

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

“Cultivo *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* para su micropropagación”.

INFORME TÉCNICO DE LA OPCIÓN CURRICULAR EN LA MODALIDAD DE:
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO BIOTECNOLOGO

PRESENTA
LUCERO LÁZARO PONCIANO

DIRECTOR

María del Carmen Oliver Salvador

México, D.F., Junio 2013

DEDICATORIA

Dedico este trabajo con todo mi cariño principalmente a Dios por permitirme haber llegado hasta este momento tan importante en mi formación profesional. A mi familia Alicia Ponciano Rodríguez, Héctor Lázaro Arreola y a mi hermana Karen Nayeli Lázaro Ponciano por ser los pilares más importantes y por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional sin importar nuestras diferencias de opiniones. A un angelito hermoso Olin Isaac Saavedra Lázaro, que ha llegado a mi vida y se ha convertido en uno de mis motores para finalizar este trabajo. Finalmente a todos mis compañeros, en especial a Ámbar Lizcano Urbina y Olin Medina Chávez porque sin el equipo que formamos, no hubiéramos logrado esa meta.

LUCERO LAZARO PONCIANO

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Molecular de la Unidad Profesional Interdisciplinaria del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Oliver Salvador, con el financiamiento de los siguientes proyectos: Proyecto SIP clave 20121097 y 20131819.

A la M. en C. Ariadna Donají Ramírez López

A quien le agradezco la oportunidad el apoyo y la paciencia, así como compartirme parte de sus conocimientos y experiencia, y el espacio para la realización de este trabajo.

“Una Universidad no puede ser una república de iguales. Ella está basada en la presunción esencial de que los mayores tienen algo que transmitir”

A mis compañeros de generación quiénes me apoyaron siempre en las buenas y las malas y con quiénes compartí los mejores momentos durante la carrera.

A todos mis profesores por transmitirme sus conocimientos y consejos a lo largo de mi formación académica.

Gracias a todas las personas que ayudaron directa e indirectamente en la realización de este proyecto.

INDICE DE CONTENIDO

Resumen.....	6
1. Introducción.....	7
2. Marco teórico.....	8
2.1. <i>Phaseolus vulgaris</i>	8
2.1.1. Botánica	8
2.1.2. Contenido nutricional	9
2.1.3. <i>P. vulgaris</i> L.en cifras.....	9
3. Regeneración <i>in vitro</i>	10
3.1. Cultivo de tejidos vegetales	10
3.2. Reguladores de crecimiento vegetal	12
3.3. Micropropagación	13
4. Micropropagación de <i>P.vulgaris</i>	14
5. Justificación	15
6. Objetivos	15
6.1. Objetivo general.....	15
6.2. Objetivo específico:.....	15
7. Metodología.....	16
7.1. <i>Materiales</i>	16
7.1.1. Medio de cultivo para tejido vegetal.	16
7.1.2. Medio de Inducción de callos	16
7.1.3. Medio de enraizamiento.	16
7.2. <i>Métodos</i>	16
7.2.1. Material vegetal.....	16
7.2.2. Limpieza y Sanitización de semillas	16
7.3. Germinación de Semillas	17
7.4. Sanitización de explantes.	17
7.5. Inducción de callos.....	17
7.6. Medio Enraizamiento de brotes.....	18
8. Resultados y discusión.....	19
8.1. Cultivo aséptico.	19
8.2. Condiciones de germinación de <i>Phaseolus vulgaris in vitro</i>	20
8.3. Inducción de callos en hojas verdaderas y tallos.....	21

8.4.	Inducción de callos a partir de yemas axilares de <i>P. vulgaris</i>	24
8.5.	Inducción de raíces y desarrollo de plántulas a partir de brotes de <i>P. vulgaris</i> ..	25
8.6.	Transferencia de plántulas <i>in vitro</i> de <i>P. vulgaris</i> a tierra.	26
9.	CONCLUSIONES.....	28
10.	RECOMENDACIONES PARA UN TRABAJO FUTURO.....	29
11.	REFERENCIAS CITADAS	30

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Porcentaje de contaminación en los protocolos ensayados.	19
Cuadro 2.	Porcentaje de germinación en los protocolos ensayados.	20

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Respuestas generadas en los cultivos <i>in vitro</i> por auxinas y las citocininas. Tomado de Introducción al cultivo de tejidos vegetales 1999.....	13
Figura 2.	Condiciones de germinación de <i>P. vulgaris</i> var. AH (A) y al transcurrir las dos semanas del cultivo (B).	20
Figura 3.	Explantes de hojas verdaderas (A con BAP y C con BAP+ 2,4-D) y de tallos (B con BAP y D con BAP+ 2,4-D). Al inicio del cultivo.	21
Figura 4.	Inducción de callos con hojas verdaderas (A con BAP Y C con BAP +2,4-D) y de tallos (B con BAP Y D con BAP+ 2,4-D), a dos semanas de cultivo.	22
Figura 5.	. Inducción de callos con hojas verdaderas (A con BAP) y tallos (B con BAP), a tres semanas de cultivo.....	23
Figura 6.	Inducción de callos a partir de yemas de <i>P. vulgaris</i> , a 2 semanas.....	24
Figura 7.	Inducción de brotes a partir de yemas axilares, a tres semanas.....	24
Figura 8.	Brotes a partir de callos provenientes de yemas axilares.....	25
Figura 9.	Brotes en medio de enraizamiento con (A) y sin (B) regulador de crecimiento. .	25
Figura 10.	Formación de plántulas a partir de brotes de <i>P. vulgaris</i> , a dos semanas del cultivo.	26
Figura 11.	Transferencia de plantas <i>in vitro</i> de <i>P. vulgaris</i> a tierra.	26

Resumen

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es un cultivo económicamente importante y una de las principales leguminosas para consumo humano en América Latina, África y Asia. No obstante su cultivo es limitado principalmente debido a patógenos virales, hongos, bacterias, insectos, falta de tolerancia a la sequía y a la falta de nutrientes en el suelo. Por tanto, existe un gran interés en el desarrollo de nuevos cultivares de frijol con que permitan resolver las problemáticas que aquejan a estos cultivos, por medio de modificación genética, de esta planta, con algún gen de resistencia (p.ej. sequía).

Sin embargo, el cuello de botella para la utilización de esta tecnología son los protocolos eficientes para dicha planta y a la fecha existen pocos reportes que son específicos para ciertas variedades. En este trabajo se realizó un cultivo *in vitro* de *P. vulgaris* estudiando diferentes factores y condiciones del cultivo, para establecer un protocolo de regeneración de esta leguminosa. Con lo cual nos permitirá el mejoramiento por medio de transformación genética.

1. Introducción

Dentro del grupo de las leguminosas que poseen semillas comestibles, el frijol común corresponde a una de las más importantes. Actualmente se encuentra distribuido en los cinco continentes como un componente esencial en la dieta y de suma importancia para agricultores de pequeña escala en América Latina y África (Singh, 1996), siendo el cultivo de frijol una fuente importante de proteína de alto nivel de consumo y bajo costo para las familias de bajo recursos (CIAT, 1992 y Rodríguez, 1996).

Sin embargo el cultivo de frijol se ve afectado principalmente por una serie de factores bióticos (hongos, bacterias, nematodos, virus, insectos) y factores abióticos (sequía, heladas, salinidad, etc.) que afectan gravemente a la producción de este cultivo. La adaptabilidad y la productividad de las leguminosas es limitada mayormente por factores abióticos como la sequía calor, frío, inundaciones, la salinidad y minerales tóxicos; aunque el tipo y la gravedad de los factores dependen de la ubicación de los cultivos. Además los cultivos bajo estrés abiótico suelen ser más susceptibles a hierbas malas, insectos y enfermedades, lo cual aumentará considerablemente las pérdidas (Reddy *et al.*, 2004).

Durante los últimos años, aumentar la producción de frijol se ha conseguido principalmente al uso de grandes cantidades de productos químicos aplicados (fertilizantes, herbicidas, pesticidas o insecticidas), la mecanización, así como las técnicas de mejora. Estas prácticas, sin embargo han generado diversos problemas económicos y ecológicos, en particular la contaminación del medio ambiente y la necesidad de suministro de energía extra.

Al mismo tiempo el avance y mejoramiento convencional de los granos se ve obstruido en muchos aspectos. Debido al largo tiempo de cultivo y selección recurrente, la diversidad del frijol ha sido erosionada y ha llegado a ser muy estrecha. Los métodos biotecnológicos ofrecen superar estas limitaciones y llevar a una mejora en la producción de frijol de diferentes maneras: a) modificación de los métodos de producción, esto contribuirá a incrementar la resistencia o tolerancia a pesticidas y enfermedades, mejora de la calidad de las semillas y la arquitectura de la planta (Zambre *et al.*, 2002).

El cultivo de tejidos y la regeneración de plantas de frijol común se ha descrito con cierto grado de éxito en los últimos años y representan una alternativa de cultivo para las especies de *Phaseolus*, sin embargo el desarrollo de un sistema óptimo en la regeneración *in vitro* ha tenido serias dificultades desde los primeros intentos realizados por Hildebrandt en 1963 y 1975, y otro intento realizado por. hasta a fecha no se logrado tener un metodo eficiente de regeneración, por la poca areproducibilidad en estos protocolos, lo que representa un gran desafío por lo recalcitrante de esta planta (Lonescuet *al.*, 1995; Gatica *et, al* 2012; Quintero *et, al* 2012; Kanchiswamy *et al.*, 2008).

La aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro* pueden disminuir del tiempo y el costo necesario para generar nuevas variedades y con el uso de ingeniería genética, facilitar la propagación de individuos con características de resistencia a factores bioticos y abioticos con lo cual se pueden incrementar la producción de estos cultivos.

2. Marco teórico

2.1. *Phaseolus vulgaris*

2.1.1. Botánica

El frijol común (*Phaseolus sp.L*) es uno de los cultivos más viejos del nuevo mundo, y el de mayor consumo a nivel mundial (Veltcheva y Svetleva 2005). Pertenece a la familia de las legumbres (Fabaceae), la cual comprende 643 géneros y 18000 especies, agrupadas en 40 tribus. La tribu Phaseoleae es por mucho el grupo más importante económicamente, ya que contiene el 75% de las legumbres comercializadas en el mundo (Broughton *et al.* 2003). El fruto es una vaina de dos valvas, las cuales provienen de un ovario comprimido; con dos suturas que aparecen en la unión de las dos valvas: la dorsal o placentar y la ventral; son de colores diversos, uniformes o con rayas. La semilla es exalbuminosa y externamente presenta la testa, el hilum, el micrópilo y la rafe: internamente está constituida por el embrión, el que a su vez está formado por la plúmula, las dos hojas primarias, el hipocótilo, los dos cotiledones y la radícula (CIAT, 1984).

2.1.2. Contenido nutricional

Su alto contenido de proteínas, minerales, vitaminas (complejo B) y aminoácidos esenciales (lisina, fenilalanina y leucina) lo hacen un complemento natural de los cereales, ya que complementa con proteínas los requerimientos nutritivos no proporcionados por otros cultivos como el maíz y arroz; por eso se considera como la principal fuente de proteína en la población de bajos recursos (Cázares *et al.*, 2003; Estrada, 2006). El frijol también es buena fuente de fibra cuyo valor varía de 14-19 g/100 g del alimento crudo, del cual hasta la mitad puede ser de la forma soluble.

Por otro lado aunque el frijol es rico en aminoácidos esenciales, es deficiente en aminoácidos que contiene azufre, como la metionina; sin embargo las proteínas de los cereales proporcionan este aminoácido, en tanto que carecen aminoácidos esenciales como la lisina. Así el consumo equilibrado de leguminosas y cereales (1:2), generalmente alivia estas deficiencias naturales y asegura una dieta balanceada (Bresanni, 1983). Desafortunadamente en muchos casos, esta relación óptima es muy difícil de alcanzar, ya que los rendimientos en la producción de leguminosas en el mundo son aún limitantes.

2.1.3. *P. vulgaris* L. en cifras

El frijol ha sido, por milenios, uno de los alimentos básicos en las regiones con latitudes bajas y medias del continente americano. Este cultivo presenta una diversidad, no solo en términos de su adaptabilidad a un amplio intervalo de ambientes, sino también en cuanto a los métodos de cultivo, a su uso y su variabilidad morfológica (Shoonhoven *et al.*, 1991).

De acuerdo con Santalla *et al.*, (1998) *P. vulgaris* es económicamente la más importante de las especies dentro del género *Phaseolus*. Es originario del continente Americano; México y Centro América son considerados uno de sus centros de domesticación. Ocupa más del 90% del área cultivada de especies de *Phaseolus* en todo el mundo.

En particular, en países de Asia, África y América Latina representa una de las principales fuentes calórico-proteicas para cerca de 500 millones de personas (Broughton *et al.*, 2003).

En los últimos veinte años, el cultivo de frijol ha incrementado gradualmente, actualmente la producción mundial de frijol (semilla seca) los 19-23 millones de toneladas métricas (TM) anuales, que se siembran en 26 millones de hectáreas (ha) de las cuales 7 millones son producidas en América Latina y África (Broughton *et al.* 2003; SEPSA y FAO 2006).

De acuerdo con los informes presentados por SEPSA y la FAO (2006), el 55% de la producción total, se concentra en sólo cinco países: Brasil, India, China, Myanmar y México. Estos grandes productores son, a su vez, grandes consumidores del producto, por lo que la producción mundial se dedica en mayor medida a atender las demandas locales de cada país. En América Central, los pequeños agricultores reportan que entre los distintos cultivos, el frijol es el principal generador de ingresos, pues le atribuyen el bienestar nutricional de la familia y el subsidio económico.

En México se sembraron 1.6 millones de hectáreas (ha) en el 2008 (FAO) con un rendimiento de 0.74 Ton/ha y un valor de su producción de poco más de 10, 000 millones de pesos. La superficie de frijol en México ha disminuido paulatinamente en los últimos 10 años. El rendimiento del cultivo de frijol en México se encuentra muy por debajo de su potencial de producción y del obtenido en otras regiones del mundo como EUA, con un rendimiento de 1.92 Ton/ha. (SEPSA y FAO 2006).

El reto de los productores de frijol es sin duda mejorar su competitividad, reto que resulta difícil de alcanzar si no se incorpora el uso de tecnologías tradicionales y modernas, con el objetivo de incrementar la producción y de mejorar la productividad de manera sostenible y eficiente. A pesar de los avances alcanzados en la investigación del cultivo de frijol en México, es necesaria la realización de investigación integral de vanguardia que pueda aplicarse en el corto tiempo y que incluya un equipo interdisciplinario que pueda abarcar la problemática, tal es el caso del uso de técnicas como la regeneración *in vitro* de tejidos vegetales.

3. Regeneración *in vitro*

3.1. Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de células y tejidos vegetales (CTV) se refiere al conjunto de técnicas usadas para crecer células, tejidos u órganos vegetales *in vitro*, bajo condiciones asépticas, controladas y libres de microorganismos (Street 1977, Calva y Ríos 1999). El CTV es una herramienta invaluable para la resolución de problemas básicos y aplicados en la biología vegetal. Los principios básicos del CTV fueron definidos a principios del siglo XX por Haberlandt (1902), Hanning (1904), Küster (1909) y otros investigadores, pero fue hasta mediados del siglo cuando White (1943 y 1963) y Gautheret (1934, 1942) desarrollaron las bases en que se fundamentan los métodos actuales.

El CTV se basa en cuatro principios básicos, de cuya comprensión y manipulación depende el éxito o fracaso de cualquier trabajo. Estos principios son:

1. Elección del explante: Órgano, tejido o segmento del tejido vegetal utilizado para el inicio del cultivo. Puede ser: semilla, embrión aislado, segmento de hoja, de tallo, de cotiledón, de raíz o de órganos reproductores.
2. Elección del medio y condiciones de cultivo: Determinarán la respuesta.
 - a. Medio de cultivo: 1) Componentes esenciales, que satisfacen los requerimientos nutricionales básicos del tejido cultivado como: fuente de carbono, minerales y vitaminas. 2) Componentes opcionales: Fitohormonas o reguladores de crecimiento vegetal como: auxinas, citocininas y giberelinas
 - b. Condiciones de cultivo: Luz, fotoperíodo, temperatura y humedad.
3. Condiciones asépticas: Exclusión de cualquier agente contaminante por lo que el material vegetal y el medio de cultivo deben de esterilizarse.
4. Contaminación: Una de las condiciones básicas que se requieren para el CTV es la asepsia, es decir, la ausencia de organismos contaminantes que pudieran afectar los resultados o incluso matar al tejido vegetal cultivado. Por desgracia la contaminación de los cultivos es un fenómeno frecuente, que se ve facilitado por el hecho de utilizar medios muy ricos en nutrientes, en los cuales prospera una amplia gama de microorganismos.

La mayoría de los microorganismos contaminantes crecen muy rápidamente bajo las condiciones en que se cultivan los tejidos vegetales, por lo que su presencia se hace claramente visible a los pocos días de iniciado el cultivo.

La esterilización superficial de los tejidos vegetales se realiza básicamente mediante el empleo de compuestos químicos capaces de eliminar a los microorganismos.

Para ello se debe considerar el hecho de que cualquier agente químico que mate microorganismos también causará daño al tejido vegetal, por lo que la principal limitante en este punto es encontrar un sistema que mate la mayor cantidad de microorganismos causando el menor daño posible a las células vegetales. (Introducción al cultivo de tejidos vegetales, 1999)

Al contrario que en animales, donde la diferenciación celular es generalmente irreversible, en plantas, incluso en células maduras y diferenciadas, se retiene la capacidad para volver al estado meristemático.

El proceso de reversión de una célula diferenciada a un estado meristemático se denomina desdiferenciación. La capacidad inherente de una célula vegetal para dar una planta completa (una capacidad que es, con frecuencia, retenida incluso después de que experimente una diferenciación final en la planta) es conocida como totipotencia celular.

Para que una célula diferenciada exprese su totipotencia es necesario que primero experimente una desdiferenciación y a continuación una nueva diferenciación que la capacita para responder a ciertos estímulos del cultivo o ambientales (Bhojwaniet *al.*, 1986). Este proceso se ve influenciado mucho en las condiciones del cultivo, principalmente en la influencia de los reguladores de crecimiento vegetal.

3.2. Reguladores de crecimiento vegetal

El desarrollo de cualquier tejido vegetal es un proceso sumamente complejo en el cual interviene un gran número de factores externos e internos cuyos mecanismos precisos de acción en muchos casos no están muy claros. Entre los factores internos que controlan el desarrollo de los diferentes tejidos de una planta destacan los llamados **reguladores de crecimiento vegetal (RCV)**, también conocidos como hormonas vegetales o fitohormonas.. (Introducción al cultivo de tejidos vegetales, 1999)

Los RCV son compuestos orgánicos sintetizados por la propia planta, que en muy pequeñas cantidades alteran el crecimiento o los patrones de desarrollo de los tejidos vegetales. Los RCV se clasifican en cinco grupos básicos dependiendo: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno (Introducción al cultivo de tejidos vegetales, 1999).

Se destaca el uso de RCV en el CTV en el manejo de los tipos, concentraciones y combinaciones de estos compuestos en un medio de cultivo que pueden manipular hasta cierto grado el desarrollo de los tejidos y las respuestas deseadas.

Debido a lo anterior, el ejemplo del balance entre auxinas/citocininas en un cultivo *in vitro* suele ser importante en la respuesta, como se puede ver en la figura 1.

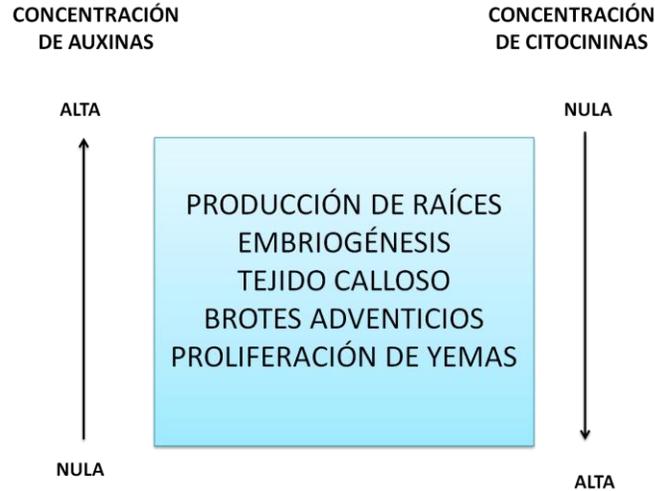


Figura 1. Respuestas generadas en los cultivos *in vitro* por auxinas y las citocininas. Tomado de Introducción al cultivo de tejidos vegetales 1999.

Por lo anterior el correcto uso de los RCV en cultivo *in vitro* de tejidos suele ser determinante para el éxito o fracaso del sistema y en consecuencia de su micropropagación.

3.3. Micropropagación

Se llama micropropagación a la propagación asexual de plantas utilizando técnicas de cultivo de tejido *in vitro*. Ésta es una de las aplicaciones más utilizadas que componen la llamada biotecnología vegetal, ello se debe a su enorme productividad al comparársele con las técnicas tradicionales de propagación de plantas. Algunas características y ventajas de la micropropagación son:

1. Sistema de propagación clonal: Manteniendo las características genotípicas del material inicial.
2. Sistema independiente al exterior: Proceso en laboratorio con condiciones controladas.
3. Cantidad limitada de material vegetal para la obtención de plantas.
4. Espacio reducido y tiempo cortos para realizar el proceso.
5. Mayor consistencia en la calidad del producto, debido a que los explantes se encuentran libres de bacterias, hongos e incluso virus.

La importancia de tener una buena técnica de micropropagación reside en que se podrá multiplicar vegetativamente variedades de interés agrícola de manera sencilla y económica, obteniendo así un gran número de individuos genéticamente idénticos en un corto período de tiempo.

4. Micropropagación de *P.vulgaris*.

La aplicación de las herramientas de la biotecnología al mejoramiento del cultivo de frijol ha sido limitada, por carecer de protocolos eficientes de regeneración *in vitro* para los cultivares de *P. vulgaris*L. El primer reporte de regeneración data de 1976, cuando Crocomo regeneró plantas de frijol a partir de explantes (ejes embrionarios) cultivados en un medio complementado con extracto de semillas de frijol (citado por Malik y Saxena, 1992).

Los recientes avances en el cultivo de tejidos han ofrecido la oportunidad de producir cultivos que no podría ser obtenido por métodos convencionales de mejoramiento, pero los protocolos de regeneración están influenciados por el genotipo. La respuesta y capacidad de regeneración del cultivo *in vitro* varía significativamente entre diferentes genotipos y variedades del frijol. Estos factores son importantes en la respuesta *in vitro* de *P. vulgaris* (Santalla *et al.*, 1998).

La regeneración *in vitro* de *P. vulgaris* L. sigue siendo un cuello de botella difícil, porque son poco repetibles de lograr y un proceso de baja eficiencia. Quintero *et al.*, (2010) y Gatica *et al.*, (2010) mencionan que la semilla de esta leguminosa es altamente recalcitrante a la regeneración *in vitro* quizá como resultado de una larga historia de endogamia y selección para genotipos de alto rendimiento, lo que lleva a reducir la variación en especies nuevas.

Disponer de un protocolo de regeneración es indispensable como paso previo a la transformación genética de modo que a partir de una o varias células transformadas sea posible obtener un individuo adulto con las características deseadas.

5. Justificación

El frijol (*P. vulgaris*) representa un alimento tradicional de la dieta de la población de escasos recursos, siendo uno de los cultivos de mayor importancia en nuestro país. Con el fin de aumentar la productividad y calidad de éste es necesario implementar procedimientos efectivos, encaminados a resolver los principales problemas que afectan su cultivo; tales como plagas por bacterias, hongos e insectos, sequía, tiempo y cantidad de producción.

Actualmente la inexistencia de protocolos eficientes, rápidos y reproducibles para la regeneración de *P. vulgaris* ha hecho imposible hacer la modificación genética del frijol con algún gen de resistencia; con lo cual se podría aumentar la productividad de este cultivo. Por lo tanto es necesario contar con un protocolo de regeneración para lograr mayor productividad del cultivo.

6. Objetivos

6.1. Objetivo general

- Establecimiento de un cultivo *in vitro* para la micropropagación de *Phaseolus vulgaris* var. AH

6.2. Objetivo específico:

- Determinación de las condiciones de asepsia de semillas del frijol para el cultivo *in vitro*.
- Determinación de las condiciones de germinación de las semillas.
- Establecimiento de las condiciones de inducción de callos para la micropropagación.

7. Metodología

7.1. Materiales

7.1.1. Medio de cultivo para tejido vegetal.

Medio MS (Murashige and Skoog, 1962) mezcla basal de sales (4.3 g/L), Agar bacteriológico (5 g/L) y 6-bencilaminopurina (BAP 1.12 mg/L). El pH 5.7, se esterilizó en autoclave por 15 min a 121 °C y 15 psi.

7.1.2. Medio de Inducción de callos

Medio de Inducción de callos consistió en medio MS, mezcla basal de sales, sacarosa (3% w/v), Agar bacteriológico (5 g/L), BAP (1.12 mg/L) y Ácido 2,4- Diclorofenoxiacético (2,4-D) (0.5 mg/L), Ácido ascórbico (150 mg/L) como antioxidante y Vitaminas MS (1mL/L), pH 5.7 y se esterilizó en autoclave por 15 min a 121 °C y 15 psi.

7.1.3. Medio de enraizamiento.

Se probaron dos formulaciones del medio de enraizamiento: medio MS, mezcla basal de sales, sacarosa (3% w/v), Ácido indol butírico (AIB 1 mg/L), Ácido ascórbico (300 mg/L) y Vitaminas MS (1mL/L), pH 5.7 y otra formulación solo sin AIB. Estos se esterilizaron en autoclave por 15 min a 121 °C y 15 psi.

7.2. Métodos

7.2.1. Material vegetal.

Se utilizaron semillas de frijol Azufrado Higuera FRI-001-220995 (AH). Proporcionadas por El Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

7.2.2. Limpieza y Sanitización de semillas

Para la limpieza y sanitización de las semillas se utilizaron tres protocolos.

7.2.2.1. Protocolo uno

Las semillas de *P. vulgarisse* colocaron en una solución de H₂SO₄ durante un minuto, después dentro de la campana de flujo laminar se sumergieron en una solución de etanol al 70% durante un minuto y finalmente se adiciono hipoclorito de sodio al 1.12% más dos gotas de Tween 20® durante 20 min. En cada paso las semillas fueron enjuagadas con agua destilada estéril.

7.2.2.2. Protocolo dos

Se realizó como el protocolo uno cambiando la concentración de etanol a 95% (v/v) y de hipoclorito de sodio con una relación de (1:4).

7.2.2.3. Protocolo tres

Se realizó como el protocolo uno, sólo aumentando el tiempo de exposición de H₂SO₄ concentrado a 80 segundos y el tiempo de hipoclorito de sodio al 1.12% con dos gotas de Tween 20® a 25 minutos.

7.3. Germinación de Semillas

Tres semillas fueron colocadas en cajas magenta de 300 ml que contenían 40 ml de medio MS BAP para su germinación, se mantuvieron los cultivos durante siete días en oscuridad y tres días con una intensidad luminosa de 131.9 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ a 27°C con 32% humedad.

7.4. Sanitización de explantes.

Una vez transcurrido el tiempo de germinación, las hojas verdaderas, yemas y tallos, obtenidos de los cultivos, fueron utilizados como explantes.

Se retiraron de forma estéril de las plántulas crecidas en condiciones asépticas, tallos, hojas verdaderas y yemas axilares y se transfirieron a un vaso de precipitados, previamente esterilizado, y se procedio a la sanitización de los explantes se utilizaron dos procedimientos.

7.4.1. Procedimiento uno

Las plántulas se sumergieron en una solución de etanol al 70% y se agitaron manualmente durante 30 segundos, una vez transcurrido el tiempo las plántulas se enjuagaron cinco veces con agua destilada estéril, para eliminar los residuos de etanol y finalmente se sumergieron en agua destilada estéril para su posterior uso.

7.4.2. Procedimiento dos

Las plántulas se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% (v/v) con dos gota de Tween 20. Se agitaron manualmente durante dos minutos y después las plántulas fueron enjuagadas, hasta retirar el exceso de jabón, este último paso se repitió dos veces. Una vez terminado el tratamiento, las plántulas se sumergieron en agua destilada estéril para su posterior uso.

7.5. Inducción de callos

Para la inducción de callos se probaron dos formulaciones de medio MS abajo indicados.

7.5.1. Formulación del medio MS1

Una vez limpiadas las plántulas, se procedió al corte de los explantes. Los tallos fueron cortados con una longitud de un cm y cada hoja verdadera fue cortada en tres segmentos denominados superior, medio y basal aproximadamente de 1 cm² y fueron colocados en cajas petri con 20 mL con medio de cultivo MS y BAP. Los cultivos estuvieron con las mismas condiciones ambientales que en el proceso de germinación.

7.5.2. Formulación de medio MS2

Se utilizaron los mismos explantes y también se cortaron las yemas axilares, de longitud variable, la sanitización se hizo como en 7.5.1, solo que el medio que se utilizó es MS, BAP y 2,4-D.

7.6. Medio Enraizamiento de brotes

A partir del cultivo de callos provenientes de yemas axilares, se cortaron los brotes generados en los callos a los 21 días de cultivo y se transfirieron a medio de enraizamiento (7.1.3) con y sin AIB (1 mg/L) a las mismas condiciones de intensidad luminosa, temperatura y humedad de la germinación de las semillas.

7.7. Transferencia de plantas de *P. vulgaris* obtenidas por organogénesis a tierra.

Las plantas obtenidas por organogénesis indirecta a partir de yemas axilares se transfirieron a macetas con una mezcla de perlita, vermiculita, peatmoss y fibra de coco previamente hidratada por capilaridad.

Las macetas se mantuvieron en el cuarto de cultivo con las siguientes condiciones: 68% de humedad a 26 °C y se tuvo cuidado de mantener a humedad de las macetas lo cual se hizo suministrando agua por capilaridad.

8. Resultados y discusión

8.1. Cultivo aséptico.

La sanitización de las semillas se realizó con los tres protocolos que se muestran en el apartado 7.2.2, el porcentaje de contaminación de los cultivos se observa en el cuadro 1.

Cuadro 1. Porcentaje de contaminación en los protocolos ensayados.

PROTOCOLO	Total de semillas	Porcentaje de contaminación
1	146	51.3 %
2	147	18.3 %
3	75	6.66 %

El objetivo del cultivo aséptico es obtener un porcentaje de contaminación bajo, pero que pueda garantizar un porcentaje de germinación, elevado. Como se observa anteriormente, en el cuadro 1, el protocolo 1 presenta un porcentaje de contaminación mayor al 50%, siendo este el valor más elevado, lo cual indica que este tratamiento aplicado no asegura la eliminación de todos los microorganismos presentes en las semillas.

Por otro lado el protocolo 2 presenta el porcentaje de contaminación intermedio con una valor de 18.3%, aunque este protocolo no elimina toda la contaminación, su porcentaje asegura una asepsia mayor y aceptable.

Sin embargo el protocolo 3 presenta el menor porcentaje de contaminación con solo 6.6%, lo que indica ser hasta el momento, el mejor tratamiento de asepsia de las semillas.

Es importante distinguir que un porcentaje bajo de contaminación no asegura un porcentaje alto de germinación, dentro del cultivo *in vitro*, más bien debe de existir una relación que favorezca tanto la germinación como la eliminación de microorganismo. Lo óptimo sería la eliminación completa de agentes contaminantes y la obtención del 100% de germinación, sin embargo, la mayoría de los tratamientos empleados para los tejidos vegetales, llegan a dañar siempre, en cierto grado las células, es por ello que se desea obtener un porcentaje que permita destruir la mayor cantidad de microorganismos presentes en los tejidos y que a su vez nos proporcione la mayor cantidad de germinación de plántulas.

8.2. Condiciones de germinación de *Phaseolus vulgaris* in vitro.

Para el proceso de germinación de las semillas de frijol var. AH los cultivos se mantuvieron durante 10-14 días como se observa en la figura 2.

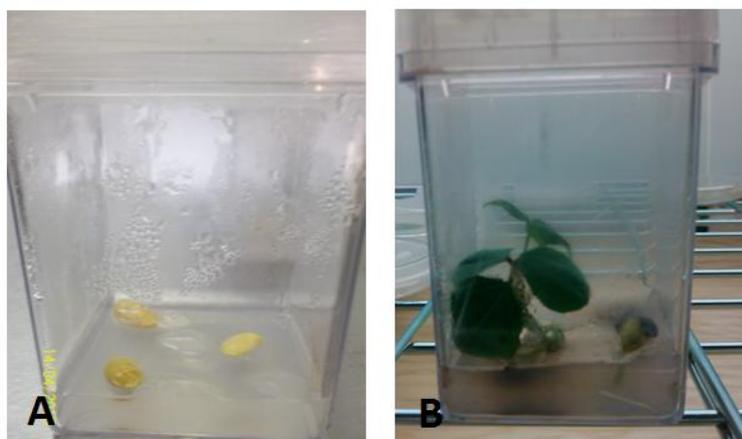


Figura 2. Condiciones de germinación de *P. vulgaris* var. AH (A) y al transcurrir las dos semanas del cultivo (B).

Las condiciones de germinación de las semillas fueron las mismas para los 3 protocolos utilizados y el porcentaje de germinación de cada uno se muestra en el cuadro 2.

Cuadro 2. Porcentaje de germinación en los protocolos ensayados.

PROTOCOLO	Total de semillas	Porcentaje de germinación	Plántulas totales
1	146	15.3 %	25
2	117	14.9 %	17
3	75	4.44 %	2

Como vimos anteriormente en el establecimiento aséptico, el protocolo 3 fue el tratamiento más recomendable, con un menor porcentaje de contaminación, sin embargo la germinación de semillas utilizando este tratamiento, no es tan favorable, obteniendo el menor porcentaje de germinación cuyo valor es 4.4%.

Este resultado supone que el tratamiento aséptico utilizado es demasiado agresivo, el cual está dañando considerablemente las células vegetales, evitando la germinación de las semillas.

Por otro lado, para el protocolo 1 a pesar del alto porcentaje de contaminación se obtuvo un mayor porcentaje de germinación; debido a que las células vegetales no presentaron demasiado daño, pero el tratamiento aséptico no es suficiente para remover la mayor cantidad de agentes contaminantes.

Finalmente el protocolo 2 muestra el porcentaje de germinación intermedio con un valor de 14.9 %, este es muy cercano al protocolo 1, sin embargo a diferencia de este último, su porcentaje de contaminación es menor. Estos resultados nos indican que la germinación, se ve limitada con el tratamiento de sanitización y con este se logró eliminar una gran cantidad de contaminación.

8.3. Inducción de callos en hojas verdaderas y tallos.

Una vez transcurrido el tiempo de cultivo, se tomaron los tallos y las hojas verdaderas de las plántulas como explantes y se aplicaron los procedimientos 1 y 2 de sanitización.

Para cada procedimiento, los explantes de hojas verdaderas se cortaron en tres segmentos los cuales se colocaron de forma axial, mientras que los tallos se cortaron de un cm de longitud y se colocaron en cajas petri en medio para inducir callos.

La figura 3 muestra los explantes al inicio del cultivo.

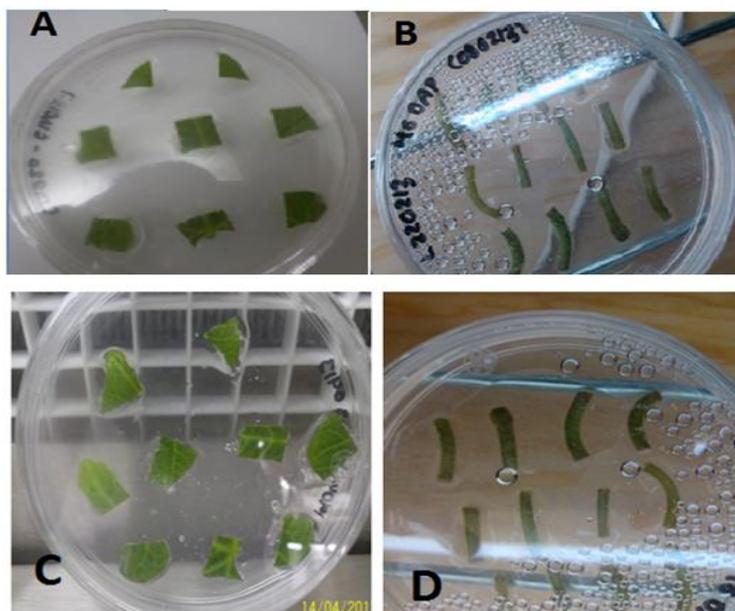


Figura 3. Explantes de hojas verdaderas (A con BAP y C con BAP+ 2,4-D) y de tallos (B con BAP y D con BAP+ 2,4-D). Al inicio del cultivo.

La presencia de callos se observó en 6 días y los cultivos se mantuvieron durante dos semanas hasta el recambio de medio. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.

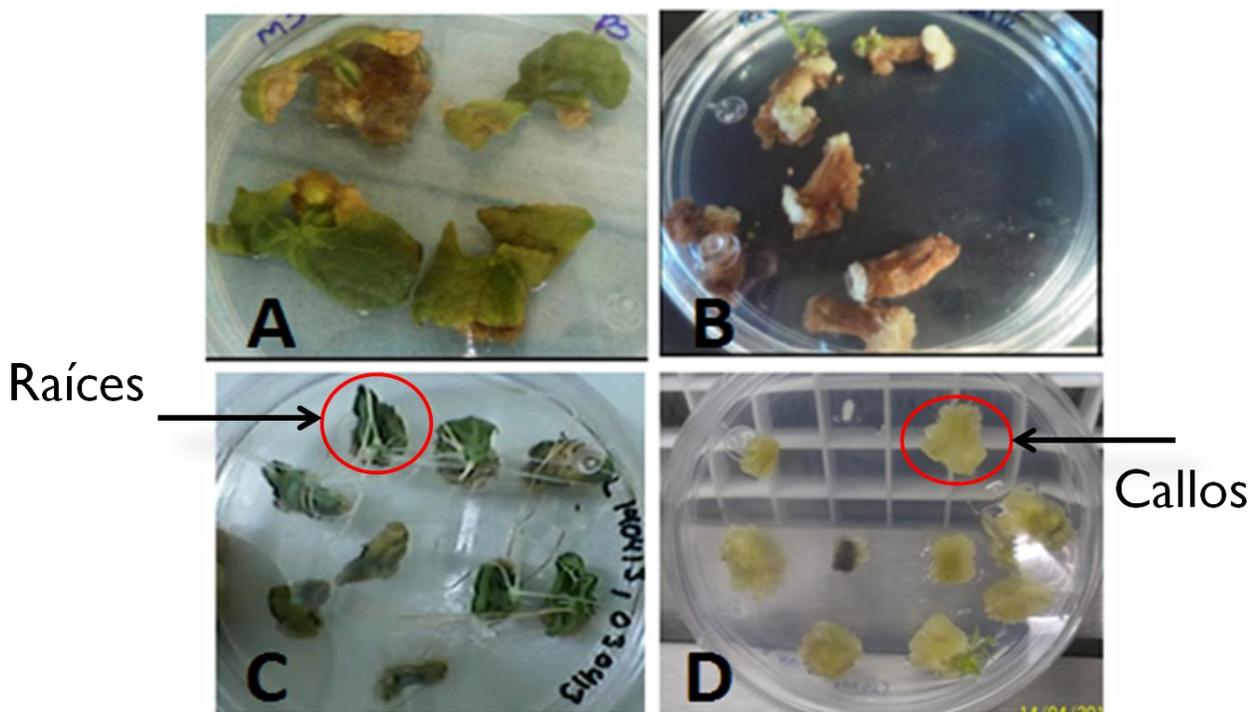


Figura 4. Inducción de callos con hojas verdaderas (A con BAP Y C con BAP +2,4-D) y de tallos (B con BAP Y D con BAP+ 2,4-D), a dos semanas de cultivo.

Como se observa en la figura anterior, en los explantes de hoja verdaderas como de tallo, utilizando BAP, no hay presencia de tejido calloso y ambos tipos de explantes presentan oxidación.

Sin embargo, utilizando BAP + 2,4-D, en los explantes de tallo hay formación de tejido calloso, mientras que en las hojas verdaderas se observa crecimiento de raíces. Las respuestas de ambos procedimientos a simple vista son diferentes y existen diversos factores que influyen en los resultados obtenidos.

Para el procedimiento 1, tanto las hojas como los tallos, no manifiestan ningún tipo de respuesta, lo que nos dice, en primera instancia, que bajo las condiciones de cultivo a las que está sometido el tejido no es posible la formación de callos, ni raíces.

Sin embargo hay que mencionar que este resultado se ve influenciado por diferentes factores, en primera el papel que juega el tratamiento de desinfección de los explantes, para este caso uso etanol al 70% durante un minuto, es posible que se hayan dañado las

células vegetales o incluso haber matado el tejido, impidiendo así la división celular y la formación de callos. En este caso se recomendaría bajar la concentración del etanol o usar otro tipo de agentes desinfectantes como el hipoclorito de calcio o el cloruro de mercurio.

En segunda, se sabe que los reguladores de crecimiento, son una parte importante para generar un patrón de desarrollo del tejido, en este caso, se utilizó BAP (6-bencilaminopurina-HCl) que favorece la división celular, sin embargo, al no existir ninguna respuesta en los explantes, se puede suponer que la concentración utilizada, de este regulador no es la suficiente para la inducción de callos, siendo necesario aumentar la concentración de este o el uso o combinación de otro tipo de reguladores.

Por otro lado utilizando BAP+2,4-D en los explantes, se manifiestan respuestas diferentes tanto en hojas verdaderas como en tallos. Estos resultados, al igual que en el procedimiento 1, se ven influenciados por los dos factores ya antes mencionados, la desinfección de los explantes y medio de inducción de callos, sin embargo ambos tejidos estuvieron sometidos a las mismas condiciones de cultivo, asumiendo finalmente que la diferencia de respuesta obtenida se debe principalmente al tipo de explante elegido.

Los explantes de hojas verdaderas y tallos con BAP se mantuvieron una semana más en cultivo como se observa en la figura 5.

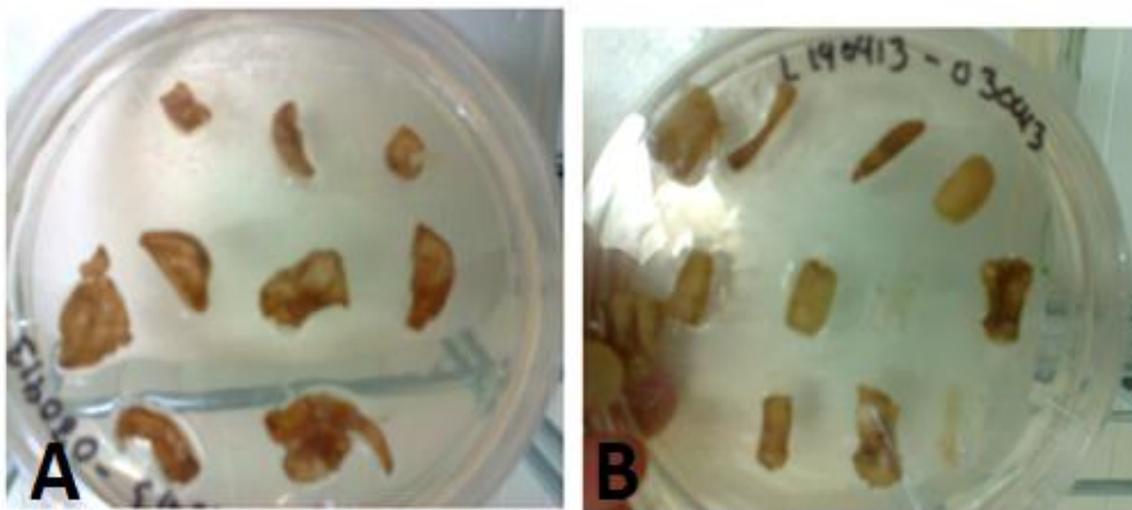


Figura 5. . Inducción de callos con hojas verdaderas (A con BAP) y tallos (B con BAP), a tres semanas de cultivo

8.4. Inducción de callos a partir de yemas axilares de *P. vulgaris*.

A los 10 días de germinación se tomaron como explantes yemas axilares y fueron transferidas a medio MS+BAP y 2,4-D, la respuesta se observó a los 6 días de cultivo (figura 6).

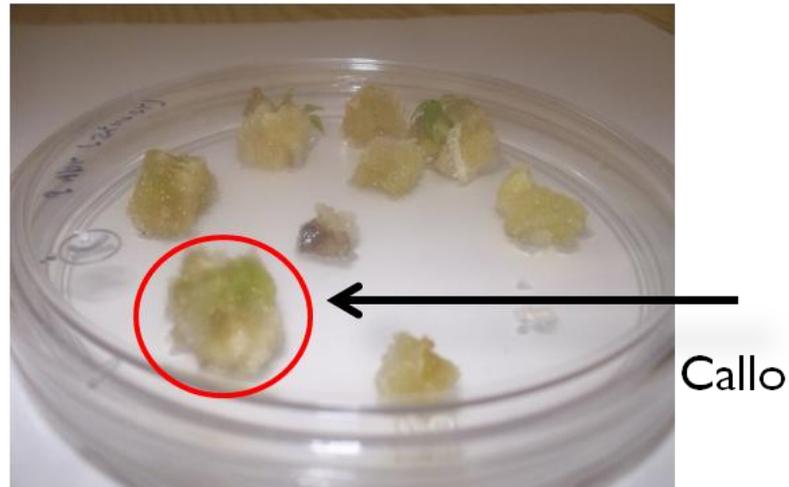


Figura 6. Inducción de callos a partir de yemas de *P. vulgaris*, a 2 semanas.

Como se aprecia en la imagen las yemas presentaron formación de tejido calloso a los 6 días de cultivo, el cual era suave y de un color amarillo a verde.

La diferenciación de brotes comenzó a aparecer, aproximadamente a los 14 días después del cultivo (Figura 7).

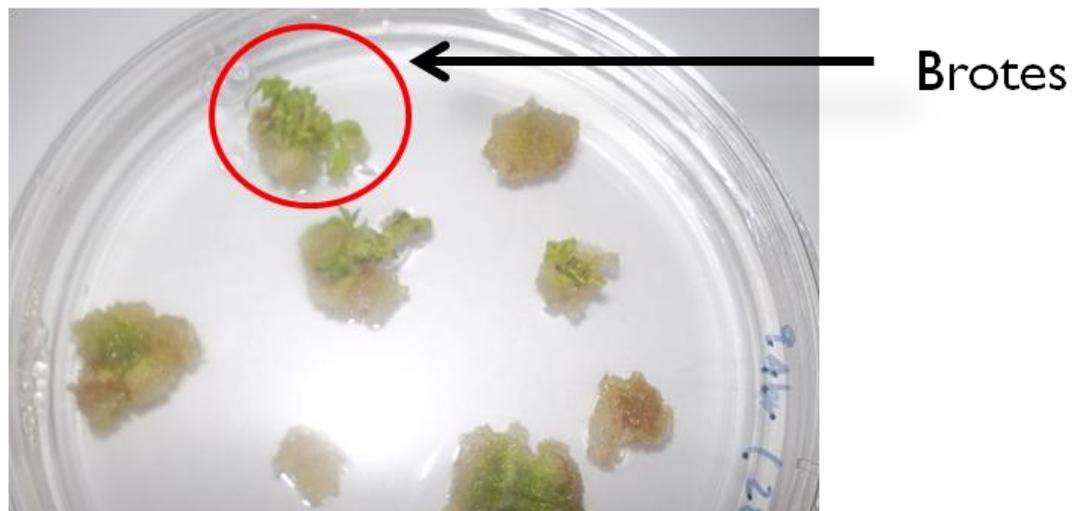


Figura 7. Inducción de brotes a partir de yemas axilares, a tres semanas

A diferencia de los tallos, en las que solo hubo presencia de tejido calloso, en las yemas se logró la diferenciación de las células y organogénesis, para la formación de brotes, los

callos presentaron aproximadamente de 3-5 brotes en presencia de 2,4-D y BAP, como se muestra en la figura 8.



Figura 8. Brotes a partir de callos provenientes de yemas axilares.

8.5. Inducción de raíces y desarrollo de plántulas a partir de brotes de *P. vulgaris*.

Los brotes se transfirieron a medio de enraizamiento con y sin AIB, como se observa en la figura 9.

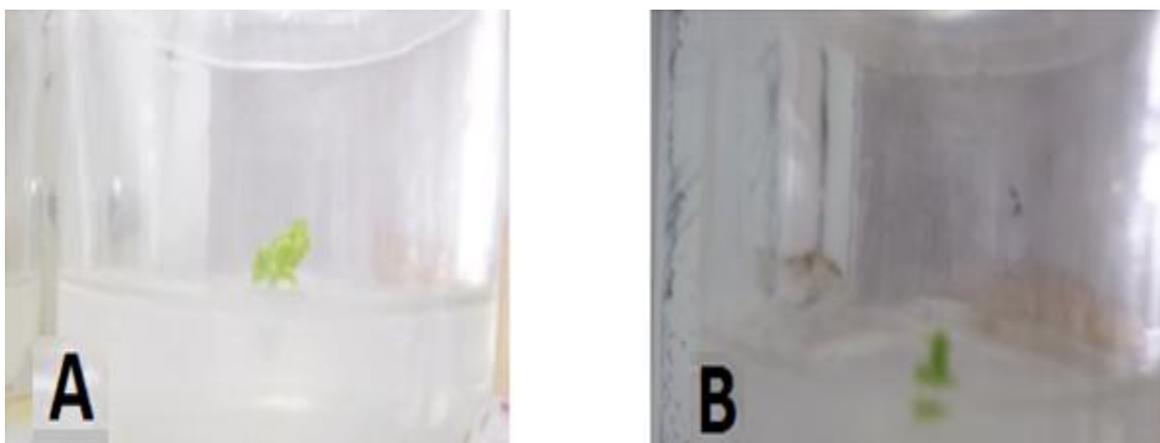


Figura 9. Brotes en medio de enraizamiento con (A) y sin (B) regulador de crecimiento.

Los cultivos se mantuvieron durante dos semanas, hasta el desarrollo de las plántulas, como se ve en la figura 10.

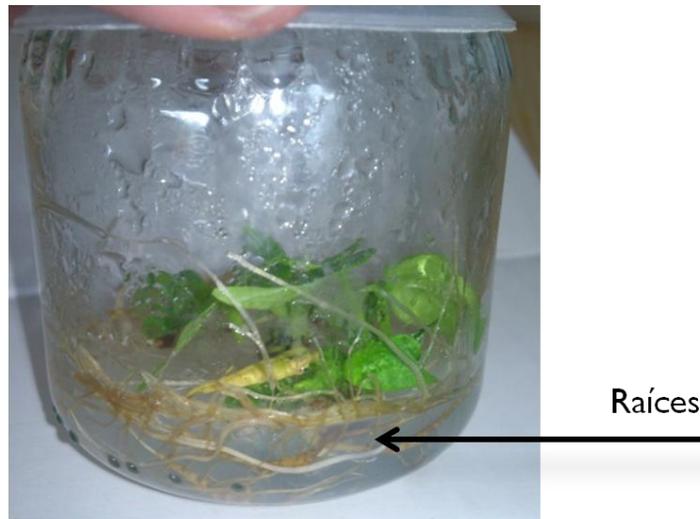


Figura 10. Formación de plántulas a partir de brotes de *P. vulgaris*, a dos semanas del cultivo.

Con se observa en la figura anterior, la elongación de raíces con AIB a una semana es mayor en comparación con el medio para enraizar sin AIB.

8.6. Transferencia de plántulas *in vitro* de *P. vulgaris* a tierra.

Las plántulas enraizadas por el método anterior se transfirieron a tierra, como se observa en la figura 11.



Figura 11. Transferencia de plantas *in vitro* de *P. vulgaris* a tierra.

Una alta humedad favorece la presencia de hongos; en las condiciones de humedad (68 %) a las que se sometieron las plantas hubo presencia de hongos lo que ocasiono la muerte de estas.

Algunas variables, como la selección de explantes, condiciones de crecimiento, adición de reguladores de crecimiento modifican el proceso de regeneración *in vitro* (Zambre et al, 2001). De acuerdo al protocolo 1 se obtuvo un porcentaje de germinación de 15.3%, esto es contrario a lo reportado por Velázquez-Sánchez, 2012 ya que bajo las mismas condiciones de sanitización, no logró la germinación de las semillas de *P. vulgaris* var. AH. Por lo que podemos decir que esta respuesta se pudiera deber al estado fisiológico de las semillas.

Cabe mencionar que en este trabajo se usaron por vez primera explantes de tallos, y estos mostraron formación de callos poco voluminosos, mientras que las yemas axilares, mostraron tejido calloso de mayor volumen. Estos últimos callos indujeron la formación de brotes, los que se pasaron a medio de enraizamiento con la consecuente formación de raíces y desarrollo de plántulas *in vitro*.

Nuestros resultados son diferentes a los reportes de regeneración *in vitro* de *P. vulgaris*, ya que otros autores usan diferentes explantes tienen mejores respuestas para el desarrollo de plantas completas, p.e. Quintero et al., 2010, utilizaron ejes embrionarios de Negro Plus en medio MS+BAP obteniendo plantas completas con un porcentaje del 29%, sin embargo Velázquez-Sánchez, 2012 bajo las mismas condiciones no logró reproducir dicho protocolo. Mostrando, que la respuesta de los cultivos *in vitro* de *P. vulgaris*, es diferente, entre cada variedad, además que los protocolo de regeneración no son reproducibles de un autor a otro.

9. CONCLUSIONES

- Con el protocolo 2 (apartado 7.2.2.2) se logró disminuir el porcentaje de contaminación de semillas de *P. vulgaris* AH.
- Se logró incrementar el porcentaje de germinación de semillas var. AH usando el protocolo 1 de sanitización.
- Se logró la inducción de callos en los explantes de tallos y yemas de *P. vulgaris* var.AH.
- Se logró la inducción de raíces en explantes de hojas verdaderas y de yemas axilares de *P. vulgaris*.
- Se logró la inducción de brotes a partir de callos provenientes de explantes de yemas axilares de *P. vulgaris* var.AH.
- Se logró desarrollar una planta completa de *P. vulgaris* var.AH, a partir de yemas axilares, por organogénesis indirecta.

Aportación de este trabajo:

Los resultados de este estudio son base para el establecimiento de un protocolo de micropropagación de frijol (*P. vulgaris* var. AH).

10. RECOMENDACIONES PARA UN TRABAJO FUTURO

- Continuar con el estudio de las condiciones para obtener un método más eficiente de sanitización de semillas de *Phaseolus vulgaris* var. *AH*, mediante un diseño experimental de tratamientos (tipo de desinfectantes, concentración y tiempo de exposición de los mismos).
- Continuar con el estudio de las condiciones del cultivo para obtener un protocolo más eficiente y reproducible de la micropropagación del *Phaseolus vulgaris* var. *AH*. mediante un diseño experimental de las condiciones del cultivo (concentraciones y tipos reguladores de crecimiento vegetal, así como diferentes explantes, como ejes embrionarios entre otros).

11. REFERENCIAS CITADAS

Espinosa Guízar María Angélica (2007); Organogénesis in vitro de *Phaseolus vulgaris* L. var. Jamapa; Facultad de Agrobiología; Uruapan Michoacán México.

Gatica, A., Muñoz, J., Ramírez, P. and Valdez, M. (2010). In vitro plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris*): effect of N6-benzylaminopurine and adenine sulphate. *Journal of Biotechnology* Vol.13 No.1.

Ibarra, P.F.J., E.B. Cazares, G.J. A. Acosta, and R. Cuellar. El 2003." *Negro Vizcaya, nueva variedad de frijol negro brillante para el altiplano de México. Folleto técnico* 21 (2000).

Koinange, Epimaki MK, Shree P. Singh, and Paul Gepts. "Genetic control of the domestication syndrome in common bean." *Crop Science* 36.4 (1996): 1037-1045.

L.R. García¹, I. Bermúdez-Carabaloso¹, N. Veitía¹, R. Collado¹, D. Torres¹, C. Romero¹, A.Martiren (Marzo 2012).; Regeneración de plantas de cinco variedades de *Phaseolusvulgaris* L. vía organogénesis directa.; *Biología Vegetal* Vol 12 No 1:149.

López López Leobardo (2008); Regeneración in vitro de *Phaseolusvulgaris*: Influencia de fitohormonas, sales minerales y fuente de carbono; Facultad de Agrobiología, Uruapan Michoacán México.

Lourdes R. García*, Raúl Collado, Idalmis Bermúdez-Carabaloso, NoviselVeitía, Damaris Torres, (Junio, 2008); Regeneración de plantas vía organogénesis directa en *Phaseolus vulgaris* L. *Biología vegetal* Vol 8 No 2:109.

Malik, K. and Saxena, P. (1991).Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L. Promotive role of N6 enzyaminopurine in cultures from juvenile leaves.Short communication. *Planta* 184:148-150.

Pérez MolpheBalch Eugenio Martín, Ramírez Malagón Rafael (1999); Introducción al cultivo de tejidos vegetales; Universidad Autónoma de Aguascalientes; Aguascalientes Mexico.

Pérez P. J.; R, García. L; Gómez K. R (2004); Formación de callos en *Phaseolusvulgaris* L.cv. Turrialba-4 con Thidiazuron y ácido 2,4-diclorofenoxiacético; *Biología vegetal* Vol 4 No 4:233.

Quintero, A., Espinosa, E., Acosta, J., Guzmán, H. and Mora, H. (2010). Método eficiente de regeneración in vitro de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agrociencia* 44: 57-64.

Raúl Collado, Lourdes R. García, Idalmis Bermúdez-Caraballosa, Damaris Torres, Carlos Romero (Septiembre 2012); Influencia del agente gelificante en la regeneración de plantas de *Phaseolus vulgaris* L, a partir de callo organogénicos; *Biotecnología vegetal* Vol 12 No 3:143.

Santalla, M., Power, J. and Bavey M. (1998). Efficient in vitro shoot regeneration responses of *Phaseolus vulgaris* and *P. coccineus*. *Euphytica*, July 1998, vol. 102, no. 2, p. 195-202.

Svetleva, D., Velcheva, M. and Bhowmik, G. (2003). Biotechnology as a useful tool in common bean (*Phaseolus vulgaris* L) improvement. *Euphytica*, vol. 131, no. 2, p. 189-200.

Velázquez Sánchez Margarita (2012); Diseño y construcción de vectores para la transformación del cloroplasto de frijol (*Phaseolus vulgaris*); México D.F.

Velcheva M., Svetleva D, Petkova AP., Perl A (2005); In vitro regeneration and genetic transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Problems and progress; *Scientia Horticulturae* vol 107

Zambre, M., De Clercq, J., Vranova, E., Van Montagu, M., Angenon, G. and Dillen W. (1998). Plant regeneration from embryo-derived callus in *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) and *P. acutifolius* A. Gray (tepary bean). *Plant Cell Rep* 17:626–630.