



**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
DIRECCION GENERAL DE INVESTIGACION
PROGRAMA UNIVERSITARIO DE INVESTIGACION EN
ALIMENTACION Y NUTRICION -PRUNIAN-
FACULTAD DE AGRONOMIA**



**RESPUESTA DEL FRIJOL (Phaseolus vulgaris L.) A LA
REGENERACION DE PLANTAS IN VITRO**

Fernando Rodríguez Bracamonte
Coordinador

Héctor Ramazini
Ruperto Fuentes Gómez
Ana D. Arévalo
Indrid Figueroa
Investigadores

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 1997

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

Dr. Jafeth Cabrera Franco
Rector Magnífico

Dr. Otto Manuel España
Secretario General

Lic. Víctor Rodríguez Toasperm
Director General de Investigación

Dr. Carlos Sánchez Flamenco
Coordinador de Programa

Amparo Corado de Vásquez
Leticia Martínez
Unidad de Publicaciones y Divulgación

© Universidad de San Carlos de Guatemala

Se autoriza la reproducción total o parcial del contenido,
citando la fuente bibliográfica.

Los autores son responsables por el contenido de sus trabajos.

Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación - DIGI -, Edificio S-11, 3er. Piso, Ciudad Universitaria, zona 12. Ciudad de Guatemala. C.P. 01012. Teléfonos: 4767232, 4767213. Fax: 4769675 Guatemala, C.A.

e mail UDDigi@usac.edu.gt

**DIRECCION GENERAL DE INVESTIGACION
PROGRAMA UNIVERSITARIO DE INVESTIGACION EN
ALIMENTACION Y NUTRICION -PRUNIAN-
FACULTAD DE AGRONOMIA**

**RESPUESTA DEL FRIJOL (Phaseolus vulgaris L.)
A LA REGENERACION DE PLANTAS IN VITRO**

- USAC - DIGI - PRUNIAN -

633.372

Repuesta del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a la regeneración de las Plantas in vitro. / Héctor Ramazini...[et al.] ; ed. DIGI. Dirección General de Investigación, DIGI, Programa Universitario de Investigación en Alimentación y Nutrición - Guatemala : DIGI, PRUNIAN, USAC, 1997.

34 p. : il. ; 28 cm.

Bibliografía: 27-28

1. Frijol (*Phaseolus vulgaris* L:) – Investigaciones 2. Semillas de Frijol – Cultivos y medios de cultivo 3. Proteínas del Frijol 4. Nutrición de las plantas 5. Mejoramiento selectivo del Frijol 6. Callos (Botánica) I. Ramazini, Héctor Coaut. II. T.

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
2. OBJETIVOS	4
3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	4
3.1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
4. METODOLOGÍA	6
4.1 PRIMERA ETAPA	6
4.2 SEGUNDA ETAPA	7
4.2.1 Obtención de explante	7
4.2.2 Formación de callo	7
- Medio de cultivo	7
- Variables generales	8
4.2.3 Regeneración de plantas	8
- Selección de callos a trasplantarse	8
- Medio de cultivo	8
- Variables generales	9
4.2.4 Climatización de plantas	9
4.2.5 Brotación	9
4.2.6 Análisis de los datos	10
4.3 TERCERA ETAPA	11
4.3.1 Entradas a ser regeneradas in vitro	11
4.3.2 Estabilidad de las plantas regeneradas in vitro, en relación con sus progenitores	11
- Comparación taxonómica de las entradas	11
- Patrón de las proteínas totales en la semilla	11
a. Soluciones a usar	12
b. Extracción de proteínas totales	12
c. Preparación del gel	12
d. Corrida (electroforesis)	13
e. Tinción y destinción	13
f. Análisis de los electroforegramas	14
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
5.1 PRINCIPALES RESULTADOS DEL PROYECTO EN 1993	13
5.1.1 Materiales de frijol colectados	13
5.1.2 Obtención de explantes	13
5.1.3 Medios de cultivo y suplementos nutritivos	14
- Medios básicos para la formación de callos	14
- Concentración y combinación de reguladores de crecimiento en la fase de regeneración	14

5.1.4	Formación de callos.....	15
5.1.5.	Regeneración de plantas.....	15
5.2	RESULTADOS OBTENIDOS EN LA SEGUNDA ETAPA (1994)	16
5.2.1	Colecta.....	16
5.2.2	Formación de callos.....	18
5.2.3	Regeneración de plantas.....	18
5.2.4	Brotación.....	18
5.2.5	Climatación	19
5.3	RESULTADOS DE LA TERCERA FASE	20
5.3.1	Validación del protocolo.....	20
	PROTOCOLO PARA LA OBTENCION DE PLANTAS DE FRIJOL (<i>Phaseolus</i> sp) IN VITRO	22
	1. Explante	22
	2. Producción de callos.....	22
	3. Regeneración de plantas.....	23
	4. Brotación.....	24
	5. Climatización.....	24
5.3.2	Estabilidad de las plantas regeneradas in vitro, en relación con sus progenitores	25
	- Comparación taxonómica de las entradas.....	25
	- Patrón de las proteínas totales en la semilla	25
6.	CONCLUSIONES.....	26
7.	RECOMENDACIONES	26
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	27
ANEXO	29

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro No.1. Principales características de las semillas de las entradas que germinaron y se generaron como mínimo callo en 1994	17
Cuadro No.2. Medios de cultivo que indujeron callos, explante y tipo de callo por entradas	19
Cuadro No.3. Se presentan las colectas cuyos callos se subcultivaron y generaron plantas o raíces.....	20
Cuadro No.4. Materiales que se usaron para validar el protocolo y su respuesta a la inducción de callo, regeneración y brotación, así como la especie a que pertenece y su índice de similitud.....	21
Cuadro No. 5. Se presentan el número de plantas regeneradas in vitro y valores promedios del Índice de Similitud por especie de <i>Phaseolus</i>	26
Cuadro No. 6. Lista de materiales (entradas) de frijol silvestres, locales y criollos colectados	30

RESUMEN

El frijol (Phaseolus vulgaris L.) constituye uno de los granos de mayor importancia en la dieta alimenticia de la población guatemalteca, especialmente la de escasos recursos económicos, por su contribución en el 30% de la ingesta de proteínas.

El presente trabajo se realizó dentro del subprograma de Granos Básicos del Instituto de Investigaciones Agronómicas de la Facultad de Agronomía y el Programa de Alimentación y Nutrición de la Dirección General de Investigación –DIGI-. Se tuvo como objeto de estudio la variabilidad genética del frijol existente en el país, con el fin de seleccionar, caracterizar y conservar los genotipos que presenten la capacidad de regenerar plantas in vitro.

La investigación se realizó en tres etapas, la primera en 1993, realizándose primordialmente actividades de colecta de materiales locales y nativos de Phaseolus; se evaluaron los factores: materiales de frijol, explantes, medios básicos de cultivo y suplementos nutritivos, así como concentración y combinación de reguladores de crecimiento.

El segundo año (1994), se centró en la realización de estudios para la regeneración de plantas in vitro. En el tercer año (1995), se validó el protocolo para la regeneración in vitro; se realizó una caracterización morfológica de las plantas regeneradas y se comparó el patrón de la distribución de bandas de proteínas totales de las semillas, obtenidas por medio de electroforesis.

De acuerdo a los resultados, es posible la regeneración in vitro de plantas de frijol (Phaseolus sp.). La regeneración se da cuando se transfiere a medios de regeneración callos con raíces; la regeneración se encontró que está relacionada con el material usado como explante, de tal forma que explantes provenientes de semillas de P. coccineus L., P. polyanthus Green y P. vulgaris L. silvestre o con poco grado de mejoramiento regeneran plantas in vitro. Las plantas regeneradas y trasplantadas no presentaron cambios morfológicos respecto a la especie, ni en el patrón de distribución de proteínas totales de sus semillas; que puedan ser considerados significativos.

Se hace necesario continuar con estudios que tiendan a optimizar estos procedimientos.

1. INTRODUCCIÓN

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) constituye uno de los granos de mayor importancia en la dieta alimenticia de la población guatemalteca, especialmente la de escasos recursos económicos, por su contribución en el 30% de la ingesta de proteínas.

No obstante el origen mesoamericano del cultivo, aún no se cuenta con variedades que satisfagan las exigencias de los agricultores y generalmente contienen alrededor de un 20% de proteína, la cual en su mayor parte es no asimilable.

Los avances de la investigación en el cultivo in vitro en otras especies vegetales abre la posibilidad de que esta técnica se incorpore a los programas convencionales de mejoramiento genético y permita mejorar la producción y la calidad de la proteína del frijol.

Los consumidores del grano de frijol somos los llamados a mejorar genéticamente el cultivo, y considerando la regeneración in vitro como un factor a incorporar en los programas de mejoramiento se ve la necesidad de realizar estudios básicos en esta área, como: evaluación de medios de cultivo para la inducción de callo y regeneración de plantas; estudiar la respuesta de los explantes a la inducción de callo y regeneración de plantas in vitro.

En el presente trabajo se presentan la experiencias en la propagación in vitro de frijol obtenidas en el proyecto de investigación "RESPUESTA DEL FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) A LA REGENERACIÓN DE PLANTAS IN VITRO", el cual se realizó dentro del subprograma de Granos Básicos del Instituto de Investigaciones Agronómicas de la Facultad de Agronomía y el Programa Universitario de Alimentación y Nutrición de la Dirección General de Investigación –DIGI- con el cofinanciamiento del Fondo de Investigaciones de la DIGI y Presupuesto de la Facultad de Agronomía.

Durante la realización del proyecto se colectaron semillas de poblaciones de *Phaseolus* silvestres, locales y mejoradas. En algunos casos, material vegetal (hojas y tallos), los cuales se trabajaron en el laboratorio de Cultivo de Tejido de la Facultad de Agronomía, lográndose la regeneración in vitro de plantas de frijol de 23 colectas, las cuales se llevaron al campo en donde se caracterizaron morfológicamente, se comparó el patrón de distribución de las bandas de proteínas totales obtenidas de las semillas, mediante electroforesis, no observándose cambios significativos entre las plantas colectadas y las regeneradas in vitro.

2. OBJETIVOS

El presente trabajo tiene como objeto de estudio la variabilidad genética de frijol existente en el país, con el fin de seleccionar, caracterizar y conservar los genotipos que presenten la capacidad de regenerar plantas in vitro, con los siguientes objetivos:

- Colectar, clasificar y almacenar materiales silvestres y criollos o locales de frijol (Phaseolus sp).
- Inducir callos en materiales de frijol definidos de acuerdo a su especie y zona de vida donde fueron colectadas.
- Regenerar in vitro plantas de frijol a partir de callos.

3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

3.1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Ramos (1992) cultivando hipocotilos provenientes de cinco cultivares de frijol sobre los medios PC-L2, Blaydes, Gamborg et. al. A los diez días los callos se transfirieron a los medios PC-L2 con mayor contenido de auxina y al medio Blaydes sin hormonas. Los resultados indican que en un mismo medio el índice de crecimiento relativo (ICR) fue diferente en cada uno de los cultivares ensayados. Lo que sugiere que el factor genético del cultivar se manifiesta ante determinado medio nutritivo, lo cual puede comprobarse comparando la respuesta de los genotipos en los demás medios. Probablemente esta respuesta está condicionada con la actividad específica de los reguladores ante un determinado genotipo.

Mok y Mok (1970) evaluaron la respuesta genotípica del frijol frente a 4 auxinas y 7 genotipos de Phaseolus vulgaris L., Phaseolus lunatus L. y Phaseolus acutifoliu L. Fue usado el medio Murashigue y Skoog. El picloram fue efectivo en promover el crecimiento del callo. Los tejidos de algunos genotipos crecieron bien entre 1.25 a 40 uM y no hubo diferencia en cuanto al peso en respuesta a varias concentraciones de Picloram. El 2,4-D también incrementó el crecimiento del callo, pero en menor rango de concentraciones (1.25 a 20 uM).

El ácido naftalenacético en concentraciones relativamente altas (10 a 40 uM) indujo el crecimiento del callo. El ácido indol-3 acético no fue efectivo en soportar el crecimiento del callo, el cual fue de color café, en cada período de cultivo; al llegar a las 3 semanas el callo se puso necrótico completamente.

Crepy et. al. (1986) estudiaron el comportamiento de callos en 2 medios basales (BSB y MS). Cuando los callos fueron transferidos al medio sólido BSB, después de tres semanas ocurrió un incremento en la masa de células. Al inicio el callo era de color café, pero por último se necrosó totalmente. En el segundo medio (MS) con adiciones de agua de coco, 2,4-D

(0.05mg/l), ácido naftalenacético (0.10 mg/l) y Bencil adenina (0.5 mg/l), los callos permanecieron verdes durante 6 semanas y no presentaron necrosis. La presencia del 2,4-D determinó la sobrevivencia de los callos.

Los callos producidos por Crocromo et. al. (1975) fueron iguales en su crecimiento frente a varias concentraciones de sucrosa, pero la presencia de la caseína hidrolizada pareció ser necesaria para que ocurriera el crecimiento del callo, mientras que la presencia de 2,4-D produjo mucho crecimiento de los callos.

Ruiz y Peláez (1986) estudiaron la formación de callos en explantes de meristemo, epicotilo, catáfila e hipocotilo de *Phaseolus vulgaris* L. y *Phaseolus coccineus* L. Todos los cultivares y explantes formaron callos eficientemente en el medio con 2,4-D, los cuales fueron los más grandes, pero en *Phaseolus vulgaris* L. fueron relativamente pequeños. En cambio, con el ácido naftalenacético y bencil adenina se produjeron callos más frecuentemente. El hipocotilo produjo callos más grandes.

Muñoz (1989) y Sharp et. al. (1983) manifiestan que son muchos los reportes sobre la dificultad de regenerar plantas a partir de callos utilizando genotipos cultivados de *Phaseolus vulgaris* L.

Crocromo et. al. (1975) cultivaron explantes de hojas en el medio MS con adición del ácido indolacético (11.2 uM), ácido naftalenacético (5.4 uM) y quinetina (0.9 uM), y además se adicionó 1/4 de extracto de semilla de frijol por litro, logrando regenerar dos plantas de nueve cultivares experimentados de *Phaseolus vulgaris* L. En los otros ensayos cuando se adicionó el extracto de 1/4 de semilla de frijol fue notable el incremento del callo y la morfogénesis de raíz.

Angilini y Allavena (1989) hicieron estudios en la regeneración de plantas usando explantes de cotiledones inmaduros de frijol (*Phaseolus coccineus* L.) cultivados en experimentos previos por micropropagación, el 37.5 por ciento fue observado en el medio Murashigue y Skoog más 2-isopentil adenina (10 mg/l) y ácido 2- naftoxiacético (NOA) (0.05 mg/l), de acuerdo con los resultados obtenidos se confirma el potencial morfogenético de los cotiledones inmaduros de *Phaseolus coccineus* L.

La regeneración de brotes fue observado por Ruiz y Peláez (1986) en los medios L4, L7 y MS5 más ácido indolacético (2.25 mg/l) y ácido naftalenacético (0.18 mg/l), derivados de 3 explantes de frijol (meristemos, hipocotilo y embriones) de *Phaseolus vulgaris* L.

Muñoz (1989) logró la regeneración de plantas completas en otras leguminosas, en materiales silvestres de frijol *Phaseolus neglectus* L., *P. scarabellus* L., *P. santotrichus*, *P. Pedecillatus* y *P. glaucocarpus* L., mediante el uso de callos originados del nudo cotiledonar cultivados sobre la mitad de las sales de Murshigue y Skoog más ácido indolacético (para inducir callo). Luego regeneró sobre el medio Gamborg más ácido indolacético, ácido giberélico y bencil aminopurina. Esto indica que la regeneración de plantas está influenciada por el genotipo, la clase de tejido usado como explante y el medio de cultivo.

MacClean y Grafton (1988) desarrollaron plantas de frijol usando el tejido del nudo cotiledonar, germinados en el medio de Murashigue y Skoog más 0.5 u M de benciladenina.

Rublo y Kartha (1985) y Muñoz (1989) obtuvieron múltiples retoños a partir de meristemas de frijol en el medio de Murashigue y Skoog más 10 uM de bencil adenina. Con ANA se obtuvo menor número de plántulas.

Martínez y Sondalh (1884) tomaron inóculos de 33 cultivares y los establecieron sobre el medio Gamborg más benciladenina (0.5 uM). Los cultivos produjeron callo, raíces y retoños adventicios de acuerdo al genotipo.

Rublo y Kartha (1985) evaluaron la respuesta morfogénica de meristemas apicales de 3 especies de Phaseolus. Los meristemas de Phaseolus vulgaris L., exhibieron la mejor respuesta en términos de regeneración de brotes cuando se cultivó en el medio MS con bencil adenina (10 uM) y ácido indolacético o ácido indolbutírico en la misma concentración.

Alvarado (1992) evaluó explantes de raíz de una variedad de frijol en dos medios basales (Murashigue y Skoog, y White) y siete combinaciones hormonales (2,4-D y ANA), que variaron entre 0 y 3 mg/l. Todos los tratamientos produjeron callos, y no hubo regeneración de plantas de frijol.

Ramazzini (1992) evaluó el medio MS y 3 auxinas (ANA, 2,4-D y AIA), utilizando 4 explantes diferentes de una variedad de frijol. Además cultivó células en suspensión del mismo cultivar. En este estudio únicamente se produjeron callos.

4. METODOLOGÍA

La investigación se ejecutó en tres etapas.

4.1 PRIMERA ETAPA

Se efectuó en 1993, realizando primordialmente actividades de colecta de materiales locales y nativos de Phaseolus en áreas geográficas en donde crece en forma silvestre y se cultivan frijoles con poco grado de mejoramiento.

En lo referente a regeneración in vitro de plantas se evaluaron los factores: materiales de frijol, métodos de desinfección, obtención de explantes, medios básicos de cultivo y suplementos nutritivos, así como concentración y combinación de reguladores de crecimiento. Para cada uno de estos factores se pueden tener varios niveles, dando origen a un gran número de posibles combinaciones, y con base en los objetivos del trabajo, se usó la técnica de triangulación para definir los niveles de reguladores de crecimiento y medios de cultivo para los diferentes explantes.

Los resultados obtenidos en cada ensayo se analizaron y servían para replantear constantemente los tratamientos y procedimientos para las pruebas siguientes.

4.2 SEGUNDA ETAPA (1994)

En el segundo año se realizaron algunas colectas de semillas. El peso del trabajo se concentró en realizar estudios para la regeneración de plantas in vitro.

4.2.1 Obtención de explante

Con base en los resultados de la primera etapa se usaron explantes provenientes de hipocotilo y de hojas de plántulas germinadas en condiciones estériles.

4.2.2 Formación de callo

- Medio de cultivo

Con base a los resultados de la primera etapa se usaron los medios denominados Inducción I e Inducción II, teniendo de base a Murashige y Skoog (MS), modificándose los reguladores y concentraciones de éstos. Los explantes se encubaron con luz constante o en la oscuridad a una temperatura aproximada de 24° C.

A continuación se describen los medios utilizados:

INDUCCIÓN I. EN LA OBSCURIDAD

MACRO A	-----	10X
MACRO B	-----	10X
MICRO A,B	-----	1000X
SOL FE	-----	100X
MIOINOSITOL	-----	100X
THIAMINA	-----	1000X
VITAMINAS	-----	1000X
SUCROSA	-----	3 %
2,4-D	-----	0.3 mg/l
BAP	-----	0.1 mg/l
CASEINA HIDROLIZADA	-----	1 g/l
AGAR	-----	0.8 %
PH	-----	5.7

INDUCCIÓN II. EN LUZ

MACRO A	-----	10X
MACRO B	-----	10X
MICRO A,B	-----	1000X
SOL FE	-----	100X
MIOINOSITOL	-----	100X
THIAMINA	-----	1000X
VITAMINAS	-----	1000X
SUCROSA	-----	3 %
MANITOL	-----	2 %
ANA	-----	0.75 mg/l

CASEINA HIDROLIZADA -----	1	mg/l
AGAR -----	0.6	%
PH -----	5.7	

- Variables generales

- Si el material de frijol forma callo o no
- Tipo de callo
- Color
- Consistencia: friable o duro

4.2.3 Regeneración de plantas

- Selección de callos a trasplantarse

Para promover la rediferenciación de las células a partir de los callos, se seccionaron callos friables, blancos, compactos o semicompactos con raíces. Estos callos se fraccionaban y se sembraban, cada segmento contenía por lo menos una raíz.

- Medio de cultivo

Se utilizó como medio básico las modificaciones del medio de Murashige y Skoog (MS) obtenidos en la primera etapa del proyecto, realizando variaciones en los reguladores de crecimiento y en sus concentraciones. Originando los medios identificados como R1, R2, R3, R4, R5 y R6, los que se describen a continuación:

MEDIO BASICO MS

MACRO A -----	10X
MACRO B -----	10X
MICRO A,B -----	1000X
SOL FE -----	100X
MIOINOSITOL -----	100X
THIAMINA -----	1000X
VITAMINAS -----	1000X
SUCROSA -----	3%

Variaciones de los Reguladores de crecimiento y otros compuestos:

MEDIO R1

AIA -----	0.10 mg/l
BAP -----	0.5 mg/l
KIN -----	0.5 mg/l

MEDIO R2.

AIA -----	0.5 mg/l
BAP -----	2 mg/l

MEDIO R3.

ANA	-----	0.5 mg/l
KIN	-----	1 mg/l
GA ₃	-----	0.5 mg/l
ADENINA	-----	0.5 mg/l

MEDIO R4.

ANA	-----	0.5 mg/l
BAP	-----	2 mg/l
GA ₃	-----	0.5 mg/l
ADENINA	-----	0.5 mg/l

MEDIO R6.

AIA	-----	0.5 mg/l
KIN	-----	2 mg/l
GA ₃	-----	1.0 mg/l
ADENINA	-----	0.5 mg/l

- Variables generales

- Si hay regeneración o no a partir de callo
- Apariencia física de la planta

4.2.4 Climatización de plantas

Con el fin de que las plantas regeneradas in vitro se adapten a condiciones de campo se climatizaron. Para el efecto se usó suelo esterilizado, trasplantándose a estos suelos cuando la planta in vitro alcanzaba aproximadamente un tamaño de 5-10 cm de alto, con un número de entrenudos mayor de 5 y con un buen sistema radicular.

4.2.5 Brotación

Generalmente con el medio de cultivo para regeneración se obtuvo una planta. Con el fin de promover una multiplicación masiva se evaluó el enraizamiento y brotación de microestacas. También se evaluaron medios de cultivo con el mismo fin. Para el enraizamiento de estacas se usaron plantas con unos 5 nudos, estas se seccionaban produciendo una microestaca por nudo y se sembraban en un medio de cultivo que tenía MS más Mioinositol, solución de Fe, Vitaminas, Thiaminas, Sucrosa al 3%, AIA, BAP y kinetina.

Se establecieron tres medios de cultivo, utilizándose de base MS. Estos se definen a continuación:

MEDIO BASICO MS

MACRO A	-----	10X
MACRO B	-----	10X
MICRO A,B	-----	1000X
SOL FE	-----	100X
MIOINOSITOL	-----	100X
THIAMINA	-----	1000X
VITAMINAS	-----	1000X
SUCROSA	-----	3%

Variaciones de los Reguladores del crecimiento y otros compuestos:

MEDIO CA

GA ₃	-----	0.25 mg/l
ACIDO PANTOTENICO	-----	2 mg/l
SUCROSA	-----	3 %
AGAR	-----	0.8 %

MEDIO C

AIA	-----	1 mg/l
KIN	-----	0.5 mg/l
GA ₃	-----	0.5 mg/l
CISTEINA	-----	2 mg/l
AGAR	-----	0.8 %
Ph	-----	6.7

MEDIO Z

GA ₃	-----	0.6 mg/l
SUCROSA	-----	3 %
AGAR	-----	0.6 %

4.2.6 Análisis de los datos

Este trabajo tuvo como fin último la regeneración de plantas de frijol in vitro y la determinación taxonómica de los mismos; por lo que el único análisis de los datos fue la determinación taxonómica de las plantas regeneradas y de los materiales que le dieron origen.

4.3 TERCERA ETAPA (1995)

En el tercer año se validaron los resultados, utilizándose los medios de inducción de callo: Inducción I, cultivándose en Luz por 12 horas, e Inducción II en la oscuridad, los medios de regeneración R1 y R2 y el medio de brotación Medio C.

4.3.1 Entradas a ser regeneradas in vitro

Con base a las características de las semillas (cuadro 6A), estado de la colecta (silvestre, criolla o local) y zona de vida, se seleccionaron las colectas (cuadro 6A): 3, 9, 12.3, 12.5, 12.7, 21, 23, 31, 36, 37.7, 38.9, 44, 48, 51, 53, 68, 72, 74, 75 y 79. También se usaron semillas de las variedades comerciales de *Phaseolus vulgaris* L., Quinack Che y Parramos. Estas últimas usadas por Alvarado (1992) y Ramazzini (1992) respectivamente.

4.3.2 Estabilidad de las plantas regeneradas in vitro, en relación con sus progenitores

Las plantas regeneradas in vitro como a sus respectivas entradas se compararon con la clave botánica para el género *Phaseolus* elaborada por Standley y Steyermark (Standley y Steyermark, 1946), a la vez, se comparó la distribución de las bandas electroforéticas de las proteínas totales de la semilla de las plantas regeneradas in vitro con las semillas de las entradas de las cuales se obtuvieron.

El fin de esta comparación fue determinar la estabilidad de las plantas regeneradas in vitro en relación con sus progenitores, en este caso semillas botánicas de la colecta que regeneró plantas in vitro.

- Comparación taxonómica de las entradas

Utilizando la clave botánica para la definición taxonómica desarrollada por Standley y Steyermark (Standley y Steyermark, 1946) para el género *Phaseolus* se determinó la especie de las plantas regeneradas in vitro; ya que solamente en pocas colectas se logró obtener material vegetal (hojas, flores, vainas, semillas) que permitieran conocer la especie en el momento de la colecta; a la vez permitió observar la estabilidad morfológica de las plantas regeneradas in vitro en relación con sus colectas, descritas anteriormente.

- Patrón de las proteínas totales en la semilla de *Phaseolus*

Las proteínas se consideran como el producto primario del ADN, de tal forma que conocer el patrón de estas en una etapa de desarrollo de la planta permite la identificación de genotipos, realizar catálogos de accesiones, análisis de diversidad genética y estudios de evolución y diseminación, entre otros. La técnica más fácil y frecuente de usar para conocer el patrón de proteínas es la ELECTROFORESIS. Esta se basa en la desnaturalización de las proteínas mediante la adición de Urea y mercaptoetanol al romper los enlaces de hidrógeno y disulfuro. La cadena polipeptídica lineal formada mediante la adición de aniones (SDS) se carga negativamente. Esta al ser sometida a una carga eléctrica en un soporte migran linealmente proporcional al logaritmo de su masa, pudiéndose identificar su presencia o ausencia y tamaño.

De acuerdo a lo expuesto, el protocolo a seguir depende para cada especie u órgano que se utilice, haciéndose necesario ajustar experimentalmente para cada

especie u órgano. Pero en términos generales se usó de base la metodología descrita por Laemmli (1970) para leguminosas, realizándose los pasos:

a. Soluciones a usar:

- Solución o buffer de extracción: Tris, SDS, Urea, Trazas de azul de bromofenol y agua. pH: 8.0.
- Solución o buffer de corrida: Glicina, Tris, SDS y agua.
- Soluciones formadoras del gel: Acrilamida, Bisacrilamida, Tris (Tris hidroximetilaminometano), SDS (Dodecil sulfato de sodio), Acido clorhídrico, AP (Persulfato de amonio), TEMED (N',N',N',N' tetrametilenediamine) y agua.
- Solución de tinción: Azul de Coomassie R 250, Metanol, Acido acético y agua.
- Solución de destinción: Metanol, Acido acético y agua.

b. Extracción de proteínas totales:

- Se tomó una muestra de 10 gr de semilla, se eliminó la testa y se maceró, hasta obtenerse una harina suficientemente fina para que pase a través de una malla de 1 mm.
- Se pesó 10 mg de harina, transfiriéndose a un eppendorf (1.5 ml de capacidad) o tubo de centrifuga.
- Se agregó 1 ml de buffer de extracción. La proporción harina: solvente depende de las especies que se trate. Se ajustó experimentalmente a 9:1.
- Se agregó 10 ul de mercaptoetanol, se agitó en agitador (vortex) por 1 a 2 min y se dejó a temperatura del laboratorio por aproximadamente 30 min. Durante este tiempo se agitó 2 a 3 veces más.
- Se centrifugó a 6000 g x 20 min.
- El sobrenadante se transfirió a un eppendorf y almacenó en refrigeración hasta su análisis.

c. Preparación del gel:

Para que las proteínas se desplacen uniformemente a través de la matriz de poliacrilamida, se hace necesario inicialmente conformar una parte del gel en la cual las proteínas se apilen y otra en la cual se separen de acuerdo a su masa. El gel de apilamiento usado contiene una concentración de 4 ó 5% de poliacrilamida, el gel de separación de la concentración de poliacrilamida fue del 10% y se definió experimentalmente de acuerdo al Peso Molecular de la proteína.

d. Corrida (electroforesis):

La carga negativa dada a las proteínas por el SDS permite que al someterlas a un campo eléctrico migren, de acuerdo a su masa, de una carga negativa a una carga positiva a través de la matriz de poliacrilamida y el buffer de corrida. En términos generales se usó una fuente de poder que mantuvo una energía de 15mA/gel y una corriente de 100 a 150 V. El tiempo de corrida era fijado por el desplazamiento del colorante azul de Coomassie.

e. Tinción y destinción:

- En una bandeja se puso a teñir las proteínas en la solución de tinción, se mantuvo en agitación por dos horas. Posteriormente se colocó en la solución de destinción entre 4 a 8 horas, hasta que mostraron las bandas de proteínas con la nitidez y color de fondo deseado.
- El gel se dibujó, observándose la distribución de las bandas de proteínas totales.

f. Análisis de los electroforegramas:

- Mediante un análisis cualitativo, basándose en la presencia o ausencia de las bandas de proteínas totales, se utilizó el Índice de similitud (SI), definido por la ecuación:

$$SI = \frac{\text{Número de pared de bandas similares}}{\text{Número de bandas diferentes} + \text{Número de bandas similares}}$$

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 PRINCIPALES RESULTADOS DEL PROYECTO EN 1993

5.1.1 Materiales de frijol colectados

En los departamentos de Jutiapa, Chiquimula, Chimaltenango y San Marcos se realizaron 66 colectas (1 a 66), de las cuales, por la variabilidad genética mostrada en la semilla respecto a color y tamaño, se obtuvieron 98 entradas (cuadro 6A). Evaluándose 32 de ellos, seleccionados con base a la especie, zona de vida y cantidad de semilla disponible.

5.1.2 Obtención de explantes

Los explantes de frijol evaluados provenían de los tejidos vegetales: hipocotilo, meristemo, hoja y raíz. De éstos, los explantes de hipocotilo presentaron más puntos verdes (áreas de diferenciación), una menor respuesta en su orden se observó con explantes de meristemo y hoja. Respuesta semejante a la reportada por Sharp et. al. (1983) y Chartfiel y Armstrong (1985).

5.1.3 Medios de cultivo y suplementos nutritivos

- Medios base para la formación de callos:

En el primer año (1993) del proyecto, se evaluaron los medios de cultivo de Gamborg, N6, White y MS. Los explantes tuvieron mejor respuesta en MS adicionado con agua de coco. Sin embargo, en el medio Gamborg se obtuvieron algunos puntos verdes (área de rediferenciación celular).

Al medio MS, se le hicieron algunas modificaciones, tales como el uso de 10, 25, 50, 75 y 100 por ciento de sales básicas y, suplementos con agua de coco (AC) y vitaminas. Según los resultados, tanto al 10 como al 100 por ciento de la concentración de las sales de MS fueron similares, observándose callos con zonas de rediferenciación celular (puntos verdes) y raíces.

La adición al medio MS suplementos como agua de coco (15%), Thiamina HCl (1 ppm), 2% sucrosa, y agar al 0.6%, en un pH de 5.7; resultó ser el mejor. Además, en estas condiciones los callos de la mayoría de materiales de frijol permanecieron mayor tiempo sin oxidarse, es decir que no se necrosaron antes de los 55 días. Cuando se usó el medio MS sin la adición de agua de coco, 3% de sucrosa y 0.8% de agar, algunos callos de frijol se necrosaron a los 25 días.

Posiblemente la prolongación del tiempo de la aparición de necrosis se debió a la cantidad y calidad de nutrientes que contiene el agua de coco (vitaminas, enzimas, etc.), y al bajo porcentaje de sucrosa.

- Concentración y combinación de reguladores de crecimiento en la fase de regeneración.

Dentro de las Auxinas, se evaluó el Acido Indol Acético (AIA) en concentraciones que van de 0.10 a 4.0 mg/l, y el Acido Naftalen Acético (ANA) en el rango de 0.10 a 2.0 mg/l. Pudo notarse que al usar mayor cantidad de auxina el callo tiende a crecer en tamaño, presentándose necrosis en un menor tiempo. Esto sucede principalmente al usar el ANA, no así con el AIA, puesto que su efecto y degradación se da con mayor facilidad y en menor tiempo, dificultando la conservación y manejo del callo, efecto que fue observado por Mok y Mok (1970).

Con relación a las citocininas BAP, KIN y Adenina; se evaluaron concentraciones que variaron de 0.10 a 20 mg/l. También se evaluó la giberelina (GA_3) en concentraciones de 0.25 a 3.0 mg/l. Sucede que a altas concentraciones (mayor de 10.0 mg/l) generalmente los callos tienden a morirse, debido a la toxicidad, provocando necrosis.

Al usar de 0.10 a 0.75 mg/l de AIA y ANA; 0.10 a 5.0 mg/l de BAP, KIN y Adenina; 0.20 a 2.0 mg/l de GA_3 en la fase de regeneración in vitro de plantas de frijol se observaron puntos verdes con cierta organización y raíces.

5.1.4. Formación de callos

En la inducción de callo, 32 materiales respondieron al evaluarse en el medio MS, adicionado con 0.25 mg/l 2,4-D, y en 0.75 mg/l de ANA. De estas dos auxinas el ANA presentó mejores resultados en calidad y cantidad de callos.

Se obtuvieron callos generalmente a los 8 ó 10 días después de la inoculación de los explantes. De 32 materiales de frijol, 22 presentaron callo con textura friable (esponjoso), 5 con textura semicompacta y 5 con textura compacta.

Del total de materiales evaluados, 13 presentaron zonas de diferenciación celular (puntos verdes) con cierta organización; además, algunos de estos materiales formaron raíces. De acuerdo a otros investigadores, la rizogénesis es lo más frecuente en el cultivo de callos de frijol, y se debe a que las células responden con mayor facilidad a las auxinas, ya que éstas participan tanto en la formación de callo, como en la fase de regeneración de plantas. La mayoría de materiales de frijol que presentaron estas características, son las que tienen textura semicompacta y compacta.

Los callos que presentaron textura friable presentaron también puntos verdes (áreas de diferenciación) y raíces, generalmente relacionadas con la especie colectada.

Lo anterior se relaciona con lo observado por Martínez y Sondaih (1984) y Muñoz (1989), quienes indican haber observado una respuesta al medio de cultivo de acuerdo al genotipo.

5.1.5 Regeneración de plantas

Los explantes de hipocotilo en medios de cultivo con 0.25 mg/l de 2,4-D y 0.75 mg/l de ANA formaron callos friables que presentaron cierta rediferenciación celular al formar puntos verdes (áreas con cierta organización) y en algunos casos raíces.

Por otra parte, los explantes de meristemos y hojas en el medio MS con AIA, KINETINA Y IBA desarrollaron callos friables con puntos verdes (áreas con cierta organización).

Al evaluar meristemos en el medio MS adicionado con AIA, kinetina, y luego Acido indolbutírico (IBA), éstos se desarrollaron, produciendo brotes de 5 centímetros de alto, los cuales formaron callos en su parte basal, los que al dividirse formaron plantas completas.

Al igual que Rublo y Kartha (1985), se obtuvieron plantas completas al usar la técnica de micropropagación (microestaca), cuando se inocularon meristemos laterales (nudo de tallo) en el medio MS, suplementado con 1 ml/l de tiamina. Estas plantas fueron climatadas en un micro invernadero, y posteriormente sembradas en campo definitivo, lográndose su desarrollo.

Los resultados señalados al igual que los obtenidos por Rublo y Kartha (1985), Ruiz y Pelaez (1986), Angilini y Allavena (1989) y Muñoz (1989) señalan que el frijol tiene la capacidad de regenerar plantas, y la misma se debe evaluar teniendo en cuenta el medio

de cultivo base, explante, concentración y combinación de reguladores del crecimiento para las especies de Phaseolus.

Para nuestro caso, la investigación concluyó que debe incluirse dentro de los factores a evaluar la diversidad genética del género Phaseolus.

5.2 RESULTADOS OBTENIDOS EN LA SEGUNDA ETAPA (1994)

5.2.1 Colecta

En la segunda etapa se realizaron tres viajes de colecta a las áreas de Calderas, Palín en Escuintla y Santa María de Jesús en Sacatepéquez, Guatemala, y Chimaltenango. Se realizó un total de 24 colectas (67 a 90), haciendo 28 entradas (cuadro 6A). Se concentró la colecta en materiales silvestres de las especies P. polyanthus Green, de P. coccineus L. y P. vulgaris L.

5.2.2 Formación de callos

Con base a su grado de mejoramiento o domesticación, la zona de vida en donde se realizó la colecta y su respuesta en la etapa I, se seleccionaron un total de 60 entradas para la generación de callos y su posible regeneración de plantas. De éstas, 48 iniciaron el proceso de formación de callos, 10 de ellas se murieron por oxidación. Del total, 18 desarrollaron callos (cuadro 1). Las entradas que desarrollaron callos se transfirieron a medios de regeneración.

Cuadro No. 1.
**Principales características de las semillas de las entradas que
germinaron y se generaron como mínimo callo en 1994**

MATERIAL	CARACTERÍSTICAS DE LA SEMILLA
3-----	Frijol negro, pequeño de enredo

9.3	-----	Frijol blanco de enredo
12.2	-----	Frijol naranja y negro
12.3	-----	Frijol negro
12.5	-----	Frijol café claro
12.7	-----	Frijol café, naranja y blanco
31	-----	Frijol blanco, enredo perenne
36	-----	Frijol negro
37.3	-----	Frijol negro
37.5	-----	Frijol naranja
37.6	-----	Frijol negro
37.7	-----	Frijol negro
38.9	-----	Frijol gris y negro, mediano
41	-----	Frijol café claro y negro
42	-----	Frijol negro, grande
44	-----	Frijol café claro y negro
46	-----	Frijol blanco
47	-----	Frijol naranja
48	-----	Frijol naranja y negro
66.3	-----	Frijol blanco y negro, pequeño
70	-----	Frijol café con negro, grande, silvestre
74	-----	Frijol café y negro, pequeño, silvestre
75	-----	Frijol café y negro, pequeño, silvestre

Por haberse realizado la colecta principalmente en mercados y semillas almacenadas por los agricultores, en donde se desconoce la edad de la semilla, posiblemente originó que varias entradas no germinaron.

En el cuadro 2 se observa que el medio inducción uno, permitió de una mejor forma la inducción de callos, varias entradas sólo generaron callos en un medio, pero el 66.66% de ellas inducen callo en los dos medios.

La incubación en la obscuridad permitió un desarrollo del callo en menor tiempo y generalmente eran callos friables y de un tamaño que permitían su subcultivo. El explante de hoja dio callos friables y generalmente permitían su rediferenciación.

El medio inducción uno en la oscuridad generalmente permitía el desarrollo de callos friables, blanco, lográndose controlar la oxidación de los mismos.

Es de señalar la versatilidad que mostraron las colectas 3, 9, 12.5 y 12.7 al responder a los dos medios, indistintamente del explante y producir callos friables, compactos o semicopactos y friables y compactos. Respondieron en mejor forma los piligues y/o piloy pero también respondieron algunos frijoles blanco y negros.

5.2.3 Regeneración de plantas

Los callos generalmente en cualquier medio de inducción producen raíces, esto originó la idea de subcultivar los callos con el fin de conservarlos. Con el propósito expuesto, varios callos con raíces se subcultivaron y colocaron en medio para regeneración de plantas, observándose que estos callos regeneraban plantas completas o bien producían hojas. Incluyéndose esta observación como un procedimiento.

Al trasladar callos con parte de raíces a medios de regeneración, se logró la regeneración completa de 28 plantas de las colectas 9, 12.5, 12.7, 38,9 y 44 (cuadro 3). Con base en las características de la semilla (cuadro 1) se puede inferir que son P. polyanthus Green., P. coccineus L. y P. vulgaris L.

5.2.4 Brotación

Con el objeto de incrementar el número de brotes se sometieron varias plantas regeneradas a altas concentraciones de kinetina, permitió la producción de más de un brote.

Cuadro No. 2
Medios de cultivo que indujeron callos,
explante y tipo de callo por entrada

COLECTA	INDUCCIÓN DE CALLO		EXPLANTE		TIPO DE CALLO		
	MEDIO 1 ¹	MEDIO 2 ¹	HOJA	HIPOCOTILO	FRIABLE	COMPACTO O SEMICOM-PACTO	FRIABLE Y COMPACTO

3	X		X	X	X		
9	X	X	X	X	X	X	X
12.2		X		X		X	
12.3		X	X			X	X
12.5	X	X	X	X	X	X	X
12.7	X	X	X	X	X	X	X
31	X			X			
36	X	X	X		X		
37.3	X		X	X		X	
37.5	X		X				
37.6	X	X	X	X		X	
37.7	X	X	X	X		X	
38.9	X	X	X	X	X		
41		X	X		X		
42		X	X	X	X	X	
44	X	X	X	X		X	
46	X	X				X	
47	X	X	X	X	X		X
48	X	X	X		X		
66.3			X			X	
70	X	X	X			X	
74	X		X			X	
75	X		X			X	
Total	18	16	20	13	10	14	5

1 = Ver metodología: Medio de cultivo

Con el fin de aumentar el número de plantas se tomaron estacas de plantas regeneradas in vitro y se sometieron a medios con altas concentraciones de kinetinas, observándose la brotación y producción de raíces.

5.2.5 Climatación

Con el proceso de adaptación de las plantas al ambiente natural no existió ningún problema, ya que se adaptan fácilmente cuando se trasplantan con suficiente raíz.

En todos los casos se observó una susceptibilidad a altas humedades en el sustrato.

Cuadro No. 3 Se presentan las colectas cuyos callos se subcultivaron y generaron plantas o raíces

SUBCULTIVADOS	GENERADO PLANTAS	GENERADO RAÍZ
---------------	------------------	---------------

ENTRADAS		ENTRADAS		MEDIOS ¹	COLECTA	MEDIOS ¹
UNA VEZ	DOS VECES	UN SUBCULTIVO	DOS SUBCULTIVOS			
9	9		9	I1 V/R1-RI	3	I1 B2 y B1
12.5	38.9	12.5		I1 B1-R1-R2	9	I1 B2
12.7		12.5		I1 B2-R2	12.5	I2 B2
31		12.5		I2 B2-R1-R2	12.7	I1 B2 y B1
36		12.7		I1 B2-R1-R2	36	I2 B2
37.7		38.9		I1 B1-R1	42	I2 B2
38.9		44		I1 B2-R1	44	I1-2 B1 Y B2
44					47	I1 B2
47						
48						

1 = Ver metodología: Medio de cultivo

5.3 RESULTADOS DE LA TERCERA FASE

5.3.1 Validación del protocolo

Como era de esperarse las entradas: 9, 12.3, 12.5, 12.7, 21, 23, 31, 38.9, 44, 68, 72, 74, 75 y 79 regeneraron plantas completas independientemente del medio de inducción de callo (cuadro 4), observándose una mejor respuesta en el medio de regeneración R1. El trasplante al medio de brotación permitió un mejor y más rápido crecimiento de las plantas y un mayor número de brotes.

Las variedades Quinack-che y Parramos produjeron callos indistintamente del medio de Inducción, pero no se logró la regeneración de plantas completas, sólo se observaron puntos verdes (áreas de diferenciación celular) como lo habían indicado Alvarado (1992) y Ramazzini (1992).

Los resultados evidencian que el protocolo siguiente, permite la regeneración in vitro de plantas de frijol (*Phaseolus* sp.) silvestres, locales y criollas con poco grado de mejoramiento genético.

Cuadro No. 4

Materiales que se usaron para validar el protocolo y su respuesta a la inducción de callo, regeneración y brotación, así como la especie a que pertenece y su índice de similitud

ENTRADA	MEDIO INDUCTOR DE CALLO		REGENERO PLANTAS	HUBO BROTAION	ESPECIE	SI %
	I ¹	I ²				
3	x				V	
9	x	x	x	x	V	90
12.3		x	x	x	C	80
12.5	x	x	x	x	C	80
12.7	x	x	x	x	C	85
21		x	x	x	V	94
23		x	x	x	V	94
31	x		x	x	C	90
36	x				P	
37.7	x				P	
38.9	x		x	x	V	80
44	x	x	x	x	C	90
48	x	x			C	
51	x				C	
53	x				C	
68	x	x	x	x	V	96
72	x		x	x	C	96
74	x	x	x	x	V	96
75	x	x	x	x	V	96
79	x		x	x	P	94
Quinak-che	x	x			V	
Parramos	x	x			V	

V = *Phaseolus vulgaris* L.
 C = *Phaseolus coccineus* L.
 P = *Phaseolus polyanthus* Green.

SI = Índice de similitud entre las plantas regeneradas in vitro y las entradas en las que se obtuvo el explante que le dieron origen, expresado en porcentaje.

PROTOCOLO PARA LA OBTENCIÓN DE PLANTAS DE FRIJOL (*Phaseolus* sp) IN VITRO

1. Explante

Se utilizaron secciones de hipocotilo, obtenidas de la siguiente forma:

- a. Preparación de medio de Germinación:
Se prepara una solución de agar al 0.7%. Colocando 50 ml de la solución de agar en earlenmeyer de 250 ml, se esterilizan en autoclave a 120 grados centígrados y 20 p.s.i. por 25 minutos.
- b. Desinfección de la semilla:
Las semillas se desinfectan en una solución de Hipoclorito de sodio al 0.75% y agua destilada en agitación constante, durante 15 minutos, posteriormente se lavan tres veces con agua destilada y esterilizada.
- c. Siembra de la semilla e incubación:
Las semillas desinfectadas se depositan dentro de los earlenmeyer con la solución de agar; proceso que se realiza en la cámara de flujo laminar. Posteriormente para que se realice la germinación de las semillas, éstas se colocan en condiciones de 24 horas de luz a una temperatura aproximada de 24 grados centígrados.

A los cuatro días se pueden extraer los hipocotilos y raíces, a los ocho días las hojas.

2. Producción de callos

- a. Medios:
Se pueden usar los medios:
 - Base Murashige y Skoog:

Macro A	10X
Macro B	10X
Micro A y B	1000X
Solución de Fe	100X
Mioinositol	100X
Thiamina	1000X
Vitaminas	1000X
Sucrosa	3 %
2,4-D	0.3 mg/l
BAP	0.1 mg/l
Caseína hidrolizada	1.0 g/l
Agar	0.8 %
pH	5.7

Cultivándose el callo en obscuridad.

Es necesario considerar una etapa de 15 días de cultivo en ausencia de 2,4-D cuando el callo ya está formado, previa a la etapa de regeneración.

- Base Murashige y Skoog;

Macro A	10X
---------	-----

Macro B	10X
Micro A y B	1000X
Solución de Fe	100X
Mioinositol	100X
Thiamina	1000X
Vitaminas	1000X
Sucrosa	3 %
Manitol	2 %
ANA	0.75 mg/l
Caseína hidrolizada	1.0 g/l
Agar	0.6 %
pH	5.7

Cultivándose el callo en luz continua.

3. Regeneración de plantas:

a. Medios base Murashige y Skoog:

Macro A	10X
Macro B	10X
Micro A	1000X
Micro B	1000X
Solución de Fe	100X
Mioinositol	100X
Thiamina	1000X
Vitaminas	1000X
Sucrosa	3 %
Agar	0.6%
pH	5.7

Reguladores de crecimiento

AIA	0.1 mg/l
BAB	0.5 mg/l
Kinetina	0.5 mg/l

Callos fiables, blancos, compactos o semicompactos con raíces se dividen tratando que cada segmento cuente por lo menos con una raíz; estos se siembran en medios de regeneración y se cultivaban a una temperatura aproximada de 24°C y un período de luz de 12 horas diarias.

4. Brotación:

Este paso constituye una etapa en la cual plantas regeneradas se transfieren a un medio que permita la producción de más de un brote y el crecimiento de las plantas.

a. Medio base Murashige y Skoog:

Macro A	10X
Macro B	10X
Micro A	1000X
Micro B	1000X
Solución de Fe	100X
Mioinositol	100X
Thiamina	1000X
Vitaminas	1000X
Sucrosa	3 %
Agar	0.8%
Cisteína	2 mg/l
pH	6.7

Reguladores de crecimiento:

AIA	1 mg/l
Kinetina	0.5 mg/l
GA ₃	0.5 mg/l

Este medio también permitió el enraizamiento y brotación de microestacas, las cuales al producir raíz y brotar se pueden climatar.

5. Climatización:

Seguir los pasos normales para climatar las plantas regeneradas in vitro. En frijol se observó su sensibilidad a altas humedades en el sustrato que lo soporta, por lo que éste tiene que tener un buen drenaje y controlarse el riego.

Es necesario trasplantarse con suficiente cantidad de raíces, de lo contrario su recuperación es muy lenta o se muere la planta.

5.3.2 Estabilidad de las plantas regeneradas in vitro en relación con sus progenitores

- Comparación taxonómica de las entradas

De acuerdo a la clave taxonómica dada por Standley y Williams las colectas 12.3, 12.5, 12.7, 31, 44 y 72 pertenecen a *Phaseolus coccineus* L.; las colectas 9, 21, 23, 38.9, 68, 74 y 75 a *Phaseolus vulgaris* L. y la colecta 79 a *Phaseolus polyanthus* Green.

- Patrón de proteínas totales en las semillas

En los cuadros 4 y 5 se presentan los resultados del número de entradas que regeneraron plantas por especie. Para *P. coccineus* L. se obtuvieron 6 plantas regeneradas in vitro, de las cuales 5 provienen de colectas de plantas cultivadas y una silvestre, el valor promedio de SI (cuadro 5) indica una alta estabilidad del proceso de regeneración in vitro, aunque en la colecta silvestre el valor fue mayor (96%) en relación con las cultivadas (rango de 80 a 90%). Para *P. polyanthus* Green, el valor de SI (cuadro 4) es alto (96%), pudiéndose inferir una alta estabilidad del proceso de regeneración in vitro.

Para frijol común, especies de nuestro mayor interés, se observó que el 70% de la entradas regeneraron plantas in vitro usándose el protocolo descrito. Es necesario señalar que del total de entradas el 20% lo constituyen variedades comerciales con un alto grado de mejoramiento genético. Los valores de SI de las colectas de semillas locales cultivadas se presentaron en un rango de 80 a 90%, inferior al observar en la colecta silvestre, que presentó un valor de SI de 96% (cuadros 4 y 5). Al igual que para las otras especies descritas estos valores se pueden considerar altos, por lo que se infiere una buena estabilidad de las plantas regeneradas in vitro.

El concepto de estabilidad indicado, basándose en el índice de Similitud de las bandas de las proteínas totales de la semilla, puede considerarse muy general por la poca precisión que nos presentan las proteínas totales en la semilla en relación con otras técnicas moleculares, ejemplo Rapd's e isoensimas.

Cuadro No. 5
Se presentan el número de plantas regeneradas in vitro y valores medios del Índice de Similitud por especie de *Phaseolus*

ESPECIE	NUMERO DE PLANTAS	VALORES MEDIOS DE SI, EN PORCENTAJE	PORCENTAJE DE ENTRADAS REGENERADAS IN VITRO*
---------	-------------------	-------------------------------------	--

	ENTRADAS SEMBRADAS	REGENERADAS in vitro		
<u>P. vulgaris</u> L.	10	7	92.29	70.00
<u>P. coccineus</u> L.	9	6	86.83	66.66
<u>P. polyanthus</u> Green.	1	1	94.00	33.33

* = Porcentaje de entradas que regeneraron plantas in vitro con relación al número que se cultivaron in vitro.

6. CONCLUSIONES

- De acuerdo a los resultados, es posible la regeneración in vitro de plantas de frijol Phaseolus sp.. La regeneración se dá cuando se transfiere a medios de regeneración callos con raíces.
- La regeneración de plantas de frijol está relacionada con el material usado como explante, de tal forma que explantes provenientes de semillas de P. coccineus L. P. poliathus L. y P. vulgaris silvestre o poco grado de mejoramiento regeneran plantas in vitro.

7. RECOMENDACIONES

- Para la regeneración de plantas de frijol (Phaseolus sp.) utilizar de base el protocolo desarrollado en el presente proyecto de investigación.
- Continuar con estudios que tiendan a optimizar estos procedimientos.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. ALVARADO GÓMEZ, J. 1992. Evaluación de medios de cultivo para la inducción de callo y regeneración de plantas en frijol (Phaseolus vulgaris L.), variedad

Quinack ché. Tesis Ingeniero Agrónomo. Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 80 p.

2. ANGELINI, R. R.; ALLAVENA, A. 1989. Plant regeneration from immature cotyledon explant cultures of bean (*Phaseolus coccineus* L.). *Plant cell, Tissue and Organ culture* (Japan) 19: 167-174.
3. CHATFIELD, J. M.; ARMSTRONG, D. J. 1985. Regulation of cytokinin oxidase activity in callus tissues of *Phaseolus vulgaris* L. c.v. *Great Northern Hort Science* (EE. UU) 23 (5): 493-499.
4. CREPY, L.; BARROS, L. M.; VALENTE, V. R. 1986. Callus productions from leaf protoplast of various cultivars of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant cell Report* (Japón) 5: 124-126.
5. CROCROMO, O. J.; PETERS, J. E.; SHARP, W. R. 1975. A literature review and the requirements for grow of *Phaseolus vulgaris* L. in tissue culture. *Arquivos de Biología e Tecnología* (Bra.) 18: 25-31.
6. _____. 1976. Plantlet morphogenesis and the control of callus growth and root induction of *Phaseolus vulgaris* L. with the addition of a bean seed extract. 2. *Pflanzenphysiol. Bd.* (Germany) 78: 456-460.
7. KERNS, H.R. 1985. Correlation of cotyledonary node shoot proliferation and somatic embryoid development in suspension culture soybean (*Glycine max* Merr.). *Plant Cell Report* (Japón) 140-143.
8. MARTINS, I. S.; SONDAHL, M. R. 1984. Multiple shoot formation from shoot apex cultures of *Phaseolus vulgaris* L. *J. Plant Physiol* (EE. UU.) 115: 205-208.
9. MC CLEAN, P.; GRAFTON, K. F. 1988. Regeneration of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) via organogenesis. *Plant Science* (EE. UU.) 60: 117-122.
10. MOK, M. C.; MOK, D. W. 1977. Genotypic responses to auxins in tissue cultures of *Phaseolus*. *Physiol Plant* (EE.UU.) 40: 261-264.
11. MUÑOZ, F., L. C.. 1989. Algunas metodologías experimentales utilizadas en cultivo de tejidos de frijol. Colombia, CIAT. 18 p.
12. RAMAZZINI, S. H. 1992. Respuesta del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Parramos a la inducción de callo y al cultivo de células en suspensión. Tesis Ingeniero Agrónomo Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 67 p.

13. RAMOS O, G. A. 1983. Respuesta morfogénica en cultivo de tejidos de seis cultivares de frijol (Phaseolus vulgaris L.) Tesis Mag. Sc. Turrialba, C. R., CATIE. 53 p.
14. RUBLO A., KARTHA, K. K. 1985. In Vitro culture of shoot apical meristems of various Phaseolus species and cultivars. J. Plant Physiol. (EE. UU) 119: 425-433.
15. RUIZ, M. L.; PELAEZ, M. I. 1986. A comparative study of callus formation and plant regeneration from different explants of Phaseolus vulgaris and Phaseolus Coccineus. Berlin, Horn. p. 495-497.
16. SHARP, W. R.; EVANS, D. A.; AMMIRATO, P. V. 1983. Handbook of plant cell culture; techniques for propagation and breeding. New York, Mcmillan Publishing. v. 2, p. 137-169.
17. STANDLEY PAUL C., STEYERMARK JULIAN A. 1946. Flora of Guatemala. Published by Chicago Natural History Museum. Fieldiana: BOTANY, Vol. 24, Part V. 316 - 335 p.

ANEXO

Cuadro No.6
Lista de materiales (entradas) de frijol silvestres,
locales y criollos colectados

Colecta	Especie	Lugar de colecta	Características
---------	---------	------------------	-----------------

(entradas)			grano	planta
1		2.2 km camino de Parramos a Yepocapa	negro, pequeño	enredo, cultivado
2		2.2 km camino de Parramos a Yepocapa	rojo	de suelo
3		2.3 km camino de Parramos a Yepocapa	negro, pequeño	enredo
4		2.3 km camino de Parramos a Yepocapa	negro, pequeño	enredo
5		2.3 km camino de Parramos a Yepocapa	negro, pequeño	enredo
6		2.3 km camino de Parramos a Yepocapa	rojo, grande	enredo
7		2.3 km camino de Parramos a Yepocapa	rojo intenso, grande	enredo
8		2.5 km camino de Parramos a Yepocapa	negro, mediano	enredo
9		3.1 km camino de Parramos a Yepocapa, Pampay, Parramos.	blanco, mediano	enredo
10		3.1 km camino de Parramos a Yepocapa, Pampay, Parramos.	colorado	enredo
11		3.1 km camino de Parramos a Yepocapa, Pampay, Parramos.	negro, pequeño	enredo
12.1		3.1 km camino de Parramos a Yepocapa, Pampay, Parramos.	café claro y negro	enredo
12.2		3.1 km camino de Parramos a Yepocapa, Pampay, Parramos.	naranja y negro	enredo
12.3		3.1 km camino de Parramos a Yepocapa, Pampay, Parramos.	negro, mediano	enredo
12.4		3.1 km camino de Parramos a Yepocapa, Pampay, Parramos.	morado intenso y negro	enredo
12.5		3.1 km camino de Parramos a Yepocapa, Pampay, Parramos.	café claro	enredo
12.6		3.1 km camino de Parramos a Yepocapa, Pampay, Parramos.	morado y negro	enredo
12.7		3.1 km camino de Parramos a Yepocapa, Pampay, Parramos.	café, naranja y blanco	enredo
12.8		3.1 km camino de Parramos a Yepocapa, Pampay, Parramos.	morado, grande	enredo
13		7.0 km camino de Parramos a Yepocapa,	rojo, mediano	enredo
14		Parramos	rojo	enredo
15		Parramos	negro, mediano	Vaina colorada
16		Parramos	negro, mediano	Vaina Blanca
17		Parramos	negro, mediano	Vaina Morada

Continuación cuadro No. 6

Colecta (entrada)	Especie	Lugar de colecta	Características	
			grano	planta

18	P.	Parramos	negro, mediano	Vaina blanca
19		mercado de chimaltenango	negro, mediano	
20		mercado de chimaltenango	negro, mediano	
21		mercado de chimaltenango	colorado, mediano	
22		mercado de chimaltenango	negro, mediano	
23		mercado de chimaltenango	blanco, mediano	
24		mercado de chimaltenango	café claro, pequeño	
25		mercado de chimaltenango	blanco, mediano	
26		Joya Grande, Zaragoza	rojo, mediano	enredo
27		Joya Grande, Zaragoza	rojo -naranja, mediano	enredo
28		Joya Grande, Zaragoza	corinto	enredo
29		Joya Grande, Zaragoza	negro, mediano	Vaina blanca, enredo
30		Joya Grande, Zaragoza	negro, mediano	Vaina morada, enredo
31		Joya Grande, Zaragoza	negro	enredo
32.1		Joya Grande, Zaragoza	café, mediano	
32.2		Joya Grande, Zaragoza	café y negro, mediano	
33.3		Joya Grande, Zaragoza	negro, mediano	
33.4		Joya Grande, Zaragoza	rojizo, mediano	
33.5		Joya Grande, Zaragoza	blanco, mediano	
33.6		Joya Grande, zaragoza	negro y blanco, mediano	
34		mercado de Comalapa	negro, mediano	Patzizia
35		mercado de Comalapa	negro y colorado, grande	
36		mercado de Comalapa	negro	
37.1		mercado de Comalapa	negro, mediano	Frijol ejotero
37.2		mercado de Comalapa	negro, mediano	
37.3		mercado de Comalapa	negro	
37.4		mercado de Comalapa	blanco, mediano	
37.5		mercado de Comalapa	naranja	
37.6		mercado de Comalapa	rojo	
37.7		mercado de Comalapa	gris, pequeño	
37.8		mercado de Comalapa	gris y café, pequeño	

Continuación cuadro No. 6

Colecta (entrada)	Especie	Lugar de colecta	Características	
			grano	planta

38.1	P.	mercado de Comalapa	negro, mediano	
38.2		mercado de Comalapa	negro, grande	
38.3		mercado de Comalapa	blanco, mediano	
38.4		mercado de Comalapa	corinto, mediano	
38.5		mercado de Comalapa	amarillo, mediano	
38.6		mercado de Comalapa	gris, mediano	
38.7		mercado de Comalapa	gris y café, pequeño	
38.8		mercado de Comalapa	gris y negro, pequeño	
38.9		mercado de Comalapa	rojo, pequeño	
38.10		mercado de Comalapa	naranja	
38.11		mercado de Comalapa	colorado, mediano	
38.12		mercado de Comalapa	colorado, grande	
38.13		mercado de Comalapa	colorado y corinto, mediano	
38.14		mercado de Comalapa	colorado y naranja, mediano	
38.15		mercado de Comalapa	colorado, naranja y amarillo, mediano	
38.16		mercado de Patzicia	colorado y amarillo, mediano	
39		mercado de San Marcos	negro, mediano	
40		mercado de San Marcos	amarillo y café claro	perenne
41		mercado de San Marcos	café y negro	perenne
42		mercado de San Marcos	negro	perenne
43		mercado de San Marcos	café claro	perenne
44		mercado de San Marcos	café y negro	perenne
45		mercado de San Marcos	naranja y negro	perenne
46		mercado de San Marcos	blanco	enredo
47		mercado de San Marcos	naranja	enredo
48		mercado de San Marcos	negro y naranja	enredo
49		mercado de San Marcos	colorado y corinto	perenne
50		mercado de San Marcos	naranja y café	enredo
51		mercado de San Marcos	café oscuro y negro	enredo
52		mercado de San Marcos	morado	enredo
53		mercado de San Marcos	café oscuro y claro	enredo
Colecta (entrada)	Especie	Lugar de colecta	Características	
			grano	planta

54		Mercado de San Marcos	naranja y corinto	enredo
55		Mercado de San Marcos	café oscuro y claro	enredo
56		Mercado de San Marcos	morado claro y negro	enredo
57		Mercado de San Marcos	café claro y negro	enredo
58		Mercado de San Marcos	redondo, grande, negro	enredo
59		Mercado de San Marcos	café oscuro y claro	enredo
60		Tamarindo, Asunción Mita, Jutiapa	blanco, mediano	
61		El Tablón, Asunción Mita, Jutiapa	colorado, mediano	
62		Guevara, Asunción Mita, Jutiapa	negro, mediano	
63		Linares, Asunción Mita, Jutiapa	negro, mediano	
64		Linares, Asunción Mita, Jutiapa	negro, mediano	
65		El Tablón, Asunción Mita, Jutiapa	colorado, mediano	rabia de gato
66		Tamarindo, Asunción Mita, Jutiapa	blanco, mediano	
67	P. polyanthus	Camino: San Miguel Dueñas - caldera	café oscuro y negro, mediano	
68	P. vulgaris	Laguna de Calderas, Amatitlan (1500 msnm)	café oscuro y negro, pequeño	silvestre
69.1	P. coccinius	Quilenco, Chiantla	negro, mediano	silvestre
69.2	P. coccinius	Quilenco, Chiantla	blanco y negro, pequeño	
69.3	P. coccinius	Quilenco, Chiantla	blanco y negro, pequeño	
69.4	P. coccinius	Quilenco, Chiantla	café y negro, pequeño	
69.5	P. coccinius	Quilenco, Chiantla	negro y morado, mediano	
70	P. polyanthus	Calderas, 1500 msnm	café y negro, grande	
71	P. coccinius	Guatemala-Quetzaltenango, 151 km. 2280 msnm	café oscuro, pequeño	
72	P. coccinius	Volcán de Agua, cerca de Sta. María de Jesús, 2000 msnm	café y negro, mediano	
73	P. polyanthus	Chimachoy, Such. 2100 msnm	café, morado y negro, pequeño y grande	
74	P. vulgaris	San Miguel Dueñas, Sac. 1500 msnm	café y negro, pequeño	
75	P. vulgaris	camino: Palin-Sta. María de Jesús, 1100 msnm	café y negro, pequeño, plano	
76	P. polyanthus	Calderas	negro, grande	
77	P. polyanthus	Calderas	café y negro, grande	
78	P. polyanthus	Calderas	café claro y negro, grande	
79	P. polyanthus	Calderas	café oscuro y negro, mediano	

80	P. polyanthus	Calderas	corinto, grande	
----	---------------	----------	-----------------	--

Continuación cuadro No. 6

Colecta (entrada)	Especie	Lugar de colecta	Características	
			grano	planta
81	P. polianthus	Calderas	colorado, grande	
82	P. polianthus	Calderas	colorado y naranja, grande	
83	P. polianthus	Calderas	morado y negro, grande	
84	P. polianthus	Calderas	rojizo y negro, grande	
85	P. polianthus	Calderas	naranja y café, grande	
86	P. polianthus	Calderas	naranja y rojo, grande	
87	P. polianthus	Calderas	amarillo y café, mediano	
88	P. polianthus	Calderas	amarillo y naranja, mediano	
89	P. polianthus	Calderas	café claro y negro, grande	
90	P. polianthus	Calderas	blanco, grande	