

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA



EVALUACION in vitro DE BROTES DE FRIJOL
(Paseolus vulgaris L. y P. acutifolius Gray.)
PARA LA DETERMINACION DE TOLERANCIA
A LA SAL DE NaCl.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA

PRESENTA

LEOBARDO IRACHETA DONJUAN

T

SB327

I7

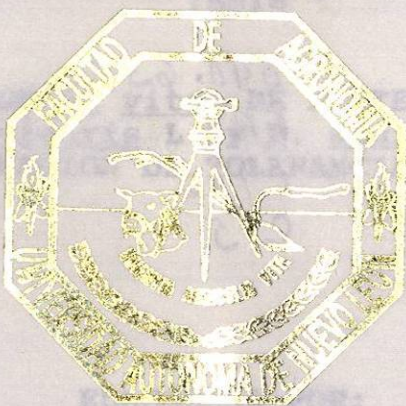
C.1



1080072014

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE AGRONOMIA
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA



EVALUACION in vitro DE BROTES DE FRIJOL
(*Paseolus vulgaris* L. y *P. acutifolius* Gray.)
PARA LA DETERMINACION DE TOLENCIA
A LA SAL DE NaCl.

LEOBARDO IRACHETA DONJUAN

EVALUACION in vitro DE BROTES DE FRIJOL
(*Paseolus vulgaris* L. y *P. acutifolius* Gray.)
PARA LA DETERMINACION DE TOLENCIA

ACEPTADA Y APROBADA POR EL COMITADO PARCIAL
PARA OBTENER EL TITULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA

PRESENTA

LEOBARDO IRACHETA DONJUAN

DRA. ELIZABETH CAMERON CERDA
DIRECTOR

ING. CEBARDO GONZALEZ FLORES

MARIN, N. L.

ING.

JUNIO, 1993

011587

T
SB 327
I 7

040.633
FAP
1993
C.5



(72014)



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE AGRONOMIA

" TESIS "

EVALUACION in vitro DE BROTES DE FRIJOL
(Phaseolus vulgaris L. y P. acutifolius Gray.)
PARA LA DETERMINACION DE TOLERANCIA A LA SAL DE NaCl.

ELABORADA POR:

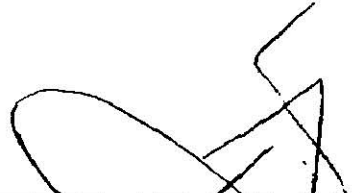
LEOBARDO IRACHETA DONJUAN

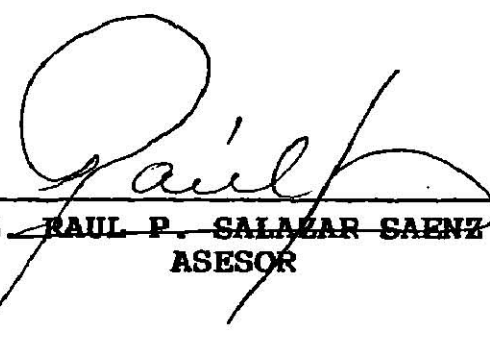
ACEPTADA Y APROBADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL TITULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA

COMITE SUPERVISOR DE TESIS



DRA. ELIZABETH CARDENAS CERDA
DIRECTOR

ING. CESAREO GUZMAN FLORES
ASESOR

ING. RAUL P. SALAZAR SAENZ
ASESOR

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por brindarme los conocimientos agrícolas.

A la Dra. Elizabeth Cárdenas Cerda, por sus invaluable enseñanzas en estudio del cultivo de tejidos vegetales; por la gran confianza, amistad y sobre todo apoyo y ánimos para continuar mis estudios.

Al Ing. Cesáreo Guzmán Flores, por su interés y positivas sugerencias en la revisión del presente trabajo.

Al ING. Raúl P. Salazar Sáenz, por sus atinadas observaciones durante la revisión del escrito.

Al M. C. Omar G. Alvarado Gómez, por la valiosa aportación de literatura para el trabajo realizado.

Al Ing. Netzahualcóyotl M., Martín A., Guillermo C., Sergio R. Abelardo G., Roberto N., Ing. Carmen O., Ing. Adriana G., Alida V., Ing. Ninfo F., Odilón B. y Emiliano, por todos los inolvidables momentos de amistad compartidos.

A los compañeros de trabajo del Laboratorio de Biotecnología Vegetal: Carlos, Blanca, Mario y Guillermo; por hacer más grato el ambiente de trabajo y ayuda prestada.

DEDICATORIAS

A mi Dios: Por no pedirme adoración y dolor, y por darme el don de ser racional para usar sin miedo mi propia mente.

A mis padres:

Sra. Ma. Ladislada Donjuan de Iracheta y
Sr. Leobardo Iracheta Martínez, por todo el amor y comprensión que me han dado en la vida.

A mis hermanas:

Eusebia, Luisa, Brenda, Victoria y Cristina,
por el cariño y apoyo mutuo que nos distinguen.

A mis abuelos:

Sra. Antonia Sánchez de Donjuan y
Sr. Guadalupe Donjuan Quintero, por su bondad y entereza que me han inculcado.

A mi cuñado: Lic. Carlos Valle Montemayor, por el apoyo que siempre ha mostrado a la familia.

INDICE

	PAG.
INDICE DE CUADROS	III
INDICE DE FIGURAS	IV
RESUMEN	VI
I. INTRODUCCION	1
II. REVISION DE LITERATURA	3
2.1. Efecto de la salinidad en las plantas cul- tivadas.	3
2.1.1. Toxicidad	4
2.1.2. Efectos sobre la morfogénesis	4
2.1.3. Efectos en el metabolismo.....	7
2.2. Mecanismos de tolerancia a la salinidad	10
2.2.1. Control genético de la tolerancia a la salinidad	12
2.2.2. Ajuste osmótico	14
2.3. Regeneración <u>in vitro</u> de frijol.....	17
2.3.1. Organogénesis	17
2.3.2. Embriogénesis	20
2.3.3. Efecto de las soluciones salinas sobre las células	22
III. MATERIALES Y METODOS.	26
3.1. Material biológico	26
3.2. Germinación de la semilla	26
3.3. Medio de cultivo	27
3.3.1. Preparación de medio de cultivo	27

	PAG.
3.4. Tratamientos	29
3.5. Disección de brotes	30
3.5.1. Predesinfestación de brotes	31
3.5.2. Desinfestación de brotes	31
3.6. Establecimiento <u>in vitro</u>	31
3.7. Ambiente de cultivo	34
3.8. Variables de estudio	34
3.8.1. Longitud de brote	34
3.8.2. Número de brotes axilares	34
3.8.3. Número de hojas desplegadas	35
3.8.4. Peso fresco	35
3.8.5. Peso seco	35
3.9. Análisis estadístico	36
IV. RESULTADOS.	38
4.1. Efecto de las concentraciones de NaCl en el crecimiento de los brotes de frijol <u>in vitro</u> ...	38
4.1.1. Longitud de brote	38
4.1.2. Número de brotes axilares	40
4.1.3. Número de hojas desplegadas	42
4.1.4. Peso fresco	44
4.1.5. Peso seco	46
V. DISCUSION.	48
VI. CONCLUSIONES	54
VII. BIBLIOGRAFIA.	55
VIII. APENDICE.	62

INDICE DE CUADROS

Cuadro		pág.
1	Sales inorgánicas del medio básico Murashige-Skoog (1962), en mg.l^{-1}	29
2	Niveles de NaCl probados en los tres cultivares de frijol	30

INDICE DE FIGURAS

Figura	pág.
1	Esquema de los procedimientos para el establecimiento <u>in vitro</u> de los brotes de frijol 33
2	Longitud de brote en los tres cultivares de frijol en cuatro concentraciones de NaCl. Se evaluó a las cuatro semanas de su establecimiento <u>in vitro</u> para la determinación de tolerancia a la sal de NaCl..... 39
3	Número de brotes axilares en los tres cultivares de frijol en cuatro concentraciones de NaCl. Se evaluó a las cuatro semanas de la siembra <u>in vitro</u> para la determinación de tolerancia a la sal de NaCl..... 41
4	Número de hojas desplegadas de los tres cultivares de frijol en cuatro concentraciones de NaCl. Se evaluó a las cuatro semanas de la siembra <u>in vitro</u> para la determinación de la tolerancia a la sal de NaCl..... 43
5	Peso fresco de los brotes de los tres cultivares de frijol en las cuatro concentraciones de

	NaCl. La evaluación fue a las cuatro semanas de su siembra <u>in vitro</u>	45
6	Peso seco de los tres cultivares de frijol en cuatro concentraciones de NaCl. Las evaluaciones se realizaron a las cuatro semanas de la siembra <u>in vitro</u> para la determinación de la tolerancia a la sal de NaCl.....	47

RESUMEN

El frijol representa uno de los principales cultivos básicos en México, pero también es altamente sensible a la salinidad de los suelos, los cuales cada vez son más dominantes en el país. De esta forma, el cultivo in vitro representa una técnica útil para realizar evaluaciones y determinaciones de tolerancia a sales en este cultivo.

El objetivo de esta investigación fue el determinar la respuesta de tolerancia de los brotes de dos cultivares de Phaseolus vulgaris L. y uno de P. acutifolius Gray. bajo tres dosis de NaCl, utilizando la técnica in vitro.

Los tratamientos aplicados consistieron en someter a los brotes de los tres cultivares de frijol, bajo los efectos del NaCl a las concentraciones de 0.0, 0.1, 0.3 y 0.5 M.

De esta manera, los análisis estadísticos indicaron que para las cinco variables estudiadas en los dos cultivares de P. vulgaris L. (Selección-4 y Pinto-114) disminuyó el valor de cada una de ellas al elevarse la concentración de NaCl.

Por su parte el cultivar de P. acutifolius G. sólo registró dichas respuestas en las concentraciones mayores a 0.1 M.

Sin embargo, en la concentración de 0.3 M se presentó el límite mínimo de crecimiento de los brotes para los tres cultivares, ya que también la concentración de 0.5 M registró la misma respuesta que dicha concentración. En estas dos ultimas concentraciones la necrosis también fue observada.

Por consiguiente, se concluyó que el cultivar de P. acutifolius G. (Phaacu-125) resultó ser más tolerante a la sal de NaCl bajo la concentración de 0.1 M de NaCl, ya que los valores de las variables en esta concentración no difirieron estadísticamente de la concentración de 0.0 M.

I. INTRODUCCION.

La salinidad en el suelo agrícola constituye un factor limitante de gran impacto en regiones áridas y semiáridas; estimándose cerca de 900 millones de hectáreas afectadas por este fenómeno en el mundo. En las regiones semiáridas se encuentran grandes extensiones de tierra irrigadas, de las cuales se considera que un tercio de ellas presenta problemas de excesos de sales, lo cual constituye una restricción significativa en la expansión agrícola.

Entre las diferentes especies de plantas cultivadas susceptibles a sales, se encuentra el frijol común (Phaseolus vulgaris L.) ya que se clasifica como un cultivo poco tolerante a éstas; en donde, dicho factor aunado a otros igualmente negativos, conforma el bajo promedio de rendimiento de este cultivo en el país.

Los problemas de bajos rendimientos en frijol y en general en las especies cultivadas, ocasionados por excesos de sales en el suelo, pueden ser disminuidos por el uso de procedimientos tecnológicos y/o biológicos; entiéndase en el caso de los primeros el manejo de agua-suelo, así como la metodología de irrigación y desalinización; mientras que en los segundos, se incluye el uso y transformación de halófitas, o bien la manipulación y mejoramiento para la introducción de tolerancia a sales en glicófitas.

El uso de la técnica de cultivo in vitro para el incremento de la producción se ha vuelto muy importante para los trabajos de manipulación en la introducción de tolerancia a sales y resistencia a diversos factores en las especies agrícolas susceptibles, lográndose obtener diferentes líneas celulares a partir de una población somática.

Debido a los problemas que enfrenta el frijol común en los programas de mejoramiento in vivo, por ser altamente autopolinizado; la técnica in vitro constituye una herramienta que facilita estos trabajos, ya que se puede llevar a cabo la recuperación de híbridos interespecíficos. Lo anterior constituye una alternativa para la obtención de suficiente semilla producto de dicha polinización cruzada; donde además con el uso de brotes apicales se consigue incrementar y mantener íntegramente el genotipo obtenido, facilitándose los estudios metabólicos, aparte de lograr una eliminación de patógenos virales y selección de variedades tolerantes a sales.

Por lo anteriormente expuesto, el objetivo de esta investigación fue el determinar la respuesta de tolerancia de los brotes de dos cultivares de P. vulgaris L. y uno de P. acutifolius Gray. bajo cuatro dosis de NaCl, utilizando la técnica in vitro.

II. REVISION DE LITERATURA.

2.1. Efecto de la salinidad en las plantas cultivadas.

El potencial hídrico (Ψ_w) de la solución del suelo depende fundamentalmente del potencial osmótico (Ψ_o). Este es originado por el efecto que ejercen las partículas disueltas en el agua y disminuye con la adición de soluto a la solución. Sin embargo dentro de condiciones de salinidad, el efecto del Ψ_o sobre la relación del Ψ_w o del suelo del mismo sobre la absorción de agua por la planta es similar a la que se registra por la sequía (Hale y Orcutt, 1987). Aunque en este caso la fuerza responsable de que el agua no pueda fluir hacia la planta es el potencial mátrico (Ψ_m) que se origina por la atracción electrostática que ejercen las partículas del suelo sobre las moléculas de agua (Guzmán y Kohashi, 1993).

Disminuciones en el Ψ_w del suelo reducirán la absorción de agua por la planta. Sin embargo los iones disueltos al penetrar a la planta provocan la respuesta vegetal de diferentes formas y en diferentes grados, lo cual dependerá de la constitución genética del individuo (Anónimo, 1982). En los siguientes apartados se describen algunos efectos que la salinidad tiene sobre el desarrollo vegetal.

2.1.1. Toxicidad

Encontramos escasos estudios sobre los efectos tóxicos de la salinidad sobre el frijol. No obstante existen abundantes trabajos en este aspecto sobre otras especies. De acuerdo con Abel y MacKenzie (1964), las características de toxicidad por cloruros en algunos árboles como el duraznero y cítricos es una deshidratación y obscurecimiento de las hojas, empezando en los márgenes del ápice; mientras que a nivel in vitro, en trabajos llevados a cabo por Yang et al. (1990) en dos especies de Sorghum sp. utilizando callos sometidos a varias concentraciones de NaCl, se comprobó una reducción del crecimiento y el daño salino pareció estar asociado con el ion tóxico. Reddy y Vaidyanath (1986) por su parte, reportan que el crecimiento de callos de algunas especies de plantas dentro de varias concentraciones de NaCl, puede provocar una toxicidad iónica.

2.1.2. Efectos sobre la morfogénesis

A nivel planta es común que el exceso de iones y el déficit hídrico provocados por la concentración salina, pueda en un momento dado ocasionar una reducción general del crecimiento en las plantas glicófitas; dicho déficit hídrico provocado por la concentración salina aparte de reducir el crecimiento de glicófitas, también puede repercutir en el crecimiento de halófitas, sólo que en este caso a una más alta concentración de sales; donde la reducción del crecimiento es

debido, en ambos casos, a la inhibición de la fotosíntesis o del desarrollo de nuevas células (Greeway y Munns, 1980). Por su parte Taleisnik citado por Mejía (1990) menciona que se ha establecido en plantas completas, que las sales reducen la dominancia apical y el tamaño de los tallos.

Por consiguiente, los efectos que ocasiona la salinidad a nivel celular, pueden repercutir en la reducción de turgencia, inhibición de la función de la membrana o actividades enzimáticas (Flowers et al., 1977), inhibición de la fotosíntesis (Schwarz y Gale citados por Hasegawa et al., 1986), inducción de una deficiencia iónica debida al inadecuado transporte, y/o incremento del uso de energía metabólica por los procesos de no crecimiento involucrados en el mantenimiento de la tolerancia (Yeo citado por Hasegawa et al., 1986).

Por otra parte Pua y Thorpe citados por Mejía (1990) han encontrado que las sales promueven en un momento dado la morfogénesis en algunos cultivos in vitro; como el caso de callos que en presencia de sal producen brotes, pese a que el medio de cultivo empleado no tenga las hormonas requeridas.

Tal vez una explicación de lo anterior sean las determinaciones de Nabors y Dykes (1985) en el cultivo de células de tabaco, quienes expresan que conforme se incrementó el NaCl, se calculó una aparente velocidad de mutación en dichas

células , en donde las mutaciones se comportaron como alelos dominantes y apareciendo en una relación de 1:500,000 células.

Sin embargo, los mecanismos involucrados en la diferenciación morfogénética aún son desconocidos, por lo que se ha pensado que las células bajo tratamiento salino, desarrollan un efecto similar a la autotrofia provocada por citocininas, ya que está bien comprobado que el desarrollo de brotes está asociado con altos niveles de esta fitohormona (Chandler et al. citados por Mejía, 1990).

Respecto a lo anterior, Spiegel-Roy y Ben-Hayyim (1985) han encontrado un incremento muy marcado en la formación de embriones in vitro en Citrus sinensis y C. aurantium, el cual fue observado en la presencia de 0.085 ó 0.1 M de NaCl y en algunos casos también a 0.17 M de NaCl. Binh et al. (1992) en el caso de monocotiledóneas, también han establecido que las interacciones entre diferentes tipos de células en una población expuesta a una baja concentración salina, usualmente afecta la respuesta morfogénica celular en el cultivo de células en suspensión, como en el caso específico de arroz, en las cuales se encontró una formación de embriones somáticos a 1.5% de NaCl, pero a este mismo nivel salino se encontró una inhibición del desarrollo vegetal de estos embriones.

Por consiguiente, las sales como el NaCl, ejercen un gran efecto en los procesos morfogénéticos de las plantas, tal y como lo corroboran Bourgeais et al. citados por Mejía (1990), quienes encontraron que las sales de NaCl redujeron el crecimiento de ápices de tallos de tomate, reduciendo el desarrollo y crecimiento de ápices conforme se elevó la concentración salina. Juárez citado por Mejía (1990), al igual que los investigadores anteriores, encontro que el cultivo de ápice de tallo de tomate en presencia de NaCl, reducen proporcionalmente el desarrollo de tallos y raíces al elevar la concentración de sal, inhibiendo totalmente el crecimiento y desarrollo a 1.2% de NaCl.

En general, incrementos en la salinidad reducen la velocidad de germinación (Francois, 1985, Abel y MacKenzie, 1964) y de emergencia (Ogasa, citado por Abel y Mackenzie, 1964).

2.1.3. Efectos en el metabolismo

Se ha encontrado que uno de los efectos adversos provocados por la salinidad es la inhibición de la actividad enzimática (Flowers et al., 1977). Greenway y Munns (1980) han determinado que el crecimiento de muchas especies tolerantes a sales es mucho menos sensible en altas concentraciones internas de electrolitos, en comparación con lo expresado en la respuesta con enzimas, de estas especies, aisladas y

sometidas a tratamiento; por lo que ésta discrepancia entre respuestas in vivo e in vitro pueden ser debidas a la más baja concentración iónica en el citoplasma que en el tejido como un todo; sin embargo, algunos estudios in vitro muestran que la inhibición de enzimas puede ser mitigada por el incremento en los niveles del substrato o por la adición de otros solutos orgánicos. En el caso de las especies glicófitas no hay discrepancia entre la respuesta en la sensibilidad de la actividad enzimática in vitro y la respuesta de crecimiento, debido a que muchas especies tienden a reducir el crecimiento cuando la concentración de iones en las hojas es tan baja como 100 mM de Cl^- . De esta manera, aunque no hay evidencia disponible, la reducción del crecimiento puede ser debido a la inhibición de enzimas por la sal, asumiendo que no hay adaptaciones basadas en cualquier modificación enzimática o la falta de mantenimiento de bajas concentraciones en el citoplasma.

Bernstein (1963), expone que la mayor parte de los sistemas enzimáticos investigados aparecen como más sensibles a la hipotonicidad que a la hipertonicidad, o a la disminución en la concentración de iones específicos por abajo del óptimo que a la concentración más óptima; mientras que por otra parte no se puede excluir que algunos sistemas enzimáticos podrían ser críticamente afectados por las concentraciones en el Ψ_o y la concentración iónica en la célula.

Greenway y Munns (1980) han mostrado en sus estudios in vitro una sensibilidad similar a los electrolitos por parte de enzimas de halófitas y glicófitas; por lo que al respecto Flowers et al. (1977) concluyó que las enzimas de halófitas no son notablemente resistentes a sales, ni requieren de ellas, así estas plantas verdaderamente son muy similares a las enzimas de otras plantas, siendo su actividad generalmente inhibida por altas concentraciones de electrolitos, aunque la inhibición puede ser superada en algunas excepciones por incrementos de las concentraciones del substrato y por la aclimatación de las condiciones de crecimiento.

En algunos trabajos in vitro sobre los efectos del NaCl sobre las enzimas de halófitas angiospermas, se ha reportado que la dehidrogenasa maléica, transaminasa aspártica, dehidrogenasa glucosa-6-fosfato y la dehidrogenasa isocratata extraídas de Artiplex sp., Salicornia sp. y de la glicófita Phaseolus vulgaris L. muestran una sensibilidad in vitro similar al NaCl, y en cambio se observa una gran diferencia en la tolerancia a sales a nivel planta (Greenway y Osmond citados por Flowers et al., 1977). Flowers et al. (1977) por otra parte, expusieron que la dehidrogenasa-6-fosfato y la maléica de la Sauceda maritima fueron inhibidas por 60% a 70% en la presencia de 333 mM de NaCl, estando estos efectos in vitro del NaCl en la actividad enzimática indistinguibles de los efectos en las enzimas correspondientes a Pisum sativum el cual es sensible a la sal.

En el caso de frijol común (Phaseolus vulgaris cv. Contender), específicamente durante el estudio de crecimiento de células en suspensión, Liau y Boll (1971) observaron una fase de retraso en términos de velocidad de crecimiento exponencial de las células, en donde la disminución del peso seco por célula después del décimo día presumiblemente se deba a una degradación sobre los procesos sintéticos, ocasionados por la inducción de procesos enzimáticos; lo cual sería de gran importancia considerar durante los estudios in vitro con NaCl.

Para el caso específico de la actividad fotosintética, el efecto de la salinidad es indirecta, ya que lo que ésta provoca es un desequilibrio hídrico entre la planta y el suelo, que como se mencionó en el apartado 2.1. se produce una sequía induciendo cierres estomatales, por lo que se limita la absorción de CO₂ y por consecuencia se reduce la actividad fotosintética (Iljin, 1957), además, Mejía (1990) menciona que una de las causas de la reducción de la fotosíntesis en las plantas es la alteración de la morfología de los cloroplastos, ocasionada por la salinidad, lo cual provoca una desorganización del grana y por lo tanto pérdida de la capacidad fotosintetizadora.

2.2. Mecanismos de tolerancia a la salinidad

La capacidad de las plantas superiores para crecer satisfactoriamente sobre suelos salinos depende de la

constitución fisiológica de la planta, su estado de crecimiento y sus hábitos radícolas (Buckman y Brady, 1977).

Flowers et al. (1977) concluyó que la extrema tolerancia en las plantas está correlacionada con una habilidad para mantener una alta concentración salina dentro de las células; por lo que se considera el crecimiento, junto con la toma, acumulación y localización intracelular de iones para los mecanismos de tolerancia a sales en plantas en general. Así mismo, las evidencias indican que la acumulación de moléculas orgánicas en el interior de las células también permiten la osmorregulación (Croughan et al. 1981, Greenway y Munns, 1980)

Otro mecanismo de tolerancia es la excreción de iones por bombeo activo y en ocasiones por la presencia de glándulas salinas y tricomas especializados (Flowers et al. 1977). La dilución de sales intracelulares es un mecanismo que se encuentra en plantas suculentas (Hale y Orcutt. 1987).

En general, los mecanismos de exclusión son efectivos a bajas o moderados niveles de salinidad; mientras que la acumulación de iones es el mecanismo primario usado por halófitas a elevados niveles de sal, presumiblemente en conjunción con la capacidad de compartimentizar iones en la vacuola (Flowers et al., 1977, Greenway y Munns, 1980). La capacidad para acumular y compartimentizar iones ha sido considerado para ser el resultado de cambios en la permeabilidad

de la membrana y las propiedades de trasportación de ión que facilita el transprte contra los gradientes electroquímicos y transporte selectivo en la membrana (Greenway y Munns, 1980).

2.2.1. Control genético de la tolerancia a la salinidad

Se ha también sugerido que la sensibilidad salina de algunas glicófitas puede ser debida a la insuficiente toma de electrolitos para la presión de turgor o para mantener el volumen, particularmente en el tejido expandido; donde la solución sería una sincronización de la compartimentación de iones por las células de las hojas con altas velocidades de transportación de iones al brote; por lo que se ha asumido que un número de especies contienen genes para la eficiente compartimentación de iones, es decir, para la acumulación en la vacuola (Greenway y Munns, 1980).

Spiegel-Roy y Ben-Hayyim (1985), han observado que el mantenimiento de la tolerancia en líneas celulares durante todos los subsecuentes estados de desarrollo vegetal constituye un problema. Por su parte Greenway y Munns (1980) han reportado que el genotipo provoca diferencias en la transportación de iones al brote en el caso de soya; respecto a esto, Abel (1969) ha encontrado que el factor de exclusión o inclusión de cloruros en las hojas y tallos de este cultivo es controlado por un par de genes; donde el gen con símbolos Ncl y ncl son propuestos como dominancia de la exclusión y la

recesiva inclusión de cloruros, respectivamente.

Nabors citado por Ibrahim et al. (1992), expresa la necesidad de establecer la estabilidad y herabilidad de una característica seleccionada, preferentemente por análisis del comportamiento de plantas derivadas de la semilla progenitora de las plantas seleccionadas dentro de condiciones de campo. De acuerdo a esto, Ibrahim et al. (1992) al realizar comparaciones de trabajos in vitro e in vivo, encontró que en todos los parámetros de selección in vitro se produjo un nivel más alto de tolerancia a NaCl que la selección in vivo, ya que una variación adicional durante la selección in vitro, aparte de la variación de la semilla de Coleus blumei, podría ser debida a la mutación durante el cultivo de tejidos, lo cual contribuye a la modificación del genotipo de brotes regenerados y seleccionados.

En otros trabajos con tolerancia, Hasegawa et al. (1986) han considerado que la inestable tolerancia de células de tabaco adaptadas a 171 mM de NaCl fue indicativo de que aparentemente sólo ocurrió una adaptación fisiológica sin tomar en cuenta la gran variabilidad para la tolerancia a sales entremezclada con los clones celulares en la población celular inadaptada; aun así, las adaptaciones fisiológicas parecieron responsables por cerca del 60% de la tolerancia exhibida por las células creciendo en 428 mM de NaCl, donde el enriquecimiento de la población por tipos celulares más

tolerantes ocurrió cuando la exposición a los niveles de agobio fue elevado, ocurriendo como resultado de la selección de variantes estables (Handa et al. citados por Hasegawa et al., 1986) o debido a un cambio genómico estable impulsado por el medio ambiente (Meins y Binns citados por Hasegawa et al., 1986).

2.2.2. Ajuste osmótico

A todos estos procesos donde están involucradas modificaciones en el Yo y que regulan las relaciones hídricas de las células, se denomina ajuste osmótico (Guzmán y Kohashi, 1993). Dicho proceso es considerado como un mecanismo de sobrevivencia antes que un mecanismo que permite elevar la velocidad de crecimiento en presencia de un agente agobiante (Hasegawa et al., 1986).

Otros términos han sido usados como equivalentes al ajuste osmótico, entre estos están la osmorregulación, regulación de turgencia, regulación de la actividad hídrica y adaptación osmótica (Hale y Orcutt, 1987).

Así mismo, Brenstein (1963) por su parte, menciona en sus trabajos realizados en varios cultivos, específicamente en pimiento, que la edad, tamaño y estado de desarrollo fisiológico de la planta, pueden haber contribuido a su más baja velocidad de ajuste osmótico.

En el caso de solutos o componentes orgánicos, Hasegawa et al. (1986) menciona que estos se cree están involucrados con el ajuste osmótico en células de tabaco, los cuales podrían ser compartimentizados en el citoplasma, y por consiguiente su contribución intracelular al ajuste osmótico podría ser muy significativo.

Trejo et al. (1992) en sus estudios con Amaranthus sp., reporta que la acumulación de iones para el ajuste osmótico pareció no tener efectos en la limitación del crecimiento en las células, atribuyéndolo al hecho de que en algunos casos los efectos iniciales de la salinidad ocurren por deficiencia hídrica (Flowers et al. citados por Trejo et al., 1992).

Hale y Orcutt (1987) opinan por su parte, que el ajuste osmótico puede dar una elevación completa o parcial para el mantenimiento de la turgencia y por conveniencia esto es usual para medir el incremento en solutos, tanto en un Ψ_w de cero, en el cual el punto de Ψ_p iguala al Ψ_o ; como en un turgor de cero, en el cual el punto de Ψ_p iguala a la Ψ_o , ambos dados por las condiciones de la siguiente fórmula:

$$\text{Potencial Osmótico} = \frac{\Psi_{o_o} V_o}{V}$$

donde V es el volumen osmótico y Ψ_{o_o} y V_o son algunos valores de referencia, como por ejemplo: turgencia completa o cero turgencia.

Por otra parte, es de importancia el considerar que durante los primeros estadios del agobio hídrico, la turgencia completa puede ser mantenida por los procesos de ajuste osmótico, pero conforme el agobio continúa hay menor capacidad para el ajuste completo. Por otra parte, si se considera que la contribución de los carbohidratos para la ósmosis no es muy grande para explicar algún ajuste significativo en el turgor dentro de las condiciones agobiantes; lo que puede estar pasando de antemano en el desarrollo de tolerancia al agobio salino, es que la reducción en el crecimiento y rendimiento es causado por una regulación osmótica basada en la absorción de electrolitos contra un gradiente de concentración, causando una reducción en la dependencia de fotosíntatos y en la síntesis de solutos orgánicos para mantener el turgor (Hale y Orcutt, 1987). Hasegawa et al. (1986) por su parte, también concluye que el ajuste osmótico en algunas células adaptadas a sal puede ser debido en gran parte por la acumulación de Na^+ y Cl^- , lo cual ocurre contra un gradiente de concentración.

Bernstein (1963) comprobó lo anterior en plantas de pimiento, al cultivarlas por un período más largo en el medio salino y encontrar, específicamente en las hojas maduras, que la acumulación de cloruro se convirtió en el mayor factor en el ajuste osmótico. En el caso de los trabajos en Phaseolus vulgaris L., consigna que el incremento de Ca contribuyó al ajuste osmótico en los tallos de esta especie en el

medio de cultivo con el tratamiento de CaCl_2 , y un evidente incremento del Na^+ en los tratamientos de Na_2SO_4 y NaCl ; siendo realizado el ajuste osmótico de frijol en un corto periodo, estando una expansión parcialmente uniforme de las hojas ya dentro del ajuste osmótico; por lo que en conclusión se determinó también que la velocidad de ajuste osmótico en plantas podría ser adecuado el conocer los cambios en suelo salino dentro de condiciones de campo normales.

2.3. Regeneración in vitro de frijol

2.3.1. Organogénesis

El término organogénesis de novο en el cultivo de tejidos se refiere a la diferenciación dentro del explante (Thorpe citado por Litz y Jarret, 1991); por consiguiente la organogénesis comprende el desarrollo de yemas o de meristemas radicales a partir de los explantes directamente o a partir de callos (Litz y Jarret, 1991), donde a la formación de órganos en explantes de callo se conoce como la ruta de la organogénesis indirecta, donde un callo sin estructura organizada puede dar origen a brotes y raíces; el tamaño del callo del cual puede emerger estructuras organizadas varía considerablemente (Krikorian, 1991).

Todas las partes de la planta se han utilizado como explantes para la iniciación de callo, sin embargo, los

tejidos jóvenes poseen un alto grado de actividad meristemática y tienden a tener más plasticidad in vitro.

En realidad son pocas las pruebas para el crecimiento y organogénesis de vástagos de frijol común vía cultivo de tejidos; sin embargo algunos de los trabajos que se pueden mencionar son los realizados por Saam et al. (1987) quienes observaron una proliferación de vástagos a partir de ápices de plántulas en dos cultivares de Phaseolus vulgaris L. en un medio Murashige-Skoog adicionado con 6-Bencilaminopurina (BA 3.0 mg.l^{-1}) y Ac. naftalenacetico (ANA 0.1 mg.l^{-1}), en donde sin embargo el enraizamiento de dichos vástagos fue dado en el medio M.S. solamente, logrando obtener plantas maduras, las cuales produjeron flores fértiles, vainas y semillas.

Por otra parte, los trabajos realizados por Kartha et al. citados por Saam et al. (1987), sobre la regeneración de plantas a partir de meristemas de algunas leguminosas, entre ellas incluídas la soya y el frijol; y los llevados a cabo por Rublo y Kartha citados por Saam et al. (1987) sobre el cultivo in vitro de meristemas apicales de vástagos de varias especies y cultivares de Phaseolus; demuestran claramente la capacidad de organogénesis del frijol, donde se notó que los múltiples vástagos fueron producidos en determinados medios de cultivo.

En otros trabajos se ha logrado una satisfactoria multiplicación de vástagos de Phaseolus sp. después de tres perio-

dos de cultivo en pruebas realizadas por Allavena y Rossetti, citados por Saam et al. (1987).

Otro de los trabajos sobre organogénesis de Phaseolus realizados por Martins y Sondahl (1984) consistió en el desarrollo de brotes axilares a partir de cultivos nodales de plántulas de frijol, encontrando resultados favorables en el desarrollo de yemas axilares, las cuales produjeron plántulas en un medio B₅ adicionado con 6-BA (5mM) y AIB (Ac. indolbutirico a 0.25 mM); y posterior a esto se enraizaron dichas dichas plántulas en el mismo medio pero adicionado con AIB (10 mM) durante un lapso de 10 días.

McClellan y Grafton, citados por Jackson y Hobbs (1990) en sus trabajos sobre la regeneración de frijol común por vía de la organogénesis, a partir de explantes de nudos cotiledonares determinaron que la mejor componenda entre calidad y número de brotes producidos, fue determinada por los niveles de citocinina de 1 ó 5 mg.l⁻¹ de BAP.

Por otra parte, la investigación realizada por Martínez (1992) sobre la regeneración in vitro de plántulas de cuatro cultivares de frijol (Phaseolus vulgaris L.) utilizando brotes apicales como explantes, muestran que los dos medios M.S., tanto el adicionado con BA (3.0 mg.l⁻¹) + ANA (0.1 mg.l⁻¹) para la etapa de inducción y multiplicación, no mostraron diferencias significativas, a diferencia de los

medios de cultivo empleados para el enraizamiento, que mostraron a M.S básico + cinetina (0.5 mg.l^{-1}) + AIB (3.0 mg.l^{-1}) como el mejor para esta etapa.

2.3.2. Embriogénesis

Los embriones iniciados a partir de células que no son el producto de la fusión de gametos se les denomina embriones asexuales, adventicios o somáticos; los cuales son estructuras bipolares con un eje radical-apical sin conexión vascular con el tejido materno; donde dichas estructuras deben ser capaces de formar plantas normales. Sin embargo, la naturaleza de la diferenciación que se registra como resultado de la embriogénesis somática no ha sido probada y las interpretaciones de los eventos que ocurren tempranamente en las células y que traen consigo la diferenciación de plantas a partir de callos siguen siendo hipotéticas (Litz y Jarret, 1991). Por consiguiente, estos mismos investigadores, consideran que todos los tejidos vegetales tienen capacidad para formar callos in vitro; pero sólo pocos explantes poseen la habilidad para producir callos embriogénicos; por lo general se han empleado como explantes, hipocótilos y embriones; adicionalmente, se han usado ápices caulinares, segmentos de tallo, hojas, raíces e inflorescencias inmaduras.

Las células presentes en cultivos en suspensión, que en determinado momento podrían ser de utilidad para la inducción

de la embriogénesis somática, pueden mostrar una gran variación en el tamaño y forma; como en algunos trabajos en Phaseolus sp., donde las células pueden ser esféricas (12-40 μ en el diámetro), de forma babuchada (30-60 x 10-20 μ) y acalabazada (95 x 40 μ) (Narayanaswamy, 1977). Trabajos específicos en el cultivo de células en suspensión en Phaseolus vulgaris L. para el estudio de los patrones de crecimiento y división han sido llevados a cabo por Liao y Boll (1971) en donde muestran que el mayor número de células individuales en cada suspensión celular de hipocótilo fueron elongadas, sin ceptos, células filamentosas con muy poco citoplasma; lo cual es de importancia conocer para determinados estudios de embriogénesis en cultivos líquidos.

Por otra parte, una vez que se logre la embriogénesis en medio líquido se podrían extender a pruebas de tolerancia a salinidad, tal y como el trabajo realizado por Gale y Boll (1979) quienes hicieron la determinación del crecimiento de células de frijol en cultivos en suspensión en presencia de NaCl, lo cual sienta una base a seguir después que se logre la inducción de la embriogénesis somática en el cultivo líquido; lo cual aún no ha sido reportado para el caso de este cultivo.

Pruebas ya directamente realizadas en la aplicación de la metodología de embriogénesis en Phaseolus sp. han sido realizadas para el cultivo de embriones inmaduros productos de cruces interespecíficas entre P. vulgaris L. y P. acutifolius

Gray., tales como los reportados por Sabja et al. (1990) quienes encontraron que las dos semillas colocadas en la parte media de la vaina fueron las únicas en las que sus embriones, una vez aislados, desarrollaron hasta la madurez al ser cultivados in vitro dentro del medio de cultivo M.S. líquido modificado y sostenido en un soporte de cristal hilado. De igual manera otro trabajo sobre el aislamiento de embriones inmaduros y su posterior cultivo in vitro han sido realizados tales como los mostrados por Ramírez et al. (1992) quienes trabajaron con embriones inmaduros productos de crusas interespecíficas de Phaseolus sp. y por Muños y López (1992) quienes através del cultivo in vitro de embriones inmaduros de tres genotipos de frijol común, dentro de los medios B₅ y M.S. modificados, se encontro que la respuesta a la germinación depende del genotipo y del medio de cultivo, encontrando así al medio B₅ como el mejor para la germinación y el desarrollo completo de los embriones.

2.3.3. Efecto de las soluciones salinas sobre las células.

La tolerancia a sales ha sido considerada como una capacidad natural de las células, específicamente las embriogénicas, las cules toleran un nivel alto de agobio salino en comparación con otros tipos de células; sin embargo en el caso de las células de arroz éstas han formado embriones somáticos a 1.5% de NaCl pero su desarrollo es inhibido a ésta misma concentración (Binh et al., 1992).

Spiegel-Roy y Ben-Hayyim (1985) expusieron que las características morfogenéticas de células de poblaciones a NaCl difieren de las nunca expuestas a sales; como es el caso de embriones de líneas celulares seleccionadas como tolerantes en dos especies de Citrus sp., en donde su crecimiento y desarrollo fue más satisfactorio que embriones de líneas no tolerantes de comparable tamaño y estado, al ser expuestas en medios conteniendo varias concentraciones de NaCl.

Por consiguiente, muchos trabajos acerca de la regeneración a partir de células, muestran la existencia de dos tipos de células, como en las especies anteriores, pero sobre todo en los estudios con cereales, donde es notoria la existencia de estas células, las embriogénicas y las no embriogénicas, en donde las primeras presentan, de acuerdo con Nabors y Dykes (1985), una forma isodiamétrica con diámetro de 50 μ m y pequeñas, mientras que las no embriogénicas son alargadas (50 μ m x 400 μ m) con grandes vacuolas.

En el caso de soya (Glicine max L.), conforme el Yo fue disminuido por el uso de un agente osmótico en el medio de cultivo, todas las células se transformaron en pequeñas y esféricas, mientras que en el testigo la forma fue alargada e irregular en más de la mitad de las células.

Por otra parte Flowers et al. (1977) corroboran que la vacuola abarca un gran porcentaje del volumen celular en las

células vacuoladas de las hojas, en las cuales es posible el calcular la concentración de algún soluto en este compartimento cerrado, considerando al tejido como un todo, es decir de unos 500-700 μ . Por su parte, Iljin (1957) estableció que la principal causa de muerte de las células sujetas a cambios hídricos bruscos es la estructura celular y la presencia de una gran vacuola en cada célula, la que condiciona la contracción y expansión del protoplasto; por lo que si la célula es grande y la vacuola es correspondientemente grande y si la membrana citoplasmática es muy delicada, la destrucción de la célula es realizada fácilmente y la resistencia es reducida.

Casi todos los datos que muestran que las concentraciones de Na^+ son más bajas en el citoplasma que en la vacuola, han sido obtenidas con raíces expuestas a bajas concentraciones de Na^+ (1-10 mM). No hay estimaciones de Na^+ o Cl^- en el citoplasma de glicófitas vasculares a la salinidad, lo cual podría reducir seriamente reducir su crecimiento (Greenway y Munns, 1980).

En otros experimentos, como los llevados a cabo por Croughan et al. (1978) mostró que más del 99% de las células de alfalfa en cultivos en suspensión y colocadas después en medio sólido con 1% de NaCl por dos meses, mostraron una disminución del crecimiento y decoloración, sin embargo una pequeña cantidad de estas continuó creciendo, manteniendo una apariencia sana; por lo que la línea celular seleccionada de

estas células creció mucho mejor que la línea no selecta a elevados niveles de NaCl, sugiriendo una tolerancia de estas a la sal, en donde además los datos expresan que esta línea requiere de una substancial cantidad de NaCl para su crecimiento óptimo.

En el caso de la membrana, Greenway y Munns (1980), encontraron que el NaCl reduce la permeabilidad en membranas celulares de soya, mientras que el calcio es importante para mantener la permeabilidad selectiva de membranas, y el sodio puede incrementar su permeabilidad, por lo que un desplazamiento de calcio por sodio en la pared celular puede influenciar el contenido de solutos en la célula. Por su parte, Binzel et al. citados por Alvarado (1990) consideran que los efectos en la función de la membrana no sólo se deben a las elevadas concentraciones iónicas, sino de igual forma, por las proporciones de ciertos iones, como sodio:calcio y sodio:potasio.

Las plantas de Phaseolus vulgaris L. dentro de condiciones salinas usualmente tienen un incremento en la concentración osmótica celular, lo cual puede ser ocasionado por la toma de iones del medio salino (Na^+ , Cl^- ó SO_4) por un incremento en la concentración de más iones inocuos de K^+ o azúcar, o por un incremento de ácidos orgánicos (Bernstein, 1963).

III. MATERIALES Y METODOS

El trabajo se efectuó durante los meses de Abril a Julio de 1991 en el laboratorio de Anatomía y Fisiología Vegetal de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, ubicada en Marín, N.L.

3.1. Material biológico

Se utilizaron semillas de dos cultivares de frijol común (Phaseolus vulgaris L) correspondientes al cultivar Pinto-114 y Selección-4, y un cultivar del frijol tépari (Phaseolus acutifolius Gray.), representado por el cultivar Phaacu-125.

Las semillas de ambas especies fueron proporcionadas por el Banco de Germoplasma de la FAUANL. Estas correspondieron a la cosecha de otoño de 1990.

3.2. Germinación de la semilla

Primeramente se realizó una predesinfestación de sesenta semillas de cada cultivar. Para esto las mismas fueron sometidas a los efectos del agua corriente por 5 min y alcohol etílico al 80% (solución acuosa) por 30 seg. Enseguida se realizó la desinfestación con hipoclorito de sodio al 0.6% (solución de hipoclorito de sodio comercial al 10% en solución

acuosa) al cual se le añadió 0.5 ml de polioxietileno sorbitan monolaurato (Tween-20). En ésta solución se colocó la semilla por 10 min. Para eliminar el exceso de agente desinfectante, la semilla se enjuagó por tres ocasiones con agua bidestilada esterilizada. La siembra se realizó en cajas de propagación con perlita esterilizada como sustrato.

3.3. Medio de cultivo

El medio de cultivo empleado en esta investigación correspondió al medio Murashige - Skoog (1962), modificado de acuerdo a Saam et al. (1987) para la propagación in vitro de frijol común a partir de ápices de brotes.

3.3.1. Preparación de medio de cultivo

Usando como disolvente agua bidestilada, se mezclaron las siguientes sustancias:

- Sales inorgánicas del medio basal Murashige-Skoog 1962 (cuadro 1).
- Sacarosa (30 g.l^{-1}).
- Myo-inositol (100 mg.l^{-1}).
- Glicina (2 mg.l^{-1}).
- Piridoxina. HCl (0.5 mg.l^{-1}).
- Ac. Nicotínico (0.5 mg.l^{-1}).
- Tiamina (0.1 mg.l^{-1}).
- 6-Benzilaminopurina (BAP a 3.0 mg.l^{-1}).

-Ac. naftalenacetico (0.1 mg.l^{-1}).

La solución formada se aforó con agua bidestilada a un volumen de 950 ml, considerado adecuado para ajustar el pH.

Para ajustar el pH a 5.95 (Saam *et al.*, 1987) se empleó un potenciómetro Corning M103, donde las regulaciones de la lectura se efectuaron por la adición de soluciones de HCl y NaOH tanto al 0.1N como al 1.0N, para de esa manera bajar y subir la lectura respectivamente. En seguida se aforó a un litro con agua bidestilada.

Para lograr la solidificación del medio de cultivo se agregó Agargel (5 g.l^{-1}) el cual previamente se fundió en un horno de microondas por 7 minutos.

Una vez disuelto el agar se colocó el medio de cultivo en frascos de vidrio de 125 ml con tapas de plástico herméticas, agregando 25 ml / frasco; posteriormente se esterilizaron en una autoclave horizontal eléctrica (Barnstead 1250) a una presión de 1 kg/cm^2 y a una temperatura de 121°C por 15 min.

Cuadro 1. Sales inorgánicas del medio básico Murashige-Skoog (1962) en mg.l^{-1}

NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
KH_2PO_4	170
KI	0.83
H_3BO_3	6.2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
Na_2 . EDTA	37.30
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.80

La lista de materiales y soluciones concentradas empleados para la realización de los medios de cultivo se aprecian en el cuadro 1A y 2A, respectivamente.

3.4. Tratamientos

Cada cultivar de frijol fue sometido a la acción de diferentes dosis de NaCl. Estas consistieron en una adición al medio de cultivo de soluciones de 0.0, 0.1, 0.3 y 0.5 M de NaCl. Como consecuencia se estableció un total de 12 tratamientos, los cuales se presentan en el Cuadro 2.

Para la adición de los tratamientos de NaCl, se realizó agregando el reactivo antes de las fuentes de fierro, vitaminas y el ajuste del pH.

Cuadro 2. Niveles de NaCl probados en los tres cultivares de frijol.

TRATAMIENTOS	CULTIVAR	DOSIS DE NaCl [M]
T1 (C ₁ d ₀)	Selección-4	0.0
T2 (C ₁ d ₁)	Selección-4	0.1
T3 (C ₁ d ₂)	Selección-4	0.3
T4 (C ₁ d ₃)	Selección-4	0.5
T5 (C ₂ d ₀)	Pinto-114	0.0
T6 (C ₂ d ₁)	Pinto-114	0.1
T7 (C ₂ d ₂)	Pinto-114	0.3
T8 (C ₂ d ₃)	Pinto-114	0.5
T9 (C ₃ d ₀)	Phaacu-125	0.0
T10(C ₃ d ₁)	Phaacu-125	0.1
T11(C ₃ d ₂)	Phaacu-125	0.3
T12(C ₃ d ₃)	Phascu-125	0.5

C₁₋₃= cultivar
d₀₋₃= dosis

3.5. Disección de brotes

Una vez germinadas las semillas de los tres cultivares, se seleccionaron los brotes requeridos del cultivar Selección-4 nueve días después de su germinación. En el caso del Pinto-114 y Phaacu-125 se hizo ocho días después de germinadas.

Se cumplió con el requisito de una etapa fenológica que indicara la emergencia de la primer hoja trifoliada, con un diámetro visualmente uniforme dentro de cada cultivar, así como a características normales dentro de la fenología del cultivar. Se extrajeron los brotes seleccionados con una longitud aproximada a los 2 centímetros.

3.5.1. Predesinfestación de brotes

Los brotes disectados fueron lavados con agua corriente por espacio de 1 min y sometidos a la acción del alcohol etílico al 80% por 30 segundos.

3.5.2. Desinfestación de brotes

Los brotes se colocaron por 10 min en la solución desinfestante, constituida por hipoclorito de sodio al 0.6% (solución de hipoclorito de sodio comercial al 10% en solución acuosa) adicionada con 0.5 ml de polioxietileno sorbitan monolaurato (Tween-20). En seguida se enjuagaron dichos brotes por tres ocasiones con agua bidestilada esterilizada.

Esto último se realizó en completa asepsia, dentro de la campana de flujo laminar marca Alder.

3.6. Establecimiento in vitro

Los brotes seleccionados de cada cultivar fueron reducidos a 1 cm de longitud con un bisturí debidamente flameado. Esto se hizo en condiciones asépticas dentro de cajas petri esterilizadas y debidamente identificadas.

Realizado lo anterior, se procedió a la siembra de cada brote en un frasco de vidrio esterilizado conteniendo 25 ml de medio de cultivo con el tratamiento de NaCl correspondiente.

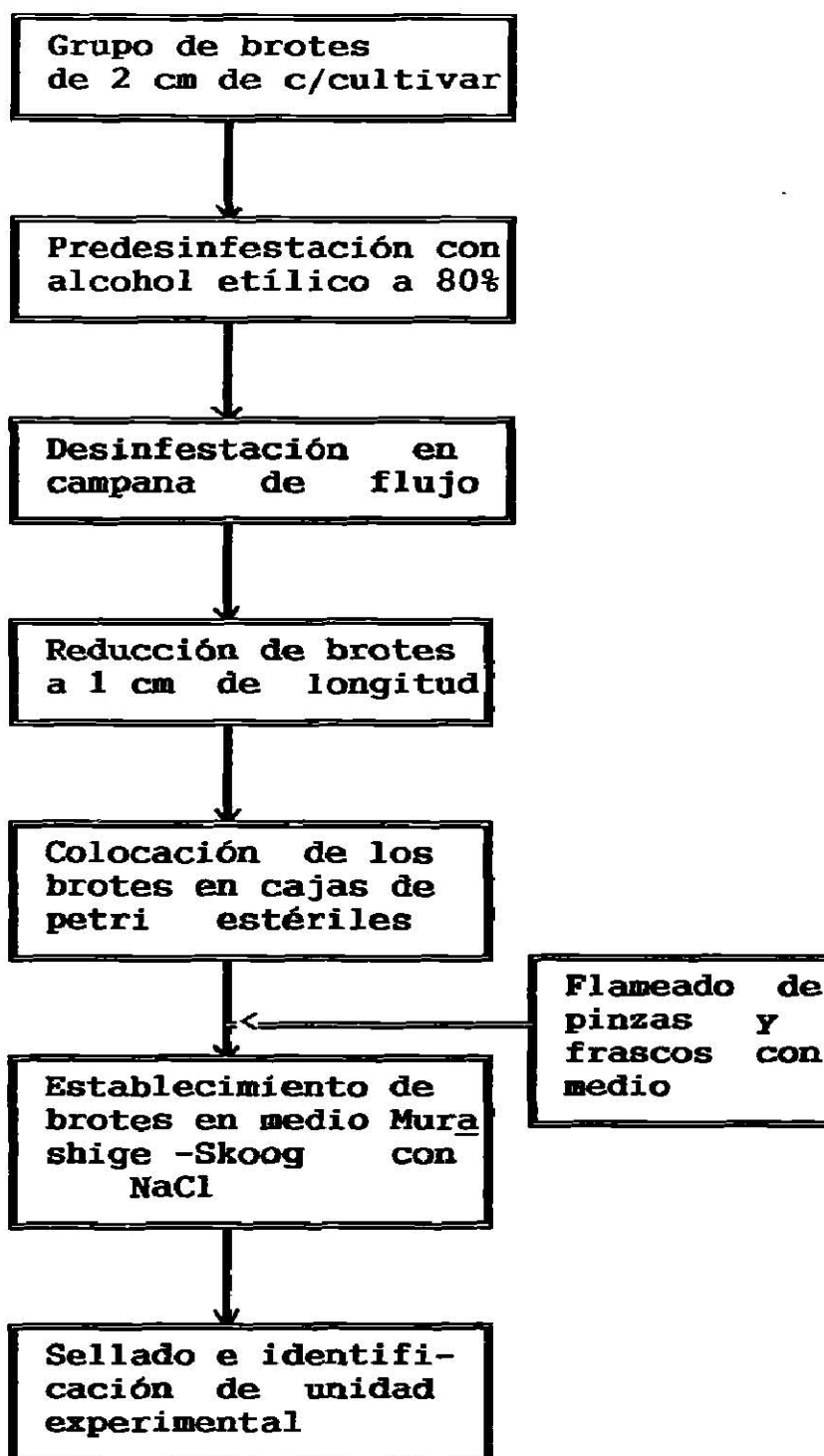
Cada frasco constituyó una unidad experimental, las cuales en total fueron sesenta.

Para la siembra anterior se procedió de la siguiente manera: Se flamearon las pinzas y la boca del frasco en la flama de una lámpara de alcohol; se esperó el enfriamiento de las pinzas antes de intentar tomar el explante, de esta manera se evitaron quemaduras y contaminación del brote.

El procedimiento general para realizar lo anterior se ilustra en la Figura 1.

La lista de materiales, equipo y reactivos empleados desde la predesinfestación hasta el establecimiento in vitro de los ápices de brotes se muestra en el Cuadro 3A.

Figura 1. Esquema de los procedimientos para el establecimiento *in vitro* de los ápices de brotes de frijol.



3.7. Ambiente de cultivo

Las unidades experimentales fueron colocadas en una cámara bioclimática (Biotronette Mark III-846) con una temperatura de 24 °C (± 1) y un fotoperíodo de 16 hr luz por 8 de oscuridad. Dichas unidades experimentales permanecieron en las condiciones descritas un período de 4 semanas.

3.8. Variables de estudio

Se seleccionaron cinco variables para estimar la tolerancia de los cultivares a la salinidad. Suponemos que entre mayor sea el valor de cada variable también es mayor la tolerancia.

3.8.1. Longitud de brote

Es la distancia en milímetros desde la cicatriz del corte hasta la porción distal del ápice. Esta se midió directamente con una regla a las cuatro semanas de la siembra in vitro.

3.8.2. Número de brotes axilares

En cada eje de crecimiento originado por el desarrollo del brote sembrado, se contó el número de brotes provenientes de las yemas laterales o axilares. En este caso se consideró brote axilar, aquel que presentaba al menos 3 mm de longitud.

Esta variable se evaluó a las cuatro semanas de la siembra in vitro realizando la transformación $\sqrt{x}$ para cada valor.

3.8.3. Número de hojas desplegadas

Se contaron las hojas desplegadas provenientes del brote original y de los brotes axilares. Se consideró hoja desplegada a quella que presentaba los tres folíolos separados. Dicha variable se evaluó a las cuatro semanas de cultivo in vitro con una transformación de $\sqrt{x+1}$ en los conteos de cada unidad experimental.

3.8.4. Peso fresco

Es el peso, expresado en gramos, del brote. Para su medición se extrajo éste del medio de cultivo (con un papel absorbente se le eliminó el medio de cultivo adherido) y se pesó en una balanza analítica (Sartorius 125V). Esto se realizó a las cuatro semanas de la siembra in vitro empleando una transformación $\sqrt{x+1}$ para su correspondiente análisis estadístico.

3.8.5. Peso seco

Es el peso, expresado en gramos, del brote deshidratado por 24 horas en una estufa de aire forzado (marca Telco M26), cuya temperatura fue de 80°C. Lo anterior se hizo inmediata-

mente después de evaluado el peso fresco, como se describió en el apartado 3.8.4., y para su análisis estadístico se empleó la transformación $\sqrt{x+1}$.

3.9. Análisis estadístico

El diseño estadístico correspondió a un completamente al azar con arreglo factorial 4×3 . Las diferentes dosis de NaCl fueron el factor A y los diferentes cultivares el factor B ; lo anterior originó total de 12 tratamientos, los cuales fueron evaluados con 5 repeticiones; por consecuencia se tuvieron 60 unidades experimentales.

De esta manera el modelo estadístico fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = M + T_{ij} + E_{ijk}$$

$$T_{ij} = D_i + C_j + DC_{ij}$$

donde:

Y_{ijk} = ijk -ésima observación de la variable dependiente.

M = efecto promedio general del experimento

T_{ij} = efecto de los tratamientos y la interacción

E_{ijk} = efecto del error experimental

D_i = efecto de la i -ésima dosis de NaCl

C_j = efecto del j -ésimo cultivar

DC_{ij} = efecto de la ij -ésima interacción dosis/cultivar

Siendo las hipótesis establecidas las siguientes:

H0= No hay diferencias entre los tratamientos de NaCl probados, entre los cultivares empleados y la interacción cultivar-concentración de NaCl.

HA= Hay diferencias significativas entre los tratamientos de NaCl, entre los genotipos y la interacción genotipo-concentración, dado el grado de toxicidad y diferencia genética existente.

H0= El cultivar de Phaseolus acutifolius Gray. no presenta tolerancia a sales de NaCl in vitro, dado a que es una especie glicófita.

HA= El cultivar de P. acutifolius Gray. presenta mayor tolerancia a sales de NaCl in vitro, debido a que así se ha registrado en campo.

IV. RESULTADOS.

4.1. Efecto de las concentraciones de NaCl en el crecimiento de los brotes de frijol in vitro.

4.1.1. Longitud de brote

El análisis estadístico indicó una diferencia altamente significativa por el efecto de las concentraciones de NaCl; en contraste, no se presentaron diferencias entre cultivares ni por la interacción cultivar-concentración (Cuadro 4A).

Se presentó una relación inversa entre la longitud del brote y la concentración salina; es decir, entre mayor fue la concentración de la solución, menor fue la longitud del brote (Figura 2). El rango de valores estuvo entre 1 cm, que registraron los tres cultivares en la concentración de 0.5M, y 2.56 cm, que lo presentó el cultivar Selección-4 en 0.0 M de NaCl.

Cabe aclarar que en el caso de Phaacu-125 no se presentaron diferencias estadísticas entre 0.0 y 0.1 M de NaCl (Cuadro 5A).

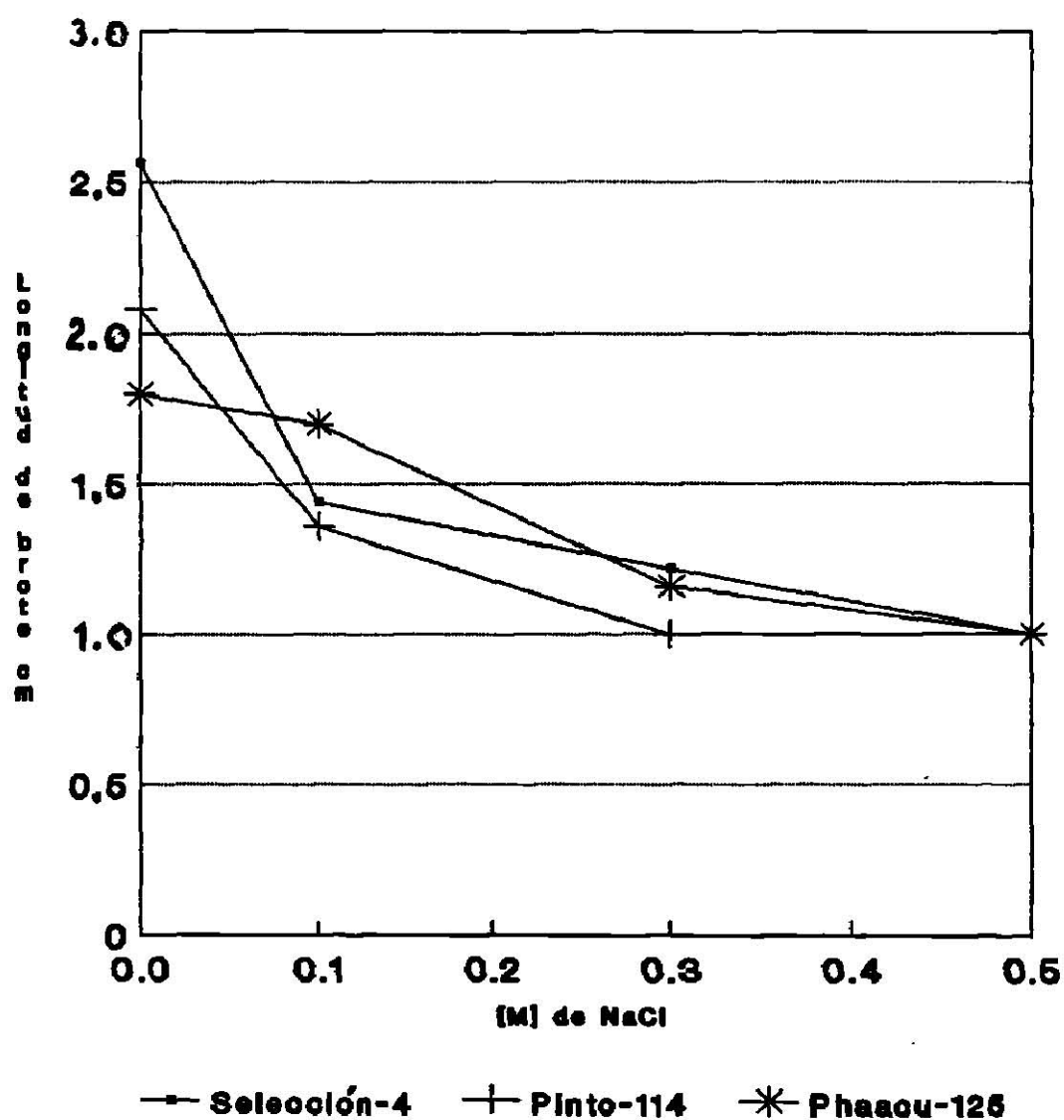


Figura 2 : Longitud de brote en los tres cultivares de frijol en cuatro concentraciones de NaCl. Se evaluó a las cuatro semanas de su establecimiento *in vitro* para la determinación de tolerancia a la sal de NaCl.

4.1.2. Número de brotes axilares

El análisis de varianza indicó una diferencia significativa por efecto del cultivar y altamente significativa por el efecto de las concentraciones de NaCl y la interacción cultivar-concentración (Cuadro 6A).

Disminuyó la brotación axilar conforme se elevó la concentración de NaCl (Figura 3). En este caso en las concentraciones 0.3 y 0.5 M los tejidos presentaron necrosis generalizada. El rango de valores estuvo entre 1 brote, que mostraron los tres cultivares en la concentración de 0.5 M y 3.04 brotes, en el cultivar Pinto-114 en 0.0 M.

Los cultivares de Phaseolus vulgaris L., Pinto-114 y Selección-4, presentaron el mayor número de brotes a 0.0 M, siendo estadísticamente superiores al resto de los tratamientos. Cuando la concentración aumento de 0.0 M a 0.1 M disminuyó el número de brotes en un 34% y un 54% en los cultivares Selección-4 y Pinto-114 respectivamente (Cuadro 7A). En cambio en Phaseolus acutifolius G., cultivar Phaacu-125, no se presentó diferencia estadística entre 0.0 y 0.1 M de NaCl, registrando sólo un descenso en la tasa de brotación axilar de 15%.

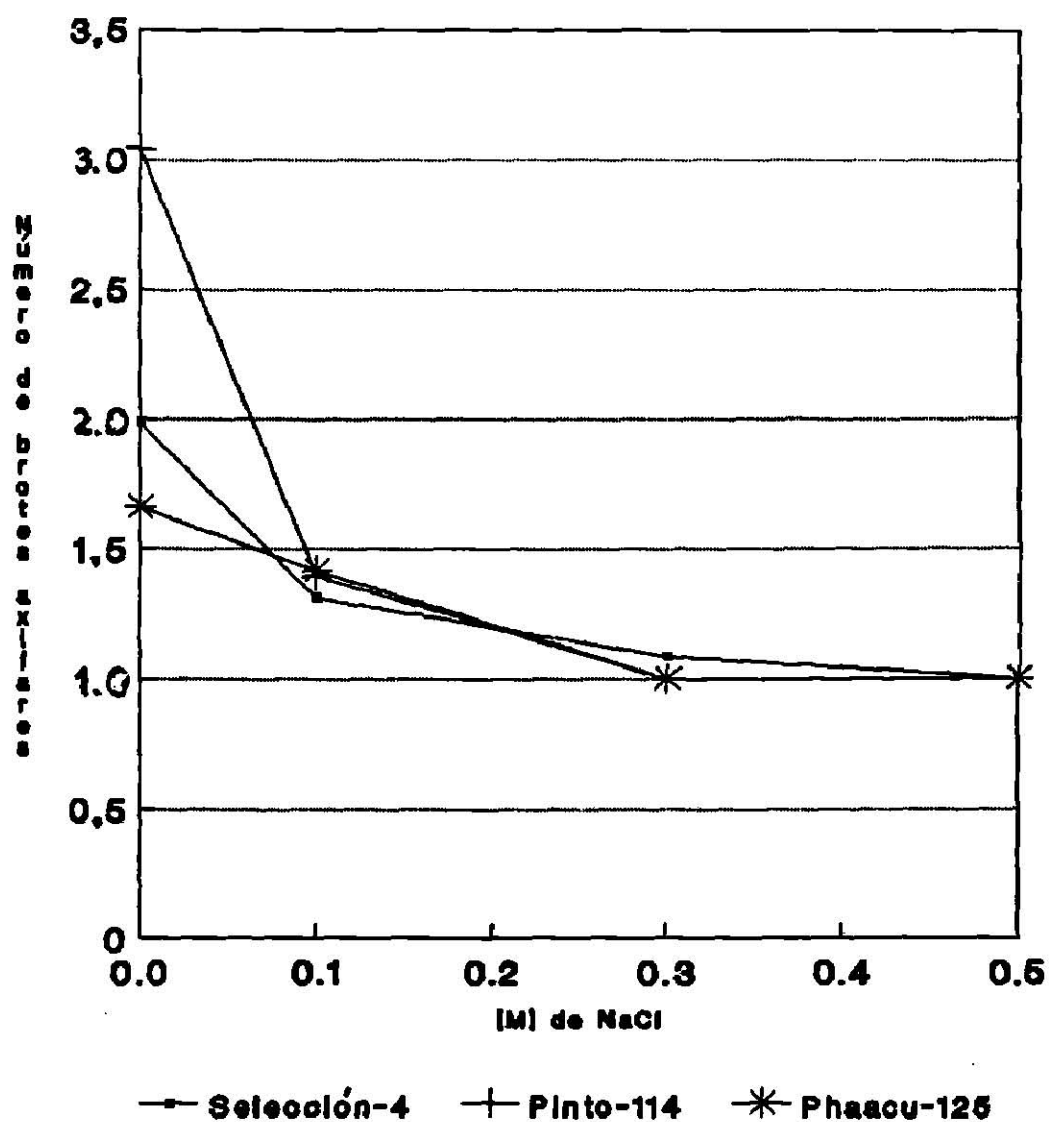


Figura 3 : Número de brotes axilares en los tres cultivares de frijol en cuatro concentraciones de NaCl. Se evaluó a las cuatro semanas de la siembra in vitro para la determinación de tolerancia a la sal de NaCl.

4.1.3. Número de hojas desplegadas

Se presentaron diferencias altamente significativas por el efecto de las concentraciones de NaCl y los cultivares estudiados. Los efectos de la interacción cultivar-concentración sólo fueron significativos (Cuadro 8A).

El número de hojas desplegadas disminuyó en los cultivares de Phaseolus vulgaris L., Selección-4 y Pinto-114, conforme aumentaron los niveles de NaCl. Por su parte Phaacu-125 no presentó diferencias estadísticas en los niveles de 0.0 y 0.1 M, aunque en este último presentó un incremento de 5.37% en el número de hojas desplegadas en relación a 0.0 M (Figura 4).

La gama de valores estuvo entre 1 hoja en 0.5 M y 2.55 hojas en 0.0 M. En el primer caso correspondió a Selección-4 y Phaacu-125, y en el segundo a Pinto-114 (Cuadro 9A).

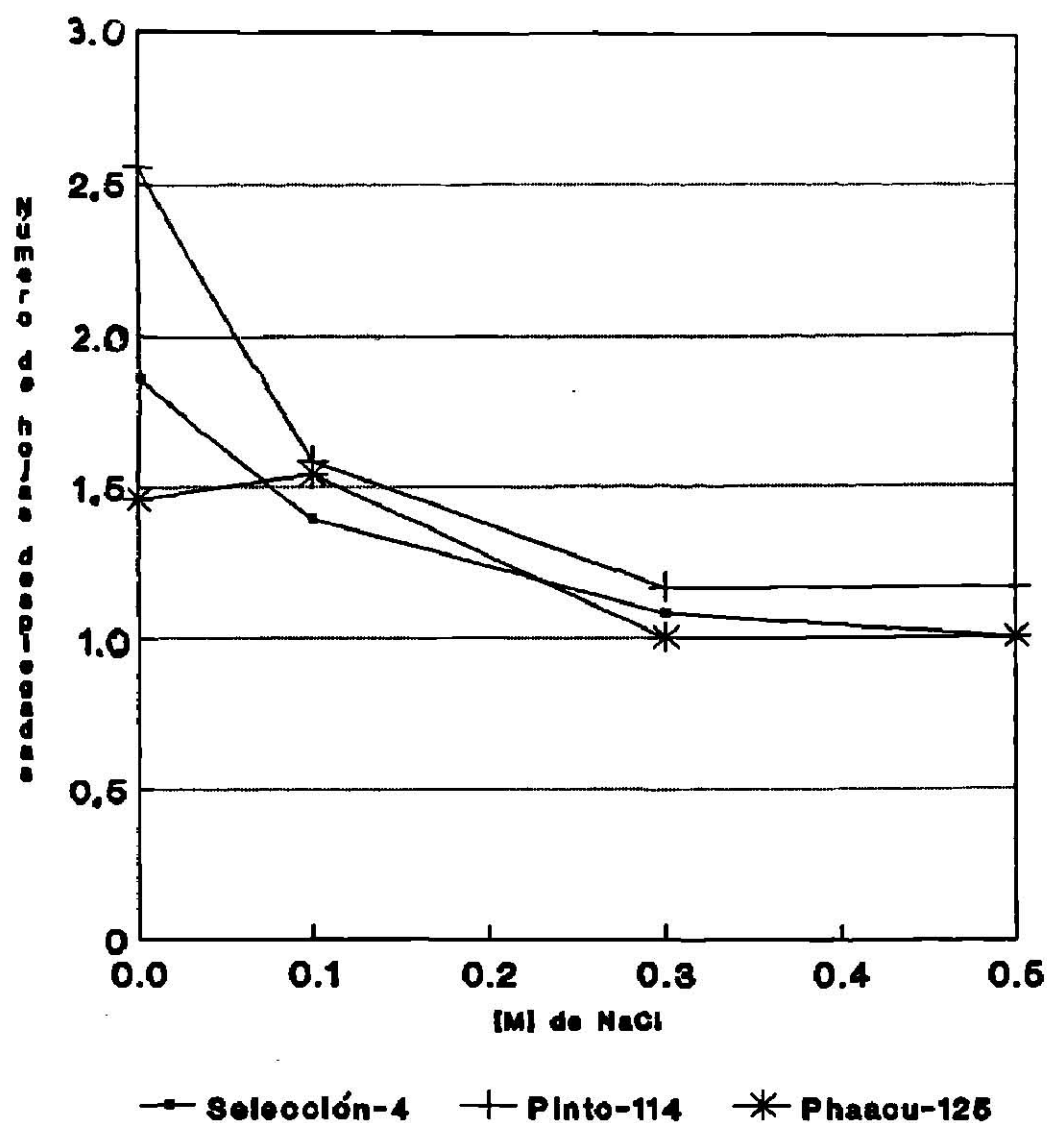


Figura 4 : Número de hojas desplegadas de los tres cultivares frijol en cuatro concentraciones de NaCl. Se evaluó a las cuatro semanas de la siembra in vitro para la determinación de la tolerancia a la sal de NaCl.

4.1.4. Peso fresco

El análisis estadístico indicó diferencias altamente significativas por efecto de las concentraciones de NaCl, los cultivares y la interacción cultivar-concentración (Cuadro 10A).

Se encontró una relación inversa entre el peso fresco y la concentración de NaCl para el caso de los tres cultivares, es decir, entre más alta fue la concentración de NaCl menor fue el peso fresco (Figura 5). Los valores variaron entre 1.0011 g en la máxima concentración de la sal y 1.1533 g en 0.0 M; dichos valores correspondieron a los cultivares Phaacu-125 y Pinto-114 respectivamente.

Cabe aclarar que bajo las concentraciones de 0.3 y 0.5 M, los brotes de los tres cultivares presentaron una necrosis en en todas las repeticiones.

No se presentó diferencia estadística entre el tratamiento de 0.0 M y 0.1 M para el caso del cultivar Phaacu-125 (Cuadro 11A).

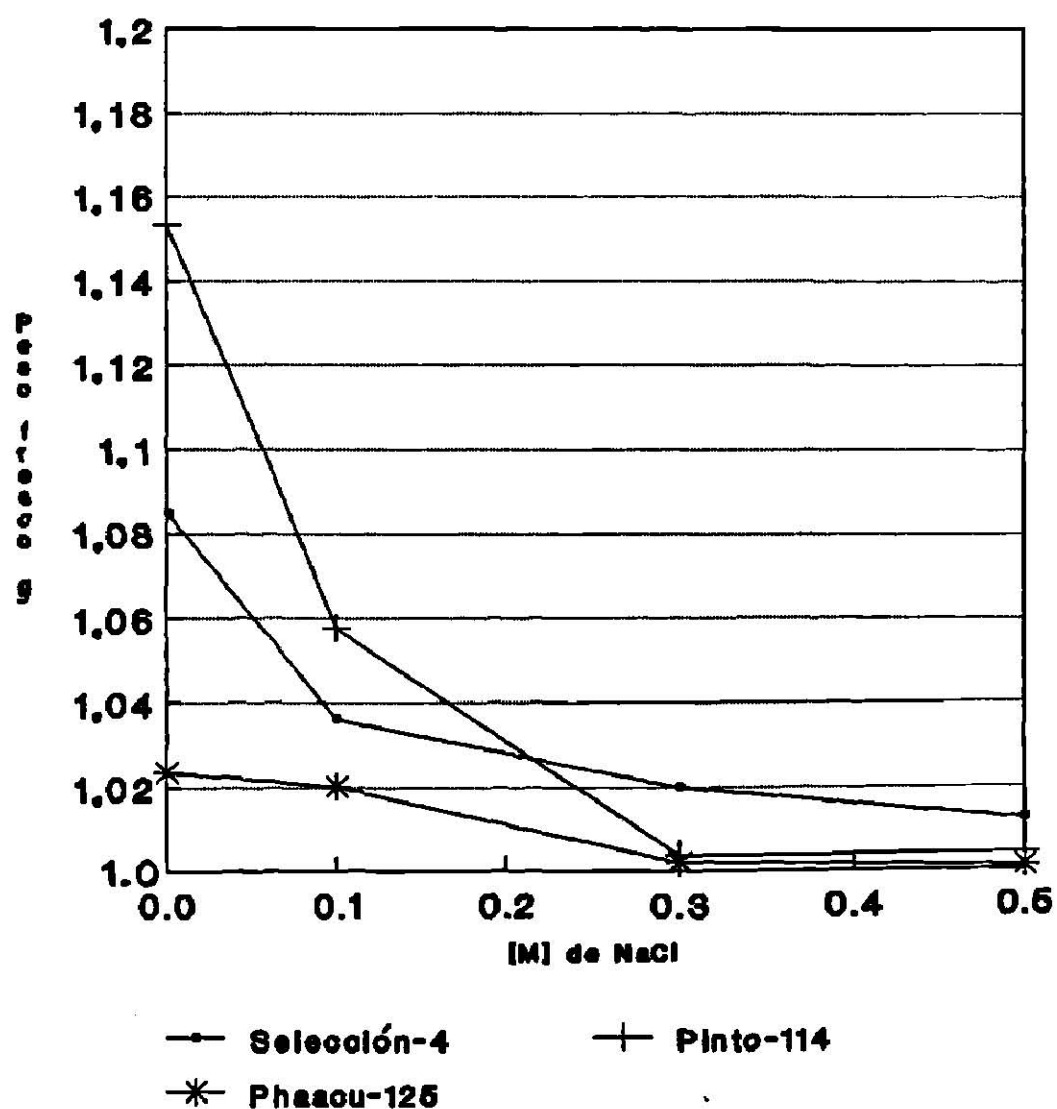


Figura 5 : Peso fresco de los brotes de los tres cultivares de frijol en las cuatro concentraciones de NaCl. La evaluación fue a las cuatro semanas de su siembra in vitro para la determinación de la tolerancia a la sal de NaCl.

4.1.5. Peso seco

El análisis estadístico mostró diferencias altamente significativas por efecto de las concentraciones de NaCl, cultivares y la interacción cultivar-concentración de NaCl (Cuadro 12A).

Se observó que conforme aumentó la concentración de NaCl el peso seco disminuyó en los tres cultivares (Figura 6). La gama de valores varió entre 1.0004 g a la concentración de 0.5 M y 1.0211 g en 0.0 M de NaCl; dichos valores correspondieron al cultivar Phaacu-125 y Pinto-114 respectivamente.

El cultivar Phaacu-125 no mostró diferencias estadísticas entre las cuatro concentraciones de NaCl, pero su peso seco fue inferior a los otros dos cultivares en las concentraciones de 0.0, 0.1 y 0.5 M, aunque tampoco difirió de estos estadísticamente (Cuadro 13A).

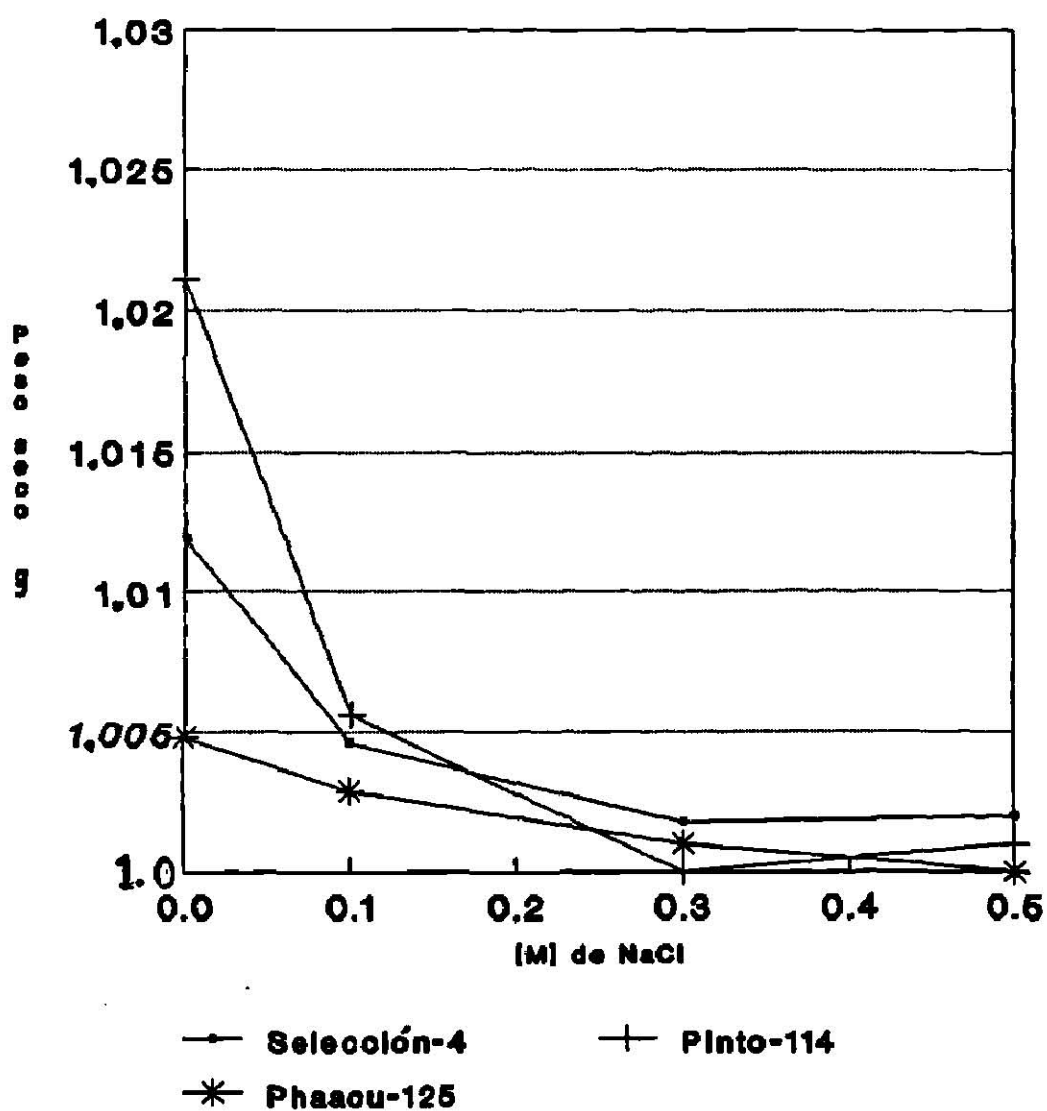


Figura 6: Peso seco de los tres cultivares de frijol en las cuatro concentraciones de NaCl. Las evaluaciones se realizaron a las cuatro semanas de la siembra in vitro para la determinación de tolerancia a la sal de NaCl.

V. DISCUSION.

Los resultados obtenidos indican que las cinco variables estudiadas en el caso de los cultivares de Phaseolus vulgaris variaron en relación inversa a las concentraciones estudiadas. Es decir, a mayor concentración de NaCl el valor de cada variable disminuyó. En cambio, el cultivar de P. acutifolius G. sólo presentó dicha relación en las concentraciones de 0.3 y 0.5 M . Lo anterior nos sugiere que esta especie es más tolerante que P. vulgaris L. a las sales.

El comportamiento general de ambas especies coincide con lo mencionado en trabajos previos para otras especies como Oryza sativa L. (Binh et al.1992), Glycine max L. (Abel y MacKenzie, 1964) y tomate (Burgeais et al. citados por Mejía 1990).

Por otra parte queda claro que en la concentración de 0.3 M se alcanzó el límite del mínimo crecimiento al que podrían llegar los brotes, puesto que las concentraciones mayores producían el mismo crecimiento que dicha concentración.

En seguida se hace breve discusión para cada variable:

5.1. Longitud de brote

Las disminuciones en la elongación del brote en relación

al incremento de la concentración de NaCl pudo deberse a que con dicho incremento disminuye el potencial hídrico del medio y por consecuencia se redujó la endósmosis, por consiguiente también disminuye el potencial de presión. Se sabe que este es un componente importante en el crecimiento del tamaño celular (Guzmán y Kohashi, 1992).

5.2. Número de brotes axilares

El descenso altamente significativo de la brotación axilar en los dos cultivares de Phaseolus vulgaris L. parece ser debido a su mayor susceptibilidad a la sal como especie glicófita (Anónimo 1982), así como al efecto dañino por el ión tóxico que reportan Reddy y Vaidyanath (1986) y Yang et al. (1990), quienes observaron que el crecimiento in vitro de algunas especies de plantas en varias concentraciones de NaCl pueden provocar una toxicidad iónica.

Resultados similares se obtuvieron por Burgeais et al. citados por Mejía (1990) en ápices de tomate, en los cuales el desarrollo y crecimiento de estos se redujo conforme se elevó la concentración de NaCl. Así mismo Kimball et al. (1975) encontraron para el caso del cultivo de tejidos de soya, que las yemas no se desarrollaron por abajo de los -10.9 bars.

Por otra parte, la igualdad estadística entre el testigo y la concentración de 0.1 M de la especie P. acutifolius Gray.

(Phaacu-125) hace pensar que las concentraciones internas del ión no causaron toxicidad alguna en dicho nivel salino; tal y como lo expone Trejo *et al.* (1992) entre el testigo y el nivel más bajo de NaCl a 50 mM en Amaranthus sp.

5.3. Número de hojas desplegadas

La disminución en el número de hojas desplegadas conforme aumentaron los niveles de NaCl en los tres cultivares, pero sobre todo en los dos cultivares de Phaseolus vulgaris L. puede ser debido a su incapacidad para excluir el ión Cl^- , lo cual provocó problemas de toxicidad que impidió el despliegue y desarrollo; tal y como lo indica Abel (1969), quien encontró en la soya, que las variedades más sensibles presentaron una acumulación del ión cloro en tallos y hojas en grandes cantidades dependiendo del genotipo; mientras que Abel y MacKenzie (1964) determinaron que al incrementar los niveles de NaCl el tamaño de las hojas disminuyó; además de presentarse una necrosis en las concentraciones por arriba de los 8.1 mmhos/cm.

Las diferencias de los cultivares Selección-4 y Pinto-114 con el cultivar de P. acutifolius Gray., en el caso de las diferencias estadísticas entre sus tratamientos salinos, parecen ser debidas a que las especies de plantas varían respecto a las cantidades de Na^+ que pueden acumular, y en dado caso excluir de sus hojas al acumularlo en sus tallos (Aónimo

1982). Sin embargo, el ligero crecimiento de Phaacu-125 bajo la concentración de 0.1 M parecen ser ocasionados por el Na^+ , ya que podría eficientizar la utilización del N y P, tal y como lo muestran Trejo et al. (1992) en los estudios con Amaranthus sp., donde la concentración más baja de NaCl (50 mM) superó estadísticamente al testigo; aunque también el hecho de que esta especie crezca en ambientes salinos in vivo puede propiciar primeramente una osmorregulación que esté asociada con la actividad enzimática (Alvarado 1990).

5.4. Peso fresco

La brusca disminución de biomasa, al elevarse la concentración de NaCl en los cultivares, se piensa es ocasionada por la acumulación del ión tóxico, tal y como lo reporta Rodríguez et al. (1992) en tres especies de Atriplex, quienes observaron una diferencia altamente significativa en cuanto a la producción de biomasa por el efecto de la concentración de NaCl. Mientras que Goertz y Coons (1989) encontraron también una disminución en el peso fresco de las raíces de dos especies de Phaseolus vulgaris L. y una de P. acutifolius G. al elevar la concentración salina.

Los mayores valores registrados que corresponden al cultivar Pinto-114 pueden ser ocasionados en parte por su mayor vigor y turgencia. Resultados semejantes los obtuvo Rodríguez et al. (1992) con la especie Atriplex canescens la

cual registró mayores valores en la producción de biomasa dado su mayor porte.

En el caso de la interacción entre Phaacu-125 y la concentración de 0.1 M, resultó no tener diferencias estadísticas con el tratamiento 0.0 M, por lo que esto puede deberse a la capacidad que presenta Phaacu-125 para desarrollarse bajo condiciones de temperatura y salinidad que son agobiantes para las especies de P. vulgaris L.

5.5. Peso seco

El descenso en el peso seco al incrementar los niveles de NaCl, es posible que sea ocasionado por la desviación de alguna parte de la energía del crecimiento y metabolismo; es decir, que la declinación sea como una consecuencia del mantenimiento a costa del crecimiento celular dentro del agobio, tal como lo expresan Reddy y Vaidyanath (1986) para Oryza sativa L. Estos explican que dentro de las condiciones de crecimiento in vitro y bajo los efectos de NaCl, encontraron que el agobio salino disminuyó, tanto el peso fresco como el peso seco. De igual forma, Rodríguez et al. (1992) encontraron una disminución del peso seco de Atriplex triangularis al elevar el contenido de sales del medio.

La igualdad estadística en los valores de peso seco para Phaacu-125 en las cuatro concentraciones probadas, específica-

mente entre las concentraciones de 0.0 y 0.1 M, que fueron las que registraron un crecimiento para el caso de las demás variables, puede ser debido a la concentración de solutos orgánicos en el citoplasma, lo cual puede contribuir a un balance osmótico cuando los electrolitos son más bajos en el citoplasma que en la vacuola; aunque también es posible que esta especie contenga genes para la compartimentación de iones, tal como lo expresan Greenway y Munns (1980), quienes mencionan que un cierto número de especies de glicófitas poseen genes para la acumulación de iones en la vacuola. Sin embargo, esto último no ha sido comprobado para el caso de P. acutifolius Gray.

De esta manera, debido a los valores obtenidos en las concentraciones de 0.3 y 0.5 M de NaCl para los tres cultivares, será necesario el disminuir la concentración salina hasta un máximo que sea inferior a 0.3 M, para contar con una mayor apreciación del rango de tolerancia.

Por otra parte, el menor desarrollo del cultivar de P. acutifolius G., aún en la concentración de 0.0 de NaCl en relación a los cultivares de P. vulgaris L., pareció indicar que el medio de cultivo y la interacción hormonal no fue la más adecuada para esta especie, por lo que se requiere el establecer por medio de bioensayos dicho medio y relación hormonal.

VI. CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos y a la metodología empleada en la presente investigación, se concluye que:

1. El cultivar de Phaseolus acutifolius Gray. (Phaacu-125), en comparación a los cultivares de P. vulgaris L., mostró una mayor tolerancia a la sal de NaCl bajo la concentración de 0.1 M ya que su valor en dicha concentración no difirió estadísticamente de la concentración 0.0 M.
2. Los dos cultivares de P. vulgaris (Selección-4 y Pinto-114) mostraron mayor susceptibilidad al NaCl bajo todas las concentraciones probadas, ya que la presencia de necrosis a las dos semanas de la siembra y el decenso brusco del crecimiento en todas las variables de estudio, se registro apartir de la concentración de 0.1 M.

VII. BIBLIOGRAFIA.

- Abel, G.H. and A.J. MacKenzie. 1964. Salt tolerance of soybean varieties during germination and later growth. Crop Sci. 4: 157-160
- Abel, G.H. 1969. Inheritance of the capacity for chloride inclusion and chloride exclusion by soybean. Crop Sci. 9: 697-698
- Alvarado G., O.G. 1990. Caracterización in vitro de la tolerancia de Chenopodium quinoa Will. a la salinidad (NaCl). Tesis de Maestría en Ciencias Colegio de Postgraduados. México. 112p
- Anónimo. 1982. Diagnóstico y rehabilitación de los suelos salinos y sódicos. Laboratorio de salinidad de los Estados Unidos de Norteamérica. Ed. Limusa. México, pp: 63-68 y 71-73.
- Bernstein, L. 1963. Osmotic adjustment of plants to saline media. II. Dynamic Phase. American Journal of Botany. 50:360-370
- Binh, D.Q., L.E. Heszky, G. Gyulai y A. Csillag. 1992. Plant regeneration of NaCl-pretreated cell from long-term suspension culture of rice (Oryza sativa L.)

in high saline conditions. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 29:75-82

Buckman, H.O. y N.C. Brady. 1977. Naturaleza y propiedades de los suelos. Ed. Montaner y Simón. Barcelona, España. pp:396-403

Croughan, T.P., S.J. Stavarek and D.W. Rains. 1978. Selection of NaCl tolerant line of cultured alfalfa cells. Crop Sci. 18:959-963

. 1981. In vitro development of salt resistant plants. Environ. Expt. Bot. 21:317-324

Flowers, T.J., P.F. Troke and A.R. yeo. 1977. The mechanism of salt tolerance in halophytes. Ann. Rev. Plant Physiol. 28:89-121

Francois, L.E. 1985. Salinity effects on germination, growth, and yield of two squash cultivars. Hort Science. 20(6):1102-1104

Gale, J. and W.G. Boll. 1979. Growth of bean cells in suspension culture in the presence of NaCl and protein stabilizing factors. Can. J. Bot. 57:777-782

- Goertz, S.H. and J.M. Coons. 1989. Germination response of tepary and navy beans to sodium chloride and temperature. Hort Science. 24(6):923-925
- Greenway, H. and R. Munns. 1980. Mechanisms of salt tolerance in non halophytes. Ann. Rev. Plant Physiol. 31:149-190
- Guzmán F.,C. y J. Kobashi S. 1993. El agua en la célula vegetal. Apuntes del curso de fisiología vegetal Facultad de Agronomía. U.A.N.L. p:34, 35 y 36
- Hale, M.G. and D.M. Orcutt. 1987. The physiology of plants under stress. John Wiley and sons. New York 205p.
- Hasegawa, P.M., R.A. Bressan and A.K. Handa. 1986. Cellular mechanisms of salinity tolerance. Hort Science. 21: 1317-1324
- Ibrahim, K.M., J.C. Collins and H.A. Collin. 1992. Characterization of progeny Coleus blumei following an in vitro selection for salt tolerance. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 28:139-145
- Iljin, W.S. 1957. Drought resistance in plants and physiological processes. Ann. Rev. Plant Physiol 8:257-274

- Jackson, J.A. and S.L.A. Hobbs. 1990. Rapid multiple shoot production from cotyledonary node explants of pea (Pisum sativum L.). In Vitro Cell. Dev. Biol. 26:835-838
- Kimball, S.L., W.D. Beversdorf and E.T. Bingham. 1975. Influence of osmotic potential on the growth and development of soybean tissue culture. Crop Sci. 15:750-752
- Krikorian, A.D. 1991. Estabilidad genotípica en células, tejidos y plantas derivadas de cultivos in vitro En: Cultivo de Tejidos en la Agricultura Fundamentos y Aplicaciones. Ed. Roca, W.M. y L.A. Mroginski. CIAT. Cali., Colombia. p:313-338
- Liau, D.F. and W.G. Boll. 1971. Growth, an patterns of growth and division, in cell suspension cultures of bush bean (Phaseolus vulgaris cv. Contender). Can. J. Bot. 49:1131-1139
- Litz, R.E. y R.L. Jarret. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y orga nogénesis; En Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Ed. Roca, W.M. y L.A. Mroginski. CIAT. Cali, Colombia. pp:143-172

- Martínez A., F.J. 1992. Regeneración in vitro de cuatro genotipos de frijol (Phaseolus vulgaris L.) a partir de brotes apicales. Tesis de Licenciatura. FAUANL, Marín, N.L. México. 71p.
- Martins, I.S. and I.S. Sondahl. 1984. Axillary bud development from nodal cultures of bean seedlings (Phaseolus vulgaris L.). Turrialba. 34(2):157-161.
- Mejía M., J.M. 1990. Análisis electroforético y de desarrollo de células y ápices de Lycopersicon esculentum y un híbrido de Saccharum en condiciones de tensión por NaCl y Kanamicina. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, México, 146p
- Muñoz L., I.S. y M.C. López P. 1992. Cultivo in vitro de embriones inmaduros de frijol (Phaseolus vulgaris L.). Memorias del XIV Congreso Nacional de Fitogenética. UNACH. p:12
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant.* 15:473-479
- Nabors, M.W. and T.A. Dykes. 1985. Tissue culture of cereal cultivars with increased salt, drought, and acid

tolerance. Biotechnology in International Agricultural Research. IRRI pp:121-138

Narayanaswamy, S. 1977. Regeneration of plants from tissue cultures. En Plant Cell, Tissue, and Organ Culture. Ed. Reinert, J. and Y.P.S. Bajaj. Berlin Heidelberg. N.Y. pp:178-207.

Ramírez M.,R., F.R. Díaz S. y J.L. Barrera G. 1992. Cultivo in vitro de embriones inmaduros derivados de cruas interespecíficas de Phaseolus vulgaris x P. acutifolius. Memorias del XIV Congreso Nacional de Fitogenética. UNACH. p.11

Reddy, P.J. and K. Vaidyanath. 1986. In vitro characterization of salt stress effects and the selection of salt tolerant plants in rice (Oryza sativa L.) Theor. Appl. Genet. 71:757-760

Rodríguez M., J.F. E.E. Andrade A. y M.E. García H. 1992. Efecto de la salinidad del suelo y escarificación sobre la producción de fitomasa en tres especies del género Atriplex. Memorias del XIV Congreso Nacional de Fitogenética. UNACH. p.68A

Saam, M.M., G.L. Hosfield and J.W. Saunders. 1987. In vitro propagation of dry bean from seedling shoot tips.

J. Amer. Soc. Hort. Sci. 112(5):852-855

Sabja, A.M., D.W.S. Mok and M.C. Mok. 1990. Seed and embryo growth in pod cultures of Phaseolus vulgaris and P. vulgaris x P. acutifolius. HortScience. 25(10):1288-1291

Spiegel-Roy, P. and G. Ben-Hayyim. 1985. Selection and breeding for salinity tolerance in vitro. Plant and Soil. 89:243-252

Trejo C., R., M.C. López P., J.L. Rodríguez O. y V.A. González H. 1992. Tolerancia relativa de células de Amaranthus hypochondriacus L. a salinidad. Memorias del XIV Congreso Nacional de Fitogenética. UNACH. p.27

Yang, Y.W., R.J. Newton and F.R. Miller. 1990. Salinity tolerance in Sorghum II. Cell culture response to sodium chloride in S. bicolor and S. halepense. Crop Sci. 30:781-785

VIII. A P E N D I C E

Cuadro 1A . Materiales, equipo y reactivos empleados para la preparación de cultivo Murashige-Skoog (M.S. 1962)

1. Vasos de precipitados y probetas
2. Pipetas de 0.5, 1, 2, 5 y 10 ml
3. Pizetas
4. Plancha magnética
5. Balanza analítica Sartorius 125V
6. Potenciómetro Corning M103
7. Papel aluminio
8. Horno de microondas y autoclave horizontal
9. Agua bidestilada
10. Solución de 0.1 y 1.0 N de HCl y NaOH
11. Solución buffer
12. Soluciones concentradas de sales inorgánicas y aditamentos del medio de cultivo.

Cuadro 2A. Soluciones concentradas del medio de cultivo M.S.

Solución A (1000x):	CaCl ₂ ·2H ₂ O	22.0 g en 50ml
Solución B:	KNO ₃ se agregan 1.9 g.l ⁻¹ directamente en el medio de cultivo.	
	NH ₄ NO ₃ se agregan 1.65 g.l ⁻¹ directamente en medio de cultivo.	
Solución C (1000x):	KI	41.5mg en 50ml
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	1.25mg en 50ml
Solución D (400x) :	KH ₂ PO ₄	3.4g en 50ml
	H ₃ BO ₃	0.124g en 50ml
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	5.0mg en 50ml
Solución E (400x) :	MgSO ₄ ·7H ₂ O	7.4g en 50ml
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.44g en 50ml
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.172g en 50ml
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.5mg en 50ml
Solución F (200x) :	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.557g en 100ml
	Na ₂ EDTA	0.745g en 100ml
Solución G (100x) :	Glicina	50.0mg en 250ml
	Piridoxina. HCl	12.5mg en 250ml
	Ac. nicotínico	12.5mg en 250ml
	Tiamina	2.5mg en 250 ml

Cuadro 3A. Materiales, equipo y reactivos usados desde la pre-desinfestación, hasta la siembra in vitro de los cultivos de Phaseolus sp.

1. Vasos de precipitado, probetas (100 ml)
2. Frascos de alimento infantil con 25 ml de medio de cultivo.
3. Bisturí, pinzas y lámpara de alcohol
4. Cajas de petri esterilizadas
5. Regla graduada
6. Algodón y gasas esterilizadas
7. Agua bidestilada esterilizada
8. Alcohol etílico
9. Hipoclorito de sodio comercial
10. Tween-20.

Cuadro 4A. Análisis de varianza para la variable longitud de brotes bajo los efectos de las cuatro concentraciones de NaCl.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	P>F
Factor A	3	11.9898	3.9966	24.7724	0.000**
Factor B	2	0.5243	0.2621	1.6250	0.206NS
Interacción	6	1.3716	0.2286	1.4170	0.227NS
Error	48	7.7440	0.1613		
Total	59	21.6298			

C.V.= 27.66%

** Altamente significativo

NS No significativo

Cuadro 5A. Comparación de medias por diferencia mínima significativa para la variable longitud de brote; promedio de cinco repeticiones.

Tratamiento	promedio *
1	2.56 A
5	2.08 AB
9	1.80 BC
10	1.70 BC
2	1.44 BCD
6	1.36 CD
3	1.22 CD
11	1.16 CD
4	1.00 D
7	1.00 D
8	1.00 D
12	1.00 D

DMS= 0.01

* Promedios en cm.

Cuadro 6A. Análisis de varianza para la variable número de brotes axilares, bajo los cuatro niveles de NaCl.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	P>F
Factor A	3	14.7926	4.9308	39.1635	0.000**
Factor B	2	1.2817	0.6408	5.0900	0.010*
Interacción	6	4.0062	0.6677	5.3032	0.000**
Error	48	6.0434	0.1259		
Total	59	26.1239			

C.V.= 25.20%

** Altamente significativo

* Significativo

Cuadro 7A. Comparación de medias por diferencia mínima significativa para la variable número de brotes axilares promedio de cinco repeticiones.

Tratamientos	*	promedio	
5	9.8	3.0428	A
1	4.4	1.9854	B
9	2.8	1.6585	BC
10	2.0	1.4142	BCD
6	2.0	1.3949	BCD
2	1.8	1.3121	CD
3	1.2	1.0828	CD
4	1.0	1.0000	D
7	1.0	1.0000	D
8	1.0	1.0000	D
11	1.0	1.0000	D
12	1.0	1.0000	D

DMS= 0.6030

* Promedios reales (sin transformación)

Cuadro 8A. Análisis de varianza para la variable número de hojas desplegadas en los brotes de los tres cultivares de frijol bajo los efectos del NaCl.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	P>F
Factor A	3	8.1259	2.7086	22.3726	0.000**
Factor B	2	1.4885	0.7442	6.1476	0.004**
Interacción	6	1.8527	0.3087	2.5506	0.031*
Error	48	5.8113	0.1210		
Total	59	17.2787			

C.V.= 24.84%

** Altamente significativo

* Significativo

Cuadro 9A. Comparación de medias por diferencia mínima significativa para la variable número de hojas desplegadas; promedio de cinco repeticiones.

Tratamientos	*	promedio	
5	6.0	2.5554	A
1	2.8	1.8584	B
6	1.6	1.5856	BC
10	1.4	1.5413	BC
9	1.2	1.4584	BC
2	1.0	1.3949	BC
7	0.4	1.1656	C
8	0.4	1.1656	C
3	0.2	1.0828	C
4	0.0	1.0000	C
11	0.0	1.0000	C
12	0.0	1.0000	C

DMS= 0.5913

* Promedios reales (sin transformación)

Cuadro 10A. Análisis de varianza para la variable peso fresco de los tres cultivares de frijol bajo las concentraciones de NaCl.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	P>F
Factor A	3	0.6449	0.0215	19.4122	0.000**
Factor B	2	0.0189	0.0094	8.5350	0.001**
Interacción	6	0.0282	0.0047	4.2457	0.002**
Error	48	0.0531	0.0011		
Total	59	0.1647			

C.V.= 3.21%

** Altamente significativo

Cuadro 11A. Comparación de medias por diferencia mínima significativa para la variable peso fresco; promedio de cinco repeticiones.

Tratamientos	*	promedio	
5	0.33822	1.1533	A
1	0.17812	1.0848	B
6	0.12016	1.0578	BC
2	0.07456	1.0363	BCD
9	0.04792	1.0236	CD
3	0.04160	1.0205	CD
10	0.04096	1.0202	CD
4	0.02514	1.0124	CD
7	0.00902	1.0044	CD
8	0.00582	1.0028	CD
11	0.00316	1.0015	CD
12	0.00242	1.0011	D

DMS= 0.556

* Promedios reales en g (sin transformación)

Cuadro 12A. Análisis de varianza para la variable peso seco de los tres cultivares bajo los cuatro niveles de NaCl.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	P>F
Factor A	3	0.001316	0.000439	20.7519	0.000**
Factor B	2	0.000240	0.000120	5.6842	0.006**
Interacción	6	0.000469	0.000078	3.6992	0.004**
Error	48	0.001015	0.000021		
Total	59	0.003040			

C.V.= 0.4575%

** Altamente significativo

Cuadro 13A. Comparación de medias por diferencia mínima significativa para la variable peso seco; promedios de cinco repeticiones.

Tratamientos	*	promedio
5	0.04302	1.0211 A
1	0.02412	1.0119 B
6	0.01148	1.0056 BC
9	0.00978	1.0048 BC
2	0.00944	1.0046 BC
10	0.00592	1.0029 C
3	0.00454	1.0022 C
4	0.00378	1.0018 C
8	0.00248	1.0011 C
11	0.00154	1.0007 C
7	0.00122	1.0005 C
12	0.00108	1.0004 C

DMS= 0.0078

* Promedios reales en g (sin transformación)

