

DESARROLLO DE RAICES *in vitro* DE *Phaseolus vulgaris* L. Y SU ESTUDIO ANATOMICO COMPARATIVO¹

Patricia López González y Guillermo Carrillo Castañeda ²

RESUMEN

El presente trabajo trata sobre la caracterización morfológica de tipos de raíz de *Phaseolus vulgaris* L. obtenidos a partir de tejidos de hoja y del ápice del tallo, en 3 medios de cultivo, comparativamente con el desarrollado a partir de semilla. De acuerdo con los resultados, las raíces obtenidas *in vitro* no presentaron similitud total, evaluada mediante pruebas citoquímicas y ultraestructurales con la raíz normal; sin embargo, estos resultados servirán de base para definir aquellas características anatómicas y bioquímicas mínimas requeridas en el establecimiento de la simbiosis *in vitro*. Se determinó además, que para la inducción y desarrollo continuo de las raíces, no se requieren hormonas exógenas. La condición física del medio de cultivo CN no modificó el patrón de desarrollo de la raíz.

SUMMARY

The present paper deals with the morphological comparisons of different types of roots of *Phaseolus vulgaris* L., developed *in vitro* from leaves tissue and apical meristems against the normal root obtained from the seed. The roots developed *in vitro* were not completely similar to the normal from the citochemical and ultrastructural point of view. However, our results suggest the need to clarify those minimum anatomical and biochemical characteristics required to establish *in vitro* associations. It was found that in order to develop this kind of cultures *in vitro*, no exogenous ftohormones were required. The physical condition of the CN culture medium did not modify the pattern of root development.

INTRODUCCION

La raíz es el órgano del vegetal especializado para llevar a cabo las funciones de absorción de nutrimentos, así como de sostén de la planta y recibe productos

¹ Este trabajo es parte de la tesis que para obtener el título de biólogo, presentó el primer autor en la Universidad Autónoma de Morelos.

² Estudiante y Profesor Investigador, respectivamente. Centro de Genética, Colegio de Postgraduados, Chapingo, Méx. 56230.

elaborados de la parte aérea de ésta. En casos particulares, este órgano representa el lugar físico de interacción con microorganismos simbióticos o patógenos; en tales casos, las características anatómicas, como la presencia de los pelos radicales (Bergersen, 1982), y las bioquímicas (Bohlool y Schmidt, 1974), juegan un papel importante.

La interacción simbiótica *in vitro* de microorganismos del género *Rhizobium* asociado con diversas especies vegetales, ha sido estudiada en células desdiferenciadas de plantas de *Glycine max* (Holsten *et al.*, 1971), *Triticum monococcum* (Child, 1975), *Vigna unguiculata* y *Nicotiana tabacum* (Scowcroft y Gibson, 1975) o bien con raíces desarrolladas a partir del pecíolo de hojas de leguminosas que durante este proceso se conservaron verdes (Lie, 1971).

Al estudiar las interacciones simbióticas y parasíticas en las que interviene la raíz, se considera conveniente evitar la presencia en el medio de productos generados en otros órganos de la planta (como las hojas), lo cual puede conseguirse mediante el cultivo de raíces *in vitro*.

El objetivo del presente trabajo fue comparar el desarrollo de raíces de *P. vulgaris* obtenidas *in vitro*, así como las características anatómicas de éstas, cuando se desarrollaron en tres medios de cultivo, respecto al obtenido de raíces producidas a partir de semilla.

MATERIALES Y METODOS

Material Biológico y Medios de Cultivo

Se utilizaron semillas de frijol (*P. vulgaris* L.), del cultivar 'Negro-150', proporcionado por el Programa de Frijol del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-SARH).

Se emplearon los medios de cultivo CN (Cressweil y Nitsch, 1975), Smith (Mascarenhas *et al.*, 1969), y el de Murashige y Skoog (1962), modificado MS2 conteniendo 2.6 mg/l de cinetina y 4.0 mg/l de ácido indol acético (AIA). Los medios CN s/h, Smith s/h y MS2 s/h no contenían la o las hormonas correspondientes. Los medios MS-Smith y MS-CN contenían las sales inorgánicas del medio MS2 y los compuestos orgánicos del medio Smith y CN, respectivamente. Los medios de cultivo fueron

suplementados con 20% de agua de coco (*Cocos nucifera*), a excepción del medio CN s/c empleado para el cultivo de ápices. Cuando los medios se prepararon en estado sólido, se agregaron 7 g de agar por litro, después de ajustar el pH a 5.8 ± 1 .

Los medios sólidos se sirvieron (muestras de alícuotas de 10 ml) en frascos de vidrio de 30 ml de capacidad. De los medios líquidos se sirvieron 25 ml en matraces Erlenmeyer de 125 y 250 ml de capacidad. Los medios de cultivo se esterilizaron en una autoclave a una presión de 1.05 kg/cm^2 por 15 minutos.

Procedimiento Para el Establecimiento de Cultivos *in vitro*

El primer par de hojas unifoliadas de plantas de 12-15 días y los ápices del tallo de 8-12 días, se desinfectaron en hipoclorito de calcio (3% p/v), durante 10 minutos. Fragmentos de hoja de aproximadamente un cm^2 , al igual que los ápices seccionados, se incrustaron en los medios de cultivo correspondientes. Para el establecimiento de los cultivos en suspensión se hizo transferencia de raíces y masas de células desdiferenciadas de 10-15 días, desarrolladas en los medios MS2, Smith y CN, a nuevos medios frescos en estado líquido.

Los cultivos de hoja fueron incubados durante 20-30 días a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ en la obscuridad. Los de ápices se incubaron en luz continua por un lapso de 20-33 días. Los cultivos en suspensión, a $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ en la obscuridad y en agitación horizontal (108 oscilaciones por minuto con 5 cm de desplazamiento).

Para la prueba de afinidad de núcleos a la tinción, se analizaron siguiendo el procedimiento descrito por García (1972), las porciones apicales de raíces obtenidas en cada uno de los medios, así como las de raíces obtenidas de semillas normales.

Las plántulas desarrolladas a partir de los ápices del tallo fueron transplantadas en macetas con tierra estéril y conservadas hasta la etapa de floración.

Ultraestructura de la Raíz

Su determinación se hizo en muestras del ápice de la raíz, de raíces diferenciadas desarrolladas a partir de semillas y de aquéllas desarrolladas a partir de hoja en los medios sólidos de MS2, Smith y CN. La fijación se realizó con

glutaraldehído (3%) durante 2 h a 4°C. La postfijación se efectuó con tetraóxido de osmio al 1% durante 12 h a 4°C. Posteriormente las muestras se deshidrataron en alcohol etílico al 50, 60, 70, 80, 90% y absoluto. La preinclusión se llevó a cabo en una mezcla de óxido de propileno y Epón 1:1 durante 24 h a temperatura ambiente. La inclusión se efectuó en Epón 812 donde las muestras permanecieron durante 24 h a 60°C, para su polimerización. Los cortes semifinos de 1 µm de grosor fueron teñidos con azul de toluidina al 1%, observados y fotografiados en microscopio electrónico y fotomicroscopio.

RESULTADOS Y DISCUSION

Desarrollo de los Cultivos *in vitro* Establecidos a Partir de Segmentos de Hoja

En los medios sólidos Smith, MS2 y CN los cultivos manifestaron dos tipos de respuesta: desarrollo de células desdiferenciadas (células que manifiestan pobre especialización y por consiguiente, adaptables mediante un proceso de desarrollo a varias funciones), y raíces; en los medios MS2 y Smith el desarrollo de células desdiferenciadas fue predominante ya que el 78 y 70% del peso fresco total, correspondió a este tipo de desarrollo, respectivamente (Cuadro 1). En el medio CN predominó el desarrollo de raíces, representando casi el 84% del peso fresco de los cultivos, si consideramos que el peso del tejido de la hoja residual no constituye un desarrollo *in vitro*. Las raíces generadas en cada uno de los 3 medios de cultivo tuvieron aspectos peculiares que a simple vista permitía diferenciarlos, siendo el medio de CN en el que prácticamente sólo se generaron raíces. Estos resultados coinciden con los obtenidos por López et al. (1978a) y Pérez y Carrillo (en prensa).

Desarrollo de Plantas a partir de Apices del Tallo

El 80 por ciento de los ápices sembrados en el medio CN s/c, diferenciaron a los 8 días un par de hojas trifoliadas desarrollándose simultáneamente las raíces. Posteriormente, el grado de desarrollo de las plantas fue similar al que obtuvieron López et al. (1978b) y Pérez y Carrillo (en prensa); es decir, la raíz desarrollada en el medio CN es funcional al permitir el desarrollo de plántulas

Cuadro 1. Respuesta de los cultivos establecidos a partir de explantes de hoja de frijol Negro 150 en los medios Smith, MS2 y CN.

Medio de Cultivo	Tejido Vegetal	Peso fresco expresado en porcentaje ^{1/}	Características del tejido desarrollado
Smith	Hoja residual	4.28	
	Células desdiferenciadas	70.10	Color café claro
	Raíz	25.50	Gruesas, de aspecto esponjoso
MS2	Hoja residual	0.72	
	Células desdiferenciadas	77.94	Color crema y café claro
	Raíz	21.34	Delgadas
CN	Hoja residual	61.50	
	Células desdiferenciadas	6.30	Color crema
	Raíz	32.20	Aparentemente parecidas a la normal.

^{1/} Los porcentajes corresponden al promedio de 10 muestras por tratamiento.

diferenciadas en este medio, las que al ser transplantadas en macetas continuaron su desarrollo normal, hasta floración.

Para evaluar el efecto de las sales inorgánicas en el patrón de desarrollo de los cultivos se emplearon los medios MS-Smith y MS-CN, en los que se observó una mayor porporción del desarrollo de células desdiferenciadas y modificaciones en el grosor de la raíz. Por ejemplo, en el medio MS-Smith comparativamente con el Smith, se presentó una mayor masa de células desdiferenciadas y las raíces también fueron de mayor grosor y tamaño. En el medio MS-CN fue más aparente la mayor proporción de células desdiferenciadas mientras que el número, tamaño y grosor de las raíces

fue menor que las desarrolladas en el medio CN.

Este resultado pone de manifiesto la importancia y efecto de las sales inorgánicas en el patrón de desarrollo. La composición inorgánica del medio CN es más pobre que la del medio MS, por lo que se explica que el tipo de desarrollo obtenido a partir de hoja en el medio CN sea principalmente de raíces.

Al realizar el estudio anatómico de la raíz se encontró que las que tenían mayor diámetro a su vez tenían un mayor número de capas celulares de la corteza. En relación a esto, Street y McGregor (1952) indican haber encontrado un aumento en el diámetro de raíces de *Lycopersicon esculentum* por alteración del potencial osmótico del medio nutritivo, originando la formación de un mayor número de estratos corticales.

Efecto de la Condición Física del Medio Sobre el Patrón de Desarrollo

Los cultivos desarrollados a partir de segmentos de hoja en los medios sólidos de MS2, Smith y CN, fueron transferidos a medios líquidos. En los cultivos en suspensión MS2, MS2 s/h, Smith y Smith s/h, se observó que solamente hubo un desarrollo pobre de células desdiferenciadas en diversos estados de agregación; en cambio, en los medios en suspensión CN y CN s/h donde el patrón de desarrollo siguió siempre la misma tendencia, se detectó un vigoroso y acelerado crecimiento de raíz como respuesta exclusiva. Como lo manifiestan estos resultados, bajo las condiciones experimentales empleadas, fue evidente que el estado líquido del medio CN y CN s/h acelera el crecimiento de las raíces. Esto concuerda con el fenómeno comunicado por Street y Henshaw (1966) quienes encontraron que el estado físico del medio por sí solo no modificó el patrón de desarrollo de los cultivos; en contraste, con maíz, trigo y sorgo, Hendre et al. (1971 y 1972) encontraron que las masas de células desdiferenciadas desarrolladas en el medio Smith sólido, al transferirlas al medio Smith líquido, generaban abundantes raíces.

En cuanto al papel de las hormonas exógenas, éstas no fueron necesarias en la inducción y desarrollo continuo de las raíces, lo que sugiere que las hormonas endógenas del tejido de hoja son capaces de inducir las respuestas encontradas y/o que los niveles hormonales sintetizados por la raíz, son suficientes para su desarrollo. En relación a esto, Bottino et al. (1979) indican que hipotéticamente cualquier tejido vegetal vivo posee la capacidad de sintetizar hormonas, pero

algunos pierden esta capacidad o las cantidades sintetizadas son insuficientes para su desarrollo. Este resultado reviste interés dado que en el estudio de la interacción *in vitro* de *Rhizobium* sp y la leguminosa correspondiente, la presencia de hormonas en el medio podría interferir en dicho fenómeno. Además se han encontrado alteraciones en la estructura anatómica de la raíz, por acción de las hormonas exógenas, en *Lycopersicon esculentum* (Hugher y Street, 1966) y en *Pisum sativum* (Torrey, 1957; Torrey y Shigemura, 1957).

Estudio Anatómico de la Raíz

Se utilizó como patrón a la raíz desarrollada a partir de semilla, el cual fue semejante al observado en plantas normales por Yépez (1977), Fahan (1974) y Engleman (1979). Sin embargo, las raíces desarrolladas *in vitro* difirieron de las obtenidas a partir de semilla en el grosor de la raíz, tamaño de los espacios intercelulares y del cilindro, número de capas celulares de la corteza y la morfología de las células que la constituyen, así como en la presencia de amiloplastos (Cuadros 2 y 3), dependiendo el medio de cultivo en el que se obtuvieron.

Cuadro 2. Datos morfológicos comparativos de las raíces de 12 días inducidas *in vitro* a partir de segmentos de hojas y la raíz normal de 5 días de plantas de *P. vulgaris*.

Medio de cultivo	Tipo de raíz	Morfología de células epidérmicas	Células de la corteza	
			No. de capas celulares	Morfología de las células
Smith	<i>in vitro</i>	Polimorfas	7	Semiesféricas
MS2	<i>in vitro</i>	Alargadas	5	Alargadas
CN	<i>in vitro</i>	Polimorfas	6	Irregulares
Suelo	normal	Alargadas	11	Semiesféricas

La forma de células epidérmicas de la raíz MS2 (Figura 3a) fueron las más parecidas a las de la raíz normal (Figura 1a), al ser ambas de tipo alargado a diferencia de la apariencia polimórfica de las raíces Smith (Figura 2a) y CN (Figura 4a). Las

células de la corteza de la raíz Smith, fueron las que más se semejaron a la raíz normal (Figuras 2a y 1a). Los amiloplastos fueron abundantes en la raíz normal y la raíz CN (Figuras 1b y 4b), y escasearon en las raíces MS2 y Smith (Figuras 3b y 2b). Los espacios intercelulares más grandes fueron encontrados en la raíz Smith (Figura 2a), que pueden ser responsables del aspecto esponjoso que muestra esta raíz.

Cuadro 3. Medias de los diferentes estratos celulares de la raíz normal y de las inducidas *in vitro* de *P. vulgaris*. Los datos corresponden a un promedio de 5 determinaciones.

Medio de cultivo	G R O S O R (μ m)			Cilindro o médula (μ m)	Espacios intercelulares (μ m)
	Epidermis	Corteza	Endodermis		
Normal	7.3 $\pm$ 2.53	450.8 $\pm$ 9.13	17.6 $\pm$ 1.43	367.2 $\pm$ 24.80	0.2 $\pm$ 0.083
Smith	16.3 $\pm$ 5.93	330.8 $\pm$ 26.64	26.9 $\pm$ 8.75	229.4 $\pm$ 14.85	13.9 $\pm$ 5.67
MS2	6.7 $\pm$ 0.91	114.3 $\pm$ 8.29	10.7 $\pm$ 0.98	114.7 $\pm$ 7.96	5.0 $\pm$ 1.25
CN	20.8 $\pm$ 3.18	190.8 $\pm$ 47.17	10.9 $\pm$ 2.36	99.1 $\pm$ 22.17	6.1 $\pm$ 2.61

Como otro criterio de comparación se determinó el grado de afinidad a la tinción (por el método de Feulgen), de los núcleos de las células de las diferentes raíces. Esta prueba citoquímica permitió definir que solamente se tiñeron los núcleos de la raíz normal y CN, aunque los de esta última en menor grado.

Como se aprecia, ninguno de los tipos de raíces generados *in vitro* presentó similitud anatómica total con el normal, lo cual haría suponer, que este material no tiene probabilidades para ser utilizado en una asociación simbiótica o parasítica *in vitro*. Sin embargo, cabe la posibilidad de que una raíz parcialmente diferente a la normal pudiera conjuntar las características anatómicas y bioquímicas mínimas requeridas para permitir la asociación *in vitro*, por lo que se requiere continuar con este tipo de estudios para determinar esas características mínimas de la raíz, que permitan establecer la asociación simbiótica entre plantas no leguminosas y *Rhizobium*, *in vitro*.

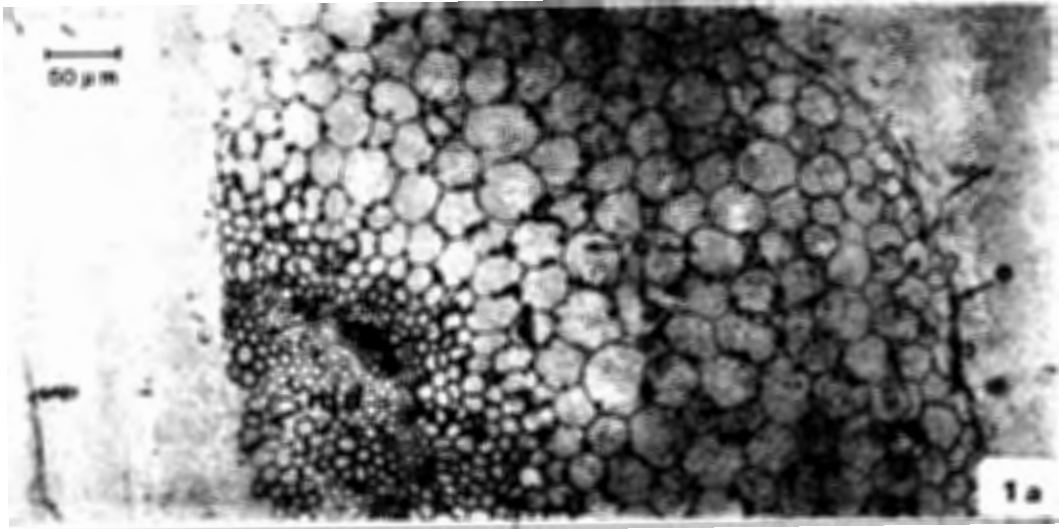


Figura 1a. Aspectos panorámicos de la raíz normal bajo microscopía de luz en donde se aprecia: la epidermis (e), formada por células alargadas; la corteza (c), integrada por aproximadamente 11 capas de células esféricas con pequeños espacios intercelulares.

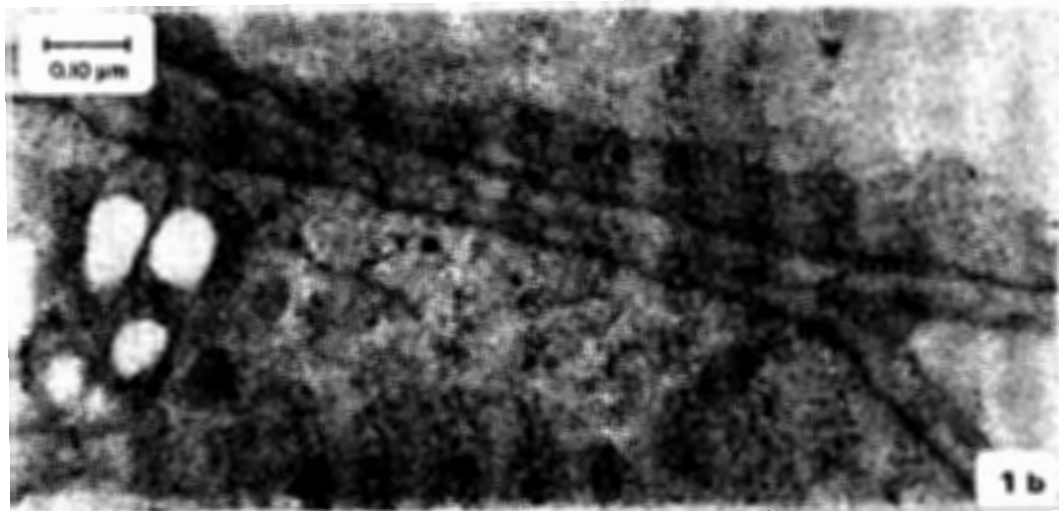


Figura 1b. La micrografía electrónica de la raíz normal muestra una zona de la corteza donde se aprecian: abundantes amiloplas_{tos} (a), lámina media (lm), membrana celular (mc), mitocon_{drias} (m), núcleo (n), retículo endoplásmico (re) y vacuo_{la} (v).

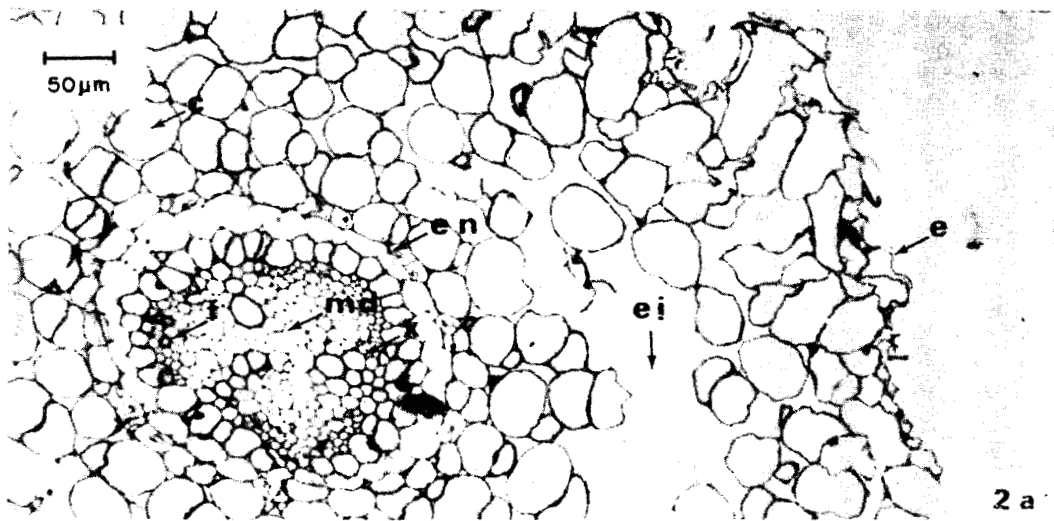


Figura 2a. En la raíz Smith, bajo microscopía de luz, se aprecian las células epidérmicas polimorfas (e) y las células de la corteza esféricas en su mayoría (c). Los espacios intercelulares (ei) son muy grandes; e, epidermis; en, endodermis; md, médula.



Figura 2b. En esta micrografía electrónica de la raíz Smith es notoria la falta de amiloplastos en las células de la corteza.

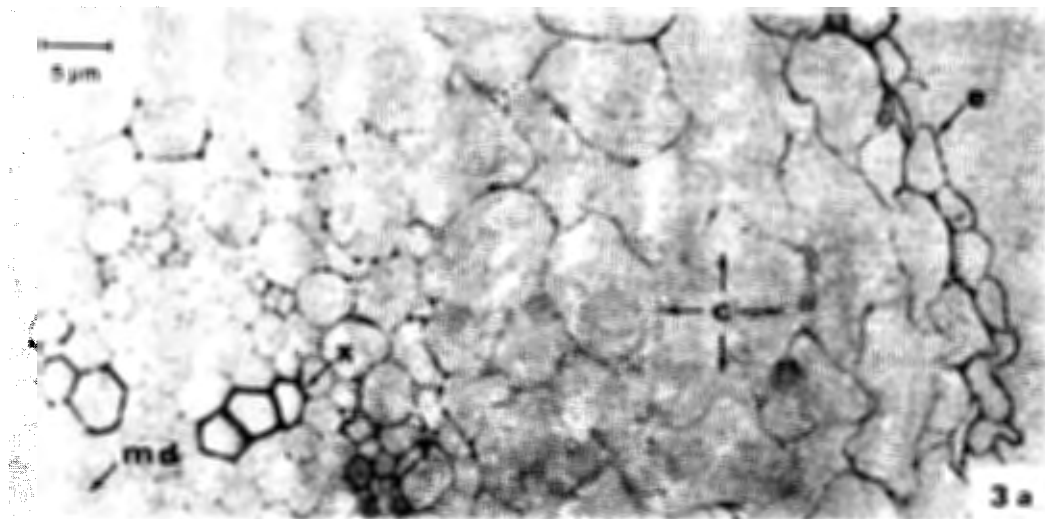


Figura 3a. La raíz MS2 bajo microscopía de luz, muestra la presencia de células epidérmicas alargadas. La corteza está integra da por aproximadamente 5 capas de células de forma irregular.

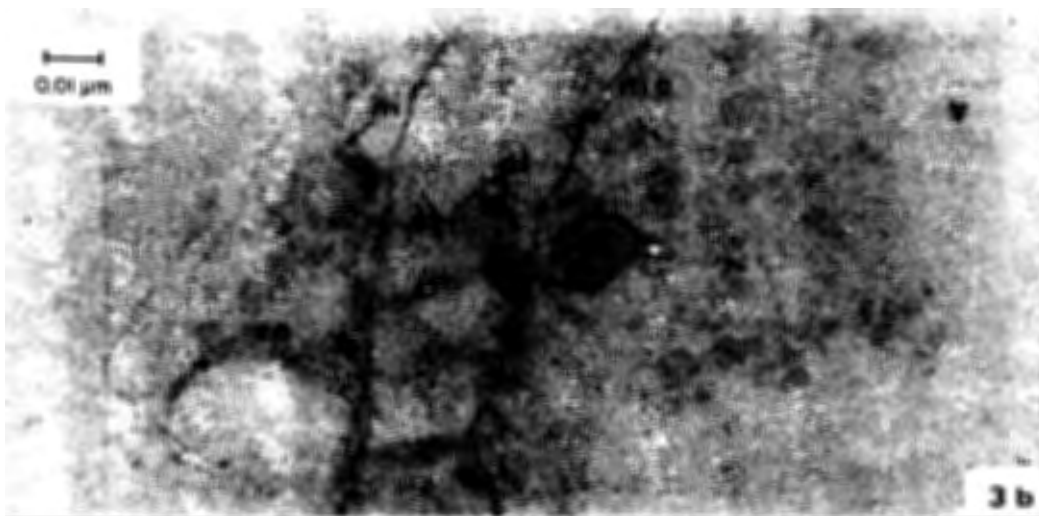


Figura 3b. En la micrografía electrónica de las células de la corteza de la raíz MS2 se aprecia la membrana celular, mitocondrias, numerosas plasmodesmas (pl) y retículo endoplásmico.

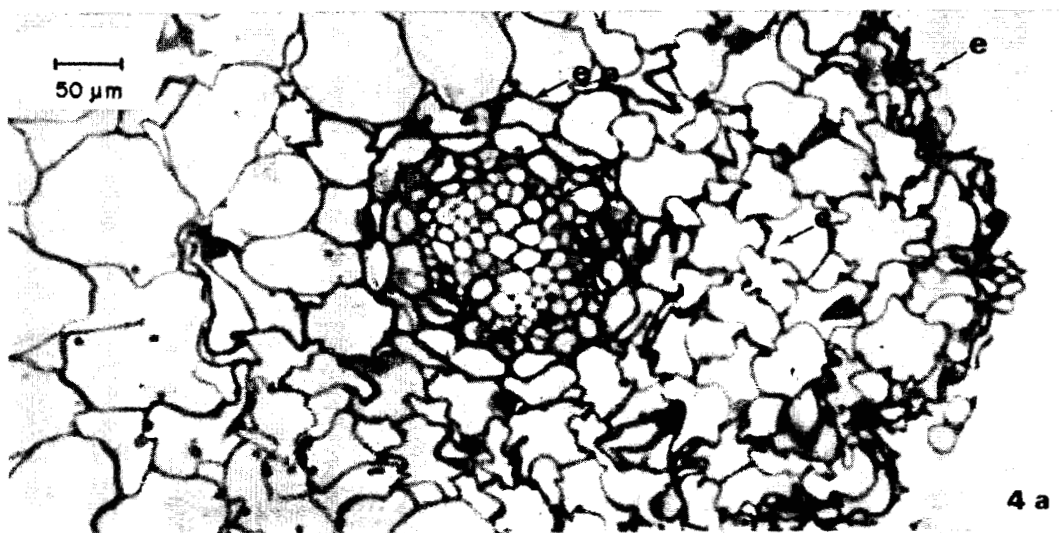


Figura 4a. En la raíz CN bajo microscopía de luz, se aprecia que la epidermis y la corteza están formadas por células polimorfas. El número de capas celulares del estrato de la corteza es de aproximadamente 6. f, floema.

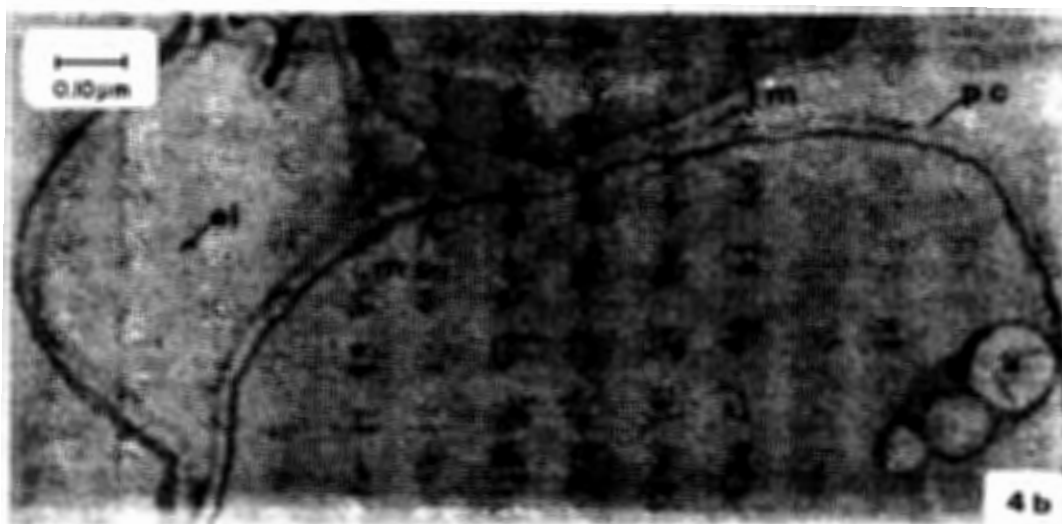


Figura 4b. La micrografía electrónica de la raíz CN muestra abundantes amiloplastos, y los espacios intercelulares (ei) de tamaño intermedio entre los de la raíz normal y la Smith. pc, pared celular.

CONCLUSIONES

1. El medio de cultivo CN, fue el único en el que se estableció el cultivo de raíces, prácticamente sin células desdiferenciadas.
2. Las raíces desarrolladas en el medio CN son funcionales ya que soportan el desarrollo de plantas a partir de ápices.
3. Las hormonas exógenas no fueron requeridas para la inducción, diferenciación y desarrollo continuo de raíces *in vitro*.
4. Anatómicamente la raíz MS2 fue la de mayor similitud con la raíz normal, a nivel de células epidérmicas.
5. Citoquímicamente, la raíz CN fue la más parecida a la raíz normal.
6. Ultraestructuralmente, la raíz normal y la CN fueron similares al presentar numerosos amiloplastos.

BIBLIOGRAFIA

- Bergersen, F.J. 1982. Root nodules of legumes: structure and functions. Research Studies Press. A Division of John Wiley and Sons, LTD, pp. 1-8.
- Bohlool, B.B. and Schmidt, E.L. 1974. Lectins: A possible basis for specificity in the *Rhizobium* legume nodule symbiosis. Science 185: 269-271.
- Bottino, P.J., Marce, C.R. and Gaff, L.M. 1979. Tissue culture and organogenesis in the winged bean. Can. J. Bot. 57: 1773-1776.
- Cresswell, R. and Nitsch, C. 1975. Organ culture of *Eucalyptus grandis* L. Planta 125: 87-90.
- Child, J.J. 1975. Nitrogen fixation by a *Rhizobium* sp. in association with non-leguminous plant cell cultures. Nature 253: 350-351.
- Engleman, M.E. Anatomía y morfología. (1979). En: Contribuciones al conocimiento del frijol (*Phaseolus*) en México. Engleman, M.E. (Ed). Editorial C.P. Chapingo, México.
- Fahan, A. 1974. Plant anatomy. 2a. ed. Pargamon Press, Oxford, p. 611.
- García, V.A. 1972. Manual de técnicas de citogenética. Editorial C.P. Chapingo, México.

- Hendre, R.R., Mascarenhas, A.F., Patha, K.M., Seetarama, B. and Jagannathan, V. 1971. Studies on tissue culture of maize, wheat, rice and sorghum. International symposium on "Morphogenesis in plant cell, tissue and organ cultures". University of Delhi. Delhi, India.
- _____. 1972. Studies on tissue cultures of maize, wheat, rice and sorghum. Biochem. J. 128: 27.
- Holsten, R.D., Burns, R.C., Hardy, R.W.F. and Hebert, R.R. 1971. Establishment of symbiosis between *Rhizobium* and plant cells *in vitro*. Nature 232: 173-176.
- Hugher, E.W.O., and Street, H.E. 1966. Effects of inhibitory-concentrations of 3- indolacetic acid and 3- indolacetonitrile on cell division and tissue differentiation on excised tomato roots. J. Exp. Bot. 11: 198.
- Lie, T.A. 1971. Nodulation of rooted leaves in leguminous plants. Plant and Soil. 34: 663-673.
- López P., M.C., G. Carrillo Castañeda y V.M. Salceda. 1978a. Estudios sobre el desarrollo de citocultivos de *P. vulgaris* L. y *Lycopersicon esculentum* en medios suplementados con aguamiel y agua de coco. I. Fisiología de los cultivos estáticos y en suspensión. Agrociencia 31: 65-73.
- _____. 1978b. Estudio sobre el desarrollo de citocultivos de *P. vulgaris* L. y *Lycopersicon esculentum* en medios suplementados con aguamiel y agua de coco. II. Cultivo y diferenciación de los meristemas apicales del tallo. Agrociencia 31: 75-81.
- Mascarenhas, A.F., Hendre, R.R., Roa, B.S. and Jagannathan, V. 1969. Tissue culture of maize, wheat, jowar and rice. Indian J. Exptl. Biol. 7: 65-67.
- Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue culture. Physiol. Plantarum 15: 483-497.
- Pérez T., H. y G. Carrillo Castañeda. (en prensa). Efecto de la velocidad de desarrollo *Rhizobium phaseoli* sobre la capacidad infectiva. Agrociencia.
- Scowcroft, W.R., and Gibson, A.H. 1975. Nitrogen fixation by *Rhizobium* associated with tobacco and cowpea cell cultures. Nature 253: 351-352.
- Street, H.E. and McGregor, S.M. 1952. The carbohydrate nutrition of tomato roots. III. The effect of external sucrose on the growth and anatomy of excised roots. Ann. Bot. 16: 195.
- _____, and Henslow, G.G. 1966. Methods for plant tissue culture. In: Cell and Tissue in Culture. Willmer N.E. (Ed.). Academic Press, New York. 471 p.
- Torrey, J.G. 1957. Cell division in isolated single plant cell *in vitro*. Proc. Nat. Acad. Sci. 43: 887. Whashington, D.C.
- _____, and Shigemura, G. 1957. Growth and controlled morphogenesis in pea root callus tissues grown in liquid medium. Amer. J. Bot. 44: 334.

Yépez B., M. 1977. Anatomía anómala de la raíz, hipocótilo y tallo de *Phaseolus coccíneus* L. Tesis de Biología, Fac. Ciencias. UNAM. México, D.F. 45p.