

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGIA

**Tesis para optar por el grado de Licenciatura en Biología con énfasis en
Genética y Biotecnología.**

**Descripción morfológica e histológica del desarrollo ontogénico del eje
embrionario cigótico de cuatro variedades costarricenses de frijol
(*Phaseolus vulgaris* L.) bajo condiciones de cultivo *in vitro***

Marisol Jiménez Chavarría
Carné 992081

2008

Dedicatoria

Esta tesis esta dedicada a:

Primeramente a Dios por darme la vida y guiar con sabiduría mis pasos en este camino.

A mis padres Olivio Jiménez y María Rosa Chavarría, por su amor, consejos y la confianza que me brindaron siempre, por mantenerse a mi lado en todo momento y sacarme adelante en los momentos difíciles, sabiendo así aprovechar el mejor obsequio que los padres pueden dar a un hijo, educarse orgullosamente con el esmero y esfuerzo de ellos.

A mis hermanos por el aporte que han dado a mi vida y siempre estar ahí en las buenas y en las malas.

A mí novio Frank Jiménez, quién en este último paso de la culminación de este trabajo a estado ahí incondicionalmente apoyándome en todo momento.

Marisol Jiménez Chavarría.

Agradecimientos.

A mis profesores de tesis Ethel Sánchez, Andrés Gatica y Martha Valdez por formar parte esencial de este trabajo.

Al personal del Centro de Investigación de Estructuras Microscópicas (CIEMIC), del Laboratorio de Biotecnología y Transformación Genética de Plantas y a la Lic. Dorís Fernández de la Universidad de Costa Rica, por el apoyo, equipo y material necesario en la elaboración de este trabajo.

A mis compañeros, compañeras y personas que han estado presentes en todo momento de mi carrera.

A la Vicerectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica por el financiamiento al proyecto "Optimización del proceso Morfogénico y de la regeneración in vitro de variedades Costarricenses del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), por medio de estudios anatómicos e histológicos", mediante el Fondo especial de estímulo a la investigación del año 2006.

Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Biología con énfasis en Genética y Biotecnología

Lic. Ethel Sánchez
DIRECTORA DE TESIS

M.Sc. Andrés Gatica Arias
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dra. Marta Valdez Melara
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dra. Ana Victoria Lizano.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dra. Virginia Solís
DIRECTORA ESCUELA DE BIOLOGIA

Marisol Jiménez Chavarría
SUSTENTANTE

INDICE GENERAL

<i>Dedicatoria</i>	<i>ii</i>
<i>Agradecimientos</i>	<i>iii</i>
INDICE GENERAL	v
RESUMEN	vii
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	3
1. Características del género <i>Phaseolus</i>	4
1.1 Distribución	4
2. Origen del frijol.....	4
3. Situación mundial	5
4. Situación del frijol en Costa Rica	7
5. Importancia del frijol en Costa Rica	10
5.1 Importancia Nutricional del frijol.....	10
6. Variedades de frijol en Costa Rica	11
6.1 Variedades de grano negro.....	11
6.2 Variedades de grano rojo	12
7. <i>Cultivo in vitro de tejidos vegetales</i>	13
8. Organogénesis somática.....	14
9. ¿Por qué el uso de la biotecnología para el mejoramiento del frijol?.....	15
10. Estudios en biotecnología del frijol.....	16
OBJETIVOS	19
Objetivo general:	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
Localización experimental.....	20
Microscopia electrónica de barrido (MEB)	21
Exposición y cobertura del meristemo apical a los 0 días de cultivo.....	22
Técnicas histológicas	22
a. Técnica para microscopía de luz	23
b. Microscopia óptica de alta resolución (MOAR).....	24
Desarrollo ontogénico del eje embrionario cigótico en condiciones <i>ex vitro</i>	25
RESULTADOS	26
Exposición y cobertura del meristemo apical a los 0 días de cultivo.....	26
Análisis ultraestructural del desarrollo de los ejes embrionarios sin BAP (control) de las cuatro variedades de frijol a través del tiempo.....	26
Efecto del BAP en el crecimiento bajo condiciones <i>in vitro</i>	28
Análisis de la formación de brotes utilizando MEB.	32
Análisis ultraestructural del desarrollo de los ejes embrionarios empleando BAP en las cuatro variedades de frijol a través del tiempo.	33

Desarrollo ontogénico y análisis ultraestructural del eje embrionario cigótico en condiciones <i>ex vitro</i>	35
Histología del frijol	36
<i>DISCUSIÓN</i>	118
<i>CONCLUSIONES</i>	122
<i>RECOMENDACIONES</i>	122
<i>LITERATURA CITADA</i>	123

RESUMEN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es uno de los cultivos de mayor importancia económica y alimenticia en Costa Rica. Es la principal fuente de proteína, hierro y fibra en la dieta de los costarricenses, principalmente en las zonas rurales. La producción de frijol enfrenta varias limitantes, tales como enfermedades causadas por hongos, bacterias y virus, ataque de insectos, deficiencias nutricionales y la pérdida de tolerancia a sequías. Para tratar de solucionar estos problemas, es indispensable mejorar genéticamente las variedades existentes por técnicas biotecnológicas e inducción de mutaciones. En este estudio, se realizaron análisis morfológicos e histológicos del desarrollo ontogénico para optimizar el proceso morfogénico y la regeneración *in vitro* de cuatro variedades costarricenses (Bibrí, Guaymí, Huetar y Brunca) de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Para generar la mayor cantidad de brotes, se empleó cultivo *in vitro* de ejes embrionarios, se utilizó cinco concentraciones de BAP (0, 5, 7.5, 10 y 12.5mg/l). Se determinó que la concentración óptima para formar brotes corresponde a 5mg l⁻¹. Además con microscopía electrónica se describió la morfología de los ejes embrionarios de las cuatro variedades de frijol sin y con 5mg l⁻¹ de N⁶-benzylaminopurina (BAP), se determinaron semejanzas entre las variedades, como por ejemplo la estructura y clasificación de los estomas y tricomas encontrados. Por otra parte, se observó diferencias en la epidermis de los ejes embrionarios y en los elementos de los vasos. Con el uso del microscopio de barrido también se determinó que la variedad Brunca es la que forma mayor número de brotes apicales al día doce de cultivo, sin embargo no se encontraron diferencias significativas (p= 0.1053) entre las variedades para esta característica.

INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es uno de los cultivos de mayor importancia económica y alimenticia en Costa Rica. Es la principal fuente de proteína, hierro y fibra en la dieta de los costarricenses, principalmente en las zonas rurales (MAG 1991).

La producción de frijol enfrenta varias limitaciones, tales como enfermedades causadas por hongos, bacterias y virus, ataque de insectos, deficiencias nutricionales y la pérdida de tolerancia a sequías (Aragão *et al.* 1996; MAG 1991). Para tratar de solucionar estos problemas, es indispensable buscar alternativas que permitan mejorar las variedades existentes por técnicas biotecnológicas e inducción de mutaciones.

Para tales efectos, es indispensable desarrollar un sistema eficiente de cultivo *in vitro* que permita la regeneración de plantas. Esta especie, no obstante es, bastante recalcitrante en su respuesta morfogénica, a los diversos métodos de cultivo *in vitro*. Muy pocos grupos en el mundo han logrado desarrollar procedimientos exitosos de regeneración de plantas para este cultivo. Asimismo, a pesar del gran número de investigaciones sobre la regeneración de plantas *in vitro*, vía embriogénesis u organogénesis somática, en numerosas especies vegetales, muy pocas presentan la evidencia histológica suficiente como para comprender los eventos morfológicos obtenidos.

Por lo tanto, es de suma importancia realizar estudios morfológicos e histológicos que permitan la optimización de la regeneración bajo condiciones de cultivo *in vitro* de las variedades costarricenses del frijol común.

El estudio de la morfología de los meristemas apicales de genotipos costarricenses de frijol, permitirá la selección adecuada de las variedades de frijol a utilizar para la aplicación de técnicas de transformación genética e inducción de mutaciones.

Además, este estudio busca optimizar el proceso de organogénesis y regeneración de plantas de frijol, mediante el conocimiento de los eventos histológicos y anatómicos morfológicos que ocurren en las diversas etapas de desarrollo. Esa información es muy importante, pues se desconoce la respuesta de las variedades de frijol común que se cultivan en Costa Rica, a la aplicación de técnicas de cultivo de tejidos. Estas técnicas pueden ser de gran utilidad para complementar

programas de mejoramiento. Las ventajas que se obtienen son: disminución del tiempo y el costo necesario para generar nuevas variedades, facilidad de manipulación *in vitro* de individuos potenciales y ejercer altas presiones de selección.

Según Aragão y Rech (1997), las características morfológicas de los brotes apicales y los efectos del BAP en la inducción de brotes múltiples son importantes para evaluar rasgos importantes en el meristemo apical, por lo que es una característica que se tomará en cuenta para así obtener en un futuro variedades costarricenses de frijol mejoradas genéticamente.

MARCO TEÓRICO

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es uno de los cultivos más viejos del nuevo mundo, y el de mayor consumo a nivel mundial (Veltcheva y Svetleva 2005). Pertenece a la familia de las legumbres (Fabaceae), la cual comprende 643 géneros y 18000 especies, agrupadas en 40 tribus. La tribu Phaseoleae es por mucho el grupo más importante económicamente, ya que contiene el 75% de las legumbres comercializadas en el mundo (Broughton *et al.* 2003).

El género *Phaseolus* es monofilético, de origen Neotropical. Se conocen entre 50-60 especies originarias de América, donde 5 especies: el frijol común (*P. vulgaris*), frijol yearlong (*P. polyanthus*), frijol scarlet runner (*P. coccineus*), frijol terapia (*P. acutifolius*) y el frijol Lima (*P. lunatus*) han sido domesticados (Broughton *et al.* 2003). El frijol común se encuentra entre las especies más cultivadas de la familia Fabaceae, siendo la legumbre más importante (Veltcheva y Svetleva 2005).

El frijol común se consume como grano maduro, grano inmaduro o como vegetal. La alta calidad nutricional de los frijoles en términos de porcentaje de proteína es un importante complemento de los alimentos almidonados. El alto contenido mineral, especialmente hierro y zinc, así como fuente de fibra, ácido fólico, tiamina, magnesio y potasio, son de gran importancia en regiones donde hay una alta prevalencia de deficiencias de micronutrientes (Broughton *et al.* 2003; Rodríguez y Fernández 2003).

La semilla del frijol contiene entre 20-25% de proteína, y la phaseolina es la principal. También es fuente de vitaminas y minerales. Contiene biotina la cual es un factor esencial para una variedad de carboxilasas y descarboxilasas establecidas en diversas vías metabólicas de todos los organismos. Se cree que el estado de la biotina varía entre las plantas durante el desarrollo y condiciones de crecimiento. El aislamiento, identificación y caracterización de la biogénesis de *P. vulgaris* podría ampliar el conocimiento de las condiciones óptimas y del tejido más apropiado de la planta para obtener grandes cantidades de biotina libre, lo cual traería mayores beneficios para la salud (Broughton *et al.* 2003).

1. Características del género *Phaseolus*.

El frijol es una planta anual, de crecimiento rápido. El sistema radicular es poco profundo, está constituido por una raíz principal y gran número de raíces secundarias con elevado grado de ramificación. El tallo principal es herbáceo, es el eje central de la planta, el cual está formado por una sucesión de nudos y entrenudos; se origina del meristemo apical del embrión de la semilla. Las primeras hojas son simples, las demás hojas son compuestas, trifoliadas y su tamaño cambia según la variedad. La flor presenta una coloración que varía de blanco al color lila, según la variedad. Las inflorescencias presentan de 4 a 8 flores por racimo, cuyos pedúnculos nacen en las axilas de las hojas o en las terminales de algunos tallos. El fruto es una legumbre de color, forma y dimensiones variables, en cuyo interior se disponen 4-6 semillas. La semilla es pequeña, de forma, tamaño y color dependientes de la variedad (Barboza 2002).

1.1 Distribución

El frijol se cultiva en gran diversidad de climas entre los 0 a 3000 m.s.n.m. y sus mayores rendimientos se obtienen en zonas donde la temperatura promedio oscila entre los 15 y 27 °C. Temperaturas promedio superiores a 27 °C favorecen el desarrollo vegetativo, pero ocasionan el aborto y desprendimiento de las flores, reduciendo el número de vainas y de semillas por planta. Este grano se produce en regiones con 1500 a 2600 mm de precipitación anual, aunque teóricamente de 300 a 400 mm de lluvia bien distribuidos son suficientes para obtener una buena cosecha. El exceso o déficit de lluvia son igualmente perjudiciales para la producción, pues inciden directamente en el desarrollo de la planta y la susceptibilidad a enfermedades (Barboza 2002; Broughton *et al.* 2003).

2. Origen del frijol

Existe duda sobre cuál nombre debe darse a la especie silvestre cercana a *P. vulgaris*. En poblaciones Sudamericanas, puede ser distinguido empleando el término *õaborigineus*. El tipo silvestre crece aislado en un amplio rango desde el este central de México a través de América Central, a lo largo de las laderas orientales de los Andes al noroeste de Argentina (Kaplan 1981).

Se sugiere que al menos un grupo de *P. vulgaris* domesticado evolucionó en la región Mesoamericana (México- Guatemala), pero no se tiene evidencia al respecto

(Kaplan 1981).

Además los fósiles de frijoles, están mal representados en los registros arqueológicos, como resultado de los métodos de recolección, pues los agricultores de regiones como México, arrancan las plantas con crecimiento erecto o arbustivo del suelo cuando maduran y las desgranán en estelas (juncos que sirven para cubrir el suelo de las habitaciones). Por lo tanto, el principal recurso de evidencia disponible para el análisis de la distribución y orígenes del frijol, comprende semillas y fragmentos de semillas, las cuales pueden ser carbonizadas por la ausencia del contacto con la humedad (Kaplan 1981).

Existen varias hipótesis sobre el inicio de la domesticación del frijol común: la más aceptada es la que propone que el frijol fue domesticado en Mesoamérica y luego transportado a Sudamérica. Según Kaplan (1981), la domesticación se llevó a cabo hace unos 7000 años. (Kaplan 1981)

3. Situación mundial

La producción mundial de frijoles secos ronda los 19-23 millones de toneladas métricas (TM) anuales, que se siembran en 26 millones de hectáreas (ha) de las cuales 7 millones son producidas en América Latina y África (Broughton *et al.* 2003; SEPSA y FAO 2006). En estos sitios son una importante fuente de proteínas y calorías, pues, la proteína animal es limitada y el consumo de frijol satisface el requerimiento proteico. Además, el frijol común cuenta con el 22% de la proteína total consumida por los humanos en el mundo (Aragão *et al.* 1996, Sánchez *et al.* 2005)

De acuerdo con los informes presentados por SEPSA y la FAO (2006), el 55% de la producción total, se concentra en sólo 5 países: Brasil, India, China, Myanmar y México (Cuadro 1). Estos grandes productores son, a su vez, grandes consumidores del producto, por lo que la producción mundial se dedica en mayor medida a atender las demandas locales de cada país. Brasil es el principal productor universal de frijol, y logra una producción de 2.8 millones de TM. India es el otro gran productor mundial de frijol, con un 31% del área y una participación del 14% en la producción mundial. Similar al caso de Brasil, India presenta un alto volumen de producción pero con bajos rendimientos, de casi un 50% inferior a la media mundial.

Cuadro 1. Producción promedio anual de frijol y sus principales productores (2001-2005)

Pais	Producción (en miles)	Participación relativa %	Porcentaje acumulado %
Mundo	188367	100%	
Brasil	2972	16%	16%
India	2580	14%	30%
China	1942	11%	41%
Myanmar	1516	8%	49%
México	1363	7%	56%
Estados Unidos de América	1052	6%	62%
Uganda	523	3%	65%
Indonesia	311	2%	67%
Kenya	346	2%	69%
Canadá	308	2%	70%
Turquía	240	1%	72%
Burundi	236	1%	73%
Tailandia	178	1%	74%
Nicaragua	197	1%	75%
Resto	4584	25%	100%

Fuente: SEPSA y FAO 2006

En el mundo se comercializa, en promedio, tan solo un 17% del total del frijol producido; asimismo, el promedio del nivel de dependencia de importaciones es del 15%. Cuatro países (Myanmar, China, Argentina y Canadá) concentran el 72% de las exportaciones mundiales de frijol. En la importación, también hay una alta concentración, pero menos marcada. Nueve países (India, Japón, EE.UU., Reino Unido, México, Brasil, Italia, Cuba y Venezuela) importan en conjunto casi la mitad del total mundial. Costa Rica ocupa la posición 20 entre los grandes importadores de frijol, pero la quinta posición entre los importadores de frijol negro (SEPSA y FAO 2006).

Gran parte de la producción en Latinoamérica tiene lugar en pequeñas fincas de 1-10 ha, a menudo en tierras quebradas y de baja fertilidad. Al menos el 80% de las áreas aquí plantadas son establecidas en laderas. En países como Kenya, el consumo anual es mayor que en América Latina, llegando a 66 kg por persona (Broughton *et al.* 2003).

Ante la pobreza en África y América Latina, especialmente en áreas rurales, las legumbres son cultivos provechosos en comparación con otras opciones como los cereales. En América Central, los pequeños agricultores reportan que entre los distintos cultivos, el frijol es el principal generador de ingresos, pues le atribuyen el

bienestar nutricional de la familia y el subsidio económico, que les permite a los hijos del agricultor el ingreso a diferentes niveles de educación, incluyendo niveles universitarios (Broughton *et al.* 2003).

4. Situación del frijol en Costa Rica

La producción nacional de frijol es de 10 mil TM anuales, cultivadas en aproximadamente 12 mil ha. Esta producción ha disminuido a una tasa media de -9.1% anual entre el año 2000 y el 2005, en razón de unas 1 800 ha al año. Las principales zonas de siembra son las regiones de Huetar Norte y Brunca, con 67% y 22% de la producción total, respectivamente (SEPSA y FAO 2006).

El consumo *per capita* por año en Costa Rica es de aproximadamente 10 kg. Este consumo ha disminuido a una tasa media de -1% anual (Fig. 1), entre el año 2000 y el 2005 (Araya 2000; SEPSA y FAO 2006). De acuerdo con Araya (2000), en Costa Rica el área dedicada al cultivo del frijol ha variado en los últimos años. A partir de 1980 se dio un incremento sostenido, pasando de 23 681 ha a 63 160 ha en el período 1991-1992. Sin embargo, como lo reportan SEPSA y FAO (2006), el área sembrada decreció hasta llegar a reducirse al 50% en el período comprendido entre 1995-1996, debido principalmente, a políticas gubernamentales. Para el lapso agrícola entre el año 1998-1999 la superficie cultivada fue de 36 142 ha. La razón principal de esta disminución radica en que el Estado costarricense implementó políticas de libre comercio, entre las cuales están el eliminar las compras de ciertos productos agrícolas. Estas compras tenían como objeto el garantizar un precio de compra a los productores. Ante la eliminación de esta distorsión de mercado, los productores de frijol se vieron fuertemente afectados y esto se ha reflejado en una disminución del área cultivada y por ende de la producción nacional.

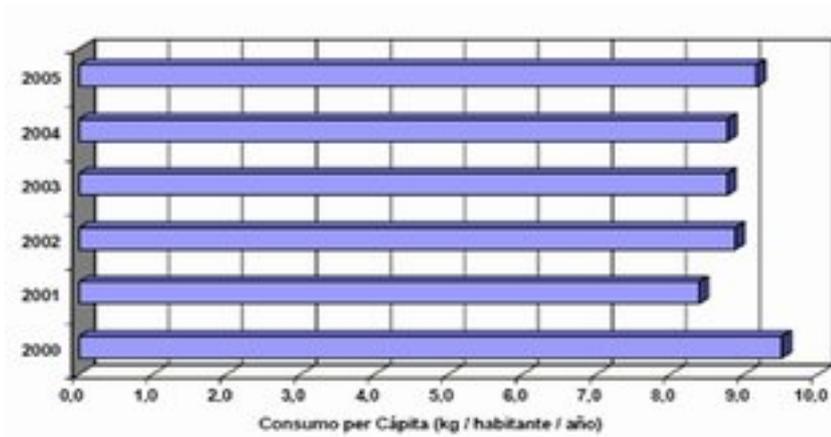


Figura 1. Consumo per cápita de frijoles para Costa Rica (2000-2005). Tomado de SEPSA y FAO 2006.

En Costa Rica, cerca del 90% de la producción está destinada a la venta y el restante 10% es para autoconsumo. La producción se puede clasificar en tres segmentos: i) quienes siembran este producto mayoritariamente para autoconsumo o subsistencia; ii) un segundo segmento destina la mayor parte de su cosecha a fines comerciales, pero consume un pequeño porcentaje de esta y iii) un tercer segmento que dedica su cosecha completamente al mercado. Se estima que el consumo anual de frijol en Costa Rica es de 40 mil TM. De esta cantidad, la producción nacional cubre entre un 30% - 40%. Por tanto, se debe recurrir al mercado internacional para complementar la insuficiente oferta interna (Fig. 2) (SEPSA y FAO 2006).

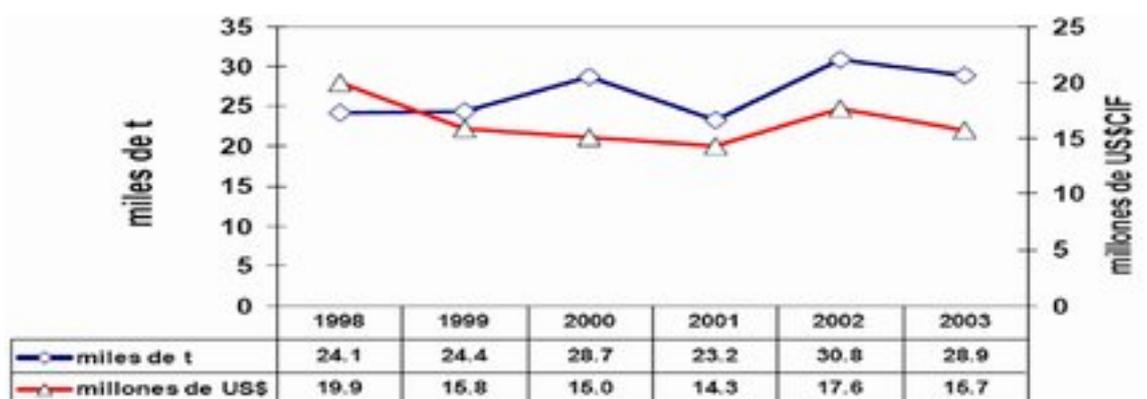


Figura 2. Importación de frijoles negros y rojos a Costa Rica entre 1998 y 2003. Tomado de Salazar (2004).

Costa Rica importa frijol negro desde China, los Estados Unidos, Canadá, Argentina y Chile. China se ha consolidado recientemente como el primer proveedor

de este grano, con una participación que supera la tercera parte del total de importaciones del año 2005. En cuanto al frijol rojo, Honduras y Nicaragua son los principales proveedores. Incluso, dichos países alcanzaron plena participación durante los años anteriores al 2005, cuando China aún no se constituía como un mercado emergente y significativo para el abastecimiento del grano (SEPSA y FAO 2006).

En Costa Rica, la producción de frijol se enfrenta a problemas que lo hacen menos competitivo en relación con otros países productores, tales como disminución del uso de semillas de variedades mejoradas, altos costos de producción, exceso en el laboreo del suelo y la alta dependencia de fertilizantes y agroquímicos. La principal limitación para su producción es la enfermedad fúngica "Mustia hilachosa" (MH) (*Thanatephorus cucumeris*) que se presenta en condiciones húmedas y lluviosas y con temperaturas moderadas y altas. Para esta enfermedad, no existen fuentes de resistencia natural en las variedades comerciales que se siembran en la región centroamericana (MAG 1991; Araya 2000).

En ese sentido, resulta de gran interés, generar variabilidad genética por medio de técnicas biotecnológicas, para la selección y obtención de variedades resistentes a MH. La aplicación de técnicas como el cultivo *in vitro*, la ingeniería genética y/o la mutagenesis, puede ser una valiosa alternativa para el control de enfermedades en esta especie. Así, se puede contribuir al incremento de la productividad del frijol, en condiciones armoniosas con el ambiente y la salud de los agricultores y de esa manera, propiciar un aumento de la competitividad de la producción nacional (MAG 1991).

El frijol negro pequeño es el de mayor consumo; es preferido por un 50% de los consumidores del país, solo un 20% consume frijol rojo y al 30% le es indiferente el color del grano. Dicha preferencia fue inducida por políticas de precios tiempo atrás, la cual terminó por ser una costumbre. Por otra parte, el grano rojo ha tomado más valor debido a una menor oferta (Hernández y Araya 2000; Hernández *et al.* 2001).

Sin embargo, desde el año 2000, la preferencia por el frijol negro se ha venido debilitando, debido probablemente al efecto combinado de la reducción de la cosecha local de frijol negro, diferenciales de precios entre ambos tipos de frijol, y la influencia de la inmigración extranjera, en particular desde Nicaragua. (SEPSA y FAO 2006).

5. Importancia del frijol en Costa Rica

El cultivo de frijol tiene gran importancia económica y social, ya que es producido por pequeños y medianos agricultores. Es parte fundamental de la dieta proteínica de la población, en especial en las zonas rurales donde, por limitaciones económicas, muchas veces el consumo de proteína animal es reducido (MAG 1991; Araya 2000). Se estima que el frijol es la segunda fuente de proteína diaria más importante y la tercera fuente de calorías en el continente africano (Broughton *et al.* 2003)

De acuerdo con Rodríguez y Fernández (2003), el 96.7% de los costarricenses consumen frijoles. Sin embargo, la cantidad y frecuencia con que se emplean ha venido disminuyendo. En el periodo comprendido entre 1966 y 1996 el abastecimiento promedio de frijol pasó de 57g de frijoles/día a un consumo de 31 g por día en 1996. Dicho consumo es menor en la zona urbana (28.1 g/ día) que en la rural (42.9 g/ día).

5.1 Importancia Nutricional del frijol

El frijol juega un papel importante en los requerimientos diarios de magnesio, proteínas, tiamina, hierro y potasio (Fig. 3), pero a pesar de su valioso aporte a la dieta, los folatos y la fibra siguen siendo deficientes en la población costarricense (Rodríguez y Fernández 2003).

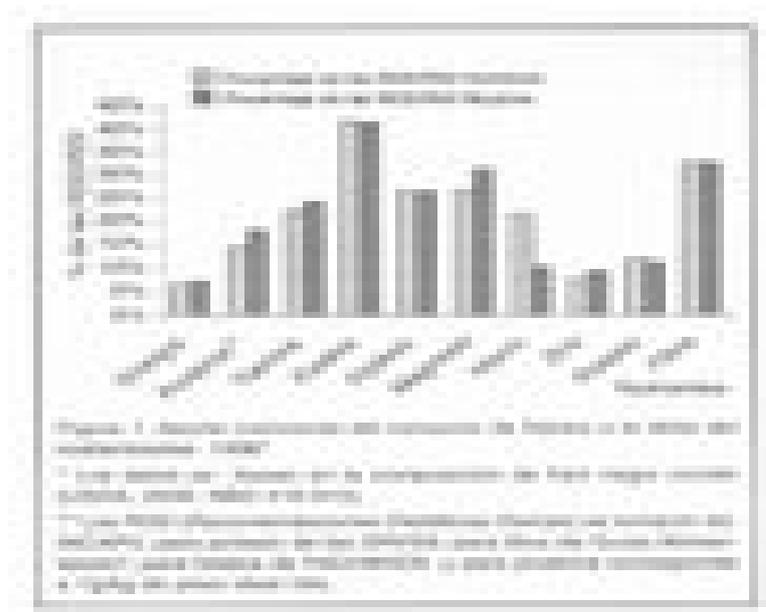


Figura 3. Aporte nutricional diario del consumo de frijoles a la dieta del costarricense, durante en periodo de 1996. Tomado de Rodríguez y Fernández (2003).

Por otro lado el consumo de frijol contribuye a la prevención y tratamiento de patologías como la diabetes y el cáncer, por su aporte de micronutrientes así como por su alto contenido de aminoácidos, taninos, fitoestrógenos, fibra y aminoácidos no esenciales (Rodríguez y Fernández 2003).

6. Variedades de frijol en Costa Rica

Poehlman y Allen (2003) definen una variedad agrícola como un grupo de plantas similares que por sus características estructurales y rendimiento se distinguen de otras variedades dentro de la misma especie.

Entre las variedades que se cultivan en Costa Rica, se encuentran las de grano negro (Brunca y Guaymí) y las de grano rojo (Huetar y Bribri).

6.1 Variedades de grano negro

Brunca: Procede de la línea BAT 304, generada por el programa frijol del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) de Colombia y fue catalogada como nueva variedad en 1982. Actualmente es una de las variedades más cultivadas del país por su precocidad, rendimiento y amplia adaptación (Hernández, en prep.).

Es una variedad de crecimiento indeterminado y postrado, conocido anteriormente como de semi-guía. Su altura es de 45 cm. Una de sus principales características es su gran precocidad, ya que florece entre los 34 y 37 días. Madura a los 66 días y su ciclo de cultivo es de 75 días (MAG 1991).

La flor es de color lila, la semilla es negra opaca y en la madurez, las vainas cambian de color verde a crema claro. Se siembra en las principales zonas frijoleras del país y bajo diferentes métodos como el frijol tapado (las semillas son sembradas y cubiertas con vegetación muerta), el ñespequeö (en un hoyo hecho por una macana, se colocan de una a tres semillas de frijol), en relevo con maíz y semimecanizado. Su rendimiento promedio es de 1 700kg/ha que va a depender del sistema y del manejo agronómico (Hernández, en prep.).

Guaymí: Es una planta arbustiva y semierecta, posee hábito de crecimiento indeterminado arbustivo con buena ramificación y producción de una gran cantidad de vainas. Florece a los 38 días y la maduración ocurre a los 68 días. Su ciclo de vida es de 76 días. El grano es color negro brillante, flor color lila y las vainas son color crema violácea durante la madurez fisiológica.

Presenta una amplia adaptación y se siembra en las principales zonas productoras de frijol del país. Su rendimiento depende del sistema de siembra y el manejo agronómico; a nivel experimental es de 1.667kg/ha y en las fincas de los agricultores es de 1.226kg/ha (Hernández, en prep.).

6.2 Variedades de grano rojo

De acuerdo con Hernández *et al* (2001), la decoloración del grano es una característica no deseable y muy frecuente en variedades de grano rojo, por lo que, la estabilidad en el color del grano de la variedad Bribri bajo diferentes condiciones de manejo, localidades, épocas de siembra y almacenamiento, le han conferido una gran aceptación por parte del agricultor y los comerciantes.

Bribri: La línea MD 23-24 se introdujo y evaluó en Costa Rica entre los años 1996 y 1999 y que dió origen a la nueva variedad de frijol Bribri. La misma fue desarrollada por la Escuela Agrícola Panamericana-Zamorano y se originó de la cruce (RAB 310/XAN 155) X (DOR 391/POMPADOUR G) (Hernández *et al* 2001).

Esta es una variedad arbustiva, para siembra en espeque (tradicional, se da un espaciamiento entre hileras y plantas y con un palo se da forma al hueco donde se siembra la semilla), semimecanizada o en asocio con otros cultivos. Posee amplia adaptación a diversas zonas frijoleras de América Central. Se ha evaluado en altitudes desde los 40m hasta los 1000msnm, en regiones como Upala, Los Chiles, Guatuso, Alajuela, Puriscal, Pérez Zeledón y Buenos Aires (Hernández y Araya 2000).

La planta posee las siguientes características: es un arbusto de crecimiento indeterminado y de porte erecto. El ciclo vegetativo oscila entre 76 y 80 días. El período de floración abarca de 38 a 41 días después de la siembra. La flor es de color blanca. La madurez fisiológica se alcanza entre los 68 y 72 días después de la siembra. El color del tallo es verde en la fase vegetativa y rosado en la etapa madura. En la etapa de madurez fisiológica, las vainas son de color verde durante la etapa de llenado del grano y rosadas de la mitad de la vaina hacia el dorso de la misma. El peso de 100 semillas llega a los 18 o 20 gramos y su color es rojo brillante oscuro (Hernández y Araya 2000; Hernández *et al.* 2001).

En estudios realizados, se encontró que la producción promedio de esta variedad en las fincas de agricultores fue de 972kg/ha, con un máximo de 1930kg/ha. A nivel experimental su producción promedio fue de 939kg/ha, con un máximo de 1811kg/ha. El análisis general de los datos indica que en un 68% de los ensayos, Bribri superó en rendimiento al testigo local y el 48% tuvo una producción similar. En rendimiento promedio superó al testigo nacional en un 17% y al testigo local en un 13,4 %; su producción fue superior en un 8,5% al promedio de rendimiento obtenido en todos los ensayos, además posee tolerancia a enfermedades, especialmente a mustia hilachosa (Hernández y Araya 2000).

Huetar: Esta variedad surge del cruce entre el cultivar criollo México 80-R con la línea BAT 202, realizado en el programa de frijol común del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). La población F2 fue introducida en el país en 1980, en donde se inició el proceso de selección hasta nominarla como nueva variedad en 1982 (Hernández, en prep.)

La variedad es arbustiva, erecta, de porte bajo, con altura de 45cm, precoz y resistente al volcamiento. Posee hábito de crecimiento arbustivo indeterminado. Florece aproximadamente a los 34 días, madura entre los 63 y los 66 días cuando sus vainas toman un color rojo. La maduración es muy uniforme y el ciclo de cultivo es de 75 días (MAG 1991).

El grano es de color rojo opaco de forma alargada ovoidal, la flor color blanco y las vainas al madurar cambian de color verde a color rojo. Se siembra en las principales zonas productoras de frijol del país. A nivel experimental su rendimiento promedio es de 1 528kg/ha. Se puede sembrar bajo condiciones de monocultivo en los sistemas semimecanizado y de espeque (Hernández, en prep.)

7. Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

Una amplia variedad de técnicas de cultivo de tejidos, manipulación genética y biología molecular han sido desarrolladas en varias especies de plantas. Estas técnicas han tenido profunda repercusión en las prácticas agrícolas y en el mejoramiento de la calidad y cantidad de alimentos y plantas cultivables de interés comercial. A estas tecnologías llevadas a cabo en el laboratorio, se les llama biotecnología de plantas. Las bases fundamentales para su aplicación son la capacidad de células y órganos de plantas de desarrollarse en plantas completas

(Simbiosis 2003, Svetleva *et al.* 2003, Valdez *et al.* 2004).

El cultivo de tejidos consiste esencialmente en aislar una porción de la planta (explante) y obtener así células, tejidos u órganos, que se cultivan en condiciones asépticas, en un medio de cultivo de composición química definida y que se colocan en condiciones ambientales controladas de luz, fotoperíodo, temperatura y humedad, adecuadas a la fisiología de la planta. Se pueden obtener diferentes respuestas morfogénicas, dependiendo de la metodología y de los medios de cultivo utilizados. Estos van desde la formación de tejidos organizados (organogénesis) hasta la obtención de embriones somáticos y células embrionarias (Roca y Mroginski 1991).

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica que puede ser aplicada para la obtención y propagación de plantas libres de patógenos; en estudios de genética, ingeniería genética, fisiología, biología molecular, fitopatología, en la bioconversión y producción de compuestos útiles; en el incremento de la variabilidad genética de los cultivos; en la conservación e intercambio de germoplasma; en la obtención de mutantes y plantas haploides (Mroginski y Roca 1991).

Consecuentemente, el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, es una herramienta poderosa y versátil para el estudio de problemas básicos y para la solución de problemas aplicados en el campo de la biotecnología agrícola del frijol.

8. Organogénesis somática

La organogénesis es la producción de brotes adventicios *in vitro* y se refiere al proceso mediante el cual las células y tejidos forman una estructura unipolar llamada primordio, en que el sistema vascular está conectado con el tejido progenitor. La neoformación de plantas mediante este proceso, puede llevarse a cabo de tres maneras: i) producción de órganos adventicios directamente del explante, sin formación de callo; ii) producción de órganos adventicios a partir de un callo derivado de un explante y iii) producción de plántulas a partir de yemas axilares (Dixon 1985; Litz y Jarret 1991). En general, la organogénesis puede subdividirse en dos etapas: i) caulogénesis o formación de brotes, inducida por un medio de cultivo con alta proporción de citoquininas, que genera plántulas sin raíz, y posteriormente ii) el enraizamiento de las mismas al transferirlas a un medio con elevada proporción de auxinas (Dixon 1985).

9. ¿Por qué el uso de la biotecnología para el mejoramiento del frijol?

Existe un considerable interés mundial por el desarrollo de métodos no convencionales de mejoramiento genético en la agricultura, tales como la modificación genética, vía transgénesis o por inducción de mutaciones por irradiación o por métodos químicos. El objetivo es generar plantas tolerantes a factores de estrés biótico (plagas, patógenos, enfermedades) o abiótico (condiciones ambientales adversas) que no pueden ser obtenidas por métodos tradicionales, los cuales pueden utilizar solamente la variabilidad genética disponible en los recursos genéticos primarios de la especie, tales como variedades locales, o especies silvestres relacionadas y reproductivamente compatibles con ella (Chrispeels y Sadava 2003).

El incremento de la producción de frijol se ha debido principalmente a la alta tasa de compuestos químicos aplicados (fertilizantes, herbicidas, pesticidas, o insecticidas), mecanización o prácticas de amelioración. Sin embargo, estas prácticas han generado varios problemas económicos y ecológicos, particularmente contaminación ambiental (Veltcheva *et al.* 2005).

La susceptibilidad a sequías, pestes y enfermedades, así como la baja calidad nutricional, representan un reto en la producción de plantas por técnicas de mejoramiento tradicional (Sánchez *et al.* 2005)

Los métodos de producción tradicional llegan a ser limitados por el bajo potencial de recombinación como resultado de la autopolinización, la baja capacidad hereditaria de algunas características importantes y al aborto de embriones en algunos híbridos interéspecíficos (Veltcheva *et al.* 2005). Tal es el caso de *Phaseolus*, cuya producción es limitada y susceptible a muchos patógenos, incluyendo varios virus, hongos y bacterias (Mohamed *et al.* 2006)

Las distintas técnicas biotecnológicas ofrecen una alternativa para superar dichas limitaciones y guiar al mejoramiento del frijol en varios campos: i) aumentando la resistencia o tolerancia a plagas y enfermedades y a factores ambientales estresantes, ii) mejorando la calidad de la semilla y la arquitectura de la planta y iii) cambiando el modo de producción (Veltcheva *et al.* 2005).

Para utilizar exitosamente la gran variedad de aplicaciones biotecnológicas disponibles en mejoramiento genético, se requiere contar con metodologías de regeneración de plantas a partir de células somáticas generadas por cultivo *in vitro*. De otra manera, se obtendrían plantas modificadas genéticamente, pero de

naturaleza "quimérica" o genéticamente heterogéneas. Sin embargo, la morfogénesis *in vitro* aún no ha sido establecida de manera exitosa y repetible para una gran cantidad de especies cultivadas, tales como el frijol común (*P. vulgaris* L.). Esta especie es bastante recalcitrante en su respuesta morfogénica a los diversos métodos de cultivo *in vitro*, por lo que pocos grupos en el mundo han logrado desarrollar procedimientos exitosos de regeneración de plantas (Zambre *et al.* 1997; Roca *et al.* 1998).

La producción de brotes y la regeneración de plantas en *Phaseolus* bajo condiciones de cultivo *in vitro* ha sido descrita por autores como Malik y Saxena (1991), Aragão y Rech (1997) y Mohamed y colaboradores (2006), sin embargo la frecuencia de brotes obtenidos es aún limitada, 4-8 brotes por explante. (Ahmed *et al.* 2002).

Muy pocos laboratorios en el mundo, particularmente en Brasil, han desarrollado procedimientos exitosos de cultivo *in vitro* y regeneración de plantas para variedades de frijol de origen andino (Broughton *et al.* 2003). Pero a pesar del éxito esporádico con transformación genética, las especies de *Phaseolus* son aún consideradas recalcitrantes para el cultivo *in vitro* y transformación (Zambre *et al.* 1997; Mohamed *et al.* 2006).

10. Estudios en biotecnología del frijol

Veltcheva *et al.* (2005) manifiestan que Kueneman en 1976 obtuvo resultados preliminares en regeneración de cultivo de meristemos en *P. vulgaris*. Además, mencionan que Kartha y colaboradores en 1981 investigaron el proceso de regeneración de plantas a partir del cultivo de meristemos en algunas de las más importantes legumbres, para la crioconservación del germoplasma, utilizando un medio complementado con varias concentraciones de BAP. El BAP es una citoquinina, empleada en los medios de cultivo, para estimular la división celular (junto con otras auxinas) y reactivar la actividad de los brotes laterales. También induce la formación de brotes adventicios (Gaspar *et al.* 1996).

Malík y Saxena (1991) argumentan que en el primer reporte de regeneración de esta especie, sólo dos plantas fueron regeneradas en un medio que contenía extracto de semilla de frijol en una composición no definida. Además, Aragão y Rech (1997) mencionan que en 1992 Mohamed y colaboradores, investigaron los efectos del BAP en la proliferación de brotes en ejes embrionarios del frijol común y el frijol

Therapy en Mesoamérica. Sus resultados demostraron inducción prolífica de brotes múltiples. En un estudio realizado por Mohamed *et al.* (2006), en *P. angularis*, para promover el desarrollo de yemas y la inducción de brotes múltiples, los brotes adventicios fueron mantenidos en un medio de multiplicación que consiste en sales MS (Murashige y Skoog 1962), vitaminas B5 y suplementado con 5 μ M de BAP.

En 1993, Russell y colaboradores obtuvieron las primeras plantas transgénicas de frijol común vía descarga eléctrica de partículas recubiertas de ADN, aunque a muy bajas frecuencias de regeneración (0.03%). En Brasil, Aragão *et al.* (1996), lograron regenerar plantas transgénicas de frijol de la variedad andina òOlatheö a una frecuencia promedio de 0.9%. En este caso, se indujo la formación de brotes a partir de los meristemos apicales de ejes embrionarios bombardeados con micro proyectiles, impulsados por helio.

Aragão y Rech (1997) encontraron varios aspectos anatómicos que inciden en la baja frecuencia de regeneración de plantas transformadas de frijol. Esto se logró con el examen de la morfología de los ápices meristemáticos de 17 cultivares andinos de tipo òCariocaö y òJaloö. En algunos cultivares la región del meristemo apical está parcialmente o bastante recubierta por los primordios foliares, lo que dificulta la penetración de los micro proyectiles cubiertos de ADN por biobalística. En aquellos cultivares donde el grado de exposición del meristemo apical fue de 100%, lograron inducir múltiples brotes e incrementar la frecuencia de regeneración de plantas transgénicas a partir de los meristemos apicales bombardeados.

Por otro lado, Albino (2005) desarrolló un método alternativo para la regeneración *in vitro* del frijol, que generó plantas vía organogénesis a partir de callos inducidos del cultivo de yemas apicales de ejes embrionarios de la variedad brasileña òOlathe Pintoö. Este es un procedimiento bastante eficiente de regeneración *de novo* de plantas fértiles de frijol, donde se generaron unas 8 plantas enraizadas por callo, empleando 0.5mg/l de thidiazuron (TDZ) y 0.25mg/l de ácido indolacético (AIA). Los análisis histológicos confirmaron una neoformación de plantas vía organogénesis. Este procedimiento experimental está siendo utilizado para obtener plantas transformadas de frijol por el grupo de investigadores de los laboratorios de EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) en Brasil.

En el caso de estudios morfológicos e histológicos es poco lo que se ha realizado con el frijol. Contreras *et al.* (2001) realizaron observaciones con microscopía

electrónica de transmisión en hojas de *P. vulgaris* inoculadas con *Xanthomonas axonopodis* pv. Phaseoli para visualizar los cambios ocurridos a nivel celular en la epidermis, mesófilo y tejido vascular. Otro estudio realizado con estigmas de *P. vulgaris* silvestres y cultivadas, describió la histología y micromorfología de la región estigmática (Cajal *et al.* 2004).

Por otra parte, García y Madríz (1999) estudiaron la anatomía de la lámina foliar en 5 genotipos de frijol mungo: var. 'Criolla', 'VC1973A', 'VC2764B', 'NM94' y 'CHUN NAM 4', a fin de aportar información histológica de posible utilidad para la delimitación genotípica a nivel intraespecífico y para una mejor interpretación de algunos aspectos de su comportamiento agronómico. Los resultados obtenidos revelaron una histología bastante homogénea en los 5 genotipos investigados, observándose diferencias con respecto a las variables anatómicas cuantitativas: densidad de estomas, densidad de tricomas y grosor de la lámina foliar.

A nivel mundial, las investigaciones realizadas para el mejoramiento del frijol, se centran principalmente en los *consortium*, dentro de los cuales se encuentran: el *consortium* Belga (IPBO/B) que desarrolla estudios de transformación genética, *consortium* Brasil (LCV/UFPE) que trabaja con mapas físicos basados en citogenética de *P. vulgaris* y el *consortium* CIAT en Colombia (Broughton *et al.* 2003).

OBJETIVOS

Objetivo general:

Realizar estudios morfológicos e histológicos del desarrollo ontogénico del eje embrionario de cuatro variedades costarricenses de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L. var. Bribri, Guaymí, Huetar y Brunca) que permitan optimizar el proceso morfogénico y la regeneración de plántulas bajo condiciones de cultivo *in vitro*.

Objetivos específicos:

1. Describir morfológica e histológicamente los embriones cigóticos de cuatro variedades costarricenses de frijol, utilizando técnicas de microscopía de luz y microscopía de barrido (MEB).
2. Determinar el área de exposición y la cobertura del meristemo apical en las cuatro variedades de frijol costarricenses, utilizando microscopia electrónica de barrido.
3. Determinar la concentración óptima de N⁶-bencilaminopurina (BAP) para la inducción de brotes en las cuatro variedades costarricenses de frijol.
4. Describir, mediante MEB, el desarrollo ontogénico de los brotes generados en los medios de cultivo complementados con la dosis adecuada de BAP en las cuatro variedades costarricenses de frijol.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización experimental

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología y Transformación Genética de Plantas, en el Laboratorio de Microtécnicas de la Escuela de Biología y en el Centro de Investigación de Estructuras Microscópicas (CIEMIC) de la Universidad de Costa Rica.

Material vegetal

Se utilizaron embriones cigóticos de las variedades costarricenses de frijol común: Guaymí, Bribri, Huetar, y Brunca, fueron suministradas por la Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno de la Universidad de Costa Rica.

Desinfección del material vegetal

En la cámara de flujo laminar, las semillas se colocaron en etanol al 70 % v/v por 1 min, y se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Posteriormente, se agregaron 100 ml de hipoclorito de sodio (NaOCl, 5. 25% i.a.) al 1% con tres gotas de Tween 20, y se agitaron por 20 min. Las semillas se lavaron tres veces con agua destilada estéril, y se colocaron por 16-18 h en agua destilada estéril.

Transcurrido el tiempo de remojo, en la cámara de flujo laminar se procedió a extraer los ejes embrionarios de las semillas. Para eso se abrió cada semilla por la mitad y se desprendió el eje embrionario de los cotiledones. Una vez extraídos, los primordios fueron removidos con ayuda del bisturí, dejando expuesto el meristemo apical. Subsecuentemente, se cortó una pequeña porción de la parte posterior del eje embrionario. Por último, los ejes embrionarios se colocaron en 20 ml de NaOCl al 0,1% por 10 min y se lavaron tres veces con agua destilada estéril.

Cultivo de los ejes embrionarios

Los ejes embrionarios desinfectados se cultivaron en frascos de vidrio tipo Gerber (4 explantes/frasco) conteniendo 25 ml de medio MS, complementado con 5 diferentes concentraciones de BAP (0.0, 5.0, 7.5, 10.0 y 12.5 mg l⁻¹), 3 % de sacarosa y 0.8 % de agar (Sigma), a un pH 5.8. El medio se autoclavó por 15min a 1,5 libras de presión y 121 °C. Los ejes embrionarios se cultivaron a 26 °C con un fotoperíodo de 12 h luz aproximadamente a 2500 lux. Transcurridas 2 semanas, todos los ejes

embrionarios cultivados en los tratamientos con BAP se transfirieron a un medio MS sin reguladores de crecimiento.

Para determinar la concentración adecuada de BAP en cada una de las variedades de frijol, se realizaron evaluaciones semanales, durante 5 semanas. Se determinó el número de brotes, la presencia de raíz, presencia de callo y oxidación de los brotes.

Los resultados se analizaron estadísticamente a la segunda y quinta semana. Se escogieron estas dos semanas por ser la segunda semana cuando se realizó el subcultivo de los explantes y se cortó la parte más distal del eje embrionario donde se da la formación de callo y oxidación y la quinta semana por ser la última que se procedió a la toma de datos.

Nuevamente, se realizó cultivo *in vitro* para ratificar los datos obtenidos en la primera fase del estudio, pero esta vez se procedió a utilizar solamente la concentración de BAP seleccionada como óptima. Se determinó el número de brotes, oxidación, formación de callo, formación de raíz y número de raíces. Se tomó una n: 10, se analizó estadísticamente en la segunda y quinta semana desde el inicio de cultivo.

Se utilizó el programa estadístico Infostat (v.1.1), se empleó un análisis de varianza con el test: Tukey. Además, se determinó el promedio y el error estándar.

Microscopia electrónica de barrido (MEB)

Los ejes embrionarios previamente desinfectados y extraídos de las semillas o que fueron recolectados en cada una de la toma de muestras, se fijaron en solución de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 2 h a 4 °C. Las muestras se lavaron tres veces por 15 min con una solución amortiguadora de fosfatos de sodio (pH 7,4). Se posfijaron durante una hora en tetraóxido de osmio al 1% en amortiguador de fosfatos, posteriormente se efectuaron tres lavados de 15 min cada uno con agua destilada, se deshidrataron en una serie ascendente de etanol (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% y 100%) y seguidamente se realizaron cuatro cambios con alcohol terbutílico (Mallinckrodt) para ser secados por sublimación. Por último, los ejes embrionarios se montaron sobre bases de aluminio de 15 mm, con el meristemo apical dirigido hacia arriba y se cubrieron en un cobertor iónico (Giko 1B-3) con una capa de oro de 40 nm de grosor. Las observaciones se llevaron a cabo con un microscopio electrónico de barrido (MEB) Hitachi S-570 que se operó a 15KV.

Exposición y cobertura del meristemo apical a los 0 días de cultivo

Para determinar el área de exposición y cobertura del meristemo apical, se emplearon 50 ejes embrionarios de cada una de las variedades estudiadas. Una vez extraídos los ejes embrionarios a los 0 días y ser tratados mediante la técnica de MEB, se procedió a determinar la parte expuesta dibujando cada uno de los domos apicales que son proyectados en la pantalla del microscopio de barrido empleando filminas y marcador permanente y a una misma magnificación y ángulo de inclinación. Una vez dibujados, con ayuda de una regla dividida en cm., y que tiene incorporada la medida de radio para determinar el área de un círculo mediante la fórmula $A= r^2$, suponiendo que el domo es circular; esta medida se tomó como el área total del domo del eje embrionario y el área de cobertura se determinó entre la diferencia entre el área total y el área que fue dibujada (área de exposición).

Para determinar el área de exposición, los domos que fueron dibujados se recortaron y empleando el medidor de área foliar, se determinó el área.

Toma de muestras para microscopia electrónica de barrido

Una vez definida mediante cultivo *in vitro* la concentración óptima de BAP en cada una de las cuatro variedades de frijol, se realizó la descripción morfológica mediante microscopia de barrido. Para esto, se tomaron muestras durante las 5 semanas de observación. Durante las dos primeras semanas de cultivo, se recolectaron 5 muestras a los 0, 1, 4, 8 y 12 días. Luego de las dos semanas, los ejes embrionarios se transfirieron a un medio MS libre de reguladores de crecimiento y se procedió a la toma de 5 muestras una vez a la semana, durante las tres últimas semanas de evaluación.

Técnicas histológicas

Para la descripción histológica de los meristemos apicales de las cuatro variedades de frijol se utilizaron dos tipos de técnicas histológicas: la técnica para microscopia de luz que se empleó para el material a los 0 y 8 días de cultivo y la microscopia óptica de alta resolución (MOAR) para describir el material a los 8 días de cultivo.

Se hicieron cortes transversales y longitudinales el número de brotes el número de brotes y se tomaron las fotografías de las diferentes estructuras de los ejes embrionarios. Los cortes realizados con ambas técnicas, se observaron en un

microscopio de luz invertido (Olympus IX50).

a. Técnica para microscopía de luz

Los ejes embrionarios se fijaron por 18 h en una solución de formalina-acetato-alcohol al 50% v/v (FAA). Posteriormente, se deshidrataron en una serie de alcohol butílico terciario (ABT) a diferentes concentraciones (Cuadro 2). Luego, se infiltraron desde el ABT a la parafina (Merck) de forma gradual como se indica a continuación: 1) xilol por 30min, 2) xilol-parafina (1:1) por 1 h, 3) parafina pura 3 h y se colocaron en el horno y 4) posteriormente se hace un último cambio de parafina pura por 30min y se dejó en el horno. Después de este proceso la parafina líquida, se pone en moldes y se orienta el eje embrionario según el corte requerido y se dejó polimerizar a temperatura ambiente (24°C-25°C).

Cuadro 2. Concentraciones y tiempo requerido por el alcohol butílico terciario (ABT) para la deshidratación del material vegetal.

Tipo de alcohol	Concentración empleada (%)	Tiempo requerido (h)
A. B. T	50	2
A. B. T	70	Toda la noche
A. B. T	80	2
A. B. T	85	1
A. B. T	90	1
A. B. T	95	1
A. B. T	100	Toda la noche
A. B. T	100	2-4
A. B. T	100	2-4

Después de este proceso, se obtuvieron cortes con un grosor aproximado de 5-7 µm utilizando un micrótopo rotatorio (Reichert) y una cuchilla de acero inoxidable, se montaron en portaobjetos con ayuda del adhesivo Haupt (1g gelatina Knox, 100ml agua destilada 30°C, 2g fenol y 15ml glicerina pura) y solución flotadora (formalina al 4%), posteriormente, se tiñeron con las soluciones que se indican en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Soluciones y tiempo requerido para teñir el material vegetal, para ser observado al microscopio de luz.

Solución empleada	Tiempo requerido (min.)
Xilol	10
Xilol	10
Alcohol 95%	3
Alcohol 70%	3
Safranina (2.25g safranina en 225 ml alcohol etílico 95°)	24 h
Alcohol 50%	3
Alcohol 70%	5
Alcohol 95%	3
Fast-green (0.1% o 0.2% en alcohol absoluto)	15 s
Alcohol absoluto	3
Xilol	3
Xilol	3

b. Microscopía óptica de alta resolución (MOAR)

Los ejes embrionarios se fijaron en solución de Karnovsky (Karnovsky 1965) por 2h a 4 °C. Las muestras se lavaron tres veces por 15 min con una solución amortiguadora de fosfatos (pH 7,4). Se posfijaron durante una hora en tetraóxido de osmio al 1% y posteriormente se efectuaron tres lavados de 15 min cada uno con agua destilada. Luego, se deshidrataron en una serie ascendente de acetona (30%, 50%, 70%, 90%, 100%, 100% y 100%). Seguidamente, se colocaron en una mezcla 1:1 acetona y resina Spurr dureza media (Bozzola y Russell 1991)) por 5h, y luego se infiltraron en resina pura por 5h. Transcurrido este lapso, se realizó la inclusión y polimerización de las muestras en una estufa a 70 °C. Se realizaron cortes con grosor entre 100-250nm utilizando un ultra micrótopo (Power tome PC). Luego los cortes se tiñeron con azul de toluidina y se observaron y fotografiaron utilizando el microscopio invertido.

Desarrollo ontogénico del eje embrionario cigótico en condiciones *ex vitro*

Para cada una de las variedades de frijol, se colocaron semillas en tierra estéril. Estas semillas se pusieron en las mismas condiciones en las que se encontraba el material cultivado *in vitro*, a 28 °C con un fotoperíodo de 12 h luz.

Para realizar la observación en MEB, se extrajeron los ejes embrionarios a los 0, 1, 4, 8 y 12 días, recolectando por día, 5 ejemplares de cada variedad. También, se realizaron comparaciones con los ejes embrionarios cultivados en los diferentes tratamientos con y sin BAP *in vitro*. Además, se realizaron observaciones semanales del crecimiento de las plántulas de frijol para cada una de las variedades. Se determinó presencia de raíz, el número de brotes y el color del brote.

RESULTADOS

Exposición y cobertura del meristemo apical a los 0 días de cultivo

Con el fin de determinar el área de exposición y cobertura del meristemo apical, se analizaron 50 ejes embrionarios de cada una de las variedades Brunca, Guaymí, Huetar y Bribrí por microscopía electrónica de barrido. Los resultados obtenidos indican que el porcentaje de ápices donde el meristemo apical está completamente expuesto (100%) sigue el siguiente patrón: Brunca (37%) > Guaymí (26%) > Huetar (16%) > Bribrí (8%).

Igualmente, la variedad Guaymí presenta el mayor porcentaje de exposición del área del meristemo apical (79%), seguida por la variedad Brunca (73%), Huetar (72%) y Bribrí (60%).

En las micrografías de los meristemos apicales de las variedades Brunca (Fig. 4A), Guaymí (Fig. 4B), Huetar (Fig. 4C) y Bribrí (Fig. 4D) se observó claramente el ápice caulinar. Rodeando al domo se observan los primordios foliares.

Análisis ultraestructural del desarrollo de los ejes embrionarios sin BAP (control) de las cuatro variedades de frijol a través del tiempo.

Las cuatro variedades al día 0 presentaron casi en su totalidad un domo expuesto, la epidermis es más irregular en el extremo comparado con la parte inferior del mismo (Fig. 4).

En la epidermis del eje embrionario, se observó zonas con hundimientos, los que podrían corresponder posiblemente a áreas de origen de los estomas (Fig. 5). Sin embargo, también se observaron protuberancias en la epidermis, que corresponden a estomas, éstos se observaron asentados en estructuras coniformes (Fig.6). Estas protuberancias se encontraban en menor número y siempre en el hipocótilo del eje embrionario.

Al realizar cortes transversales se pudo diferenciar las diferentes capas; epidérmica, células parénquimáticas (corteza y de medula), el cilindro vascular así como la capa cuticular (Fig. 7). En la variedad Bribrí, entre las células parénquimáticas se notó los espacios intercelulares y se logra apreciar la capa epidérmica de forma más alargada (Fig. 8 y 9). Las células parénquimáticas son de

reserva por la gran cantidad de almidón presente (Fig. 10)

Al día 1 de crecimiento se observó el extremo apical que contiene el ápice caulinar. Se observaron las papilas epidérmicas que cubren toda la estructura (Fig. 11). La epidermis de los domos, para las cuatro variedades, son células irregulares en su extremo más definidas y regulares en la parte inferior (Fig. 12) El epicótilo presentó papilas cubiertas con cera cuticular en muchos casos y con estructuras que puede ser el origen de los tricomas o de los estomas (Fig. 13).

El crecimiento de los primordios foliares fue muy evidente conforme el desarrollo ontogénico del eje embrionario. Al día 4, se observó la presencia de estructuras globosas y/o elongadas, las cuales envuelven el ápice. Las papilas que componen la epidermis son muy conspicuas y en los primordios de mayor edad se observaron diferentes grados de desarrollo de tricomas unicelulares y pluricelulares (Fig. 14). Se observó el cilindro vascular, se distingue por un halo central. También se logró diferenciar dos tipos de células, unas medianas las cuales se tratan de las células del parénquima de corteza y las más grandes que corresponden a las del parénquima de médula (Fig. 15). Es a partir de este día que aparece por primera vez el floema y el xilema (Fig. 16), en donde se presentaron en todas las variedades analizadas los elementos de los vasos con ornamentación de las paredes laterales secundaria en forma helicoidal (Fig. 16 A). También se observaron puntuaciones de la pared lateral tipo alterna (Fig. 16 B).

A los 8 días de crecimiento, se observó tricomas y estomas más desarrollados, se notaron estructuras muy jóvenes de forma globosa y otras estructuras más elongadas de bases anchas. Se observó como estas hojas jóvenes van adquiriendo la forma de la hoja madura (Fig.17 y 18). También es más evidente un mayor número de estomas en las superficies de las hojas.

Al día 12, se observó la formación del brote apical. Además, el crecimiento y volumen de las hojas jóvenes aumenta (Fig. 19), dando origen a las hojas maduras, con una vena central prominente y venas laterales. Es evidente un mayor número de tricomas, en la superficie de las hojas se observó mayor cantidad de estomas.

Los estomas presentes en las cuatro variedades son los paracíticos a diferentes niveles, solo Bribí presento estomas hundidos y sólo en Brunca se observó anomocíticos, mientras que las cuatro variedades presentan al mismo nivel y proyectándose hacia fuera (Fig. 20)

Entre los tipos de tricomas encontrados, se encuentra: los largos simples unicelulares, los globosos cortos pluricelulares y los simples cortos unicelulares y puntiagudos (Fig. 21)

Efecto del BAP en el crecimiento bajo condiciones *in vitro*

Se determinó el número promedio de brotes formados en Bribri, Brunca, Guaymí y Huetar, a través del tiempo, estimándose esta característica a partir de la tercera semana hasta la quinta semana de cultivo en medio MS complementado con 5 mg l^{-1} de BAP. Se observó un incremento en el número de brotes al transcurrir el tiempo de cultivo en las diferentes concentraciones y en las cuatro variedades estudiadas. La variedad Huetar a la tercera semana de cultivo, presentó un promedio de brotes inferior a 1 al someterla a las concentraciones de 10.0 y 12.5 mg l^{-1} de BAP. En el control (0.0 mg l^{-1} de BAP) en todas las variedades se dió la formación de solo 1 brote y este se mantuvo a lo largo del tiempo (Fig. 22-25).

En el Cuadro 4 se muestra el promedio de brotes producidos por los ejes embrionarios de las cuatro variedades en las diferentes concentraciones de BAP, a la quinta semana de cultivo. Se determinó que al usar el BAP la mayor cantidad de brotes se obtuvo al utilizar 5 mg l^{-1} a excepción de la variedad Huetar, la cual fue a 12.5 mg l^{-1} (Fig. 26-30).

Cuadro 4. Promedio de brotes a la quinta semana, producidos en los ejes embrionarios de Bribrí, Brunca, Guaymí y Huetar sometidos a las diferentes concentraciones de BAP.

Variedad	Concentración de BAP (mg l ⁻¹)				
	0	5	7.5	10	12.5
Bribrí	1 ± 0	2.26 ± 0.27 AB	1.88 ± 0.16 AB	2.23 ± 0.33 AB	1.89 ± 0.23 AB
Brunca	1 ± 0	2.66 ± 0.18 A	1.94 ± 0.20 AB	2.38 ± 0.25 A	2.44 ± 0.26 A
Guaymí	1 ± 0	1.73 ± 0.15 B	1.67 ± 0.15 B	1.47 ± 0.15 B	1.50 ± 0.19 B
Huetar	1 ± 0	2.53 ± 0.22 A	2.53 ± 0.21 A	2.46 ± 0.19 A	2.69 ± 0.2 A
p		0,0121	0,0077	0,0100	0,0025
R ²		0,07	0,08	0,07	0,10

Estadísticamente, si se compara entre tratamientos para cada una de las variedades, Brunca (p= 0,1774), Bribrí (p= 0,5656), Guaymí (p= 0,5890) y Huetar (p= 0,8963), se demuestra que no existen diferencias significativas (Fig. 31-34). Por lo tanto, se determinó el tratamiento de 5 mg l⁻¹ como el más efectivo, basándose solamente en el promedio de brotes cuantificables. Se eliminó del análisis estadístico el control, ya que se espera la formación de un brote.

Cuando se analizó estadísticamente entre variedades para cada uno de los tratamientos empleados, todos fueron significativos (Cuadro 4, ver columnas), la variedad Bribrí en todos los tratamientos compartió semejanza con las demás variedades estudiadas. Se demuestra como en este caso en cada uno de los tratamientos si se compara las variedades si es estadísticamente significativo.

Otra variable que se cuantificó fue la presencia o ausencia de oxidación en el eje embrionario. En Bribrí, los ejes embrionarios se oxidaron en las diferentes dosis de BAP utilizadas entre un 97% a un 100% a la segunda semana, mientras que en la quinta semana la oxidación fue gradual conforme aumentó la dosis de BAP, a excepción del control que presentó 100% de oxidación (Fig. 35).

De acuerdo al ANOVA utilizando las diferentes concentraciones de BAP para la

segunda semana, no se observaron diferencias significativas ($p=0.6015$), sin embargo, a la quinta semana si se observaron diferencias significativas ($p\leq 0.0001$), donde el control es estadísticamente diferente en todas las concentraciones utilizadas, y el menor porcentaje de oxidación se observó al utilizar una concentración de 5 mg l^{-1} de BAP obtuvo menor porcentaje de oxidación.

Para la variedad Guaymí, a la segunda semana de cultivo, todos los tratamientos causaron entre un 97% a un 100% de oxidación en los ejes embrionarios. Para la quinta semana, al igual que Bribrí conforme se aumentó la concentración de BAP se obtuvo mayor oxidación, excepto el tratamiento que corresponde a 12.5 mg l^{-1} de BAP que fue ligeramente menor al correspondiente a 10 mg l^{-1} (Fig. 36).

Al realizar el ANOVA, se determinó que para la segunda semana no se obtuvieron diferencias significativas ($p= 0.4540$) comparado con la quinta semana, donde si se obtuvieron diferencias ($p=0.0286$). Se observaron tres grupos, uno correspondiente al control, el segundo a 5 mg l^{-1} de BAP con menor oxidación y el tercer grupo que comprende las demás concentraciones, las cuales comparten similitud con 0 y 5 mg l^{-1} .

Para la variedad Brunca, a la segunda semana de cultivo los porcentajes de oxidación oscilaron entre 78%-94%. A la quinta semana, estos valores se mantuvieron constantes a diferencia del tratamiento de 5 mg l^{-1} de BAP que descendió drásticamente de 94% en la segunda semana a un 25% al final de la evaluación (Fig. 37).

Según el ANOVA, en la segunda semana no se obtuvieron diferencias significativas ($p=1063$), al contrario a la quinta semana se observaron diferencias significativas ($p\leq 0.0001$), donde la concentración correspondiente a 5 mg l^{-1} es diferente a las demás concentraciones.

Por último, para Huetar a la segunda semana al igual que Brunca, los valores varían entre 63%-98%, siendo el control el que presenta menor oxidación y 5 mg l^{-1} BAP la mayor oxidación. En la quinta semana, la oxidación en las concentraciones de 5 y 7.5 mg l^{-1} BAP se redujo drásticamente, mientras que en las demás se mantuvo constante (Fig. 38).

El ANOVA muestra como en la semana dos y cinco se obtuvo diferencias significativas ($p=0.0001$) y ($p=0.0009$) respectivamente.

De los datos analizados, comparando entre tratamientos, entre variedades y la interacción de ambos análisis con respecto a la oxidación, se obtiene un resultado

significativo ($p < 0.0001$). Entre las variedades Bribrí y Huetar, el comportamiento observado es similar, pues presentan valores similares de oxidación, de igual forma pasa en las variedades Brunca y Guaymí.

Entre los diferentes tratamientos, los resultados obtenidos son variables salvo la concentración de 12.5 mg l^{-1} , que exhibe un comportamiento similar a la concentración de 0 mg l^{-1} por un lado y con 10 y 7.5 mg l^{-1} por otro lado. En cuanto a la interacción entre estas variables, un grupo aparte lo forma Brunca 5 mg l^{-1} , esto se debe al 25% de oxidación que se obtuvo en este tratamiento.

Con respecto a los análisis anteriores se concluyó que la concentración óptima para formar los brotes corresponde a la de 5 mg l^{-1} de BAP.

En el segundo experimento donde se realizó el cultivo de los ejes embrionarios, la variedad Brunca presenta mayor promedio de brotes con 2.40 ± 0.37 por explante y 4.10 ± 0.48 en la segunda y quinta semana respectivamente (Cuadro 5). Lo anterior confirma lo obtenido en el primer cultivo de los ejes embrionarios, donde la variedad Brunca a la quinta semana presenta mayor número de brotes y Guaymí con $1,50 \pm 0,22$ es el que presenta menos brotes.

Cuadro 5. Promedio de brotes a la segunda y quinta semana de observación empleando 5 mg l^{-1} de BAP en cada una de las variedades.

Variedad	Semana dos	Semana cinco
Huetar	$1.10 \pm 0.28 \text{ B}$	$2.00 \pm 0.37 \text{ B}$
Guaymí	$1.60 \pm 0.27 \text{ AB}$	$1.50 \pm 0.22 \text{ B}$
Brunca	$2.40 \pm 0.37 \text{ A}$	$4.10 \pm 0.48 \text{ A}$
Bribrí	$0.90 \pm 0.35 \text{ B}$	$1.86 \pm 0.34 \text{ B}$
P	0,0098	<0,0001
R ²	0,27	0,49

Estadísticamente, a la semana dos entre variedades existen diferencias significativas ($p = 0.0098$), al igual en la quinta semana se observaron diferencias

significativas ($p < 0.0001$), donde Brunca es estadísticamente diferente a las otras variedades (ver letras Cuadro 5).

En cuanto a la oxidación, tanto en la semana dos como en la cinco, la mayor oxidación se presentó en la variedad Bribri con 50% y 100% respectivamente (Fig. 39 y 40). Estadísticamente, a la segunda semana no hay diferencias significativas entre las variedades ($p = 0.2801$), sin embargo a la quinta semana si hay significancia ($p = 0.0053$).

Para el caso de formación de callo, en la segunda semana Huetar, Guaymí y Brunca presentó un 100% y Bribri solo un 50% lo formaron. Por su parte, Guaymí en la quinta semana presentó mayor porcentaje (60%), mientras que para Bribri no se formó callo (Fig. 41 y 42).

De igual manera, para la formación de raíz, Guaymí en la segunda semana presentó un mayor porcentaje de raíz (80%) y Huetar fue la que presentó menos porcentaje de plántulas que la formaron (10%). En la quinta semana Guaymí, Brunca y Bribri todas las plántulas formaron raíz y solo un 60% formaron raíz en Huetar (Fig. 43 y 44). Estadísticamente, a la semana dos se encontró diferencias significativas para formación de callo ($p = 0.0001$) y raíz ($p = 0.0055$). A diferencia de la semana cinco para la variable formación de callo no se encontró diferencia alguna ($p = 0.0767$). Por su parte el dato correspondiente a raíz si fue significativo ($p = 0.0041$), donde Huetar es diferente a las otras variedades.

Lo anterior se ratifica con el número de raíces presentes en las plántulas, donde Huetar presentó 2.20, Brunca 4.5, Guaymí 6,5 y Bribri 4.14 raíces por explante (Fig. 45). Se observaron diferencias significativas en el número de raíces entre las variedades ($p = 0.0013$) en la semana cinco de observación.

Análisis de la formación de brotes utilizando MEB.

Se utilizó una concentración de 5 mg l^{-1} BAP para las cuatro variedades estudiadas. Haciendo uso de MEB, se determinó el promedio de brotes apicales a los doce días de observación (se escogió este día por ser el periodo en que se observó claramente los brotes formados), obteniéndose un mayor promedio en la variedad Brunca con 3.60 ± 0.24 brotes (cuadro 6) coincidiendo con lo encontrado en el cultivo *in vitro*. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas ($p = 0.1053$) entre las cuatro variedades a los doce días de cultivo (ver letras en cuadro 6).

Cuadro 6. Promedio de brotes apicales a los doce días de cultivo, empleando MEB y 5 mg l⁻¹ de BAP en las cuatro variedades de frijol estudiadas.

Variedad	Brotes apicales
Huetar	2.40 ± 0.51 A
Guaymí	2.20 ± 0.58 A
Brunca	3.60 ± 0.24 A
Bribrí	3.40 ± 0.40 A
p	0,1053
R ²	0,31

Del mismo modo, se determinó el promedio de brotes laterales presentes a la quinta semana de cultivo (a los 37 días) y se observó un mayor número de brotes en la variedad Huetar (1 ± 0.45), mientras que la variedad Guaymí no presentaron brotes laterales (Fig. 46). Al realizar análisis estadístico no presento diferencias significativas (p= 0.2174).

Análisis ultraestructural del desarrollo de los ejes embrionarios empleando BAP en las cuatro variedades de frijol a través del tiempo.

La morfología de los ejes embrionarios para las cuatro variedades de frijol cultivados en un medio complementado con 5 mg l⁻¹ de BAP, muestra el meristemo apical, un vástago compuesto por los primordios jóvenes que sobresalen al lado del domo, (Fig. 47). Al cuarto día de cultivo, se apreció hojas jóvenes que cubren los brotes que empiezan a formarse (Fig. 48).

En el octavo día de cultivo, el domo apical está cubierto por gran cantidad de hojas jóvenes con tricomas en la superficie abaxial (Fig.49). Se contabilizó un promedio de hojas jóvenes, en Brunca de 7.6, Bribrí 7.0, Huetar 5.3 y Guaymí 5.0, de un total de cinco plántulas para cada variedad.

Al día doce de cultivo, se observó la formación de un mayor número de hojas los cuales presentaron mayor cantidad de tricomas en la superficie abaxial. Estos tricomas en la parte superior de las hojas son más maduros y en la parte inferior son más jóvenes. También se observó la formación de brotes (Fig. 50).

En el epicótilo e hipocótilo la epidermis muestra diferencias morfológicas. Todas las variedades tienen el epicótilo con papilas, aunque en la mayoría de los casos y debido al tratamiento aplicado se observaron colapsadas (Fig. 51). Con respecto al hipocótilo, en Guaymí al día uno de crecimiento se observaron células lisas mientras que en Brunca, Bribrí y Huetar presentan papilas (Fig. 52). Se observó cera cuticular en todas las variedades estudiadas.

La variedad Guaymí presentó dos tipos de epidermis una lisa en la zona del hipocótilo y otra irregular. Esta característica se mantiene a través del tiempo (Fig. 53).

Con respecto a los estomas, al día uno de cultivo en las cuatro variedades se observó la formación de estos, siendo Bribrí la variedad que los presenta más inmaduros (Fig. 54). En el día doce se observó los estomas bien formados con una buena definición de las estructuras que lo forman: el ostiolo y las células guarda (Fig. 55).

También en la epidermis se observaron cuatro tipos de tricomas: dos pluricelulares y dos unicelulares (Fig. 56). Entre los pluricelulares está uno corto globoso el cual comprende entre 3 a 5 células, mientras que el largo simple con una base engrosada y se divide en dos células. Los tricomas unicelulares son uno largo y simple, y el otro corto, simple ambos con una base engrosada.

Con respecto a los tejidos internos en un corte transversal de tallo, para el día uno ya se observó el cilindro vascular que separa la médula de la corteza. Bribrí se diferencia de las otras tres variedades en el tamaño del parénquima de la médula, el cual es más grande que el parénquima de la corteza. Por el contrario en Brunca, Guaymí y Huetar el parénquima de la médula es más pequeño que el parénquima de la corteza. Las cuatro variedades se asemejan en que presentan dos capas de células epidérmicas (Fig. 57).

A partir del día cuatro se apreció un tejido xilemático bien formado, se distinguen los elementos de los vasos y el parénquima (Fig. 58).

Los elementos de los vasos en las cuatro variedades presentaron

ornamentaciones de la pared lateral secundaria de forma helicoidal y escalariforme (Fig.59 y 60). En Brunca y Bribrí se observaron también tipos de puntuaciones en las paredes laterales de forma opuestas y escalariforme (Fig. 61).

Desarrollo ontogénico y análisis ultraestructural del eje embrionario cigótico en condiciones *ex vitro*.

Las observaciones realizadas con cada una de las variedades estudiadas muestran como a la primera semana de cultivo las que corresponden a grano negro (Guaymí y Brunca) presentan tallo rosado, y por su parte las de grano rojo (Huetar y Bribrí) su tallo es verde tierno (Fig. 62). Además otra característica que se pudo observar fue la germinación en las variedades de frijol negro fue mayor que en las de frijol rojo. Donde Brunca y Guaymí presentaron en orden 50% y 60% de germinación mientras que Huetar y Bribrí 10% y 20% respectivamente.

Por otra parte, a la quinta semana se observó un mayor desarrollo de las plantas formadas comparado con la semana uno. Las variedades de grano negro mantienen su tallo rosado (Fig. 63 B y C). Las variedades de grano color rojo, sólo Bribrí cambio el color de su tallo de verde tierno a rosado, pero Huetar lo mantiene verde tierno (Fig. 63 A y D). Al igual que en la primera semana, la germinación y desarrollo de los de grano negro fue más evidente que los de grano rojo.

Con respecto a las observaciones en microscopio de barrido, al día uno de cultivo bajo condiciones *ex vitro*, el domo está bastante expuesto y se apreció como el extremo tiene las células menos definidas si se compara con la parte inferior, las cuales son más definidas (Fig. 64).

Al día 1 se pudieron encontrar estomas bien formados en las diferentes partes del eje embrionario, pero en la variedad Bribrí, sólo se observaron los estomas en desarrollo. También se apreciaron las células de la epidermis del epicótilo, las cuales tienen forma irregular (estos se muestran colapsadas). En Huetar, la epidermis esta compuesta por papilas bien formadas (Fig. 65). El hipocótilo presenta células irregulares, aunque en su gran mayoría se encuentran colapsadas (Fig. 66). También se observaron tricomas en el cuerpo del eje embrionario, principalmente en la zona de los primordios foliares, en las variedades de grano negro (Brunca y Guaymí) ya que Huetar y Bribrí no se observaron (Fig. 67). En un corte transversal del vástago se observó que el grosor de las diferentes capas es similar entre las diferentes

variedades, se distinguió fácilmente el parénquima de la médula y de la corteza, el cilindro vascular, la epidermis y la cutícula (Fig. 68).

Al cuarto día de cultivo se observó mayor desarrollo de las hojas alrededor del domo, también ya a este nivel se observaron tricomas bien desarrollados en el epicótilo. En las cuatro variedades se apreció como muchos de estos tricomas se desprendieron de la epidermis de la planta durante el proceso (Fig. 69).

Al día ocho y doce de cultivo, el meristemo está más cubierto de hojas y éstas presentan mayor número de tricomas, los cuales se presentaron también en la parte interna de los primordios foliares de mayor edad. De igual forma en el resto de la plántula. En la Figura 70 y 71 se observa los tricomas largos en el centro del meristemo. También se observó claramente un brote formado por cada eje embrionario (Fig. 72).

Al día ocho de cultivo, las epidermis de las plántulas son similares a lo exhibido al día uno de cultivo. Para las cuatro variedades, la epidermis es irregular, aunque unas más alargadas que en otras variedades (Fig. 73).

La presencia de tricomas fue otra característica que se observó durante todos los días en que se realizó la observación. Para los ejes embrionarios cultivados *ex vitro* a diferencia de los ejes embrionarios a los que se suministro 5 mg l^{-1} de BAP no se logró observar los tricomas largos simples pluricelulares. En Guaymí se apreció un tricoma globular largo unicelular (Fig. 74).

En las cuatro variedades también se encontró estomas paracíticos que están hundidos, al mismo nivel de las otras células epidérmicas y los que se proyectan hacia el exterior. En Guaymí y Huetar además se evidenció la presencia de estomas anomocíticos, aunque estos en menor proporción (Fig. 75)

El desarrollo de las hojas es en un período más temprano que en cultivo *in vitro*, ya al cuarto día se logró observar hojas bien desarrolladas y con gran cantidad de tricomas (Fig. 76)

Histología del frijol.

Los meristemos de los ejes embrionarios de frijol presentaron las capas características de un meristemo apical tanto al día cero como al octavo día de cultivo. Se observó el procambium, el meristema fundamental, la protodermis y el

promeristema (Fig. 77). Se pudo distinguir en todas las variedades la capa de la protodermis a los cero días de cultivo, la cual está compuesta por una hilera de células (Fig. 78).

En corte transversal del tallo a los 0 y 8 días con 5 mg l^{-1} BAP, se muestra el xilema rodeado por otras células más pequeñas (posiblemente se trate de floema), además de parénquima de médula (células más grandes) (Fig.79).

Con estas técnicas de microscopía de luz se observaron las diferentes capas de los tejidos meristemáticos que dan origen a los tejidos vasculares, fundamentales (parénquima, colénquima y esclerénquima) y la epidermis, que posteriormente van formando los diferentes órganos de la planta. No se encontró diferencias entre los ejes embrionarios a los que se les aplicó BAP y a los que no se les aplicó esta citoquinina (Fig. 80 y 81).

No se observó diferencia en cuanto a la formación de yemas axilares, en las plántulas cultivadas para el día ocho, sin BAP y las que se le aplicaron 5 mg l^{-1} de BAP (Fig. 82).

Es importante además mencionar como la técnica histológica permitió confirmar la presencia de tricomas unicelulares y pluricelulares en las diferentes variedades analizadas (Fig. 83).

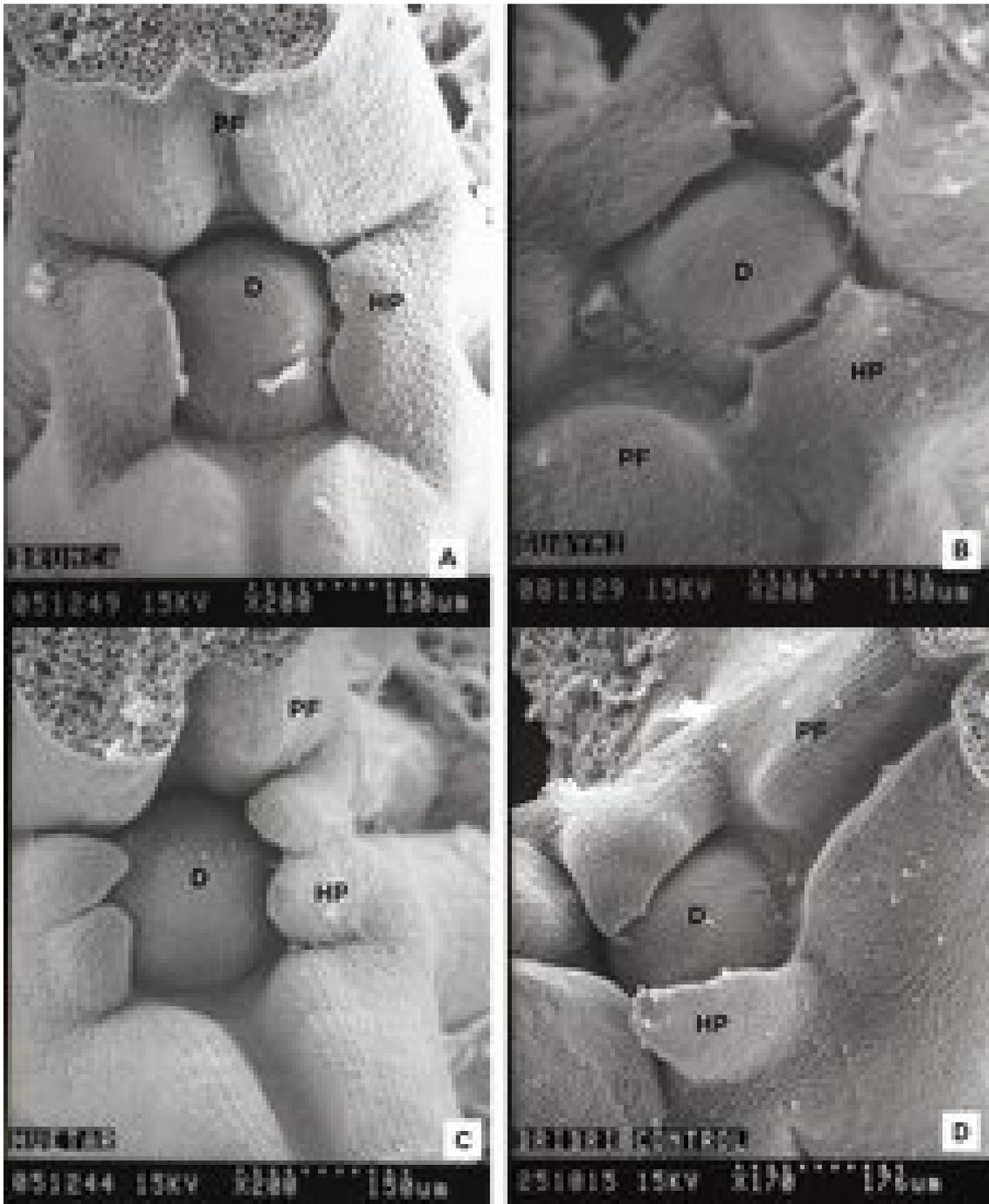


Figura 4. Microfotografías de barrido de los meristemos apicales de las variedades costarricenses de frijol a los 0 días de cultivo sin BAP. HP: hojas primarias, D: domo, PF: primordios foliares.

(A) Brunca, en el extremo del domo presenta células más irregulares y en la parte inferior más definidas.
Esc. 4,5 cm= 150 µm

(B) Guaymí, en el extremo del domo presenta células más irregulares y en la parte inferior más definidas.
Esc. 4,5 cm=150 µm

(C) Huetar, en el extremo del domo presenta células más irregulares y en la parte inferior más definidas.
Esc. 4,5 cm= 150 µm

(D) Bribri, en el extremo del domo presenta células más irregulares y en la parte inferior más definidas.
Esc. 4,5 cm= 176 µm.

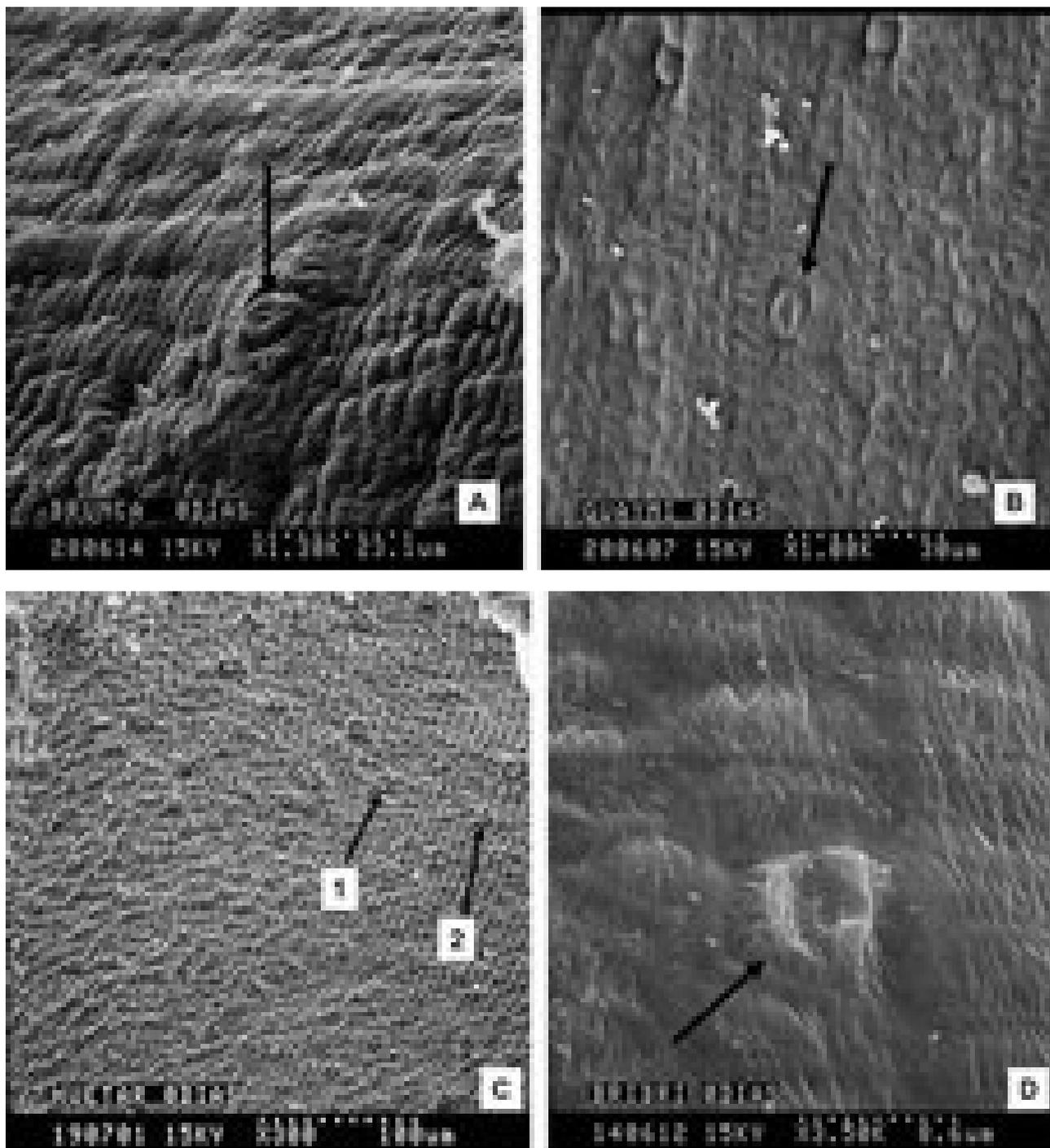


Figura 5. Detalle de la superficie epidérmica, se distinguen posibles orígenes de estomas de las variedades costarricenses de frijol a los 0 días de cultivo sin BAP.

(A) Brunca, estoma en desarrollo. Obsérvese las papilas de la epidermis del epicótilo. Esc. 4,5 cm= 23,1 μ m.

(B) Guaymí, posibles orígenes de estomas o de tricomas, estoma en desarrollo (flecha). Obsérvese las papilas de la epidermis del epicótilo. Esc. 4,5 cm= 30 μ m.

(C) Huetar, posibles orígenes de estomas o de tricomas (1), estomas en desarrollo (2). Obsérvese las papilas de la epidermis del epicótilo. Esc. 4,5 cm=100 μ m

(D) Bribí, estoma en formación. Esc. 4,5 cm= 8,6 μ m.

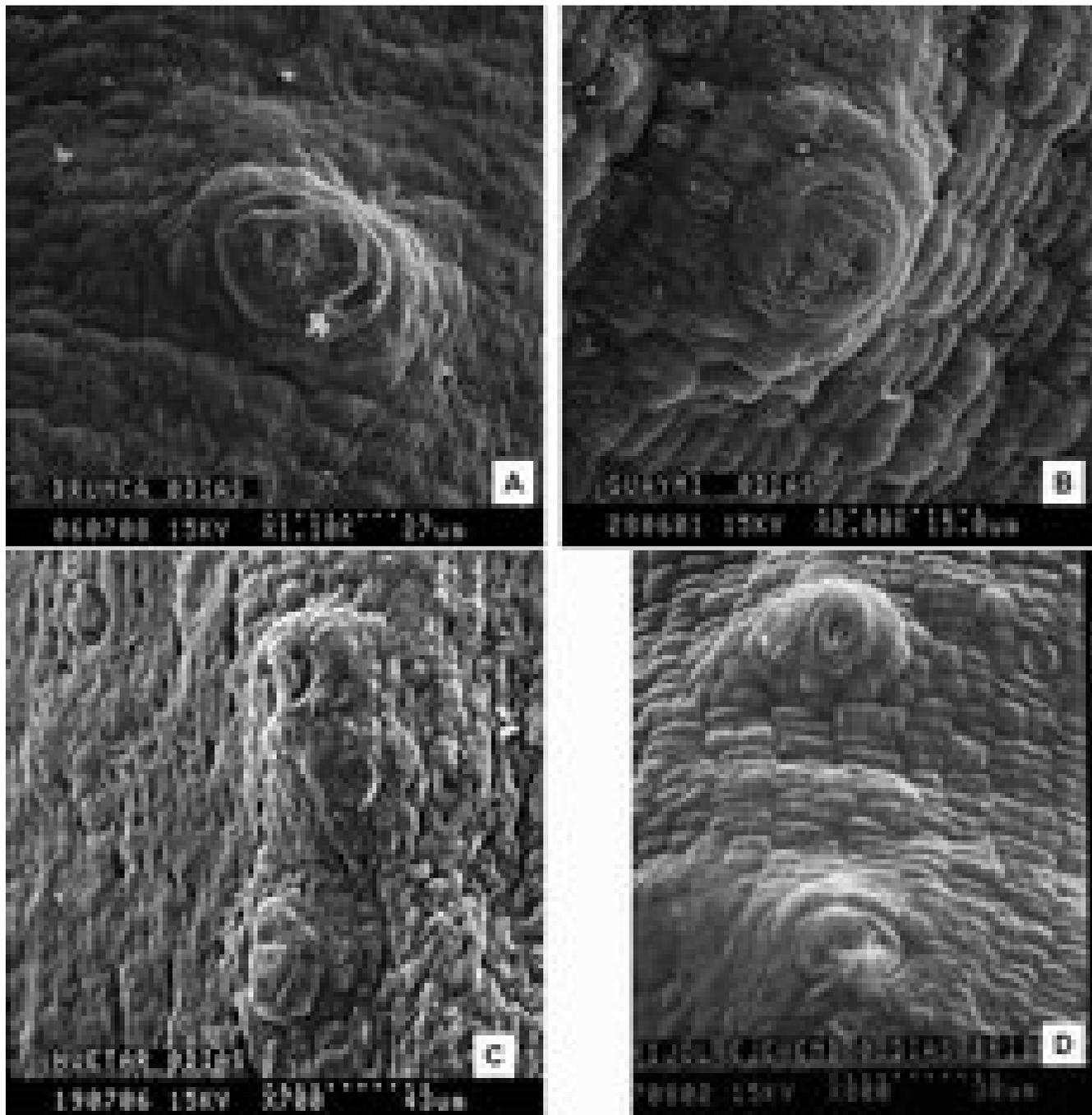


Figura 6. Estomas en formación a los 0 días de cultivo sin BAP, estomas que se encuentran en una estructura cónica

- (A) Brunca. Obsérvese las papilas de la epidermis del hipocótilo. Esc. 4,5 cm=27 μ m.
- (B) Guaymí. Obsérvese las papilas de la epidermis del hipocótilo. Esc. 4,5 cm=15 μ m.
- (C) Huetar. Obsérvese las papilas de la epidermis del hipocótilo. Esc. 4,5 cm=43 μ m.
- (D) Bribri, Obsérvese las papilas de la epidermis del hipocótilo. Esc. 4,5 cm=38 μ m.

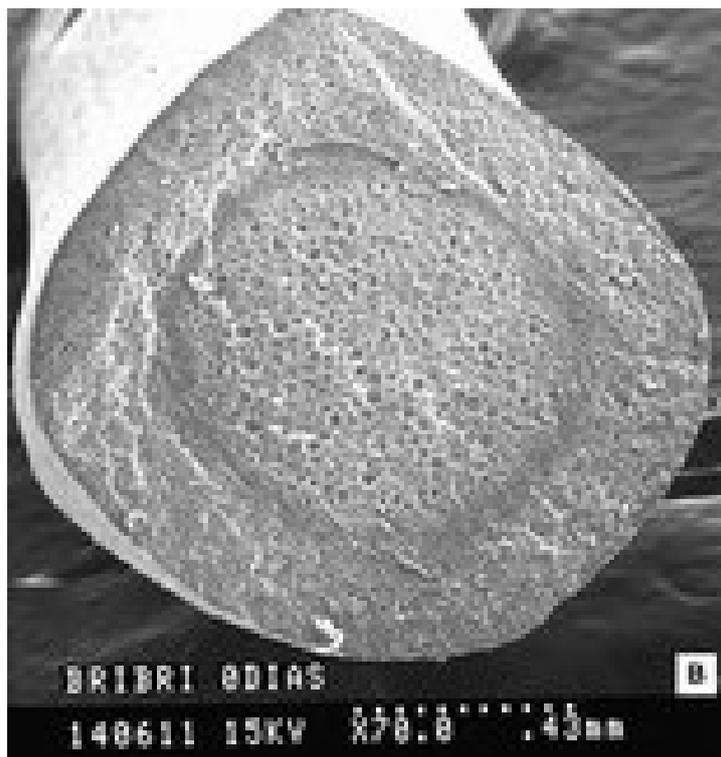
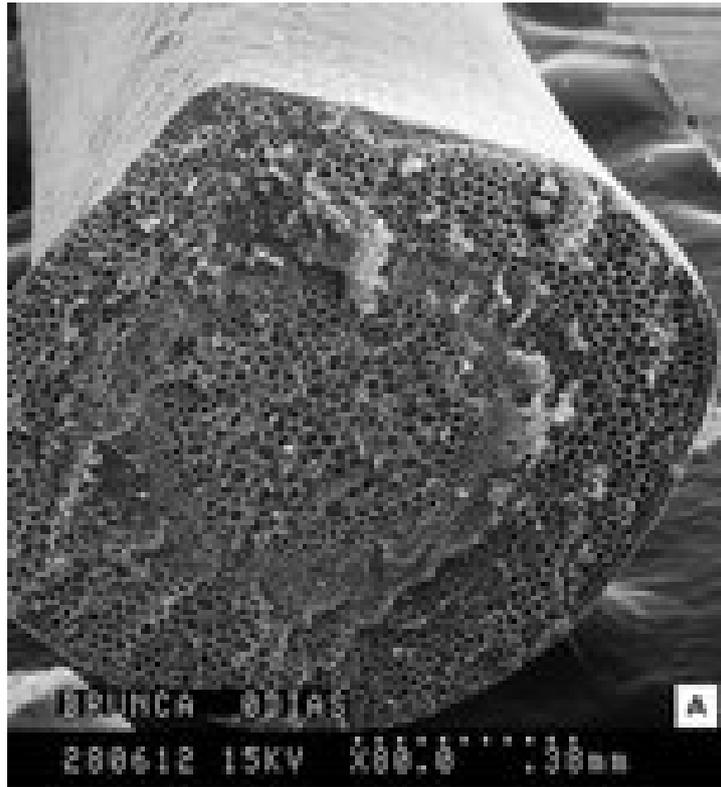


Figura 7. Corte transversal del eje embrionario a los 0 días de cultivo sin BAP. Se observan las células parénquimáticas de corteza y de medula, el haz vascular y la capa epidérmica

(A) Brunca. Esc. 4,5 cm= 0,38 μ m.

(B) Bribri. Esc. 4,5 cm= 0,43 μ m.

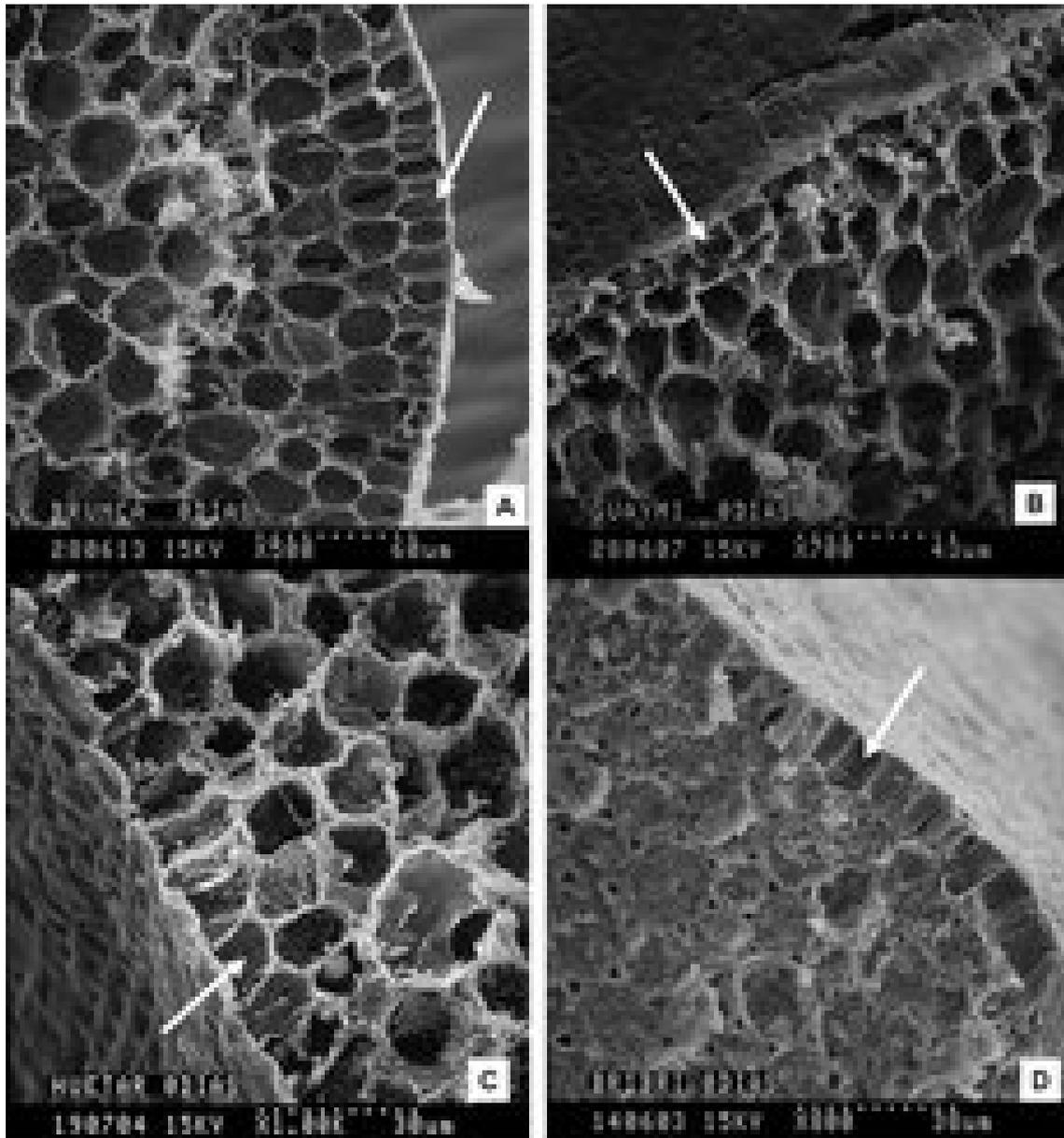


Figura 8. Corte transversal del eje embrionario a los 0 días de cultivo sin BAP.

(A) Brunca. Obsérvese la capa epidérmica, las células se observan un poco alargadas (flecha). Esc. 4,5 cm=60 μ m.

(B) Guaymí. Obsérvese la capa epidérmica, las células se observan un poco alargadas (flecha). Esc. 4,5 cm=43 μ m.

(C) Huetar. Obsérvese la capa epidérmica, las células se observan un poco alargadas (flecha). Esc. 4,5 cm=30 μ m.

(D) Bribrí. Obsérvese la capa epidérmica, las células se observan un poco alargadas (flecha). Esc. 4,5 cm=38 μ m.

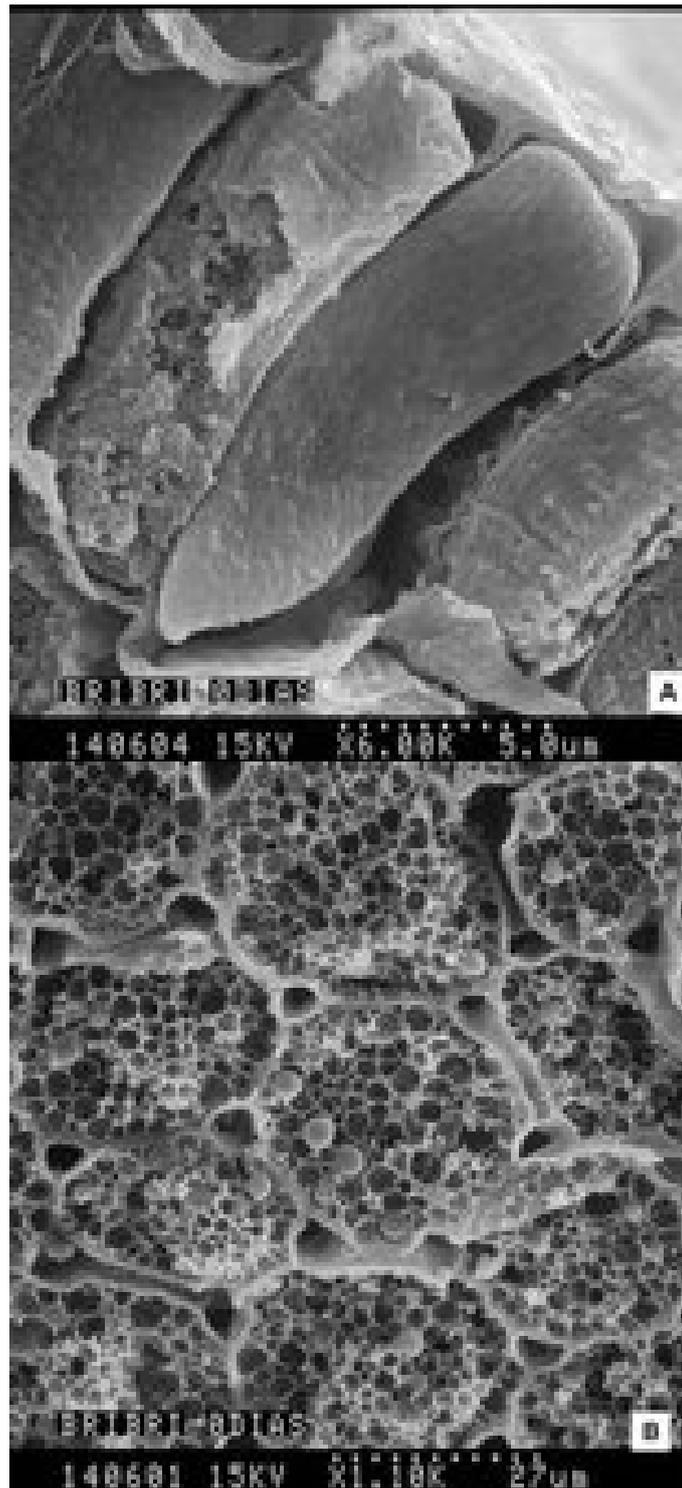


Figura 9. Cortes transversales del vástago a los 0 días de cultivo sin BAP.

(A) Detalle de las células de la capa epidérmica. Esc. 4,5 cm= 5 μ m.

(B) Células de parénquima, se observan muy vacuolizadas y conteniendo gránulos, posiblemente de almidón. Note los espacios intercelulares. Esc. 4,5 cm= 27 μ m.

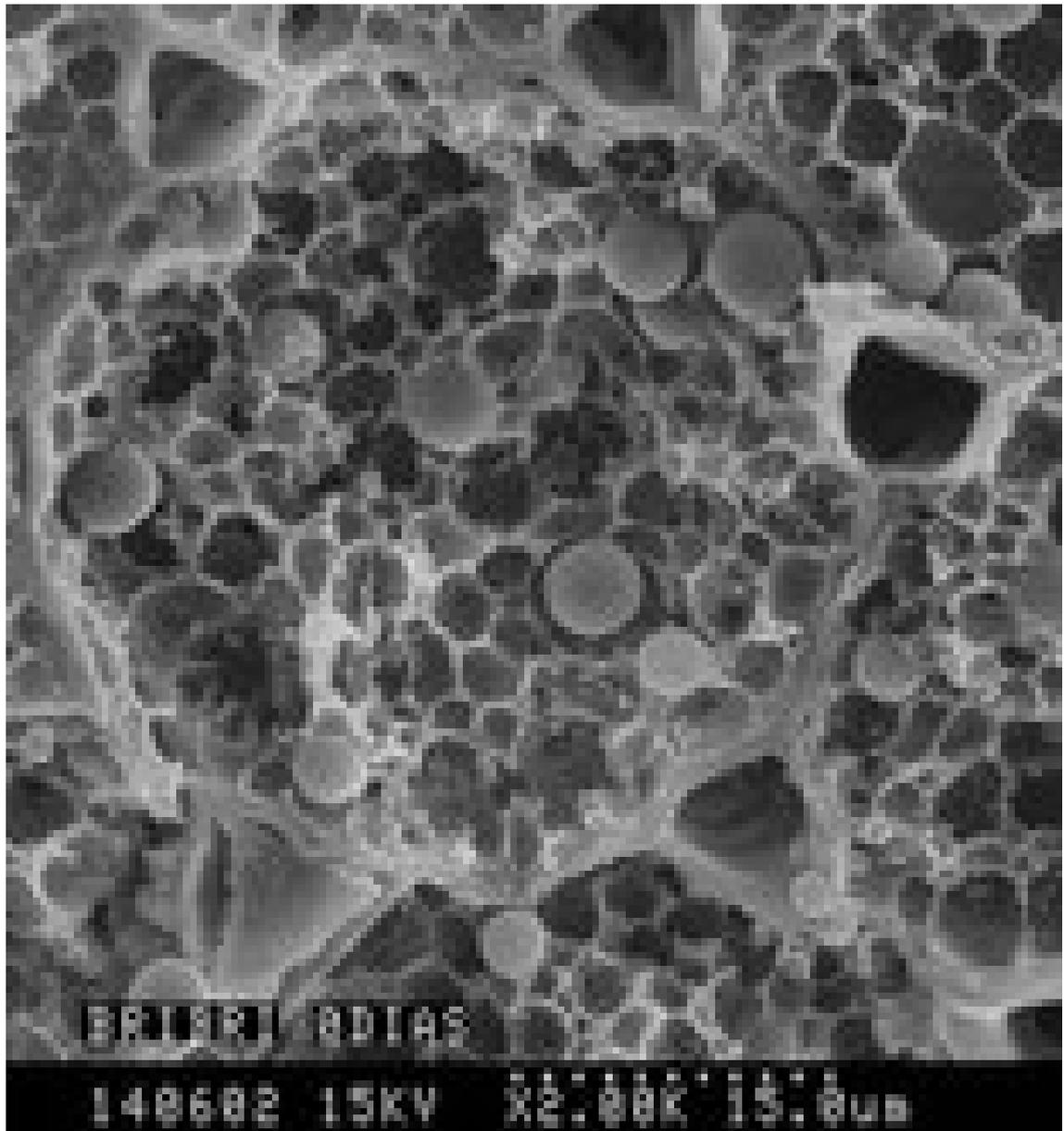


Figura 10. Detalle células de parénquima a los 0 días de cultivo sin BAP. Se observan espacios intercelulares y almidón Esc. 4,5 cm=15µm.

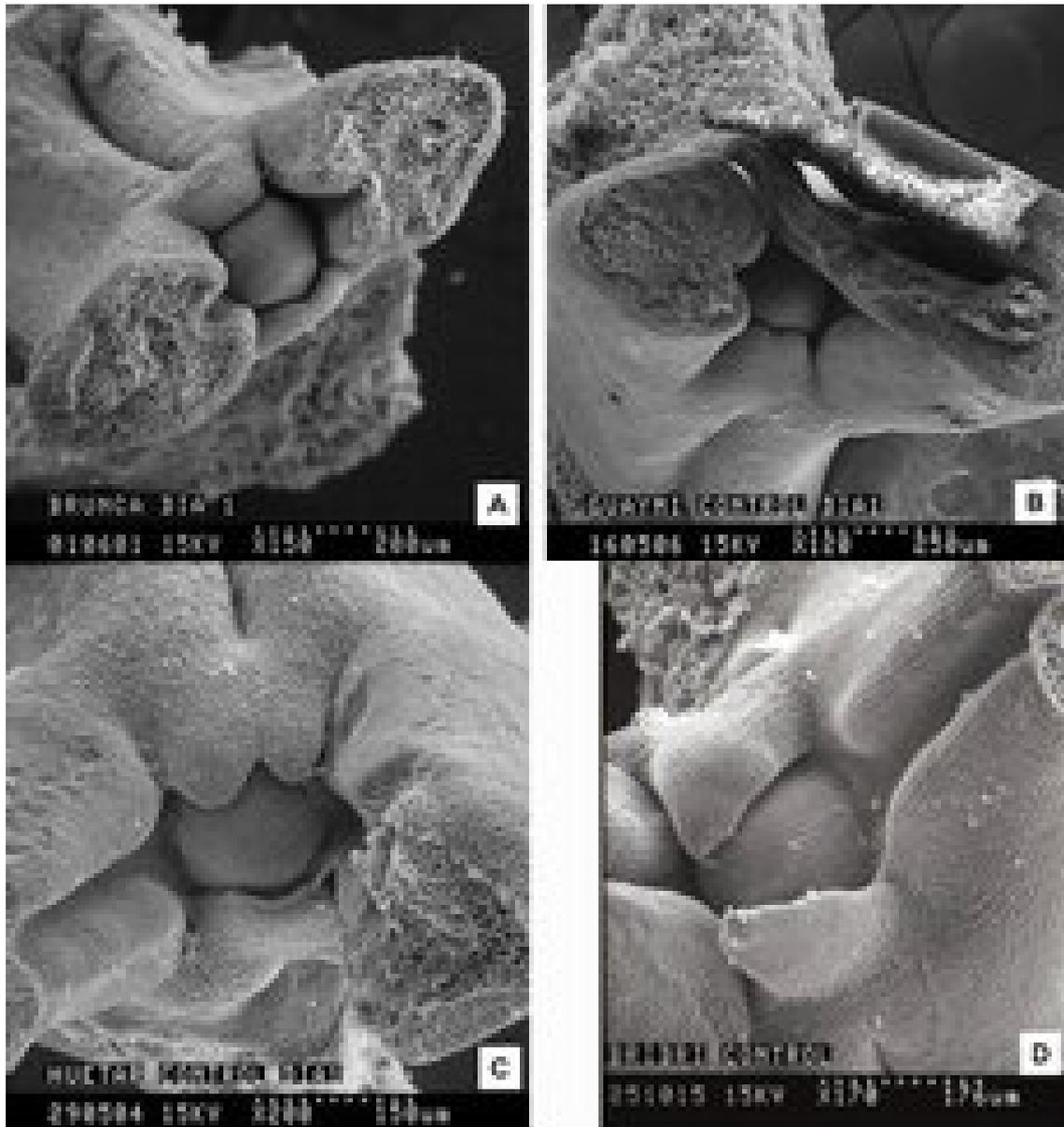


Figura 11. Ápice caulinar a 1 día de cultivo sin BAP. Nótese que el polo apical está formado por células pequeñas e isodiamétricas y la presencia de papilas epidérmicas que cubren toda la estructura. Además, el domo esta rodeado por dos primordios muy jóvenes.

(A) Brunca, Esc. 4,5 cm= 200 μ m.

(B) Guaymí, Esc. 4,5 cm= 250 μ m.

(C) Huetar, Esc. 4,5 cm= 150 μ m.

(D) Bribri, Esc. 4,5 cm= 176 μ m.

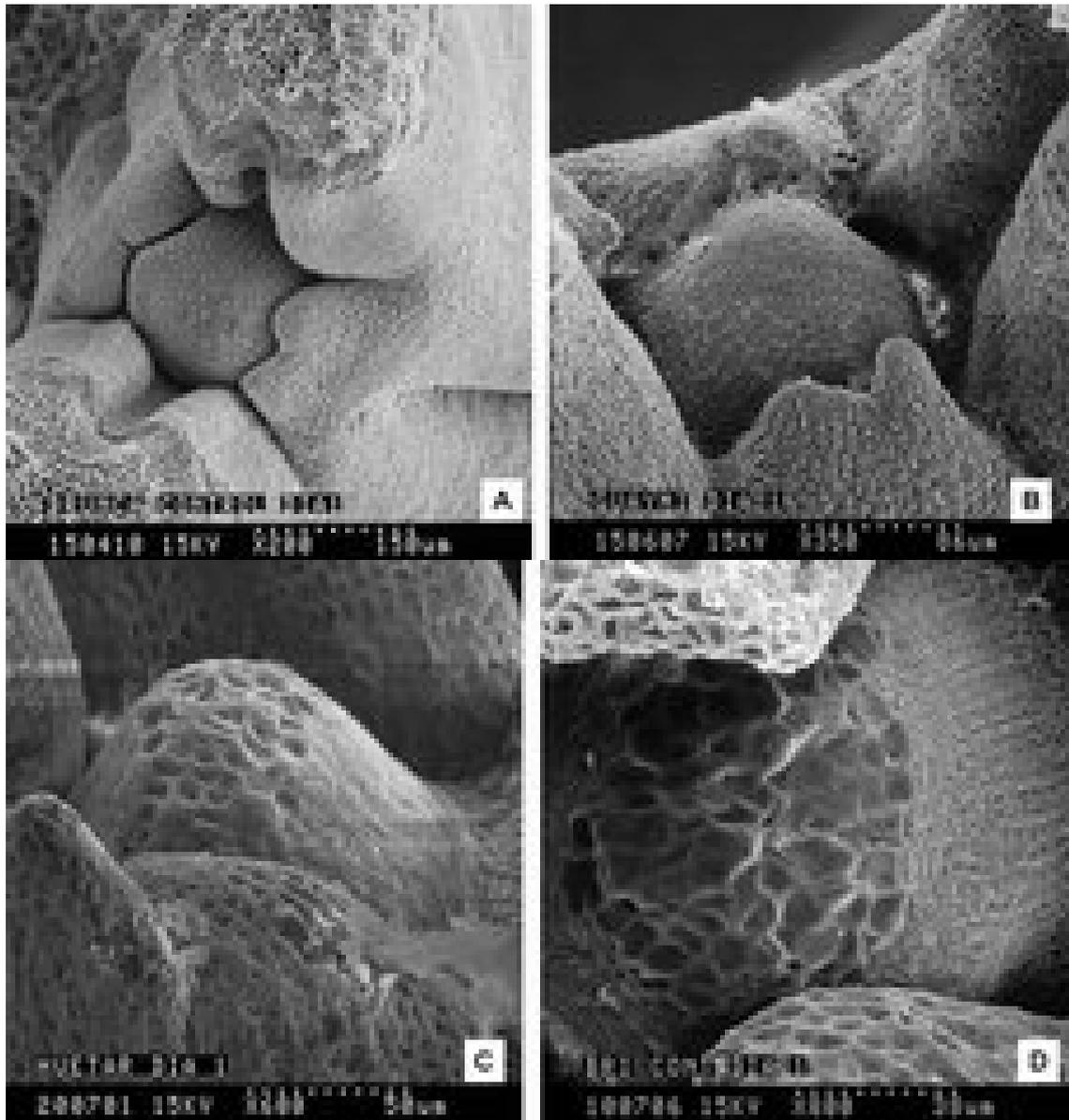


Figura 12. Domo de los meristemos apicales, al día 1 de cultivo sin BAP. Nótese las células de la parte central del domo de forma irregular y mientras se acerca a la zona inferior son más regulares.

(A) Brunca. Esc, 4.5 cm=150 μ m.

(B) Guaymí. Esc, 4.5 cm=86 μ m.

(C) Huetar. Esc, 4.5 cm=50 μ m.

(D) Bribri. Esc, 4.5 cm=38 μ m.

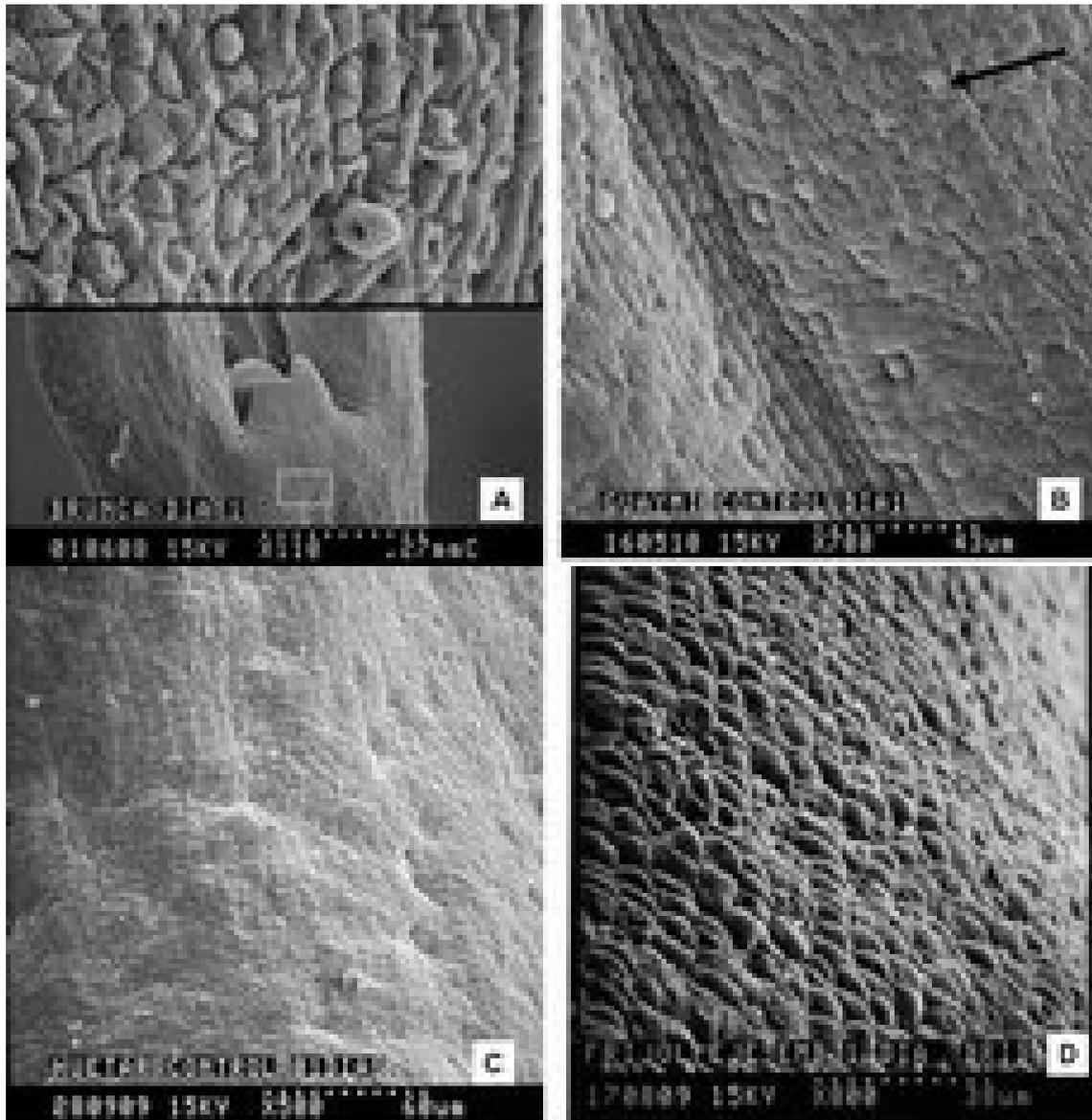


Figura 13. Detalle de la superficie del epicótilo al día uno de crecimiento en un medio sin BAP.

(A) Brunca. Papilas, obsérvese la formación de tricoma. Esc. 4,5 cm=0,27 mm.

(B) Guaymi. Papilas, obsérvese formación tricomas así como posibles orígenes de estomas o tricomas Esc. 4,5 cm=43 μ m.

(C) Huetar. Papilas, obsérvese posibles orígenes de estomas o tricomas Esc. 4,5 cm=60 μ m.

(D) Bribí. Papilas Esc. 4,5 cm=38 μ m.

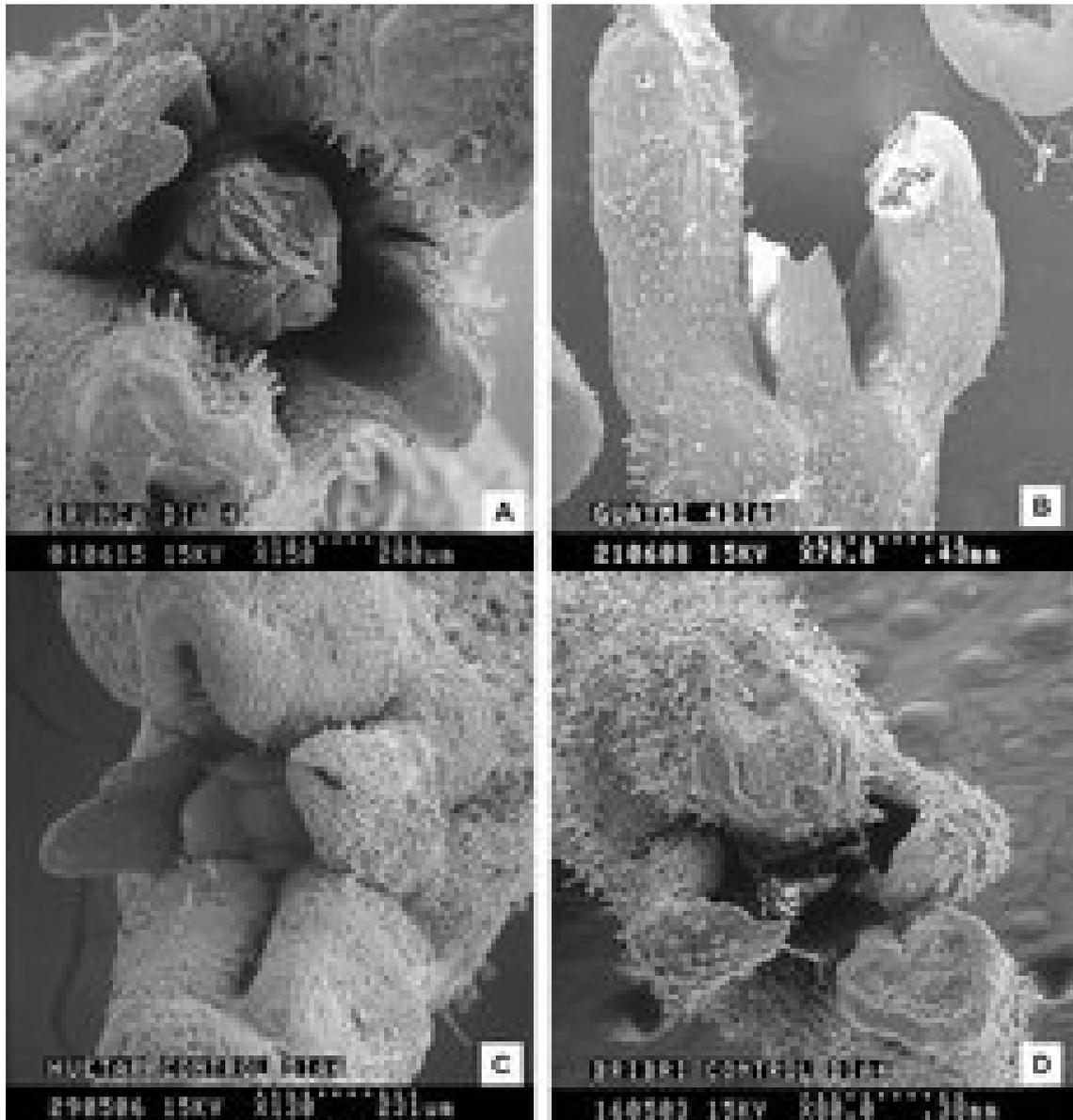


Figura 14. Extremo apical, al día 4 de crecimiento en el medio de cultivo sin BAP.

(A) Brunca. Nótese los primordios foliares que envuelven el meristemo apical. Alrededor se observa hojas jóvenes cubiertas de tricomas. Esc. 4,5 cm=200 μ m.

(B) Guaymí. Micrografía que muestra las hojas jóvenes que rodean el domo, obsérvese los tricomas en el cuerpo de la plántula Esc. 4,5 cm=0.43 mm.

(C) Huetar. Meristemo apical semicubierto por tres primordios foliares. Estas estructuras están rodeadas por hojas jóvenes. Esc. 4,5 cm=231 μ m.

(D) Bribí. Domo cubierto por hojas jóvenes, nótese la gran cantidad de tricomas. Esc. 4,5 cm=0.38 mm.



Figura 15. Corte transversal al cuarto día de desarrollo del eje embrionario en el medio sin BAP. En las cuatro variedades se observaron las mismas estructuras y desarrollo.

(A) Brunca. Note el parénquima de la corteza y de la médula, el cilindro vascular (cubierto por gran cantidad de cera) y la capa epidérmica. Esc. 4,5 cm=0.30 mm.

(B) Bribí. Note el parénquima de la corteza y de la médula, el cilindro vascular y la capa epidérmica. Esc. 4,5 cm=0,27 mm.



Figura 16. Elementos de los vasos presentes en el xilema del frijol, a los 8 días de cultivo sin BAP.

(A) Ornamentación de las paredes laterales secundaria forma helicoidal. Esc. 4,5 cm=7,5 μ m.

(B) Puntuación de la pared lateral tipo alterna Esc. 4,5 cm=13,6 μ m.

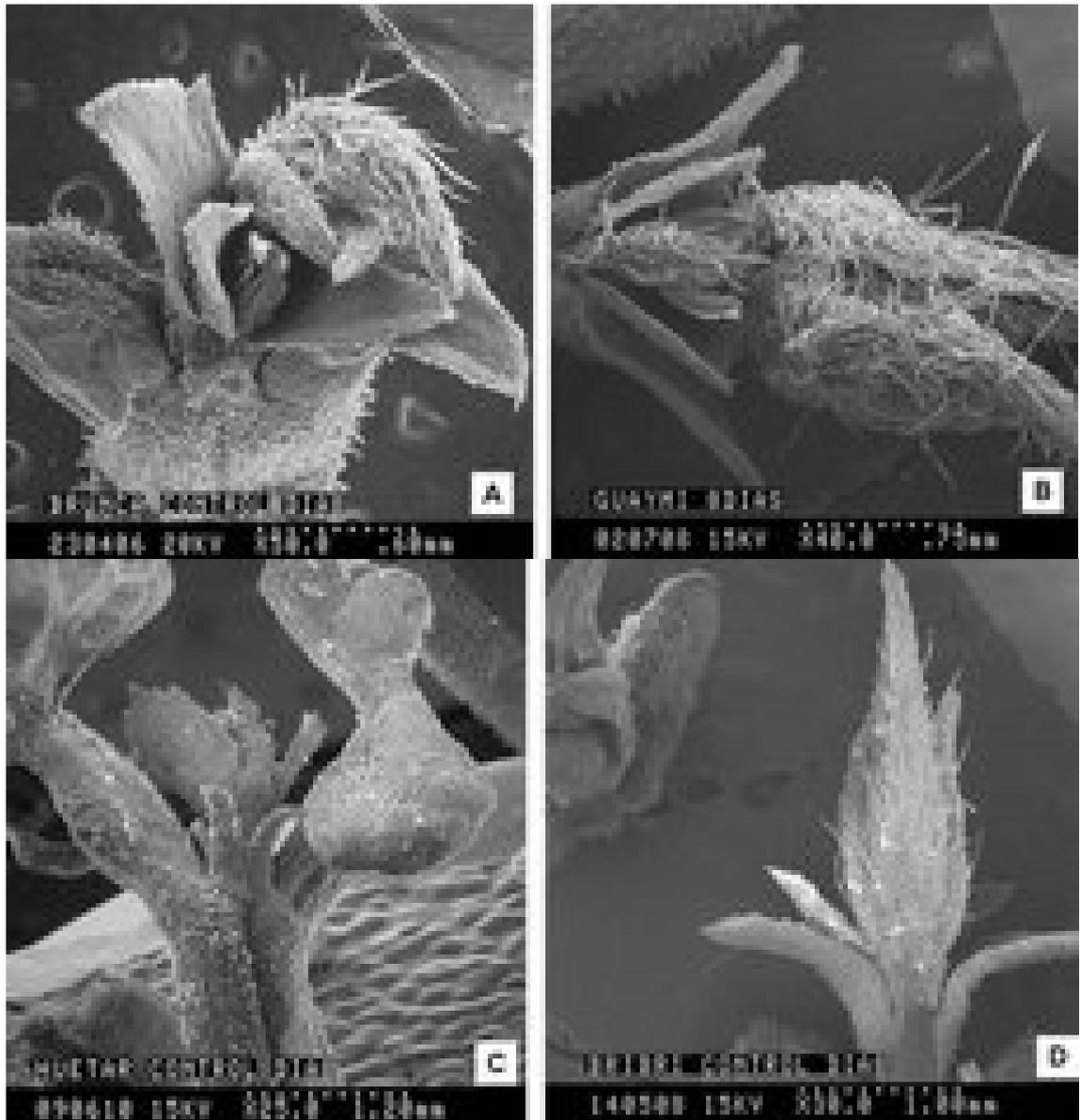


Figura 17. Extremo apical al día ocho de crecimiento en el medio sin BAP.

(A) Brunca. Obsérvese la gran cantidad de tricomas y las hojas jóvenes que van adquiriendo forma de hoja madura. Esc. 4,5 cm=0,60 mm.

(B) Guaymí. Tricomas maduros en hojas maduras. Esc. 4,5 cm=0,75 mm.

(C) Huetar. Hojas que sobresalen del domo, note los tricomas en cuerpo de la plántula. Esc. 4,5 cm=1,20 mm.

(D) Bribí. Domo cubierto por gran cantidad de tricomas maduros. Esc. 4,5 cm=1 mm

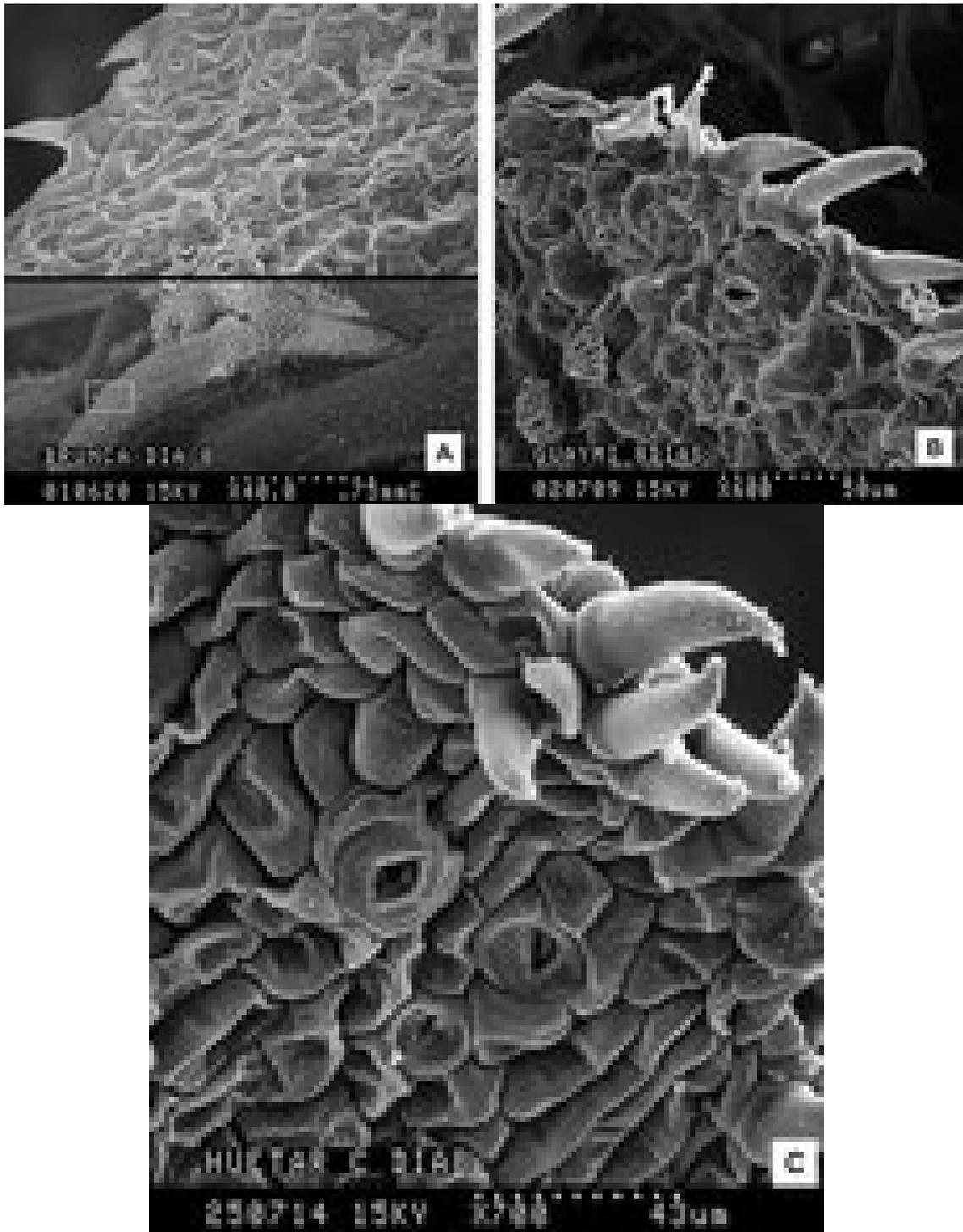


Figura 18. Ocho días de crecimiento en medio sin BAP. Se observa un abundante número de estomas presentes en las hojas. Se nota una estructura estomática bien desarrollada.

(A) Brunca. Estomas paracíticos en superficie adaxial de hoja, presenta tricomas unicelulares en el borde de la hoja. Esc. 4,5 cm=0,75 mm.

(B) Guaymí. Se observa un alto número de estomas con el ostiolo abierto, en superficie adaxial. Esc. 4,5 cm=103 μ m.

(C) Huetar. Mayor detalle de estomas abiertos. Note los tricomas en el borde de la lámina foliar. Esc. 4,5 cm=43 μ m.

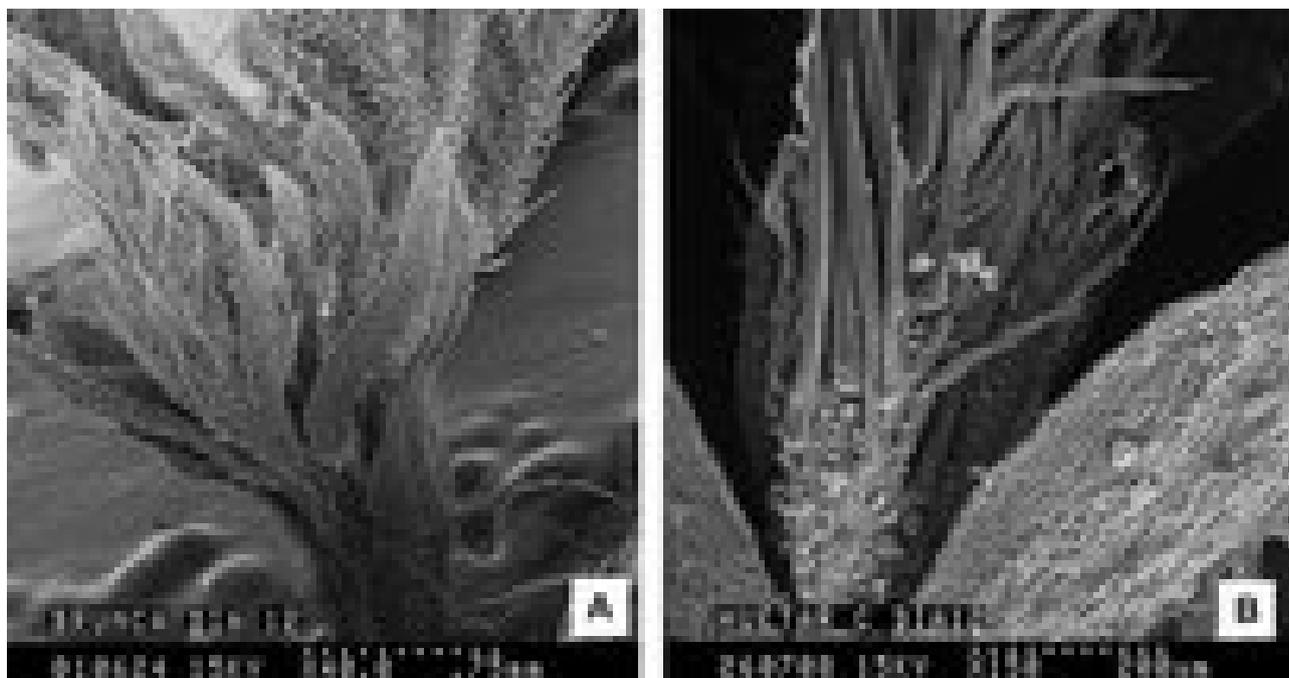


Figura 19. Panorámica del eje embrionario, a los doce días de cultivo sin BAP. Nótese la formación de solamente un brote.

(A) Brunca. Crecimiento de las hojas es muy evidente, cerca del domo se nota un crecimiento abundante de tricomas muy largos Esc. 4,5 cm=0,75 mm.

(B) Huetar. Crecimiento de las hojas, cerca del domo se nota un crecimiento abundante de tricomas muy largos En la superficie abaxial se evidencia mayor número de tricomas Esc. 4,5 cm=200 μ m.

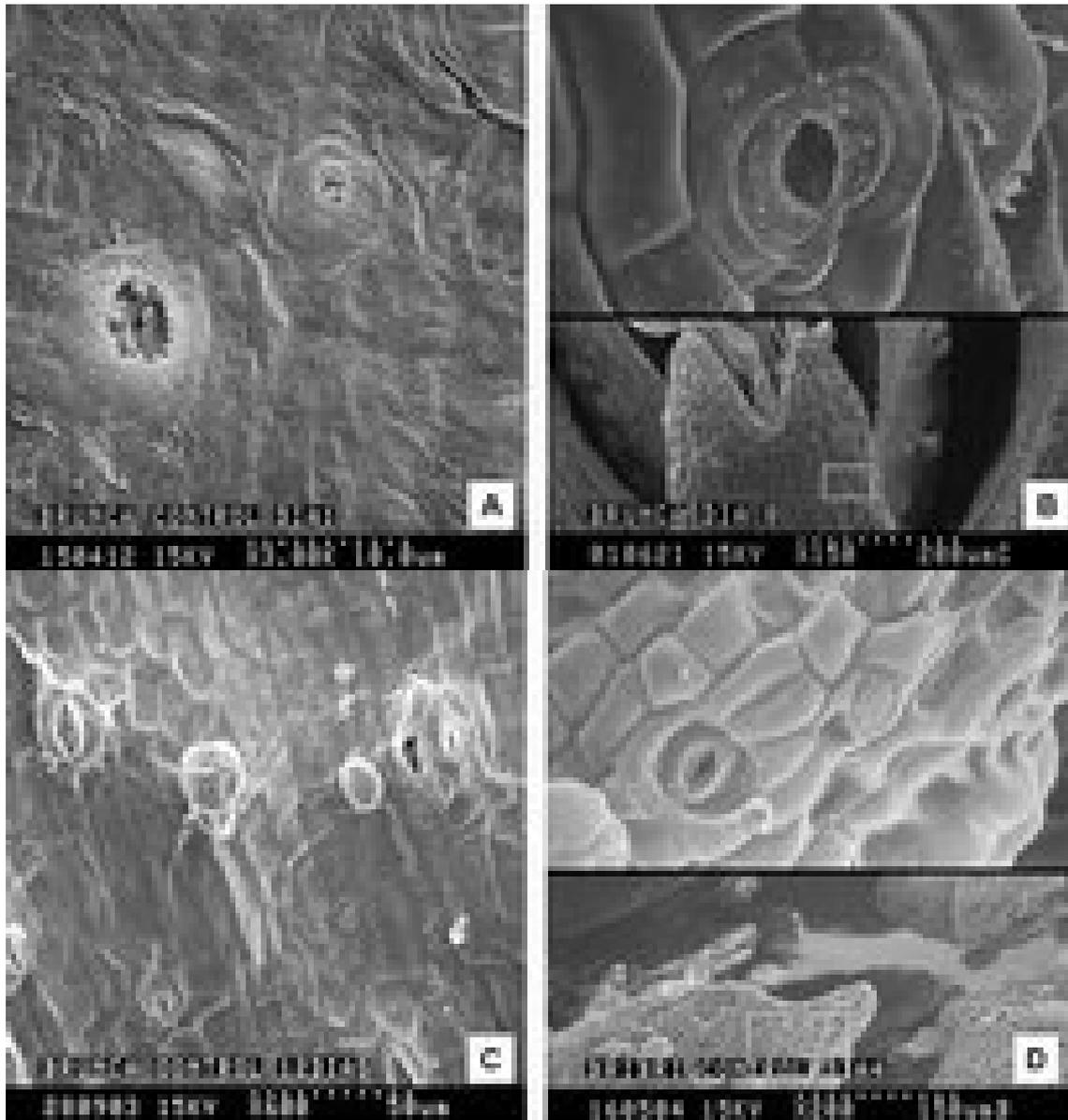


Figura 20. Estomas presentes en frijol a diferentes días de cultivo *in vitro* en medio MS sin BAP.

(A). Estoma anomocítico en la variedad Brunca al día de cultivo. Esc. 4,5 cm=10 μ m.

(B). Estoma paracíticos al mismo nivel de las células epidérmicas. Esc. 4,5 cm=200 μ m.

(C). Estoma paracíticos proyectado hacia el exterior de la epidermis 4,5 cm=50 μ m.

(D). Estoma paracíticos hundido con respecto al nivel de las células epidérmicas 4,5 cm=150 μ m.



Figura 21. Tricomas encontrados en las cuatro variedades de frijol en medio sin BAP.
(A) Tricoma corto globular pluricelular, compuesto por tres células. Esc. 4,5 cm=15 μ m.
(B) Tricoma largo unicelular. Esc. 4,5 cm=50 μ m.

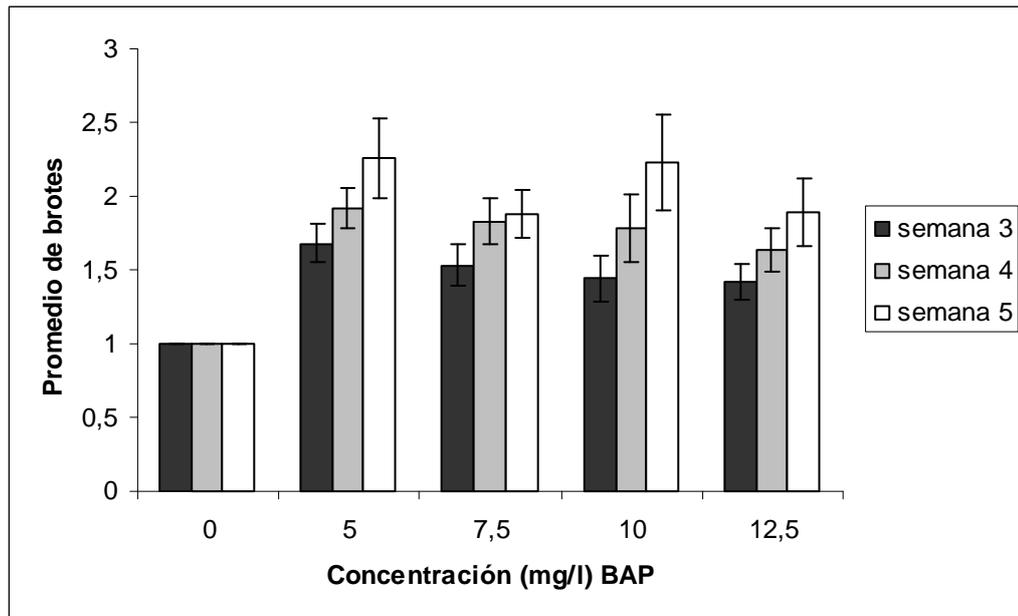


Figura 22. Efecto de la concentración de BAP en la formación de brotes en la variedad Bribrí a la tercera, cuarta y quinta semana de cultivo.

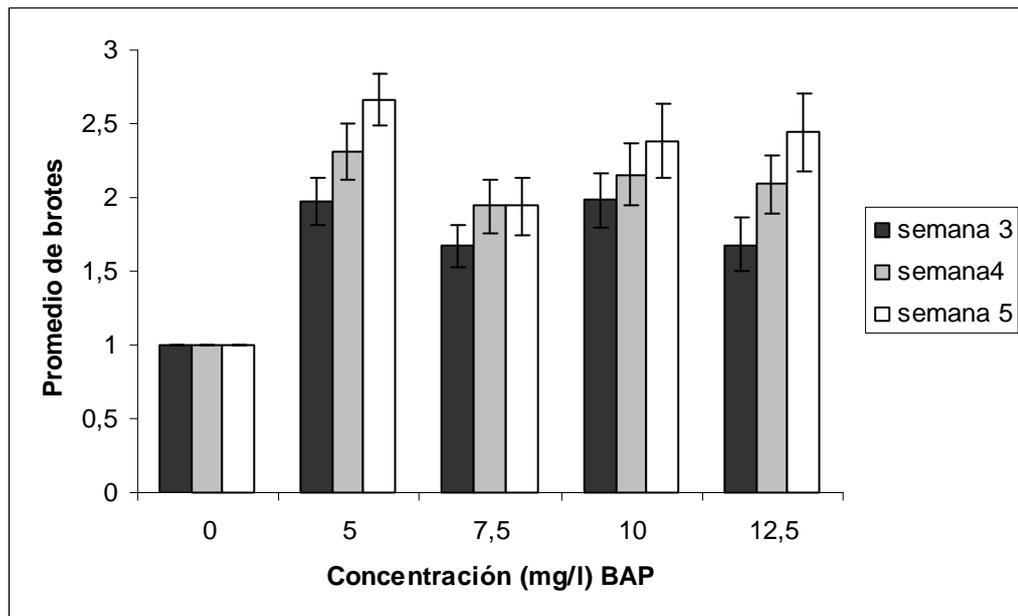


Figura 23. Efecto de la concentración de BAP en la formación de brotes en la variedad Brunca a la tercera, cuarta y quinta semana de cultivo.

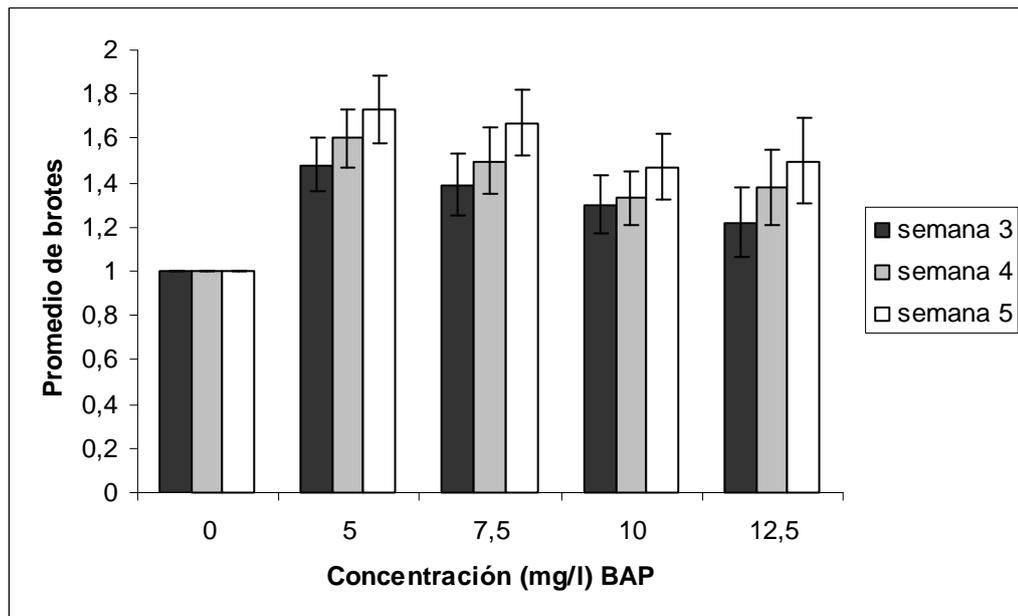


Figura 24. Efecto de la concentración de BAP en la formación de brotes en la variedad Guaymí a la tercera, cuarta y quinta semana de cultivo.

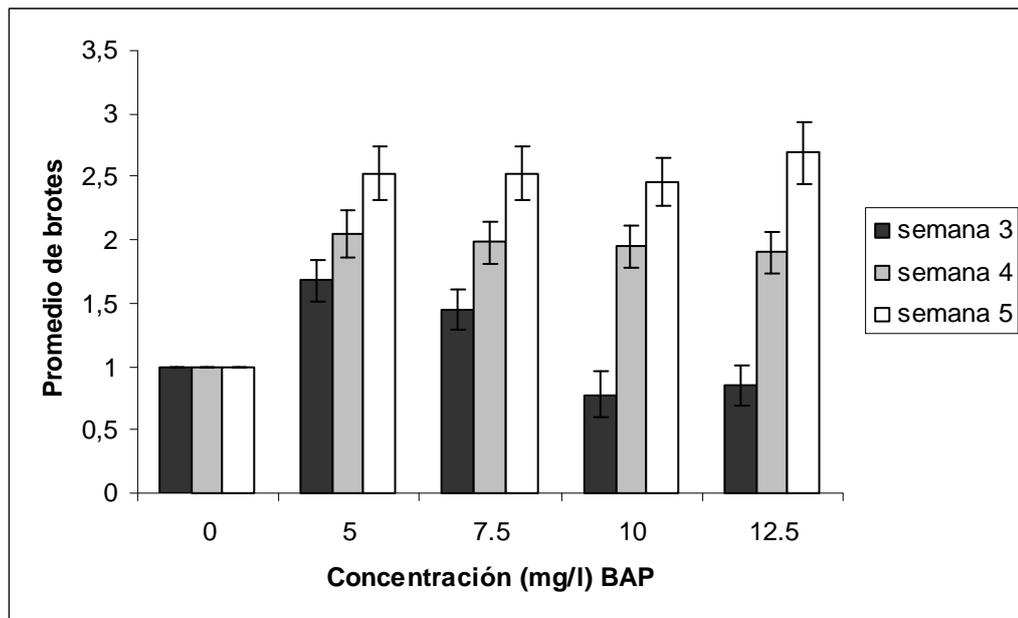


Figura 25. Efecto de la concentración de BAP en la formación de brotes en la variedad Huetar a la tercera, cuarta y quinta semana de cultivo.



Figura 26. Tratamiento con 0 mg l^{-1} de BAP a la quinta semana de cultivo *in vitro*. Se observa la formación de solamente un brote con hojas y raíces bien desarrolladas. (A) Bribrí, (B) Brunca, (C) Guaymí y (D) Huetar.



Figura 27. Formación de brotes en la variedad Bribrí a la quinta semana de cultivo *in vitro* en los diferentes tratamientos empleados: (A) 5 mg l^{-1} , (B) $7,5 \text{ mg l}^{-1}$, (C) 10 mg l^{-1} y (D) $12,5 \text{ mg l}^{-1}$.

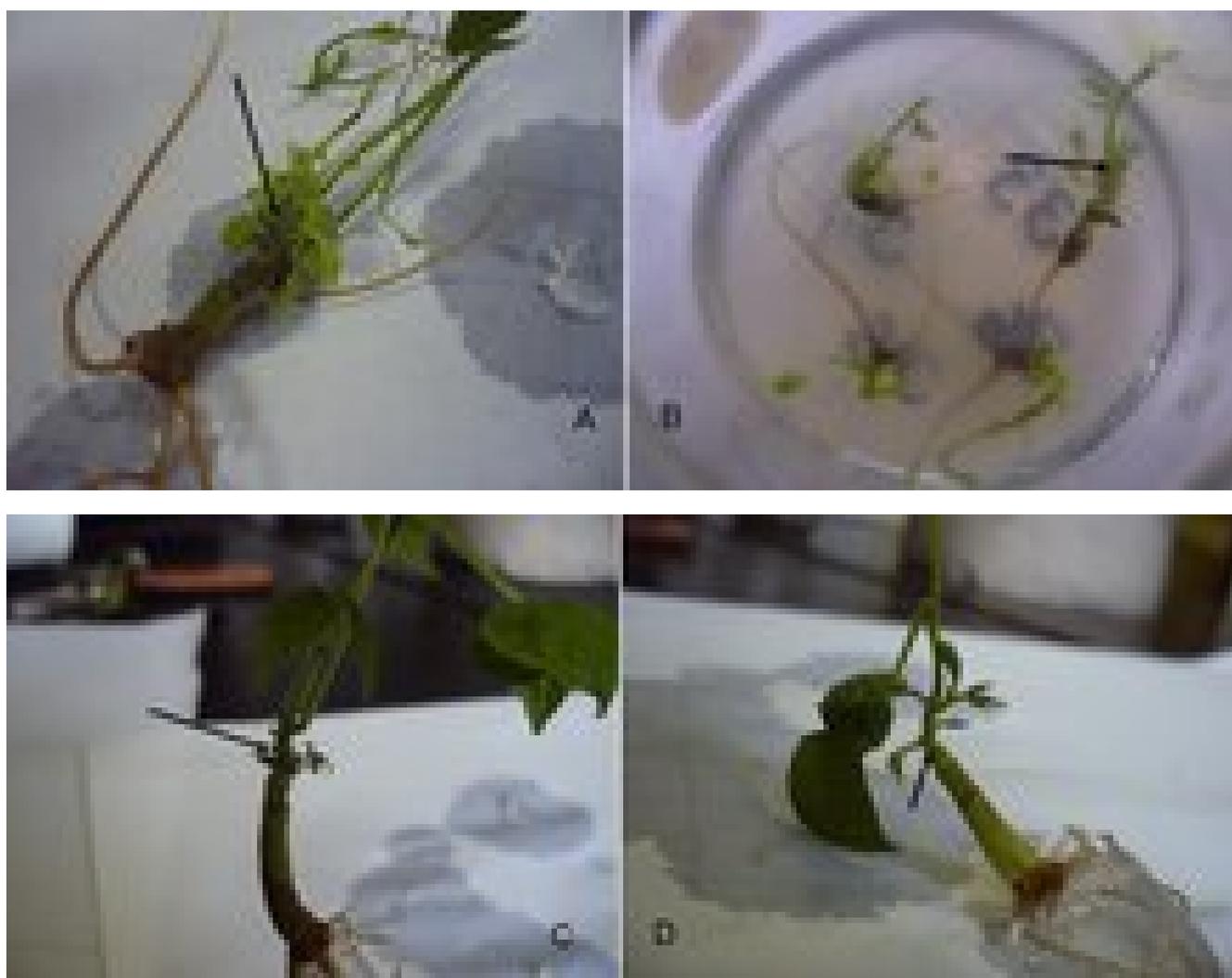


Figura 28. Formación de brotes en la variedad Brunca a la quinta semana de cultivo *in vitro* en los diferentes tratamientos empleados: (A) 5 mg l^{-1} , (B) $7,5 \text{ mg l}^{-1}$, (C) 10 mg l^{-1} y (D) $12,5 \text{ mg l}^{-1}$.

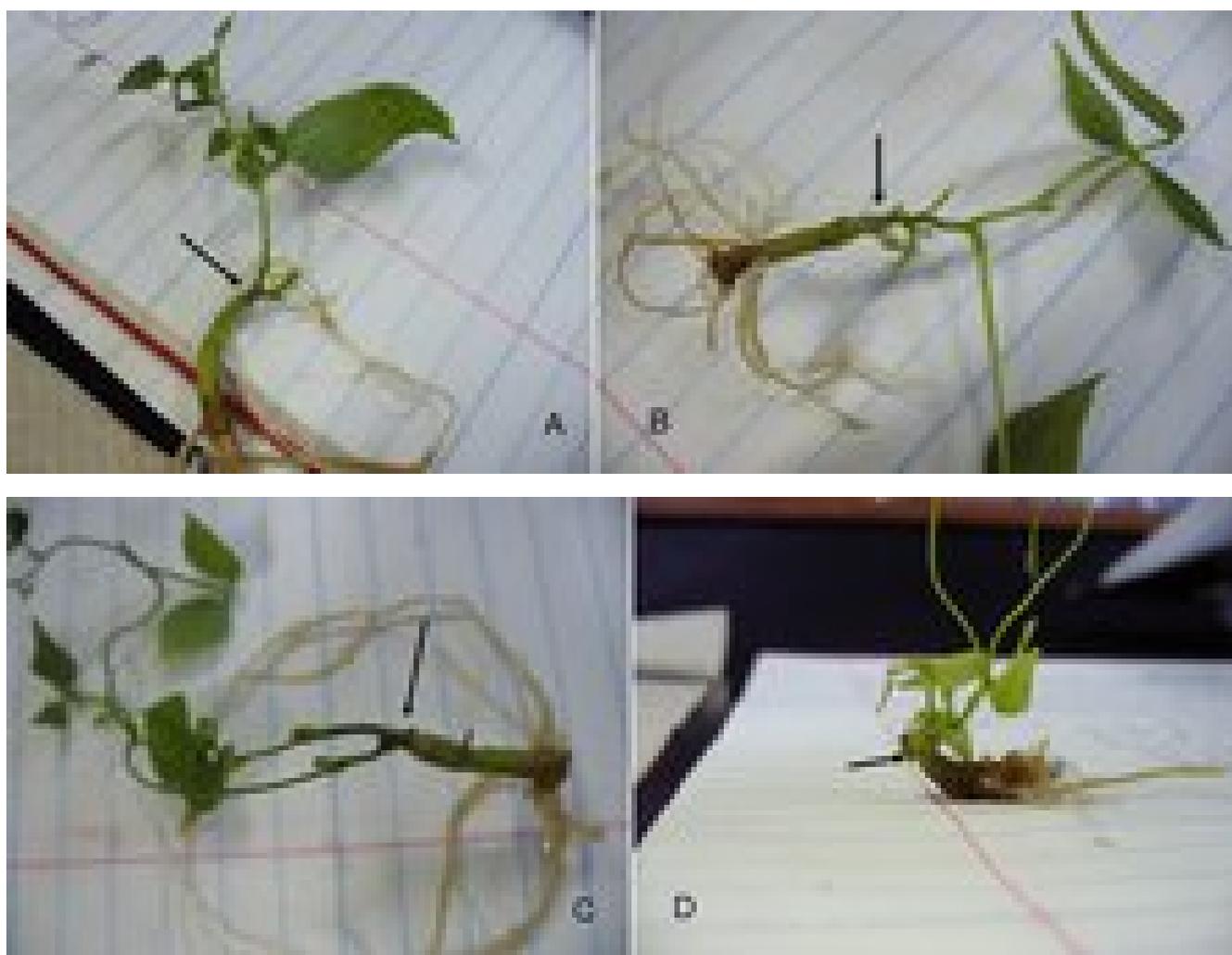


Figura 29. Formación de brotes en la variedad Guaymí a la quinta semana de cultivo *in vitro* en los diferentes tratamientos empleados: (A) 5 mg^l⁻¹, (B) 7,5 mg^l⁻¹, (C) 10 mg^l⁻¹ y (D) 12,5 mg^l⁻¹.



Figura 30. Formación de brotes en la variedad Huetar a la quinta semana de cultivo *in vitro* en los diferentes tratamientos empleados: (A) 5 mg^l⁻¹, (B) 7,5 mg^l⁻¹, (C) 10 mg^l⁻¹ y (D) 12,5 mg^l⁻¹.

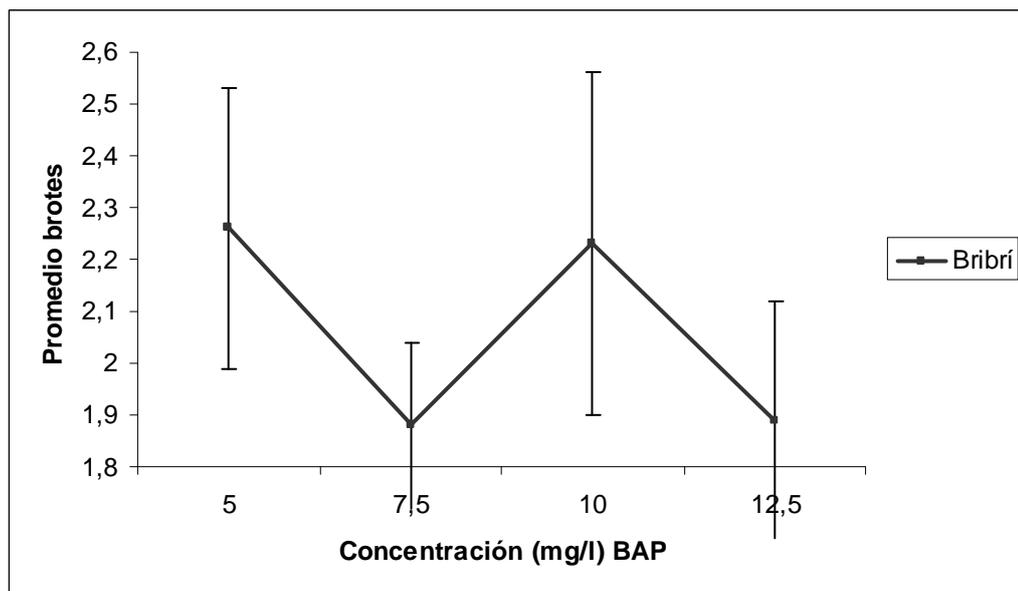


Figura 31. Análisis estadístico del número de brotes para la variedad Bribri a la quinta semana de cultivo bajo condiciones *in vitro*.

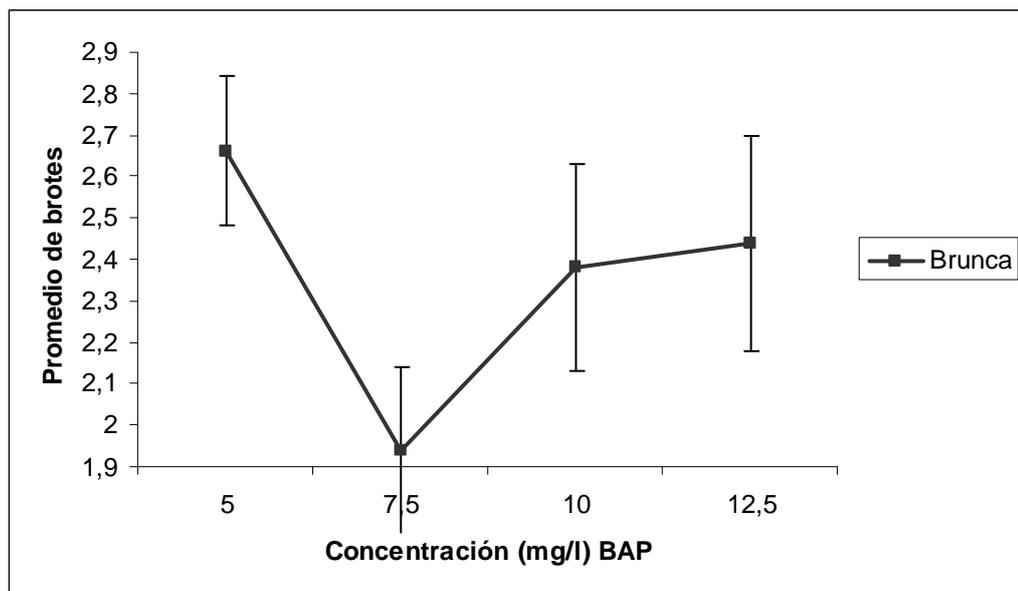


Figura 32. Análisis estadístico del número de brotes para la variedad Brunca a la quinta semana de cultivo bajo condiciones *in vitro*.

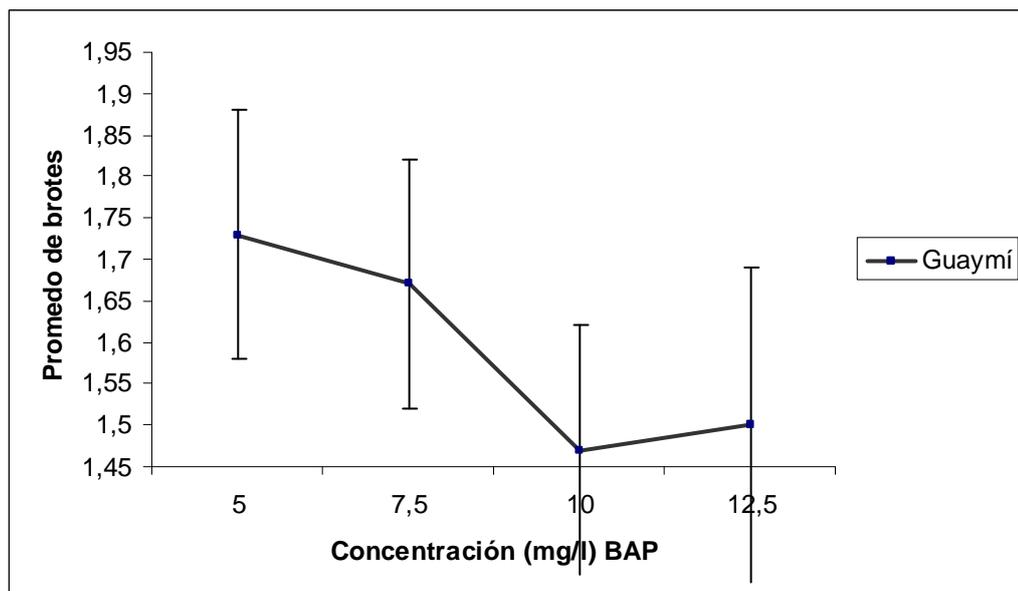


Figura 33. Análisis estadístico del número de brotes para la variedad Guaymí a la quinta semana de cultivo bajo condiciones *in vitro*.

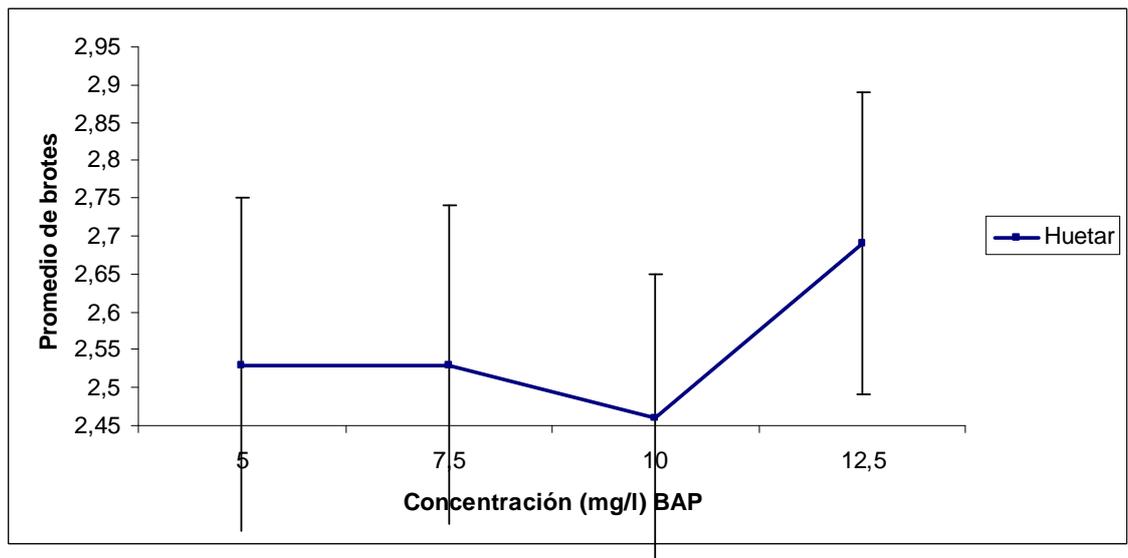


Figura 34. Análisis estadístico del número de brotes para la variedad Huetar a la quinta semana de cultivo bajo condiciones *in vitro*.

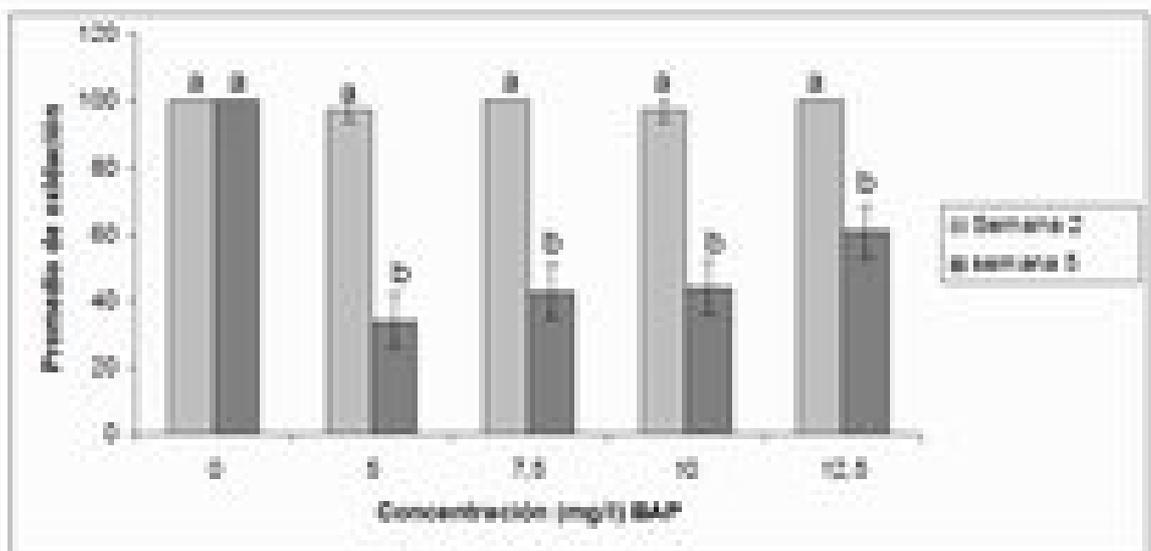


Figura 35. Efecto del BAP en la variedad Bribrí para la oxidación de los ejes embrionarios a la segunda y quinta semana de cultivo, bajo condiciones *in vitro*.

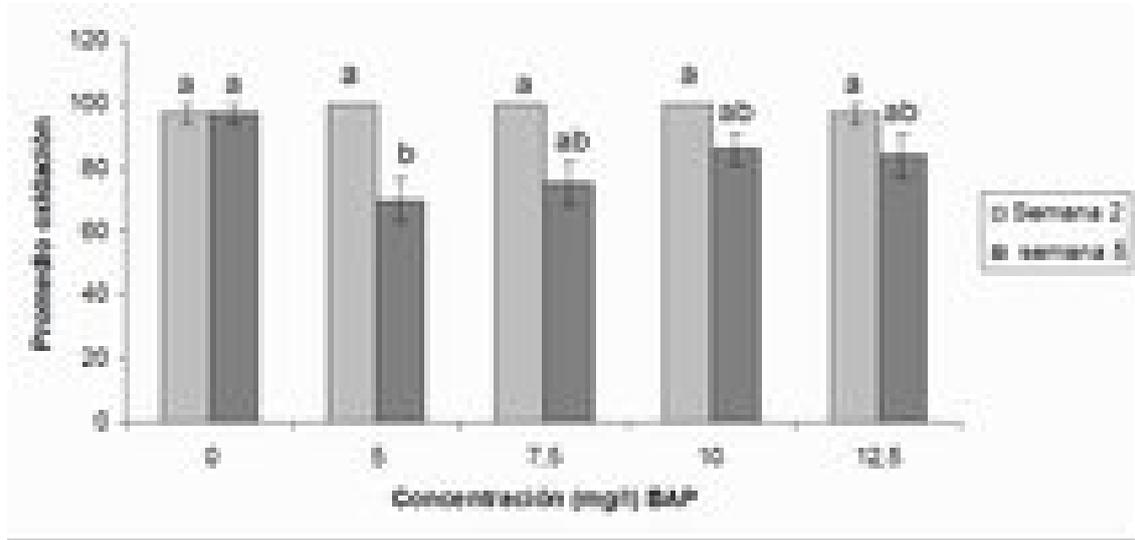


Figura 36. Efecto del BAP en la variedad Guaymí para la oxidación de los ejes embrionarios a la segunda y quinta semana de cultivo, bajo condiciones *in vitro*.

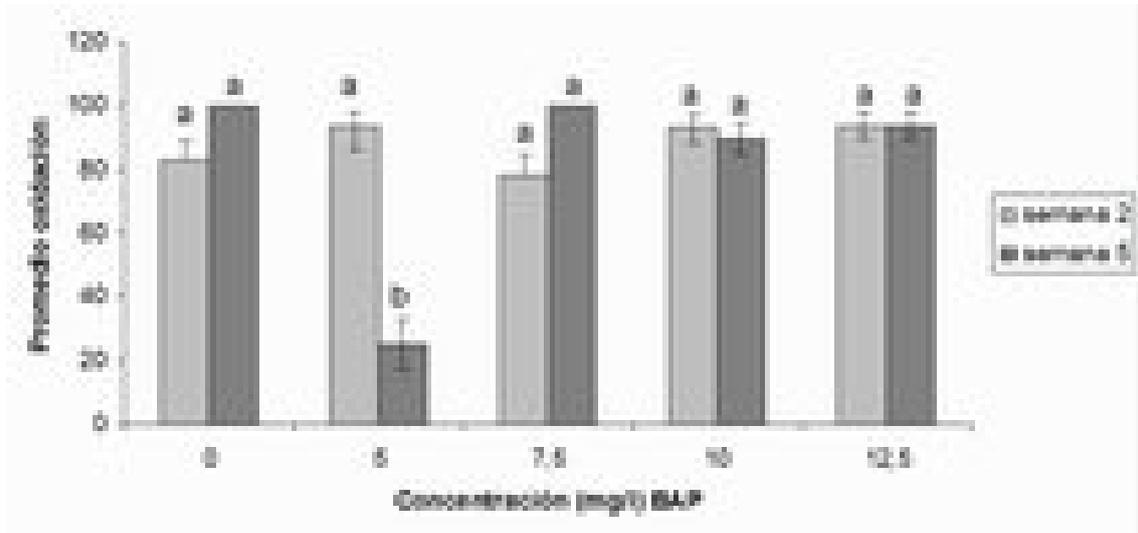


Figura 37. Efecto del BAP en la variedad Brunca para la oxidación de los ejes embrionarios a la segunda y quinta semana de cultivo bajo condiciones *in vitro*.

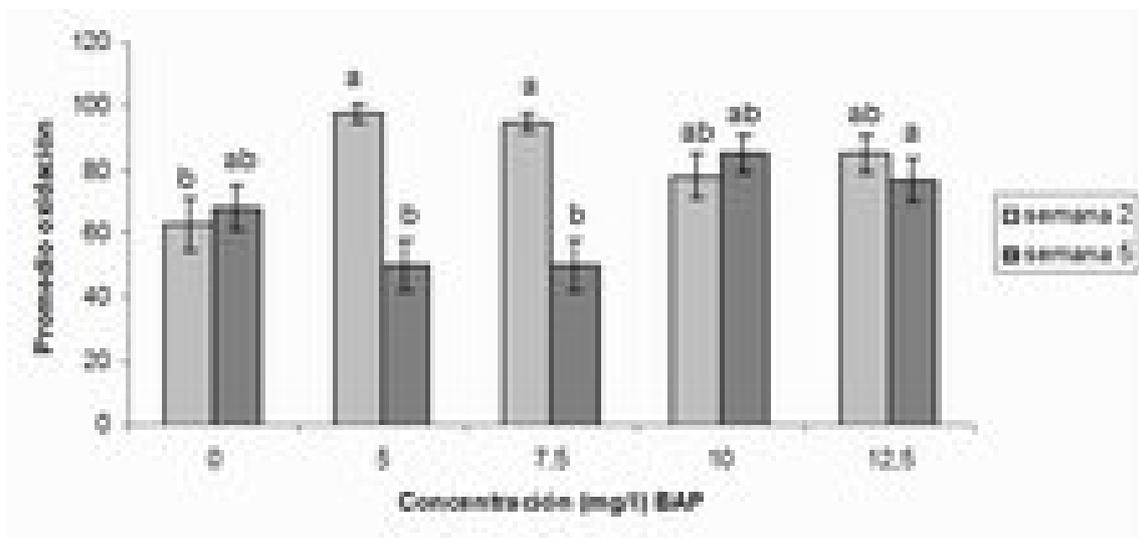


Figura 38. Efecto del BAP en la variedad Huetar para la oxidación de los ejes embrionarios a la segunda y quinta semana de cultivo bajo condiciones *in vitro*.

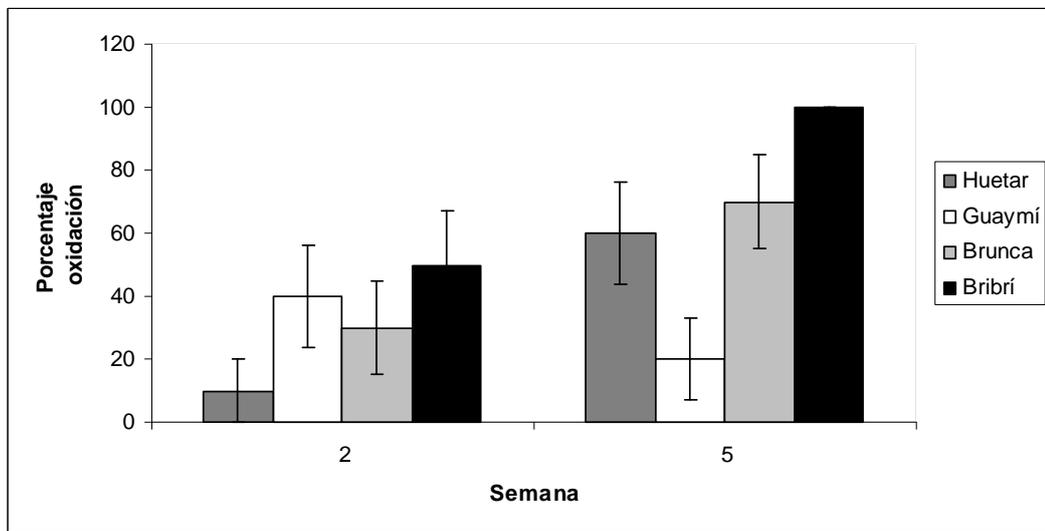


Figura 39. Porcentaje de oxidación empleando 5 mg l^{-1} de BAP en las variedades Huetar, Guaymí, Brunca y Bribri a la segunda y quinta semana de cultivo.



Figura 40. Oxidación de las plántulas a la quinta semana de cultivo *in vitro* empleando 5 mg l^{-1} . Bribrí (A), Guaymí (B), Brunca (C) y Huetar (D).

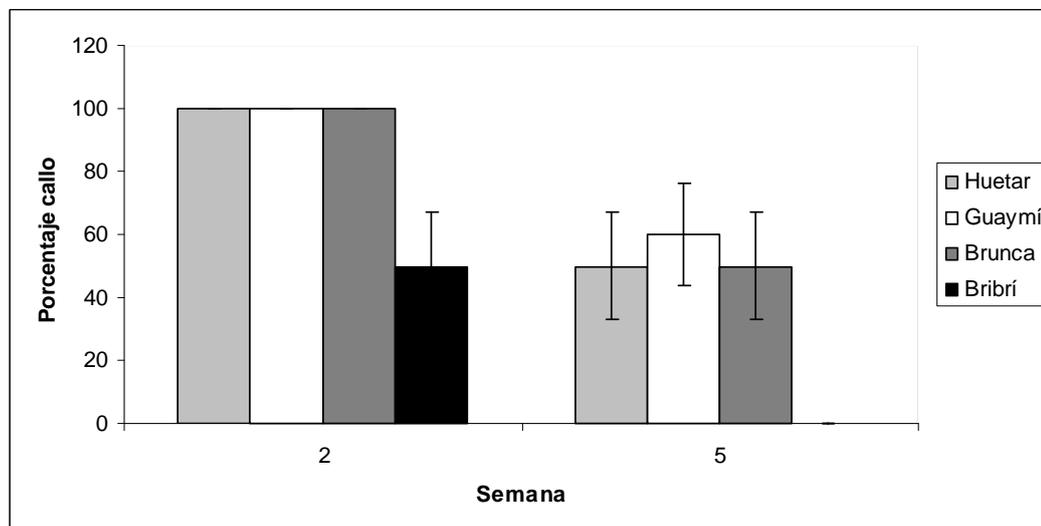


Figura 41. Porcentaje de formación de callo en las variedades Huetar, Guaymí, Brunca y Bribri empleando 5 mg l^{-1} de BAP a la segunda y quinta semana de cultivo.

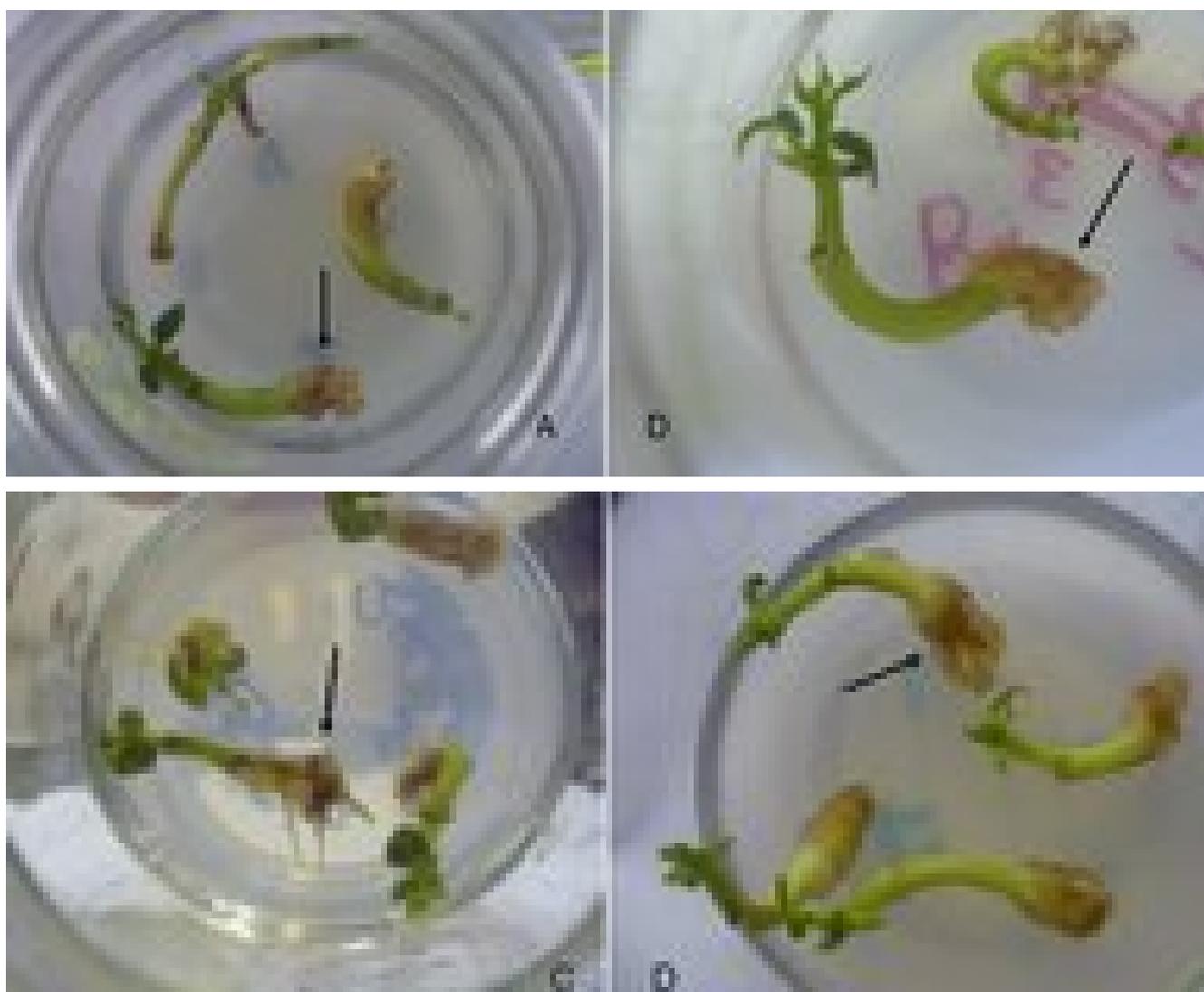


Figura 42. Formación de callo (c) de las plántulas a la segunda semana de cultivo *in vitro* empleando 5 mg l^{-1} . Bribri (A), Guaymí (B), Brunca (C) y Huetar (D).

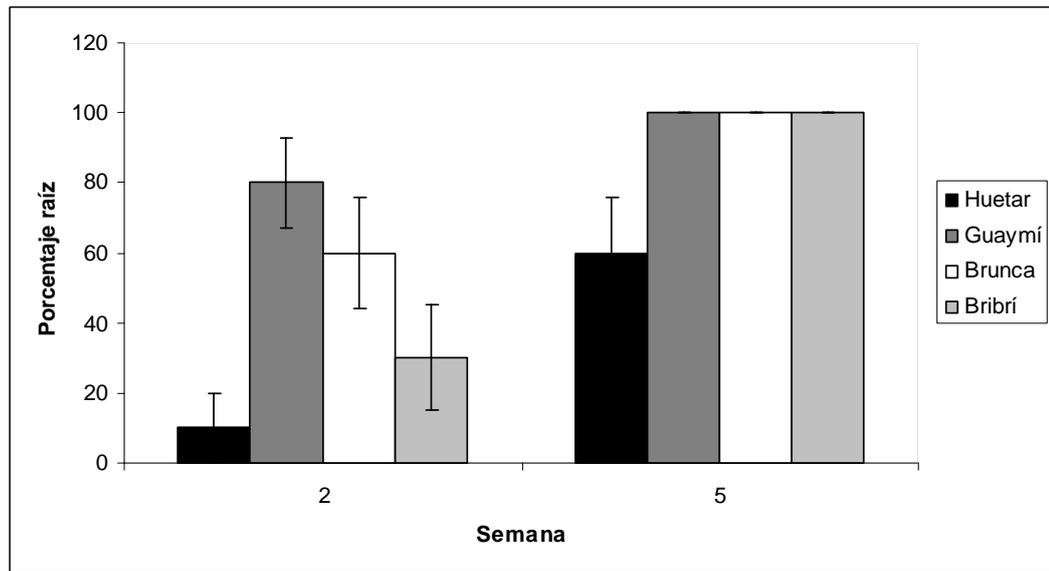


Figura 43. Promedio de formación de raíz en las variedades Huetar, Guaymí, Brunca y Bribri empleando 5 mg l⁻¹ de BAP a la segunda y quinta semana de cultivo.



Figura 44. Formación de raíz (r) de las plántulas a la quinta semana de cultivo *in vitro* empleando 5 mg/l 1.Bribri (A), Guaymí (B), Brunca (C) y Huetar (D).

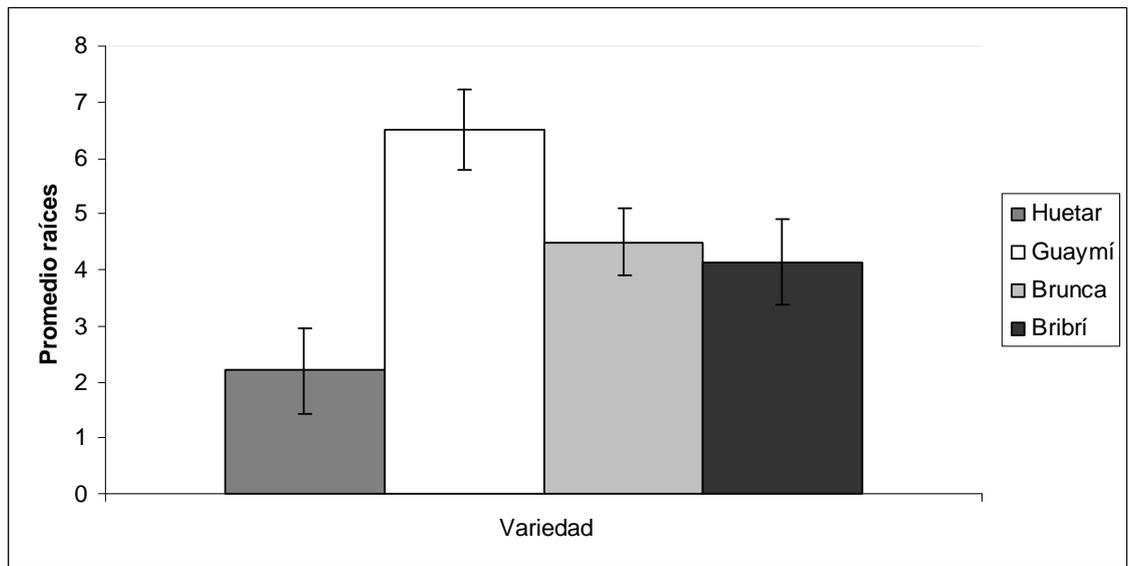


Figura 45. Promedio de raíces en las plántulas de las variedades Huetar, Guaymí, Brunca y Bribri empleando 5 mg l^{-1} de BAP a la quinta semana de cultivo.

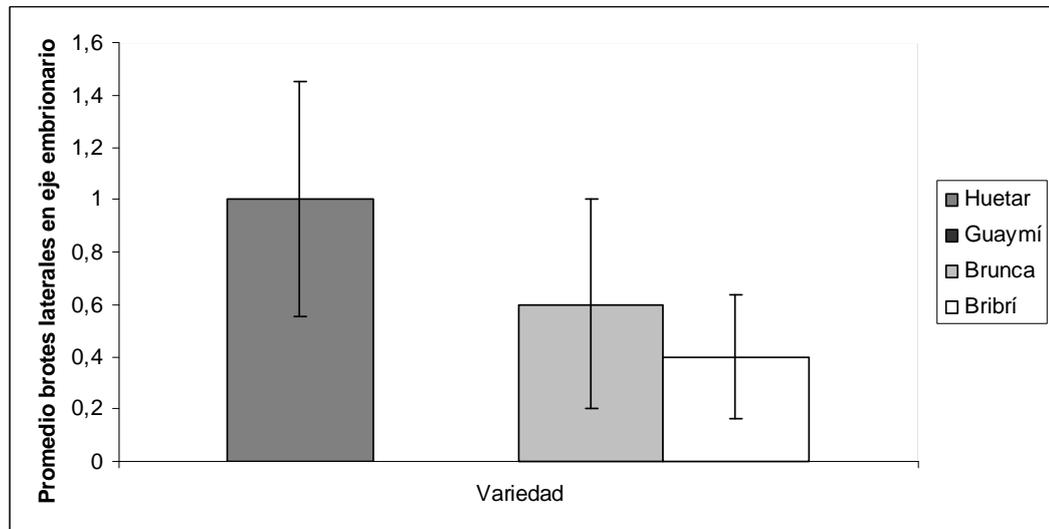


Figura 46. Promedio de brotes laterales en las cuatro variedades estudiadas empleando 5 mg l^{-1} de BAP a la quinta semana de cultivo *in vitro*.

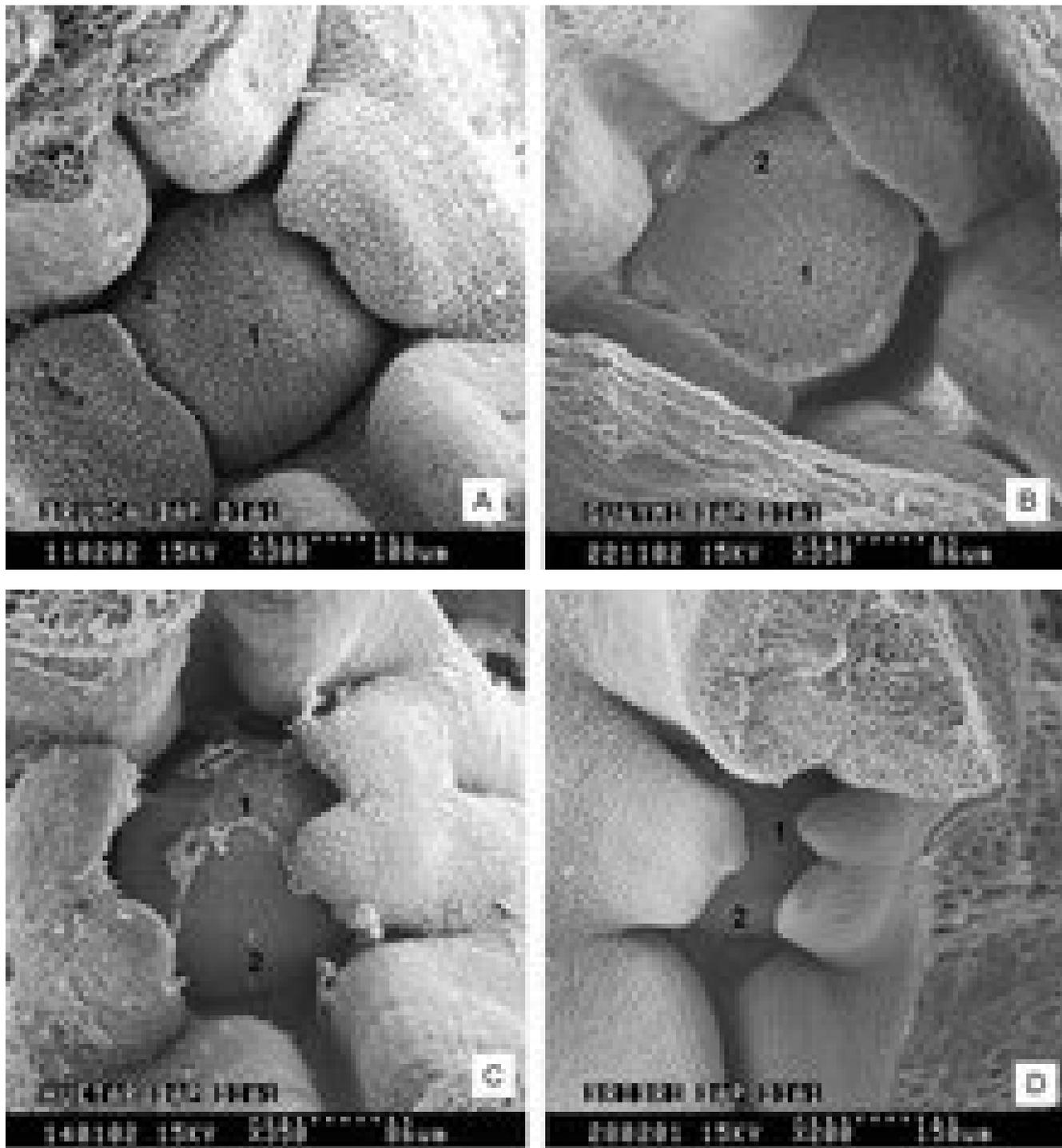


Figura 47. Superficie del domo apical para cada una de las cuatro variedades de frijol al día 1 de cultivo en medio MS complementado con 5 mg l^{-1} de BAP.

(A) Brunca. El área delimitada (a) corresponde epidermis con células menos definidas, (b) epidermis con células más definidas, (p) primordios jóvenes. Esc. $4,5 \text{ cm}=100 \mu\text{m}$.

(B) Guaymí. Esc. $4,5 \text{ cm}=86 \mu\text{m}$.

(C) Huetar. Esc. $4,5 \text{ cm}=86 \mu\text{m}$.

(D) Bribrí. Esc. $4,5 \text{ cm}=150 \mu\text{m}$.

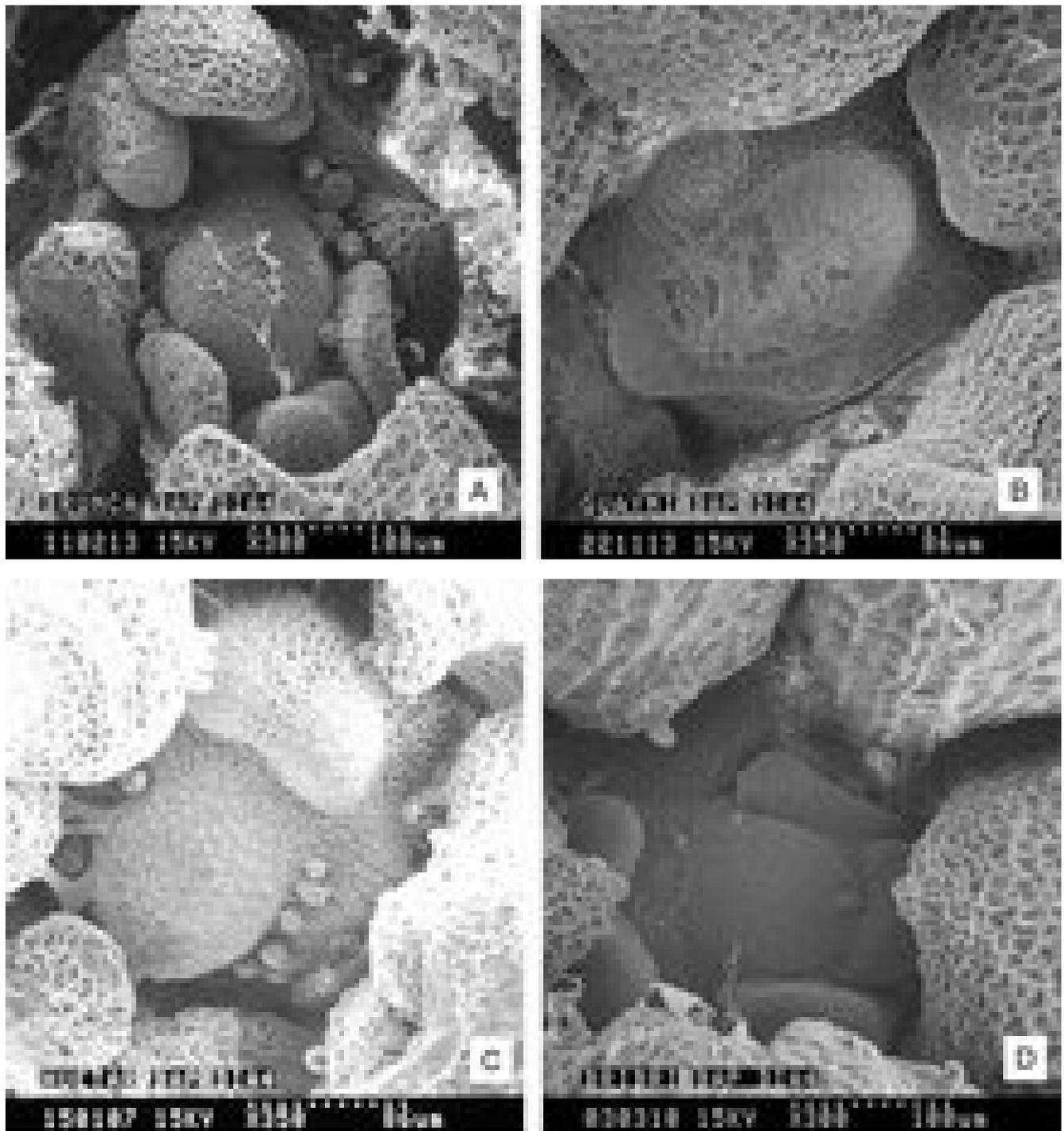


Figura 48. Domo apical al cuarto día de cultivo en medio MS complementado con 5 mg l^{-1} de BAP. Se observa la formación de hojas (a) que rodean el domo.

- (A) Brunca. Esc. $4,5 \text{ cm}=100 \mu\text{m}$.
- (B) Guaymí. Esc. $4,5 \text{ cm}=86 \mu\text{m}$.
- (C) Huetar. Esc. $4,5 \text{ cm}=86 \mu\text{m}$.
- (D) Bribri. Esc. $4,5 \text{ cm}=100 \mu\text{m}$.

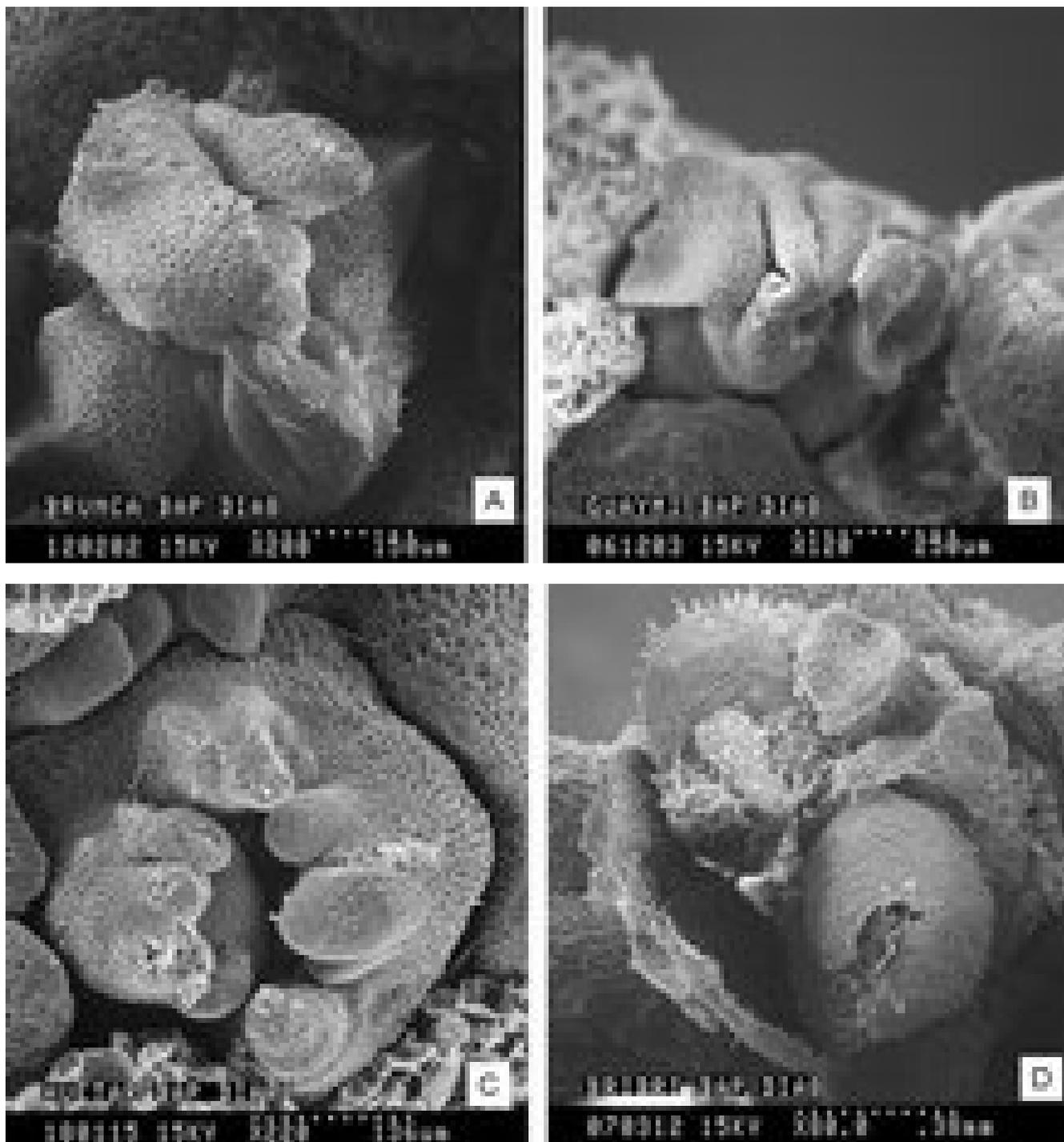


Figura 49. Extremo apical al octavo día de cultivo en medio MS complementado con 5 mg l⁻¹ de BAP.

- (A) Brunca. Obsérvese las hojas que cubren el domo. Esc. 4,5 cm=150 μm.
- (B) Guaymí. Formación de cinco hojas jóvenes. Esc. 4,5 cm=250 μm.
- (C) Huetar. la formación de dos brotes (b). Esc. 4,5 cm=136 μm.
- (D) Bribrí. Hojas con abundante cantidad de tricomas. Esc. 4,5 cm=0,38 mm.

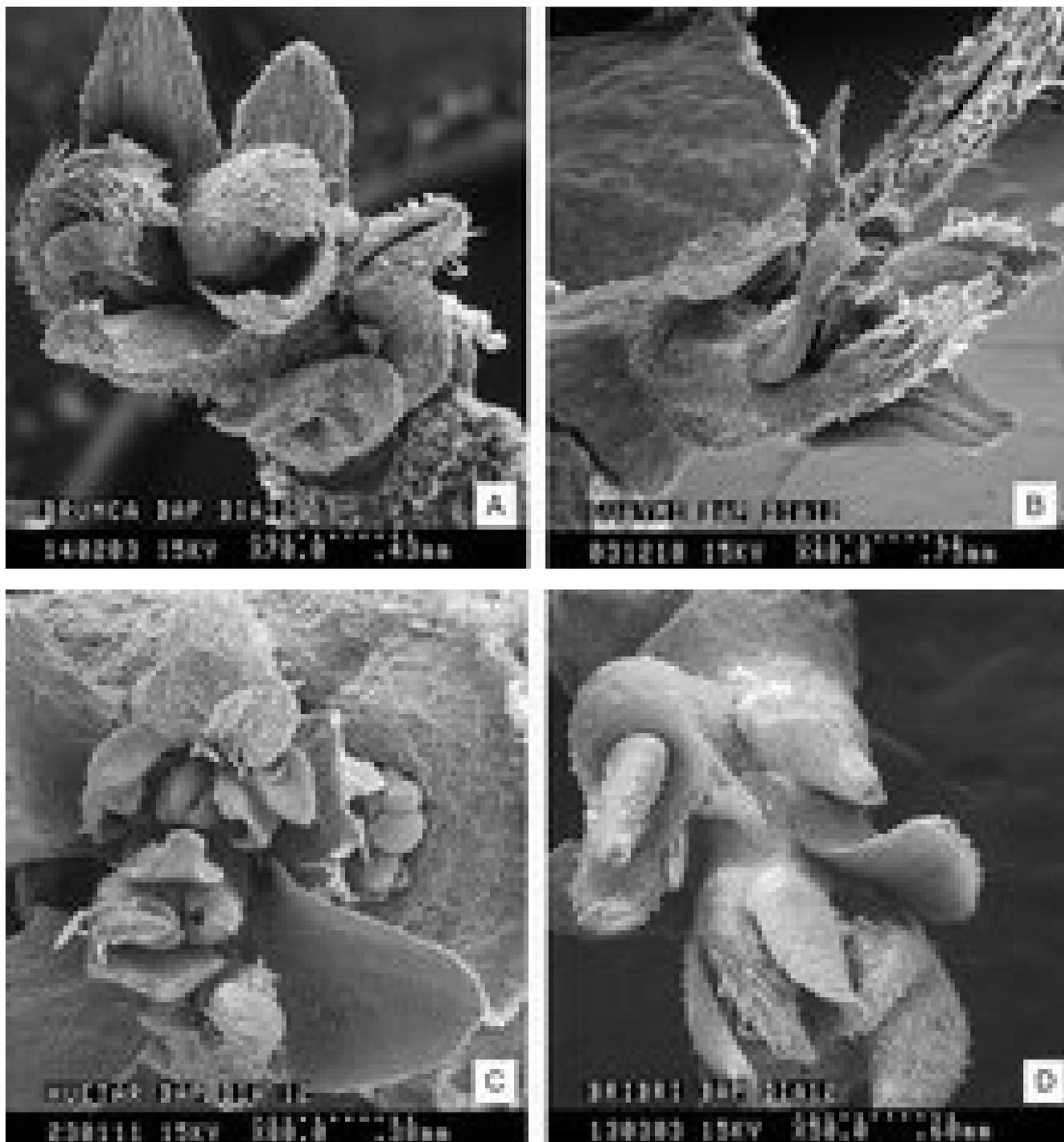


Figura 50. Meristemo apical de frijol a los doce días de cultivo en medio MS complementado con 5 mg l^{-1} .

(A) Brunca. Obsérvese la formación de 2 brotes cubiertos por tricomas maduros. Esc. $4,5 \text{ cm}=0,43 \text{ mm}$.

(B) Guaymí. Formación de dos brotes, se encuentran cubiertos por tricomas. Esc. $4,5 \text{ cm}=0,75 \text{ mm}$.

(C) Huetar. Cuatro brotes formados. Esc. $4,5 \text{ cm}=0,38 \text{ mm}$.

(D) Bribrí. Formación de tres brotes. Tricomas maduros sobresalen de los brotes. Esc. $4,5 \text{ cm}=0,60 \text{ mm}$.

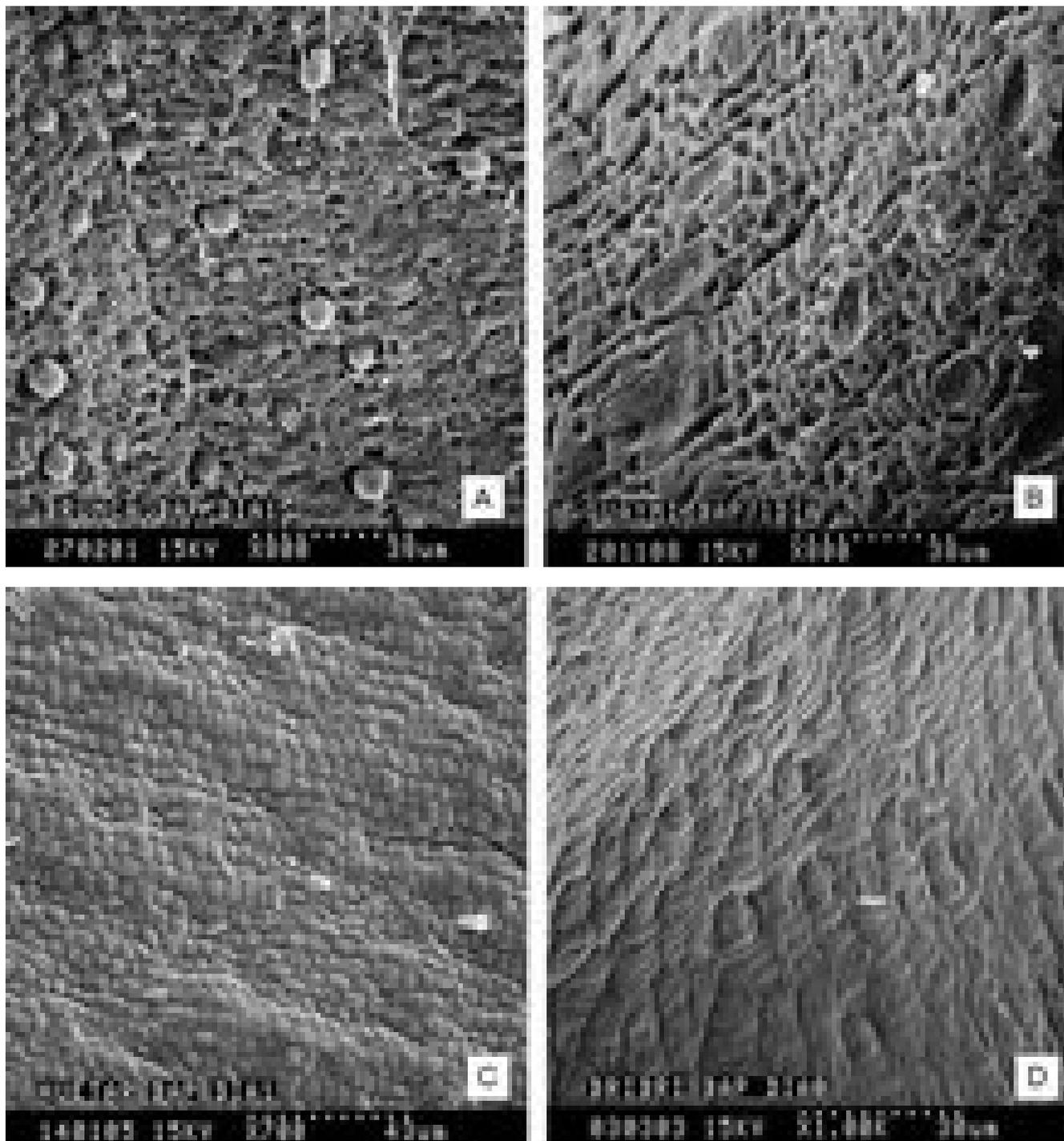


Figura 51. Epicótilo de frijol al día de cultivo en medio MS complementado con 5 mg l^{-1} .

(A) Brunca. Papilas colapsadas, obsérvese los tricomas globulares. Esc. $4,5 \text{ cm}=38 \mu\text{m}$

(B) Guaymí. Epidermis irregular. Esc. $4,5 \text{ cm}=38 \mu\text{m}$

(C) Huetar. Papilas, obsérvese el posible origen de tricomas o de estomas. Esc. $4,5 \text{ cm}=43 \mu\text{m}$

(D) Bribrí. Papilas colapsadas. Formación de estomas. Esc. $4,5 \text{ cm}=30 \mu\text{m}$

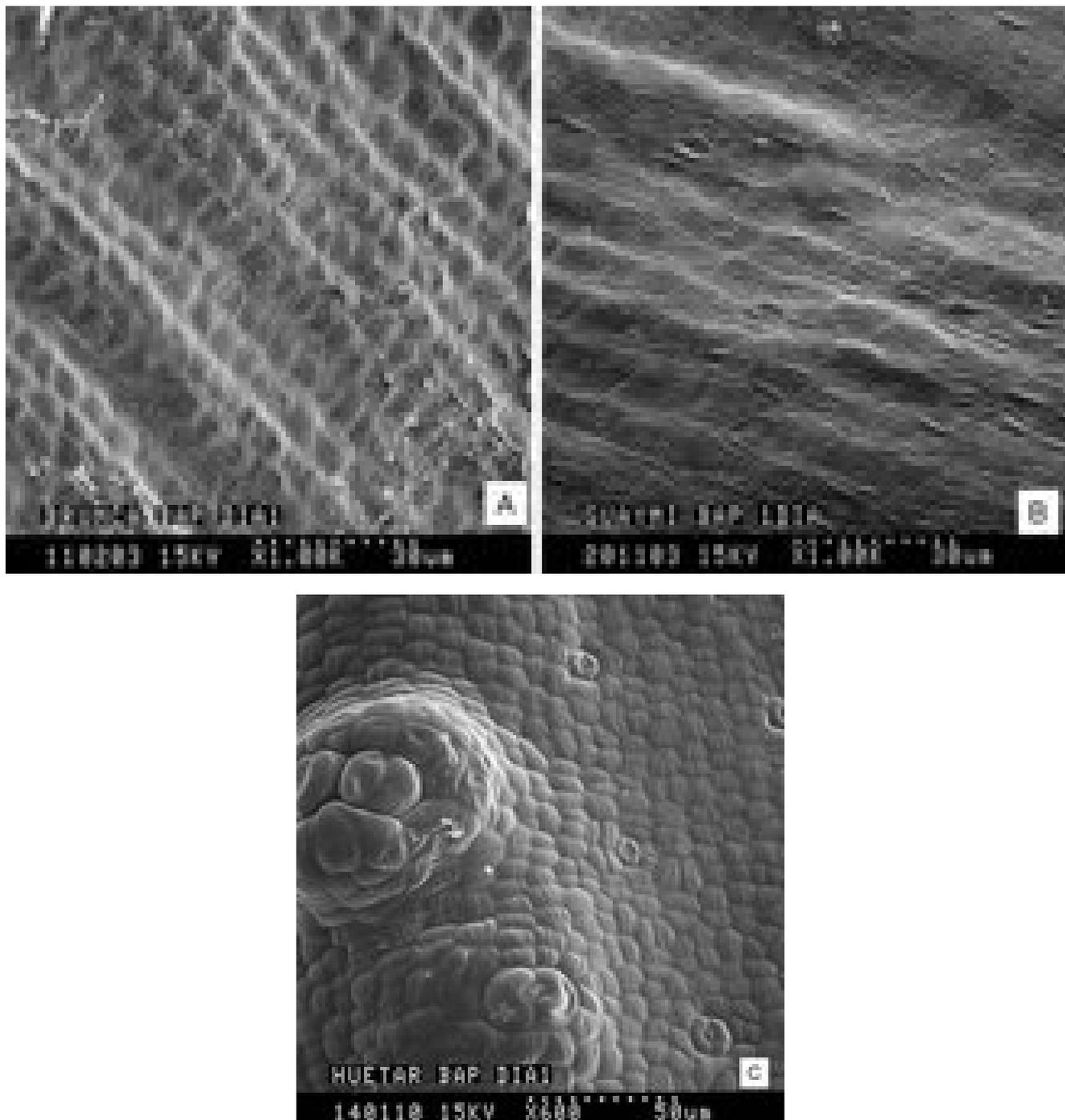


Figura 52. Hipocótilo de frijol al día de cultivo en medio MS complementado con 5 mg l^{-1} .

(A) Brunca, papilas con cera. Esc. $4,5 \text{ cm}=30 \mu\text{m}$

(B) Guaymí, epidermis lisa. Esc. $4,5 \text{ cm}=30 \mu\text{m}$

(C) Huetar, papilas, con estomas desarrollados Esc. $4,5 \text{ cm}=50 \mu\text{m}$



Figura 53. Epidermis de Guaymí a través del tiempo en medio MS complementado con 5 mg l^{-1} de BAP al día uno de cultivo.

(A) Eje embrionario, se marca donde inicia el epicótilo (1) y el hipocótilo (2). Esc. $4,5 \text{ cm}=100 \mu\text{m}$

(C) Panorámica, obsérvese la epidermis irregular (1) del epicótilo y lisa (2) del hipocótilo. Esc. $4,5 \text{ cm}=1 \text{ mm}$.

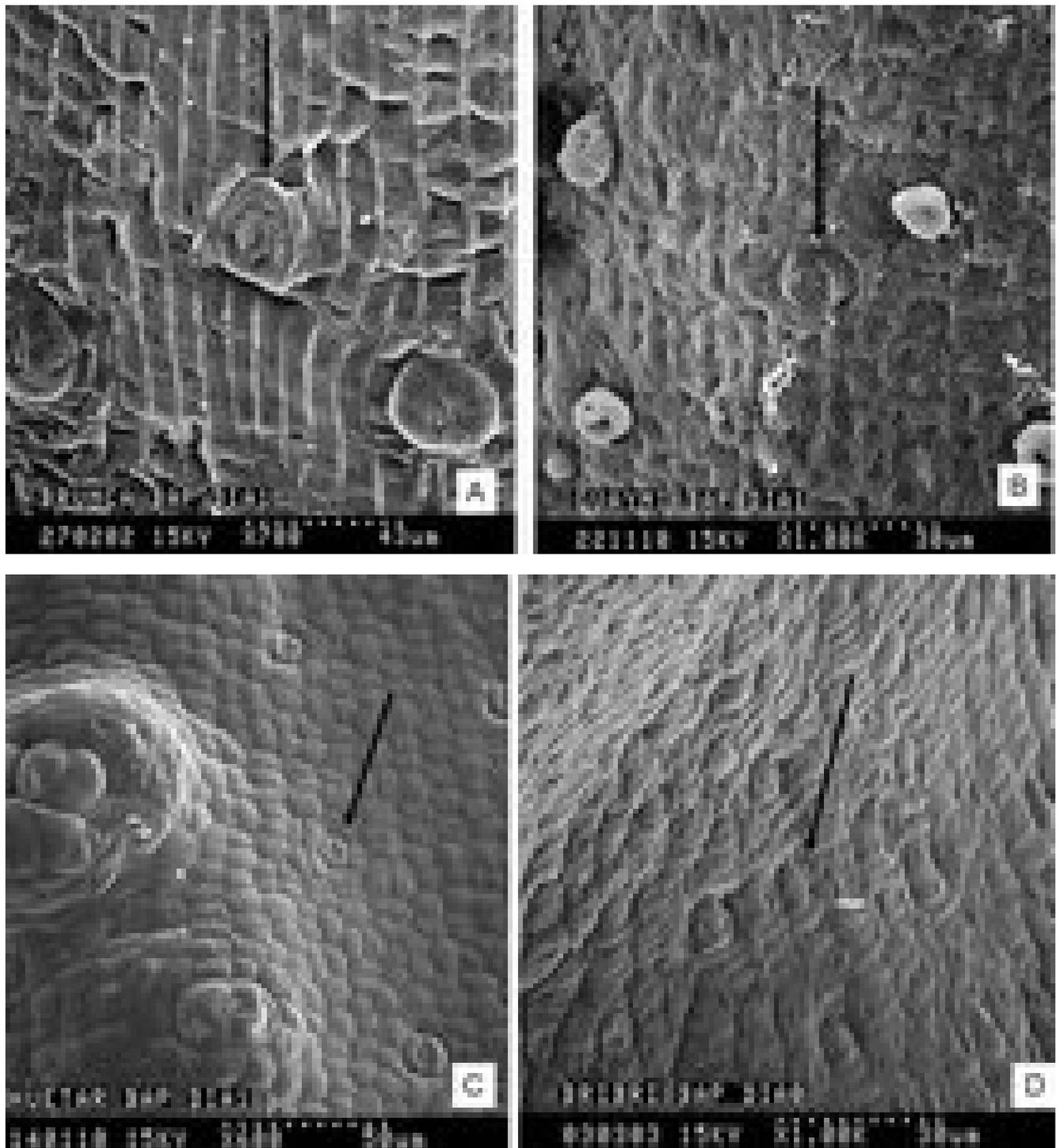


Figura 54. Desarrollo de los estomas al día uno de cultivo en medio MS complementado con 5 mg l^{-1} de BAP

- (A) Brunca. Estoma parásítico al nivel de las células epidérmicas. Esc. $4,5 \text{ cm}=43 \mu\text{m}$
- (B) Guaymí. Estoma parásítico al nivel de las células epidérmicas, obsérvese tricomas globulares. Esc. $4,5 \text{ cm}=30 \mu\text{m}$
- (C) Huetar. Estoma parásítico al nivel de las células epidérmicas. Esc. $4,5 \text{ cm}=50 \mu\text{m}$
- (D) Bribrí. Estoma parásítico al nivel de las células epidérmicas. Esc. $4,5 \text{ cm}=30 \mu\text{m}$

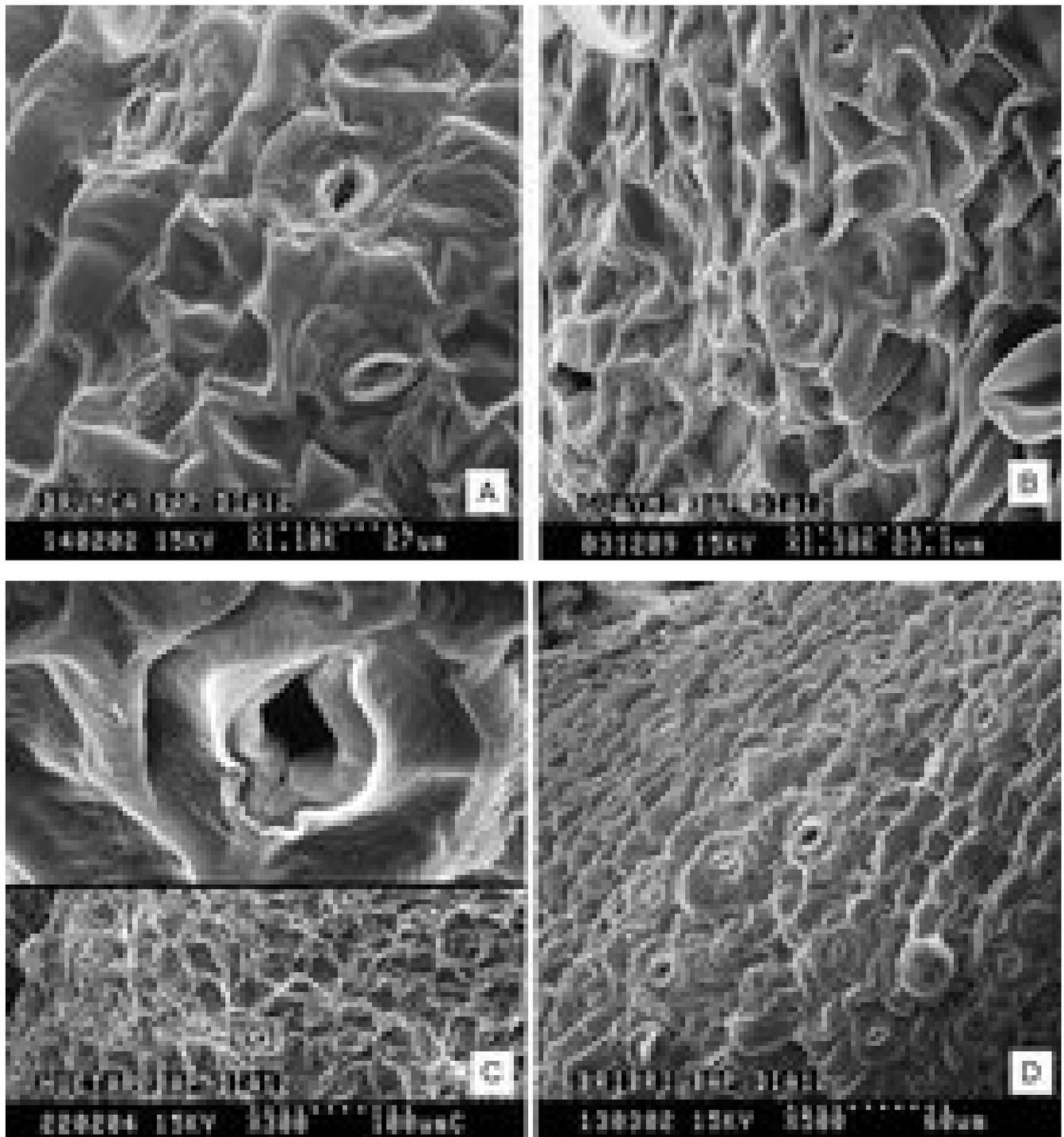


Figura 55. Desarrollo de los estomas al día doce en medio MS complementado con 5 mg l^{-1} de BAP.

(A) Brunca. Estoma abierto en hoja. Esc. $4,5 \text{ cm}=27 \mu\text{m}$

(B) Guaymí. Estoma en superficie abaxial. Esc. $4,5 \text{ cm}=23,1 \mu\text{m}$

(C) Huetar. Detalle estoma abierto. Esc. $4,5 \text{ cm}=100 \mu\text{m}$

(D) Bribrí. Estomas abiertos. Esc. $4,5 \text{ cm}=60 \mu\text{m}$.

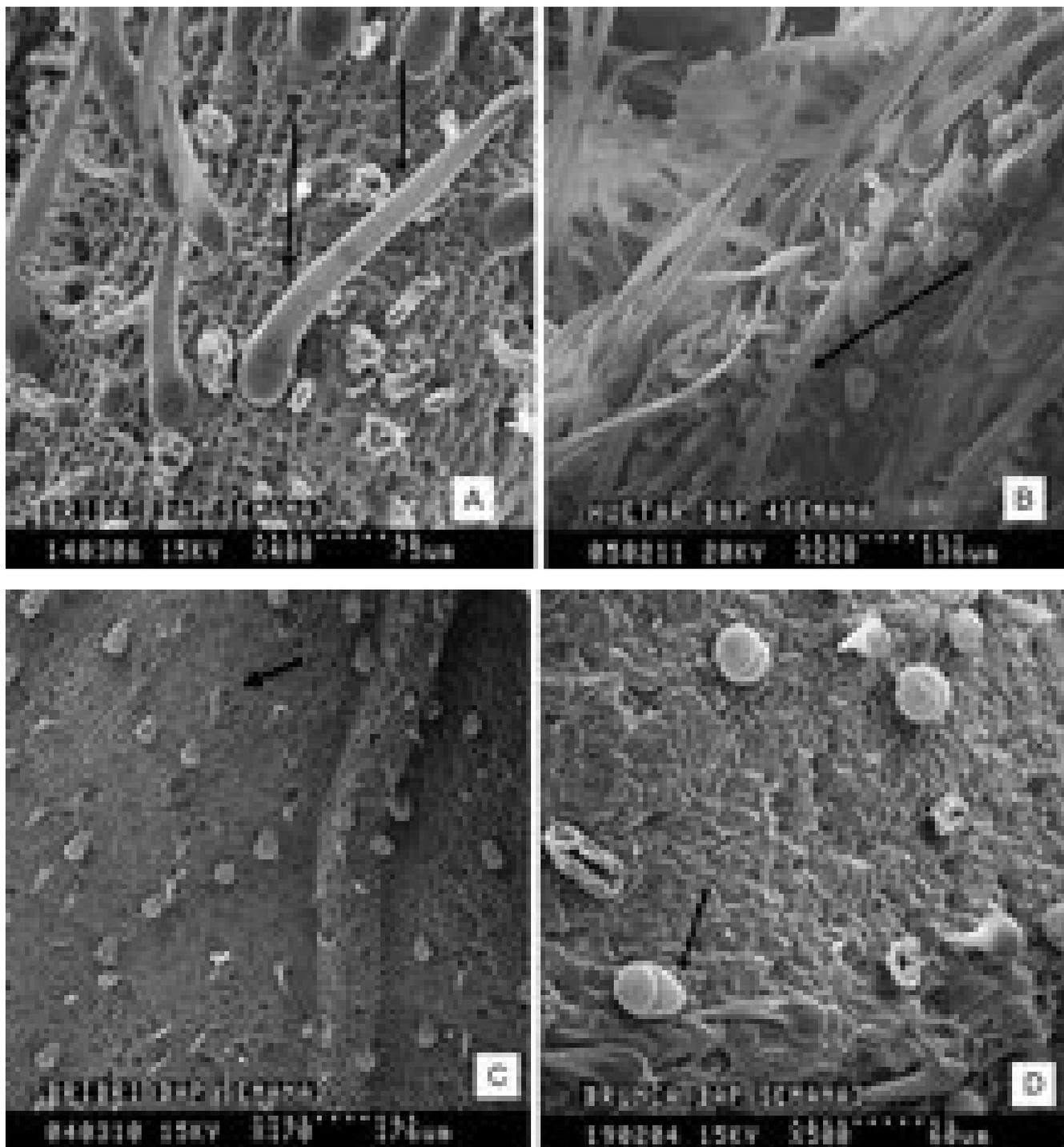


Figura 56. Tricomas presentes en frijol en medio MS complementado con 5 mg l^{-1} de BAP.

(A) Pluricelular largo, note las dos células que lo forma Esc. $4,5 \text{ cm}=75 \mu\text{m}$

(B) Unicelular largo. Esc. $4,5 \text{ cm}=136 \mu\text{m}$

(C) Unicelular corto (flecha), en vena central y láminas foliares de las hojas. Esc. $4,5 \text{ cm}=176 \mu\text{m}$

(D) Globular corto pluricelular (flecha). Esc. $4,5 \text{ cm}=60 \mu\text{m}$

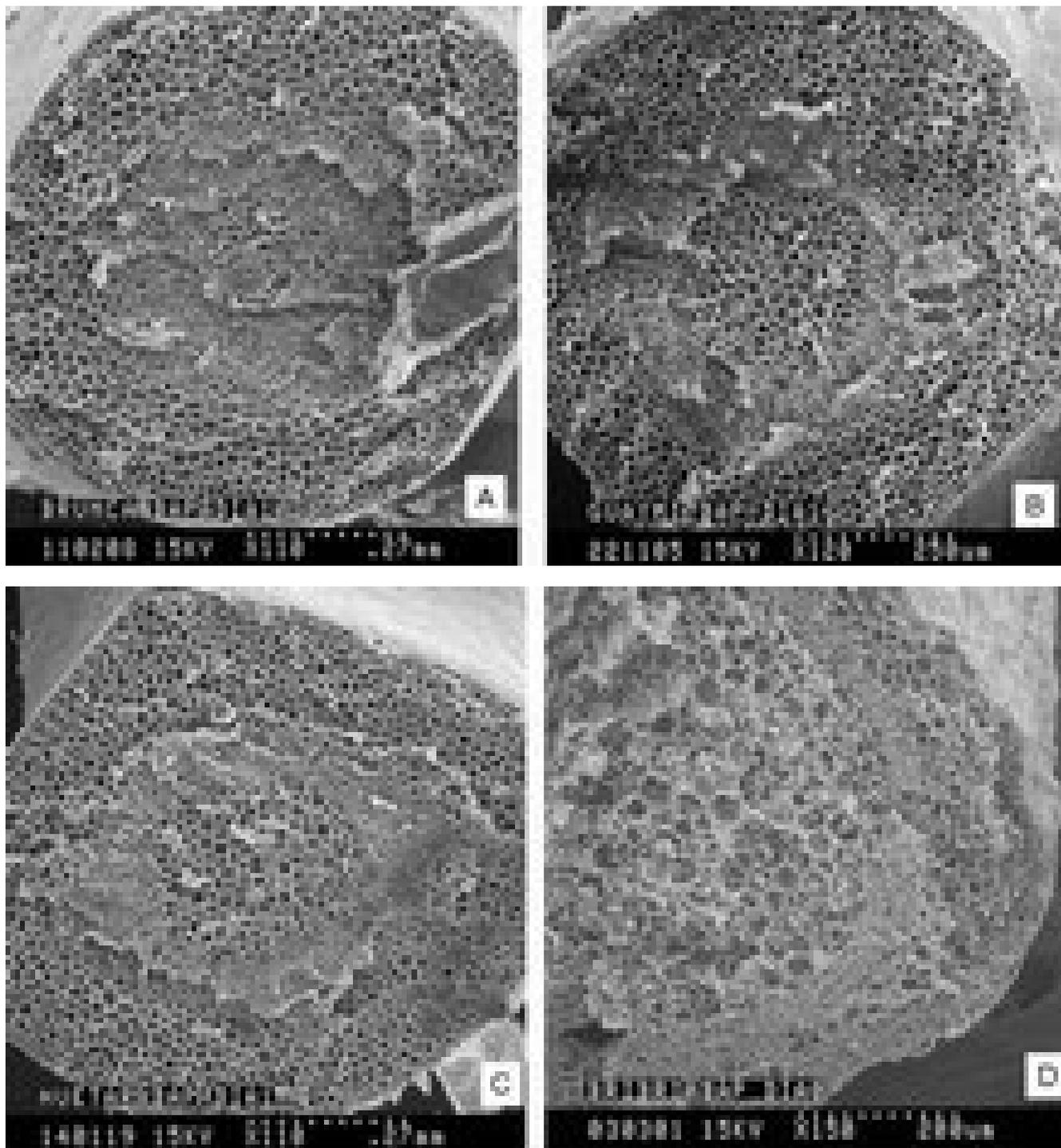


Figura 57. Corte transversal de tallo con un día de cultivo en medio MS complementado con 5 mg l^{-1} de BAP.

- (A) Brunca. Esc. $4,5 \text{ cm}=0,27 \text{ mm}$.
- (B) Guaymí. Esc. $4,5 \text{ cm}=250 \mu\text{m}$.
- (C) Huetar. Esc. $4,5 \text{ cm}=0,27 \text{ mm}$.
- (D) Bribrí, corte colapsado. Esc. $4,5 \text{ cm}=200 \mu\text{m}$.

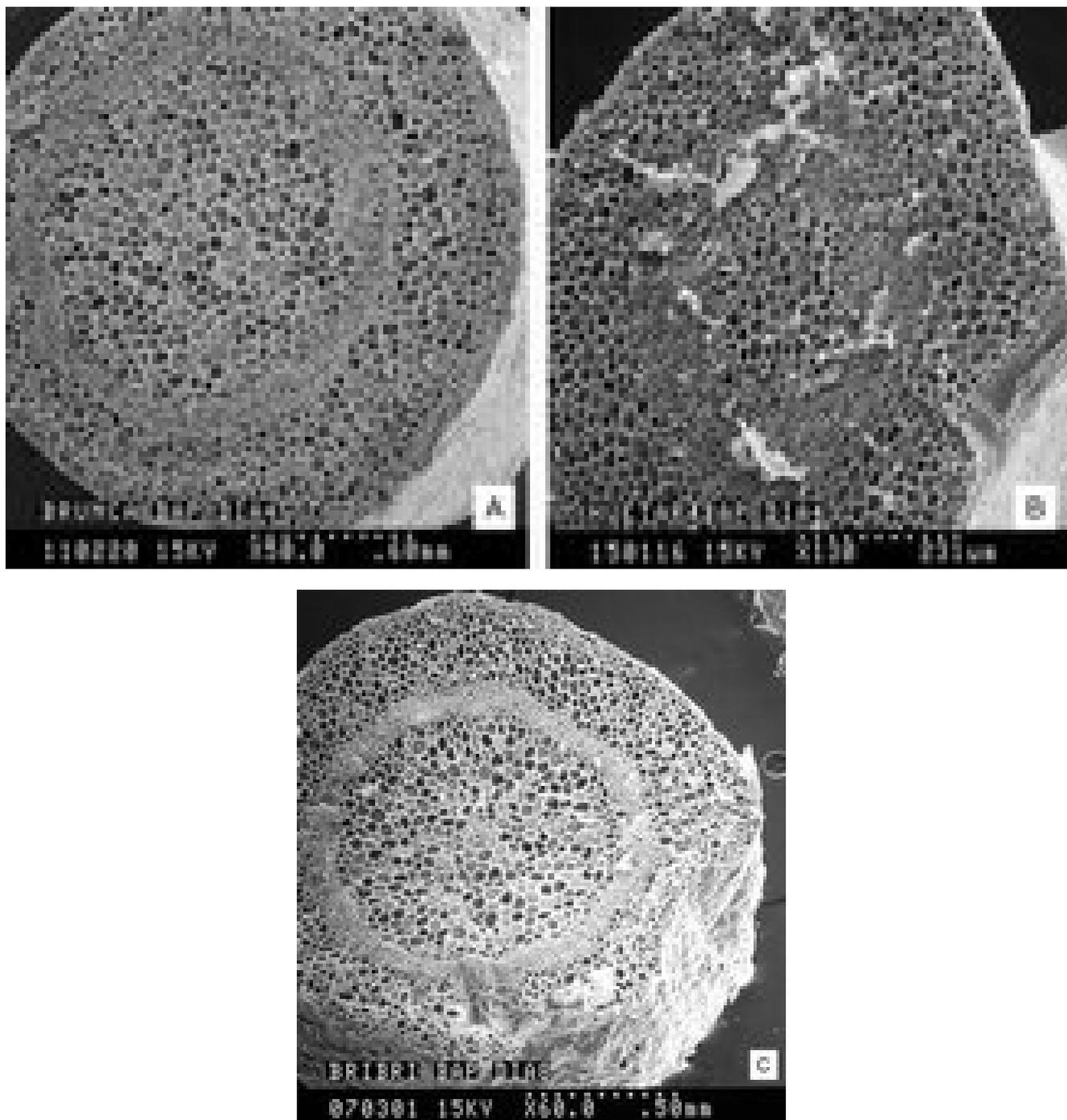


Figura 58. Corte transversal de tallo al día cuatro en medio MS complementado con 5mg l^{-1} de BAP

(A) Brunca. Obsérvese el parénquima de la corteza y de la médula, el cilindro vascular y la epidermis. Esc. $4,5\text{ cm}=0,60\text{ mm}$

(B) Guaymí. Obsérvese el parénquima de la corteza y de la médula, el cilindro vascular y la epidermis. Esc. $4,5\text{ cm}=231\text{ }\mu\text{m}$

(C) Bribí. Obsérvese el parénquima de la corteza y de la médula, el cilindro vascular y la epidermis. Esc. $4,5\text{ cm}=0,50\text{ mm}$

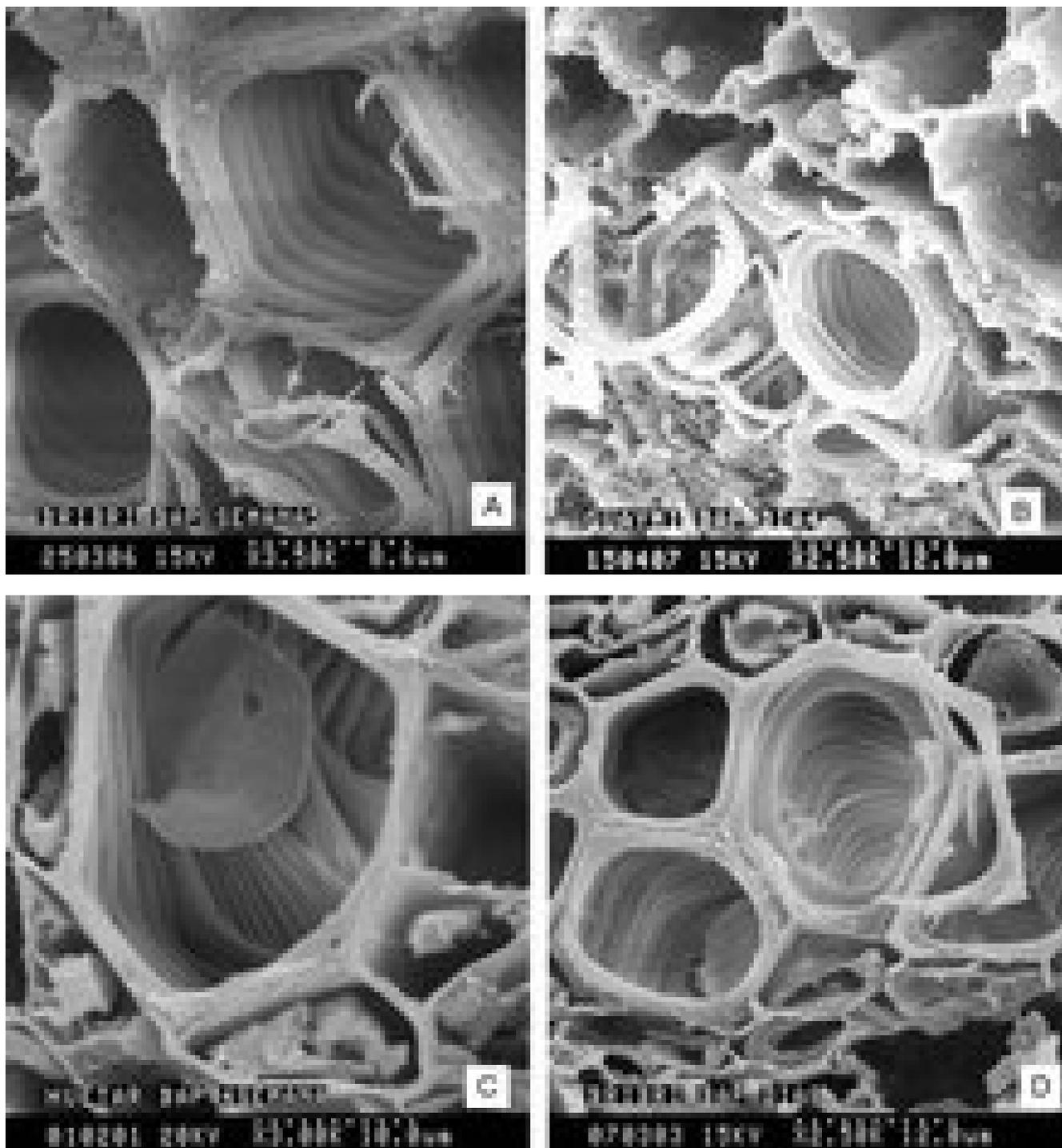


Figura 59. Elementos de los vasos con ornamentaciones tipo helicoidal en la pared lateral secundaria, en medio MS complementado con 5 mg l^{-1} de BAP.

- (A) Brunca. Esc. $4,5 \text{ cm}=8,6 \mu\text{m}$
- (B) Guaymí. Esc. $4,5 \text{ cm}=12 \mu\text{m}$
- (C) Huetar. Esc. $4,5 \text{ cm}=10 \mu\text{m}$
- (D) Bribí. Esc. $4,5 \text{ cm}=12 \mu\text{m}$

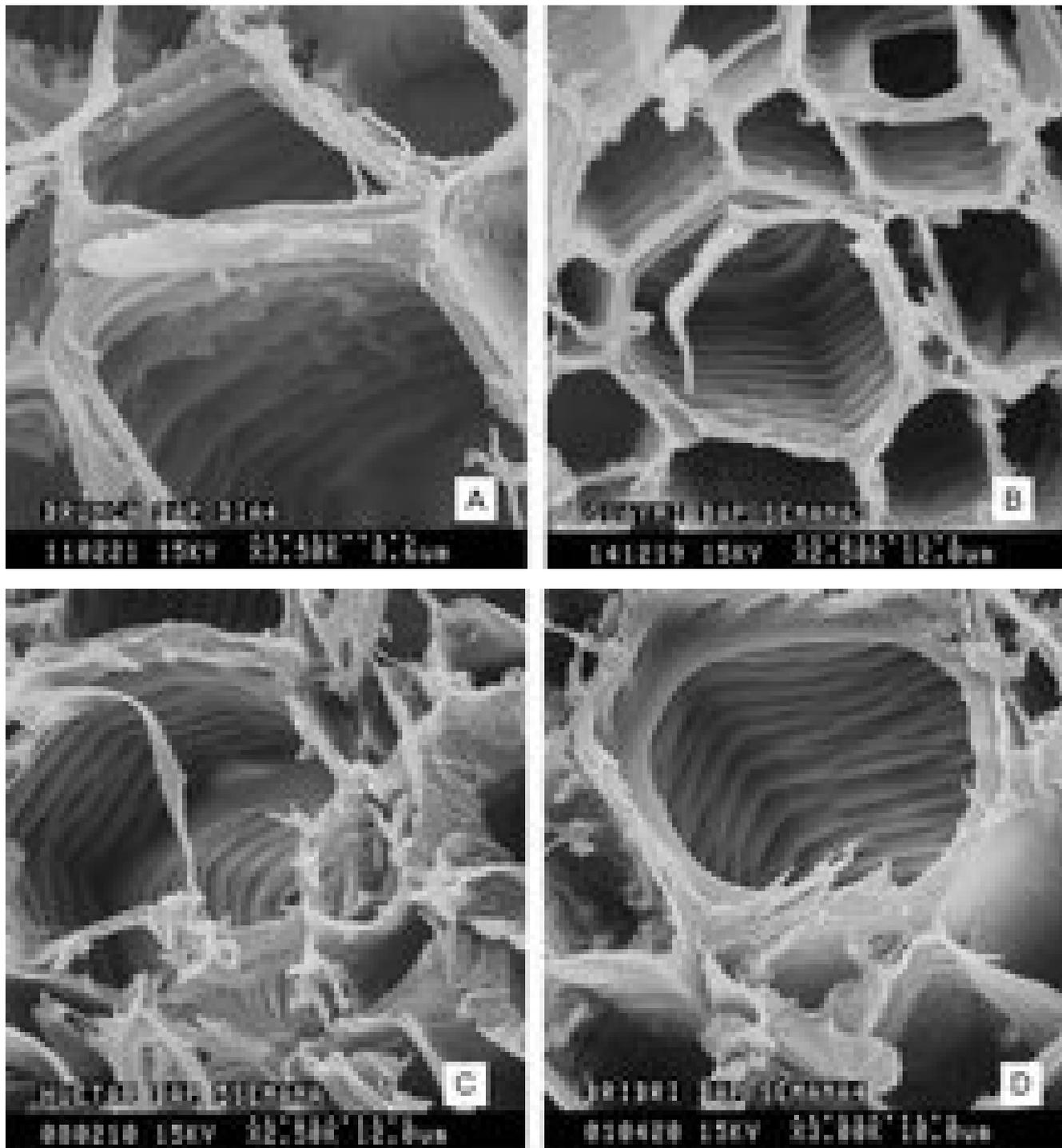


Figura 60. Elementos de los vasos con ornamentaciones tipo escalariforme en la pared lateral secundaria, en medio MS complementado con 5 mg l^{-1} de BAP.

- (A) Brunca. Esc. $4,5 \text{ cm}=8,6 \mu\text{m}$
- (B) Guaymí. Esc. $4,5 \text{ cm}=12 \mu\text{m}$
- (C) Huetar. Esc. $4,5 \text{ cm}=12 \mu\text{m}$
- (D) Bribrí. Esc. $4,5 \text{ cm}=10 \mu\text{m}$

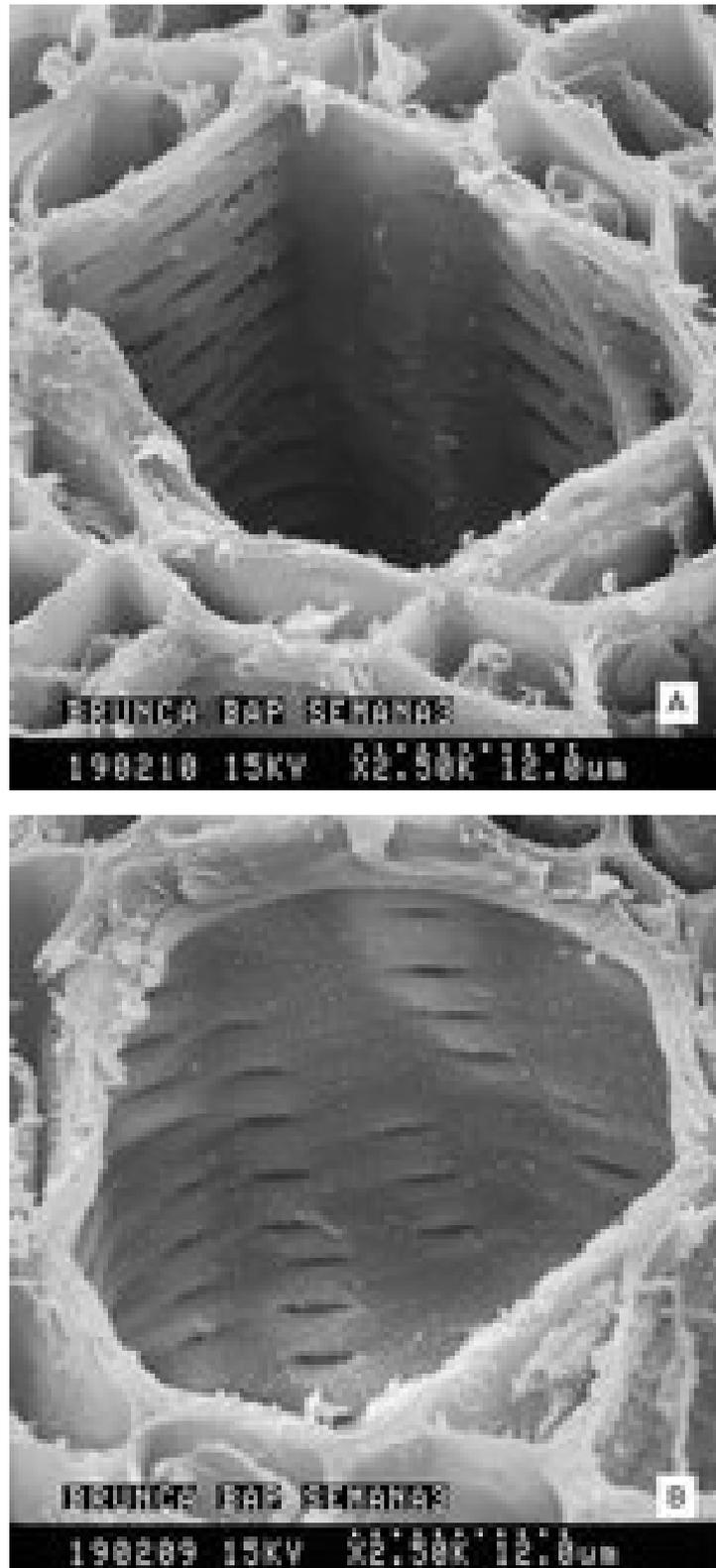


Figura 61. Tipos de puntuaciones en las paredes laterales de los elementos de los vasos, en medio MS complementado con 5 mg l^{-1} de BAP.

(A) Opuestas presentes en Brunca. Esc. $4,5 \text{ cm}=12 \mu\text{m}$

(B) Escalariforme en Brunca. Esc. $4,5 \text{ cm}=12 \mu\text{m}$



Figura 62. Desarrollo de los ejes embrionarios a la semana uno de cultivo, en condiciones *ex vitro*. (A) Bribrí. (B) Brunca. (C) Guaymí y (D) Huetar.



Figura 63. Desarrollo de los ejes embrionarios a la semana cinco de cultivo, en condiciones *ex vitro*. (A) Bribrí. (B) Brunca. (C) Guaymí y (D) Huetar.

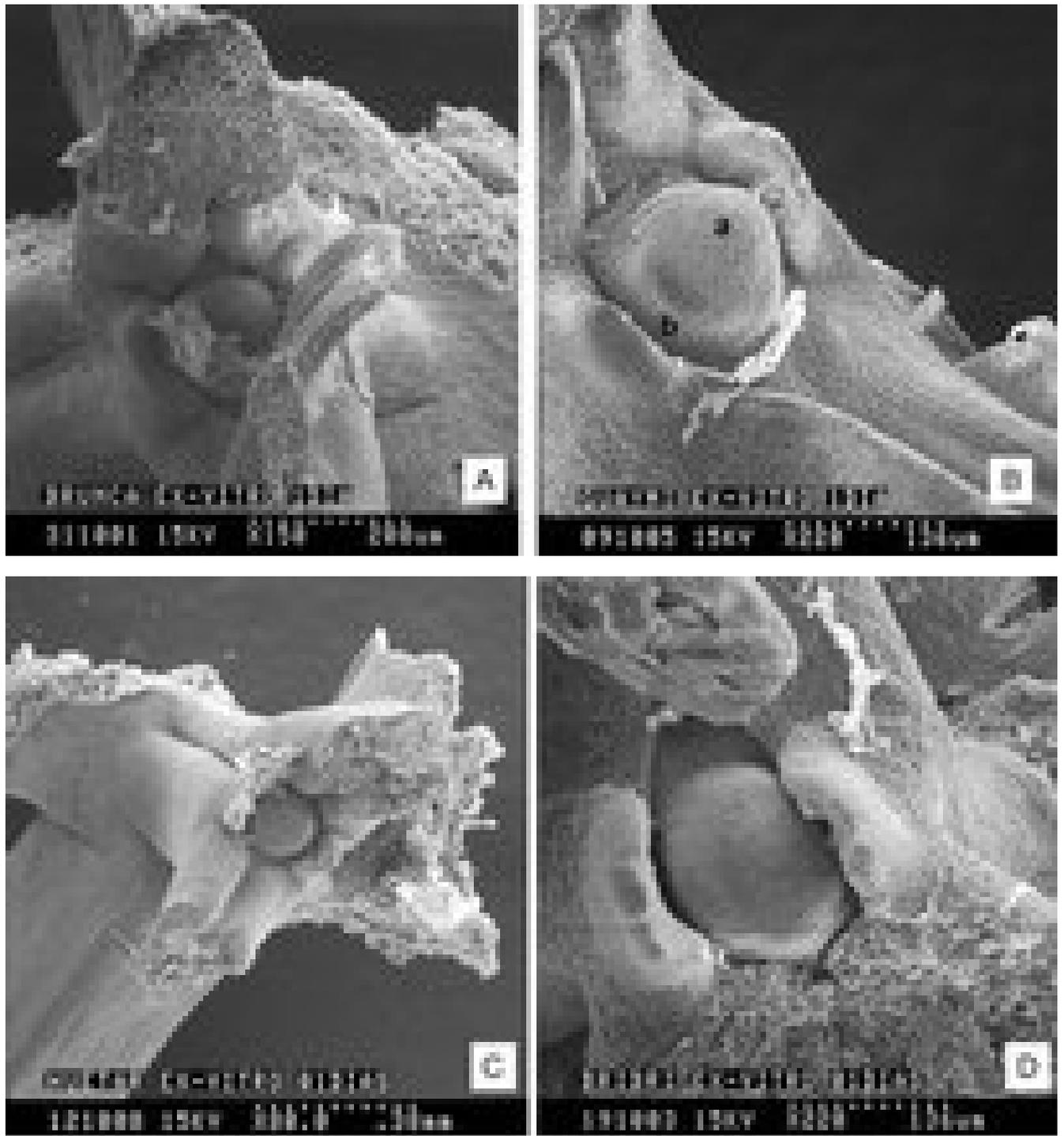


Figura 64. Domo frijol a los 0 de días de cultivo *ex vitro*.

- (A) Domo se observa cubierto por primordio viejo. Esc. 4,5 cm=200 μ m
- (B) Células irregulares en el extremo (a) y definidas en la parte inferior (b). igual característica se observa en las cuatro variedades. Esc. 4,5 cm=136 μ m
- (C) Panorámica del eje embrionario. Esc. 4,5 cm=0,38 mm
- (D) Domo expuesto. Esc. 4,5 cm=136 μ m

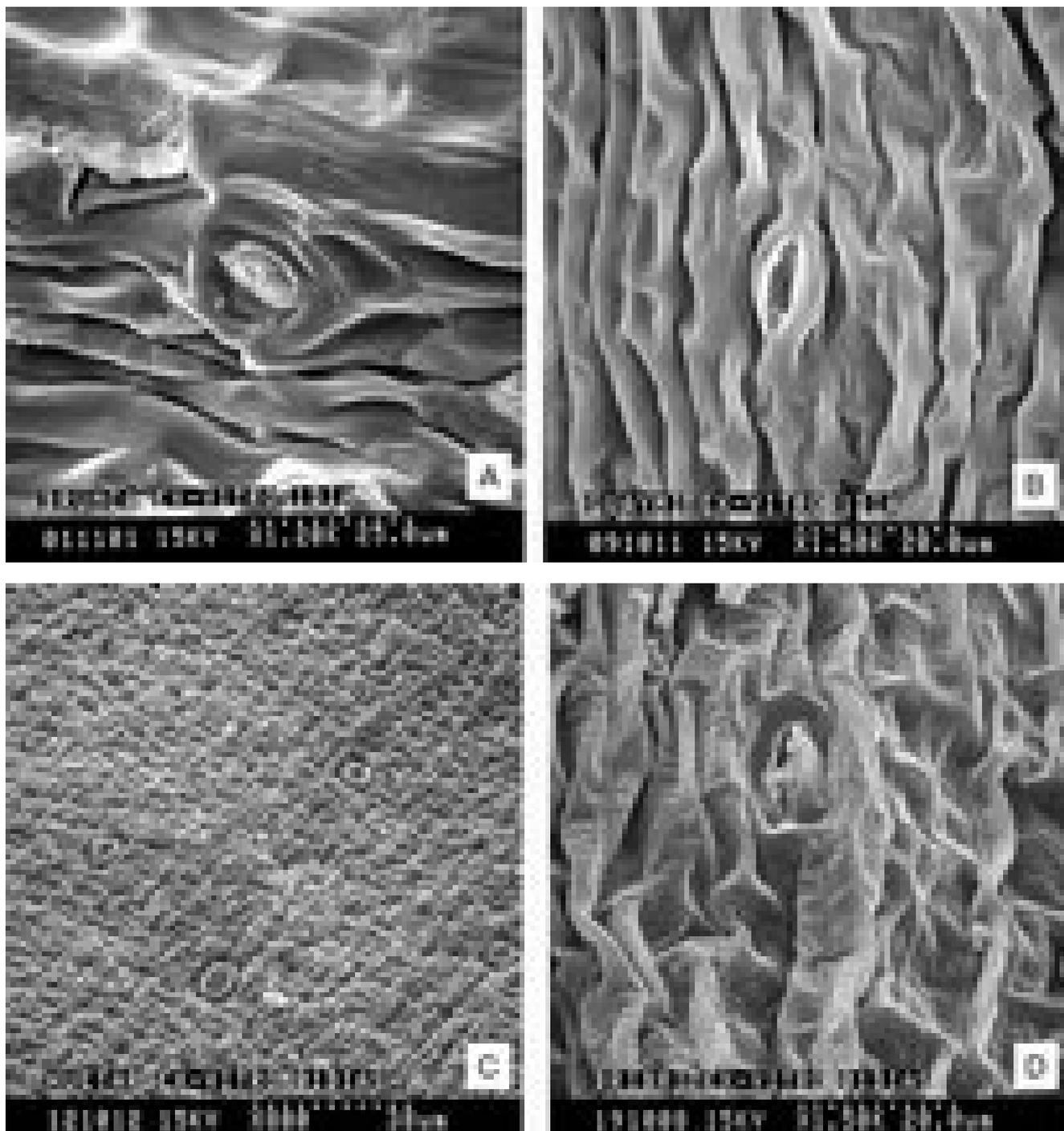


Figura 65. Estomas formados al día uno bajo condiciones de cultivo *ex vitro*.

- (A) Brunca. Estoma bien formado, observe la epidermis alargada. Esc. 4,5 cm=25 μ m
- (B) Guaymí. Estoma cerrado, la epidermis se encuentra colapsada. Esc. 4,5 cm=20 μ m
- (C) Huetar. Estomas en desarrollo, obsérvese las papilas. Esc. 4,5 cm=38 μ m
- (D) Bribri. Estoma cerrado, epidermis colapsada. Esc. 4,5 cm=20 μ m

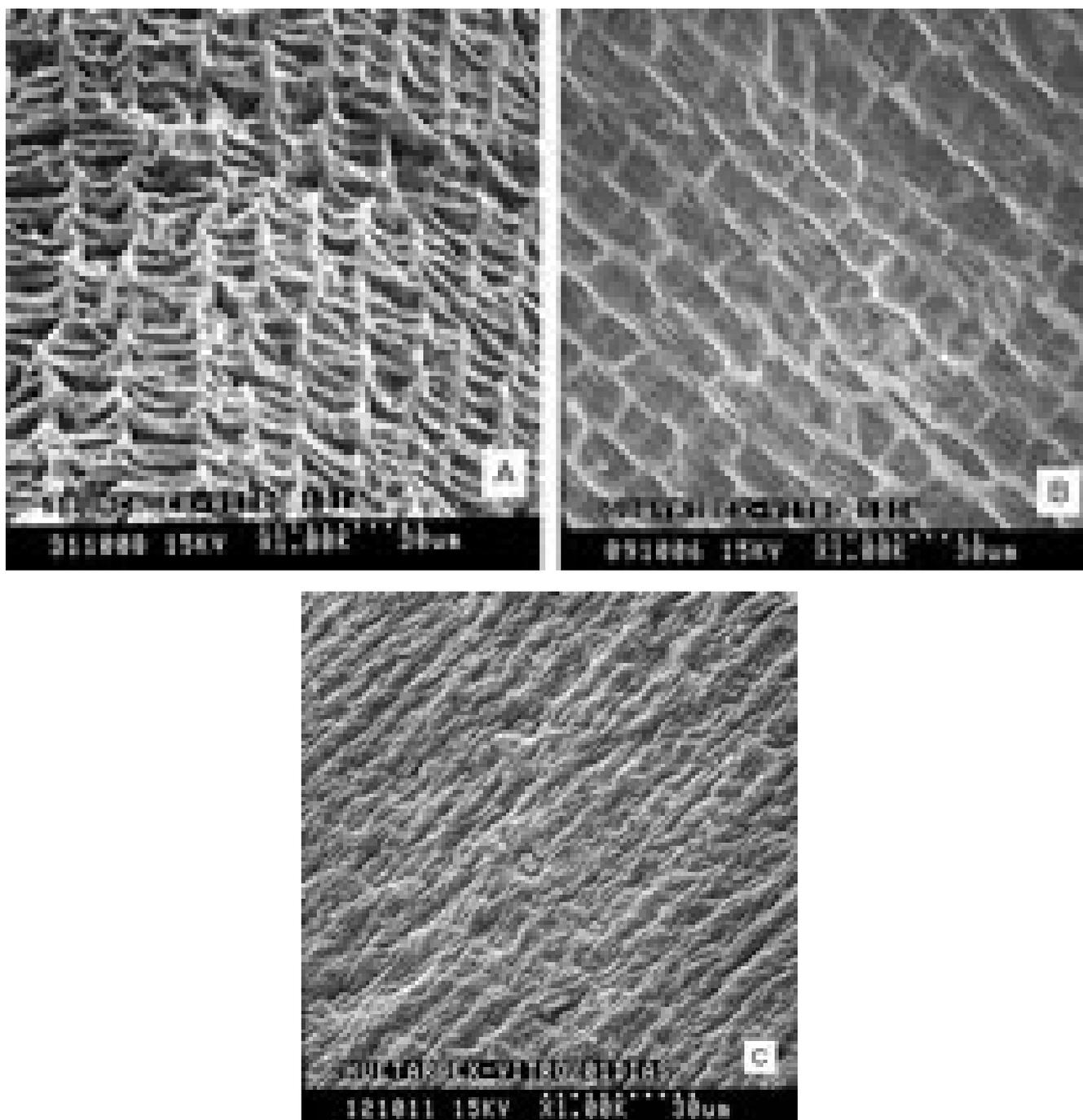


Figura 66. Hipocótilo de frijol al día uno bajo condiciones de cultivo *ex vitro*.

(A) Brunca. Epidermis irregular se observa colapsada. Esc. 4,5 cm=30 μ m

(B) Guaymí. Epidermis rectangular. Esc. 4,5 cm=30 μ m

(C) Huetar. Papilas, obsérvese los posibles orígenes de estomas o tricomas. Esc. 4,5 cm=30 μ m

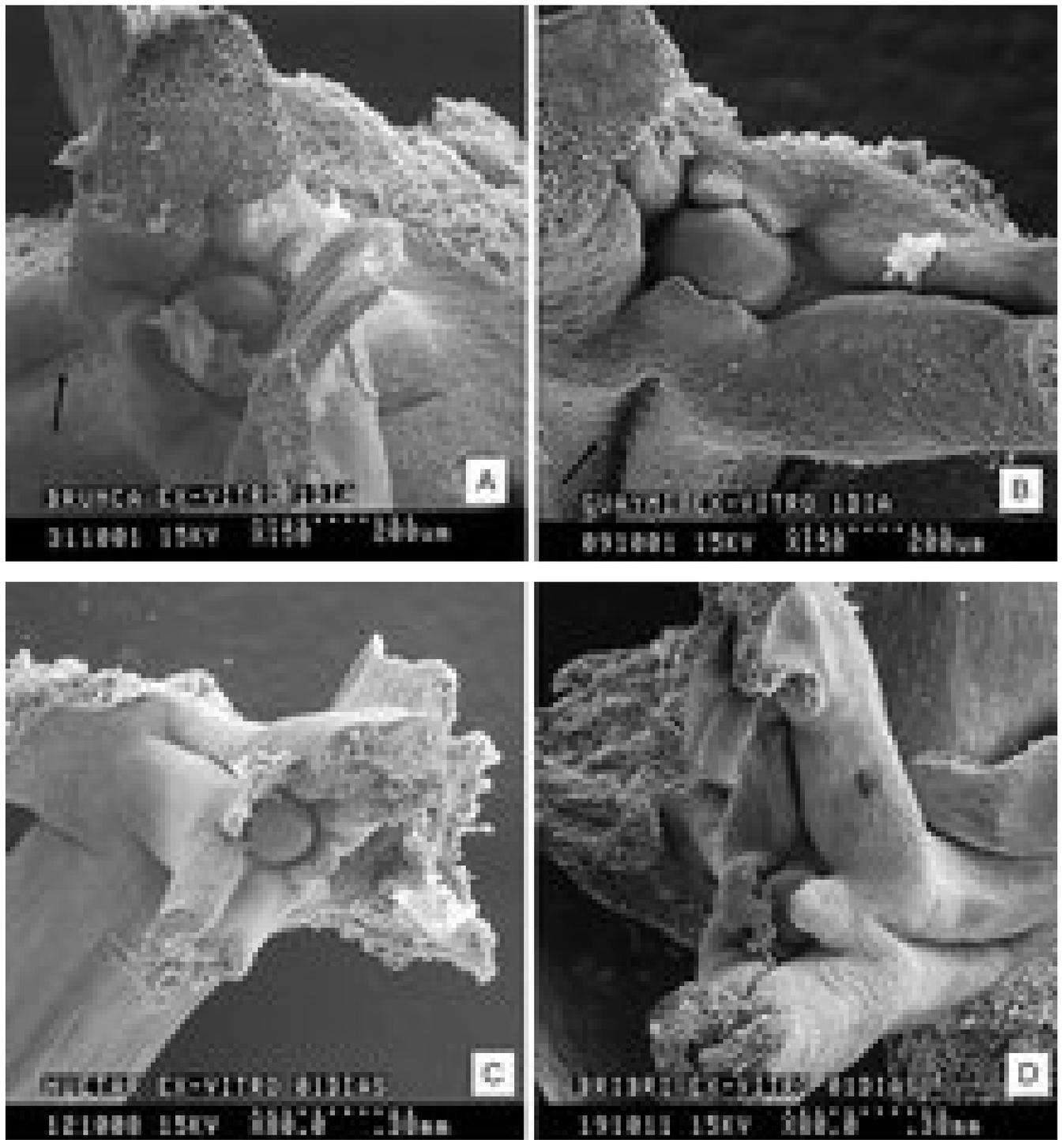


Figura 67. Tricomas en cuerpo de eje embrionario al día uno bajo condiciones de cultivo *ex vitro*.

(A) Brunca. Tricomas en epicótilo (flecha). Esc. 4,5 cm=200 μm

(B) Guaymí. Tricomas globulares (flecha). Esc. 4,5 cm=200 μm

(C) Huetar. No presenta tricomas visibles. Esc. 4,5 cm=0,38 mm

(D) Bribrí. No tiene tricomas visibles. Esc. 4,5 cm=0,38 mm

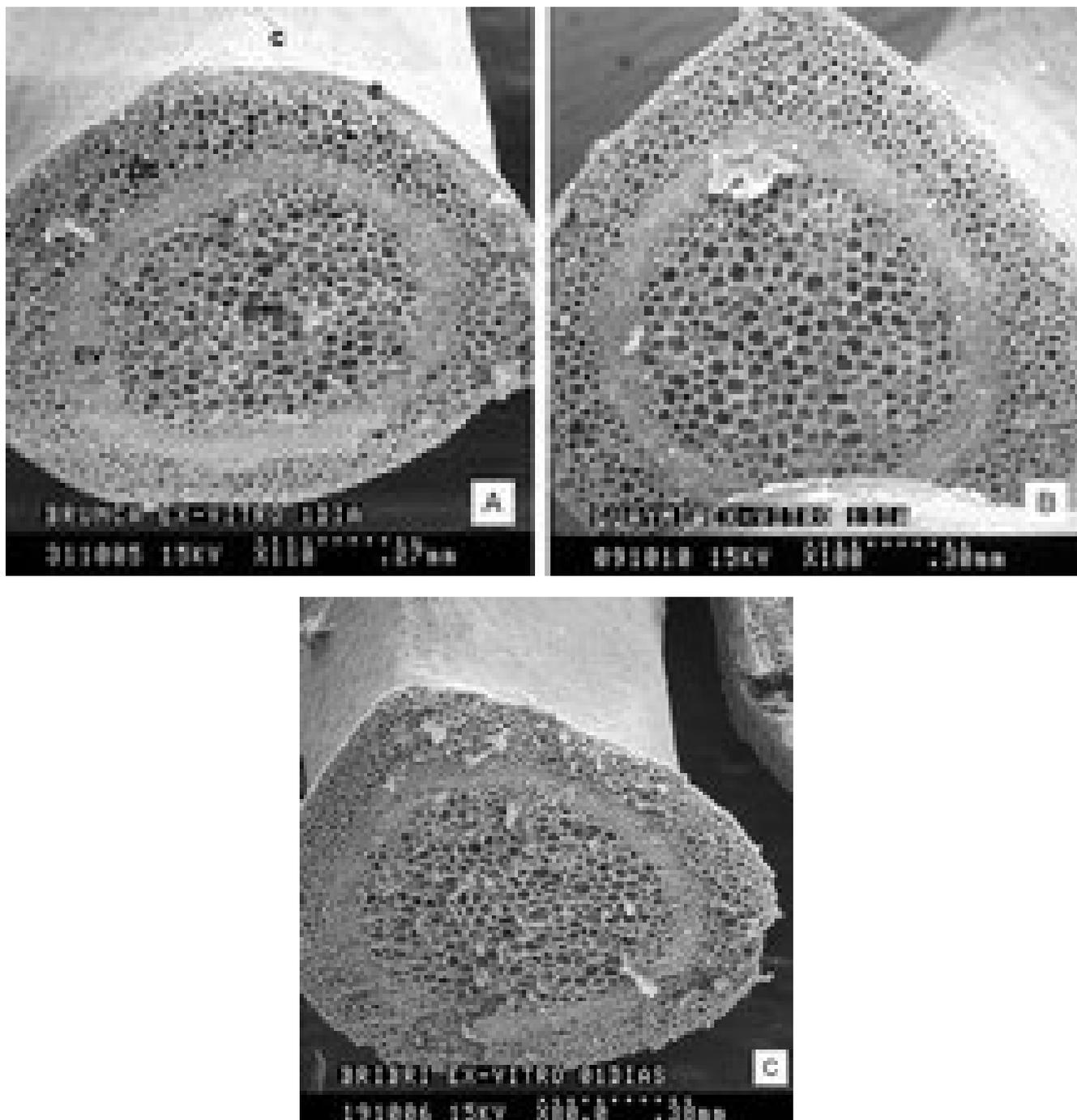


Figura 68. Corte transversal del vástago al día uno bajo condiciones de cultivo *ex vitro*.

(A) Brunca. Observe la epidermis (e), el parénquima de médula (pm) y de la corteza (pc), la cutícula (c) y el cilindro vascular (cv). Esc. 4,5 cm=0,27 mm

(B) Guaymí. Esc. 4,5 cm=0,30 mm

(C) Bribrí. Esc. 4,5 cm=0,38 mm

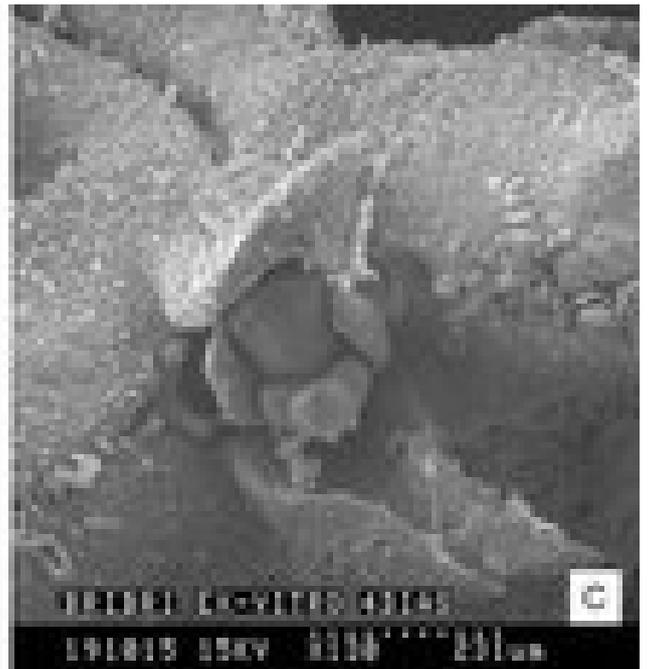
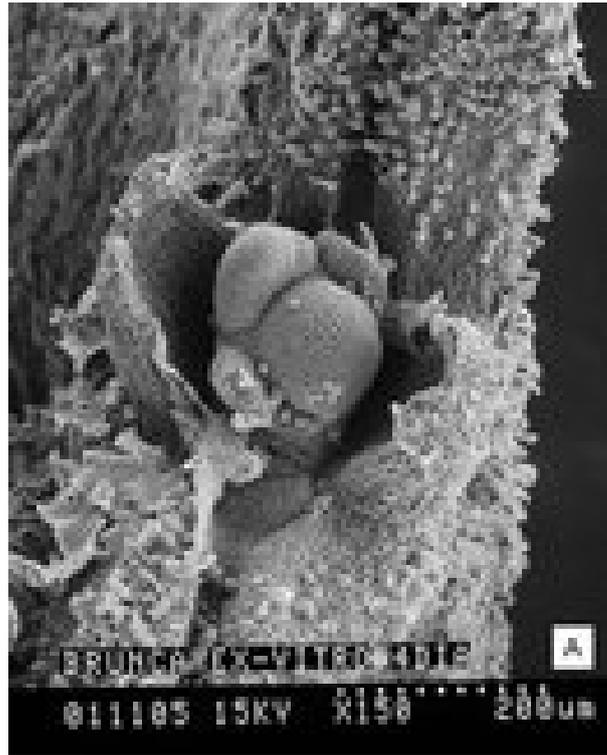


Figura 69. Extremo apical al cuarto día bajo condiciones de cultivo bajo condiciones de cultivo *ex vitro*.

(A) Brunca. Obsérvese los primordios que sobresalen en la periferia del domo, con gran cantidad de tricomas en la superficie. Esc, 4.5 cm=200 μ m.

(B) Huetar. Obsérvese los primordios que sobresalen en la periferia del domo, con gran tricomas en la superficie Esc, 4.5 cm=0,30 mm.

(C) Bribrí. Obsérvese los primordios que sobresalen en la periferia del domo, con gran cantidad de tricomas en la superficie Esc, 4.5 cm=231 μ m.

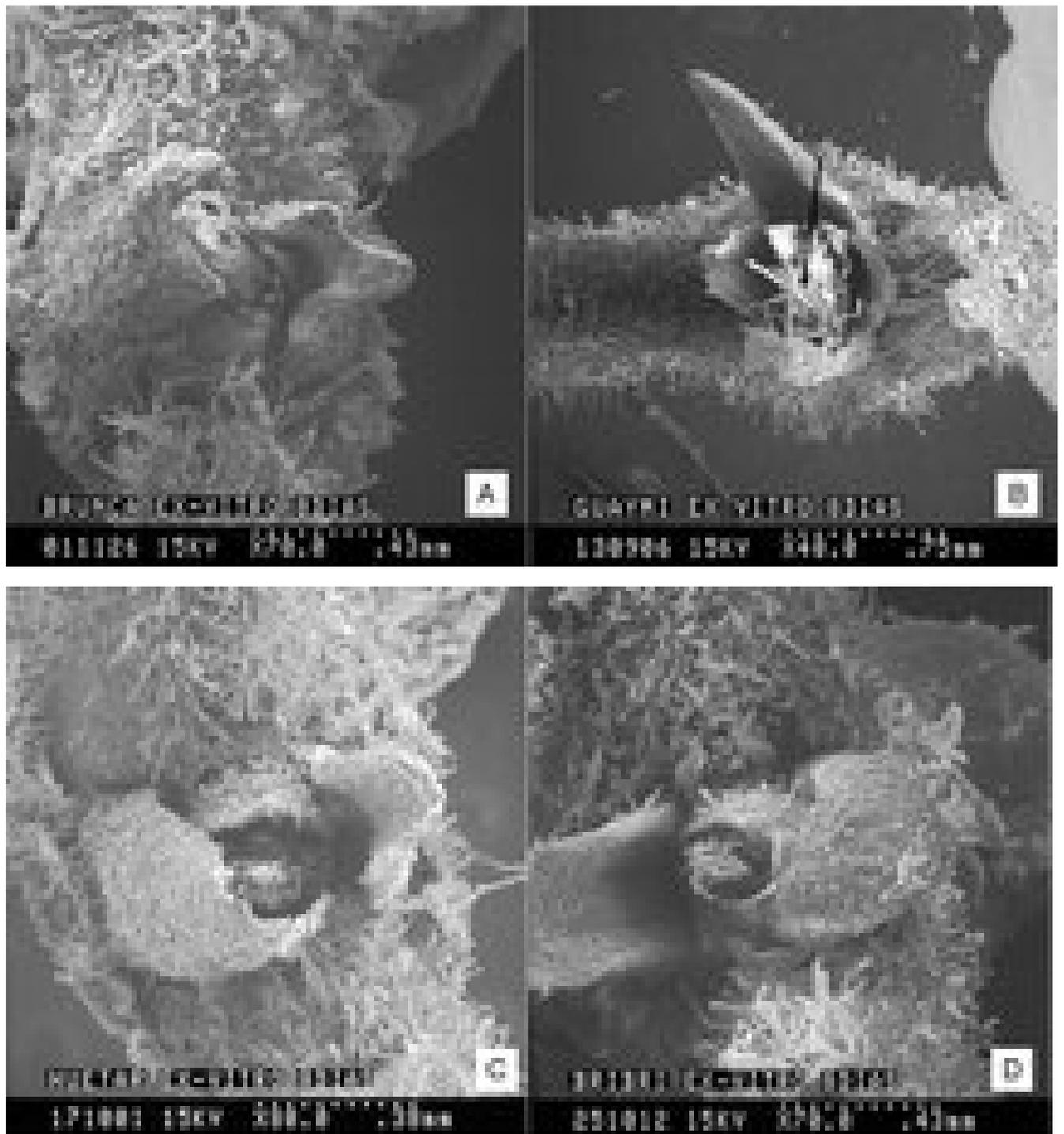


Figura 70. Hojas con ocho días de crecimiento bajo condiciones de cultivo *ex vitro*.

(A) Brunca. Note la gran cantidad de tricomas presentes en el centro del brote formado. Esc, 4.5 cm=0,43 mm.

(B) Guaymí. Note la gran cantidad de tricomas presentes (flecha). Esc, 4.5 cm=0,75 mm.

(C) Huetar. Cantidad de tricomas presentes en el centro del brote Esc, 4.5 cm=38 mm.

(D) Bribrí. Gran cantidad de tricomas presentes en el centro del brote Esc, 4.5 cm=43 mm.

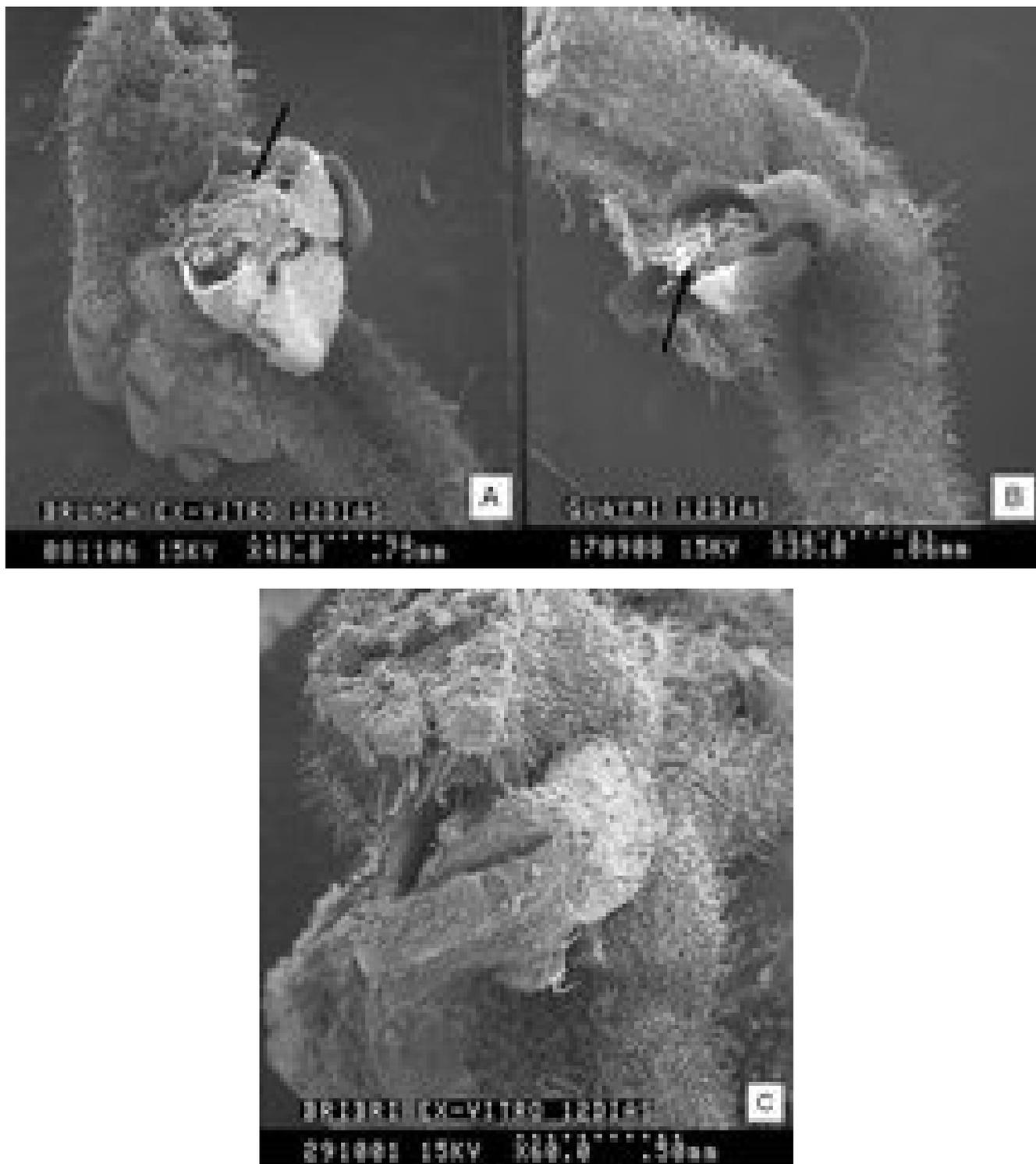


Figura 71. Hojas con doce días de crecimiento bajo condiciones de cultivo *ex vitro*.

(A) Brunca. Note la gran cantidad de tricomas presentes en el centro del brote formado (flecha). Esc, 4.5 cm=0,75 mm.

(B) Guaymí. Note la gran cantidad de tricomas presentes (flecha). Esc, 4.5 cm=0,86 mm.

(D) Bibrí. Gran cantidad de tricomas presentes en el centro del brote Esc, 4.5 cm=50 mm.



Figura 72. Formación de un brote, bajo condiciones de cultivo *ex vitro*, en cada una de las variedades estudiadas. Esc, 4.5 cm=1,36 mm.

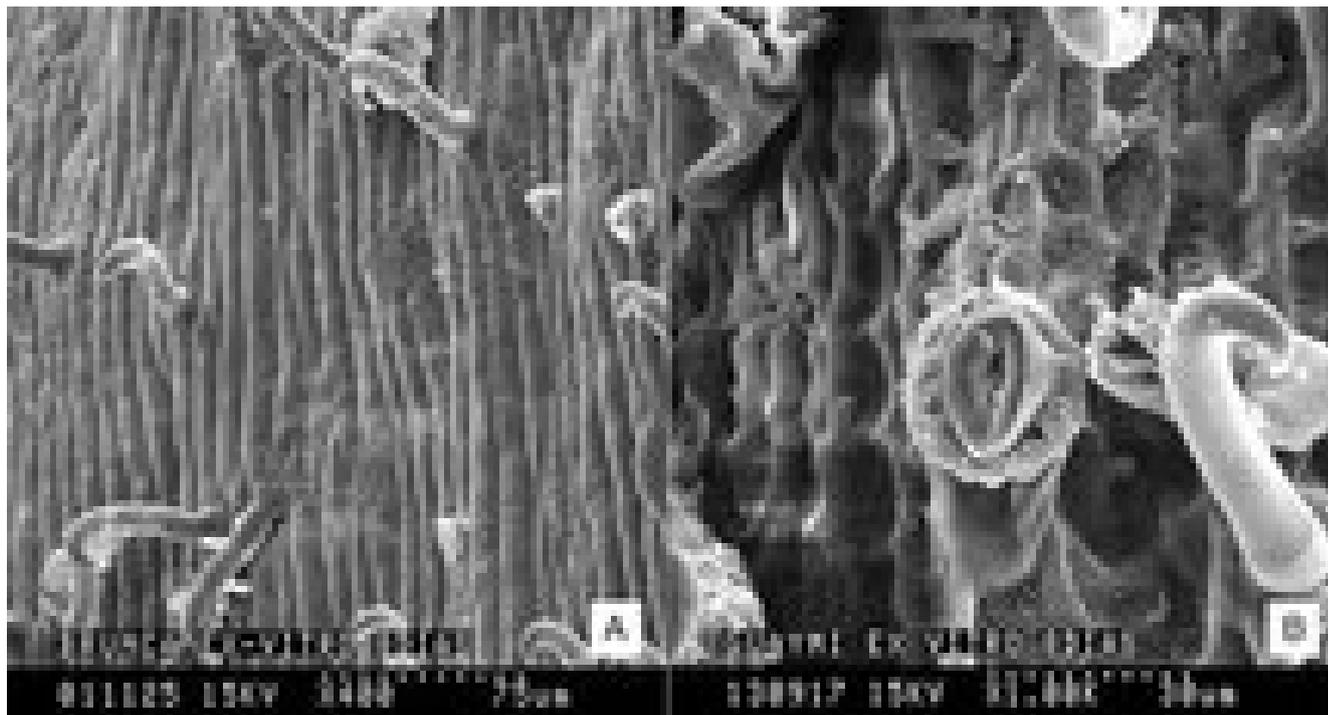


Figura 73. Epidermis a los ocho días de cultivo bajo condiciones de cultivo *ex vitro*.
 (A) Brunca. Epidermis en epicótilo, presenta células alargadas. Esc, 4.5 cm=75 μ m.
 (B) Guaymí. Epidermis irregular en epicótilo. Esc, 4.5 cm=30 μ m.
 (C) Huetar. Epidermis en epicótilo, presenta células alargadas. Esc, 4.5 cm=50 μ m.

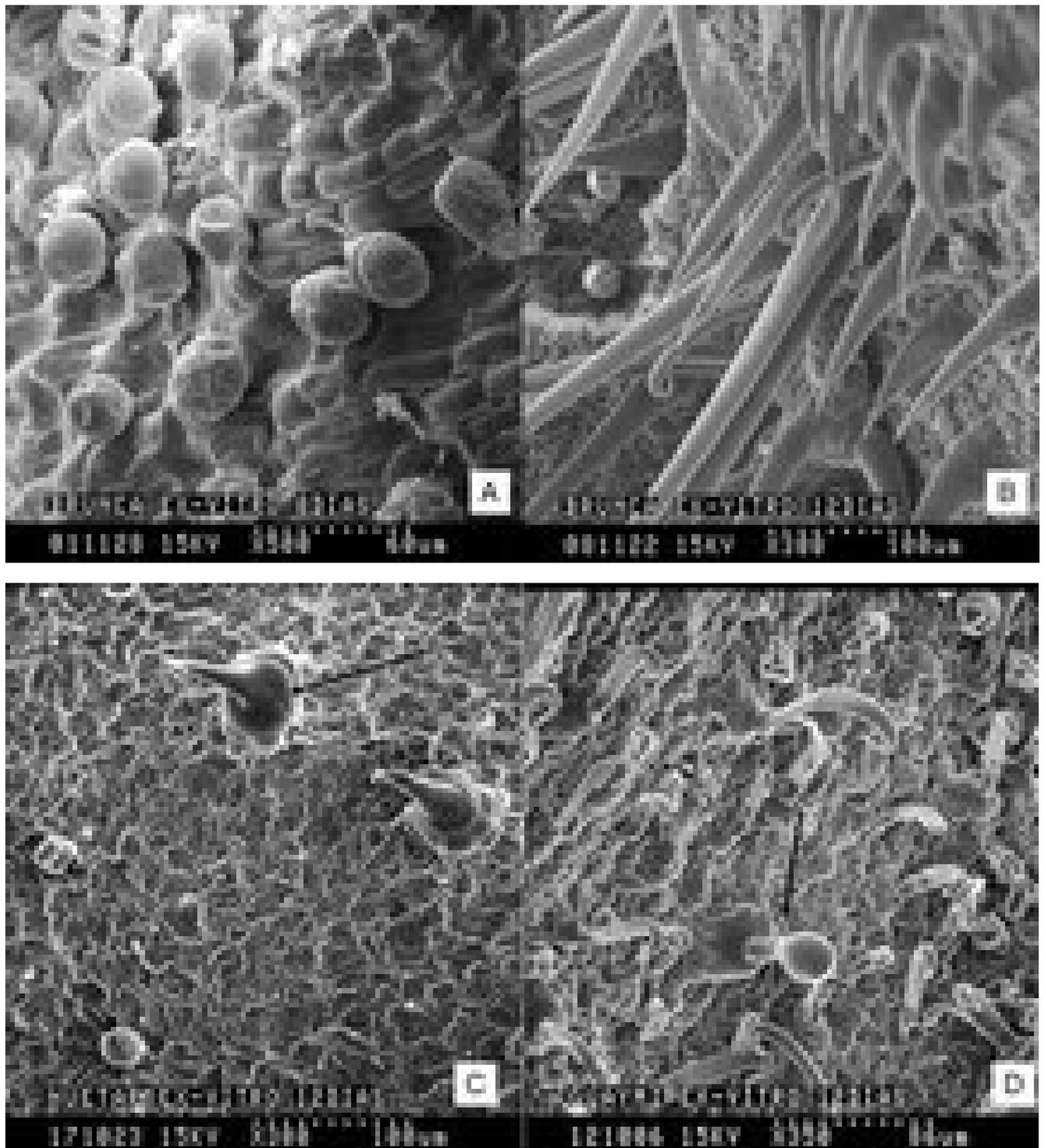


Figura 74. Tricomas presentes en las cuatro variedades de frijol bajo condiciones de cultivo *ex vitro*.

- (A) tricoma globular corto pluricelular. Esc, 4.5 cm=60 μ m.
- (B) Tricoma unicelular largo. Esc, 4.5 cm=100 μ m.
- (C) unicelular corto. Esc, 4.5 cm=100 μ m.
- (D) Globular largo unicelular, presente solo en guaymí. Esc, 4.5 cm=86 μ m.

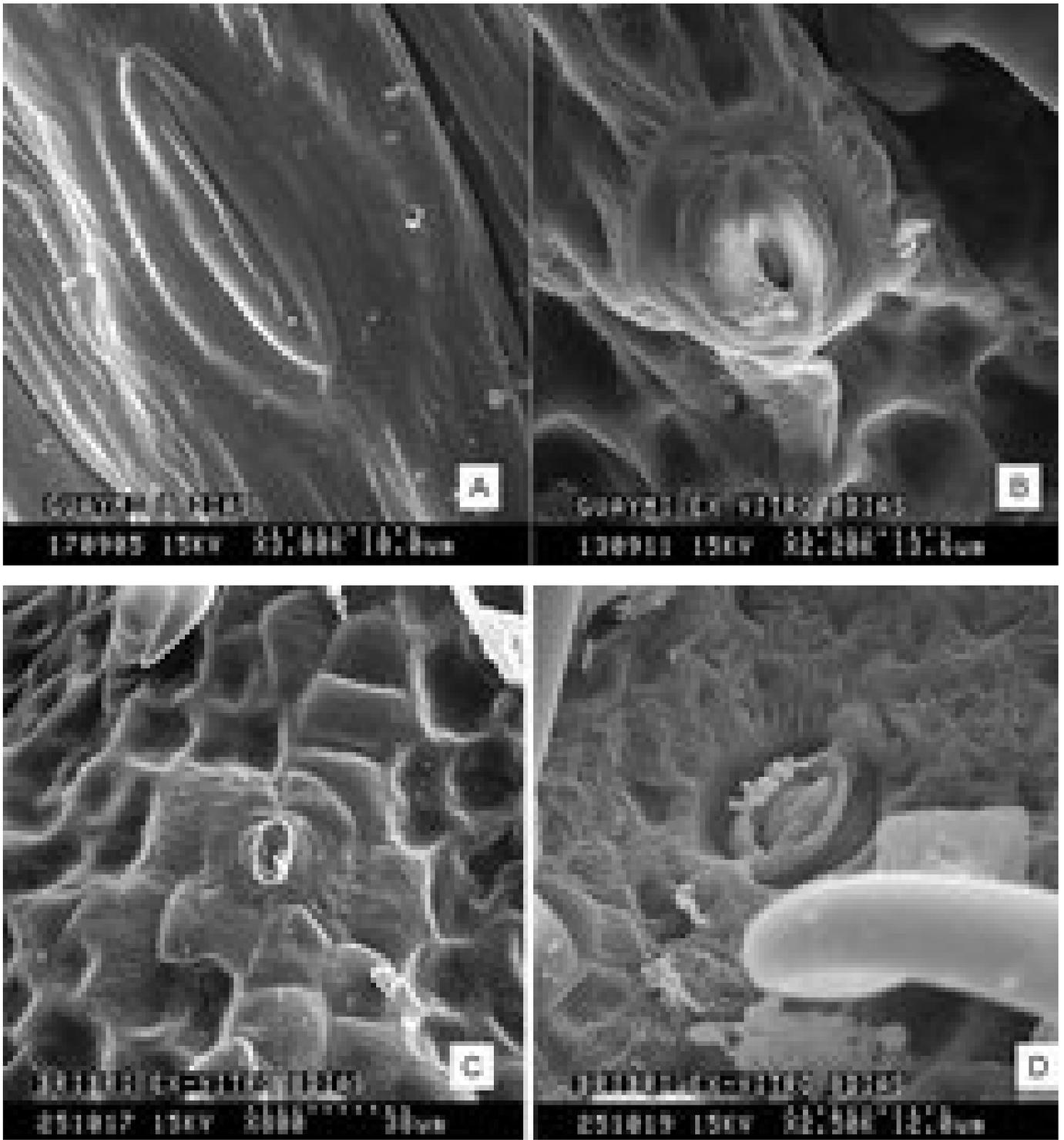


Figura 75. Estomas presentes en variedades de frijol bajo condiciones de cultivo *ex vitro*.

(A). Tricoma anomocítico. Esc, 4.5 cm=10 μ m.

(B). Tricoma paracítico, se encuentra proyectado hacia el exterior. Esc, 4.5 cm=13,6 μ m.

(C) Tricoma paracítico, se encuentra al nivel de las células epidérmicas. Esc, 4.5 cm=38 μ m.

(D). Tricoma paracítico, se encuentra hundido con respecto a las células epidérmicas. Esc, 4.5 cm=12 μ m.

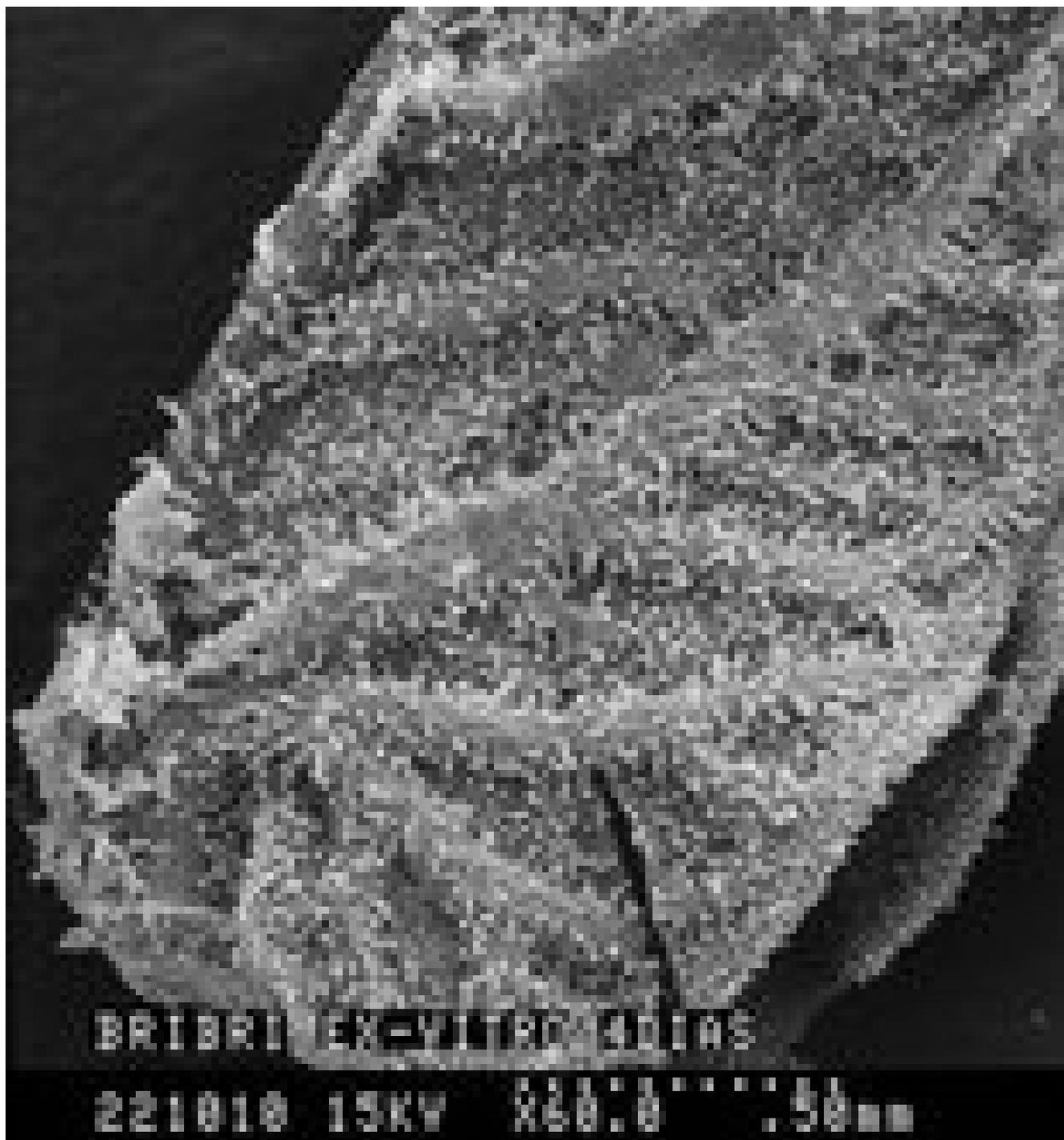


Figura 76. Hoja bien desarrollada al cuarto día bajo condiciones de cultivo *ex vitro*. Obsérvese los tricomas, así como la venación. Esc, 4.5 cm=0,50 mm.

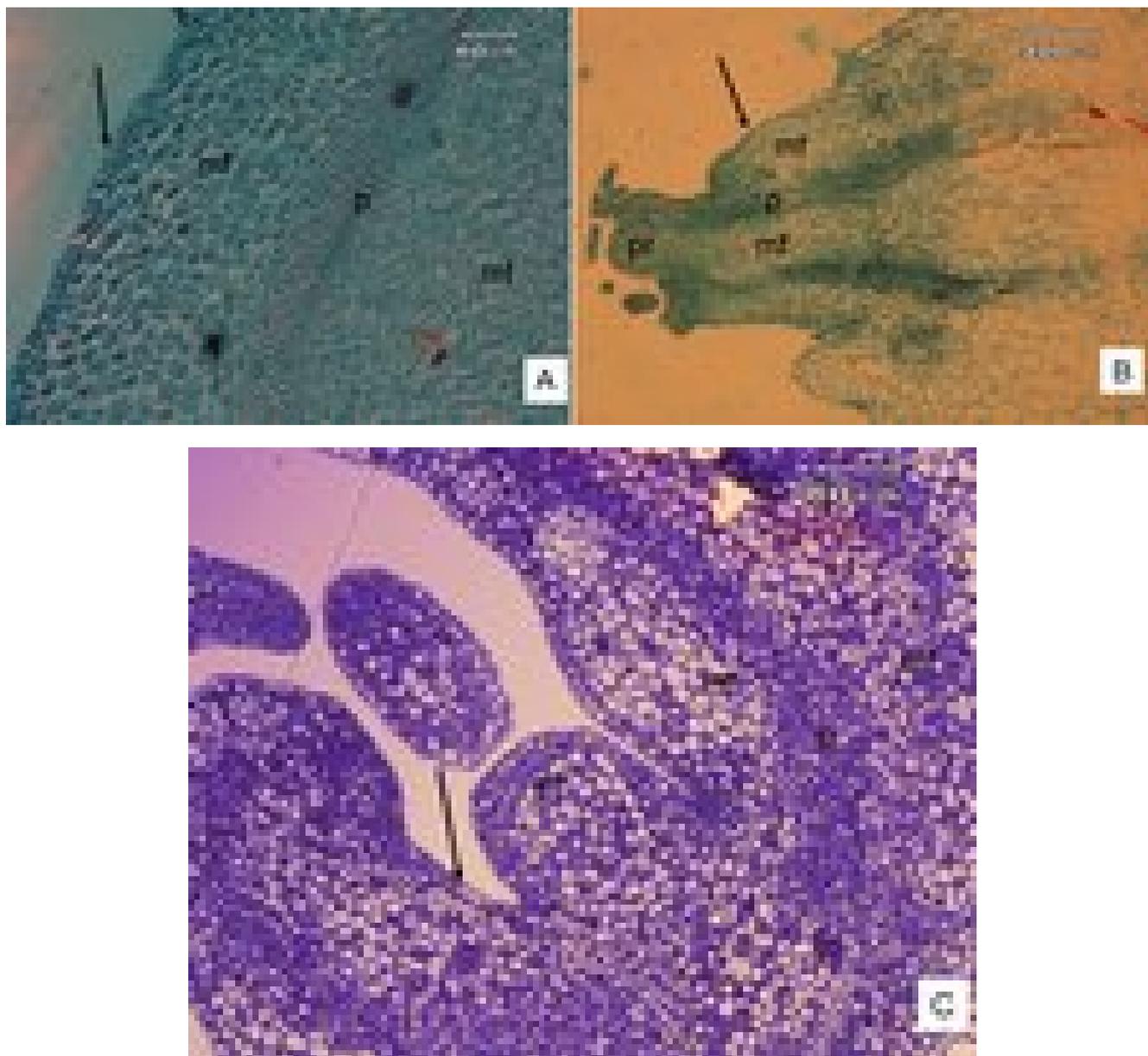


Figura 77. Corte longitudinal del meristemo apical de frijol. Se muestra, (pr) el promeristema, (p) procambium, (mf) meristema fundamental y protodermis (señalado por la flecha).

(A) A los 0 días de cultivo con o sin BAP.

(B) A los ocho días de cultivo sin BAP.

(C) A los ocho días de cultivo con 5 mg l^{-1} de BAP.



Figura 78. Protodermis a los cero días de cultivo sin aplicación de BAP. Se muestra la capa del eje embrionario compuesta por una hilera de células (flecha). Esta característica se observó en todas las variedades analizadas.

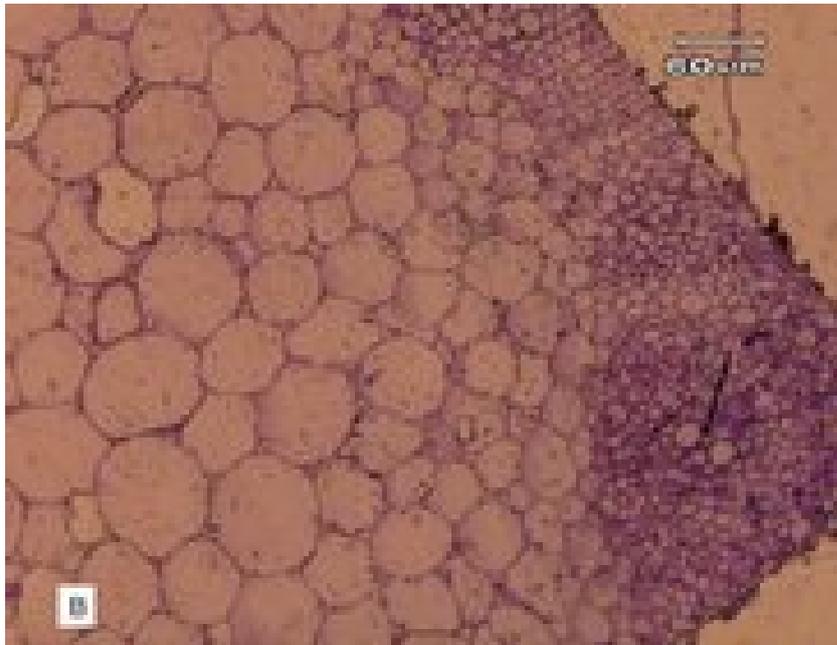
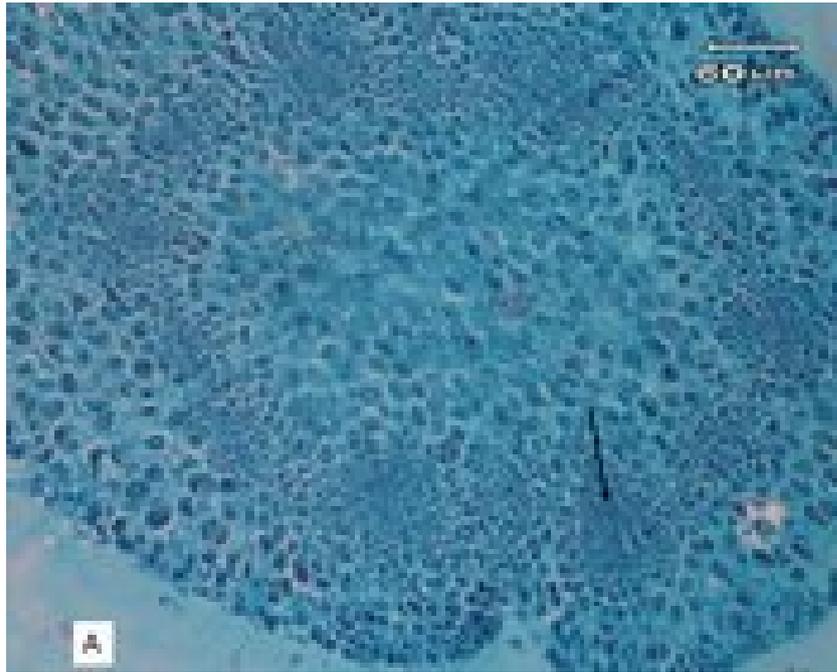


Figura 79. Cortes transversales de tallo de frijol.

(A) A los 0 días de cultivo, note, el cilindro vascular, el parénquima de la corteza, el parénquima de la médula y la epidermis.

(B) A los 8 días sin BAP, corte de un segmento del vástago de frijol, observe el xilema formado (flechas).

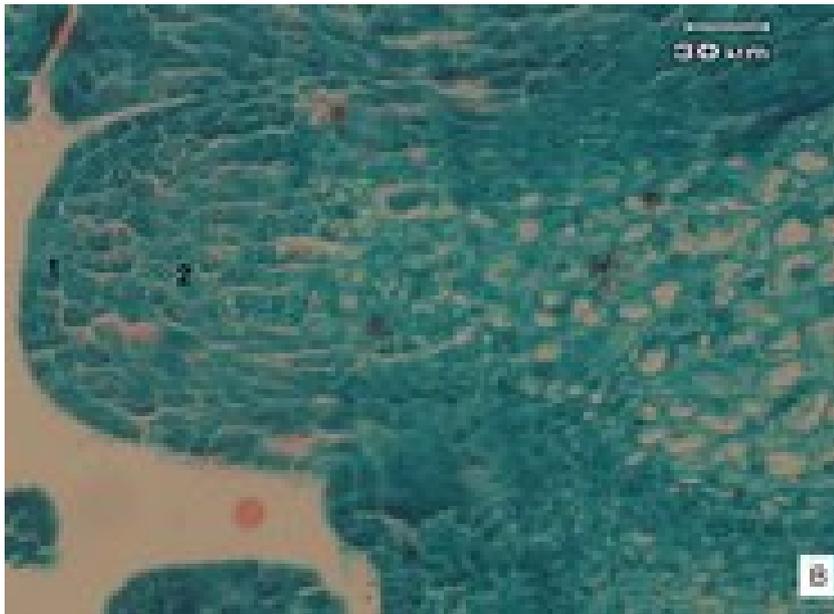
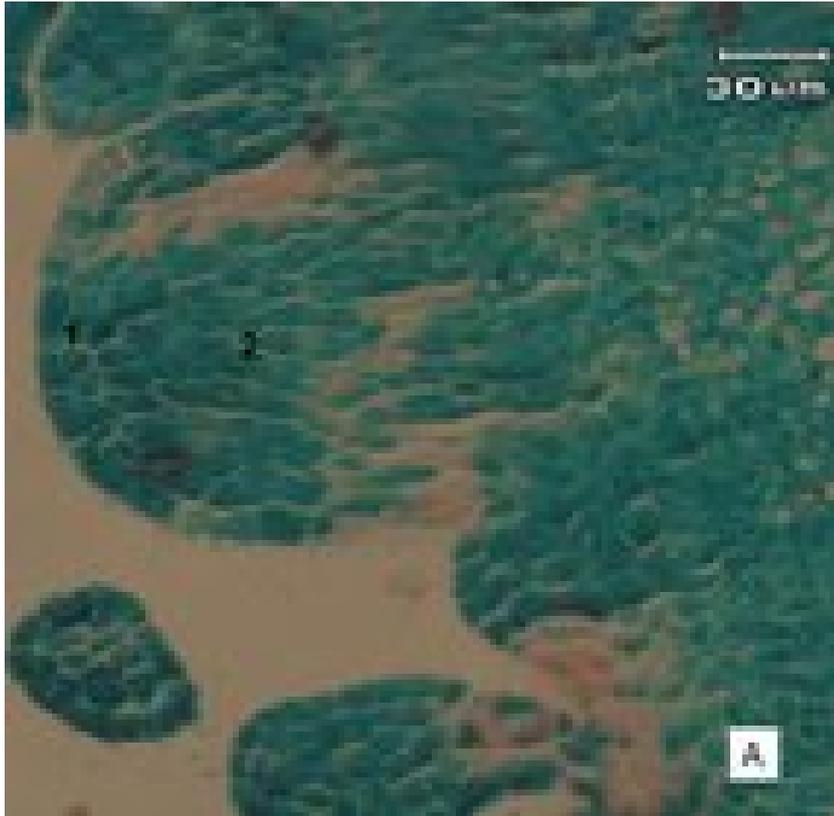


Figura 80. Corte longitudinal de meristemo apical de frijol (30 μ m).

(A) Sin BAP a los 8 días de cultivo.

(B) Con 5 mg l⁻¹ de BAP a los 8 días de cultivo. (1) Células iniciales apicales, (2) células madres centrales.

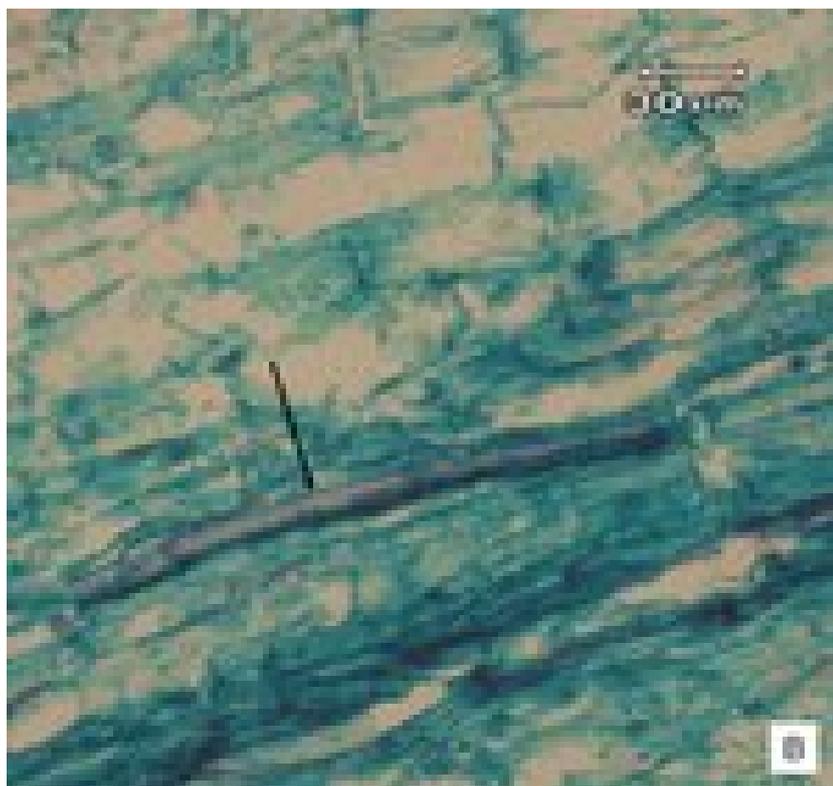
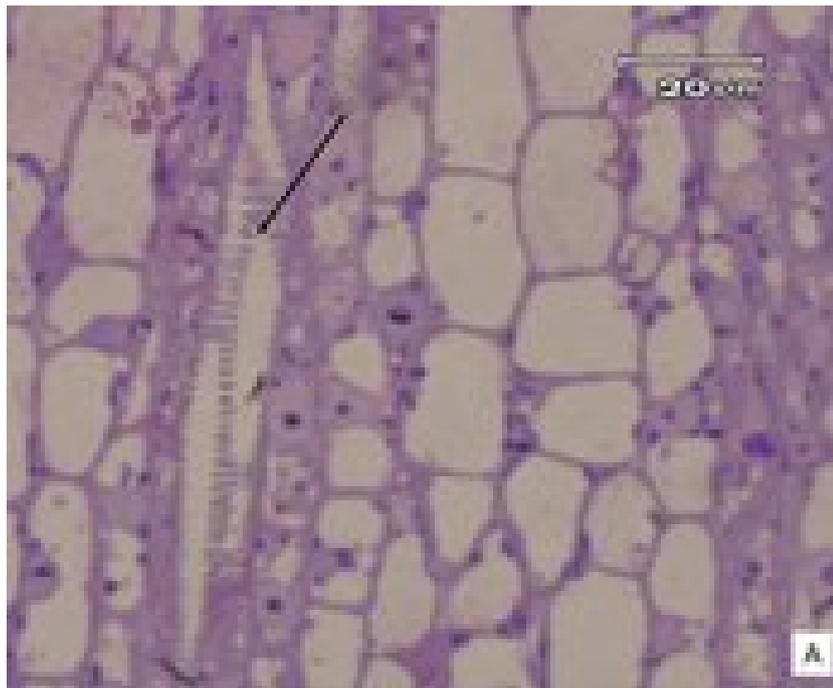


Figura 81. Elementos de los vasos tipo helicoidal (flechas) presentes en tallo de frijol.

(A) Sin BAP a los 8 días de cultivo.

(B) Con 5 mg l^{-1} de BAP a los 8 días de cultivo.



Figura 82. Corte longitudinal de meristemo apical de frijol. Se señala la yema axilar formada (flecha).

(A) Sin BAP a los 8 días de cultivo.

(B) Con 5 mg l^{-1} de BAP a los 8 días de cultivo.

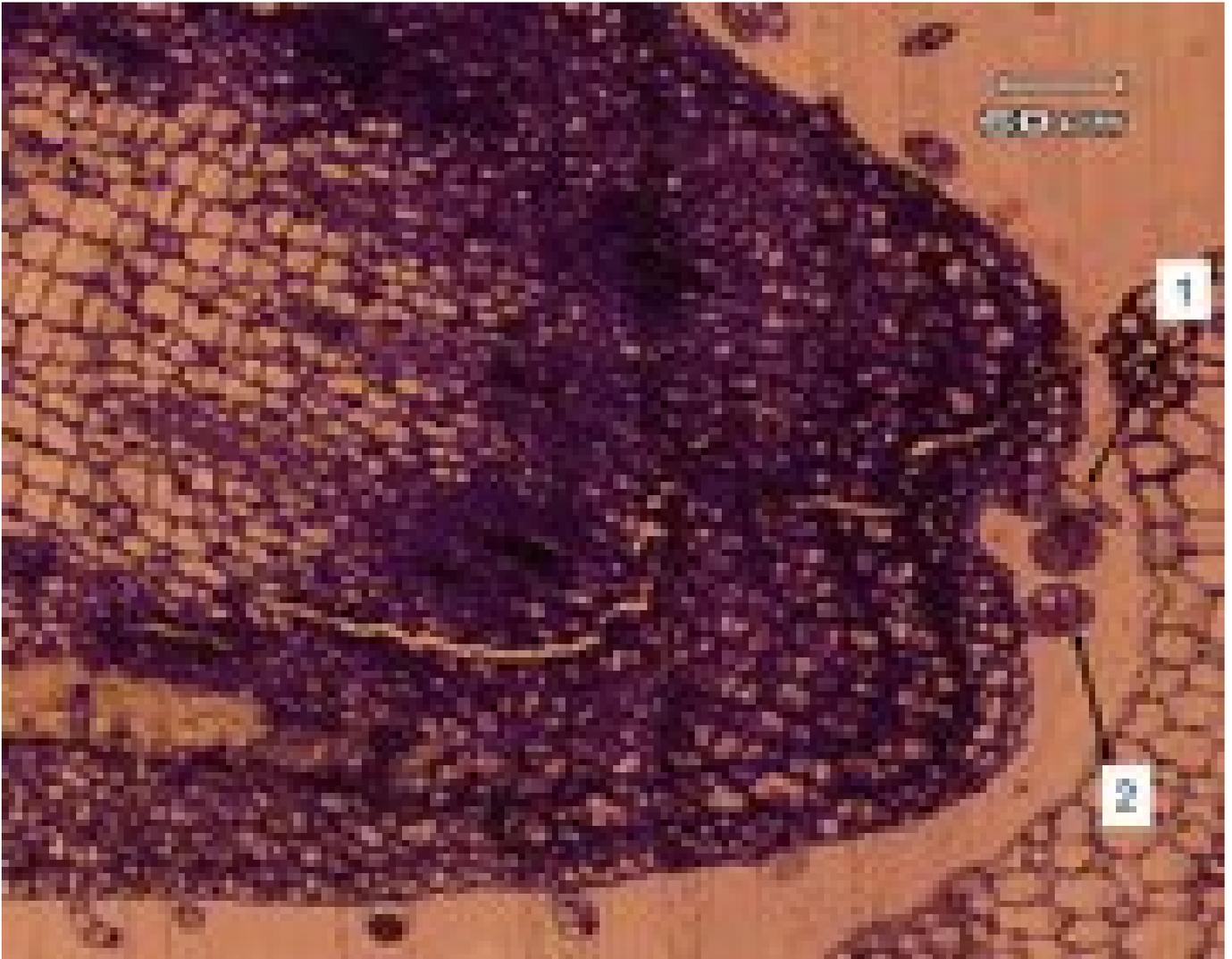


Figura 83. Tricomas observados en los ejes embrionarios de frijol cultivados en la ausencia de BAP a los 8 días de cultivo.

- (1) Tricoma tipo unicelular largo.
- (2) Pluricelular globoso, nótese que esta formado por cuatro células.

DISCUSIÓN

La anatomía de las estructuras en las diferentes especies de plantas, provee la base para la identificación, relación taxonómica y evolución (Clark y Gould 1975). Tanto la superficie de las plantas como su anatomía interna presentan rasgos topográficos complejos, de tamaños microscópicos y que en ocasiones se hace necesario el uso de un microscopio electrónico. Pero en nuestro caso, el análisis de las características ultraestructurales, resulta de gran ayuda en el reconocimiento morfológico, por ejemplo para determinar el tamaño del meristemo (domo).

En el desarrollo del eje embrionario de las variedades de frijol, el microscopio electrónico facilita la observación para lograr determinar las diferencias y semejanzas de las variedades analizadas, debido a que estos caracteres son muy similares y la observación con un microscopio de luz se ve limitada por la resolución y aumentos que ofrece (Sánchez 1999).

Inicialmente, el embrión cigótico es una masa de células indiferenciadas, y conforme se va desarrollando, los diferentes tejidos, de acuerdo a su posición y características citológicas, van adquiriendo una función específica dentro de la planta. Este crecimiento se da mediante divisiones en todos los planos produciendo cuerpos isodiamétricos, o con formas no definidas (Evert 2006).

Recientemente, el meristemo apical ha sido objeto muchos estudios en el desarrollo de las plantas. El brote meristemático apical es típicamente pequeño (aproximadamente 100µm en diámetro), el domo está formado por un grupo de 800 a 12000 células, pero el tamaño y forma del brote meristemático apical varía en diferentes etapas del desarrollo y entre especies (Medford 1992). Tiene, entre sus funciones, proveer la información de los brotes axiales y la iniciación de los órganos laterales, tales como las hojas (Kwiatkowska 2004).

El meristemo apical se relaciona con el crecimiento, distribución interna y la forma externa del ápice. Por tanto, se da una diferenciación de zonas distintivas en el meristemo, zonas observadas en los cortes realizados en este análisis como son procambium, protodermis y meristemo fundamental. En algunas partes las células pueden dividirse lentamente y alcanzar considerables dimensiones, en otras pueden dividirse frecuentemente y permanecer pequeñas (Evert 2006). El brote meristemático apical consiste de un pequeño domo de células cubiertas y protegidas por hojas en el botón como se confirmó en el trabajo a las diferentes semanas. Este grupo de células parece ser superficialmente homogéneo, y está organizado en regiones con diferentes

funciones y destinos (Brand *et al.* 2001).

Con respecto a la epidermis en todas las variedades de frijol, el extremo del domo comparado con la parte inferior mostraba la epidermis más irregular, debido a que estas células corresponden a las células de la zona central, que es un grupo de células localizadas en el extremo apical y actúan como depósito de las células madre (Medford 1992; Lenhard y Laux 1999; Brand *et al.* 2001). Además, como menciona Evert (2006), se caracteriza por mantenerse siempre joven y poco diferenciado, lo que indica que es una zona constante crecimiento como lo señalan Kwiatkowska y Dumais (2003).

Se observó las ceras cuticulares sobre la capa epidérmica en todas las variedades de frijol con o sin BAP en el medio de cultivo. De acuerdo con Evert (2006) y Flores-Vindas (1999), la presencia de estas sustancias regula la transpiración de la planta y la protege contra la desecación y son evidentes en estados tempranos de desarrollo.

En relación a los estomas, se observaron estructuras con células auxiliares alrededor, según García y Madriz (1999), los estomas encontrados en *Vigna radiata* (L.) (frijol mungo) son en su mayoría paracíticos, pero también se observaron estomas paralelocíticos con células anexas de tamaño desigual. De acuerdo con Espinosa-Osornio (2002) los estomas paracíticos son frecuentes en las Rubiaceae, las Mimosoideae y en algunos géneros de Papilionoideae.

Cabe señalar, que aún cuando el estoma paracítico es reportado como el más común en especies de la subfamilia Papilionoideae la presencia de estomas paralelocíticos, también ha sido indicada en miembros de la misma (García y Madriz 1999). En nuestro estudio, se logró observar en mayor número estomas paracíticos, lo anterior porque en algunos casos, la disposición de las células epidérmicas alrededor de las células oclusivas permitió clasificar los estomas como anomocíticos pero solamente en Guaymí y en Brunca, y como Flores-Vindas (1999) menciona una misma especie puede mostrar diferentes tipos estomáticos.

Los estomas estaban dispuestos sobre las diferentes superficies del eje embrionario, hundidos, al mismo nivel de las otras células epidérmicas y proyectados hacia el exterior de la epidermis, característica señalada por Flores-Vindas (1999) como variable en la superficie de la planta. En las hojas de todas las variedades estudiadas, se observaron estomas en ambas epidermis (hojas anfiestomática), característica que parece ser común de acuerdo con García y Madriz (1999) en el género *Vigna*.

A simple vista se evidenció como la mayor cantidad de estomas se encontraban en la superficie abaxial, que según García y Madriz (1999) es común en las hojas

anfiestomáticas, puesto que la presencia de una alta densidad de estomas por unidad de área de lámina se ha correlacionado con una mejor capacidad fotosintética.

En el presente trabajo se pudieron observar diferentes tipos de tricomas: (1) simples, sin ramificación, unicelulares, delgados y largos, (2) los simples, sin ramificación unicelulares cortos, presentes en las venas de las hojas, (3) los globulares cortos pluricelulares, (4) los globulares unicelulares largos que solo se observaron en los ejes embrionarios de Huetar cultivados bajo condiciones *ex vitro* y (5) los pluricelulares largos que se encontraron en Bribrí a partir de la tercera semana de cultivo, de acuerdo a la clasificación de González (2006). Según García y Madriz (1999), entre los tipos de tricomas descritos para cultivos de *P. vulgaris* L. sobre la epidermis adaxial y abaxial, se encuentran, el tricoma tector unicelular, en cuya base se observan varias células de contorno poligonal que se disponen a modo de roseta y el tricoma glandular de pedicelo corto formado por 3 células y cabeza globosa de contenido denso, constituida por 4 células. Siendo el primero el más abundante en la cara adaxial, especialmente sobre las venas, mientras que el segundo tipo predomina en la epidermis abaxial. Estos tricomas fueron descritos por Dahlin y colaboradores en otros tres cultivares de *P. vulgaris*.

Con respecto a los tejidos vasculares inmersos dentro del parénquima, se logró observar elementos de los vasos del xilema con ornamentación de la pared lateral secundaria en forma helicoidal y escalariforme. De acuerdo con Flores-Vindas (1999) una misma planta puede presentar más de un tipo de ornamentación de los elementos de los vasos.

En relación al área de exposición del domo apical, en un estudio realizado con 17 cultivares de frijol Brasileño tipo Carioca y Jalo, se observó como esta región meristemática apical está parcialmente expuesta, puesto que comprende un rango de exposición entre 25% - 85% (Aragão y Rech 1997). En nuestro trabajo este rango está entre 60% y 79%.

Aragão y Rech (1997), también determinaron el número de brotes producidos empleando diferentes concentraciones de BAP para cinco cultivares de frijol. Obtuvieron que las concentraciones óptimas fueron $4,4\mu\text{M}$ (1 mg l^{-1}) en el cultivar FEB171 y $22,2\mu\text{M}$ (5 mg l^{-1}) en el cultivar PF9029984 y en promedio se produjeron de 6 a 8 brotes por planta. Resultados muy similares obtuvo Mohamed y colaboradores (2006), utilizando explantes de epicótilo de *Phaseolus angularis* L. cultivados en medio sólido y líquido de MSB₅ (MS base más vitamina B₅) con $5\mu\text{M}$ de BAP ($1,13\text{ mg l}^{-1}$)

obteniendo un promedio de 16-18 brotes por explante.

A pesar de ser un género diferente a *Phaseolus* Rodríguez y colaboradores (2003) utilizaron *Artemisia absintium* L., empleando segmentos nodales de 1cm de longitud determinaron que la concentración óptima de BAP correspondió a $0,5\text{mg l}^{-1}$ obteniendo en promedio 35 brotes a los 40 días de cultivo.

Los resultados obtenidos en estos estudios son muy superiores al número de brotes obtenidos en nuestro estudio, en el que se empleó 5mg l^{-1} de BAP y que obtuvo un promedio de 1,5 a 4 brotes por explante; aunque cantidad suministrada en el cultivar PF9029984 es igual a la que se utilizó en nuestro caso. Por el contrario, la que se empleó en el cultivar FEB171 (1mg l^{-1}), en *P. angularis* ($1,13\text{mg l}^{-1}$) y en *A. absintium* ($0,5\text{mg l}^{-1}$) son muy inferiores a las que se probaron en esta investigación.

Si se aplican dosis altas de BAP, estas concentraciones pueden ser excesivas, pues los reguladores de crecimiento actúan como estimuladores en pocas cantidades y en altas concentraciones, deprimen las plantas actuando como inhibidores (Rodríguez 2003). Se menciona como el BAP a $30-80\mu\text{M}$ ($6,8-18\text{mg l}^{-1}$) afecta negativamente la frecuencia de diferenciación de brotes en *Phaseolus* (Mohamed *et al.* 2006).

Aragão y Rech (1997), empleando BAP observaron que al segundo día de cultivo se inició la formación de brotes y a partir del día cinco superaba los cuatro brotes. La mayoría de estos brotes aparecieron en la zona periferal del meristemo. Además, gran número de brotes surgieron entre el sétimo y décimo día de cultivo, pero muy pocos alcanzaron tamaños superiores a 1 cm. En este estudio, al cuarto día de cultivo, se observó como el domo apical va adquiriendo mayor tamaño y los primordios comienzan a desarrollarse, sin embargo es a partir del día ocho que se evidencia el inicio de la formación de brotes y al día doce se lograron cuantificar por el tamaño alcanzado (superior a 1 cm). En estas variedades costarricenses la mayoría de estos brotes, también, se desarrollaron en la zona periferal del meristemo. Estudios realizados han demostrado que la diferenciación de brotes *de novo* en embriones de frijol empleando citoquininas aparece en la capa periferal del anillo meristemático (Aragão y Rech 1997).

CONCLUSIONES

Las cuatro variedades de frijol cultivadas en medio MS presentan una morfología e histología similar entre ellas. Al cuarto día de cultivo están presentes los elementos de los vasos con ornamentación de las paredes laterales secundarias tipo helicoidal. Estas variedades presentan tres tipos de tricomas dos unicelulares y uno pluricelular, también el estoma característico es el paracítico y se observaron hundidos, a nivel de las células epidérmicas y elevados.

Guaymí fue la variedad que presentó el mayor porcentaje de exposición del área del meristemo (domo) con 79%. La variedad Bribrí es la que presentó menor área de exposición con un 60%.

La concentración óptima de BAP para la inducción de brotes a partir de ejes embrionarios de frijol es la que corresponde a 5 mg l^{-1} . El promedio de brotes formado es de 1,5 a 4 brotes por explante en las cuatro variedades estudiadas.

Las plántulas generadas en medio de cultivo complementado con 5 mg l^{-1} de BAP presentaron una morfología e histología con comportamiento similar a las plántulas a las que no se les suministró el BAP. Estas plántulas presentan además tricomas largos simples pluricelulares con la base engrosada. Las ornamentaciones de las paredes laterales secundarias son tipo helicoidal y escalariforme.

RECOMENDACIONES

Realizar experimentos con menores concentraciones de BAP que permitan experimentar si se forma mayor cantidad de brotes por explante para optimizar el proceso morfogénico y la regeneración *in vitro* de las cuatro variedades de frijol.

Realizar pruebas que permitan definir el protocolo óptimo de MEB y así evitar que las estructuras se colapsen y que permita la adecuada observación de los tejidos.

Emplear secado por punto crítico para evitar que los tejidos se colapsen por acción del secado por sublimación.

LITERATURA CITADA

- Albino M. M. C. 2005. Regeneração de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) via organogênese e transformação genética via biobalística. Ph. D. Thesis. Universidade de Brasília. Brasília, Brasil.
- Aragão F. J. L., L. M. G. Barros, A. C. M. Brasileiro, S. G. Ribeiro, F. D. Smith, J. C. Sanford, J. C. Faria & E. L. Rech. 1996. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 142-150.
- Aragão, F. J. L. & E. L. Rech. 1997. Morphological factors influencing recovery of transgenic bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) of a carioca cultivar. *International Journal of Plant Sciences* 158 (2): 157-163.
- Araya, C. 2000. Estatus de las principales enfermedades del cultivo de frijol, y posibilidades organizativas para su manejo integrado en Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas* 55: 6-11.
- Ahmed, E. E., G. Y. Bisztray and I. Velich. 2002. Plant regeneration from seedling explants of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Acta Biologia Szegediensis* 46 (3-4): 27-28.
- Barboza, L. 2002. Estudio de la polinización natural del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) en Alajuela. Informe de práctica de especialidad. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica.
- Bozzola, J. & L. Russell. 1991 *Electron Microscopy*. Jones and Bartlett Publishers. United States of America.
- Broughton, W. J., G. Hernández, M. Blair, S. Beebe, P. Gepts & J. Vanderleyden 2003. Beans (*Phaseolus spp.*) - model food legumes. *Plant and Soil* 252: 55-128.

- Brand, U; M. Hobe & R. Simon. 2001. Functional domain in plant shoot meristems. *BioEssays* 23: 134-141.
- Cajal, S.; A. Delgado & J. Márquez. 2004. Estigmas en *Phaseolus vulgaris* silvestres y cultivadas. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
- Clark, C. A. & F. W. Gould. 1975. Some epidermical characteristics of paleas of *Dicanthelium*, *Panicum* and *Echinochloa*. *American Journal Botanica* 62 (7): 743-748.
- Contreras, N., G. Trujillo, O. Borges, & F. Centeno. 2001. Análisis ultraestructural de la interacción de *Xanthomonas axonodis* pv. *Phaseoli* con genotipos resistentes, moderadamente resistentes y susceptibles de *Phaseolus vulgaris*. *Interciencia* 26(11): 554-557.
- Chrispeels, M. J. & D. E. Sadava. 2003. *Plants, genes, and crop biotechnology*. Jones and Bartlett Publishers, International Barb House, London, UK.
- Dixon, R. A. 1985. *Plant Cell Culture: a practical approach*. IRL Press, Washington D. C.
- Espinosa-Osornio, G., G. Vargas-Simón y M. Engleman. 2002. Contribución al estudio de la anatomía foliar del icaco (*Chrysobalanus icaco* L.). *Bioagro* 14 (1): 29-36.
- Evert, R. F. 2006. *Esau's Plant Anatomy: meristemos, cell and tissues of the plant body: their structure, function, and development*. 3rd ed. Wiley-Interscience. United States.
- Flores-Vindas, E. 1999. *La planta: estructura y función*. Volumen I. Editorial Tecnológica de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 367 p.
- García, M y P. Madríz. 1999. Anatomía foliar comparada de 5 genotipos de frijol mungo, *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Revista de la Facultad de Agronomía-LUZ* 16: 610-620.

- Gaspar, T., C. Kevers, C. Penel, H. Greppin, D. M. Reid & T. Thorpe. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cellular and Development Biology - Plant* 32: 272-289.
- González, A.M. 2006. Morfología de plantas vasculares. Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina (Consultado 20 agosto 2008, www.biología.edu.ar/botanica)
- Hernández, J. C & Araya, R. 2000. Nueva variedad de frijol rojo. UCR-MAG. (Consultado 20 mayo 2007, www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/tec_frijol.pdf)
- Hernández, J. C., R. Araya & A. Morales. 2001. Bribrí, nueva variedad de frijol rojo pequeño para Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana* 12(1): 15-23.
- Kaplan, L. 1981. What is the origin of the common bean? *Economic Botany* 35(2): 240-254.
- Karnovsky, M. J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology* 27:137.
- Kwiatkowska, D. 2004. Structural integration at the shoot apical meristem: models, measurements and experiments. *American Journal of Botany*. 91(9): 1277-1293.
- Lenhard, M & T. Laux. 1999. Shoot meristem formation and maintenance. *Current Opinion in Plant Biology*. 2:44-50.
- Litz, R. E & R. L. Jarret. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis, p. 143-173. *In Cultivo de Tejidos en la Agricultura*. CIAT. Cali, Colombia.
- Malik, K. A. & P. K. Saxena. 1991. Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L.: promotive role of N⁶-benzylaminopurine in cultures from juvenile leaves. *Planta* 184: 148-150.
- Medford, J. I. 1992. Vegetative apical meristems. *The Plant Cell* 4: 1029-1039.

- Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). 1991. Aspectos técnicos de sobre cuarenta y cinco cultivos de Costa Rica. Dirección General de Investigación y Extensión Agrícola. San José, Costa Rica. (Consultado 20 mayo 2007, www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/tec_frijol.pdf)
- Mohamed, S. V., J. M. Sung, T. L. Jeng & Ch. S. Wang. 2006. Organogenesis of *Phaseolus angularis* L.: high efficiency of adventitious shoot regeneration from etiolated seedlings in the presence of N⁶-benzylaminopurine and thidiazuron. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 86: 187-199.
- Mroginski, L. A. & W. M. Roca. 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*, p. 19-40. *In Cultivo de Tejidos en la Agricultura*. CIAT. Cali, Colombia.
- Murashige, T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Poehlman, J. M. & D. Allen. 2003. Mejoramiento genético de las cosechas. LIMUSA, S. A. México.
- Roca, W. M., A. Mejia-Jiménez & H. J. Jacobsen. 1998. Development of an *in vitro* regeneration system in common bean suitable for genetic transformation. Latin American Meeting on Plant Biotechnology. REDBIO/FAO. La Habana, Cuba.
- Roca, W. M. & L. A. Mroginski. 1991. Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales, p. 1-19. *In Cultivo de Tejidos en la Agricultura*. CIAT. Cali, Colombia.
- Rodríguez, C. L. & R. X. Fernández. 2003. Los frijoles (*Phaseolus vulgaris*): su aporte a la dieta del costarricense. *Acta Médica Costarricense* 45(3).
- Russell, D. R., K. M. Wallace, J. H. Bathe & B. J. Martinell. 1993. Stable transformation of *Phaseolus vulgaris* via electric discharge mediated particle acceleration. *Plant Cell Reports*. 12: 165-169.

- Salazar, J. J. 2004. La actividad de frijol en Costa Rica. Programa Nacional de Frijol. (Consultado 9 junio 2008, www.mercanet.cnp.go.cr/SIM/Granos_Basicos/Documentos.pdf/pitta_2004.pdf)
- Sánchez, M. E. 1999. Comparación morfológica ultraestructural de las especies silvestres de arroz *Oryza*: Poaceae en Costa Rica. Tesis para optar por el grado de Licenciatura en Biología con énfasis en Botánica. Universidad de Costa Rica. 114p
- Sánchez, P. D.; M. S. Ruíz, S. H. Maldonado, E. V. Pineda, M. G. Chavira, S. F. Velásquez, J. A. Gallegos & A. M. Avilés. 2005. An organogenic plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Science. PSL 7420: 1-6.
- SEPSA y FAO. 2006. Estudio de competitividad del frijol en Costa Rica con la metodología de la matriz de análisis de política (MAP). Proyecto TCP/COS/3001 (A). Costa Rica. (Consultado 9 junio 2008, [www.infoagro.go.cr/TCP-COS_3001\(A\)/Documentos/frijol.pdf](http://www.infoagro.go.cr/TCP-COS_3001(A)/Documentos/frijol.pdf)).
- Simbiosis. 2003. Programa Cooperativo para la construcción de indicadores en Biotecnología y Tecnología de Alimentos adaptados a los países de América Latina y el Caribe, para motivar la aplicación y transferencia de tecnologías industriales. Proyecto NODO-COSTA RICA. Comisión Institucional de Biotecnología Bogotá, Colombia.
- Svetleva, D., M. Velcheva & G. Bhowmik. 2003. Biotechnology as a useful tool in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) improvement. Euphytica. 131: 189-200.
- Valdez, M., R. López & L. Jiménez. 2004. Estado actual de la biotecnología en Costa Rica. Revista Biología Tropical 52 (3): 733-743.
- Velcheva, M. & D. Svetleva. 2005. *In vitro* regeneration of *Phaseolus vulgaris* L. via organogenesis from petiole explants. Journal Central European Agriculture. 2005(1): 53-58.

Veltcheva, M., D. Svetleva, S. P. Petkova & A. Perl. 2005. *In vitro* regeneration and genetic transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) ó Problems and progress. *Scientia Horticulturae*. 107: 2-10.

Zambre, M. A., J. De Clercq, E. Vranová, M. Van Montagu, G. Angenon & W. Dillen. 1997. Plant regeneration from embryo-derived callus in *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) and *P. acutifolius* A. Gray (terapy bean). *Plant Cell Reports*. 17: 626-630.