

Organogénesis indirecta en *Phaseolus vulgaris* L. cv. CIAP 7247

Raúl Collado*¹, Lourdes R. García¹, Gert Angenon², Dámaris Torres¹, Carlos Romero¹, Idalmis Bermúdez-Caraballoso, Novisel Veitía, Miriam Ramírez *Autor para correspondencia.

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: raulc@ibp.co.cu

²Instituut Voor Moleculaire Biologie en Biotechnologie. Vrije Universiteit Brussel. Belgium.

RESUMEN

La principal limitante para la transformación genética de *Phaseolus vulgaris* L. está relacionada con las dificultades para su regeneración *in vitro*. Para transformar genéticamente uno de los cultivares de mayor importancia en Cuba se requiere desarrollar previamente un protocolo de regeneración *in vitro* vía organogénesis indirecta. Es por ello, que este trabajo se realizó con el objetivo de lograr la formación de brotes a partir de callos en *Phaseolus vulgaris* L. cv. CIAP 7247. Se emplearon como material vegetal semillas maduras cosechadas en una casa de cultivos protegidos. En la formación de callos se determinó el efecto del tipo de explante. Para lograr la formación de brotes a partir de callos, se probaron cuatro concentraciones de 6-bencilaminopurina (0.5, 1.0, 2.0, 2.5 mg.l⁻¹) y un tratamiento control sin reguladores de crecimiento. Transcurridos 45 días de cultivo, se evaluó el número de brotes formados en 0.5g de masa fresca de callo. El mayor porcentaje (86%) de explantes que formaron callo se observó en los cotiledones, seguido por los segmentos de eje embriogénico con nudo cotiledonal (57%) y por los cotiledones con eje embriogénico (38%). Sin embargo, solo se formaron brotes en los callos que crecieron a partir de cotiledones con eje embriogénico. Con la adición de 2.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP al medio de cultivo de formación de brotes el número de brotes observados en 0.5 g de callos se incrementó 2.2 veces. Se demostró que el tipo de explante tuvo un efecto determinante en la regeneración.

Palabras clave: brotes, callos nodulares, frijol, transformación genética

ABSTRACT

The main difficulty that limits the genetic transformation in *Phaseolus vulgaris* L. is the low responsiveness for *in vitro* regeneration. The development of an *in vitro* regeneration via organogenesis protocol is needed in order to achieve the genetic transformation in one of the most important cultivar of this legume in Cuba. Therefore, the aim of this work was to obtain shoots formation from morphogenetic calli in *Phaseolus vulgaris* L. cv. CIAP 7247. Matures seeds harvested in greenhouse were used as plant material. Different explants were studied for callus formation (cotyledon, cotyledon with a segment of embryonic axis and segment of embryonic axis with cotyledonal nude). Number of explants with callus formation was evaluated after 28 days. The percentage was also determined. Formed calli were classified according to their consistency and structure in compacts-nodular and soft – spongy. Three concentration of 6-bencylaminopurine (0.5, 1.0 and 2.0 mg.l⁻¹) and control treatment without growth regulator were studied to achieve shoot induction and formation from calli. Number of shoots formed on 0.5 g of callus fresh mass, after 45 days of culture, was evaluated. The highest percentage (86%) of explants with callus formation was determinate on cotyledons. Segments of embryonic axis with cotyledonal nude produced 57%, and cotyledons with embryonic axis 38%. However, shoots were only formed on calli grown from cotyledons with embryonic axis. The addition of 6-BAP 2.0 mg.l⁻¹ to shoot formation medium increased in 2.2 the number of shoots observed on 0.5 g of calli. It was demonstrated that the kind of explant had a determinant effect on calli regeneration.

Key words: common bean, nodular calli, shoot

INTRODUCCIÓN

Durante varios años, en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) el incremento de los rendimientos ha sido logrado principalmente debido a altas proporciones de productos químicos aplicados (fertilizantes, herbicidas, pesticidas, insecticidas), mecanización, así como prácticas de cultivo intensivo. Estas actividades, sin embargo, han generado varios problemas económicos y ecológicos; particularmente contaminación ambiental y la

necesidad de suministrar energía extra al proceso de producción (Cruz de Carvalho *et al.*, 2000). Al mismo tiempo, en la mejora genética convencional no se han logrado progresos debido a la prolongada selección, bajo potencial de recombinación como un resultado de la autopolinización y el aborto de embriones en híbridos interespecíficos de interés comercial (Zambre *et al.*, 2001).

Los nuevos sistemas que conducen al mejoramiento genético del frijol, se han apoyado

en los métodos biotecnológicos para vencer las limitaciones anteriormente mencionadas y se han dirigido a incrementar la resistencia o tolerancia a pesticidas y enfermedades, a factores de estrés ambiental así como a mejorar la calidad de la semilla y la arquitectura de la planta (Zambre *et al.*, 2002).

Sin embargo, el desarrollo de un sistema adecuado para la propagación *in vitro* que permita el mejoramiento genético mediante la transformación genética es aún un reto (García *et al.*, 2006).

En la literatura científica se han descrito tres protocolos de propagación vía organogénesis indirecta en *Phaseolus vulgaris*. Mohamed *et al.* (1993) trataron de propagar *in vitro* cinco cultivares de *P. vulgaris*, pero solo tuvieron éxito con dos (Tara y Xan-159) que son híbridos obtenidos por cruzamiento de *P. acutifolius* x *P. vulgaris*. Además, sus resultados no pudieron ser repetidos por Zambre *et al.* (1998). El segundo protocolo fue propuesto por Zambre *et al.* (1998) quienes obtuvieron plantas de *P. vulgaris* a través de organogénesis indirecta en una línea mejorada de Xan-159, pero sus resultados son altamente dependiente del genotipo usado. Los dos protocolos inicialmente publicados son poco eficientes y pobremente repetibles, se limitan a determinados genotipos generalmente de bajo valor comercial (Arellano *et al.* 2008). El tercer y más reciente protocolo fue informado por Arellano *et al.* (2008). Estos autores formaron brotes a partir de callos en 10 cultivares de *P. vulgaris*, pero ha sido demostrado que esta especie es genotipo dependiente y es muy difícil repetir los protocolos publicados en otras variedades.

Para lograr la transformación genética en uno de los cultivares de *Phaseolus vulgaris* de mayor importancia para Cuba (CIAP 7247), se requiere desarrollar previamente un protocolo de regeneración *in vitro* vía organogénesis indirecta. Es por ello, que este trabajo se realizó con el objetivo de lograr la formación de brotes a partir de callos en *Phaseolus vulgaris* L. cv. CIAP 7247.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se emplearon semillas maduras de *P. vulgaris* L. cv. CIAP 7247 cosechadas en una casa de cultivos protegidos. La desinfección de las semillas, se realizó según el protocolo propuesto por Dillen *et al.* (1997).

Una vez desinfectadas las semillas fueron sumergidas en agua desionizada estéril durante cuatro horas para facilitar la eliminación de la testa.

Influencia del tipo de explante en la formación de callo

Para determinar el efecto del tipo de explante para la formación de callos, se emplearon cotiledones, cotiledones con un segmento de eje embriogénico y segmentos de eje embriogénico que incluían el nudo cotiledonal. Los explantes fueron colocados sobre el medio de cultivo informado por García *et al.* (2006). Este contenía las sales y vitaminas propuestas por Murashige y Skoog (1962) (MS), 0.20 mg.l⁻¹ de thidiazurón (TDZ), 0.05 mg.l⁻¹ de ácido indol-3-acético (AIA), 3.0% de sacarosa y 0.35% de gelrite. El pH fue ajustado a 5.7 previo a la esterilización.

Se colocaron cinco explantes por frasco de vidrio de 250 ml de capacidad. Los cotiledones y cotiledones con segmento de eje embriogénico, se ubicaron con el lado adaxial en contacto con el medio de cultivo y los segmentos de eje embriogénico con nudo cotiledonal en posición horizontal. Se emplearon 10 réplicas por tratamiento (50 explantes en total). El experimento se desarrolló en condiciones de oscuridad a 27± 2°C y se repitió dos veces en el tiempo. A los 28 días de cultivo se cuantificó el número de explantes que formaron callo y se determinó su porcentaje. Los callos formados se clasificaron de acuerdo con su consistencia y estructura en compactos nodulares y blandos esponjosos.

Efecto del 6-BAP en la formación de brotes a partir de callos

Callos compactos nodulares obtenidos a partir de cotiledones con un segmento de eje embrionario, se multiplicaron durante cuatro subcultivos en el mismo medio de cultivo y las condiciones descritas para el experimento anterior. Posteriormente, los callos fueron transferidos a un medio de cultivo para la formación de brotes (MFB) con sales MS, vitaminas Gamborg *et al.* (1962) (vitaminas B5), 3.0% de sacarosa y 0.3% de gelrite. Se adicionaron cuatro concentraciones de 6-bencilaminopurina (6-BAP), (0.5, 1.0, 2.0, 2.5 mg.l⁻¹) y un tratamiento control sin reguladores de crecimiento. El pH fue ajustado a 5.8 antes de la esterilización.

Se colocaron 0.5 g de masa fresca de callos por frasco de vidrio de 250 ml de capacidad con 30 ml de medio de cultivo y se emplearon 10 réplicas por tratamiento. El experimento se repitió dos veces en el tiempo. El material vegetal fue mantenido por 45 días a 25 °C ± 2 con fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad a una intensidad luminosa de fotones fotosintéticos de 48.0 μmolm⁻²s⁻¹. Transcurrido este período se cuantificó el número de brotes formados por 0.5 g de masa fresca de callos.

Se empleó un diseño completamente aleatorio para los experimentos realizados. Las diferencias estadísticas de los datos expresados en porcentaje,

fueron determinadas mediante la prueba de proporciones con el paquete estadístico Statistics version 8.0. El resto de los datos se procesaron estadísticamente mediante un análisis de varianza de clasificación simple y la diferencia entre los tratamientos se determinó con la aplicación de la prueba de rangos múltiples de Duncan. El paquete estadístico empleado fue Statgraphics Plus versión 5.0 para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Influencia de tipo de explante en la formación de callo

Los resultados de este experimento demostraron que en el medio de cultivo informado por García *et al.* (2006), es posible obtener callos a partir de cotiledones, cotiledones con eje embriogénico y segmentos de eje embriogénico con nudo cotiledonal en *Phaseolus vulgaris* cv. CIAP 7247. El mayor porcentaje de callos formados se obtuvo en los cotiledones, con diferencias significativas con el resto de los otros explantes evaluados (Tabla 1).

La formación de callos en cotiledones y segmentos de eje embriogénico con nudo cotiledonal ha sido descrita por Zambre *et al.* (2005) en *Phaseolus acutifolius* y para los cotiledones con eje embriogénico por Amutha *et al.* (2006) en *Vigna radiata*, resultados que coinciden con los de este trabajo.

En los cotiledones los callos se formaron por todo el borde del explante, con una coloración parda oscura, consistencia compacta y estructura grumosa (Figura 1A). En los cotiledones con eje embriogénico los callos se generaron en el punto meristemático donde brota la yema axilar ubicado en el eje embriogénico al lado opuesto al cotiledón. Estos presentaron color blanco opaco, consistencia compacta y estructura nodular (Figura B y D). Sin embargo, la formación de los callos en los segmentos de eje embriogénico con nudo cotiledonal se inició en los cortes realizados en los dos extremos del explante y a los 28 días de cultivo cubrieron su totalidad (Figura 1C). Los callos obtenidos sobre este explante, aunque mostraron coloración parda amarillenta fueron de consistencia blanda y estructura esponjosa acuosa, característica no deseada.

Tabla 1. Formación de callo en diferentes tipos de explante en *Phaseolus vulgaris* cv. CIAP 7247 a los 28 días de cultivo.

Tipo de explante	Explantes con formación de callo (%)
Cotiledón	86 a
Cotiledón con un segmento de eje embriogénico	38 c
Segmento de eje embriogénico con nudo cotiledonal	57 b

Medias con letras no comunes difieren según la prueba de proporciones con el paquete estadístico Statistix ($p < 0.05$).

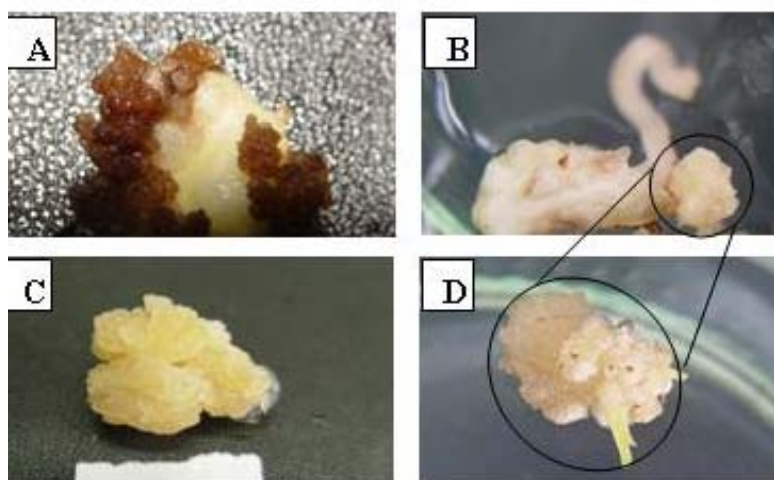


Figura 1. Formación de callo en *Phaseolus vulgaris* cv. CIAP 7247 a los 28 días de cultivo. A-cotiledón con formación de callo. B y D-callos formados a partir de un cotiledón con segmento de eje embriogénico. C-callos formados sobre un segmento de eje embriogénico con nudo cotiledonal.

Previamente se ha observado que los explantes que contienen meristemo (apical o yemas axilares) tales como ápices y segmentos nodales de plantas germinadas *in vitro* de *Phaseolus* en presencia de TDZ y AIA han formado callos que dieron lugar a brotes y estos se convirtieron en plantas (Dillen *et al.* 1996; Zambre *et al.*, 1998; Arellano *et al.*, 2008). Esta observación no es plenamente apoyada por los resultados en el genotipo CIAP 7247, ya que se demostró que los segmentos de eje embrionario con nudo cotiledonal los cuales presentan dos yemas axilares latentes solo formaron callos blandos y acuosos que no originaron brotes.

Murch y Saxena (2001) han informado que los cotiledones de semillas de plantas leguminosas contienen elevadas concentraciones de reguladores de crecimiento. La presencia de los cotiledones en el explante al menos durante siete días ha demostrado un efecto positivo en la calidad de los callos formados en especies como *Vicia faba* (Khalafalla y Hattori, 1999) y *Vigna radita* (Amutha *et al.*, 2006). Los resultados de la formación de callos en *Phaseolus vulgaris* cv. CIAP 7247 corroboraron lo anteriormente mencionado, solo el cotiledón con un segmento de eje embriogénico originó callos con potencial para la formación de brotes.

Aunque los tres tipos de explantes formaron callos, no todas las estructuras formadas en los diferentes tratamientos se diferenciaron en brotes y estos

posteriormente en plantas. Varios autores han realizado trabajos relacionados con la caracterización e identificación de callos que tienen la capacidad de generar brotes que pueden convertirse en plantas en especies leguminosas (Khalafalla y Hattori 1999; Cruz de Carvalho *et al.*, 2000; Murch y Saxena, 2001; Zambre *et al.*, 2001; Zambre *et al.*, 2002). Estos autores evidenciaron que solo los callos nodulares compactos dieron lugar a la formación de plantas. Basados en las características de los callos obtenidos en este trabajo y en los resultados descritos por los autores antes mencionados de la literatura científica consultada se seleccionó como material vegetal para continuar estudios, los callos compactos nodulares de color blanco opacos formados a partir de cotiledones con eje embriogénico.

Efecto del 6-BAP en la formación de brotes a partir de callos

Cuando los callos fueron transferidos a un medio de cultivo con diferentes concentraciones de 6-BAP y al medio de cultivo control, se observaron brotes en todos los tratamientos a los 45 días de cultivo (Tabla 2). Se observaron grupos de brotes de color verde pálido sin diferencias morfológicas de un tratamiento a otro (Figura 2). Sin embargo, el número de brotes formados por cada 0.5 g de masa fresca de callos resultó diferente en dependencia de la concentración de 6-BAP adicionada al medio de cultivo (Tabla 2).

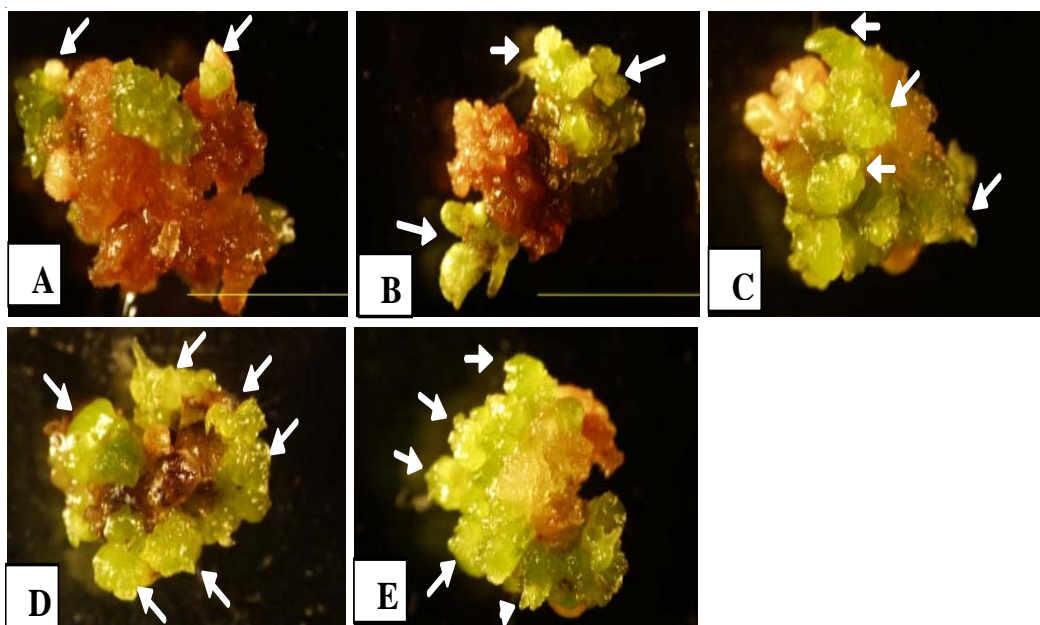


Figura 2. Formación de brotes a partir de callos en *Phaseolus vulgaris* L. cv. CIAP 7247 en el medio de cultivo para la formación de brotes, con diferentes concentraciones de 6-BAP, a los 45 días de cultivo. A-0.0 mg.l⁻¹, B-0.5 mg.l⁻¹, C-1.0 mg.l⁻¹, D-2.0 mg.l⁻¹, E-2.5 mg.l⁻¹. Las flechas en la figura señalan los brotes.

Tabla 2. Efecto de diferentes concentraciones de 6-BAP sobre el número de brotes formados en *Phaseolus vulgaris* L. cv. CIAP 7247 a los 45 días de cultivo.

Concentraciones de 6-BAP (mg.l ⁻¹)	Número de brotes formados en 0.5 g de masa fresca de callo
0.0	39.0 d
0.5	57.0 c
1.0	71.0 b
2.0	86.0 a
2.5	83.0 a
±E.E	± 2.76

Medias con letras desiguales en una misma columna difieren significativamente según la prueba de rangos múltiple de Duncan ($p < 0.05$).

Con el aumento de las concentraciones de esta citoquinina, se incrementó el número de brotes formados. Los valores más altos de esta variable se evidenciaron en los tratamientos con 2.0 y 2.5 mg.l⁻¹ de 6-BAP, con diferencias significativas con el resto de las concentraciones de este regulador de crecimiento evaluadas y con el control (Tabla 2).

Los resultados demostraron que la adición de 6-BAP al medio de cultivo incrementó significativamente la formación de brotes en los callos originados a partir de cotiledones con segmentos de eje embriogénicos. Mostraron también que este proceso se puede lograr sin la presencia de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo. Resultados similares fueron descritos en otras especies leguminosas como *Vicia faba* (L.) y *Vigna radiata* (L.), donde se señala que los callos cultivados con 2.0 mg.l⁻¹ de esta citoquinina presentaron una formación de brotes superior con respecto a los que se cultivaron en el medio de cultivo con concentraciones de 6-BAP inferiores y sin reguladores de crecimiento (Khalafalla y Hattori, 1999; Amutha *et al.*, 2006).

En los tres protocolos publicados relacionados con la organogénesis indirecta en *Phaseolus vulgaris* se empleó el 6-BAP para la formación de brotes a partir de callos (Mohamed *et al.*, 1993; Zambre *et al.*, 1998; Arellano *et al.*, 2008). Sin embargo, solo en el tercero se adicionaron concentraciones de este regulador de crecimiento superiores a 2.0 mg.l⁻¹ (5.0 mg.l⁻¹) con las que los autores obtuvieron resultados satisfactorios.

Similar a los resultados con la aplicación de los protocolos anteriormente descritos, el 6-BAP estimuló la formación de brotes a partir de callos en *Phaseolus vulgaris* cv. CIAP 7247. Sin embargo, en contraste con lo mencionado por Arellano *et al.* (2008) la respuesta mayor se logró con 2.0 y 2.5 mg.l⁻¹ sin diferencia significativa.

El empleo de cotiledones con segmentos de ejes embriogénicos como explante, permitió la formación de callos que regeneraron brotes de *Phaseolus*

vulgaris. No obstante, a diferencia de los resultados publicados por Mohamed *et al.* (1993), Zambre *et al.* (1998) y Arellano *et al.* (2008), no se logró la formación de brotes en callos desarrollados a partir de cotiledones y eje embriogénico con nudo cotiledonal. A pesar de que para la formación de brotes se utilizó el mismo regulador de crecimiento y en concentraciones muy similares a las informadas por los autores anteriormente mencionados, los resultados no coincidieron. Por tanto, se hace evidente que el explante inicial y el genotipo tuvieron un efecto en la regeneración.

Los resultados en la formación de brotes a partir de callos en *Phaseolus vulgaris* cv. CIAP 7247 fueron muy alentadores; sin embargo muy pocos brotes se convirtieron en plantas, por lo que se considera necesario realizar esfuerzos adicionales en la elongación y conversión de los brotes para incrementar la regeneración *in vitro* de esta importante leguminosa.

CONCLUSIONES

Se logró la formación de brotes a partir de callos en *Phaseolus vulgaris* L. cv. CIAP 7247. Este indicador fue influenciado por tres factores fundamentales: 1) el tipo de explante que tuvo un efecto determinante en la formación de los brotes, pues solo se observaron brotes en los callos desarrollados a partir de cotiledones con segmentos de ejes embriogénicos. 2) la adición de 6-BAP al medio de cultivo de formación de brotes, ya que el número de brotes incrementó 2.2 veces en los callos cultivados con 2.0 mg.l⁻¹ de este regulador de crecimiento. 3) el genotipo, aunque se utilizó el mismo regulador de crecimiento y en concentraciones muy similares a las referidas previamente para la formación de brotes a partir de callos en esta especie, los resultados no coincidieron con los informados.

REFERENCIAS

Amutha, S, Muruganatham M, Ganapathi A (2006) Thidiazuron-induced high-frequency axillary and adventitious shoot

- regeneration in *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*—Plant 42: 26–30
- Arellano, J, Fuentes S I, Castillo-España P, Hernández G (2008) Regeneration of different cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) via indirect organogenesis. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 1: 11-18
- Cruz de Carvalho, M H C, Le B V, Zuily-Fodil Y, Thi A T P, Kiem T T V (2000) Efficient whole plant regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using Thin-cell-layer culture and silver nitrate. *Plant Science* 159: 223-232
- Dillen, W, De Clercq J, Van Montagu M, Angenon G (1996) Plant regeneration from callus in a range of *Phaseolus acutifolius* A. Gray genotypes. *Plant Sci.* 118:81–88
- Dillen, W, De Clercq J, Goznes A, Van Montagu M, Angenon G (1997) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phaseolus acutifolius* A Gray. *Theor. Appl. Genet.* 94: 151-158
- Gamborg, O L, Miller R A y Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50: 151-158
- García, L, Pérez J, Torres D, Padrón Y, Romero C (2006) Influencia de reguladores del crecimiento en la formación de callos de *Phaseolus vulgaris* L cv. CIAP 7247. *Biotecnología Vegetal* 6 (2): 73-77
- Khalafalla, M, Hattori K (1999) A combination of thidiazuron and benzyladenine promotes multiple shoot production from cotyledonary node explants of faba bean (*Vicia faba* L.). *Plant Growth Regulation* 27: 145-148
- Mohamed, M F, Coyne D P, Read P E (1993) Shoot organogenesis in callus induced from pedicel explants of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of the American Society for Horticultural Science* 118: 158-162
- Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. 15: 473-497 *Plant Physiol*
- Murch, S J, Saxena P K (2001) Molecular fate of thidiazuron and its effects on auxin transport in hypocotyls tissues of *Pelargonium x hortorum* Bailey. *Plant Growth regulation* 35: 269-275
- Zambre, M A, De Clercq J, Vranova E, Van Montagu M, Angenon G, Dillen W (1998) Plant regeneration from embryo-derived callus in *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) and *P. acutifolius* A. Gray (teparty bean). *Plant Cell Reports* 17: 626-630
- Zambre, M, Chowdhury B, Kuo Y-H, Van Montagu M, Angenon G, Lambein F (2002) Prolific regeneration of fertile plants from green nodular callus induced from meristematic tissues in *Lathyrus sativus* L. (grass pea). *Plant Sci* 163:1107–1112
- Zambre, M, Geerts P, Maquet A, Van Montagu M, Dillen W, Angenon G (2001) Regeneration of fertile plants from callus in *Phaseolus polyanthus* Greenman (year bean). *Ann Bot* 88:371–377
- Zambre, M, Goossens A, Cardona C, Van Montagu M, Terryn N, Angenon G (2005) A reproducible genetic transformation system for cultivated *Phaseolus acutifolius* (teparty bean) and its use to assess the role of arcelins in resistance to the Mexican bean weevil. *Theor Appl Genet* 110: 914–924