

## Enraizamiento y aclimatización de brotes de *Phaseolus vulgaris* L. regenerados *in vitro*

Lourdes R. García \*, Raúl Collado, Idalmis Bermúdez-Caraballoso, Novisel Veitía, Dámaris Torres, Carlos Romero. \*Autor para correspondencia.

Instituto 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: lourdes@ibp.co.cu

### RESUMEN

El género *Phaseolus* se ha demostrado que es recalcitrante a la regeneración *in vitro* de plantas lo cual es un requisito indispensable para iniciar un programa de mejoramiento genético. Con el objetivo de lograr el enraizamiento y aclimatización de brotes regenerados del cv. CIAP 7247 se estudió la influencia de IBA en el medio de cultivo. Además, se evaluó la longitud de los brotes y la supervivencia de las plantas enraizadas en la fase de aclimatización. Los resultados mostraron que es indispensable el AIB para la inducción de raíces en esta variedad. Se comprobó que los brotes con 1 cm o más de longitud pueden ser transferidos a los medios de cultivo de enraizamiento donde se obtienen porcentajes de formación de raíces mayores de 70.6% y supervivencia en fase de aclimatización fue 95%. No se encontraron diferencias en cuanto al color y forma de las hojas y tallo y todas las plantas aclimatizadas fueron fértiles.

Palabras clave: auxinas, cultivo de tejidos, frijol

### ABSTRACT

The genus *Phaseolus* showed to be recalcitrant to *in vitro* plant generation, which is a prerequisite to start a breeding program. Influence of IBA in the culture medium and the shoot longitude were studied in order to achieve rooting and acclimatization of regenerated shoots of the cv. CIAP 7247. Survival of plants in the acclimatization phase was also evaluated, as well as morphological characteristics and fertility them. Results showed that IBA is indispensable for roots induction in this variety. Shoots with 1 cm or more can be transferred to the rooting culture medium where percentages of roots formation 70.6% and 95% of plants acclimatization are obtained. Differences in the morphological characteristics were not found taking into account color and shape of leaves and shoot. Besides, all the plants were fertile.

Keywords: auxin, beans, tissue culture

### INTRODUCCIÓN

*Phaseolus vulgaris* es una de las especies del género *Phaseolus* que más se cultiva mundialmente como fuente de alimentación por sus valiosos aportes a la dieta de millones de personas en países de América, Asia y África (Delgado-Sánchez *et al.*, 2006).

Dentro de los programas de mejoramiento genético la búsqueda de variedades más productivas, resistentes a estrés biótico y abiótico es una tarea primordial para satisfacer las necesidades siempre crecientes de la población.

Entre las herramientas que se han utilizado para acelerar el desarrollo de nuevas variedades está la transformación genética (Guidolin,

2003). No obstante, en las especies de *Phaseolus* estas técnicas se hacen muy difíciles por lo recalcitrante del cultivo *in vitro* y la poca reproducibilidad de los experimentos, entre otras causas (Shamsudeen *et al.*, 2006; Kanchiswamy y Maffei, 2008). *Phaseolus acutifolius* es la única especie de *Phaseolus* que puede ser fácilmente transformada con *Agrobacterium tumefaciens* (Terry *et al.*, 2008).

Para poder desarrollar estas técnicas es indispensable contar con protocolos de regeneración de plantas eficientes que permitan llevar las investigaciones hasta la evaluación de las plantas en el campo.

El cultivo de tejidos y la regeneración de plantas en *P. vulgaris* ha tenido serias dificultades

desde el inicio. Diferentes explantes han sido utilizados para la regeneración directa de plantas siguiendo la vía de la organogénesis (Guidolin, 2003), pero se ha demostrado que esta especie es genotipo dependiente y es difícil repetir los protocolos desarrollados en otras variedades (Collado *et al.*, 2008).

García *et al.* (2008) propusieron un protocolo de regeneración de plantas vía organogénesis directa a partir de yemas múltiples en *P. vulgaris* L. cv. CIAP 7247. En la presente investigación se realizan un conjunto de experimentos con el objetivo de lograr el enraizamiento y la aclimatización de plantas regeneradas *in vitro* en este cultivar.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon brotes elongados de *P. vulgaris* L. cv. CIAP 7247 regenerados *in vitro* a partir de yemas múltiples según el protocolo propuesto por García *et al.* (2008).

Se emplearon frascos de vidrio de 250 ml de capacidad con 30 ml de medio de cultivo. El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5.7 previo a la esterilización con NaOH 1.0 N y HCl 1.0 N.

Se colocaron seis explantes por frasco de cultivo que contenían 30 ml del medio de cultivo y se emplearon 10 frascos por tratamiento. Los explantes fueron subcultivados cada dos semanas al mismo medio de cultivo y las evaluaciones se realizaron a las 4 semanas. El material vegetal se incubó a  $27 \pm 2$  °C en condiciones de luz solar en las cámaras de crecimiento.

El diseño experimental empleado fue completamente aleatorizado para todos los experimentos, dadas las condiciones de homogeneidad en las que se desarrolló la investigación. Para los análisis estadísticos se realizaron análisis de varianza de clasificación simple. Para determinar los grupos homogéneos y/o significativamente diferentes, a un nivel de 5.0%, se utilizó la prueba de rangos múltiples de Tukey.

### Influencia del ácido indol butírico (AIB)

Brotes elongados, con longitud mayor o igual a 3 cm, fueron separados y colocados en

distintos medios de cultivo con el objetivo de lograr el enraizamiento. El medio de cultivo basal estuvo compuesto por las sales Murashige y Skoog (1962), sacarosa 30 g.l<sup>-1</sup>, vitaminas propuestas por Heinz y Mee (1969) y se estudiaron tres concentraciones de AIB (0.0, 1.0 y 2.0 mg.l<sup>-1</sup>). Se utilizó como control el medio de cultivo libre de reguladores del crecimiento.

Se cuantificó el número de brotes enraizados y se midió la longitud de las raíces por brote (cm).

### Influencia de la longitud de los brotes

Se determinó el tamaño mínimo permisible de los brotes para lograr el enraizamiento *in vitro* y la aclimatización posterior en casas de cultivo. Para ello se utilizaron brotes entre 0.5 y 1 cm, entre 1 y 3 cm y mayores de 3 cm, los cuales fueron colocados en el medio de cultivo de enraizamiento seleccionado en el experimento anterior.

Las variables evaluadas fueron las mismas que en el experimento anterior.

La aclimatización de los brotes se realizó en casa de cultivo. Las plantas obtenidas *in vitro* fueron colocadas en cajas de polietileno de 70 orificios en un sustrato compuesto por una mezcla de materia orgánica-zeolita de 80-20% respectivamente. El riego tuvo una frecuencia de cinco veces al día por 2 minutos cada uno.

En esta fase se determinó el número de plantas vivas a los 7 días (supervivencia) y se observaron las características morfológicas de las plantas, el florecimiento y la fructificación para detectar alguna anomalía.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Influencia del AIB

Los mejores resultados se obtuvieron cuando se utilizó el AIB (1 y 2 mg.l<sup>-1</sup>) como componente dentro del medio de cultivo. Se observaron los mayores valores de brotes enraizados (88% y 90%, respectivamente) en un período de cuatro semanas (Figura 1).

En el medio de cultivo sin regulador del crecimiento solamente se alcanzó un 15% de enraizamiento.



Figura 1. Brotes de *Phaseolus vulgaris* L. cv. CIAP 7247 enraizados a los 30 días de cultivo en el medio de cultivo compuesto por las sales MS, sacarosa (30 g.l<sup>-1</sup>), vitaminas propuestas por Heinz y Mee (1969) y AIB (1.0 mg.l<sup>-1</sup>).

Los explantes utilizados en el experimento se regeneraron a partir de yemas múltiples formadas en medios de cultivo con 1 mg.l<sup>-1</sup> de tiazurón (TDZ) (García *et al.*, 2008). Se ha demostrado que uno de los problemas cruciales del TDZ es la inhibición del enraizamiento de los brotes en especies como *Phaseolus vulgaris*, *P. acutifolius* y *P. polyanthus*. Por ello disminuye la eficiencia de los protocolos de regeneración (Dillen *et al.*, 1997; Zambre *et al.*, 1998; Zambre *et al.*, 2001).

Se ha sugerido por varios investigadores que este regulador del crecimiento puede estar involucrado en la acumulación y/o síntesis de citoquininas (Capelle *et al.*, 1983; Cruz de Carvalho *et al.*, 2000). Por esta razón se hizo necesario en este estudio la adición de auxinas a los medios de cultivo para inducir el enraizamiento de los brotes. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Varisai Mohamed *et al.* (2006) en la especie *P. angularis*. Ellos refieren buenos resultados cuando trataron los brotes con soluciones de AIB durante 10 minutos y luego los colocaban en un medio de cultivo sin reguladores del crecimiento.

En este trabajo la respuesta de las plantas a la formación de raíces, a pesar de haberse utilizado el TDZ en anteriores medios de cultivo, puede estar relacionada, además, con la

presencia de AgNO<sub>3</sub> en el medio de cultivo de elongación de brotes. Khalafalla *et al.* (2000) demostraron que inhibidores de etileno, como AgNO<sub>3</sub>, actúan en el enraizamiento de brotes de fava regenerados en presencia de TDZ, anticipando la formación, aumentando la tasa de crecimiento y el número de raíces formadas.

#### Influencia de la longitud de los brotes

La longitud de los brotes influyó significativamente en su enraizamiento. Se observó que de los brotes  $\geq 3$  cm de longitud enraizaron el 100% y de los brotes con una longitud entre 1 y 3 cm enraizaron el 70.6%. De los brotes con longitudes menores a 1 cm solo enraizó el 47% (Tabla 1).

Cuando se evaluó la variable longitud de las raíces no se encontraron diferencias significativas entre los brotes mayores de 1 cm de longitud.

En la fase de aclimatización se observaron también diferencias en la supervivencia de las plantas en dependencia de su longitud. Todas las plantas 1 cm de longitud con raíces bien diferenciadas presentaron porcentaje de supervivencia superiores a 95% (Figura 2 A), mientras que las plantas menores de 1 cm murieron.

Tabla 1. Influencia de la longitud de los brotes en el enraizamiento *in vitro* de *P. vulgaris* cv. CIAP 7247 a los 30 días de cultivo.

Longitud de los brotes (cm)	No. de brotes enraizados	Longitud de las raíces (cm)
< 1 cm	2.8 c	1.63 b
1-3 cm	4.2 b	2.62 a
≥3 cm	6 a	2.80 a
EE	0.15	0.28

Medias con letras no comunes en una misma columna difieren significativamente por prueba de Tukey para ( $p < 0.05$ ).



Figura 2. Aclimatización de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. cv. CIAP 7247 en casa de cultivo. A- Supervivencia a los 7 días de plantadas. B- Plantas a los 25 días de plantadas. C- Plantas en floración.

Se demostró que brotes con 1cm o más de longitud pueden formar raíces cuando son transferidos a los medios de cultivo de enraizamiento, lo que garantizará una supervivencia adecuada en la fase de aclimatización.

En el estudio de las características morfológicas de las plantas no se encontraron diferencias en cuanto al color y forma de las hojas y tallo (Figura 2 B) y todas las plantas aclimatizadas fueron fértiles (Figura 2 C).

## CONCLUSIONES

En el trabajo se constata la importancia del AIB en los medios de cultivo de enraizamiento en esta especie y la necesidad de utilizar explantes mayores de 1cm en esta fase de desarrollo para lograr altos porcentajes de supervivencia en la fase de aclimatización.

## REFERENCIAS

Capelle SC, Mok DWS, Turner JE (1983) Effects of thidiazuron on cytokinin autonomy and the metabolism of  $N^6$  adenosine in callus cultures of *Phaseolus lunatus* L. Plant Physiol 73: 796-802

Collado, R, García RL, Angenon G, Torres D, Romero C, Bermúdez-Carabaloso I, Veitía N (2008) Formación de callos e inducción de brotes en *Phaseolus vulgaris* L. cv. CIAP 7247. Biotecnología Vegetal 8 (1): 35-40

Cruz de Carvalho MH, Van Lê B, Zully-Fodil Y, Pham Thi AT, Thanh Van KT (2000) Efficient whole plant regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using thin-cell-layer culture and silver nitrate. Plant Science 159 (2): 223 – 232

Delgado-Sánchez, P, Saucedo-Ruiz M, Guzmán-Maldonado SH, Villordo-Pineda E, González-Chavira M, Fraire-Velázquez S, Acosta-Gallegos J, Mora-Avilés A (2006) An organogenic plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Science 170 (4): 822-827

Dillen W, De Clercq J, Goznes A, Van Montagu M, Angenon G (1997) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phaseolus acutifolius* A Gray. Theoretical and Applied Genetics 94 (2): 151-158

García, LR, Collado R, Bermúdez-Carabaloso I, Veitía N, Torres D, Romero C (2008) Regeneración de plantas vía organogénesis directa en *Phaseolus vulgaris* L. Biotecnología Vegetal 8 (2): 77-80

Guidolin AF (2003) Regeneração de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. a partir de calos e

transformação genética via *Agrobacterium*. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias. PIRACICABA, São Paulo, Brazil

Heinz, DJ, Mee GWP (1969) Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* spp. *Crop. Science* 9 (3): 346 – 348

Kanchiswamy, CN, Maffei M (2008) Callus induction and shoot regeneration of *Phaseolus lunatus* L. cv. Wonder Bush and cv. Pole Sieva. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 92: 239 – 242

Khalafalla, MM, Hattori K (2000) Ethylene inhibitors enhance *in vitro* root formation of faba bean shorts regenerated of medium containing thidiazuron. *Plant Growth Regulation* 32 (1): 59 - 63

Varisai Mohamed M, Jih-Min S, Toong-Long J, Chang-Sheng W (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 Tiss Organ Cult.* 86: 187-199

Terryn, N, Zambre M, Angenon G, Van Montagu M (2008) Tepary Bean. Institute Plant Biotechnology for Developing Countries (IPBO), Ghent University, Ghent, Belgium and Vrije Universiteit Brussel (VUB), Brussels, Belgium

Zambre, MA, De Clerq 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 (tepary bean). *Plant Cell Reports* 17: 626 – 630

Zambre, MA, Geerts P, Maquet A, Van Montagu M, Dillen W, Angenon G (2001) Regeneration of fertile plants from callus in *Phaseolus polyanthus* Greenman (Year Bean). *Annals of Botany* 88: 371 - 377