

## Regeneración de plantas de cinco variedades de *Phaseolus vulgaris* L. vía organogénesis directa

L. R. García<sup>1</sup>, I. Bermúdez-Carabaloso<sup>1</sup>, N. Veitía<sup>1</sup>, R. Collado<sup>1</sup>, D. Torres<sup>1</sup>, C. Romero<sup>1</sup>, A. Martirena<sup>2</sup>. \*Autores para correspondencia.

<sup>1</sup>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

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5. 5. Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

### RESUMEN

Por su contenido proteico el frijol en Cuba constituye una importante fuente para la alimentación humana. Por ello, la búsqueda de cultivares con mayores potencialidades es un reto eminente en esta especie. El cultivo de tejidos en *Phaseolus vulgaris* L., resulta muy difícil causado entre otros factores por su condición variedad dependiente. El objetivo de la presente investigación fue regenerar plantas vía organogénesis directa en cinco variedades de *P. vulgaris*. Las variedades estudiadas fueron: 'ICA Pijao', 'BAT 93', 'BAT 482', 'BAT 304' y 'CIAP7247F'. Se observó que 'BAT 304' e 'ICA Pijao' tuvieron los mayores valores de número de explantes con inducción de yemas múltiples. Los mayores valores en el número de yemas múltiples por explante se obtuvieron en las variedades 'CIAP7247F' y 'BAT 482'. En la 'BAT 93' la formación de yemas múltiples fue muy profusa lo que atentó contra el número de explantes con brotes inducidos. La variedad 'CIAP7247F' fue la que presentó el mayor número de brotes por explante mientras que las variedades que mostraron los menores valores fueron 'BAT 304' y 'BAT 93'. Se constató el efecto de la variedad en esta especie durante todo el proceso del cultivo de tejidos.

Palabras clave: callus formations, cultivo *in vitro*, frijol, yemas múltiples

### ABSTRACT

The beans are an important source for human consumption in Cuba due their protein content. For this reason; the search for cultivars with greater potential is a prominent challenge in this specie. Tissue culture in *Phaseolus vulgaris* L. is very difficult, among other things, due to its genotype-dependent condition. The aim of this study was to evaluate the regeneration of plants via direct organogenesis in five genotypes of *P. vulgaris*. The genotypes studied were 'ICA Pijao', 'BAT 93', 'BAT 482', 'BAT 304' and 'CIAP7247F'. The investigation showed that genotypes 'BAT 304' and 'Pijao ICA' had the highest values of explants with multiple buds induction. In the variable number of multiple buds per explant, the highest values were obtained in 'CIAP7247F' and 'BAT 482' genotypes. In 'BAT 93' callus formation was so profuse that reduced the number of explants with buds induced. Plant regeneration was another variable that differed in the genotypes studied. 'CIAP7247F' showed the greater number of shoots per explant while genotypes that showed the lowest values were 'BAT 304' and 'BAT 93'. The effect of the variety in this species was shown during the tissues culture process.

Keywords: beans, *in vitro* culture, multiple buds

El frijol común es un alimento básico y una de las principales fuentes proteicas en la alimentación de la población de Latinoamérica y África (Cruz de Carvahlo *et al.*, 2000; Delgado-Sánchez *et al.*, 2006; Varisai-Mohamed *et al.*, 2006).

La biotecnología, conjuntamente con los programas de mejoramiento genético convencionales pudieran facilitar el

mejoramiento genético del frijol para resistencia o tolerancia a factores bióticos y abióticos, así como el incremento en la calidad de las semillas (Veltcheva *et al.*, 2005; CIAT, 2008; Gatica *et al.*, 2010).

La regeneración de plantas de frijol común a partir del cultivo de tejidos se ha descrito con cierto grado de éxito en los últimos años. No obstante la regeneración *in vitro* es todavía

un proceso difícil y de baja eficiencia (Gatica *et al.*, 2010). Asimismo los efectos del genotipo en la capacidad regenerativa, así como en la reproducibilidad han sido factores limitantes (Delgado-Sánchez *et al.*, 2006; Kwapata *et al.* 2010, Quintero-Jiménez *et al.*, 2010).

El presente trabajo tuvo como objetivo regenerar plantas vía organogénesis directa en cinco variedades de *P. vulgaris*.

Se utilizó el protocolo de regeneración de plantas vía organogénesis directa propuesto por García *et al.* (2008). Las variedades estudiadas poseen diferencias genealógicas y de color de la semilla. Estas fueron: 'ICA Pijao', 'BAT 93', 'BAT 482', 'BAT 304' y 'CIAP7247F'.

Como material vegetal se emplearon semillas maduras obtenidas en condiciones semicontroladas de casa de cultivo. Estas semillas fueron desinfectadas según el protocolo propuesto por Dillen *et al.* (1997) para su introducción *in vitro*.

Como explante inicial se utilizó el nudo cotiledonal, el cual fue colocado en un medio de cultivo para la inducción de yemas múltiples (YM). Los subcultivos se realizaron cada 15 días en el mismo medio de cultivo y luego los explantes fueron transferidos a un medio de cultivo para la regeneración de plantas. Los cultivos se colocaron a  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  en las cámaras de crecimiento en condiciones de luz solar.

Las evaluaciones se realizaron a los 30 días de cultivo. Las variables evaluadas fueron: el número de explantes con inducción de yemas múltiples (YM), el número de yemas formadas por explante y el número de brotes regenerados por explante.

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 o Dunnett's C, esta última cuando no se cumplieron los supuestos de homogeneidad de varianza.

Se observaron diferencias en la formación de YM entre las variedades estudiadas (Figura 1 A, B). Las variedades 'BAT 304' e 'ICA Pijao' presentaron los mayores valores de explantes

con inducción de YM (Tabla 1). En las restantes variedades se encontraron porcentajes de inducción de YM menores de 65.0%. Este resultado estuvo estrechamente relacionado con la fenolización de algunos explantes en el medio de cultivo lo que influyó negativamente en el número de ellos que formaron YM. Quintero-Jiménez *et al.* (2010) encontraron valores mayores al 50.0% de muerte de los explantes por oxidación fenólica en todas las variedades estudiadas de *Phaseolus vulgaris* cuando emplearon el medio de cultivo MS.

Además de lo anteriormente expuesto, en la variedad 'BAT 93' la formación de yemas múltiples fue muy profusa lo que atentó contra el número de explantes con brotes inducidos (Figura 1 A). Similares resultados obtuvieron Kwapata *et al.* (2010) cuando evaluaron la respuesta de diez variedades de *Phaseolus vulgaris* al cultivo de tejidos y encontraron que las variedades que presentaron mejores resultados fueron las que se recuperaron más rápido de las heridas causadas en el momento de la escisión del nudo cotiledonal y las que produjeron menos callos en la zona de la escisión. Estos autores concluyeron que los dos aspectos relacionados anteriormente están entre las causas que hace que esta especie sea recalcitrante a la regeneración *in vitro*. La influencia de estos dos factores en el desarrollo de los tejidos cultivados *in vitro* fue descrita también por Ozyigit (2008).

En las variedades 'ICA Pijao' y 'BAT 304' se obtuvieron un 62.0% y 70.0% de explantes que formaron YM en ambos lados del nudo cotiledonal. En la variable número de YM por explante los mayores valores se obtuvieron en las variedades 'CIAP7247F' y 'BAT 482' (Tabla 1).

Similares resultados fueron obtenidos por Delgado-Sánchez *et al.* (2006) cuando establecieron un procedimiento para la regeneración de plantas en dos variedades comerciales de *P. vulgaris* a través de organogénesis directa a partir de ejes embrionarios de semillas maduras. Igualmente Gatica *et al.* (2010) encontraron que independientemente del medio de cultivo, el número de YM difirió significativamente en dependencia de la variedad evaluada.

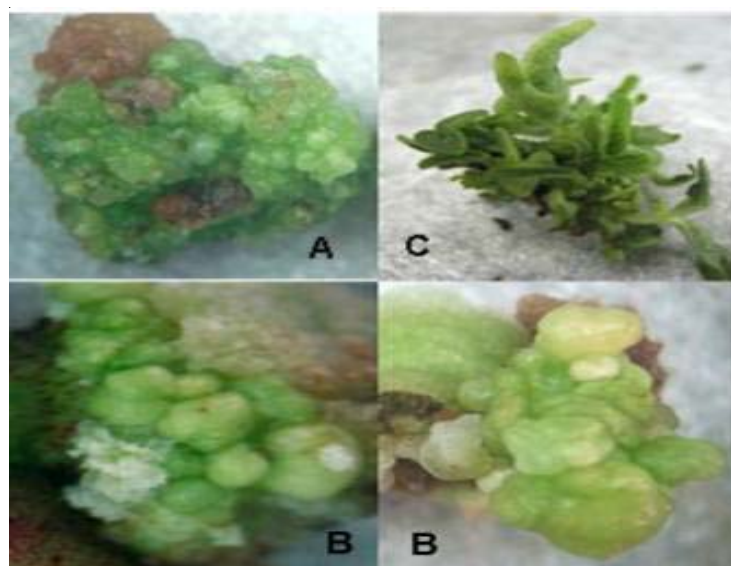


Figura 1. Inducción de yemas múltiples en variedades *P. vulgaris* durante el cultivo *in vitro*. A) Variedad 'BAT 93', B) Variedad 'ICA Pijao', C) Variedad 'CIAP7247F'.

Tabla 1. Formación de yemas múltiples en nudos cotiledonal de semillas de *Phaseolus vulgaris* a los 30 días de cultivo.

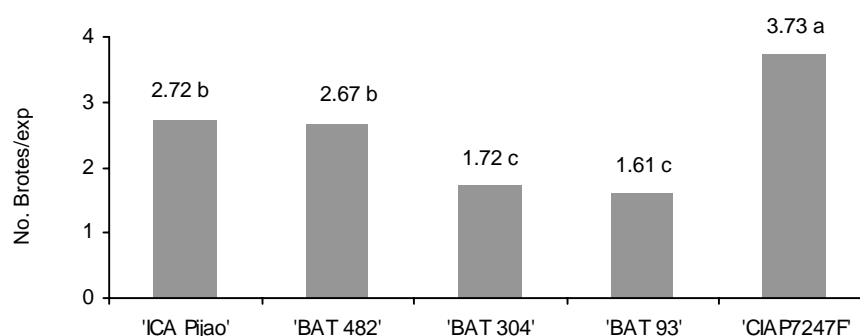
Variedades	Núm. expl. con YM/frasco	%	Número de YM/explante
'ICA Pijao'	4.23 ab	84.6	2.97 bc
'BAT 482'	3.10 c	62	4.22 a
'BAT 304'	4.30 a	86	2.32 c
'BAT 93'	2.60 c	52	3.60 ab
'CIAP7247F'	3.36 bc	67.2	4.15 a
EE	±0.32 *		±0.23

Medias con letras no comunes en una columna difieren significativamente por Tukey\* o DunnettC' para ( $p < 0.05$ ).

Aunque se utilizó el mismo explante, medio y condiciones de cultivo, la capacidad regenerativa varió entre las cinco variedades. En 'BAT 93', 'BAT 482' y 'BAT 304' se obtuvieron los menores porcentajes de YM regeneradas con 44.7%, 63.2% y 74.1%, respectivamente. Las variedades de mejores resultados fueron 'CIAP7247F' (89.8%) e 'ICA Pijao' (91.5%). Arellano *et al.* (2009) solo alcanzaron porcentajes de regeneración de 50.0%, vía organogénesis indirecta. Quintero-Jiménez *et al.* (2010) obtuvieron eficiencias de regeneración de un 83.0%. Gatica *et al.* (2010) encontraron diferencias significativas entre las variedades de *Phaseolus vulgaris* estudiadas para el número de brotes regenerados, resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo.

'CIAP7247F' fue la variedad que mayor valor presentó en el número de brotes regenerados por explante con 3.73 como promedio (Figura 1C). Las variedades que mostraron los menores valores fueron 'BAT 304' y 'BAT 93' (Figura 2). En esta última variedad no se desarrollaron brotes mayores de 1.0 cm de longitud a los 30 días de cultivo.

Los resultados confirmaron observaciones previas sobre la influencia del variedad en la regeneración de plantas por organogénesis en el frijol común (Rubluo y Kartha, 1985; Santalla *et al.*, 1998; Veltcheva *et al.*, 2005; Delgado-Sanchez *et al.*, 2006; Varisai-Mohamed *et al.*, 2006).



Medias con letras no comunes difieren significativamente por *DunnnettC'* para  $p < 0.05$ .

Figura 2. Regeneración de plantas en cinco variedades de *Phaseolus vulgaris* a los 30 días de cultivo.

## CONCLUSIONES

Se constató la condición variedad dependiente de *Phaseolus vulgaris*. Las cinco variedades estudiadas mostraron una respuesta diferencial al ser cultivadas *in vitro*. El protocolo propuesto por García *et al.* (2008) fue aplicado a las variedades estudiadas por lo que se demostró su reproducibilidad.

## REFERENCIAS

- Arellano, J, Fuentes SI, Castillo-España P, Hernández G (2009) Regeneration of different cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) via indirect organogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 96:1-11
- CIAT (2008) Improved beans for the developing world. Annual Report 2008. pp 302 Cali
- Cruz de Carvalho, MH, Van Le B, Zuily-Fodil Y, Pham Thi AT, Tran Thanh Van K (2000) Efficient whole plant regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using thin-cell-layer culture and silver nitrate. *Plant Sci* 159:223–232
- Delgado-Sánchez, P, Saucedo-Ruiz M, Guzmán-Maldonado SH, Villordo-Pineda E, González Chavira M, Fraire-Velázquez S, Acosta-Gallegos JA, Mora-Aviles A (2006) An organogenic plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science* 170:822–827
- Dillen, W, De Clercq J, Goossens A, Van Montagu M, Angenon G (1997) *Agrobacterium* mediated transformation of *Phaseolus acutifolius* A. gray. *Theor Appl Genet* 94:151–158
- García, L, Collado R, Bermúdez I, Veitía N, Torres D, Romero C (2008) Regeneración de plantas vía organogénesis directa en *Phaseolus vulgaris* L. *Biotecnología Vegetal* 8 (2): 109–114
- Gatica, Arias AM, Muños Valverde J, Ramírez Fonseca P, Valdez Melara M (2010) *In vitro* plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris*): effect of N6-benzylaminopurine and adenine sulphate. *Electronic Journal of Biotechnology* 13:1-8
- Kwapata, K, Sabzikar R, Sticklen MB, Kelly JD (2010) *In vitro* regeneration and morphogenesis studies in common bean. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 100: 97–105
- Ozyigit II (2008) Phenolic changes during *in vitro* organogenesis of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) shoot tip. *Afr J Biotechnology* 7 (8):1145-1150
- Quintero-Jiménez, A, Espinosa-Huerta E, Acosta-Gallegos JA, Guzmán-Maldonado HS, Mora-Avilés MA (2010) An improved method for *in vitro* regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agrociencia* 44: 57–64
- Rubluo, A, Kartha, K (1985) *In vitro* culture of shoot apical meristems of various *Phaseolus* species and cultivars. *Plant Physiol.* 119: 425-433
- Santalla, M, Power JB, Bavey MR (1998) Efficient *in vitro* shoot regeneration responses of *Phaseolus vulgaris* and *P. coccineus*. *Euphytica* 102 (2): 195-202
- Varisai-Mohamed, S, Sung JM, Jeng TL, Wang CS (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 (2): 187-199
- Veltcheva, M, Svetleva D, Petkova SP, Perl A (2005) *In vitro* regeneration and genetic transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)-Problems and progress. *Scientia Horticulturae* 107: 2–10