

## Efecto del sulfato de adenina en la regeneración y elongación de brotes de frijol común

L. R. García, I. Bermúdez-Caraballoso, N. Veitía, R. Collado, D. Torres, C. 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

La regeneración de brotes, el crecimiento y elongación de las plantas son etapas críticas del cultivo de tejidos en *Phaseolus vulgaris*. Este trabajo muestra el efecto del sulfato de adenina incluido en los medios de cultivo sobre la regeneración y elongación de brotes en la variedad 'CIAP 7247F'. Los resultados mostraron que el sulfato de adenina influyó tanto en la regeneración de brotes como en la elongación. Se incrementaron los valores del número de brotes regenerados y la altura de la planta cuando fue añadido en los medios de cultivo.

Palabras clave: cultivo *in vitro*, medio de cultivo, *Phaseolus vulgaris*

### ABSTRACT

Plant regeneration and further development of these are critical steps in tissue culture of *Phaseolus vulgaris*. The paper shows the effect of adenine sulfate included in the culture media on regeneration and elongation of shoots in the variety CIAP 7247F. The results showed that adenine sulfate affect plant regeneration and its elongation. The values of regenerated shoots and the plant height were increased.

Keywords: *in vitro* culture, culture medium, *Phaseolus vulgaris*

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es un cultivo económicamente importante y una de las leguminosas más consumidas por el hombre en América Latina, África y Asia (Delgado- Sánchez *et al.*, 2006).

Debido a la creciente demanda de nuevas variedades, los programas de mejoramiento genético buscan tecnologías que aceleren el desarrollo de estas, en el menor tiempo posible. Por esta razón el cultivo de tejidos en esta especie se ha potenciado en los últimos años y se han desarrollado protocolos de regeneración *in vitro* para algunas variedades (Kwapata *et al.*, 2010).

Por la condición genotipo dependiente de la especie, estos no pueden ser extrapolados a otras. Es por ello, que resulta necesario desarrollar un protocolo de regeneración de plantas, en cada variedad, que permita una eficiente diferenciación, regeneración de brotes y desarrollo de plantas completas (Veltcheva *et al.*, 2005; Gatica *et al.*, 2010).

En el Instituto de Biotecnología de las Plantas se ha desarrollado un protocolo para la

regeneración *in vitro* de plantas vía organogénesis directa (García *et al.*, 2008). No obstante, es indispensable optimizarlo, para aumentar el crecimiento y vigor de las plantas *in vitro* antes de ser llevadas a condiciones de casa de cultivo.

En *Phaseolus vulgaris* para mejorar las características de las plantas regeneradas *in vitro* se han utilizado diferentes medios de cultivo y sustancias que estimulan su desarrollo. Se ha demostrado que la adenina y la adenosina tienen actividad citoquinina, y se adicionan al medio de cultivo con el fin de mejorar el crecimiento o reforzar la respuesta que normalmente se atribuyen a la acción de la citoquinina.

En este sentido, la adenina estimula la embriogénesis somática, la formación de callos e induce la proliferación de brotes (van Staden *et al.*, 2008). En *P. vulgaris* el sulfato de adenina ha sido empleado en la formación de brotes. Sin embargo, Delgado-Sánchez *et al.* (2006) no encontraron resultados relevantes en cuanto al número de yemas formadas en dos variedades mexicanas de

frijol. Por el contrario, Gatica *et al.* (2010) encontraron que (6-bencilaminopurina, BAP) y el sulfato de adenina (SA) jugaron un importante rol en la inducción de estructuras organogénicas en cinco variedades de *P. vulgaris* de Costa Rica.

Teniendo en cuenta la problemática anteriormente planteada, la presente investigación tuvo como objetivo determinar el efecto del sulfato de adenina adicionado a los medios de cultivo sobre la regeneración y elongación de brotes de *Phaseolus vulgaris* var. 'CIAP 7247F'.

En el desarrollo de los experimentos se utilizó el protocolo de regeneración de plantas vía organogénesis directa propuesto por García *et al.* (2008). Como material vegetal se emplearon yemas múltiples (YM) inducidas a partir de nudos cotiledonales de semillas maduras germinadas *in vitro* de la variedad 'CIAP 7247F'.

Se colocaron cinco explantes por frasco de cultivo de 250 ml de capacidad, que contenían 30 ml del medio de cultivo.

Tanto en el medio de cultivo de regeneración de brotes como en el de elongación se añadieron 20 mg l<sup>-1</sup> de sulfato de adenina (SA).

Los controles utilizados fueron: medio de cultivo para la inducción de brotes (García *et al.*, 2008) y medio de cultivo para la elongación de brotes (García *et al.*, 2009).

Los subcultivos se realizaron cada 15 días al medio de cultivo de regeneración de brotes donde se mantuvieron por un período de 30 días. Luego los brotes regenerados fueron separados y se colocaron en el medio de cultivo de elongación. Los cultivos *in vitro* se mantuvieron en cámaras de crecimiento a 27 ± 2°C en condiciones de luz solar.

Las evaluaciones se realizaron a los 30 días de cultivo. Las variables evaluadas fueron: el número de brotes regenerados por explante, el número de brotes necrosados, la altura de las plantas formadas (cm) y su coloración.

Para los análisis estadísticos se utilizó el paquete estadístico SPSS (*Statistical Package for Social Science*) versión PASW Statistic 18 para la comparación de las medias se empleó la prueba de Mann

Whitney. Las diferencias se constataron para  $p < 0.05$ .

Con la adición del sulfato de adenina al medio de cultivo se logró un aumento en el número de brotes regenerados y su elongación con diferencias significativas con el control (Tabla 1).

El porcentaje de mortalidad de los explantes asociado a la oxidación fenólica en ambos tratamientos fue similar, se observaron valores de 26.5% para los explantes que se encontraban en el medio de cultivo sin SA y 22.3% para los que se encontraban en el medio de cultivo con 20 mg l<sup>-1</sup> de SA.

Similares resultados fueron descritos por Gatica *et al.* (2010) cuando evaluaron la respuesta de cinco variedades de *Phaseolus vulgaris* de Costa Rica en los medios de cultivo con 5 mg l<sup>-1</sup> de BAP y con concentraciones de 20 y 40 mg l<sup>-1</sup> de SA. Estos autores observaron que el BAP y el sulfato de adenina aumentaron el número de brotes en todos los genotipos estudiados. Los mayores valores fueron observados en la variedad 'Brunca' en la cual se obtuvo una media de 2.4 brotes. En el presente trabajo se logró un valor medio de 5.57 brotes por explante para el medio de cultivo que contenía SA.

Gatica *et al.* (2010) refirieron que la regeneración de brotes fue afectada por la oxidación fenólica. Ellos encontraron diferencias en esta variable para las variedades estudiadas cuando no utilizaron sulfato de adenina. Independientemente de la variedad, no encontraron oxidación fenólica cuando fue añadido este compuesto en los medios de cultivo. En el presente trabajo no se encontraron diferencias en cuanto a la oxidación fenólica entre los explantes que se colocaron en los dos medios de cultivo estudiados.

La composición de los medios de cultivo es importante en el proceso de regeneración de brotes por organogénesis (Santalla *et al.*, 1998). En este estudio el sulfato de adenina jugó un rol importante en la regeneración de brotes. Según van Staden *et al.* (2008) la adenina estimula los procesos de embriogénesis somática y callogénesis, incrementa el crecimiento de ápices

meristemáticos, induce la proliferación de brotes axilares y promueve la formación de yemas adventicias formadas indirectamente desde callos o directamente desde el explante.

Los beneficios de la adenina se han descrito solo cuando está asociada al nitrato de amonio o citoquininas derivadas de ella como: Bencil adenina, Kinetina o Zeatina (van Staden *et al.*, 2008).

Los resultados de este trabajo sugieren que el sulfato de adenina en explantes provenientes de medios de cultivo con thidiazuron (TDZ, una fenilurea) también mejora el proceso de organogénesis.

Esta respuesta pudiera ser atribuida a que la adenina actúa como precursor para la síntesis de citoquininas naturales como Zeatina o incrementa la biosíntesis de estas y los compuestos producidos pudieran ser más efectivos en la respuesta fisiológica. Otra posibilidad pudiera ser que la adenina actúa sinérgicamente junto de las citoquininas durante el cultivo *in vitro* (Gatica *et al.*, 2010).

Según Deshpande *et al.* (1998) el sulfato de adenina combinado con otras citoquininas a bajas concentraciones, favorecieron la inducción de brotes múltiples en *Ficus religiosa*.

Con el empleo del SA se ha logrado, además, la multiplicación *in vitro* de *Musa* (Schmidt *et al.*, 2007), *Carica papaya* (Saha *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 2007), *Cyathium intybus*

(Nandagopal y Kumari, 2006) y *Phaseolus vulgaris* (Gatica *et al.*, 2010).

En el presente trabajo la adenina estimuló la regeneración de brotes y su elongación. En contraste con estos resultados Delgado-Sánchez *et al.* (2006) refirieron que el empleo del SA en diferentes concentraciones adicionado a los medios de cultivo no produjo un incremento relevante en la formación de yemas múltiples ni en la regeneración de brotes en dos variedades mexicanas de *Phaseolus vulgaris*.

En las plantas provenientes de los medios de cultivo con SA se observó que predominaba una coloración verde más intenso que las plantas que se cultivaron en el medio de cultivo libre de esta sustancia (Figura 1).

En el medio de cultivo el uso del nitrato exige una mayor demanda energética para la asimilación del nitrógeno por lo que algunos explantes crecen mejor si se les suministra nitrógeno reducido (Krikorian, 1991). La adenina es una fuente alternativa de nitrógeno reducido que puede ser aprovechada por el explante en su crecimiento y desarrollo. Por ejemplo, en *Brassica campestris* se encontró que las plantas cultivadas en medios de cultivo con SA presentaron mayor masa fresca y la coloración de las hojas fue de un verde oscuro (Paek *et al.*, 1987).

Con la presente investigación se logró demostrar el efecto positivo que ejerce el sulfato de adenina adicionado a los medios de cultivo sobre la regeneración y elongación de brotes de *Phaseolus vulgaris* var. 'CIAP 7247F'.

Tabla 1. Efecto del sulfato de adenina sobre la regeneración de brotes (medio de cultivo de regeneración de plantas) y la altura de las plantas (medio de cultivo de elongación de brotes) en la variedad 'CIAP 7247F' a los 30 días de cultivo.

Medios de cultivo	Número de brotes/explante	Altura de la planta (cm)
Control*	4.37±0.010 b	1.01±0.018 b
Medio de cultivo con SA (20 mg l <sup>-1</sup> )	5.57 ± 0.012a	1.96±0.015 a

Medias con letras no comunes difieren significativamente por Mann Whitney para  $P < 0.05$

\* Medio de cultivo de regeneración de plantas (García *et al.*, 2008) y medio de cultivo de elongación de brotes (García *et al.*, 2009)



Figura 1. Plantas de *Phaseolus vulgaris* var. 'CIAP 7247F' a los 30 días en el medio de cultivo. A- Con 20 mg l<sup>-1</sup> de sulfato de adenina, B- Sin sulfato de adenina.

## REFERENCIAS

- Delgado-Sánchez, P, Saucedo-Ruiz M, Guzmán-Maldonado SH, Villordo-Pineda E, González Chavira M, Fraire-Velázquez S, Acosta-Gallegos JA, Mora-Avilés A (2006) An organogenic plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris* L). *Plant Science* 170:822–827
- Deshpande SR, Josekutty PC, Prathapasenan G (1998) Plant regeneration from axillary buds of a mature tree of *Ficus religiosa*. *Plant Cell Report* 17 (6-7):571-573
- García L, 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):109–114
- García L, Collado R, Bermúdez-Carabaloso I, Veitía N, Torres D, Romero C (2009) Influencia del medio de cultivo en el crecimiento y desarrollo de brotes de *Phaseolus vulgaris* L. regenerados *in vitro*. *Biotecnología Vegetal* 9 (1):47-51
- 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
- Krikorian A (1991) Propagación clonal *in vitro*. En: Roca, W. y Mroginski, L. (Ed). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. pp. 95-125. CIAT, Cali
- 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
- Nandagopal S, Ranjitha Kumari BD (2006) Adenine sulphate induced high frequency shoot organogenesis in callus and *in vitro* flowering of *Cichorium intybus* L. cv. Focus 8 potent medicinal plant. *Acta Agriculturae Slovenica* 87 (2):415-425
- Paek KY, Chandler SF, Thorpe TA (1987) *In vitro* propagation of Chinese cabbage from seedling shoot tips. *Journal Am. Soc. Hort. Sci.* 112:841- 845
- Saha M, Phatak A, Chandra N (2004) *In vitro* culture Studies in four dicecious varieties of *Carica papaya* L. using axillary buds from field-grown plants. *Journal of Tissue Research* 4 (2): 211-214
- Santalla M, Power JB, Bavey MR (1998) Efficient *in vitro* shoot regeneration responses of *Phaseolus vulgaris* and *P. coccineus*. *Euphytica* 102 (2):195-202
- Schmidt O, Schmidt E, Amaral JAT (2007) Sulfato de adenina na multiplicação *in vitro* de mamoeiro 'Tainung 01'. *Scientia Agraria* 8 (2):41-147
- van Staden J, Zazimalova E, George EF (2008) Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists. En: George EF, Hall MA, Geert-Jan De Klerk (eds) *Plant Propagation by Tissue Culture 3<sup>rd</sup> Edition*. Volume I. The Background. pp. 213–216. Springer, Dordrecht
- 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