

Formación de embriones somáticos a partir de cotiledones inmaduros en *Phaseolus vulgaris* cv. CIAP 7247

R. Collado^{1*}, L. R. García¹, G. Angenon², D. Torres¹, C. Romero¹, I. Bermúdez¹, N. Veitía¹. *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

²Laboratory of Plant Genetics. Vrije Universiteit Brussel. Belgium.

RESUMEN

El frijol común, como la mayoría de las leguminosas, es difícil de cultivar *in vitro*, por lo cual el establecimiento de un procedimiento de regeneración de plantas vía embriogénesis somática en esta especie no ha sido posible. Por tanto, determinar el efecto de factores que influyen en la formación de los embriones somáticos constituye un paso esencial para desarrollar un protocolo de regeneración vía embriogénesis somática en el frijol común. Para lograr la formación de embriones somáticos en *Phaseolus vulgaris* cv. CIAP 7247, se emplearon cotiledones de semillas inmaduras como material vegetal inicial. Se determinó el efecto de cinco concentraciones de 2,4-D (10, 20, 30, 40 y 50 mg l⁻¹) y la orientación de los cotiledones en el medio de cultivo sobre la formación de embriones somáticos. Se evaluaron, a las ocho semanas de cultivo, el número de explantes que formaron embriones somáticos y el número de embriones somáticos por explante. Los resultados demostraron que con 40 y 50 mg l⁻¹ de 2,4-D se presentaron los mayores valores de explantes que formaron embriones somáticos y número de embriones somáticos por explante. Los embriones somáticos se formaron en el lado abaxial de los cotiledones cuando estos fueron colocados con ese lado opuesto al medio de cultivo. Se logró la formación de embriones somáticos en cotiledones de semillas inmaduras de *Phaseolus vulgaris* L. cv. CIAP 7247. Se demostró que la adición de 2,4-D al medio de cultivo y la orientación del explante sobre el medio de cultivo tuvieron un efecto determinante en la embriogénesis somática de esta importante leguminosa.

Palabras clave: embriogénesis somática, frijol común, regeneración

ABSTRACT

Common bean, like most of legumes, is recalcitrant to *in vitro* culture, so the establishment of a regeneration procedure via somatic embryogenesis in this specie has not been possible. Therefore, determining the effect of factors that influencing on somatic embryos formation constitutes an essential step to develop a regeneration protocol via somatic embryogenesis in common bean. Cotyledons of immature seeds were used as initial plant material to achieve the somatic embryos formation in *Phaseolus vulgaris* cv. CIAP 7247. Five 2,4-D concentrations (10, 20, 30, 40 y 50 mg l⁻¹) and cotyledon orientation on culture medium were studied. After eight weeks on culture, the number of explants that formed somatic embryos and the number of somatic embryos per explant were evaluated. The results demonstrated that the major number of explants that formed somatic embryos and the number of somatic embryos formed per explant were obtained with 40 y 50 mg l⁻¹ of 2,4-D. Somatic embryos were formed on abaxial side from the cotyledons when this side was placed opposite to the culture medium. Somatic embryos on cotyledons from immature seeds of *Phaseolus vulgaris* L. cv. CIAP 7247 were formed. It was demonstrated that the addition of 2,4-D into culture medium, and the explant orientation had a determining effect on somatic embryogenesis in this important legume.

Key words: common bean, regeneration, somatic embryogenesis

INTRODUCCIÓN

En el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es de gran importancia la obtención de variedades comerciales con resistencia a plagas, enfermedades y condiciones edafoclimáticas

adversas. En este sentido la transformación genética puede ser una herramienta muy útil para el desarrollo del mejoramiento genético en esta especie. Establecer un procedimiento de regeneración de plantas repetible a partir de células o cultivo de tejidos es esencial para el

mejoramiento genético a través de la ingeniería genética en el frijol común (Arellano *et al.*, 2008).

La embriogénesis somática permite la formación de plantas a partir de una célula. Esta característica incrementa la efectividad de la transformación genética, debido a que disminuye o hace nulo el número de plantas quimeras formadas después de cada evento de transformación (Ko *et al.*, 2003).

Aunque se han realizado varios esfuerzos relacionados con la formación de embriones somáticos de frijol común, el desarrollo de la embriogénesis somática en esta especie no se ha logrado. La obtención de embriones somáticos en etapa globular a partir de callos formados de brotes apicales fue mencionada por Martines y Sondahl (1984); sin embargo, estos autores no observaron embriones somáticos en etapas de desarrollo superiores. Por otro lado, Allavena y Rossetti (1983) indujeron estructuras embriogénicas a partir de hojas de embriones cigóticos inmaduros de frijol común; pero el desarrollo de estas estructuras no ocurrió. Años después Saunders *et al.* (1986), describieron la formación de estructuras globulares en *Phaseolus vulgaris* con el empleo de discos de hojas de plantas germinadas *in vitro* como explante inicial y la adición de 2,4-D al medio de cultivo. Estos autores observaron que las estructuras obtenidas se multiplicaban de forma independiente pero, similar a los resultados anteriormente publicados, no lograron alcanzar etapas de desarrollo más avanzadas.

El uso común de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en los informes preliminares de embriogénesis somática en frijol común, así como los resultados positivos obtenidos en el empleo de cotiledones de semillas inmaduras en otras leguminosas como soya [*Glycine max* (L.) Merrill] y maní (*Arachis hypogaea* L.) (Eapen *et al.*, 1993; Schmidt *et al.*, 2005), condujeron a determinar el efecto de dos factores fundamentales para lograr la formación de embriones somáticos en *Phaseolus vulgaris* L. cv CIAP 7247: concentración de 2,4-D en el medio de cultivo, edad de la semilla inmadura y orientación del cotiledón sobre el medio de cultivo.

CIAP 7247 es uno de los cultivares de frijol común de mayor rendimiento agrícola, pero al igual que la mayoría de los cultivares de importancia económica en Cuba es altamente afectado por factores bióticos y abióticos que disminuyen su producción. El presente estudio podría ayudar en el establecimiento de un procedimiento para la regeneración vía embriogénesis somática lo cual constituye un paso esencial para el mejoramiento genético de este cultivar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se emplearon cotiledones de semillas inmaduras colectadas en un período de tiempo enmarcado entre los 13 – 20 días después de la floración, provenientes de plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. CIAP 7247, cultivadas en una casa de cultivos protegidos.

Efecto del 2,4-D

Se determinó el efecto de cinco concentraciones de 2,4-D (10, 20, 30, 40 y 50 mg l⁻¹) sobre la formación de embriones somáticos en los cotiledones. Se empleó el medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962) (MS), al que se le adicionaron las vitaminas B5 (Gamborg *et al.*, 1962), 3.0% de sacarosa y 3.0% de Gelrite. El pH fue ajustado a 7.0 antes de la esterilización por autoclave a 121°C con 1.2 kg.cm⁻² de presión.

Los cotiledones fueron ubicados con el lado abaxial en contacto con el medio de cultivo. Se colocaron ocho cotiledones por placa de Petri de 9.0 cm de diámetro y 10 placas por cada concentración de 2,4-D. El experimento se repitió cuatro veces. El material vegetal fue mantenido por ocho semanas a 25 ± 2°C en una cámara de cultivo con luz artificial, el fotoperíodo fue de 16/8 horas luz/oscuridad a una intensidad luminosa de 48.0 μmolm⁻²s⁻¹. A las ocho semanas de cultivo se evaluó el número de explantes que formaron embriones somáticos y se calculó el porcentaje de cotiledones por tratamiento con embriones somáticos. Se determinó el número promedio de embriones somáticos formados por explante para cada tratamiento. Además, se clasificaron los embriones somáticos por etapa de desarrollo y se cuantificaron por tratamiento.

Influencia de la orientación del explante

Con el objetivo de incrementar la formación de embriones somáticos por explante, los cotiledones de semillas inmaduras fueron colocados de dos formas diferentes en contacto con el medio de cultivo (lado abaxial y lado axial). El medio de cultivo que se empleó, así como las condiciones de cultivo en que se mantuvo el material vegetal, fueron similares a las descritas para los experimentos anteriores. Se colocaron ocho explantes por placa de Petri de 9.0 cm de diámetro con 10 réplicas y tres repeticiones para un total de 240 cotiledones por tratamiento. A las ocho semanas de cultivo se cuantificó el número de explantes que formaron embriones somáticos y se calculó su porcentaje.

Los datos experimentales 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

Efecto del 2,4-D

En dependencia de las concentraciones de 2,4-D adicionadas al medio de cultivo variaron significativamente los porcentajes de explantes con formación de embriones somáticos. Los mayores porcentajes, se obtuvieron en el medio de cultivo con 40 y 50 mg l⁻¹ de 2,4-D (Tabla 1). Estos tratamientos mostraron diferencias estadísticas con el resto de las concentraciones de este regulador de crecimiento evaluadas.

En cuanto al número de embriones somáticos por explante, los valores máximos (4.1- 4.3) se presentaron en los cotiledones cultivados con más de 30 mg l⁻¹ de 2,4-D. Estos tratamientos sin diferencias entre ellos fueron significativamente superiores al resto de los tratamientos evaluados (Tabla 1).

A las ocho semanas de colocados los explantes en el medio de cultivo para la formación de los embriones somáticos se observó sobre los cotiledones la presencia de embriones somáticos en los tratamientos con 20, 30, 40 y 50 mg l⁻¹ de 2,4-D (Figura 1 A, B, C y D).

Durante las operaciones de manejo del material vegetal los embriones somáticos formados se separaron del explante materno con mucha facilidad e incluso sin ejercer presión alguna sobre ellos, lo que demostró la carencia de conexión entre estos tejidos.

La embriogénesis somática en *Phaseolus vulgaris* se caracterizó por la presencia de embriones somáticos en etapas, globular, corazón, torpedo y cotiledonal (Figura 2 A, B, C y D), también fueron detectados embriones somáticos con crecimiento de primordios foliares y plúmula radicular (Figura 2E). Los embriones somáticos en la etapa más avanzada de desarrollo (torpedo y cotiledonal) fueron formados solo en el tratamiento con 20 mg l⁻¹ de 2,4-D (16%), mientras que en el resto de los tratamientos los embriones somáticos estaban en etapa globular (56%) y corazón (28%).

Los resultados presentados en este experimento demostraron el efecto positivo del 2,4-D en la formación de la embriogénesis somática en la especie *Phaseolus vulgaris* con

Tabla 1. Efecto de diferentes concentraciones de 2,4-D en la formación de embriones somáticos en *Phaseolus vulgaris* cv. CIAP 7247 a las ocho semanas de cultivo.

Concentraciones de 2,4-D (mg l ⁻¹)	Cotiledones que formaron embriones somáticos (%)	Número promedio de embriones somáticos por explante
10	0.0 d	0.0 c
20	1.3 c	2.3 b
30	2.4 b	4.1 a
40	4.1 a	4.6 a
50	4.3 a	4.3 a
± EE	± 0.3	± 0.5

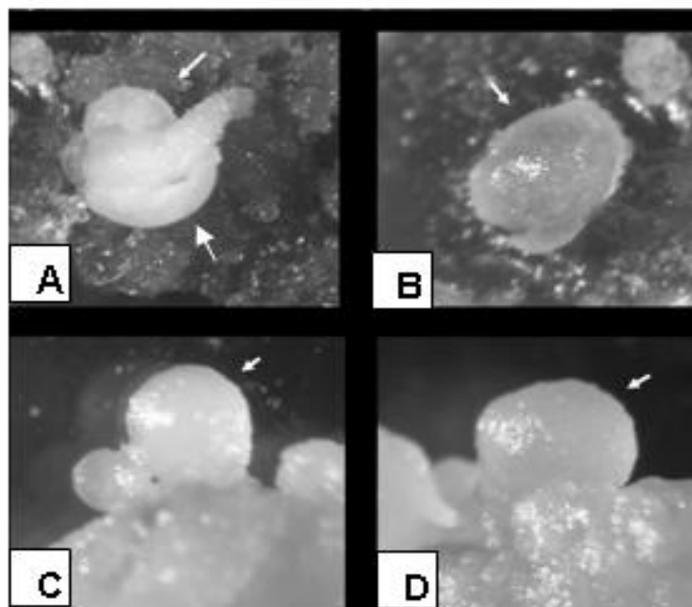


Figura 1. Formación de embriones somáticos en *Phaseolus vulgaris* cv. CIAP 7247 en medio de cultivo con diferentes concentraciones de 2,4-D a las ocho semanas de cultivo. A -20 mg l⁻¹, B -30 mg l⁻¹, C -40 mg l⁻¹, D -50 mg l⁻¹

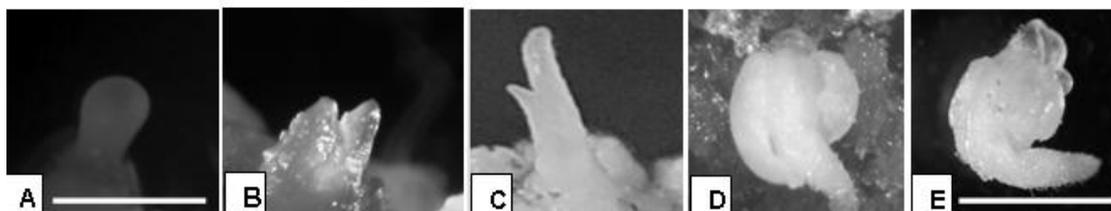


Figura 2. Embriogénesis somática en *Phaseolus vulgaris* cv. CIAP 7247. A -embrión somático en etapa globular, B-embrión somático en etapa corazón, C-embrión somático en etapa torpedo, D-embrión somático en etapa cotiledonal, E-embrión somático con primordios foliares y plúmula radicular. Las barras en la parte inferior de las figuras, para la A representa 1.0 mm de longitud y para la B 2.0 mm de longitud.

el empleo de cotiledones inmaduros como explante inicial. El efecto del 2,4-D sobre la inducción de la embriogénesis somática en leguminosas ha sido descrito por varios autores (Genga y Avellana, 1991; Ko *et al.*, 2003; Kaviraj *et al.*, 2006).

En muchos estudios relacionados con la propagación vía embriogénesis somática en *Phaseolus vulgaris*, la inducción y formación de embriones somáticos se ha realizado con la adición de citoquininas al medio de cultivo. Sin embargo, en estos trabajos no se logró la diferenciación en

plantas (Martins y Sondahl, 1984; Mohamed *et al.*, 1996; Klu, 1997; Svetleva *et al.*, 1999; Veltcheva *et al.*, 2005).

Se ha comprobado que concentraciones de 2,4-D entre 30-50 mg l⁻¹, estimularon la formación de embriones somáticos por explante en soya (Hofmann *et al.*, 2004). Además el aumento de los niveles de este regulador de crecimiento hasta 50 mg l⁻¹ en el medio de cultivo, incrementó dos veces el número de embriones somáticos por explante en *Vigna unguiculata* (Ramakrishnan *et al.*, 2005).

En este trabajo se describe por vez primera la formación de embriones somáticos a partir de cotiledones inmaduros en *Phaseolus vulgaris* cv. CIAP. En el tejido embriogénico desarrollado fueron observados embriones somáticos con crecimiento bipolar y la ausencia total de conexión de estos con el tejido materno.

Influencia de la orientación del explante

Al comparar el efecto de dos orientaciones del explante en la formación de embriones somáticos, a las ocho semanas de cultivo se observó la presencia de estos en el 4.6% de los cotiledones que fueron colocados con el lado abaxial opuesto al medio de cultivo. Sin embargo, los cotiledones que se ubicaron con la cara abaxial pegada al medio de cultivo, no formaron embriones somáticos.

Los resultados de este experimento claramente mostraron que la orientación de los cotiledones inmaduros sobre el medio de cultivo tienen un efecto en la formación de embriones somáticos en *Phaseolus vulgaris* cv. CIAP 7247. La orientación de los explante sobre el medio de cultivo ha sido un factor determinante en la formación de embriones somáticos en especies leguminosas como soya (Hartweck *et al.*, 1988; Santarém *et al.*, 1997; Ko *et al.*, 2003) y vigna (Kaviraj *et al.*, 2006). Estos autores demostraron que en soya y en vigna (*Vigna radiata* L.) la embriogénesis somática fue inducida a partir de cotiledones inmaduros, solo cuando estos se colocaron con el lado adaxial sobre el medio de cultivo, resultados similares a los obtenidos en este trabajo. Aún no está claro si la embriogénesis somática es inhibida cuando el lado abaxial de los cotiledones es colocado en contacto con el medio de cultivo; pero los autores anteriormente mencionados atribuyeron este resultado a la reducción de contacto del tejido con el medio de cultivo, lo cual limita la influencia del 2,4-D sobre las células que pueden diferenciarse en embriones somáticos. Otros autores como Choy *et al.* (1997) estudiaron el efecto de la orientación del explante en la embriogénesis somática en *Panax ginseng*. Ellos observaron que los embriones somáticos siempre se formaron en el lado del cotiledón opuesto al medio de cultivo. También demostraron que la frecuencia de formación de embriones

somáticos fue mucho mayor en el lado abaxial (66%) que en el lado adaxial (12%). Los mismos autores informaron que la diferencia en esta respuesta embriogénica estuvo relacionada con la estructura celular que conforma los diferentes lados del cotiledón. En adición, determinaron que las células de la epidermis abaxial presentaban elevadas cantidades de materiales de reserva (cuerpos lipídicos), mientras que las células de la epidermis adaxial no. Igualmente, señalaron que durante la germinación, los materiales de reserva de las células de los cotiledones se degradaron rápidamente y desarrollan cloroplastos en lugar de granos de almidón. Al mismo tiempo, la competencia embriogénica de esas células disminuyó hasta cero y no se formaron embriones somáticos; sin embargo cuando los cotiledones se colocaron sobre el medio de cultivo para la inducción de los embriones somáticos, los cuerpos lipídicos desaparecieron lentamente y además permaneció almidón acumulado. Estos materiales de reserva desaparecieron totalmente después que las células embriogénicas comenzaron el proceso de división. Esto demuestra que las células con mayor cantidad de materiales de reserva (lado abaxial del cotiledón) tienen mayor potencial embriogénico, resultado similar al observado en la formación de embriones somáticos de *Phaseolus vulgaris* L. cv. CIAP 7247.

CONCLUSIONES

Se logró la formación de embriones somáticos en cotiledones de semillas inmaduras de *Phaseolus vulgaris* L. cv. CIAP 7247. Se corroboró que la adición de 2,4-D al medio de cultivo induce la embriogénesis somática en esta especie y que esta fue influenciada además por la orientación del explante sobre el medio de cultivo, pues los embriones somáticos se formaron solo en el lado abaxial del cotiledón cuando este fue colocado opuesto al medio de cultivo.

El desarrollo de una embriogénesis somática competente en *Phaseolus vulgaris* L., aún presenta muchas dificultades, los embriones obtenidos en este trabajo no regeneraron plantas. Por tanto, esfuerzos adicionales son necesarios para identificar factores que

interactúen con los ya mencionados para promover la formación de embriones somáticos viables en esta importante leguminosa.

REFERENCIAS

- 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
- Allavena A, Rossetti L (1983) Efforts in somatic embryogenesis of *Phaseolus vulgaris* L. *Acta Hort.* 131: 239–246
- Choi, Y E, Yang D C, Kim H S, Choi K T (1997) Distribution and changes of reserve materials in cotyledon cells of *Panax ginseng* related to direct somatic embryogenesis and germination. *Plant Cell Reports* 16: 841-846
- Eapen S, George L, Rao S (1993) Plant regeneration through somatic embryogenesis in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Biologia Plantarum* 35: 499-504
- Gamborg, O L, Miller R A, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50: 151-158
- Geerts, P, Mergeai G, Baudon J P (2000) Succeeded plant regeneration from very immature embryos of *Phaseolus vulgaris*. *Ann. Rep, Bean Improv. Coop* 43: 206–207
- Genga, A, Allavena A (1991) Factors affecting morphogenesis from immature cotyledons of *Phaseolus coccineus* L. *Plant Cell Tissue Org. Cult* 27: 189–196
- Hartweck, L M, Lazzeri P A, Cui D, Collins G B, Williams E G (1988) Auxin-orientation effects on somatic embryogenesis from immature soybean cotyledons. *In vitro Cell.Dev.Biol* 24: 821-828
- Hofmann, N, Nelson R L, Korban S S (2004) Influence of media components and pH on somatic embryo induction in three genotypes of soybean. *Plant Cell Tiss. Organ Cult* 77: 157–163
- Kaviraj, C, Kiran G, Venugopal R, Kavi Kishor P, Srinath Rao (2006) Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledonary explants of Green gram (*Vigna radiata* L.) a recalcitrant grain legume. *In Vitro Cell Dev. Biol.- Plant* 42: 134-138
- Klu, G Y P (1997) Induced mutations in winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* L. DC) with low tannin content. *Euphytica* 98: 99–107
- Ko, T S, Lee S, Krasnyanski S F, Korban S S (2003) Two critical factors are required for efficient transformation of multiple soybean: *Agrobacterium* strain and orientation of immature cotyledonary explant. *Theor. Appl. Genet* 107: 439–447
- Martins, I S, Sondahl M R (1984) Early stages of somatic embryo differentiation from callus cells of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in liquid medium. *J Plant Physiol* 117: 97–103
- Mohamed, M F, Coyne D P, Read P E (1996) Enhancement effect of CPPU on differentiation of somatic embryoids in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *Plant Growth Regulator* 24: 97–103
- Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Ramakrishnan, K, Gnanam R, Sivakumar P, Manickam A (2005) Developmental pattern formation of somatic embryos induced in cell suspension cultures of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. *Plant Cell Rep* 24: 501–506
- Santarém, E R, Pelissier B, Finer J J (1997) Effect of explant orientation, pH, solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryos. *In Vitro Cell Dev.Biol. Plant* 33: 13-19
- Schmidt MA, Tucker D M, Cahoon E B, Parrott WA (2005) Towards normalization of soybean somatic embryo maturation. *Plant Cell Rep.* 24: 383-391
- Svetleva, D, Nikolaev P, Velcheva M, Petkova S y Atanassov A (1999) *Phaseolus vulgaris* L. somatic embryos induction in liquid medium. *Biotechnol, Biotechnol, Equip* 13: 9–13
- Veltcheva, M, Svetleva D, Petkova S P, Perla (2005) *In vitro* regeneration and genetic transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Problems and progress. *Scientia Horticulturae* 107: 2–10