

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

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

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad '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

Un procedimiento eficiente y reproducible para la regeneración de plantas a partir de células y cultivo de tejidos es un prerrequisito para la aplicación de métodos de transferencia de genes en el mejoramiento genético de los cultivos. Sin embargo, a pesar del considerable progreso en el desarrollo de protocolos de cultivo de tejidos en numerosas especies de plantas, el género y en especial la especie *Phaseolus vulgaris* ha permanecido recalcitrante para la regeneración *in vitro*. Con el objetivo de desarrollar un protocolo de regeneración de plantas en esta especie en el cv. CIAP 7247 se estudió la influencia de dos citoquininas en los medios de cultivo para la inducción de yemas múltiples. Además, se evaluó la necesidad de realizar un pretratamiento a los explantes, en medio de cultivo en estado líquido, antes de subcultivarlos al medio de cultivo para la inducción de yemas múltiples. Se estudiaron varios medios de cultivo para la regeneración de plantas a partir de estas estructuras. Los resultados mostraron que es indispensable el TDZ para la inducción de yemas múltiples en esta variedad. Solo se encontraron diferencias significativas en el número de explantes que formaron yemas múltiples cuando se utilizó una concentración de 0.25 mg.l<sup>-1</sup> TDZ en el medio de cultivo. El pretratamiento con TDZ a 1 mg.l<sup>-1</sup> a los embriones cigóticos germinados *in vitro* resultó indispensable para incrementar los porcentajes de formación de yemas múltiples. La adición de 6-BAP no influyó en la regeneración de plantas.

Palabras clave: citoquininas, cultivo de tejidos, frijol, yemas múltiples

### ABSTRACT

An efficient and reproducible procedure for plants regeneration from cells and tissue culture is an indispensable requirement for the application of genes transfer methods in plant breeding. Eventhough, the development of tissue culture protocols in some species of plants, genus *Phaseolus* and especially *Phaseolus vulgaris* species have remained recalcitrant to *in vitro* regeneration. A plant regeneration protocol was need for this species. The influence of two cytokinins in the culture medium to induce multiple buds in cv. CIAP 7247 was tested. Besides, the need to place the explants in a pretreatment with liquid medium before subculturing in buds induction culture medium was also evaluated. Several culture media were studied for plant regeneration starting from these structures. Results showed TDZ is indispensable for multiple buds induction in this variety. Significant differences were observed, only in the number of explants with multiple buds, when 0.25 mg.l<sup>-1</sup> TDZ were added in the culture medium. Pretreatment with 1 mg.l<sup>-1</sup> TDZ to cigotic embryos germinated *in vitro* was indispensable to increase percentages of multiple buds formation. The 6-BAP did not influence in plant regeneration.

Key words: beans, citoquinin, multiple buds, tissue culture

### INTRODUCCIÓN

Entre las especies leguminosas el frijol común (*P. vulgaris* L.) es considerado económicamente el más importante y es ampliamente cultivado. Ocupa más del 90% del área cultivada de especies de *Phaseolus* en todo el mundo. En particular, en países de Asia, África y América Latina representa una de las principales fuentes calórico-proteicas para cerca de 500 millones de personas (Broughton *et al.*, 2003). Por ello, la obtención de variedades más productivas, resistentes a plagas, enfermedades y a condiciones edafoclimáticas adversas es determinante para satisfacer las demandas de una población creciente demográficamente.

Entre las herramientas con potencial para acelerar el desarrollo de nuevas variedades está la transformación genética, que permite la introducción de genes de especies afines o de especies más distantes (Guidolin, 2003).

Un protocolo de regeneración de plantas eficiente y reproducible es un prerrequisito indispensable para la aplicación de métodos de transferencia de genes en el mejoramiento genético de los cultivos. Sin embargo, a pesar del considerable progreso en el desarrollo de protocolos de cultivo de tejidos en diferentes especies de plantas, estos continúan siendo recalcitrantes para la regeneración *in vitro* de muchas leguminosas del género *Phaseolus* (Varisai Mohamed *et al.*, 2006).

El cultivo de tejidos y la regeneración de plantas en *P. vulgaris* ha tenido serias dificultades desde los primeros intentos realizados por Hildebrandt *et al.* (1963) hasta 1975. Varios tipos de explantes han sido utilizados para la regeneración directa de plantas siguiendo la vía de la organogénesis. Por ejemplo, cultivo de meristemos (Kantha *et al.*, 1981), regeneración de brotes de pecíolo de hojas (Radeva y Lilota, 2005), explantes cotiledonales o cultivo de ejes embrionarios (Mohamed *et al.*, 1992; Hernández *et al.*, 2002), organogénesis directa a partir de plántulas, sin y en presencia de meristemos axilares (Mohamed *et al.*, 1992) o en presencia de meristemos axilares (Franklin *et al.*, 1991), brotes caulinares (Eissa *et al.*, 2002) y embriones cigóticos (Popelka *et al.*, 2004). Todos estos explantes al ser multicelulares traen consigo la aparición de quimeras en las plantas regeneradas después de un evento de transformación genética. Es por ello que se hace imprescindible la búsqueda de métodos que permitan la inducción y formación de yemas múltiples, las cuales se forman a partir de una o pocas células en el tejido (Broetjes y Keen, 1980; Vuylsteke *et al.*, 1997).

Hasta el presente no se cuenta con un protocolo de regeneración de plantas a partir de yemas múltiples en *P. vulgaris* cv. CIAP 7247 que permita poder utilizarlo en un programa de mejoramiento genético mediante transformación genética. Por tanto, se hace necesario en primer lugar determinar los medios de cultivo que permitan la inducción y el desarrollo de estas estructuras para poder establecer una metodología de trabajo. Este artículo tuvo como objetivo regenerar plantas vía organogénesis directa en *P. vulgaris* L. cv. CIAP 7247.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Como material vegetal se emplearon semillas maduras de *P. vulgaris* L. cv. CIAP 7247 obtenidas en condiciones semicontroladas de casa de cultivo. Estas semillas fueron desinfectadas según el protocolo propuesto por Dillen *et al.* (1997) para su establecimiento *in vitro*.

En cada frasco de cultivo con 30 ml del medio de cultivo de germinación en estado semisólido, se colocaron diez semillas maduras desinfectadas, sumergiendo las  $\frac{3}{4}$  partes de estas en el medio de cultivo con el hilio hacia la parte superior. Este medio de cultivo estaba compuesto por las sales del medio de cultivo recomendado por Murashige y Skoog (1962), tiamina (1 mg.l<sup>-1</sup>), sacarosa (30 g.l<sup>-1</sup>) y 6-Bencilaminopurina (6-BAP) (1.13 mg.l<sup>-1</sup>).

El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5.7 previo a la esterilización en autoclave vertical.

Para el análisis estadístico 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.

## Influencia del TDZ y el 6-BAP en la inducción de yemas múltiples

### Obtención y precultivo de los explantes

Una vez ocurrida la germinación de las semillas, los embriones cigóticos germinados *in vitro*, se colocaron en medios de precultivo líquido según la metodología propuesta por Varisai Mohamed *et al.* (2006). El medio de cultivo estaba compuesto por las sales MS, vitaminas propuestas por Heinz y Mee (1969), mio-inositol (100 mg.l<sup>-1</sup>), sacarosa (30 g.l<sup>-1</sup>) y tidiazurón (TDZ) (1 mg.l<sup>-1</sup>) ó 6-BAP (1 mg.l<sup>-1</sup>).

Se colocaron 10 embriones cigóticos (explantes) en cada erlenmeyers que contenían 100 ml de este medio de cultivo y se incubaron en condiciones de oscuridad durante 5 días a 26 ± 2 °C en un agitador orbital (INFORS HT) a 90 rpm.

### Inducción de yemas múltiples

Finalizado el tiempo de precultivo, la radícula de los embriones germinados fue eliminada y estos se transfirieron de forma horizontal a un medio de cultivo semisólido, manteniendo siempre la base en contacto con este. El medio de cultivo para la inducción de yemas múltiples estaba compuesto por las sales MS, vitaminas propuestas por Heinz y Mee (1969), sacarosa 30 g.l<sup>-1</sup>, mio-inositol 100 mg.l<sup>-1</sup> y diferentes concentraciones de TDZ (0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0) mg.l<sup>-1</sup> ó 6 BAP (0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0) mg.l<sup>-1</sup>).

Se colocaron seis explantes por frasco de cultivo de 250 ml de capacidad que contenían 30 ml del medio de cultivo y se emplearon 10 frascos de cultivo por tratamiento. Los explantes fueron subcultivados cada 15 días al mismo medio de cultivo y las evaluaciones se realizaron a las 4 semanas de cultivo.

Los cultivos fueron colocados en cámaras de crecimiento con luz solar, a una densidad de flujo de fotones fotosintéticos de aproximadamente 50 - 62.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y 27 ± 2°C.

Las variables evaluadas fueron el número de explantes con inducción de yemas múltiples en el nudo cotiledonar y en el ápice. Se seleccionó el tratamiento con mayor porcentaje de explantes con inducción de yemas múltiples.

### Influencia del pretratamiento con citoquininas en la inducción de yemas múltiples

Se evaluó la influencia del pretratamiento con TDZ y 6-BAP a los embriones cigóticos germinados *in vitro* (explantes), sobre la inducción de yemas múltiples. Los explantes fueron colocados en medio de precultivo líquido o directamente en el medio de cultivo de inducción de yemas múltiples seleccionado en el experimento anterior (control).

Los tratamientos evaluados fueron:

1.- Precultivo durante 5 días en un medio de cultivo compuesto por las sales MS, vitaminas propuestas por Heinz y Mee (1969), mio-inositol (100 mg.l<sup>-1</sup>), sacarosa (30 g.l<sup>-1</sup>) y TDZ (1 mg.l<sup>-1</sup>).

2.- Precultivo durante 5 días en un medio de cultivo compuesto por las sales MS, vitaminas propuestas por Heinz y Mee (1969), mio-inositol (100 mg.l<sup>-1</sup>), sacarosa (30 g.l<sup>-1</sup>) y 6-BAP (1 mg.l<sup>-1</sup>).

3.- Control sin precultivo: los brotes fueron colocados directamente en el medio de cultivo de inducción de yemas múltiples seleccionado en el explante.

Los explantes para este experimento fueron obtenidos al seccionar los embriones cigóticos germinados por la zona del nudo cotiledonar, aproximadamente a 0.5 cm a ambos lados de la yema. Se colocaron seis explantes por frasco. Los subcultivos se realizaron cada dos semanas y se evaluaron, a las 4 semanas de cultivo, las variables siguientes: número de explantes con inducción de brotes y con yemas múltiples.

### Influencia del 6-BAP en la regeneración de brotes

Para estimular la regeneración de las yemas y el crecimiento de los brotes los explantes provenientes del tratamiento 1 del experimento anterior (precultivo durante cinco días en el medio de cultivo con TDZ 1 mg.l<sup>-1</sup>). se colocaron en un medio de cultivo compuesto por las Sales MS, sacarosa 30 g.l<sup>-1</sup>, vitaminas Heinz y Mee (1969), mio-inositol (100 mg.l<sup>-1</sup>) y 6-BAP (0 y 0.5 mg.l<sup>-1</sup>).

Se colocaron seis explantes por frasco, con aproximadamente 20 yemas múltiples cada uno de ellos y los subcultivos se realizaron cada 15 días. Los cultivos fueron colocados en cámaras de crecimiento con luz solar, a una densidad de flujo de fotones fotosintéticos de aproximadamente 50 - 62.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y 27  $\pm$  2°C.

La variable evaluada en esta etapa fue el número de explantes con brotes ( $\geq$  5 mm) a los 15, 30, 45 y 60 días de cultivo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Influencia del TDZ y el 6-BAP en la inducción de yemas múltiples

En los tratamientos que contenían 6-BAP en el medio de cultivo solo se observó la inducción de yemas múltiples en la zona del nudo cotiledonar en la mayor concentración utilizada (2.0 mg.l<sup>-1</sup>) con una frecuencia de 13.3%.

En los explantes precultivados en un medio de cultivo líquido en presencia de TDZ y subcultivados luego en medios de cultivo semisólido con esta citoquinina, fue posible la inducción y desarrollo de yemas múltiples en todos los tratamientos (Figura 1).

La formación de las yemas múltiples en la zona apical del explante fue baja. Se obtuvieron los mayores valores (16.6%) cuando se utilizó la concentración de 2 mg.l<sup>-1</sup> de TDZ en el medio de cultivo. Para la zona del nudo cotiledonar los porcentajes de inducción y desarrollo de yemas múltiples llegaron a valores significativamente superiores en los tratamientos que contenían las concentraciones de TDZ utilizadas respecto al control (Figura 2). Cuando se analizaron los tratamientos con TDZ solo se encontraron diferencias significativas en el que contenía la concentración de 0.25 mg.l<sup>-1</sup>, esto sugiere utilizar en los medios de cultivo la concentración de 0.5 mg.l<sup>-1</sup> para minimizar los efectos colaterales que presenta esta citoquinina en el posterior desarrollo de los explantes.

Similares resultados fueron obtenidos por De Carvalho *et al.* (2000) en especies de *Phaseolus* al evaluar diferentes concentraciones de TDZ en los medios de cultivo. Es bien conocido que el TDZ suprime el crecimiento de los meristemos apicales e induce la formación de meristemos laterales resultando en brotes múltiples (Tzitzikas *et al.*, 2004). Además, ha sido sugerido que el TDZ puede intervenir en la síntesis y acumulación de citoquininas en el cultivo de tejidos (Capelle *et al.*, 1983; De Carvalho *et al.*, 2000).

Los mejores resultados, en cuanto a la inducción de yemas múltiples, fueron obtenidos cuando se utilizó la zona del nudo cotiledonar y el medio de cultivo que contenía las sales MS, las vitaminas propuestas por Heinz y Mee (1969), sacarosa (30 g.l<sup>-1</sup>), mio-inositol (100 mg.l<sup>-1</sup>) y TDZ (0.5 mg.l<sup>-1</sup>).

### Influencia del pretratamiento con citoquininas en la inducción de yemas múltiples

A los 30 días no se obtuvieron diferencias significativas para el número de brotes por frasco al comparar los tratamientos con TDZ y 6-BAP, sin embargo para el desarrollo de yemas múltiples se alcanzaron los mayores valores cuando fue utilizado en el precultivo el TDZ (Tabla 1). Estos resultados coinciden con los referidos por Olhoft *et al.* (2003) en *Glycine max*.

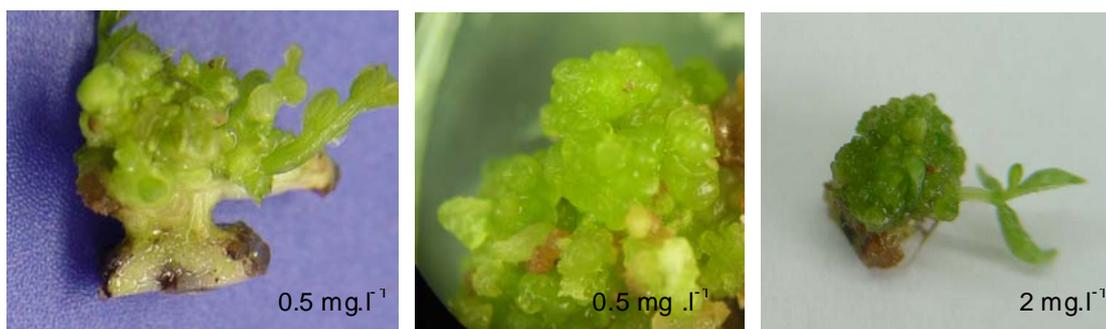
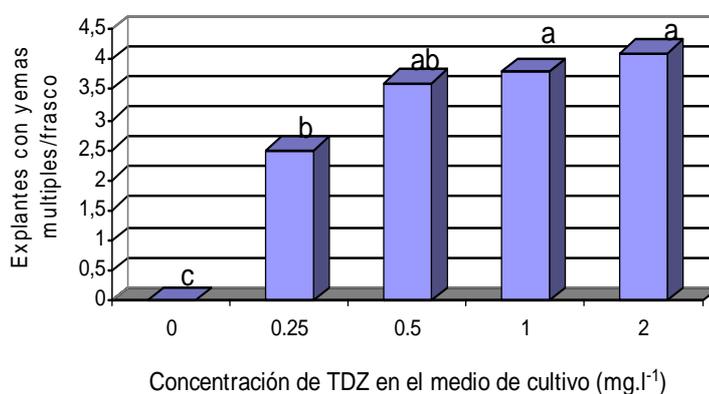


Figura 1. Formación de yemas múltiples de *Phaseolus vulgaris* L cv. CIAP7247 en los tratamientos que contenían TDZ en el medio de cultivo a los 30 días de cultivo.



Medias con letras no comunes difieren significativamente por prueba de DunnettC<sup>\*</sup> para ( $p < 0.05$ ). EE 0.31

Figura 2. Influencia de las concentraciones de TDZ en la inducción de yemas múltiples en *Phaseolus vulgaris* L. cv. CIAP 7247 a los 30 días de cultivo.

Para la formación de yemas múltiples se hace necesario el empleo de altas concentraciones de citoquininas en los medios de cultivo (Pérez, 1998). Sin embargo, se conoce que altas concentraciones de 6-BAP afectan la frecuencia de diferenciación de brotes en *Phaseolus* (Malik y Saxena, 1992).

Estos resultados confirman las primeras observaciones de que usando un precultivo de los explantes en medio de cultivo líquido con reguladores del crecimiento se mejora la regeneración de plantas (Piatczak *et al.*, 2005; Veltcheva y Svetleva, 2005). Además, pudieran deberse a que los explantes al estar sumergidos completamente en el medio de cultivo líquido que contenía 1 mg.l<sup>-1</sup> de TDZ y luego al ser colocados nuevamente en un medio de cultivo con esta citoquinina, absorbieron cantidades de nutrientes y reguladores del crecimiento que favorecieron la inducción de yemas múltiples en esta especie. Por el contrario, Yoshida (2002) observó que el contacto del explante con medios de cultivo líquidos puede inhibir la formación de brotes adventicios en soya (*Glycine max* L. Esto sugiere que existe variación entre diferentes especies en su habilidad para formar estas estructuras.

#### Influencia del 6-BAP en la regeneración de brotes

Cuando las yemas múltiples fueron colocadas en el medio de cultivo para la regeneración de plantas no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. Se observaron valores similares de brotes  $\geq 5$  mm de longitud tanto en el medio de cultivo que contenía 0.5 mg.l<sup>-1</sup> de 6-BAP como en el medio de cultivo control (libre de reguladores de crecimiento). La presencia del 6-BAP en el medio de cultivo no fue indispensable para lograr la regeneración de plantas (Figura 3). Es importante destacar que las yemas múltiples utilizadas fueron obtenidas en medios de cultivos que contenían TDZ, por lo que no fue necesaria la adición de más citoquininas en los medios de cultivo para lograr la regeneración de plantas. Según Capelle *et al.* (1983); Malik y Saxena (1992) y De Carvalho *et al.* (2000) la continua exposición de los explantes en medios de cultivo con TDZ no siempre es necesaria, pues los materiales vegetales pueden adquirir autosuficiencia después de determinado tiempo bajo contacto con esta citoquinina.

Tabla 1. Influencia del pretratamiento en la formación de brotes y yemas múltiples en *P. vulgaris* cv. CIAP 7247 a los 30 días de cultivo.

Medio de precultivo (mg.l <sup>-1</sup> )	No. brotes/ frasco	Frecuencia yemas múltiples (%)
TDZ	9.4 ab	61.6 a
6-BAP	10.8 a	19.2 b
control	7.9 b	5.6 c
EE	0.83	4.39

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

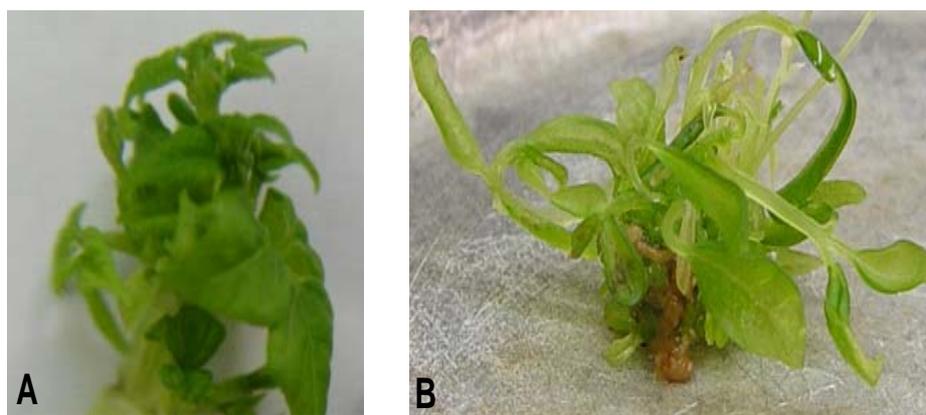


Figura 3. Formación de brotes de *Phaseolus vulgaris* L. cv. CIAP 7247 a partir de yemas múltiples a los 60 días de cultivo: A- medio de cultivo sin reguladores de crecimiento, B- medio de cultivo con 0.5 mg.l<sup>-1</sup> de 6-BAP.

## CONCLUSIONES

Se logró regenerar plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. CIAP 7247 por organogénesis directa a partir de nudos cotiledonales. El precultivo de los explantes en medio líquido con 1 mg.l<sup>-1</sup> de TDZ favoreció significativamente la formación de yemas múltiples.

## REFERENCIAS

- Broetjes C, Keen A (1980) Adventitious shoots: do they develop from one cell. *Euphytica* 29: 73-87
- Broughton, WJ, Hernández G, Blair M, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J (2003) Bean (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. *Plant and Soil* 252 (1): 55 - 128
- Capelle SC, Mok DWS, Turner JE (1983) Effects of thidiazuron on cytokinin autonomy and the metabolism of N<sup>6</sup> adenosine in callus cultures of *Phaseolus lunatus* L. *Plant Physiol* 73: 796-802
- 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
- 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
- Eissa, E, Bisztray GYD, Velich I (2002) Plant regeneration from seedling of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Proceedings of the 7<sup>th</sup> Hungarian Congress on Plant Physiology. Acta Biologica Szegediensis* 46 (3-4): 27 - 28.
- Genga, A, Allavena A (1991) Factors affecting morphogenesis from immature cotyledons of *Phaseolus coccineus* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 27 (2): 189 - 196
- 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
- Hernández, G, Lara M, Elia D, Avendaño O (2002) Recent Advances Towards *Agrobacterium* - mediated transformation of Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). First International Conference on Legume Genomics and Genetics: Translation to Crop Improvement, USA. [en línea] En: [http://www.agro.agri.umn.edu/iclgg/All\\_Abstracts.htm](http://www.agro.agri.umn.edu/iclgg/All_Abstracts.htm) [Consulta: 2 Enero 2006].
- Malik, KA, Saxena PK (1992) Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L.: high-frequency induction of direct formation in intact seedling by N<sup>6</sup>-benzylaminopurine and thidiazuron. *Planta* 186 (3): 384 - 389
- Mohamed, MF, Read PE, Coyne DP (1992) Dark preconditioning, CPPU, and thidiazuron promote shoot organogenesis on seedling node explants of common and faba beans. *American Society for Horticultural Science* 117 (4): 668 - 672
- 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
- Olhoft, PM, Fligel LE, Donovan M, Somers DA (2003) Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. *Planta* 216: 723-735
- Pérez, JP (1998) Variación Somaclonal. En: Pérez, PJ (Ed.). *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. pp. 105-121 IBP. Santa Clara
- Piatczak, E, Wielanek M, Wysokinska H (2005) Liquid culture system for shoot multiplication and secoiridoid production in micropropagated plants of *Centaureum erythraea* Rafn. *Plant Sci* 168: 431-437
- Popelka, J, Terryn N, Higgins TJV (2004) Review: Gene technology for grain legumes: can it contribute to the food challenge in developing countries? *Plant Science* 167: 195 – 206
- Radeva, M, Lilota D (2005) *In vitro* regeneration of *Phaseolus vulgaris* L. via organogenesis from petiole explants. *Journal of Central European Agricultura* 6 (1): 53 – 58
- Tzitzikas, EN, Bergervoet M, Raemakers K, Vincken JP, Lammeren AV, Visser RGF (2004) Regeneration of pea (*Pisum sativum* L.) by a cyclic organogenic system. *Plant Cell Rep* 23: 453-460
- Veltcheva, MR, Svetleva DL (2005) *In vitro* regeneration of *Phaseolus vulgaris* L. via organogenesis from petiole explants. *J Central European Agric* 6: 53-58
- Vuylsteke, D, Ortiz R, Ferris S, Crouch J (1997) Plantain improvement. *Plant Breeding Rev.* 14: 267-320
- Yoshida T (2002) Adventitious shoot formation from hypocotyls sections of mature soybean seeds. *Breeding Sci* 52: 1-8