

## Influencia de reguladores del crecimiento en la formación de callos de *Phaseolus vulgaris* L cv. CIAP 7247

Lourdes R. García <sup>1\*</sup>, Jorge Pérez Pérez <sup>2</sup>, Damaris Torres Rodríguez <sup>1</sup>, Yenny Padrón Montesino <sup>1</sup>, Carlos Romero Quintana <sup>1</sup>. \*Autor 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> Universidad de Granma, Carretera a Manzanillo, km 17, Peralejo, Bayamo. Granma. Cuba. CP 85 100

### RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo lograr la formación de callos nodulares en *Phaseolus vulgaris* L. cv. CIAP 7247 con el uso de varios reguladores del crecimiento en los medios de cultivo. Como material vegetal se tomaron cotiledones de semillas maduras desprovistos de la testa. Se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de Thidiazurón (TDZ), Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y Ácido indol-3-acético (AIA) en el medio de cultivo para la formación de callos. En los tratamientos que contenían las diferentes concentraciones de TDZ, los explantes mostraron una coloración verde amarillenta durante las dos primeras semanas de cultivo. Los mejores valores de crecimiento de los callos se encontraron cuando se utilizaron 0.2 mg.l<sup>-1</sup>. Cuando se evaluó el efecto del 2,4-D en el medio de cultivo no se encontraron diferencias significativas en el número de cotiledones con formación de callos para las concentraciones estudiadas. Estos no fueron compactos, presentaron consistencia acuosa y coloración amarillo-blancuecina sin presentar visualmente características de callos nodulares. Sin embargo, los formados en los medios de cultivo que contenían AIA fueron menos voluminosos, pero presentaban mejores características en cuanto a su consistencia. Se demostró que la combinación de los reguladores del crecimiento TDZ-AIA fue la mejor para la formación de callos nodulares en *Phaseolus vulgaris* cv. CIAP 7247.

Palabras clave: callos nodulares, cultivo de tejidos, frijol, medios de cultivo

### ABSTRACT

The present work had as objective to achieve the formation of nodular calli in *Phaseolus vulgaris* L. cv. CIAP 7247 using several growth regulators in the culture medium. Cotyledons of mature seeds without coats were used as explants. The effect of different concentrations of TDZ, 2,4-D and AIA was evaluated for the callus formation. In the treatment with different concentrations of TDZ, the explants showed green-yellow coloration during the first two weeks of culture. When the callus growth was evaluated the best values were obtained when 0.2 mg.l<sup>-1</sup> TDZ was used. When the effect of 2,4-D was evaluated in the culture medium were not found significant differences in the explants number with callus formation for the studied concentrations. These were not compact, have watery consistency and yellow-whitish coloration without presenting visually characteristic of nodular calli. Nevertheless, those formed in the culture medium with AIA were less voluminous, but they presented better characteristics in their consistency. It was demonstrated that the combination of TDZ-AIA was the best for the formation of nodular calli in *Phaseolus vulgaris* cv. CIAP 7247.

Key words: beans, culture medium, nodular calli, tissue culture

### INTRODUCCIÓN

Uno de los componentes importantes en la dieta para gran parte de las poblaciones de países en vías de desarrollo son las leguminosas, debido a que son una fuente rica y económica de proteínas y calorías. Entre las leguminosas de mayor consumo, el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) ocupa un lugar importante en África, India y América Latina (Rehman *et al.*, 2001).

Frente a las tendencias de crecimiento de la población y de consumo de frijoles, puede ser esperado un aumento de la demanda para América Latina y África a niveles sin precedentes. Este incremento podrá

asumirse solamente si son desarrollados nuevos cultivares de frijol con rendimientos más altos, resistencia múltiple a enfermedades y mayor tolerancia a la sequía y la baja fertilidad del suelo. Esto permitirá aumentar la productividad del frijol y alcanzar mayor estabilidad del rendimiento (Popelka *et al.*, 2004).

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. Entre las herramientas con potencial para ello está la transformación genética, la cual posibilita la introducción de genes de especies afines o distantes. Para esto es necesario el

desarrollo de protocolos eficientes que permitan estudios genéticos básicos y aplicados (Zambre *et al.*, 2001).

El cultivo de tejidos y la regeneración de plantas en especies del género *Phaseolus* ha tenido serias dificultades relacionadas con la eficiencia y la repetibilidad. Las referencias sobre la regeneración de plantas a partir de callos en estas especies son limitadas (Zambre *et al.*, 1998; Zambre *et al.*, 2001; Mohamed *et al.*, 2006). Por ello se hace necesario profundizar en las investigaciones con el objetivo de lograr protocolos de regeneración de plantas eficientes y repetibles que puedan ser utilizados en la transformación genética.

La composición y concentración de los reguladores del crecimiento en el medio de cultivo, son factores determinantes para la formación de callos y regeneración de plantas en los sistemas de cultivo de tejidos (Guidolin, 2003).

El objetivo del presente trabajo fue lograr la formación de callos nodulares en *Phaseolus vulgaris* L. cv. CIAP 7247 con el empleo de varios reguladores del crecimiento en los medios de cultivo.

## 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. La desinfección y germinación de las semillas, se realizó según el protocolo propuesto por Dillen *et al.* (1997).

Una vez germinada la semilla, se tomaron como explantes los cotiledones desprovistos de la testa.

Los experimentos se desarrollaron en condiciones de oscuridad a temperatura de 27 °C.

Los cotiledones fueron cortados en los bordes y divididos en fragmentos de aproximadamente 0.5 cm<sup>2</sup>. Luego fueron colocados en el medio de cultivo con la región axial en contacto con el mismo. Se colocaron cuatro explantes por frasco de 250 ml de capacidad, que contenía 30 ml del medio de cultivo.

Se empleó un diseño completamente aleatorio. El tamaño de la muestra fue de 20 frascos por tratamiento.

### Influencia del thidiazurón en la formación de callos de *P. vulgaris* L. cv. CIAP 7247

Se evaluó el efecto en la formación de callos de diferentes concentraciones de thidiazurón (TDZ) (0.0, 0.05, 0.20, 0.50 mg.l<sup>-1</sup>), en un medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) al que se adicionaron 0.05 mg.l<sup>-1</sup> de ácido indol-3-acético (AIA). El mismo

fue solidificado con Gelrite (3.5 g.l<sup>-1</sup>) y el pH fue ajustado a 5.7 previo a la esterilización.

Las variables evaluadas a los 25 días de cultivo fueron: a) Número de explantes que formaron callos, b) Coloración de los mismos y c) Crecimiento medio de los callos según la escala siguiente:

Escala	Formación de callo
Grado 1.	Explante muerto
Grado 2.	Explante vivo pero sin crecimiento
Grado 3.	Explante vivo con pequeños puntos de crecimiento de callos.
Grado 4.	Explante con 50% de formación de callos.
Grado 5.	Explante con 100% de formación de callos.

### Influencia del 2,4-D y el AIA en la formación y crecimiento de callos de *P. vulgaris* L. cv. CIAP 7247

Con el objetivo de incrementar el número de explantes con formación de callos y el crecimiento de los mismos se estudiaron varias concentraciones de 2,4-D (0.0, 1.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 mg.l<sup>-1</sup>) y AIA (0.0, 0.05, 0.50, 1.0, 3.0, 5.0, 7.0 mg.l<sup>-1</sup>) en un medio de cultivo MS con 0.2 mg.l<sup>-1</sup> de TDZ.

Las variables evaluadas a los 25 días de cultivo fueron: a) Número de explantes que formaron callos, b) Color y consistencia de los mismos, c) Crecimiento medio de los callos según la escala propuesta.

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó un análisis de varianza de clasificación simple y la comparación de medias se realizó a través de la prueba de rangos múltiples de Tukey al nivel de significación del 5% a través de los paquetes estadísticos SPSS/PC ver. 9.00 para Windows.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Influencia del TDZ en la formación de callos de *P. vulgaris* L. cv. CIAP 7247

En los medios de cultivo que contenían las diferentes concentraciones de TDZ, los explantes mostraron una coloración verde-amarillenta durante las dos primeras semanas de cultivo, posteriormente se formaron callos de color amarillo a pardo oscuro, en los bordes de los cotiledones así como en la parte inferior en contacto con el medio de cultivo (Figura 1a).

El porcentaje de formación de callos fue mayor a medida que se incrementaron las concentraciones de TDZ en el medio de cultivo. Se observaron los mayores valores con las concentraciones más altas de esta citoquinina (Tabla 1).

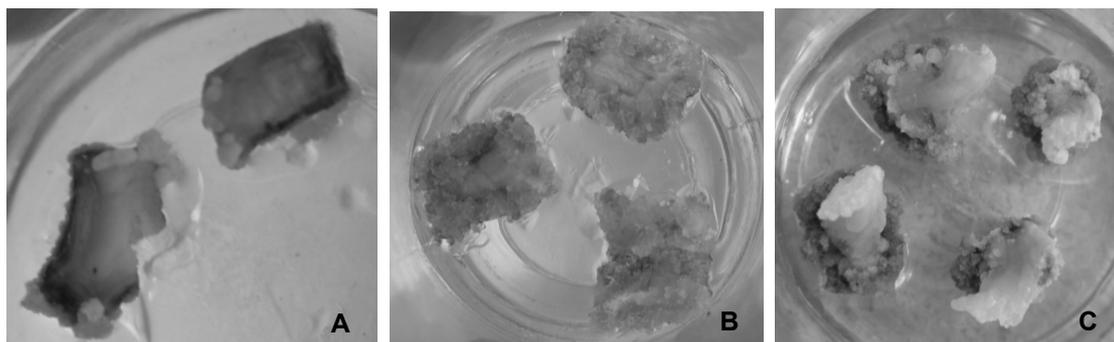


Figura 1. Formación de callos en *P. vulgaris* cv. CIAP 7247 a los 25 días de cultivo. A) En medio de cultivo compuesto por las sales MS con 0.2 mg.l<sup>-1</sup> de TDZ, B) En medio de cultivo compuesto por las sales MS con 0.2 mg.l<sup>-1</sup> de TDZ y 15 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D, C) En medio de cultivo compuesto por las sales MS con 0.2 mg.l<sup>-1</sup> de TDZ y 3 mg.l<sup>-1</sup> de AIA.

Tabla 1. Formación de callos en cotiledones de *P. vulgaris* cv. CIAP 7247 a los 25 días de cultivo en medio de cultivo MS con diferentes concentraciones de TDZ.

TDZ (mg.l <sup>-1</sup> )	Formación de callos (%)	Crecimiento de los callos (según la escala propuesta)
0	0	1.90 b
0.05	65 b	2.75 a
0.2	90 a	2.95 a
0.5	95 a	3.15 a
EE ±	0.113	0.202

Medias con letras no comunes en una misma columna difieren significativamente por la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). EE: Error Estándar.

En cuanto al crecimiento de los callos no se encontraron diferencias significativas para las concentraciones de TDZ estudiadas. En todos los casos se observaron pequeños puntos de formación de callos en los explantes, los cuales fueron más numerosos a medida que la concentración del regulador del crecimiento fue mayor. Este bajo crecimiento de los callos pudiera ser debido a que esta citoquinina se conjuga a muy bajas concentraciones en el medio de cultivo (Klerk, 2002) y por consiguiente se estimula en menor proporción la formación de callos. No obstante, los callos formados eran nodulares, compactos y de apariencia seca; características que son evidencia de callos regenerables según Schumann *et al.* (1995).

Resultados similares fueron descritos por Zambre *et al.* (1998) y Zambre *et al.* (2001) cuando trabajaron con cotiledones maduros de *P. acutifolius* y *P. vulgaris*. Estos autores describieron la formación de callo compacto de color pardo con 0.1 mg.l<sup>-1</sup> de TDZ.

La formación de callos se observó siempre en la zona de corte del explante. Varios autores como Smith y Krikorian (1990) y Van Harten *et al.* (2004) observaron

que los cortes realizados a los tejidos de los explantes facilitan la liberación de reguladores del crecimiento endógenos del explante, lo que estimula la formación de callo en esta zona.

#### Influencia del 2,4-D y el AIA en la formación y crecimiento de callos de *P. vulgaris* L. cv. CIAP 7247

Con las diferentes concentraciones de 2,4-D incorporadas en los medios de cultivo no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de formación de callos, siendo este inferior solamente cuando no se utilizó esta auxina (Tabla 2).

En general, los callos presentaron un mayor crecimiento en la medida que se incrementaron las concentraciones de 2,4-D en el medio de cultivo. Los mejores resultados para esta variable se alcanzaron en los tratamientos con 10, 15 y 20 mg.l<sup>-1</sup>.

El abundante crecimiento de los callos puede deberse indirectamente a que en condiciones de oscuridad no ocurre el efecto degradativo que provoca la luz sobre las auxinas, principalmente 2,4-D y el AIA por un proceso oxidativo. Esta respuesta a sido observada en varios cultivos (Jiménez, 2001).

Allavena y Rossetti (1983) informaron sobre la formación de callos con el empleo de diferentes concentraciones de 2,4-D en el medio de cultivo. Ellos indujeron la formación de estas estructuras en hojas y embriones cigóticos inmaduros de *P. vulgaris*. Así mismo, Eissa *et al.* (2001) en hipocótilo de *P. vulgaris* utilizaron 2 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D y 1 mg.l<sup>-1</sup> de kinetina para la formación de callos. En este trabajo a pesar de lograrse la formación de callos, en todos los tratamientos se obtuvieron callos de coloración pardo-amarillenta, traslúcidos y de consistencia acuosa (Figura 1 b), las cuales son características desfavorables (Cantliffe, 1993).

Según Yamada *et al.* (2001) el elevado nivel endógeno de auxinas en los frijoles, podría explicar la formación exagerada de callos hiperhidratados cuando se aplican concentraciones elevadas de auxinas exógenas como el 2,4-D.

Cuando se evaluó el efecto del AIA en los medios de cultivo para la formación de callos se observó, de

forma general, que estos eran menos voluminosos que los obtenidos con el 2,4-D (Figura 1 c). En todos los tratamientos que contenían esta auxina se obtuvieron altos porcentajes de formación de callos y no se encontraron diferencias significativas entre ellos. Se observaron valores superiores de crecimiento de los callos en los medios de cultivo con concentraciones de 0.5 a 7 mg.l<sup>-1</sup> de AIA (Tabla 3).

En este experimento se formaron callos compactos, de apariencia seca, con coloración pardo-amarillenta, características que concuerdan con los callos nodulares descritos por Schumann *et al.* (1995).

Resultados similares a los obtenidos en esta investigación refieren algunos investigadores al trabajar con diferentes especies del género *Phaseolus*. Estos lograron la formación de callos nodulares con una combinación de TDZ y AIA en los medios de cultivo (Zambre *et al.*, 1998; Dillen *et al.*, 2000; Zambre *et al.*, 2001).

Tabla 2. Influencia del 2,4-D en la formación de callos en cotiledones de *P. vulgaris* cv. CIAP 7247 a los 25 días de cultivo.

2,4-D (mg.l <sup>-1</sup> )	Formación de callos (%)	Crecimiento de los callos (según la escala)
0.0	60.0 b	2.45 c
1.0	80.0 ab	2.75 c
5.0	95.0 a	3.95 b
10.0	95.0 a	4.60 a
15.0	100 a	4.90 a
20.0	95.0 a	5.0 a
EE±	0.097	0.192

Medias con letras no comunes en una misma columna difieren significativamente por la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). EE: Error Estándar.

Tabla 3. Influencia del AIA en la formación de callos en cotiledones de *P. vulgaris* cv. CIAP 7247 a los 25 días de cultivo.

AIA (mg.l <sup>-1</sup> )	Formación de callos (%)	Crecimiento de los callos (según la escala)
0.0	65.0 b	2.5 c
0.05	90.0 a	3.15 b
0.50	95.0 a	3.45 ab
1.0	100 a	3.65 ab
3.0	100 a	3.70 a
5.0	100 a	3.80 a
7.0	100 a	3.90 a
EE±	0.074	0.173

Medias con letras no comunes en una misma columna difieren significativamente por la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). EE: Error Estándar.

## CONCLUSIONES

Se logró la formación de callos nodulares en *Phaseolus vulgaris* L. cv. CIAP 7247 con la combinación de los reguladores del crecimiento TDZ y AIA en el medio de cultivo.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el marco del Programa de Cooperación Universitaria Institucional entre la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas y el Consejo de Universidades Flamencas de Bélgica (IUC UCLV/MLIR).

## REFERENCIAS

- Allavena A, Rossetti L (1983) Efforts in somatic embryogenesis of *Phaseolus vulgaris*. Acta Horticulturae 131: 239 – 246
- Cantliffe DJ (1993) Advanced Propagation Systems for Biomass Species. A model system based on Sweet potato. Biomass and Bioenergy 5 (1): 63 – 69
- Dillen W, De Clercq J, Goznes A, Van Montagu M, Angenon G (1997) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phaseolus acutifolius* A Gray. Theor. Appl. Genet. 94: (2)151-158
- Dillen W, Zambre M, De Clercq J, Goossens A, Kapila J, Vranová E, Van Montagu M, Angenon G (2000) *In vitro* regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) and *P. acutifolius* A. Gray (tepariy bean). Acta Horticulturae 521: 59 – 64
- Eissa E, Bisztray GYD, Velich I (2001) Transformation of bean callus by using high-velocity microprojectiles. Acta Horticulturae 560: 129 – 132
- 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, pp. 5 - 61. PIRACICABA, São Paulo, Brazil
- Jiménez VM (2001) Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. Sociedade Brasileira de Fisiología Vegetal 13 (2): 196 – 223
- 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 Tiss Organ Cult 86: 187-199
- Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. Physiol. Plant 15: 473 – 497
- Murch SJ, Saxena PK (2001) Molecular fate of thidiazuron and its effects on auxin transport in hypocotyls tissues of *Pelargonium x hortorum* Bailey. Plant Growth Regulation 35 (3): 269 -275
- Pérez J, García L, Veitía N, Bermúdez I, Torres D, Padrón Y (2004) Formación de callos en *Phaseolus vulgaris* L cv. Turrialba-4 con Thidiazuron y ácido 2,4-diclorofenoxiacético. Biotecnología Vegetal 4 (4): 233-236
- Popelka J, Terryn Nancy, Higgins TJV (2004) Gene technology for grain legumes: can it contribute to the food challenge in developing countries?. Plant Science 167: 195 – 206
- Rehman Z, Salariya AM, Zafar SI (2001) Effect of processing on available carbohydrate content and starch digestibility of kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Food Chem. 73: 351-355
- Schumann G, Ryschka U, Schulze J, Klocke E (1995) Anatomy of Somatic Embryogenesis. En: Bajaj YPS (Ed) Biotechnology in Agriculture and Forestry 20. Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed, pp. 71-101. Kluwer Academic Publisher. Dordrech
- Smith DL, Krikorian AD (1990) Somatic proembryo production from excised, wounded zygotic carrot embryo on hormone-free medium: evaluation of effects of pH, ethylene and activated charcoal. Plant Cell Reports 9: 34 – 37
- Van Harten, AM, Raemakers CJJM, Jacobsen E, Klu EGY (2004) Direct organogenesis and somatic embryogenesis in mature cotyledon explants of winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC) using cytokinin-based media. IPGRI-FAO 131: 63 – 69
- Yamada T, Teraishi M, Hattori T, Nakamura K (2001) Transformation of azuki bean by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 64: 47 – 54
- Zambre MA, De Clercq 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 (tepariy bean). Plant Cell Rep. 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