

## Formación de callos en *Phaseolus vulgaris* L cv. Turrialba- 4 con Thidiazuron y ácido 2,4-diclorofenoxiacético

Jorge Pérez Pérez<sup>1</sup>, Lourdes García Rodríguez<sup>2</sup>, Rafael Gómez Kosky<sup>2</sup>, Idalmis Bermúdez Carabaloso<sup>2</sup>, Yenis Padrón Montesino<sup>2</sup>, Damaris Torres Rodríguez<sup>2</sup> y Carlos Romero Quintana<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup> Universidad de Granma, Carretera a Manzanillo, km 17, Peralejo, Bayamo. CP 85100, Granma. e-mail: jorge.perez@udg.co.cu

<sup>2</sup> Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.

### RESUMEN

Este trabajo tuvo como objetivo lograr la formación de callos con estructuras embriogénicas en *Phaseolus vulgaris* L. cv. Turrialba-4 con empleo de los reguladores del crecimiento Thidiazurón (TDZ) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Se utilizaron como explantes cotiledones de semillas maduras germinadas *in vitro* en medio de cultivo con las sales MS. En los medios de cultivo que contenían 2,4-D se obtuvieron callos voluminosos y no compactos, mientras que los formados en los medios de cultivo que contenían TDZ (0.20 mg.l<sup>-1</sup>) eran menos voluminosos, compactos y con formación de estructuras embriogénicas.

Palabras clave: estructuras embriogénicas, medio de cultivo, reguladores del crecimiento

### ABSTRACT

This work had like objective to obtain callus formation with embryogenic structure in *Phaseolus vulgaris* L. cv. Turrialba-4 with growth regulators Thidiazuron (TDZ) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Mature cotyledon explants germinated *in vitro* seeds in culture medium with salts MS. In the culture medium with 2,4-D obtained voluminous and non compact callus, whereas the formed in the culture medium that contained TDZ were less voluminous, compact and with formation of embryogenic structures to 0.20 mg.l<sup>-1</sup>.

Key words: culture medium, embryogenic structures, growth regulator

### INTRODUCCIÓN

El género *Phaseolus*, comprende alrededor de 30 especies de las cuales solamente cinco han sido cultivadas: *P. coccineus*, *P. lunatus*, *P. polyanthus*, *P. acutifolius* y *P. vulgaris* (frijol común). Este último, considerado desde el punto de vista económico el más importante, ocupa alrededor del 90% del área cultivada de especies *Phaseolus* en todo el mundo (Debouck, 2000; De Clercq *et al.*, 2002).

El cultivo de tejidos y la regeneración de plantas en especies *Phaseolus* ha tenido serias dificultades desde los primeros intentos realizados por Hildebrandt desde 1963 hasta 1975 (Nagl *et al.*, 1997). Desde entonces, las referencias sobre la regeneración de plantas a partir de callos en especies de *Phaseolus* son limitadas. La formación de callos con estructuras embriogénicas ha sido observada en *P. acutifolius* y *P. vulgaris* (Dillen *et al.*, 1996; Zambre *et al.*, 1998) y *P. polyanthus* (Zambre *et al.*, 2001).

La composición y concentración de los reguladores del crecimiento en el medio de cultivo, son factores determinantes para el normal crecimiento y desarrollo de las plantas en los sistemas de cultivo *in vitro*. Las auxinas y citoquininas, han sido los reguladores del

crecimiento más utilizadas en el cultivo de tejidos (Frank y Schmölling, 1999).

Mohamed *et al.* (1993) y Zambre *et al.* (1998), lograron regenerar plantas de *P. vulgaris* cv. Xan 159 y GN Tara, a partir de callos formados con diferentes concentraciones de Thidiazurón (TDZ) y Ácido indolacético (AIA).

En Cuba, hasta el momento de iniciarse estos estudios no existían referencias en relación con el cultivo *in vitro* del frijol común. En el contexto internacional los resultados han sido poco eficientes y restrictos a determinados genotipos como el *P. acutifolius*.

El objetivo del presente trabajo fue lograr la formación de callos con estructuras embriogénicas en *Phaseolus vulgaris* cv. Turrialba-4 con los reguladores del crecimiento Thidiazurón y ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Como material vegetal se emplearon semillas maduras de *P. vulgaris* L. cv. Turrialba-4 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. Para la formación y multiplicación de los callos, se estudió independientemente el efecto de diferentes concentraciones de los reguladores del crecimiento 2,4-D (0.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 mg.l<sup>-1</sup>) y TDZ (0.0, 0.05, 0.20, 0.05 mg.l<sup>-1</sup>), en un medio de cultivo basal con las sales MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con AIA (0.05 mg.l<sup>-1</sup>) y sacarosa al 20%. El mismo fue solidificado con Gelrite (3.5 g.l<sup>-1</sup>) y el pH fue ajustado a 5.7 previo al autoclaveado.

Los explantes fueron cortados en los bordes y divididos en fragmentos de aproximadamente 0.5 cm<sup>2</sup>. Posteriormente se colocó un explante por tubo de ensayo (20 cm de alto x 1.5 cm de diámetro) con 10 ml de medio de cultivo y con la región axial en contacto con el medio de cultivo.

El experimento se desarrolló en condiciones de oscuridad a temperatura de 27± 2°C.

Se empleó un diseño completamente aleatorio. El tamaño de la muestra fue de 20 tubos de ensayo por tratamiento y cinco tubos de ensayo se consideraron una réplica experimental.

Las variables evaluadas fueron: a) número de explantes que formaron callos, b) número de callos con estructuras embriogénicas, c) color y consistencia de los callos (a través de observación visual), d) el crecimiento medio de los callos que se determinó según la escala (Tabla1), elaborada para este experimento.

Las variables número de explantes que formaron callos y número de callos con estructuras embriogénicas se expresaron en porcentaje. Para el análisis estadístico de los porcentajes se empleó la fórmula: %FC = NEC \* 100/ TE, donde: (%FC) porcentaje de explantes con formación de callos, (NEC) número de explante con callos y (TE) total de explantes. Mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (p<0.05) se determinó la variabilidad entre los tratamientos.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Con el empleo del 2,4-D en el medio de cultivo no se encontraron diferencias significativas en el número de callos para las concentraciones utilizadas. Se obtuvo 100% de explantes con formación de callos en todos los tratamientos. Estos no eran compactos, de consistencia acuosa y coloración amarillo-blanquecina (Figura 1), características que son evidencia de callos no regenerables según (Schumann *et al.*, 1995).

Tabla 1. Escala para la determinación del grado de crecimiento de los callos en *P. vulgaris* cv. Turrialba-4.

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.

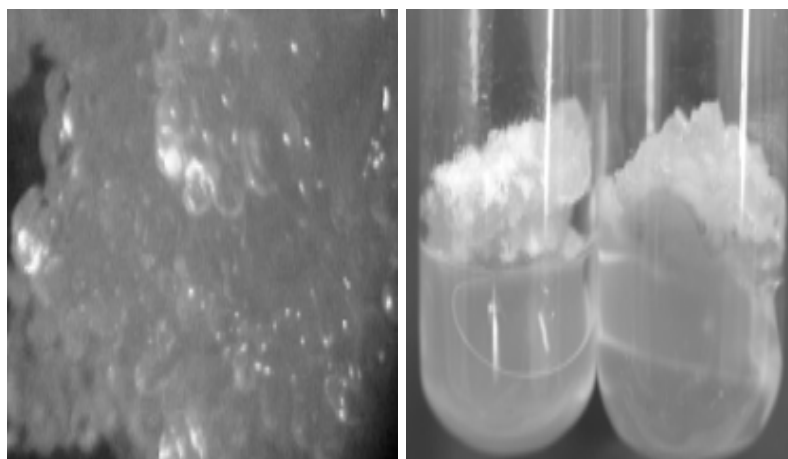


Figura 1 Callos de *P. vulgaris* cv. Turrialba-4 en medio de cultivo compuesto por las sales MS suplementado con AIA (0.05 mg.l<sup>-1</sup>), sacarosa (20%) y 2,4-D (10 mg.l<sup>-1</sup>) a los 30 días de cultivo.

Las características morfológicas de este genotipo indicaron que pudiera contener altos niveles de auxina endógena que al interactuar con las concentraciones exógenas presentes en el medio de cultivo incrementaron el volumen del callo. Según Yamada *et al.* (2000), el elevado nivel endógeno de auxinas en los frijoles es lo que podría explicar la formación exagerada de callos hiperhidratados. También Jiménez (2001), postuló que el 2,4-D en el medio de cultivo es una de las causas de incrementos en los niveles endógenos de AIA y que el abundante crecimiento de los callos puede deberse a que en condiciones de oscuridad no ocurre el efecto degradativo que provoca la luz sobre las auxinas.

En los medios de cultivo que contenían TDZ, los explantes mostraron una coloración verdosa durante las dos primeras semanas de cultivo, posteriormente se formaron callos de color blanco y pardo oscuro, en los bordes de los cotiledones así como en la parte inferior en contacto con el medio de cultivo (Figura 2a). En cuanto al crecimiento de los callos en los diferentes tratamientos con TDZ, se alcanzó un crecimiento medio de grado tres según la escala propuesta (Tabla 1), no se apreciaron diferencias significativas entre los tratamientos. Con este regulador del crecimiento se lograron callos compactos y de apariencia seca. Mediante una observación en el microscopio estereoscópico se

evidenció la formación de callos con estructuras pro-embriogénicas en el tratamiento con 0.20 mg.l<sup>-1</sup> de TDZ (Figura 2b).

La Tabla 2, muestra entre un 90 -100% de explantes con formación de callos en todas las concentraciones de TDZ, difiriendo significativamente del tratamiento control. También se observa que a concentración de 0.20 mg.l<sup>-1</sup> se alcanzó un 20% de callos con estructuras embriogénicas.

Van Harten *et al.* (2004) refieren que los cortes realizados a los cotiledones facilitan la liberación de reguladores del crecimiento endógenos del explante al medio de cultivo estimulando la formación de callos. Según Klerk (2002) el TDZ se conjuga a muy bajas concentraciones después de 12-33 días en el medio de cultivo de formación de callos en *Phaseolus*. Esto fue demostrado en medio de cultivo con TDZ radiomarcado, observándose que el 60% del TDZ se encontraba libre en el medio de cultivo, lo cual puede ser la causa de su escaso crecimiento.

Muchos trabajos refieren que generalmente esta citoquinina induce la formación de callos a bajas concentraciones. Zambre *et al.* (2001) y Dillen *et al.* (2000) trabajando con TDZ y AIA en *P. vulgaris* observaron callos compactos de apariencia seca y coloración parda oscura.

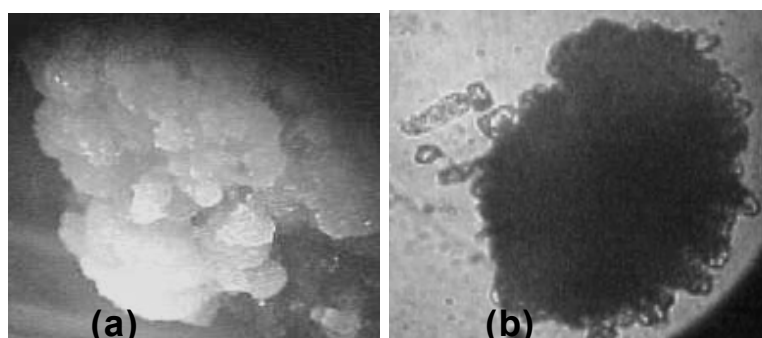


Figura 2 a) Callos de *P. vulgaris* cv. Turrialba-4 en medio de cultivo compuesto por las sales MS suplementado con AIA (0.05 mg.l<sup>-1</sup>), sacarosa (20%) y TDZ (0.20 mg.l<sup>-1</sup>) a los 30 días de cultivo. b) Formación de estructuras pro-embriogénicas.

Tabla 2. Porcentaje de formación de callos en cotiledones de *P. vulgaris* cv. Turrialba-4 con diferentes concentraciones de TDZ en el medio de cultivo.

Concentración TDZ (mg.l <sup>-1</sup> )	Total de explantes	Formación de callos (%)	Callos con estructuras embriogénicas (%)
0.00	20	0 c	0 b
0.05	20	90 b	0 b
0.20	20	90 b	20 a
0.50	20	100 a	0 b
EE±		0.13	

Medias con letras diferentes en una misma columna difieren significativamente para ( $p < 0.05$ ) según la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis ( $p < 0.05$ ).

## CONCLUSIONES

Se logró la obtención de callos con estructuras embriónicas en *Phaseolus vulgaris* L cv. Turrialba-4.

El TDZ fue el regulador del crecimiento que propició la formación de callos nodulares, encontrándose formación de estructuras embriónicas con la concentración de 0.20 mg.l<sup>-1</sup>.

## REFERENCIAS

Debouck, D (2000) Biodiversity, ecology and genetic resources of *Phaseolus* beans-Seven answered and unanswered questions. In Proc. of the 7<sup>th</sup> MAFE Intl. Workshop on Genetic Resources Part 1. Wild Legumes. pp. 95 – 123. AFFRC and NIAR, Japan

De Clercq, J, Zambre MA, Van Montagu M, Dillen W, Angenon G (2002) An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation procedure for *Phaseolus acutifolius* A. Gray. Plant Cell Rep. 21:333-340

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, De Clercq J, Van Montagu M, Angenon G (1996) Plant regeneration from callus in a range of *Phaseolus acutifolius* A. Gray genotypes. Plant Science 118: 81-88

Frank, M, Schmülling T (1999) Cytokinin cycles cells. Trends in Plant Sciences 4: 243-244

Jiménez, VM (2001) Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. Bras. Fisiol. Veg. 13 (2): 196-223

Klerk, GJ (2002) Plant Hormones in Tissue Culture. En: Biochemical Plant Cell and Tissue Culture. Duchefa Biochemiev BV, pp. 19 – 23. Catalogue 2000-2001

Mohamed, MF, Coyne DP, Read PE (1993) Shoot organogenesis in callus induced from pedicel explants of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Journal of the American Society for Horticultural Science 118:158-162

Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. Plant Physiol. 15: 473-497

Nagl, W, Ignacimuthu S, Becker J (1997) Genetic Engineering and Regeneration of *Phaseolus* and *Vigna*. State of the Art and New Attempts. Plant Physiology 150: 625-644

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

Schumann, G, Ryschka, U, Schulze, J y Klocke E (1995) Anatomy of Somatic Embryogenesis. En: Bajaj, YPS (Ed). Biotechnology in Agriculture and Forestry 20. Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I, pp. 71-101. Kluwer Academic Publisher. Dordrech

Yamada, T, Teraishi M, Hattori T, Nakamura K (2001) Transformation of azuki bean by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 64:47-54

Zambre, MA, De Clerq 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 (teparty 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