

Radiosensibilidad *in vitro* de dos tipos de explante de frijol común cultivar 'BAT-93'

Novisel Veitía, Amanda Martirena-Ramírez, Damaris Torres Rodríguez, Lourdes R García, Raúl Collado, Leonardo Rivero

Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54830. e-mail: novisel@ibp.co.cu

RESUMEN

El empleo de radiaciones Gamma combinadas con el cultivo de tejidos *in vitro* es una herramienta útil en los programas de mejoramiento genético. Sin embargo, para su aplicación es necesario disponer de un sistema de regeneración eficiente de plantas. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la radiosensibilidad *in vitro* de dos tipos de explante de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar 'BAT-93' a las radiaciones Gamma. Se irradiaron semillas de dos meses de cosechadas y el nudo cotiledonal con dos cotiledones (NC-2), con dosis de 50 y 80 Gy. Como control se emplearon 100 semillas sin irradiar. Se evaluó el porcentaje de germinación de las semillas irradiadas, los explantes con callo y número de brotes por callo a los 21 días de cultivo en los medios de cultivo de formación y regeneración de callos, respectivamente. Se encontró que el tipo de explante y la dosis de radiación influyeron en la formación de callos y la regeneración de brotes. De las semillas irradiadas se formaron callos con las dos dosis de radiaciones Gamma utilizadas. Sin embargo, solo se logró la regeneración de brotes con la dosis de 50 Gy. En el explante NC-2 no se formó callo con las dosis de radiación utilizadas. La semilla es el explante que se recomienda para la aplicación de radiaciones Gamma combinado con la regeneración de plantas vía organogénesis indirecta en *Phaseolus vulgaris* L. cultivar 'BAT 93'.

Palabras clave: cultivo *in vitro*, nudo cotiledonal, mutagénesis, *Phaseolus vulgaris* L., semillas

In vitro radiosensitivity of two types of common bean explants of 'BAT-93' cultivar

ABSTRACT

The use of Gamma radiations combined with *in vitro* tissue culture is a useful tool in breeding programs. However, for its application it is necessary to have an efficient plant regeneration system. The objective of this work was to determine the *in vitro* radiosensitivity of two types of explant of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar 'BAT-93' to Gamma radiations. Two-month harvested seeds and the cotyledonal node were irradiated with two cotyledons (NC-2), with doses of 50 and 80 Gy. As control, 100 non-irradiated seeds were used. It was evaluated the germination percentage of the irradiated seeds, the explants with callus and the number of shoots per callus at 21 days of culture in the culture media for formation and regeneration of callus, respectively. It was found that the type of explant and the radiation dose influenced the formation of calli and the shoots regeneration. From the irradiated seeds, callus was formed with the two doses of Gamma radiation used. However, the shoots regeneration just was achieved with the dose of 50 Gy. In the NC-2 explant, callus was not formed with the radiation doses used. The seed is the explant that is recommended for the application of Gamma radiations combined with the regeneration of plants via indirect organogenesis in *Phaseolus vulgaris* L. cultivar 'BAT 93'.

Keywords: *in vitro* culture, cotyledonary node, mutagenesis, *Phaseolus vulgaris* L., seeds

INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa alimenticia más importante en el

trópico de América Latina, África oriental y meridional (Dell' Amico *et al.*, 2017). Dada la importancia del cultivo en Cuba las investigaciones se dirigen al mejoramiento

genético del cultivo en la obtención de cultivares capaces de tolerar condiciones de estrés biótico y abiótico (Rojas *et al.*, 2016).

Según Jankowickz-Cieslak y Till (2015) en la base de datos de variedades mutantes predominan las obtenidas mediante el empleo de radiaciones ionizantes y específicamente con radiaciones Gamma. Estos autores refieren que esto se debe a la activa promoción del uso de radiaciones Gamma por el Programa FAO (Organización para la Alimentación y la agricultura)/IAEA (Organización Internacional de Energía Atómica), a la capacidad de las radiaciones Gamma de producir gran cantidad de aberraciones cromosómicas en comparación con los agentes mutagénicos químicos, y la aparición con mayor frecuencia de características deseables. Estas posibilidades se incrementan con el uso combinado de mutagénesis y cultivo de tejidos *in vitro* debido al incremento de la variabilidad genética, la selección y la multiplicación de las líneas deseadas en un menor periodo de tiempo y en un menor espacio que el utilizado en los métodos convencionales (Jander *et al.*, 2003).

Desde 1970 en el programa FAO/IAEA, se desarrollaron investigaciones relacionadas con el empleo de mutaciones en leguminosas de grano como método de mejoramiento genético (Micke, 1984). Sin embargo, en la literatura científica existen limitados trabajos que refieren el uso combinado de mutagénesis y cultivo de tejidos *in vitro* en frijol común (Martirena-Ramírez *et al.*, 2015a).

Esto se debe fundamentalmente a que los protocolos de regeneración de plantas *in vitro* en esta especie poseen baja eficiencia, reproducibilidad y dependen del genotipo (Kwapata *et al.*, 2010). Sin embargo, Collado *et al.* (2013) desarrollaron un protocolo de regeneración de plantas en *Phaseolus vulgaris* vía organogénesis indirecta, eficiente, que incluyó entre los cultivares evaluados a 'BAT-93' que se utiliza en la presente investigación.

De forma general, en las especies vegetales se han empleado semillas, callos, brotes y tubérculos como explantes en la aplicación combinada de ambos métodos para inducir variabilidad (Zalewska *et al.*, 2011). Según Gallone *et al.* (2012) diferentes explantes de una planta puede responder de forma diferente ante una dosis de radiación y comprometer la regeneración *in vitro*.

En frijol común se han utilizado brotes, semillas y callos (Bajaj *et al.*, 1970; Carneiro *et al.*, 1987; Martirena-Ramírez *et al.*, 2015a; Martirena-Ramírez *et al.*, 2015b) y la respuesta al tratamiento con radiaciones Gamma estuvo asociada con el cultivar, el tipo de explante y la dosis empleada. Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado el presente trabajo tuvo como objetivo determinar la radiosensibilidad *in vitro* de dos tipos de explante de frijol común cultivar 'BAT-93' a las radiaciones Gamma.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron semillas maduras de *P. vulgaris* cultivar 'BAT-93' de dos meses de cosechadas en época óptima en la casa cultivo ubicada en el Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP).

Tratamiento mutagénico

El tratamiento mutagénico con radiaciones Gamma, se realizó en el Centro de Aplicaciones Tecnológicas y Desarrollo Nuclear de La Habana, Cuba (CEADEN). Para ello, se empleó un irradiador MPX-25, con una potencia de dosis de 11.3 Gy min⁻¹. Se aplicaron dosis de 50 y 80 Gy en dos tipos de explante teniendo en consideración los resultados descritos por Martirena-Ramírez *et al.* (2015b). El primero fueron semillas y el segundo el nudo cotiledonal con dos cotiledones (NC-2) (Figura 1). Se emplearon 100 semillas sin irradiar como control.

Para el tratamiento mutagénico los dos tipos de explante fueron colocados en placas Petri de 9.0 cm de diámetro. Solo para el explante NC-2 las placas contenían 15 ml de medio de cultivo de formación de callos (MFC). Para la obtención del nudo cotiledonal previamente se tomaron semillas del cultivar 'BAT-93', que fueron desinfectadas según el protocolo propuesto por Dillen *et al.* (1997). Posteriormente, se colocaron en frascos de cultivo de 250 ml de capacidad en medio de cultivo de germinación (MG). Las semillas se mantuvieron durante tres días a 25±2 °C en oscuridad constante para la germinación. Una vez que germinaron se eliminó la testa y el eje hipocótilo y epicótilo se colocaron en medio de cultivo (MFC) el nudo cotiledonal con los dos cotiledones (NC-2).



Figura 1. Material vegetal de frijol común cv. 'BAT-93' utilizado para el tratamiento con radiaciones Gamma. a) Semillas y b) Nudo cotiledonal con dos cotiledones (NC-2).

Los medios de cultivo de germinación de las semillas (MG), formación de callos (MFC), multiplicación de callos (MMC) y regeneración de brotes (RG) fueron los descritos por Collado *et al.* (2013.)

Cultivo in vitro de los explantes irradiados

Las semillas irradiadas fueron colocadas en medio de cultivo de germinación (MG). Una vez germinadas se les eliminó la testa y el eje hipocótilo y epicótilo y se colocó el nudo cotiledonal con dos cotiledones en medio de cultivo de formación de callos (MFC). Los nudos cotiledonales con dos cotiledones (NC-2) irradiados fueron colocados directamente en frascos de cultivo que contenían medio de cultivo de formación de callos (MFC). Los dos tipos de explante se mantuvieron durante siete días en oscuridad constante a 25 ± 2 °C y posteriormente fueron transferidos a medio de cultivo de formación de callos y se colocaron durante 14 días en condiciones de iluminación con un fotoperiodo de 16 horas luz/ 8 horas de oscuridad. Transcurrido este periodo de tiempo se transfirieron al medio de cultivo de formación de callos donde se mantuvieron por 21 días para un segundo subcultivo.

Posteriormente, los callos fueron multiplicados y para ello se realizaron dos subcultivos cada 21 días. Finalmente, fueron transferidos a un medio de cultivo de regeneración de brotes. La multiplicación de los callos y la regeneración de brotes de los dos tipos de explantes irradiados se realizó mediante el esquema de trabajo propuesto por Collado *et al.* (2013).

Las evaluaciones se realizaron en la germinación de las semillas, la formación de

callos y en la regeneración de brotes. Se cuantificó el número de semillas germinadas tanto de las irradiadas como el control sin irradiar. Para los dos tipos de explante se registraron los valores del número de explantes que formó callo por frasco de cultivo a los 21 días de cultivo y con ello se calculó el porcentaje de formación de callos por frasco de cultivo. Además, se cuantificó el número de brotes por callo en medio de cultivo de regeneración a los 21 días de cultivo.

Procesamiento estadístico

Para los análisis estadístico de las tres variables evaluadas se aplicaron las pruebas H de Kruskal-Wallis y U de Mann Whitney, previa comprobación del no cumplimiento de los supuestos de normalidad de los datos y homogeneidad de varianza. El paquete estadístico empleado fue *Statistic Packaged for Social science (SPSS)* versión 21.0 sobre Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las dosis de radiaciones Gamma utilizadas no afectaron la germinación *in vitro* de las semillas de frijol común cv. 'BAT-93'. Se alcanzaron valores de 100 y 98% para las dosis de 50 y 80 Gy respectivamente, similares al alcanzado por las semillas sin irradiar (100%) para $p \leq 0.05$. Estos resultados corroboran hallazgos previos de Jan *et al.* (2012) quienes informaron que el porcentaje de germinación puede aumentar, disminuir o permanecer sin cambios después de la irradiación. Los resultados informados por varios autores confirman lo anterior. Por ejemplo, Bajaj *et al.* (1970) refirieron una

disminución en el porcentaje de germinación en semillas de frijol con dosis entre 5-400 Gy. Resultados similares fueron descritos por Carneiro *et al.* (1987) con dosis de 40-200Gy. Por el contrario, Maity *et al.* (2005) describieron un incremento en la nodulación en *Phaseolus mungo* L., en semillas irradiadas con dosis entre 50-150 Gy. Sin embargo, cuando aplicaron dosis desde 200 hasta 350 Gy se afectó la altura de los brotes de semillas recién germinadas. Por su parte, Martirena-Ramírez *et al.* (2015a) irradiaron semillas de frijol común cv. 'Ica Pijao' con dosis entre 70-100 Gy y no se afectó el porcentaje de germinación *in vitro*. Los resultados del presente trabajo coinciden con los obtenidos por dichos autores en condiciones *in vitro* con dosis de 50 y 80 Gy para el cultivar 'BAT-93'.

En la formación de callos independientemente de la dosis de radiación utilizada, tanto las semillas como el NC-2 fueron afectados. Con el explante NC-2 no se logró la formación de callo con las dosis de radiación que fueron empleadas. Sin embargo, las semillas irradiadas con 50 y 80 Gy formaron callos con diferencias significativas entre ellos y con el control sin irradiar.

Los callos formados a partir de semillas irradiadas independientemente de la dosis utilizada mostraron una coloración parda (#A0522D) y posteriormente en el segundo subcultivo en MFC presentaron puntos verdes. Con la dosis de 50 Gy se lograron valores superiores de formación de callos, aunque por debajo del 30% (Tabla 1).

La inhibición en la formación de callos en los explantes utilizados pudiera atribuirse a la detención del ciclo celular durante la división

de las células somáticas o pudieron ocurrir diversos daños en el genoma (Preussa y Britta, 2003). En relación con el explante NC-2, Collado *et al.* (2013) informaron que el cultivar de frijol común 'BAT-93' para la formación de callos requiere la presencia de los dos cotiledones. Estos autores atribuyeron el resultado a la acumulación de hormonas en los cotiledones que en balance con los reguladores del crecimiento adicionados al medio de cultivo favorecen la formación de callos.

En el presente trabajo los cotiledones y el nudo cotiledonal mostraron una coloración parda (#A0522D) y no formaron callos en el primer subcultivo en MFC. Posteriormente, ocurrió la separación de los cotiledones del nudo cotiledonal cuando se realizó la transferencia de estos a medio de cultivo fresco para el segundo subcultivo de formación de callos.

Teniendo en cuenta los resultados en la formación de callos de los dos tipos de explante del cultivar 'BAT-93' empleado, el NC-2 fue más sensible que las semillas a las dosis de radiaciones Gamma utilizadas.

De igual forma, las radiaciones (50 y 80 Gy) afectaron la regeneración de brotes a partir de callos formados de semillas irradiadas. Solo con la dosis de 50 Gy se logró la formación de brotes con diferencias significativas respecto al control sin irradiar (Tabla 2).

Los brotes regenerados del cultivar 'BAT-93' a partir de los callos irradiados presentaron coloración verde con hojas trifoliadas (Figura 2). Sin embargo, estos brotes en el segundo subcultivo en medio de cultivo de regeneración no emitieron hojas nuevas ni raíces.

Tabla 1. Formación de callos en dos tipos de explante de frijol común cv. 'BAT-93' sometidos a radiaciones Gamma.

Tratamientos	Dosis de radiaciones (Gy)	Formación de callos (%)	Rangos medios
Semillas	50	28.70	170.63 b
	80	14.51	102.08 c
Nudo cotiledonal con dos cotiledones (NC-2)	50	0.00	--
	80	0.00	--
Control sin irradiar	0	90.00	352.71 a

Rangos medios con letras desiguales difieren para $p \leq 0.05$ según la prueba H de Kruskal Wallis

Tabla 2. Regeneración de brotes de callos formados a partir de semillas irradiadas de frijol común cultivar 'BAT-93'.

Tratamientos	Dosis de radiaciones (Gy)	Número de brotes/callos	Rangos medios
Semillas	50	0.73	23.50 b
Control sin irradiar	0	2.15	42.65 a

Rangos medios con letras desiguales difieren para $p \leq 0.05$ según la prueba U de Mann Whitney



Figura 2. Brotes regenerados *in vitro* de callos formados a partir de semillas irradiadas de frijol común cv. 'BAT 93'.

La baja regeneración de brotes a partir de tejidos irradiados también ha sido referida por varios autores. Al respecto, Suprasanna *et al.* (2012), asociaron la disminución en la regeneración de plantas con el efecto tóxico de las radiaciones Gamma sobre las células. Estos autores irradiaron callos embriogénicos de caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido) y alcanzaron un bajo potencial de regeneración. Por su parte, Martirena-Ramírez *et al.* (2015a) indicaron una disminución en la regeneración respecto al control, pero lograron la formación de brotes en todos los tratamientos con las dosis de radiaciones que emplearon en el cultivar 'ICA pijao'. Por el contrario, el cultivar 'BAT-93' en el presente estudio mostró una respuesta más sensible a las radiaciones Gamma ya que con 50 Gy se logró un valor en el número de brotes por callo por debajo de uno.

CONCLUSIONES

Los dos tipos de explante de frijol común del cultivar 'BAT-93' (semilla y NC-2) tratados con radiaciones Gamma mostraron

una respuesta radiosensible. La semilla es el explante que se recomienda para la aplicación de radiaciones Gamma combinado con la regeneración de plantas vía organogénesis indirecta en *Phaseolus vulgaris* L. cultivar 'BAT 93'.

REFERENCIAS

- Bajaj Y, Saettler A, Adams M (1970) Gamma irradiation studies on seeds, seedlings and callus tissue cultures of *Phaseolus vulgaris* L.. Radiation Botany 10(2): 119–124; doi: 10.1016/S0033-7560(70)80032-1
- Carneiro JE, Barbosa HM, Cardoso AA, Vieira C (1987) The sensitivity of seeds of *Phaseolus vulgaris* L.cv. Millonario 1732 to Gamma radiation. Rev Ceres 34: 306-312
- Collado R, Veitía N, Bermúdez-Carabaloso I, García LR, Torres D, Romero C, Rodríguez-Lorenzo JL, Angenon G (2013) Efficient *in vitro* plant regeneration via indirect organogenesis for different common bean cultivars. Sci Hortic 153: 109-116; doi: 10.1016/j.scienta.2013.02.007

- Dell' Amico J, Morales D, Jerez E, Rodríguez P, Álvarez I, Martín R, Díaz Y (2017) Efecto de dos variantes de riego y aplicaciones foliares de Pectimorf® en el desarrollo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Cultivos Tropicales 38(3): 129-134
- Dillen W, De Clercq J, Goossens A, Van Montagu M, Angenon G (1997) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phaseolus acutifolius* A. Gray. Theor Appl Genet 94: 151–158; doi: 10.1007/s001220050394
- Gallone A, Hunter A, Douglas GC (2012) Radiosensitivity of Hebe 'Oratia Beauty' and 'Wiri Mist' irradiated *in vitro* with Y-rays from ⁶⁰Co. Scientia Horticulturae 138: 36–42; doi: 10.1016/j.scienta.2012.02.006
- Jan S, Parween T, Siddiqi TO, Mahmooduzzafar X (2012) Effect of Gamma (̳) radiation on morphological, biochemical, and physiological aspects of plants and plant products. Environ Rev 20: 17–39; doi: 10.1139/A11-021
- Jander G, Baerson SR, Huda JA, Gozález KA, Gruys KJ, Last RL (2003) Ethylmetane sulfonate saturation mutagenesis in *Arabidopsis* to determine frequency of herbicide resistance. Plant Physiology 131(1): 139-146; doi:10.1104/pp.102.010397
- Jankowicz-Cieslak J, Till B (2015) Forward and Reverse Genetics in Crop Breeding. En: Al Khayri JM, Jain SM, Johnson D (eds) Advances in plant breeding strategies: breeding, biotechnology and molecular tools (vol 1), pp. 215–240, Springer, Switzerland; ISBN: 978-3-319-22521-0
- Kwapata KR, Sabzikar MB, Sticklen JD, Kelly D (2010) *In vitro* regeneration and morphogenesis studies in common bean. Plant Cell Tiss Organ Cult 100: 97-105; doi: 10.1007/s11240-009-9624-9
- Maity JP, Mishra D, Chakraborty A, Saha A, Santra SC, Chanda S (2005) Modulation of some quantitative and qualitative characteristics in rice (*Oryza sativa* L.) and mung (*Phaseolus mungo* L.) by ionizing radiation. Radiation Physics and Chemistry 74: 391-394; doi: 10.1016/j.radphyschem.2004.08.005
- Martirena-Ramírez A, Veitía N, García LR, Collado R, Torres D, Rivero L, López MR (2015a) Respuesta *in vitro* de semillas de *Phaseolus vulgaris* L. cultivar 'Ica Pijao' irradiadas con diferentes dosis de radiación Gamma. Biotecnología Vegetal 15(1):9-15
- Martirena-Ramírez A, Veitía N, García LR, Collado R, Torres D, Rivero L, López MR (2015b) Efecto de radiaciones Gamma ⁶⁰Co sobre la regeneración de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. cultivar 'ICA Pijao' vía organogénesis indirecta. Biotecnología Vegetal 15(4):207-215
- Micke A (1984) Mutation breeding of grain legumes. Plant and Soil 82: 337-357
- Preussa SB, Britta AB (2003) 'A DNA damage induced cell cycle checkpoint'. Arabidopsis Genetics 164: 323-334
- Rojas L, Collado R, León A, Ocaña B, Hernández M, Veitía N, Martirena-Ramírez A, Torres D, García LR (2016) Concentración óptima de Metano Sulfonato de Etilo en *Phaseolus vulgaris* L. cv 'DOR 364' para inducir variaciones fenotípicas. Biotecnología Vegetal 6(3): 179 - 188
- Suprasanna P, Balasaheb S, Vikas PY (2012) *In vitro* mutagenesis and selection in plant tissue culture and their prospects for crop improvement. Biorremediation, Biodiversity and Bioavailability 6(1): 6-14
- Zalewska M, Tymoszek A, Miler N (2011) New chrysanthemum cultivars as a result of *in vitro* mutagenesis with the application of different explant types. Acta Sci Pol, Hortorum Cultus 10(2): 109-123

Recibido: 24-07-2017

Aceptado: 28-09-2017