Rev. Fitotec. Mex. Vol. 23. 293-306. 2000

INDUCCIÓN DE ORGANOGÉNESIS DIRECTA *in vitro* EN *Phaseolus vulgaris* L.

In vitro DIRECT ORGANOGENESIS INDUCTION IN *Phaseolus vulgaris* L.

Sandra Anabella Tello Coutiño[1], María Cristina Guadalupe López Peralta[1], Porfirio Ramírez Vallejo[1] y Elizabeth Cárdenas Soriano[2]

RESUMEN

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* constituye una alternativa para complementar al mejoramiento genético convencional; sin embargo, algunas especies, como *Phaseolus vulgaris* L., presentan limitaciones en la capacidad de respuesta organogénica, lo que hace necesario desarrollar protocolos de regeneración específicos e identificar genotipos con alta capacidad de regeneración *in vitro*. Los objetivos de esta investigación fueron establecer las condiciones *in vitro* para la inducción de organogénesis directa y caracterizar la capacidad de respuesta al cultivo *in vitro* de cinco cultivares de frijol P-48, P-20, P-31, P-4 y Jamapa. La mejor respuesta a la inducción de brotes adventicios se tuvo a partir del cotiledón cultivado en las sales inorgánicas del medio básico de Gamborg *et al.* (1976, B5); el suplemento orgánico del medio básico de Murashige y Skoog (1962, MS); sacarosa (azúcar comercial) (3% p/v); BAP (79.90 µM) y agar (0.6 % p/v). Se observaron efectos significativos entre cultivares; P-48 tuvo la mayor respuesta organogénica, con 77.1% de explantes con brotes y 3.4 brotes por explante de 5.68 mm de longitud; mientras que Jamapa exhibió la menor eficiencia de regeneración *in vitro*, con 35% de explantes con brotes y 0.75 brotes por explante de 5.75 mm de longitud. Los cultivares restantes mostraron una respuesta intermedia. El análisis histológico mostró que los brotes fueron adventicios, ya que se originaron directamente de áreas meristemáticas, formadas *de novo*, en tejido subepidermal de la parte baja de la yema axilar.

[1] Colegio de Postgraduados. Instituto de Recursos Genéticos y Productividad. Km. 36.5 Carret. México-Texcoco. 56230 Montecillo, Estado de México. Tel. y Fax: 01(595) 20262.

[2] Colegio de Postgraduados. Instituto de Fitosanidad. Km.36.5 Carret. México-Texcoco. 56230 Montecillo, Estado de México. Tel. y Fax: 01(595) 2-0200.

Fecha de Recepción: 1 de Octubre de 1999.
Fecha de Aprobación: 9 de Octubre del 2000.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Phaseolus vulgaris L., cultivo *in vitro*, brotes adventicios, frijol común.

SUMMARY

In vitro plant tissue culture represents a complementary method for conventional plant breeding; however, some species, such as *Phaseolus vulgaris* L., have limited organogenic ability. These obstacles lead to development of specific protocols, and to identify genotypes with high *in vitro* regeneration capability. This study was carried out to develop appropriated protocols for maximum induction of direct organogenesis, and to characterize *in vitro* regeneration capability in the dry bean varieties P-48, P-4, P-20, P-31, and Jamapa. As result, the highest response in induction of adventitious shoots was obtained by cotyledons grown in a medium containing, inorganic salts of Gamborg (1976, B5) basal medium, supplemented with organic compounds of the Murashige and Skoog (1962, MS) basal medium; sucrose (commercial sugar) (3% w/v); BAP (79.9 µM); and agar (0.6%, w/v). Significant statistical differences in regeneration related traits were found among varieties. P-48 showed the highest response in both rate of explants with shoots (77.1%) and number of shoots per explant (3.4), with shoots 5.68 mm long; in contrast, Jamapa had the lowest response in both rate of explants with shoots (35%) and number of shoots per explant (0.75), with shoots 5.75 mm long. The other three varieties showed an intermediate performance. Besides, histological studies showed that the shoots were adventitious, since they were directly originated from recently developed meristematic areas in subepidermal tissue, at the lowest area of the cotiledonary axilar bud.

ADDITIONAL INDEX WORDS

Phaseolus vulgaris L., *in vitro* culture, adventitious shoots, dry bean.

INTRODUCCIÓN

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es una leguminosa de gran valor en la dieta alimenticia humana en México, Centro y Sur América, cuya productividad es altamente afectada por factores biológicos, edáficos y climáticos (Beebe y Pastor Corrales, 1991), que podrían ser superados con la obtención de variedades mejoradas.

En esta especie el mejoramiento genético se hace fundamentalmente mediante técnicas convencionales. No obstante, el proceso de mejoramiento se dificulta por la escasa variabilidad genética dentro de la especie, sobre todo para algunas características de importancia agronómica como plagas y enfermedades (Beebe y Pastor-Corrales, 1991), y las barreras para la hibridación interespecífica (Singh, 1991).

Para superar estas limitaciones, la aplicación de algunas técnicas no convencionales como la variación somaclonal (selección *in vitro*), cruzas interespecíficas *in vitro*; hibridación somática; producción *in vitro* de haploides, entre otras, podrían ayudar a incrementar la variabilidad genética, complementando los programas de mejoramiento convencional (Tabares *et al.*, 1991). Sin embargo, la aplicación de estas técnicas es dependiente de protocolos adecuados y reproducibles para la regeneración *in vitro* de plantas; así como de la identificación de genotipos aptos para la regeneración y transformación genética, con el objeto de asegurar la reproducción masiva de los genotipos superiores.

El frijol es considerado como una especie recalcitrante (Malik y Saxena, 1991). El primer informe sobre regeneración de frijol fue hecho en 1976 por Crocomo y colaboradores (Malik y Saxena, 1991), quienes recobraron dos plantas de frijol a partir de un cultivo de callo, en un medio complementado con fitohormonas y extracto de semillas de frijol de composición indefinida. Posteriormente, estos autores observaron estados tempranos de embriogénesis somática en callos cultivados en un medio complementado con 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); mientras que, cuando cultivaron explantes de peciolo con una porción de la lámina en un medio complementado con bencilaminopurina (BAP) (10 µM) obtuvieron brotes en el 60% de los explantes, con un promedio de cuatro brotes por explante.

Diversos tipos de explantes han sido efectivos para la organogénesis directa: cotiledón con una porción del eje embrionario (Franklin *et al.*, 1991); plántulas completas de 10 días de edad (Malik y Saxena, 1992); la sección comprendida entre el hipocótilo y las hojas primarias (Moda-Cirino *et al.*, 1995); y ejes embrionarios inmaduros (Mohamed *et al.*, 1992). Para la organogénesis indirecta ha sido efectivo el explante de pedicelo (Mohamed *et al.*, 1993).

En lo que se refiere al germoplasma empleado en este tipo de estudios, se han utilizado diversos genotipos, en su mayoría líneas puras de baja variabilidad genética, que han mostrado respuestas variables. En este sentido, las evidencias experimentales han mostrado una estrecha relación entre la habilidad de regeneración *in vitro* de las plantas y el genotipo (Moda-Cirino *et al.*, 1995). Lo que indica la necesidad de establecer protocolos específicos para genotipos particulares de alto valor genético y comercial, así como conocer el grado de variación ge-

nética existente en poblaciones de frijol común con diferentes niveles de variabilidad genética y fenotípica.

La presente investigación se condujo con los objetivos de establecer las condiciones *in vitro* para la inducción de organogénesis directa y, al mismo tiempo, caracterizar la capacidad de respuesta (totipotencia) al cultivo *in vitro* de cinco cultivares de frijol.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizaron cuatro diferentes poblaciones nativas sobresalientes, que presentan variabilidad genética para diferentes caracteres, que se denominan P-48, P-20, P-4 y P-31, y la variedad comercial Jamapa. Los cuatro primeros cultivares forman parte del germoplasma parental del Programa de Mejoramiento Genético de Frijol, del Instituto de Recursos Genéticos y Productividad (IREGEP), del Colegio de Postgraduados. Montecillo, México.

Establecimiento del cultivo aséptico

Para la obtención de plántulas donadoras de explantes libres de contaminación se ensayaron tres tratamientos de desinfección. El proceso se inició con el lavado de las semillas en agua jabonosa, después se expusieron a una corriente de agua durante cinco minutos y a continuación se sumergieron en las soluciones desinfectantes evaluadas: 1) NaClO (3% v/v) + Tween-20 (5 gotas) (20 minutos) + bactericida (sales de plata en estado coloidal estable al 0.48%) (20 minutos); 2) NaClO (3% v/v) + Tritón X-100 (5 gotas) (30 minutos) + bactericida (sales de plata en estado coloidal estable al 0.48%) (30 minutos), y 3) NaClO (1.8 % v/v) + Tritón X-100 (5 gotas) (20 minutos) + bactericida (5 gotas) (20 minutos). En seguida, las semillas se enjuagaron cinco veces con agua destilada estéril y se sumergieron en una solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (1% v/v) durante 20 horas, para acelerar la imbibición de la semilla y facilitar la remoción de la testa. Las semillas sin testa se colocaron en cajas magenta (Magenta Corp., Chicago, Ill., USA) que contenían 35 ml del medio básico Murashige y Skoog (1962, MS) complementado con sacarosa (azúcar comercial) (3 % p/v), BAP (4.44 µM) y agar (Merck) (0.6% p/v). Adicionalmente, se evaluaron dos condiciones de incubación: 1) oscuridad total durante cuatro días y luego fotoperíodo de 16 horas, y 2) fotoperíodo de 16 horas. Las variables evaluadas a los 10 días después de la siembra fueron: contaminación, oxidación (pigmentación), germinación y plantas normales y anormales. Los resultados se expresaron como porcentajes.

Una vez establecida la metodología para obtener plántulas sanas, se ensayaron diferentes tipos de explantes: cotiledón con una porción del eje embrionario (Franklin *et al.*, 1991), epicótilo, hipocótilo y peciolo con una porción de la lámina de la hoja primaria. Los cotiledones e hipocótilos se obtuvieron de plántulas en la fases de desarrollo V1 y V2 (CIAT, 1984), mientras que los epicótilos y peciolos se obtuvieron de plántulas en la fase de desarrollo V2. Los explantes se cultivaron en 10 ml de medio modificado M1, constituido por las sales inorgánicas del medio básico de Gamborg *et al.* (1976, B5), la solución orgánica (vitaminas) del medio básico de Murashige y Skoog (1962, MS) complementado con sacarosa (3 % p/v), las fitohormonas bencilaminopurina (BAP) (8.88 µM) y ácido indolacético (AIA) (11.42 µM) y agar (Merck) (0.6% p/v), contenido en frascos de vidrio de 45 mL de capacidad. Veinte días después de la siembra, se evaluó el desarrollo de callo por explante, explantes con brotes (ambos expresados en porcenta-

je), número de brotes por explante y longitud de los brotes (mm).

Para determinar el mejor complemento de fitohormonas se cultivaron cotiledones como explante, en frascos de 45 ml, con 10 ml del medio de cultivo modificado M1 suplementado únicamente con sacarosa (3% p/v) y agar (Merck) (0.6% p/v) y como tratamientos de fitohormonas, la combinación de BAP + AIA (8.88 + 11.42 µM) y seis diferentes concentraciones de BAP (8.88, 26.64, 44.40, 62.15, 79.90 y 97.66 µM). A los 20 días después de la siembra se evaluó la formación de callo por explante, explantes con brotes (ambos expresados en porcentaje), número de brotes por explante y la longitud de brotes (mm).

Estudio histológico

Se fijaron en FAA (alcohol etílico absoluto, ácido acético glacial, formaldehído al 40%, en la proporción 10/1/2 más 7 partes de agua por volumen) (Curtis, 1986) explantes con brotes de cada cultivar durante 72 horas. Después el material vegetal se deshidrató en alcohol y se infiltró en paraplast. Con un micrótomo rotatorio se cortaron secciones de 12 µm de grosor y se montaron en portaobjetos. Los cortes se tiñeron con la tinción diferencial safranina-verde rápido (Johansen, 1940). Las preparaciones se observaron en microscopio de luz blanca.

Análisis estadístico

En cada experimento la unidad experimental estuvo constituida por un frasco de 45 mL con un explante. Los 16 tratamientos resultado de la combinación de los factores desinfección (3), explantes (6) y fitohormonas (7) se distribuyeron bajo un diseño completamente al azar en un arreglo factorial, con 8 repeticiones. Los datos de los diferentes análisis de varianza se realizaron bajo el modelo señalado, el análisis estadístico se hizo mediante análisis de varianza ($p \leq 0.01$ ó 0.05) y las diferencias entre tratamientos se establecieron mediante la prueba de rango múltiple de Duncan ($p \leq 0.01$ ó 0.05).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La contaminación entre tratamientos de desinfección varió de 0 a 20%. El valor más bajo correspondió a los dos tratamientos con hipoclorito de sodio al 3.0%. La pigmentación de las semillas fue de 0 y 8.33%, correspondiendo el porcentaje más alto al tratamiento con NaClO al 3.0% + bactericida + Tritón X-100, y el más bajo al tratamiento con NaClO al 3.0% + bactericida + Tween-20. La germinación de las semillas varió entre tratamientos de asepsia y cultivares. En el primer caso, los valores fluctuaron de 76 a 82%, lo que indica que los tratamientos no afectaron drásticamente la germinación de la semilla (Cuadro1). Entre cultivares la diferencia fue altamente significativa, ya que P-31 presentó la mayor germinación (90%) y P-4 la menor germinación (65%).

Cuando las semillas fueron colocadas bajo fotoperíodo de 16 horas se produjeron plántulas normales con un solo eje, que alcanzaron una longitud promedio de 7 cm a los 8 días después de la siembra. En contraste, cuando las semillas germinaron en condiciones de oscuridad durante 4 días, desarrollaron plántulas en las que las yemas axilares de los cotiledones formaron brotes adventicios múltiples y mostraron crecimiento reducido.

Este tipo de desarrollo de las plántulas coincide, parcialmente, con lo observado por Malik y Saxena (1992), quienes encontraron que cuando las semillas germinan en medio MS complementado con TDZ (tidiazuron)

Cuadro 1. Efecto de tres tratamientos de desinfección de semilla de cinco cultivares de frijol *in vitro* sobre contaminación (%), oxidación (%) y germinación (%).

Tratamiento	Contaminación (%)[+]	Oxidación (%)[+]	Germinación (%)
1	0.00b	0.00b	82.50
2	20.00a	3.33ba	79.16
3	0.00b	8.33a	76.66

[+] Medias con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales, según la prueba de Duncan ($p \leq 0.01$).

(10 µM) o BAP (80 µM), y bajo condiciones de oscuridad, se desarrollan plántulas con brotes surgidos a partir de las yemas axilares de los cotiledones, aunque, los requerimientos de fitohormonas en sus experimentos fueron mayores a los observados en esta investigación (4.4 µM). El desarrollo anormal de las plántulas crecidas en la oscuridad, dificultó la obtención de explantes, principalmente epicótilo y peciolo de hoja primaria, por lo que se optó por la incubación bajo fotoperíodo de 16 h para el desarrollo de plántulas donadoras de explantes.

Cuando la germinación de las semillas ocurrió bajo condiciones de luz no existió variación significativa entre cultivares en la altura de plántula a los 8 días después de siembra, ya que los promedios estuvieron entre 6.9 y 7.3 cm. Sin embargo, se observaron diferencias en el desarrollo de las plántulas de 8 días de edad de P-48, P-4 y P-20, en la etapa de desarrollo V2 (CIAT, 1984), con las hojas primarias completamente desplegadas, mientras que las plántulas del cultivar P-31 y la variedad Jamapa aún no iniciaban el despliegue del primer par de hojas. Estas variaciones se consideran como el resultado de diferencias genotípicas entre los cultivares de *P. vulgaris*.

Se observaron marcadas diferencias en la respuesta morfogénica entre explantes provenientes de plántulas en diferentes etapas de desarrollo. Así, el cotiledón y el hipocótilo obtenidos de plántulas en la etapa de desarrollo V1 solamente produjeron callo. Los explantes disecados de plántulas en la etapa de desarrollo V2 cultivados *in vitro*, únicamente el hipocótilo desarrolló callo y raíces en los dos extremos. Mientras que, el cotiledon, el epicótilo y el peciolo, además de callo, desarrollaron brotes adventicios. En el caso del cotiledón, a los 10 días después de la siembra, en uno o ambos lados del extremo inferior de la yema axilar se observó la formación de pequeñas y suaves protuberancias de color verde claro, que posteriormente se desarrollaron como pequeños brotes, sin previa formación de callo en esta zona. La alta respuesta del cotiledón proveniente de plántulas en la etapa de desarrollo V2 se atribuyó a que la base de la yema cotiledonar, lugar donde se originaron los brotes, es un tejido fisiológicamente más joven y probablemente posee un alto grado de actividad meristemática y, por lo tanto, posee mayor plasticidad para la rediferenciación, en relación con los tejidos de otros explantes. Además, debe considerarse, que en frijol los cotiledones son órganos de almacenamiento de nutrimentos necesarios para la germinación de la semilla y el desarrollo inicial de la plántula y, posiblemente, disponen de mayor cantidad de sustancias orgánicas, principalmente fitohormonas, que son necesarias para los procesos de inducción de brotes adventicios. Este resultado coincide

con lo informado por Franklin *et al.* (1991), quienes observaron el desarrollo de un anillo meristemático alrededor de la base de la yema axilar, que dio origen a brotes adventicios en el cultivar Dark Red Kindney, y con el reporte de Mohamed *et al.* (1992) quienes observaron la formación de múltiples yemas de brotes en ambos lados del explante, cuando éste estuvo constituido por la porción del nudo cotiledonar de plántulas de 3 días de edad, en los cultivares Great Northern y Harris y en las líneas PC 50 y Xan 159.

Los explantes de epicótilo, inicialmente incrementaron su tamaño en longitud y anchura, posteriormente, en los extremos, en el área que no quedó en contacto con el medio de cultivo, se formó una masa de callo friable y oxidada, y los brotes se formaron en uno o ambos extremos del explante, en el lado opuesto a la masa de callo, aunque en la mayoría de los casos se desarrolló un solo brote. En el caso de los explantes de peciolo, estos incrementaron su longitud inicial 1.5 veces y la porción de la hoja aumentó 2 veces su área; además, en la base del corte del peciolo y en las porciones de la hoja que quedaron en contacto con el medio de cultivo se formó callo de consistencia friable y oxidada; en los pocos explantes que formaron brotes, éstos se desarrollaron en el extremo del peciolo opuesto a la lámina de la hoja.

Las diferencias en el porcentaje de explantes con brotes y brotes por explante entre los tipos de explantes fueron altamente significativas ($p \leq 0.01$). El cotiledón obtenido de plántulas de 8 días, fue el tipo de explante con la mejor respuesta en términos de explantes con brotes y brotes por explante, seguido de epicótilo y peciolo; mientras que, el hipocótilo fue incapaz de responder a la inducción de brotes (Cuadro 2).

En lo que respecta al comportamiento de los explantes por cultivar de frijol, el cotiledón mantuvo un alto nivel de respuesta en todos los cultivares: 100% de explantes con brotes en P-20 y P-31; 71% en P-4 y P-48; y 57% en Jamapa. En el explante de epicótilo hubo mayor variación, ya que los porcentajes variaron entre 85% de explantes con brotes en P-48 y 14% en P-4. Los explantes de peciolo que respondieron a la inducción de brotes fueron relativamente pocos y solamente en los cultivares P-31 (28%), P-48 (14%) y Jamapa (28%).

Cuadro 2. Respuesta organogénica en diferentes tipos de explante, en cinco cultivares *de P. vulgaris* L.

Explante (tipo)	Explantes con brotes (%)[+]	Brotes por explante	Longitud de brotes (mm)
Cotiledón[1/]	80.00a	1.00a	1.76
Epicótilo[1/]	45.71b	0.54b	3.87
Peciolo[1/]	14.28c	0.14c	2.83
Cotiledón[2/]	5.71c	0.05c	3.00
Hipocótilo[1/]	0.0 c	0.0 c	-
Hipocótilo[2/]	0.0 c	0.0 c	-

[1/] planta donadora en la etapa V2 del desarrollo.
[2/] planta donadora en la etapa V1 del desarrollo.
[+] Medias con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales, con base en la prueba de Duncan ($p \leq 0.01$).

En relación a los brotes por explante, los cultivares P-48, P-20 y P-31 presentaron igual promedio, 1.14; seguidos por P-4 con 0.85; y la variedad Jamapa con 0.71. En la longitud de los brotes, no se presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$); sin embargo, los explantes de epicótilo produjeron los brotes de mayor longitud (Cuadro 2); mientras que, entre los cultivares los brotes de mayor longitud los produjo la variedad Jamapa (3.7 mm) y los de menor longitud el cultivar P-20 (1.8 mm).

La mejor respuesta a la inducción de brotes se obtuvo con cotiledón proveniente de plántulas de 8 días de edad. Los resultados coinciden parcialmente con los de Franklin *et al.* (1991), quienes utilizaron el cotiledón, obtenido de plántulas de 3 días de edad, del cultivar Dark Red Kidney, y contrastan con lo observado por Malik y Saxena (1991), quienes obtuvieron mejor respuesta organogénica cuando utilizaron peciolo con una porción de la hoja primaria en el cultivar Kinghorn.

Se ha reportado que las leguminosas en general, y las especies de *Phaseolus* en particular, son recalcitrantes y difíciles de regenerar *in vitro* (Malik y Saxena, 1992; Santalla *et al.*, 1998); sin embargo, en esta investigación se presenta una metodología para la inducción de brotes en cinco cultivares de frijol que son progenitores seleccionados a partir de un lote de 55 materiales nativos los cuales son muy heterogéneos y con una amplia variabilidad genética, y que forman parte del programa de mejoramiento a resistencia horizontal para las enfermedades más importantes en la Mixteca de Puebla en México.

Con respecto a las fitohormonas, se observaron diferencias altamente significativas en la respuesta a la inducción de organogénesis ($p \leq 0.01$). Así, el tratamiento testigo (8.88 µM BAP + 11.42 µM AIA) produjo menor porcentaje de explantes con brotes y menor número de brotes por explante (Cuadro 3), además, este tratamiento presentó el inconveniente de mayor producción de callo, el cual cubrió la zona de formación de yemas y, en algunos casos, provocó la muerte de los pequeños brotes. El crecimiento excesivo de callo se atribuyó a la presencia del ácido indolacético (AIA), ya que los tratamientos en los que no se incluyó, la cantidad de callo fue significativamente menor (Cuadro 3). Al respecto, Litz y Jarret (1991) han señalado que en algunas especies la combinación de auxinas y citocininas induce la formación de brotes, mientras que, en otras, esta combinación hormonal estimula el crecimiento y la proliferación de callo. Con base en estas evidencias experimentales fue posible inferir que la concentración endógena de AIA u otra auxina del explante debió ser alta, lo que ocasionó la proliferación de callo; de tal manera que cuando se alcanzó un balance favorable a las citocininas, la proporción de callo disminuyó notablemente y hubo mayor formación de yemas de brotes. Los resultados están acordes con Krikorian (1995), en el sentido de que las citocininas inducen organogénesis en cultivo de tejidos en presencia de auxina y en los casos en que no es necesario el complemento exógeno de auxina para la división celular, se asume que el sistema la está sintetizando.

El porcentaje de explantes con brotes varió entre 48 y 56% en los tratamientos que contenían únicamente BAP en el medio. El número de brotes por explante aumentó al incrementarse la concentración de BAP hasta un máximo de 79.90 µM. Cuando la concentración de BAP se elevó a 97.66 µM hubo una reducción en el número de brotes por explante (Cuadro 3). La tendencia observada podría atribuirse a la toxicidad, producida por un exceso de citocinina en el medio de cultivo.

Como resultado de esta investigación, fue posible establecer que los mejores tratamientos con fitohormonas para la inducción de brotes adventicios incluyeron 62.15 y 79.90 µM de BAP, lo que concuerda con las observaciones de Malik y Saxena (1992) y Moda-Cirino (1995), quienes obtuvieron brotes a partir de plántulas completas y nudos cotiledonares y del primer par de hojas como explantes, respectivamente, en medios complementados con 80 µM de BAP, y contrasta con los informes de Franklin *et al.* (1991) y Mohamed *et al.* (1992) quienes obtuvieron regeneración de frijol, vía organogénesis, en explantes de cotiledón y eje embrionario, cultivados en medios complementados con 15 µM de BAP y 5 µM de AIA + 20 µM de BAP, respectivamente. Es posible que las diferencias en las respuestas a la organogénesis encontradas en la literatura y en esta investigación pudiera ser debidas al tipo de germoplasma empleado en los diferentes estudios, lo que puede ser apoyado por el hecho de la significancia de la interacción cultivar por tratamiento hormonal.

En la respuesta de los cultivares a los tratamientos con fitohormonas se presentaron diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$). P-48, P-20 y P-31 produjeron los mayores porcentajes de explantes con brotes y el mayor número de brotes por explante; mientras que, P-4 y la variedad Jamapa presentaron proporciones menores. Además, la significancia en la interacción cultivar por tratamiento con fitohormonas, indicó que la capacidad de respuesta a la inducción de organogénesis depende de la constitución genética del explante y que su expresión puede ser modulada a través de la manipulación de los niveles fitohormonales (Cuadro 4).

Los coeficientes de correlación lineal entre niveles de fitohormonas y el porcentaje de explantes con brotes y número de brotes por explante fueron bajos (0.29 y 0.25) y no significativos estadísticamente. Conforme se incrementó la concentración de BAP, hubo incremento en el número de brotes por explante, pero este incremento no fue lineal; en la concentración de 79.90 µM de BAP, se presentó la mejor respuesta en cuatro de los cultivares. En cambio, el cultivar P-31 produjo mayor cantidad de brotes cuando se cultivó en medio complementado con 62.15 µM de BAP (Figura 1). Estos resultados muestran diferencias en la respuesta organogénica entre cultivares, y, que las cinco poblaciones de *P. vulgaris* responden mejor a las altas concentraciones de BAP, cuando se utilizan cotiledones como explante. Fue posible separar dos grupos de genotipos, uno integrado por P-48, P-20 y P-31, que mostraron la mayor cantidad de brotes por explante, y otro grupo, conformado por P-4 y Jamapa, con un mínimo número de brotes.

Para establecer las relaciones anatómicas entre el explante y los brotes desarrollados, se hizo un estudio histológico que mostró que los brotes se originaron directamente de áreas meristemáticas formadas *de novo*, en la parte inferior de la yema axilar del cotiledón, a partir de tejido subepidermal sin la formación de callo (Figura 2). Estas áreas estuvieron conformadas por células pequeñas, con citoplasma denso y núcleos grandes, como han sido descritos los meristemoides por Thorpe (1981) y Litz y Jarret (1991). En los brotes recién formados, se desarrollaron brotes secundarios a partir de centros de células con división activa. Estas observaciones mostraron el carácter exógeno de los brotes, como lo llama Esau (1982), porque la diferenciación de yemas adventicias ocurre a partir de capas de células periféricas.

En la Figura 3 se presentan estados de desarrollo de los brotes adventicios de frijol. A. Etapa inicial y B. Primordios foliares y apices a los 20 días.

Cuadro 3. Efecto de siete tratamientos BAP y AIA sobre la inducción de organogénesis *in vitro*, en cinco cultivares de *Phaseolus vulgaris* L.

BAP y AIA (µM)	Callo (%)+	Explantes con brotes (%)+	Brotes por explante	Longitud (mm)+
8.88	96.50 a	48.00 a	1.10 c	5.51 bc
26.64	88.61 b	56.43 a	1.13 bc	7.83 a
44.40	60.10 c	56.56 a	1.77 abc	5.52 bc
62.15	47.75 d	53.00 a	1.99 ab	4.51 bc
79.90	46.25 d	56.00 a	2.24 a	5.31 bc
97.66	46.75 d	50.00 a	1.50 abc	4.18 c
8.88 + 11.42	100.0 a	22.00 b	0.34 d	6.25 ab

+ Medias con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales, según prueba de Duncan (p=0.01).

Cuadro 4. Respuesta a la inducción de organogénesis *in vitro*, en cinco cultivares de *Phaseolus. vulgaris* L.

Cultivar	Callo (%)+	Explantes con brotes (%)+	Brotes por explante	Longitud (mm)+
P-48	72.50 a	77.14 a	3.41 a	5.68 ab
P-20	72.85 a	75.71 ab	2.40 a	5.41 ab
P-31	69.64 a	80.00 a	3.05 a	4.58 b
P-4	69.82 a	45.00 b	0.85 b	6.66 a
Jamapa	62.50 b	35.00 b	0.75 b	5.75 ab

+ Medias con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales, prueba de Duncan (alpha $\leq$0.01).

CONCLUSIONES

Los resultados de esta investigación permiten concluir que fue posible definir un método de desinfección para el establecimiento del cultivo aséptico apropiado para reducir al mínimo la contaminación (20 %).

Fue posible desarrollar un medio de cultivo básico para la inducción de brotes en frijol constituido por sales inorgánicas del medio de Gamborg *et al.* (1976) suplementado con los compuestos orgánicos del medio de Murashige y Skoog (1962) y adicionado con sacarosa (azúcar comercial) (3 %), bencilaminopurina (79.90 µM) y agar (6.6 %).

Se determinó que el cotiledón fue el mejor explante para la formación de brotes adventicios *in vitro*, vía organogénesis directa, también, que las diferencias entre genotipos

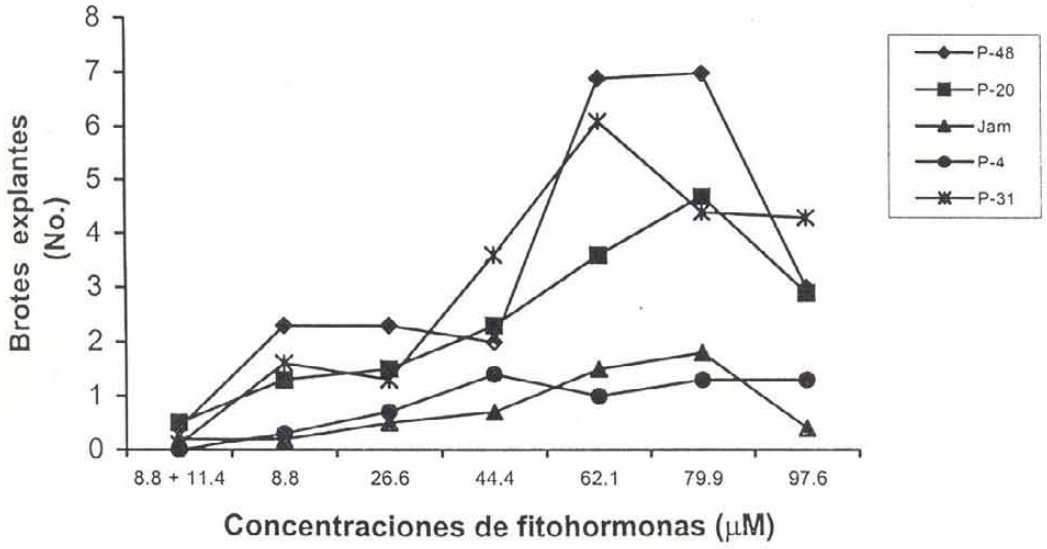


Figura 1. Número de brotes por explante por cultivar de frijol cultivado *in vitro,* en diferentes concentraciones de BAP (8.8-97.6 μM) de BAP + AIA (8.8+11.4 μM).

en la habilidad de la inducción de brotes adventicios vía organogénesis directa fueron altamente significativas ($p \leq 0.01$), lo que muestra la existencia de variabilidad genética para esta característica.

Los brotes obtenidos en esta investigación fueron formaciones *de novo* y se desarrollaron a partir de áreas meristemáticas generadas en la base de la yema axilar del cotiledón.

BIBLIOGRAFÍA

Beebe, S. E., and M. Pastor Corrales. 1991. Breeding for disease resistance. *In:* Common beans, research for crop improvement. Van Schoonhoven, A. and O. Voysest (eds.). CIAT, Colombia. pp 561-610.

CIAT. 1984. Morfología de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colombia.

Curtis, P. J. 1986. Microtécnia Vegetal. Trillas, México. 106 p.

Esau, K. 1982. Anatomía de las plantas con semilla. Ed. Hemisferio Sur, Argentina. 512 p.

Franklin, Ch. I., T. N. Trieu, R. A. Gonzales, and R. A. Dixon. 1991. Plant regeneration from seedling explants of green bean (*Phaseolus vulgaris* L.) via organogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 24: 199-206.

Gamborg, O. L, T. Murashige, T. A. Thorpe, and I. K. Vasil. 1976. Plant tissue culture media. *In vitro* 12(7):473-478.

Johansen, D. A. 1940. Plant Microtechnique. McGraw Hill, New York. 503 p.

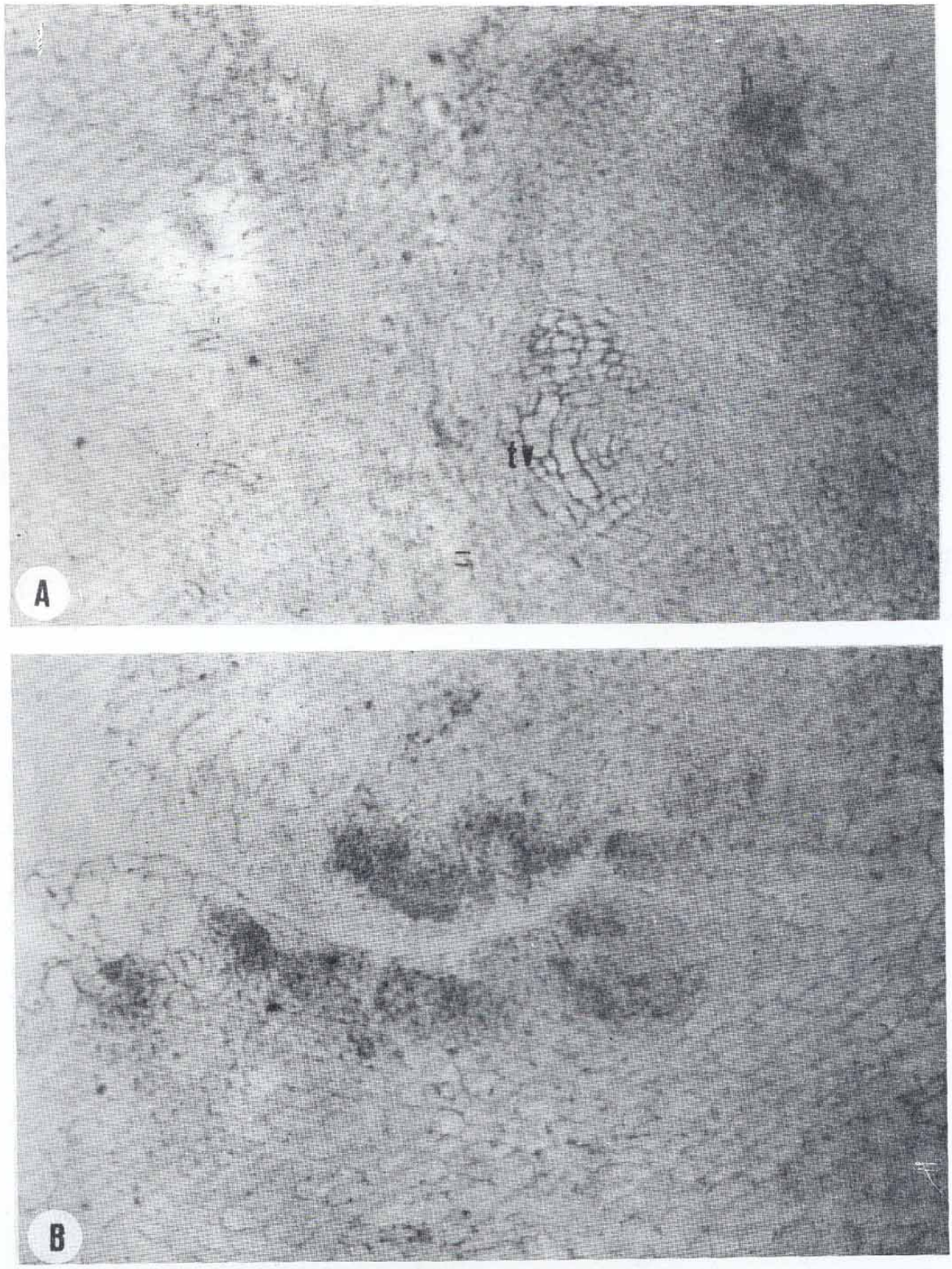


Figura 2. Origen de los brotes regenerados a partir de cotiledones cultivados *in vitro* de frijol. A. Fotomicrografía de corte transversal; nótese la iniciación de la yema del brote (b) a partir de tejido subepidérmico y la ausencia de conexión con el tejido vascular (ty). B. Fotomicrografía de región transversal nótese la iniciación de yemas de brotes.

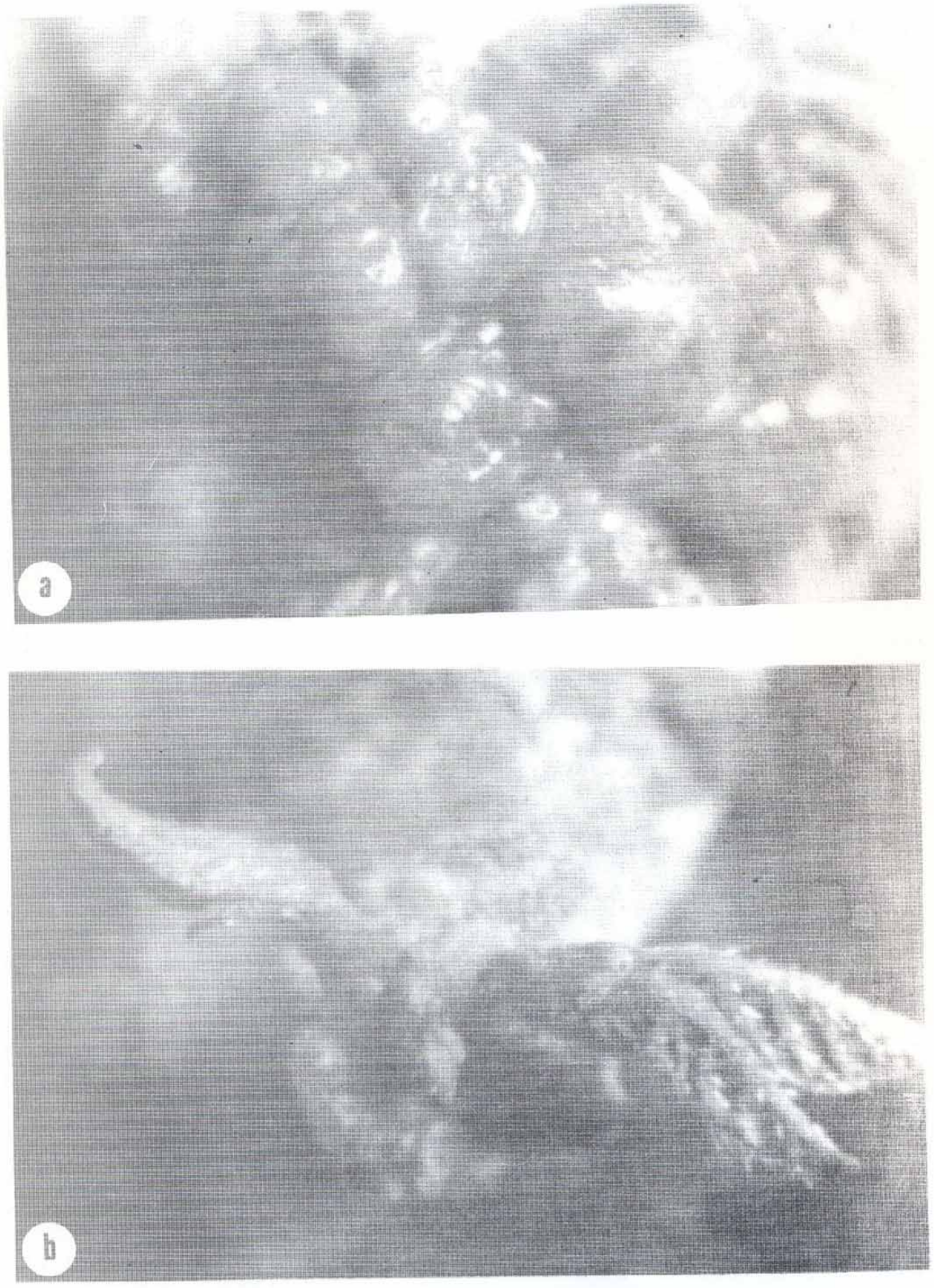


Figura 3. Diferentes estados de desarrollo de los brotes adventicios de frijol *in vitro*. a. Etapa inicial y b. Primordios foliares y ápices a los 20 días.

Krikorian, A. D. 1995. Hormones in tissue culture and micropropagation. *In*: Plant hormones, physiology, biochemistry and molecular biology. Davies, P. J. (ed.). Kluwer Academic Plublishers, Netherlands. 797 p.

Litz, R. E. y R. L. Jarret. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. *In:* Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicación. Roca, W. M. y L. A. Mroginski (ed) CIAT, Colombia. pp 143-172.

Malik, K. A., and P. K. Saxena. 1991. Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L. promotive role of N^6-benzylaminopurine in cultures from juvenile leaves. Planta 184:148-150.

Malik, K. A., and P. K. Saxena. 1992. Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L.: high-frequency induction of direct shoot formation in intact seedlings by N^6-benzylaminopurine and thidiazuron. Planta 186: 384-389.

Moda-Cirino, V., C. Nicolodi, G. Chichiricco, and D. Mariotti. 1995. *In vitro* meristematic organogenesis and plant regeneration in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. J. Genet. & Breed. 49:133-138.

Mohamed, F. M., D. P. Coyne, and P. E. Read. 1992. Plant regeneration from *in vitro* culture of embryonic axis explants in common and tepary beans. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 117: 332-336.

Mohamed, F. M., D. P. Coyne, and P. E. Read. 1993. Shoot organogenesis in callus induced form pedicel explants of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). J. Amer. Soc. Hort. Sci. 118: 158-162.

Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Santalla, M., J. B. Power, and Mr. Davey. 1998. Efficient *in vitro* shoot regeneration responses of *Phaseolus vulgaris* and *P. coocineus*. Euphytica 102:195-202.

Singh, S. P. 1991. Bean genetics. *In:* Common beans, research for crop improvement. Van Schoonhoven, A. and O. Voysest (eds.). CIAT, Colombia. pp 199-249.

Tabares, E., J. Pachón y W. M. Roca. 1991. Variación somaclonal y su aplicación al mejoramiento de cultivos. *In*: Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Roca, W. M. y L. A. Mroginski (eds.). CIAT, Colombia. pp 339-360.

Thorpe, T. A. 1981. Plant tissue culture, methods and applications in agriculture. Ed. Academic Press. New York. 379 p.