

DETERMINACION DE LA CAPACIDAD DE INDUCCION DE CALLO DE DOS VARIEDADES DE FRIJOL *Phaseolus vulgaris* L. EN DOS MEDIOS DE CULTIVO

Jorge Madriz Muñoz, Rodrigo Alfaro y Bernal Valverde

Escuela de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional
86-3000 Heredia, Costa Rica

RESUMEN

Se estudió la capacidad de formación de callo de cotiledones, epicótilos y hojas de las variedades de frijol Huasteco y Huetar cultivados en los medios F_j y PC-L2. Los tres tipos de explantes en la variedad Huasteco produjeron callos en los dos medios de cultivo utilizados. En el caso de la variedad Huetar, los tres explantes produjeron callos cuando se cultivaron en el medio PC-L2, pero en el medio F_j solamente se indujo callo a partir de explante de cotiledón de esta variedad. El mayor índice de crecimiento relativo (ICR) acumulado para los tres tipos de explantes, se observó al final de la primera y la segunda semana de crecimiento. Al finalizar la tercera semana este parámetro varió entre explantes, variedades y medios de cultivo, mostrando una tendencia a decrecer durante la cuarta semana.

ABSTRACT

The cotyledon, epicotyl and leaf callogenesis capacity was studied on the bean commercial varieties Huasteco and Huetar cultivated on F_j and PC-L2 media. The three explant types from the cultivar Huasteco formed callus on both tested media. The Huetar explants formed callus only on the PC-L2 medium; however, the cotyledon explant formed callus on F_j medium. The highest accumulated relative growth index was observed at the end of the first and second week. One week later (end of third week), this parameter varied among explants, cultivars and culture media, showing a decreasing tendency at the fourth week.

INTRODUCCION

Se estima que el 30% de la producción mundial del género *Phaseolus* proviene de América Latina, donde la demanda de este grano es aproximadamente de 14,3 kg. per cápita por año (PINCHINAT 1980 y VOYSEST 1983). En Costa Rica el frijol constituye la principal fuente de proteína para la población de menores recursos económicos (ALFARO 1983).

La demanda por una mayor cantidad y calidad de proteínas alimenticias, obliga a los fitomejoradores de los países en vías de desarrollo a redoblar esfuerzos para seleccionar variedades de frijol con amplia adaptabilidad y resistencia parcial a enfermedades, y que a su vez requieran de una cantidad mínima de insumos. Sin embargo, la transferencia de estas características deseables a las variedades comerciales no es tarea fácil, porque el proceso de mejoramiento está limitado por la variabilidad genética disponible en las poblaciones y por la complejidad de las interacciones genético-ambientales que limitan la selección de materiales segregantes.

Una opción para aumentar la diversidad genética en los programas de fitomejoramiento, es aprovechar la variación genética de plantas regeneradas *in vitro* que puede ser estable y ser transmitida a la descendencia (variación «somaclonal», LARKIN y SCOWCORFT 1981).

La aplicación de la técnica del cultivo de tejidos en el mejoramiento genético, abre la posibilidad de acelerar la transferencia de caracteres

interespecíficos deseables, tales como resistencia parcial a algunas enfermedades. Sin embargo, este método está limitado por la dificultad de regeneración de plantas del género *Phaseolus* (JACOBSEN y KYSELY 1984 y FRANKLIN *et al.* 1991). El primer paso para resolver este problema es definir en primera instancia las condiciones nutricionales más apropiadas (medio de cultivo), los tejidos en capacidad de diferenciación (tipo de explante) y la capacidad inicial de formación de callos, y si además, esta capacidad se ve influenciada por el genotipo del cultivar donante (MIKAMI y KINOSHITA 1988).

Este trabajo tiene como objetivo general evaluar la capacidad de inducción de callos de las variedades de frijol Huasteco y Huetar, utilizando tres tipos de explantes: segmentos de tallo, hoja y cotiledones en dos medios de cultivo: F_j y PC-L2.

MATERIAL Y METODOS

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad Nacional.

Se probaron dos medios de cultivo (PC-L2 y F_j), así como tres tipos de explante (cotiledón, epicótilos y hojas) de dos variedades (Huasteco y Huetar) de frijol común. La semilla genética de ambas variedades se obtuvo en la Estación Experimental «Enrique Jiménez Núñez» y fue cosechada en el mismo ciclo de siembra. La selección de ambas variedades se fundamentó en que ambos gozan de amplia aceptación entre los productores debido a su precocidad, color del grano, producción y tolerancia a las principales enfermedades prevalentes en las zonas productoras.

Medios de cultivo. La composición de los medios de cultivo utilizados en la investigación se muestra en el cuadro 1 (PHILLIPS y COLLINS 1979, International Rice Research Institute [datos no publicados]).

Tipo de explante. Para el experimento se utilizaron tres tipos de explante: cotiledón, epicótilo y hoja; la escogencia estuvo basada en los resultados previos reportados en la literatura para otras experiencias *in vitro* con especies del género *Phaseolus* (SAUNDERS *et al.* 1987, MOK y MOK 1977)

Cotiledón. 200 semillas de cada variedad se embrieron en agua destilada por seis horas. Pasado ese período, las semillas se lavaron con agua durante 30 minutos y se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaClO) al 1,5% (v/v) durante 15 minutos en una cámara de flujo laminar. Seguidamente se procedió a llevar a cabo tres lavados consecutivos con agua destilada estéril y en condiciones asépticas se eliminó la testa y se extrajeron los cotiledones a cada semilla. Cada cotiledón se colocó individualmente en un recipiente de vidrio (Baby food Jar SIGMA V 8630 Saint Louis, Missouri, USA) con 10 ml. del medio PC-L2 o F_j. Cada recipiente fue previamente esterilizado en una autoclave a 1,07 kg/cm² de presión por 25 minutos, enfriado y pesado al centígramo.

Después de colocar los cotiledones sobre el medio de cultivo, se pesaron los frascos para obtener por diferencia el peso inicial del explante. Los explantes se cultivaron por 30 días en la oscuridad y a una temperatura de 27 ± 1°C. Cada semana se registró el peso de cada uno de los frascos.

Epicótilos y hojas. En condiciones de invernadero se sembraron 200 semillas de las variedades Huasteco y Huetar en la Estación Experimental Santa Lucía. A los quince días, se tomaron segmentos de epicótilo de 1 cm. de largo a partir del punto de inserción de los cotiledones y un disco de 5 mm. de diámetro del folíolo central de la primera hoja verdadera. Los explantes de hoja y tallo se lavaron con agua corriente por 30 minutos y se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaClO) al 1,5% (v/v) en condiciones asépticas por 8 minutos. Posteriormente cada explante se colocó en un frasco con el correspondiente medio de cultivo (F_j o PC-L2) previamente esterilizado. Cada disco foliar fue colocado con el envés en contacto con el medio, mientras que el segmento de epicótilo, se colocó en el medio de cultivo conservando la polaridad de las estructuras vegetativas.

Antes y después de colocar el explante, cada frasco fue tapado y pesado en una balanza analítica para obtener por diferencia el peso inicial del explante. La pérdida de peso debido a deshidratación del medio se determinó colocando 40 frascos sin explantes bajo las mismas condiciones de crecimiento. Estos frascos se distribuyeron en un diseño irrestricto al azar con cuatro repeticiones de 10

Cuadro 1.
Composición química de los medios de cultivo utilizados
en la inducción de callo de frijol (*Phaseolus vulgaris*)

COMPONENTE	Medio de cultivo ^(a)			
	PC-L2			F _j
NH ₄ NO ₃	1.000 mg	12,5 µM*	—	—
KNO ₃	2.100 mg	20,8 µM	3.150 mg	31,20 µM
MgSO ₄ .7H ₂ O	435 mg	1,8 µM	185 mg	0,77 µM
MnSO ₄ .4H ₂ O	15 mg	90 µM	22,3 mg	133,8 µM
ZnSO ₄ .7H ₂ O	5 mg	17,5 µM	10 mg	35 µM
(NH ₄) ₂ SO ₄	—	—	220 mg	2,91 µM
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,1 mg	0,4 µM	0,025 mg	0,1 µM
KH ₂ PO ₄	325 mg	2,4 µM	540 mg	3,99 µM
KI	1 mg	6 µM	1 mg	6 µM
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,1 mg	0,4 µM	0,025 mg	0,1 µM
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,4 mg	0,6 µM	0,25 mg	0,38 µM
H ₃ BO ₃	5 mg	82 µM	6 mg	98,40 µM
CaCl ₂ .2H ₂ O	600 mg	4,1 µM	150 mg	1,3 µM
FeSO ₄ .7H ₂ O EDTA	25 mg	0,09 µM	27,85 mg	0,1 µM
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	85 mg	0,6 µM	—	—
Na ₂ EDTA	—	—	37,25 mg	1,37 µM
Acido nicotínico	—	—	2 mg	0,02 µM
Glicina	—	—	2 mg	0,01 µM
Tiamina-HCl	2 mg	6 µM	2 mg	6 µM
Piridoxina-HCl	0,5 mg	2,5 µM	—	—
2,4-D	—	—	0,5 mg	2,26 µM
BAP	0,1 mg	0,5 µM	—	—
ANA	—	—	2,5 mg	13,43 µM
Kinetina	—	—	0,5 mg	2,32 µM
Mioinositol	250 mg	1,4 mM	100 mg	0,56 mM
Sacarosa	25.000 mg	73 mM	40.000 mg	116,8 mM
Agar	8.000 mg	—	8.000 mg	—
Picloram	0,06 mg	0,25 µM	—	—
Hidrolizado de caseína	—	—	500 mg	—

(a) = Cantidades por litro, *µM = Micromoles, 2,4-D= Acido 2,4-diclorofenoxiacético, BAP= Bencilaminopurina, ANA= Acido naftalenacético

unidades cada una. De este tratamiento control se anotó semanalmente el peso de cada frasco y con el valor medio obtenido se determinó la pérdida de humedad por diferencia con el peso de cada frasco con explante.

Diseño experimental y tratamientos. Para analizar el experimento se utilizó un arreglo factorial

2x3x2 en un diseño irrestricto al azar con cuatro repeticiones. Se probaron doce tratamientos: dos cultivares, tres tipos de explantes y dos medios de cultivo.

Cada repetición estuvo formada por 50 frascos con un explante cada uno. Debido a la presencia inicial de contaminación por hongos y bacterias, se

redujo el número de frascos a 20 para cada tratamiento y en cada repetición.

Durante cuatro semanas, se determinó el peso fresco de callo (peso total del callo - peso inicial del explante). Para establecer la ganancia relativa semanal promedio de peso, se determinó el índice de crecimiento relativo acumulado de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$ICR = \sum \frac{\ln P_2 - \ln P_1}{T_2 - T_1}$$

Donde:

ICR = Índice de crecimiento relativo ($g \cdot g^{-1}$)*semana⁻¹

ln = Logaritmo natural (Neperiano)

P₂ = Peso final (g)

P₁ = Peso inicial (g)

T₂ = Tiempo final (semanas)

T₁ = Tiempo inicial (semanas)

Finalmente se realizó un análisis de varianza de los resultados obtenidos y una comparación de medias utilizando la prueba de DMS (Diferencias Mínimas Significativas) protegida por FISHER.

RESULTADOS Y DISCUSION

Peso acumulado de callo

El análisis de varianza para la variable peso total acumulado del callo que se muestra en el cuadro 2 indica que este parámetro fue afectado por los factores variedad y explante, no así por el medio de cultivo, ni por las interacciones entre estos tres factores.

La prueba de separación de medias (DMS) encontró diferencias entre variedades, indicando una ventaja significativa entre las variedades Huetar y Huasteco en relación con la ganancia de peso de callo al cabo de cuatro semanas de crecimiento.

Como puede observarse en el cuadro 3, el medio PC-L2 indujo la iniciación de callos en todos los explantes de las dos variedades utilizadas. Esta respuesta concuerda con los resultados encontrados por MOK y MOK (1977), quienes indicaron que dependiendo de la concentración utilizada, la hormona sintética picloram (ácido 4-amino 3,5,6-tricloropicolínico) mostró un efecto positivo en la tasa de iniciación, crecimiento y peso final del callo en algunos genotipos de *Phaseolus*.

Cuadro 2.
Análisis de varianza para la variable peso final de callo.

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>Fc</i>
Tratamientos	11	14,534		
variedades = A	1	1,574	1,574	5,409*
explantes = B	2	9,852	4,926	16,928**
medios = C	1	0,891	0,891	3,062
A x B	2	0,714	0,371	1,275
A x C	1	0,385	0,385	0,132
B x C	2	0,371	0,186	0,639
A x B x C	2	0,747	0,374	1,285
Error	36	1,047	0,291	
Total	47	15,581		

* P ≤ 0,05, ** P ≤ 0,01

Cuadro 3.

Peso acumulado (g) de callos de las variedades Huasteco y Huetar, al cabo de cuatro semanas de crecimiento (promedio de cuatro repeticiones)

Medio	Explante	Huasteco	Huetar
		Peso del callo	
F _j	cotiledón	1,518 a	0,698 b
	epicótilo	0,861 b	—
	hoja	0,146 d	—
PC-L2	cotiledón	0,776 b	0,695 b
	epicótilo	0,443 c	0,089 d
	hoja	0,003 d	0,013 d

Valores con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Duncan al 5%.

Por otro lado, el medio F_j indujo formación de callo en los tres tipos de explante de la variedad Huasteco pero solamente en cotiledones de Huetar. Trabajos realizados con otras especies indican que la respuesta de los diferentes tipos de explante a la inducción de callos está dada por las diferencias fisiológicas entre ellos (MIKAMI y KINOSHITA 1988).

Una respuesta diferencial al 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) en cultivares de *Phaseolus* para la formación de callos también fue informada por MOK y MOK (1977), quienes indicaron que podría deberse a variaciones genotípicas de esos cultivares. Otros autores han indicado que la inclusión de ácido nicotínico y altos niveles de azúcares en el medio de cultivo, inhibe el crecimiento de callos en algunas leguminosas (PHILLIPS y COLLINS 1979).

Índice de Crecimiento Relativo (ICR) acumulado

Cotiledón. Aunque el análisis estadístico no encontró diferencias significativas en el ICR acumulado de ambas variedades en los dos medios de cultivo, durante el período de estudio, la figura 1A muestra que el material Huasteco presenta un mayor ICR acumulado que Huetar en el medio F_j, lo

que parece indicar una especificidad de este material genético para producir biomasa más eficientemente en ese medio de cultivo.

Estos resultados también indican que cuando se utiliza este tipo de explante, la variedad Huetar también presenta una buena respuesta en el medio de cultivo PC-L2. En este medio la variedad Huetar mostró un ICR acumulado mayor y de manera sostenida que la variedad Huasteco, durante las cuatro semanas del experimento, aunque siempre ligeramente inferior que cuando estos explantes se siembran sobre el medio F_j.

Durante la tercera y la cuarta semana de cultivo, los callos de ambos cultivares en los dos medios presentan un decrecimiento del ICR acumulado, posiblemente debido a muerte celular, deshidratación acelerada del medio de cultivo y del explante original (DOODS y ROBERTS 1986).

Epicótilos. Para este tipo de explante no se encontró diferencias significativas en el ICR entre las dos variedades durante las dos primeras semanas, sin embargo, después de ese tiempo, el epicótilo de la variedad Huasteco mostró un mayor ICR acumulado sobre el medio F_j que en el medio PC-L2 (figura 1B).

Después de la segunda semana, la variedad Huasteco en el medio F_j llega a alcanzar un ICR acumulado negativo, mientras que Huasteco sobre el medio PC-L2 también disminuye pero a partir de la tercera semana, indicando que por unos días más, y a diferencia de Huasteco en el medio F_j, esta variedad presenta crecimiento celular.

Por otra parte, la variedad Huetar presenta un ICR acumulado positivo solamente sobre el medio PC-L2, pero aún menor que Huasteco en F_j, lo que indica que esta variedad presenta una mejor respuesta a esta variable.

Los resultados encontrados en este tipo de explante, indican que la máxima ganancia en biomasa se da en las tres primeras semanas de crecimiento, y que aparentemente hay una respuesta diferencial del genotipo, al medio de cultivo y las condiciones fisiológicas del explante, debido tal vez a diferencias genéticas de los materiales utili-

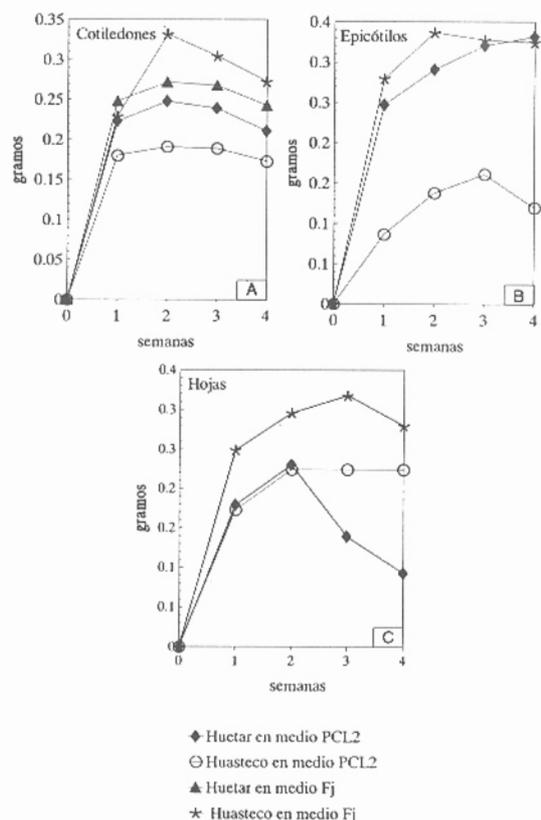


Figura 1. Crecimiento de explantes de las variedades de frijol «Huasteco» y «Huetar» en los medios de cultivo Fj y PC-L2. A: explantes de cotiledón, B: explantes de epicótilos, C: explantes de hojas.

zados, tal y como indican MIKAMI y KINOSHITA (1988).

Hojas. Cuando los explantes de hoja de Huasteco y Huetar son cultivados en el medio PC-L2, no se observaron diferencias significativas durante la primera y la segunda semana de crecimiento. El ICR acumulado para el explante de hojas que se muestra en la figura 1C, presenta una tendencia similar a la de los otros explantes, siendo ligeramente más eficiente el cultivar Huasteco cultivado sobre el medio Fj.

Al finalizar la tercera semana de crecimiento, las dos variedades muestran un comportamiento

diferente: la variedad Huetar en el medio PC-L2 presentó un brusco descenso en el ICR acumulado, probablemente debido a la incapacidad del explante para sobrevivir en este medio, mientras que la variedad Huasteco en PC-L2 permanece estable con un ICR acumulado de cero (es decir, no hubo ni pérdida ni ganancia de peso), pero manteniendo una tendencia de crecimiento positiva cuando se cultiva en el medio Fj. Las variedades Huasteco y Huetar al finalizar la cuarta semana de crecimiento presentan valores del ICR acumulado negativos, siendo más pronunciado en Huetar sobre PC-L2, mientras que Huasteco en este mismo medio permanece con un ICR acumulado de cero.

El suministro de la auxina picloram en el medio PC-L2 podría explicar la respuesta encontrada para ambas variedades sobre este medio de cultivo, ya que esta es capaz de inducir la formación de callos en todos los explantes utilizados. Asimismo, WERNICKE *et al.* (1986) indican que en hojas de trigo (*Triticum aestivum*) la concentración de 2,4-D para iniciar crecimiento depende del estado de desarrollo del explante inicial.

A pesar de que no hubo diferencias significativas para la interacción genotipo por medio de cultivo, los resultados parecen confirmar observaciones previas de otros autores, que indican que existe una respuesta diferencial de los genotipos a los diversos medios de cultivo y tipo de explante.

Los tres tipos de explantes de la variedad Huasteco fueron capaces de inducir callos cuando fueron cultivados sobre los dos medios de cultivo probados, mientras que en la variedad Huetar solo el cotiledón produjo callo en los dos medios utilizados, por lo que dependiendo del tipo de explante usado, ambos medios fueron igualmente efectivos en la inducción de callo.

A pesar de que no hubo diferencias significativas en el comportamiento del ICR acumulado durante el experimento para los tres explantes utilizados, se recomienda realizar las transferencias de los callos a otro medio que promueva la proliferación y/o diferenciación, a más tardar dos semanas después de sembrar el explante.

Finalmente, se sugiere continuar el trabajo,

para determinar el tipo de callo formado a partir de los diferentes explantes y medios de cultivo, la capacidad de organogénesis o embriogénesis de dichos callos y la capacidad de regeneración de los mismos, para así obtener una metodología que por último permita la implementación de las técnicas *in vitro* como un complemento a los métodos tradicionales de mejoramiento genético de *Phaseolus vulgaris*.

REFERENCIAS

- Alfaro, R. 1983. El cultivo del frijol. Ed. CAFESA, San José, Costa Rica. 100 pp.
- Doods, J.H. y L.W. Roberts. 1986. Experiments in plant tissue culture. 2nd ed. Cambridge University Press. U.S.A. 232 pp.
- Franklin, C.I., R.A. González y R. Nixon. 1991. Plant regeneration from seedling explants on green beans *Phaseolus vulgaris* via organogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 24:199-206.
- Jacobsen, H. y W. Kysely. 1984. Induction of somatic embryos in pea *Pisum sativum* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 3:319-324.
- Larkin, P. y W. Scowcroft. 1981. Somaclonal variation. A novel source of genetic variability from improvement. *Theor. Appl. Genetics* 60:197-214.
- Mikami, T. y T. Kinoshita. 1988. Genotypic effects on the callus formation from different explants of rice, *Oryza sativa* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 12:311-314.
- Mok, M.C. y D.W. Mok. 1977. Genotypic responses to auxins in tissue cultures of *Phaseolus*. *Physiologia Plantarum* 40:261-264.
- Phillips, G.S. y G.B. Collins. 1979. *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. *Crop Science* 19:59-64.
- Pinchinat, A. 1980. Mejoramiento genético del frijol seco *Phaseolus vulgaris*. IICA/CATIE. Curso de Agricultura Tropical-Cultivos Anuales. Turrialba, Costa Rica. 44 pp.
- Saunders, J.W., G.F. Hosfield y A. Levy. 1987. Morphogenetic effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on pinto bean *Phaseolus vulgaris* L. leaf explants *in vitro*. *Plant Cell Reports* 6:46-49.
- Voyses, O. 1983. Variedades de frijol en América Latina y su origen. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia. 87 pp.
- Wernicke, W., J.G. Gorst y L. Milkovits. 1986. The ambiguous role of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in wheat tissue culture. *Physiol. plantarum* 68:597-602.