

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA
I DEL MEDI NATURAL

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Regeneración de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. mediante cultivo *in vitro*

Trabajo final de grado

Autora: Marta Tormos Bou

Tutores: Alejandro Atarés Huerta

Vicente Moreno Ferrero

Directora experimental: Marybel Jáquez Gutiérrez

Localidad y fecha: Valencia, julio de 2021



TÍTULO:

Regeneración de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. mediante cultivo *in vitro*

RESUMEN:

La judía es la leguminosa de grano más consumida a nivel mundial, tiene muchos nutrientes y un alto contenido en proteínas por lo que es muy consumida en regiones donde el acceso a la carne es limitado. Además, son bajas en grasas y tienen un elevado contenido en fibra. Uno de los principales problemas a los que se enfrenta el cultivo de la judía común es la resistencia a diversos tipos de estreses abióticos y la sensibilidad a enfermedades y plagas. Para resolver estos problemas las técnicas de mejora clásica se pueden complementar con métodos de mejora biotecnológica como las técnicas de cultivo *in vitro*. El cultivo *in vitro* comprende numerosas aplicaciones biotecnológicas como la micropropagación vegetativa, la mejora sanitaria del material vegetal o la mejora genética con técnicas como la variación somaclonal, hibridación interespecífica y cultivo de gametos. La regeneración *in vitro* se puede llevar a cabo mediante dos vías, la organogénesis y la embriogénesis somática. El objetivo central de este proyecto consiste en estudiar la influencia de diversos factores (ej. tipo de explante, medio de cultivo y condiciones de incubación) sobre la regeneración axilar y la inducción de organogénesis adventicia o embriogénesis somática en distintas accesiones de *Phaseolus vulgaris* L. para, en un futuro, poder abordar programas de mejora basados en la inducción de variabilidad genética intraespecífica (i.e. variación somaclonal) o la transformación genética.

PALABRAS CLAVE

Judía – *Phaseolus vulgaris* L. – Regeneración axilar – Organogénesis adventicia – Embriogénesis somática - Cultivo *in vitro*

TIPO DE LICENCIA DE AUTORIZACIÓN DE ACCESO Y DIFUSIÓN DEL TFG:

Creative Commons: Reconocimiento – No Comercial (by-nc)

TITLE:

Regeneration of *Phaseolus vulgaris* L. plants by *tissue* culture

SUMMARY:

The bean is the most consumed grain legume worldwide, it has many nutrients and a high protein content, which is why it is widely consumed in regions where access to meat is limited. In addition, they are low in fat and have a high fiber content. One of the main problems facing the cultivation of common bean is resistance to various types of abiotic stresses and sensitivity to diseases and pests. To solve these problems, classical improvement techniques can be complemented with biotechnological improvement methods such as *tissue* culture techniques. *Tissue* culture includes many biotechnological applications such as vegetative micropropagation, the sanitary improvement of plant material or genetic improvement with techniques such as somaclonal variation, interspecific hybridization and gamete culture. *Tissue* regeneration can be carried out by two pathways, organogenesis and somatic embryogenesis. The aim of this project is to study the influence of various factors (e.g. type of explant, culture medium and incubation conditions) on axillary regeneration and the induction of adventitious organogenesis or somatic embryogenesis in different accessions of *Phaseolus vulgaris* L., in order to be able to tackle improvement programs based on the induction of intraspecific genetic variability (i.e. somaclonal variation) or genetic transformation, in the future.

KEYWORDS:

Bean – *Phaseolus vulgaris* L. – Axillary regeneration – Adventitious organogenesis – Somatic embryogenesis – Plant *tissue* culture

TITOL:

Regeneració de plantes de *Phaseolus vulgaris* L. mitjançant cultiu *in vitro*

RESUM:

El fesol és la lleguminosa de gra més consumida a escala mundial, té molts nutrients i un alt contingut en proteïnes pel que és molt consumida a regions on l'accés a la carn és limitat. A més, són baixes en greixos i tenen un elevat contingut en fibra. Un dels principals problemes als quals s'enfronta el cultiu del fesol comú és la resistència a diversos tipus d'estressos abiòtics i la sensibilitat a malalties i plagues. Per resoldre aquests problemes les tècniques de millora clàssica es poden complementar amb mètodes de millora biotecnològica com les tècniques de cultiu *in vitro*. El cultiu *in vitro* comprèn nombroses aplicacions biotecnològiques com la micropropagació vegetativa, la millora sanitària del material vegetal o la millora genètica amb tècniques com la variació somaclonal, la hibridació interespecífica i el cultiu de gàmetes. La regeneració *in vitro* es pot dur a terme mitjançant dues vies, l'organogènesi i l'embriogènesi somàtica. L'objectiu central d'aquest projecte consisteix a estudiar la influència de diversos factors (ex. Tipus d'explantament, medi de cultiu i condicions d'incubació) sobre la regeneració axil·lar i la inducció d'organogènesi adventícia o embriogènesi somàtica en diferents accessions de *Phaseolus vulgaris* L. per, en un futur, poder abordar programes de millora basats en la inducció de variabilitat genètica intraespecífica (i.e. variació somaclonal) o la transformació genètica.

PARAULES CLAU:

Fesol – *Phaseolus vulgaris* L. – Regeneració axil·lar – Organogènesi adventícia – Embriogènesi somàtica – Cultiu *in vitro*

AGRADECIMIENTOS

Quisiera dar las gracias a todas las personas que han hecho posible la realización de este TFG, a los compañeros del laboratorio 0.07 especialmente a Alex y Marybel por su paciencia y tutorización. Sin duda también he necesitado la ayuda y el apoyo de mucha gente ajena al laboratorio que forma parte de mi vida y han soportado mis quejas dudas y anécdotas durante todo este tiempo.

ÍNDICE GENERAL

1	Introducción	1
1.1	Origen y domesticación de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	1
1.2	Descripción morfológica.....	2
1.3	Usos e importancia económica	4
1.4	Mejora genética.....	7
1.5	Fundamentos del cultivo <i>in vitro</i>	9
1.6	Respuesta morfogénica en el cultivo <i>in vitro</i>	11
1.7	Regeneración <i>in vitro</i> de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	12
2.	Objetivos	14
3.	Materiales y métodos	15
3.1	Material vegetal	15
3.2	Técnicas básicas del cultivo <i>in vitro</i>	15
3.2.1	Preparación y esterilización de los medios de cultivo	15
3.2.2	Trabajo en condiciones asépticas.....	16
3.2.3	Esterilización de semillas.....	17
3.2.4	Siembra y germinación.....	17
3.2.5	Condiciones de crecimiento del material vegetal.....	18
3.3	Regeneración de plantas.....	18
3.3.1	Identificación de estados ontogénicos.....	18
3.3.2	Cultivo de explantes meristemáticos	18
3.3.5	Evaluación de la respuesta morfogénica	22
4	Resultados y discusión	23
4.1	Esterilización y germinación de las semillas.....	23
4.2	Identificación de los estados ontogénicos	26
4.3	Cultivo de explantes meristemáticos	28
4.4	Evaluación de la respuesta embriogénica.....	29
4.4.1	Respuesta embriogénica en explantes de hipocótilo y raíz	29
4.5	Evaluación de la respuesta organogénica	31
4.5.1	Respuesta organogénica de segmentos de cotiledón.....	31
4.5.2	Respuesta organogénica en explantes de hipocótilo y raíz	33
5	Conclusiones.....	36
6	Bibliografía	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación de una planta de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. (Van Houtte, 1845).	2
Figura 2. Producción de leguminosas grano por CCAA. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación 2021	5
Figura 3. Evolución del comercio exterior de leguminosas grano en España. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación 2021.....	6
Figura 4. . Los diferentes genotipos de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. utilizados en el experimento. La barra representa 1cm.....	15
Figura 5. Material necesario para la esterilización del material vegetal en la cabina de flujo laminar. Botes estériles con agua desionizada y las semillas en el interior. La barra representa 1 cm.....	17
Figura 6. Plantula de <i>Phaseolus Vulgaris</i> L. con los cortes realizados para obtener todos los explantes empleados. La barra representa 1cm.....	19
Figura 7. Germinación desagrupada de semillas de PV3. La barra representa 1cm.....	26
Figura 8. Estados ontogénicos de <i>Phaseolus Vulgaris</i> L. (PV2). La barra representa 1cm.....	27
Figura 9. Desarrollo de los ápices meristemáticos tras 30 días de cultivo. A: Explantes iniciales. B: Desarrollo en medio con Kinetina. C: Desarrollo en medio con 2iP. D: Desarrollo en medio con 6- Benciladenina. La barra representa 1cm... ..	28
Figura 10 . Eficacia de la regeneración de los explantes de hipocótilo PV2 cultivados durante 30 días según el medio embriogénico... ..	29
Figura 11. Explantes de hipocótilo PV2 cultivado en medio de cultivo DB (drcha.) y DK (izqda..) durante 30 días. La barra representa 1cm.....	30
Figura 12. Eficacia de la regeneración de los explantes de raíz PV2 cultivados durante 30 días según el medio embriogénico.....	30
Figura 13. Explantes de raíz PV2 cultivados durante 30 días en medio de cultivo DB (dcha.) y DP (izda.). La barra representa 1cm... ..	31
Figura 14. Eficacia de la regeneración de los explantes y microexplantes de cotiledón PV2 en medio NB tras 30 días de cultivo.....	32
Figura 15. Eficacia de la regeneración de los explantes de raíz PV2 cultivados durante 30 días en diferentes medios organogénicos.....	33
Figura 16. Explantes de raíz PV2 cultivados durante 30 días en medio de cultivo NP (izqda.) y NB (dcha.). La barra representa 1cm.	34
Figura 17. Eficacia de la regeneración de los explantes de hipocótilo PV2 tras 30 días de cultivo según medios de cultivo organogénicos.....	34
Figura 18. Explantes de hipocótilo PV2 cultivados durante 30 días en medio NK (izqda.) y NP (drcha.) La barra representa 1cm.....	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes del medio base (MB3) utilizados en el diseño de otros medios de cultivo. a (Murashige & Skoog, 1962)	15
Tabla 2. Componentes del medio de germinación, empleados para la germinación de las semillas. a (Murashige & Skoog, 1962)	16
Tabla 3. Composición hormonal de los medios para la brotación de los ápices meristemáticos utilizados en el ensayo.	19
Tabla 4. Composición hormonal de los medios embriogénicos utilizados en el ensayo	20
Tabla 5. Composición hormonal de los medios organogénicos utilizados en el ensayo.	21
Tabla 6. Proporción de semillas contaminadas y germinadas con esterilización al 50% (dcha.) y al 25 + 25% (izq.) de los genotipos iniciales.	23
Tabla 7. Proporción de semillas contaminadas y germinadas con esterilización al 50% (dcha.) y al 25 + 25% (izq.) de los nuevos genotipos.	24
Tabla 8. Proporción de semillas contaminadas y germinadas con esterilización al 30% (dcha.) y al 15 + 15% (izq.) de los nuevos genotipos..	25

1 Introducción

1.1 Origen y domesticación de *Phaseolus vulgaris* L.

La familia de las leguminosas está formada por 19.500 especies agrupadas en 751 géneros (Lewis et al., 2013). Dentro del género *Phaseolus* sólo cinco especies han sido domesticadas: *P. acutifolius* A. Gray, *P. coccineus* L., *P. lunatus* L., *P. dumosus* Macfad. y *P. vulgaris* L., siendo esta última la de mayor importancia económica (Saburido-Álvarez & Herrera-Estrella, 2015) y la que se ha utilizado en este trabajo.

La judía puede clasificarse en dos acervos genéticos, el Mesoamericano y el Andino, que difieren en sus estructuras y genes tanto en las poblaciones silvestres como en las domesticadas. Kaplan (1965) estableció que *Phaseolus vulgaris* L. se domesticó en el Valle de Tehuacán, Puebla, México hace aproximadamente 7000 años, probablemente en asociación con el maíz. Por otro lado, en las cuevas ‘El Guitarreo’ y ‘El Callejón’ en Hualyas (Perú) se recuperaron restos de *Phaseolus vulgaris* L. con características similares a las formas actuales cultivadas de frijol. Esto indica que Perú también pudo ser uno de los primeros centros de domesticación del frijol (Hernández López et al, 2013).

La domesticación de las judías ha supuesto multitud de cambios, tanto morfológicos como fisiológicos, que hacen que se diferencien las variedades silvestres de las domesticadas. Una de las consecuencias de la domesticación es la reducción de la variabilidad genética. Esto ha sucedido tanto en el acervo Mesoamericano como en el Andino y se debe a los “cuellos de botella” producidos durante la domesticación (Saburido-Álvarez & Herrera-Estrella, 2015). En este caso uno o unos pocos individuos pueden ser los responsables de la formación de una nueva variedad domesticada y, como consecuencia, algunos de los caracteres de resistencia a estreses presentes en la población silvestre original desaparecerían en ese acervo genético. En el momento actual, la recuperación de esas características interesantes que están presentes en las poblaciones silvestres relacionadas se puede abordar por diferentes métodos de mejora tanto clásicos como biotecnológicos.

1.2 Descripción morfológica

Phaseolus vulgaris L. es una planta de cultivo anual, herbácea, de días cortos, con crecimiento determinado, que puede desarrollarse de forma arbustiva o semipostrada. Su altura va de los 50 cm a los 90 cm dependiendo de la variedad y las condiciones del suelo.

Raíz

El sistema radical es superficial, ligero y poco profundo. Está formado por una raíz principal, de mayor diámetro y longitud, a partir de ella aparecen las raíces secundarias, sobre estas aparecen lateralmente las raíces terciarias y otras subdivisiones como los pelos absorbentes que son muy importantes para la absorción de agua y nutrientes. En las raíces laterales de la parte superior aparecen nódulos, que son colonizados por bacterias y ayudan a fijar el nitrógeno atmosférico.

Tallo

El tallo es herbáceo y tiene forma cilíndrica angulosa. Está formado por una sucesión de nudos, entrenudos y yemas axilares. Puede ser erecto, semipostrado o postrado, según el hábito de crecimiento de la variedad.



Figura 1. Representación de una planta de *Phaseolus vulgaris* L. (Van Houtte, 1845).

Hojas

Hay dos tipos de hojas, las primarias o unifoliadas y las trifoliadas. Las unifoliadas son simples y se caen antes de que la planta se desarrolle completamente. Las trifoliadas son compuestas y tienen tres folíolos, un peciolo y un raquis.

Inflorescencia

Las inflorescencias pueden ser axilares o terminales. Las partes principales son: el eje compuesto por el pedúnculo y raquis, las brácteas primarias y los botones florales.

Flor

Se trata de una típica flor papilionácea (con forma de mariposa), en la misma flor hay órganos masculinos y femeninos y posee corola y cáliz.

Los órganos masculinos están formados por diez estambres, nueve soldados en la base y el restante está libre. El órgano femenino se encuentra en el centro de la flor y consta de ovario, un estilo espiralmente torcido y estigma.

La corola está formada por cinco pétalos, el más grande se denomina estandarte, los dos medianos alas y los dos más pequeños constituyen la quilla. Puede ser blanca, amarilla, violácea o roja. El cáliz lo forman 5 sépalos unidos por la base.

Fruto

Es una vaina con dos valvas, por lo que se la considera una leguminosa. El tamaño es variable, entre 6 y 12 cm de longitud y suelen contener de 3 a 5 semillas dependiendo de la variedad.

Semillas

Se originan del ovulo fecundado, según la variedad tienen distintas formas (cilíndricas o esféricas), colores (blanco, negro, marrón, rojizo...) y tamaños (Debouck & Hidalgo, 1984; Espinoza-Montesinos, 2009).

1.3 Usos e importancia económica

El principal uso de la judía seca es la alimentación humana. En su composición cabe destacar los contenidos de proteínas, de hidratos de carbono de asimilación lenta, fibra, hierro, ácido fólico, tiamina, potasio, magnesio, calcio y zinc. El contenido proteico se eleva hasta un 30% dependiendo de la variedad. Las proteínas más abundantes son las globulinas. Las judías y las leguminosas en general son relativamente pobres en aminoácidos azufrados (metionina, cisteína y triptófano), pero contienen cantidades de lisina muy superiores a la de los granos de cereales, de forma que leguminosas y cereales se complementan en el aporte proteico ya que estos si tienen los aminoácidos esenciales necesarios para la óptima absorción proteica (Olmedilla et al, 2010).

El consumo de legumbres aporta múltiples beneficios como la reducción de las cardiopatías ya que reduce el colesterol LDL por su alto contenido en fibra soluble. Las legumbres son un poderoso alimento para prevenir la anemia en mujeres y niños especialmente cuando se combinan con alimentos con alto contenido en vitamina C que mejora la absorción del hierro. También evitan algunas de las alergias alimentarias más comunes, al tratarse de alimentos exentos de gluten no presentan ningún problema para los celíacos. Además, son un alimento ideal para diabéticos y ayudan a controlar el peso ya que son pobres en grasas y tienen un alto contenido en fibra que ayuda a estabilizar los niveles de insulina y glucemia. Por último, por su alto contenido en proteína son ideales para dietas vegetarianas especialmente si se consumen junto a cereales.

Las judías secas deben cocinarse antes de consumirse ya que así se eliminan los componentes tóxicos termolábiles y se reduce la cantidad de oligosacáridos manteniendo el contenido en fibra y proteína. Es un componente esencial en platos típicos de diferentes países de América donde tiene diferentes denominaciones: frijoles en México y Cuba, caraotas en Venezuela, porotos en Chile, “feijoada” en Brasil, baleadas en Honduras o habichuelas en la República Dominicana.

Según la FAO, la producción media de las últimas campañas de leguminosas grano en el mundo (2015/16 a 2019/20) se aproximó a los 50 Mt, de las cuales casi el 60% son de judías secas, el 27% de garbanzos, el 13% de lentejas y menos del 2% de vevas. Por tanto, la judía común se considera la leguminosa de grano destinada al consumo

humano directo más importante del mundo. Su cultivo está extendido por los cinco continentes, los principales productores de judías secas a nivel mundial son India, Myanmar (antigua Birmania) y Brasil, seguidos de EE. UU, China y México. En Europa el mayor productor de leguminosas de grano es Francia seguido de España, Polonia y Alemania, estos cuatro países suman el 67% de la producción europea.

En España la producción de judía seca en 2019 fue de 15 mil toneladas obtenidas en casi 10.000 hectáreas de cultivo, muy por debajo de la demanda del mercado nacional. Dentro de España, la comunidad autónoma con mayor producción de leguminosas grano en la campaña 2020/21 fue Castilla La Mancha, seguida de Castilla y León y Andalucía (Figura 2).

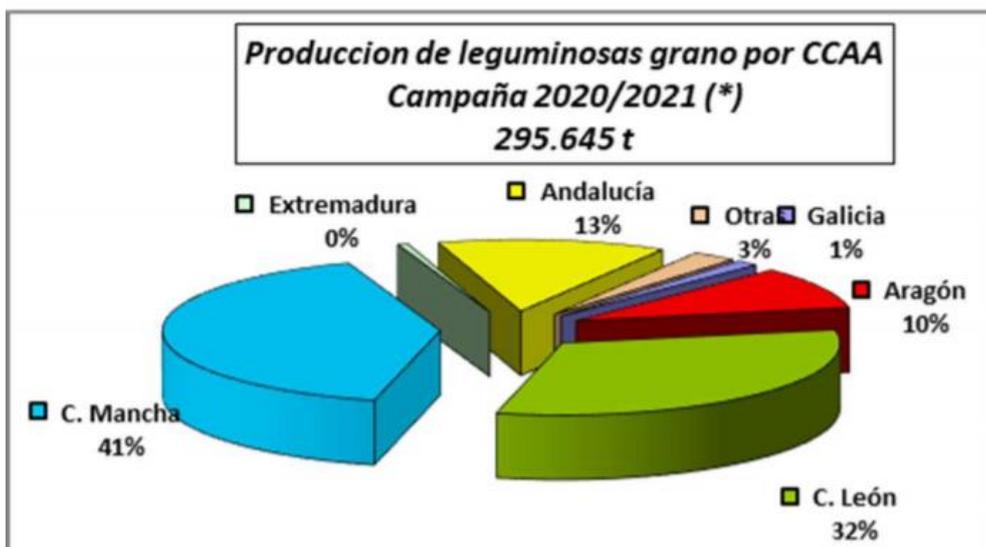


Figura 2. Producción de leguminosas grano por CCAA. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación 2021.

España, en los últimos años, es deficitaria en leguminosas de grano (judía seca, lentejas, garbanzos y vezas) y se importan muchas más toneladas de leguminosas de las que se exportan. De hecho, en el caso de la judía seca, la importación triplica lo que se produce en nuestro país (Figura 3).

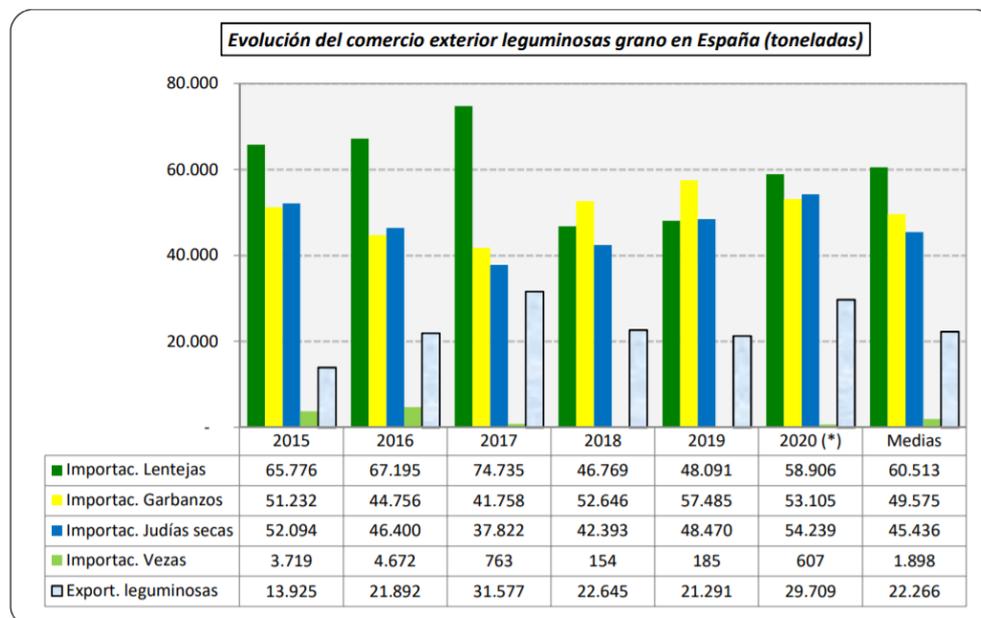


Figura 3. Evolución del comercio exterior de leguminosas grano en España. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación 2021.

La gran necesidad de judía procedente de otros países se debe principalmente a la disminución de la superficie de cultivo provocada, entre otras, por la falta de variedades con una buena adaptación a las diferentes condiciones edafoclimáticas y resistencias a plagas y enfermedades. Si se mejoraran las variedades haciéndolas más resistentes se podría ampliar la superficie cultivada con estas especies y, por tanto, se dependería menos de las importaciones. Además, estas mejoras permitirían no solo abastecer al mercado nacional sino aumentar las exportaciones.

Los principales problemas a los que se enfrenta este cultivo son las plagas y las enfermedades. Los insectos ocasionan grandes daños en los cultivos. En el caso de la judía destaca la mosca blanca *Bemisia tabaci* que debilita la planta al extraer los nutrientes, afecta al crecimiento y producción del cultivo y, además, es vector de varios virus entre los que destacan los begomovirus del mosaico dorado (BGMV) y el mosaico dorado amarillo (BGMV) que son los patógenos más ampliamente distribuidos en Latinoamérica, donde causan pérdidas en rendimiento hasta del 100% (Morales-Soto & Lamz-Piedra, 2020). La enfermedad producida por estos virus se caracteriza en ambos casos por una marcada deformación de las hojas, muchas de las cuales pueden volverse completamente amarillas o casi descoloridas. Las vainas de las plantas infectadas son muy deformes. Las semillas se pueden decolorar, deformar y

disminuir de tamaño y de peso. Además de la citada mosca blanca, BGYMV también puede transmitirse por inoculación mecánica (Cuéllar & Morales, 2006). El método de control frente a los Begomovirus ha sido principalmente el desarrollo de variedades resistentes. Estas se pueden obtener mediante la incorporación combinada de los genes dominantes de hipersensibilidad y los genes de resistencia recesivos a variedades susceptibles al virus (Morales-Soto & Lamz-Piedra, 2020).

El moho blanco, causado por el hongo *Sclerotinia sclerotiorum*, provoca severas pérdidas en la producción y disminuye la calidad del cultivo, especialmente en zonas templadas y húmedas (Lema et al., 2008). La judía común sólo presenta resistencia parcial frente a moho blanco (Miklas et al., 1999) y los mayores niveles de resistencia se encuentran en el acervo genético secundario (Gilmore et al., 2002).

La bacteriosis común (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* E.F. Smith Dowson) es una enfermedad bacteriana que afecta tanto a las hojas como al tallo y a la vaina. El patógeno puede penetrar en la planta a través de los estomas de las hojas y heridas o a través de la sutura de la vaina. La resistencia es cuantitativa, con pocos genes implicados, con efectos aditivos y/o dominantes y de baja heredabilidad.

Todos estos problemas se pueden abordar con métodos agronómicos como, por ejemplo, usando tratamientos fitosanitarios. Sin embargo, el elevado coste económico y el impacto ambiental que tiene este abordaje hace más interesante la obtención de variedades mejoradas genéticamente para lograr plantas que sean cada vez más resistentes a todas estas plagas y enfermedades.

1.4 Mejora genética

La mejora genética de los vegetales se lleva produciendo desde los inicios de la agricultura. El ser humano, mediante la observación, seleccionaba las características de interés obteniendo plantas genética y fenotípicamente distintas a las silvestres, las cuales eran más útiles para el ser humano. El proceso de domesticación tuvo muchas consecuencias positivas como la obtención de alimentos de forma predecible y la posibilidad de almacenar los excedentes, lo que permitió que la sociedad se desarrollara. Por el contrario, las plantas obtenidas mediante la mejora intuitiva presentaban algunas desventajas como ser más sensibles a enfermedades y plagas,

menor rendimiento y disminución de la tolerancia frente al estrés abiótico ya que se suprimieron algunos mecanismos de resistencia-tolerancia.

A partir del siglo XVIII aparecen las primeras casas comerciales de producción de semillas. El agricultor delega la selección de semillas a las empresas, que se especializan en generar variedades con mejores características. La selección intuitiva se sustituye por la identificación y selección de los individuos superiores que se cruzaban entre sí para obtener nuevos materiales.

En el siglo XX, tras el redescubrimiento de las leyes de Mendel aparecen los métodos clásicos de mejora genética. Con un conocimiento mayor de los mecanismos genéticos que subyacen a estos procesos aumentó la eficacia de los mismos. Su aplicación condujo al desarrollo de multitud de variedades genéticamente mejoradas.

Actualmente la mejora genética por métodos clásicos sigue siendo la herramienta más utilizada para obtener nuevos cultivares. En el caso de las judías los programas de mejora se basan principalmente en la detección de nuevas variedades tras la hibridación de parentales con características interesantes. El uso de marcadores moleculares en esta estrategia permite acelerar los plazos necesarios para alcanzar los objetivos planteados. Además, es necesario, contar con cierta variabilidad genética para poder seleccionar la característica que se desea obtener en los cultivares y corregir aquellas que no son deseadas (mayor rendimiento de los cultivares, resistencia a enfermedades y plagas, variedades adaptadas a las zonas de cultivo, mejorar el contenido nutricional, etc.). Por otra parte, como no se conocen muchos de los genes que controlan los caracteres de interés, es necesario el manejo de muchos parentales y la realización de múltiples hibridaciones para lograr el objetivo de mejora deseado. Por todo lo expuesto anteriormente, los programas de mejora clásica necesitan varios años, habitualmente más de diez, para obtener una nueva variedad de uso comercial.

La mejora genética de la judía común puede emplear técnicas biotecnológicas que permiten alcanzar los objetivos de forma más eficiente y rápida. Además de los marcadores moleculares antes comentados, las técnicas de cultivo *in vitro* pueden ayudar a ampliar la variabilidad genética tanto intraespecífica (aprovechamiento de la variación somaclonal) como extraespecífica (rescate de embriones, fusión de

protoplastos, transformación genética, etc.). Además, estas técnicas permiten alcanzar los objetivos deseados en menor plazo que los métodos clásicos. Por todo ello, el desarrollo de métodos de cultivo *in vitro* puede abrir nuevas alternativas de mejora en una especie como la judía.

1.5 Fundamentos del cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* es el conjunto de técnicas que se utilizan para inducir el crecimiento de células, tejidos u órganos vegetales en condiciones axénicas (sin contaminación) y controlando los factores que afectan al crecimiento (Calva & Ríos, 1999; Street, 1973). Estas técnicas se basan en el principio de totipotencia celular, es decir, la capacidad que tienen las células vegetales de desdiferenciarse para producir un nuevo individuo a partir de una célula (Skoog & Miller, 1957). Los reguladores del crecimiento u hormonas vegetales (auxinas y citoquininas principalmente) son elementos clave para modular este tipo de procesos y, por consiguiente, desarrollar metodologías en el área de la biotecnología vegetal (Perea, 2009).

Las técnicas de cultivo *in vitro* presentan numerosas aplicaciones, entre ellas destacan la propagación vegetativa, la mejora sanitaria y la mejora genética. La micropropagación es una técnica de multiplicación vegetativa, en la cual, a partir de un explante de una planta madre se obtienen plantas genéticamente iguales a ella, es decir, clones. Esta técnica se utiliza para conservar y multiplicar genotipos en variedades en las que es difícil obtener semillas o que se encuentran en peligro de extinción, acelerar el mejoramiento de plantas y obtener abundante material vegetal para la investigación

La mejora sanitaria o eliminación de agentes patógenos para las plantas se produce durante el cultivo *in vitro* ya que, como se ha dicho, es un cultivo axénico. Además, se han puesto a punto técnicas específicas para el saneamiento que permite, incluso, la erradicación de virus. A pesar de que los virus pueden replicarse en casi todas las células, son incapaces de hacerlo en las células meristemáticas, ya que no tienen acceso a ellas debido a la estructura de los ápices. Por tanto, si se consigue regenerar una planta completa a partir de un meristemo apical se obtiene un clon genéticamente idéntico al original, pero sin los virus (Martínez-Núñez & Gago-Mariño,

2008). Con este principio se desarrolló la técnica de microinjerto que ha permitido el saneamiento de gran cantidad de especies como, por ejemplo, los cítricos que estaban infectados por el virus de la tristeza.

Dentro de las técnicas de mejora genética se encuentra el aprovechamiento de la variación somaclonal. Esta técnica aprovecha las variaciones genéticas que se originan en los procesos de regeneración de plantas mediante técnicas de cultivo *in vitro*. Por tanto, el cultivo *in vitro* se puede utilizar para obtener mutantes, es decir, como fuente de variación intraespecífica, de la misma forma que otros agentes mutagénicos como radiaciones o agentes químicos.

Las técnicas de cultivo *in vitro* también presentan métodos con los que obtener líneas puras, es decir, plantas homocigóticas en todos sus genes. Estos materiales son necesarios para la obtención de híbridos F1 y habitualmente se obtienen con largos programas de autofecundación que duran muchos años. La producción de plantas haploides a partir de células gaméticas y su posterior duplicación permite obtener líneas homocigotas estables (líneas puras) en sólo dos pasos con lo que se acortan mucho los plazos. La técnica más utilizada para la inducción de doble haploides es el cultivo de anteras, pero también se pueden utilizar óvulos, ovarios o microsporas (Camarena et al., 2012).

La mejora genética también incluye técnicas que permiten el incremento de la variabilidad genética extraespecífica, es decir, la incorporación de genes procedentes de otras especies a nuestro acervo génico. La principal limitación que tienen los métodos clásicos para lograr este objetivo son los mecanismos de incompatibilidad sexual que aparecen al intentar realizar cruces sexuales entre diferentes especies y que imposibilitan la obtención del híbrido. Mediante técnicas de cultivo *in vitro* como el rescate de embriones, la fusión de protoplastos o la transformación genética se puede solventar este problema.

El rescate de embriones es una técnica muy útil cuando se realizan cruzamientos para transferir una característica de uno de los parentales al otro y se presentan problemas de incompatibilidad que aparecen después de formarse el embrión, normalmente por incompatibilidad entre el embrión y el endospermo. En esos casos es posible extraer el embrión híbrido y cultivarlo en medios axénicos que permitan su

desarrollo (Doménech & Picó 2015). La fusión de protoplastos permite combinar el genoma de dos especies mediante el uso de células somáticas (no sexuales) desprovistas de pared celular. En esta técnica se evitan todos los problemas derivados de los mecanismos de incompatibilidad sexual. Por último, la transformación genética de plantas consiste en incorporar y expresar de manera estable uno o varios genes procedentes de otro genoma con el fin de obtener las características controladas por esos genes (ej. resistencia a una plaga o enfermedad). Si los genes proceden de una fuente de variación sexualmente compatible se trata de cisgénesis y el resultado que se obtendría sería el mismo que con un programa de retrocruzamiento (mejora clásica) pero en mucho menor tiempo. Por otro lado, si los genes proceden de una fuente de variación sexualmente incompatible se denomina transgénesis. En este caso, la única forma de obtener este resultado es recurriendo a métodos de transformación biotecnológicos como el empleo de *Agrobacterium tumefaciens* o métodos biolísticos.

1.6 Respuesta morfogénica en el cultivo in vitro

El cultivo *in vitro* nos permite explotar la capacidad de las células vegetales denominada totipotencia celular que permite regenerar plantas a partir de un meristemo o de una célula. Estos métodos de regeneración son los que permiten llevar a cabo las técnicas descritas anteriormente. Con los estímulos adecuados es posible inducir procesos de regeneración de nuevas plantas tanto a partir de un explante con meristemos preexistentes (morfogénesis directa) como de explantes sin meristemos preexistentes (morfogénesis indirecta).

Existen dos rutas alternativas por las que se puede obtener morfogénesis indirecta, la organogénesis adventicia y la embriogénesis somática. En la organogénesis se produce la formación de un callo desorganizado, células desdiferenciadas en división activa, a partir del que se formarán nuevas estructuras como yemas, ápices y brotes (parte aérea de la planta) o raíces. Por otro lado, en la embriogénesis somática se produce la formación de nuevos embriones similares a los cigóticos pero, en este caso, a partir de células no sexuales. Estos embriones son estructuras bipolares, sin conexión vascular con el tejido materno y con la capacidad de crecer y formar una planta entera. La embriogénesis se puede producir o bien a

partir de células aisladas o utilizando callos. Las partes de la planta más utilizadas para producir este tipo de respuesta son los explantes de hipocótilo o cotiledón, aunque todas las células vegetales poseen la información genética necesaria para formar una planta completa (Llorente, 2002). La producción de organogénesis o embriogénesis dependerá del genotipo del material de partida, las condiciones ambientales y los componentes del medio de cultivo (sales minerales, sacarosa, compuestos orgánicos y, especialmente, de los reguladores del crecimiento utilizados).

1.7 Regeneración in vitro de Phaseolus vulgaris L.

La judía común se considera un cultivo difícil de regenerar *in vitro* debido a su baja capacidad de respuesta morfogénica. Esto hace que no se disponga aún de protocolos eficaces de regeneración, lo cual dificulta el desarrollo de las metodologías de mejora biotecnológica que se basan en ellos (aprovechamiento de la variación somaclonal, método haplo-diploide, fusión de protoplastos, transformación genética, etc.). Además, se ha visto, como en otras especies, que los resultados son altamente dependientes del genotipo. Por tanto, es difícil de extrapolar el resultado obtenido con una variedad a otras de la misma especie.

Según Arellano y colaboradores (2009), se ha conseguido regenerar plantas de diez cultivares distintitos mediante organogénesis indirecta, aunque con baja frecuencia de regeneración. Los mejores resultados para la inducción de callos morfogénicos se obtuvieron a partir de explantes de meristemas apicales y nudos cotiledonarios. Sin embargo, el uso de explantes con meristemas presenta el problema del origen de las nuevas estructuras regeneradas. En este caso también se probó con explantes de hipocótilo y de cotiledón. Los explantes de cotiledón solo produjeron callos en una de las combinaciones. Los explantes de hipocótilo sí produjeron callos, pero no consiguieron regenerar ningún brote con las condiciones probadas.

Según Hnatuszko-Konka y colaboradores (2019) también ha sido posible la regeneración a partir de epicótilos e hipocótilos de seis cultivares mediante organogénesis adventicia. Las mejores eficacias de regeneración para cada variedad fueron del 46 al 70% de los explantes cultivados. Estos valores máximos se obtuvieron con diferentes combinaciones de hormonas y tipo de explante en cada variedad, lo cual

demuestra la necesidad de ajustar las condiciones de regeneración según el material vegetal empleado.

En un trabajo de transformación mediada por *Agrobacterium* se ha conseguido una regeneración eficiente a través de organogénesis adventicia. Este sistema ha permitido obtener líneas transgénicas en base a análisis PCR, pero todas ellas fueron quimeras, es decir, tenían tanto células transgénicas como no transgénicas (Collado et al., 2015). En un trabajo posterior se alcanzó un resultado similar utilizando explantes de epicótilos (Collado et al., 2016). El problema de emplear este tipo de explantes con meristemas preexistentes para regenerar por la vía de organogénesis adventicia es que si las plantas regeneradas provienen del meristemo pueden presentar el problema del quimerismo como ya se ha comentado.

2.Objetivos

El objetivo de este trabajo es poner a punto un método de regeneración mediante organogénesis y embriogénesis en *Phaseolus vulgaris* L. que nos permita abordar en un futuro diferentes métodos de mejora biotecnológica. Este objetivo principal se puede desglosar en diferentes aspectos:

- Establecer las mejores condiciones de esterilización, germinación y crecimiento de plántulas axénicas a partir de semillas de judía seca.
- Obtener un método de brotación axilar de ápices meristemáticos para poder mantener y multiplicar plantas axénicas.
- Identificar las mejores condiciones de regeneración indirecta mediante organogénesis adventicia y embriogénesis somática a partir de explantes de hipocótilo, raíz y cotiledón.

3. Materiales y métodos

3.1 Material vegetal

En este trabajo se han utilizado siete variedades distintas de judía seca o judía de grano pertenecientes a la especie *Phaseolus vulgaris* L. (Figura 4).

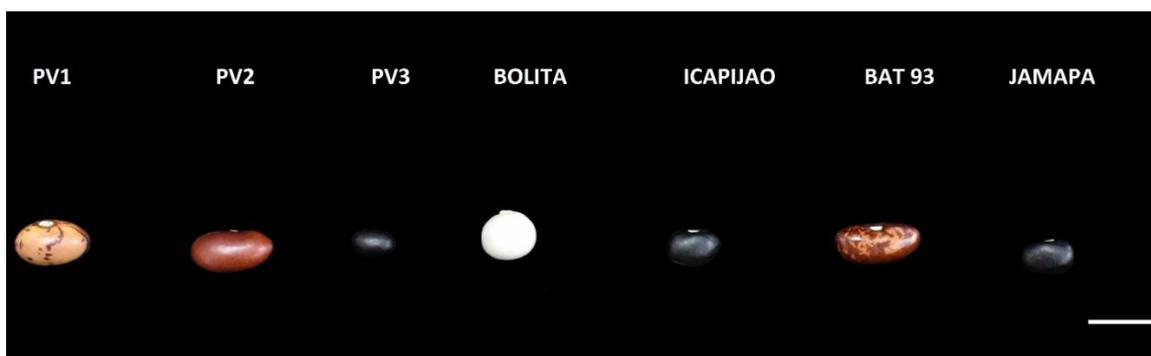


Figura 4. Los diferentes genotipos de *Phaseolus vulgaris* L. utilizados en el experimento. La barra representa 1cm.

La judía blanca (PV1) procedente de Argentina, la judía roja (PV2) procedente de Estados Unidos y judía negra (PV3) procedente de China fueron adquiridas en un supermercado. Bolita procedente de Argentina, Icajiao procedente de Colombia, Bat 93 que se desarrolló en el IBYAN, (Vivero Internacional de Rendimiento y Adaptación de Frijol) y Jamapa procedente de México (Voyest, 1983) fueron cedidas por una investigadora con el que colabora nuestro grupo.

3.2 Técnicas básicas del cultivo *in vitro*

En las técnicas de cultivo *in vitro* es necesario trabajar en condiciones axénicas, para ello se esteriliza tanto el material vegetal como el instrumental y se utilizan cabinas de flujo laminar

3.2.1 Preparación y esterilización de los medios de cultivo

Durante este trabajo se utilizaron diferentes tipos de medio (medio de germinación, medio para la clonación y medios para conseguir la regeneración tanto mediante organogénesis como mediante embriogénesis) cuya composición se detalla en el apartado correspondiente. Excepto el medio de germinación, los medios de cultivo

están diseñados a partir de un medio base (MB3) que contiene sales minerales, sacarosa y vitaminas (Tabla 1).

Tabla 1. Componentes del medio base (MB3) utilizados en el diseño de otros medios de cultivo.
^a (Murashige & Skoog, 1962).

COMPONENTES	CONCENTRACIÓN (mg·L ⁻¹)
Sales minerales	MS ^a
Sacarosa	30.000
Inositol	100
Tiamina clorhídrica	1

La preparación consistió en diluir en agua desionizada los componentes necesarios para cada tipo de medio, posteriormente usando un pH-metro se ajustó el pH a 5,7 utilizando HCl o KOH, según la composición del medio. A continuación, se distribuyó el medio en matraces a los que previamente se les había añadido 9 g·L⁻¹ de agar bacteriológico (Pronadisa®). Para fundir el agar se calentaron los matraces en un microondas y antes de que gelificara se distribuyó el medio en los recipientes de vidrio correspondientes. Finalmente se esterilizó en el autoclave a 121°C durante 20 minutos. En el caso de que los recipientes que no se podían introducir en el autoclave (placas Petri de poliestireno) había que esterilizar el medio, dejarlo enfriar y una vez alcanzada una temperatura de 40-50°C se distribuía en la cabina de flujo laminar para que gelificara. Los componentes termolábiles como los antibióticos también se añadían al medio en la cabina de flujo laminar una vez que se habían enfriado el resto de componentes.

3.2.2 Trabajo en condiciones asépticas

Para poder trabajar en condiciones axénicas se utilizó una cabina de flujo laminar, un equipo con un ventilador que fuerza el flujo de aire a través de un filtro HEPA que impide el paso de partículas mayores a 0,1 µm. La corriente de aire estéril va desde el interior al exterior dificultando la entrada de contaminantes.

También se desinfectó con etanol 70% la superficie de la cabina antes de cada uso. Los instrumentos de acero inoxidable que se usaban para manipular el material vegetal (pinzas y bisturí) se desinfectaban mediante flameado con etanol al 96%. Se emplearon

rectángulos de papel de filtro previamente esterilizado en autoclave (20 minutos a 121°C) como superficie sobre la que manipular el material vegetal.

3.2.3 Esterilización de semillas

Para conseguir plantas axénicas hay que esterilizar superficialmente las semillas. Para ello, en primer lugar, se esterilizaron en el autoclave cuatro botes de vidrio, tres de ellos con agua desionizada y uno vacío. Posteriormente, se preparó una disolución de hipoclorito sódico comercial (40 g·L⁻¹ de cloro activo) a diferentes concentraciones con unas gotas de Tween 20, un agente tensoactivo que mejora el contacto entre el material vegetal y la disolución esterilizante. En la cabina de flujo laminar se sumergieron las semillas en esta disolución durante 30 minutos. Con el fin de eliminar los restos de hipoclorito sódico se realizaron tres lavados consecutivos en agua desionizada estéril de 5, 10 y 15 minutos respectivamente (Figura 5).



Figura 5. Material necesario para la esterilización del material vegetal en la cabina de flujo laminar. Botes estériles con agua desionizada y las semillas en el interior. La barra representa 1 cm.

3.2.4 Siembra y germinación

Una vez esterilizadas las semillas se sembraron en tubos con medio de germinación (Tabla 2).

Tabla 2. Componentes del medio de germinación, empleados para la germinación de las semillas^a (Murashige & Skoog, 1962).

COMPONENTES	CONCENTRACIÓN (mg·L ⁻¹)
Sales minerales	MS ^a
Sacarosa	10.000

Posteriormente, se incubaron dos días en oscuridad a 28°C para inducir la germinación. Transcurrido ese periodo se pasaron a una cámara de cultivo con unas condiciones de fotoperiodo controladas (ver apartado 3.2.5) hasta obtener el desarrollo de las plántulas. Se evaluó tanto el número de semillas contaminadas como las que lograron germinar para producir una planta axénica.

3.2.5 Condiciones de crecimiento del material vegetal

Exceptuando los dos días de la etapa de pregerminación, todos los cultivos se incubaron en una cámara que proporciona un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, con una intensidad luminosa de $45 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y una temperatura constante de $25\pm 1^\circ\text{C}$.

3.3 Regeneración de plantas

En este trabajo se evaluó la capacidad de regeneración a partir de explantes con meristemos preexistentes (ápice meristemático) y sin meristemos preexistentes (cotiledón, hipocótilo y raíz) procedentes de plántulas axénicas.

3.3.1 Identificación de estados ontogénicos

Durante la germinación las plántulas sufren cambios internos y externos que cambian su morfología. Habitualmente la mejor respuesta organogénica se da en uno de estos estados ontogénicos. El conocimiento de la evolución temporal de estos estados nos permitiría poder planificar mejor los experimentos ya que podemos predecir en que momento las plántulas van a estar en determinado estado ontogénico. En este experimento se ha evaluado diariamente el crecimiento de las semillas y se ha anotado el estado ontogénico que habían alcanzado en cada momento para obtener esta información.

3.3.2 Cultivo de explantes meristemáticos

Los ápices meristemáticos se obtuvieron de plántulas axénicas procedentes del cultivo de semillas. Para obtenerlos el primer paso fue separar el ápice y los cotiledones del resto de la plántula cortando el hipocótilo. A continuación, se cortaron los cotiledones sin dañar el ápice meristemático (Figura 6).

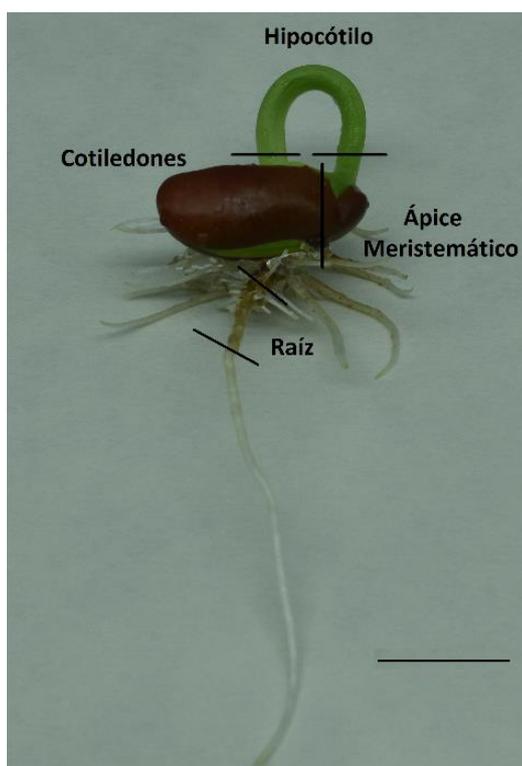


Figura 6. Plántula de *Phaseolus vulgaris* L. con los cortes realizados para obtener todos los explantes empleados. La barra representa 1cm.

Se cultivaron 5 explantes por bote en tres medios distintos, añadiendo al medio base (MB3) la hormona (citoquinina) correspondiente (Tabla 3).

Tabla 3. Composición hormonal de los medios para la brotación de los ápices meristemáticos utilizados en el ensayo

COMPONENTES (mg·L ⁻¹)			
	B	K	P
6-Benciladenina	1,0		
Kinetina		1,0	
2iP			1,0

En cada tipo de medio se cultivaron 35 explantes, formando un total de 105 ápices meristemáticos cultivados.

3.3.3 Cultivo en medios embriogénicos

Se utilizaron cuatro medios de cultivo para intentar la formación de callo desorganizado y regeneración mediante embriogénesis somática. Se añadieron al medio base diversos tipos de hormonas en cantidades variables. En los cuatro medios embriogénicos se utilizó la auxina 2,4D (ácido diclorofenoxiacético) de forma aislada o combinada con las citoquininas: Kinetina, 6-Benciladenina y 2iP.

Tabla 4. Composición hormonal de los medios embriogénicos utilizados en el ensayo.

COMPONENTES (mg·L ⁻¹)	D	DB	DK	DP
Ácido diclorofenoxiacético	3,0	3,0	3,0	3,0
6-Benciladenina		0,5		
Kinetina			0,5	
2iP				0,5

En este tipo de medio se cultivaron explantes de hipocótilo y raíz. Se obtuvieron a partir de partir de plántulas axénicas en el estado ontogénico 3. Se separaron del resto de la plántula los cotiledones y el ápice meristemático. A continuación, se eliminó el cuello de la plántula obteniendo por una parte el hipocótilo y por otra la raíz (Figura 6). Finalmente se cortaron las raíces secundarias y se cultivaron 5 o 6 explantes de hipocótilo o raíz por bote. En el medio D se cultivaron 11 explantes de hipocótilo y 5 de raíz, en el medio DB 15 de hipocótilo y 17 de raíz, en el medio DK se cultivaron 13 explantes tanto para hipocótilo como para raíz, y por último en el medio DP se cultivaron 6 explantes de hipocótilo y 12 de raíz.

3.3.4 Cultivo en medios organogénicos

Se utilizaron tres medios para intentar conseguir la formación de callo desorganizado y posterior regeneración adventicia mediante organogénesis. Para prepararlos se añadieron al medio base diversos tipos de hormonas vegetales en cantidades variables. Los tres medios organogénicos contenían la auxina ANA y diferentes tipos de citoquininas (Kinetina, 6-Benciladenina y 2iP).

Tabla 5. Composición hormonal de los medios organogénicos utilizados en el ensayo.

COMPONENTES (mg·L ⁻¹)			
	NB	NK	NP
Ácido naftalenacético	0,2	0,2	0,2
6-Benciladenina	5,0		
Kinetina		5,0	
2iP			5,0

En los medios organogénicos se cultivaron explantes de hipocótilo, raíz y cotiledón. Los dos primeros se obtuvieron como se ha descrito en el apartado anterior y se cultivaron en los tres tipos de medio. En el medio NB se cultivaron 15 explantes de hipocótilo y 14 de raíz, en el medio NK 10 de hipocótilo y 27 de raíz y por último en el medio NP se cultivaron 24 explantes de hipocótilo y 12 de raíz.

Los cotiledones se cultivaron únicamente en el medio NB. En este caso se decidió probar el efecto del empleo de explantes y de microexplantes obtenidos de plántulas axénicas en estado ontogénico 3. En primer lugar, se separaron los cotiledones de la plántula y se eliminaron los extremos distales. En el caso de los microexplantes se realizaron dos cortes longitudinales y dos transversales obteniendo nueve microexplantes de cada cotiledón. En cada placa se cultivaron 5 o 6 explantes de cotiledón con medio líquido (el mismo medio descrito anteriormente, pero sin adicionar el agar bacteriológico), trascurridas 24 horas se realizaba un cambio de medio para evitar los efectos perjudiciales de la oxidación polifenólica. Tras otras 24 horas se cultivaban los explantes en una placa Petri con medio sólido donde se dejaban hasta su evaluación. Al medio líquido se le añadió vancomicina, un antibiótico que evita la proliferación de microorganismos. Se cultivaron un total de 69 explantes y 97 microexplantes de cotiledón.

3.3.5 Evaluación de la respuesta morfogénica

Para evaluar la respuesta morfogénica de los explantes de hipocótilo, raíz, cotiledón y de los ápices meristemáticos, se contabilizó el número de explantes de los que se obtuvo respuesta una vez transcurridos 30 días de cultivo.

En primer lugar, se identificó aquellos explantes en los que se había formado callo desorganizado. Esta masa de células en división activa surge habitualmente desde las zonas de corte, no tiene estructura definida y su color puede variar desde un color crema hasta el verde. A continuación, se comprobó si había algún tipo de estructura organizada. En el caso de los ápices meristemáticos se observaba si había formación de raíces adventicias y elongación del tallo. En los medios embriogénicos se buscaban embriones somáticos y en los organogénicos la aparición de yemas, ápices o brotes. Se contabilizó cuántos explantes presentaban cada tipo de estructura.

4 Resultados y discusión

4.1 Esterilización y germinación de las semillas

Los experimentos comenzaron con la esterilización de semillas de diferentes genotipos para obtener plántulas que no presentaran ningún tipo de contaminación y que proporcionaran los explantes necesarios para los experimentos diseñados.

Inicialmente se esterilizaron cuatro genotipos (ICAPIJAO, BOLITA, JAMAPA, BAT93). Se emplearon dos métodos distintos, el primero con una disolución de lejía comercial al 50% y el segundo con dos tratamientos consecutivos de lejía comercial al 25%. Todas las esterilizaciones se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente. El porcentaje de contaminación global fue del 10% cuando se esterilizó con un tratamiento al 50% y superior al 16% cuando se hicieron dos esterilizaciones al 25% (Tabla 6).

Tabla 6. Proporción de semillas contaminadas y germinadas con esterilización al 50% (dcha.) y al 25 + 25% (izq.) de los genotipos iniciales.

GENOTIPO	50%		25+25%	
	% contaminación	% semillas germinadas	% contaminación	% semillas germinadas
ICAPIJAO	0	27	7	0
BOLITA	7	0	40	0
JAMAPA	20	13	7	0
BAT93	13	0	13	0

Los resultados relacionados con el estado axénico del cultivo fueron buenos ya que ambos tratamientos son eficaces para eliminar la mayor parte de la contaminación superficial de las semillas. Además, en este caso, la doble esterilización no supone una ventaja clara frente a la esterilización única ya que se dan valores de contaminación menores, iguales y mayores entre ambos tratamientos.

Por otra parte, la tasa de germinación fue muy baja o nula en todos los casos. La germinación fue mejor cuando se usó el primer método de esterilización. Se consiguió que germinaran dos variedades a diferencia del segundo método donde no germinó ninguna de las cuatro variedades empleadas. En cualquier caso, los protocolos analizados no proporcionaron unas eficacias de obtención de plántulas axénicas adecuadas para abordar el resto de los experimentos.

Para intentar mejorar el índice de germinación se realizaron dos tratamientos térmicos a las semillas. Se mantuvieron durante tres o cuatro días a 4°C y a -20°C hasta el momento de la esterilización para intentar revertir posibles fenómenos de latencia. Se utilizaron los mismos métodos de esterilización, pero los resultados obtenidos con las mismas cuatro variedades no fueron satisfactorios. Tanto en las semillas almacenadas a 4°C como a -20°C se produjo una menor contaminación (los valores más altos no llegaron al 7%) pero la cantidad de semillas germinadas fue incluso menor que en el experimento anterior. Solo germinaron algunas semillas en las variedades Icapijao y Jamapa con el método de esterilización al 50% y con 4°C de temperatura.

Tras los experimentos realizados se decidió descartar los genotipos utilizados ya que, probablemente por un excesivo periodo de almacenaje, habían perdido su poder germinativo. Como no se podían conseguir semillas de estos genotipos en un plazo corto de tiempo decidimos adquirir semillas de judía en un supermercado para proseguir los experimentos. Las semillas de los nuevos genotipos (PV1, PV2 y PV3) se esterilizaron como en el primer experimento (Tabla 7).

Tabla 7. Proporción de semillas contaminadas y germinadas con esterilización al 50% (dcha.) y al 25 + 25% (izq.) de los nuevos genotipos.

GENOTIPO	50%		25+25%	
	% contaminación	% semillas germinadas	% contaminación	% semillas germinadas
PV1	27	0	3	0
PV2	3	27	3	3
PV3	0	27	13	20

De nuevo funcionó mejor el tratamiento único de esterilización. Con esas condiciones se consiguió un porcentaje de contaminación adecuado en las variedades PV2 y PV3. En este caso se contaminaban menos del 3% de las semillas esterilizadas y en ambos casos germinaron el 27% de las semillas. Se vio que la variedad PV1 presentaba una mayor contaminación y no germinó en ningún caso. Por si la baja eficacia de germinación se debía a que las semillas se veían afectadas por el hipoclorito sódico y visto que la contaminación parecía controlada, se modificó el porcentaje de este componente, reduciéndolo del 50% al 30% y del 25% al 15%.

Tabla 8. Proporción de semillas contaminadas y germinadas con esterilización al 30% (dcha.) y al 15 + 15% (izq.) de los nuevos genotipos.

GENOTIPO	30%		15+15%	
	% contaminación	% semillas germinadas	% contaminación	% semillas germinadas
PV1	18	3	15	0
PV2	6	55	9	3
PV3	3	29	16	6

Al reducir el porcentaje de hipoclorito sódico del 50% al 30% aumentó la cantidad de semillas germinadas llegando al 55% en el caso de PV2. Esto apoya la hipótesis de que una excesiva concentración de lejía podía estar influyendo negativamente en la capacidad germinativa de las semillas. Por otro lado, con dos esterilizaciones al 15% se aumentó ligeramente el porcentaje de contaminación respecto a una esterilización única como pasó en el experimento anterior. Esto, unido al hecho de que la germinación era menor, nos hizo descartar para el futuro este tratamiento esterilizante. En la bibliografía se han probado otros tratamientos que no utilizamos habitualmente en el laboratorio para esterilizar semillas. Así, Barrera-Moreno y colaboradores (2018) realizaron la esterilización superficial de las semillas en placas Petri con gas cloro durante 16 horas. Para ello se mezcló 4 mL de HCl 12 N con 100 mL de clorox comercial dentro de una cabina de extracción de gases. Con este método se contaminaron el 6% de las semillas. Esta metodología se podría probar en el futuro con nuestras variedades.

En cuanto a las tres variedades evaluadas, no se consiguió que germinara prácticamente ninguna semilla de la variedad PV1 en ninguna de las condiciones analizadas por lo que se descartó para experimentos futuros. Por otro lado, aunque PV3 sí que produjo plántulas axénicas su eficacia no superaba el 30%. Además, se observó que estas semillas tenían una germinación muy dispar en el tiempo lo que dificultaba su utilización (Figura 7).

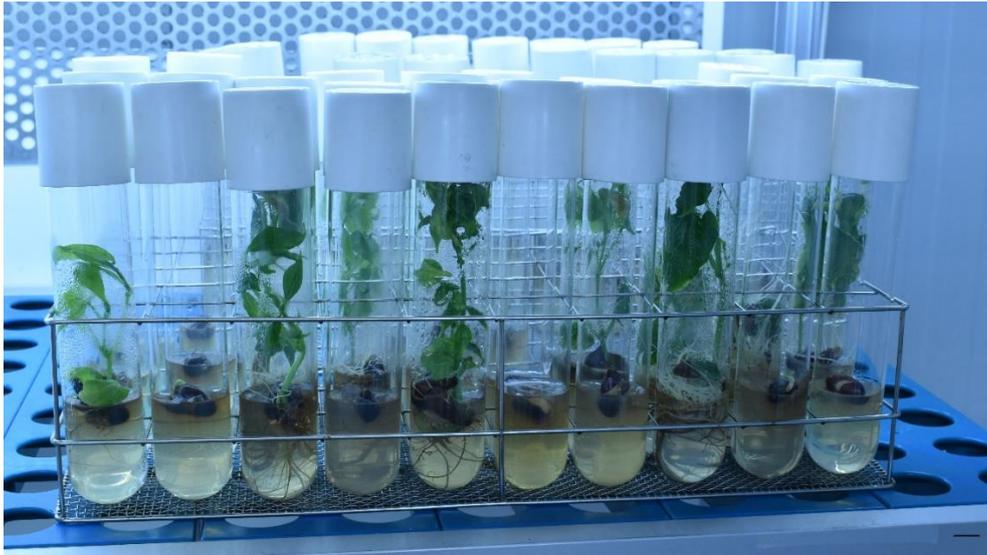


Figura 7. Germinación desagrupada de semillas de PV3. La barra representa 1cm.

Por tanto, los experimentos se realizaron con el genotipo PV2 esterilizándolo con un tratamiento de lejía comercial al 30%. Esperamos en el futuro disponer de semillas más recientes y, por tanto, con mayor poder germinativo, para intentar aplicar los resultados obtenidos en ese nuevo material vegetal.

4.2 Identificación de los estados ontogénicos

Conocer en qué estado ontogénico se encuentra la plántula es muy útil para llevar a cabo la inducción del proceso morfogénico y que se desarrolle lo mejor posible. Como ya se ha comentado este estudio se realizó a partir de semillas esterilizadas de la variedad PV2.

El estado 0 corresponde a la semilla sin germinar. Las semillas empezaron a emitir la radícula, estado 1, tres días después de su esterilización, tras pasar por la cámara de oscuridad. Cuando llevaban dos días en fotoperiodo apareció la radícula y los

cotiledones tomaron un color verde más intenso (estado 2). Al día siguiente (5 días después de la esterilización) ya presentaban un hipocótilo elongado y el sistema radicular estaba más desarrollado. Además, los cotiledones se habían separado por lo que era más sencillo su manipulación (estado 3). La aparición de la primera hoja (dos días después del estado 3) marca el inicio del estado 4. El desarrollo de la plántula continúa la elongación del epicótilo y el tallo, la formación de nuevas hojas y el desarrollo del sistema radicular (estado 5).



Figura 8. Estados ontogénicos de *Phaseolus vulgaris*. L. (PV2). La barra representa 1 cm.

Por trabajos previos con esta especie y por nuestra experiencia en otras especies, se decidió trabajar con explantes procedentes de plántulas en estadio 3. En este estado, que se produce cinco días después de la esterilización de las semillas, ya se han formado todos los explantes que queremos utilizar, se pueden individualizar fácilmente y todavía no han comenzado procesos de envejecimiento y senescencia propios de estados más avanzados.

4.3 Cultivo de explantes meristemáticos

En este experimento se evaluó la brotación axilar a partir de ápices meristemáticos en estado ontogénico 3. Se utilizaron tres tipos de medio, cada uno con un regulador del crecimiento distinto. En total se cultivaron 105 ápices meristemáticos (35 en cada tipo de medio) en condiciones de fotoperiodo durante 30 días (Figura 9).



Figura 9. Desarrollo de los ápices meristemáticos tras 30 días de cultivo. A: Explantes iniciales. B: Desarrollo en medio con Kinetina. C: Desarrollo en medio con 2iP. D: Desarrollo en medio con 6-Benciladenina. La barra representa 1cm.

Trascurrido el tiempo de cultivo se observó que en todos los casos había crecimiento de los ápices meristemáticos y formación de un tallo elongado con múltiples hojas y un sistema radicular adventicio perfectamente funcional. No se observaron diferencias significativas entre los medios empleados y cualquiera de ellos puede ser empleado como medio de clonación en trabajos futuros.

4.4 Evaluación de la respuesta embriogénica

En este experimento se evaluó la respuesta embriogénica de los explantes de hipocótilo y raíz en medios con combinaciones distintas de reguladores del crecimiento.

4.4.1 Respuesta embriogénica en explantes de hipocótilo y raíz

Los explantes de hipocótilo y raíz se encontraban en estado ontogénico 3 y se cultivaron durante 30 días en condiciones de fotoperiodo. Pasado este tiempo se contabilizó el número de explantes sin crecimiento, con crecimiento desorganizado y con crecimiento embriogénico. En total, se evaluó la respuesta embriogénica de más de 45 explantes de hipocótilo y raíz respectivamente. En todos los medios de cultivo se consiguieron explantes de hipocótilo que desarrollaran callos desorganizados con valores superiores al 60% (Figura 10).

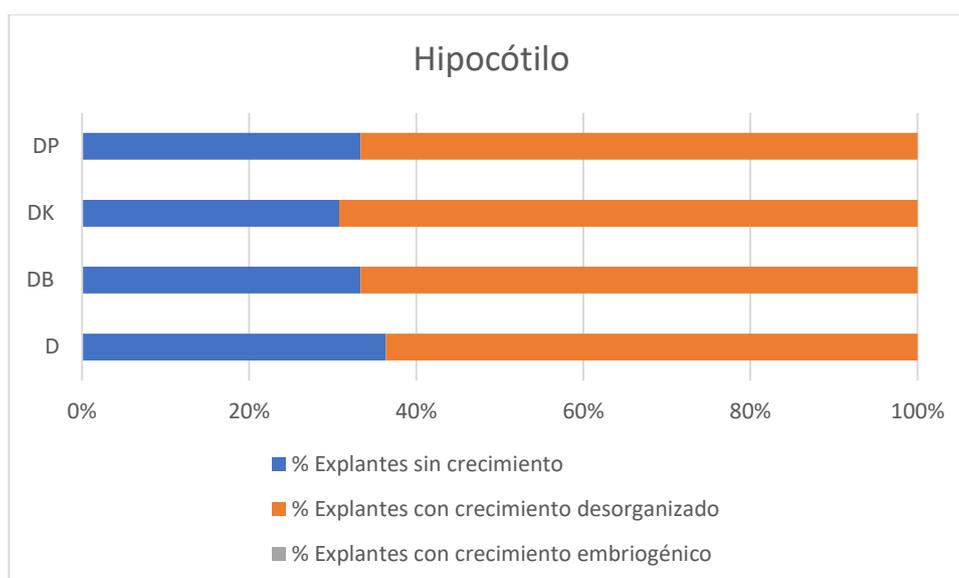


Figura 10. Eficacia de la regeneración de los explantes de hipocótilo PV2 cultivados durante 30 días según el medio embriogénico.

Sin embargo, en ninguno de los explantes analizados se detectó desarrollo embriogénico (Figura 11).

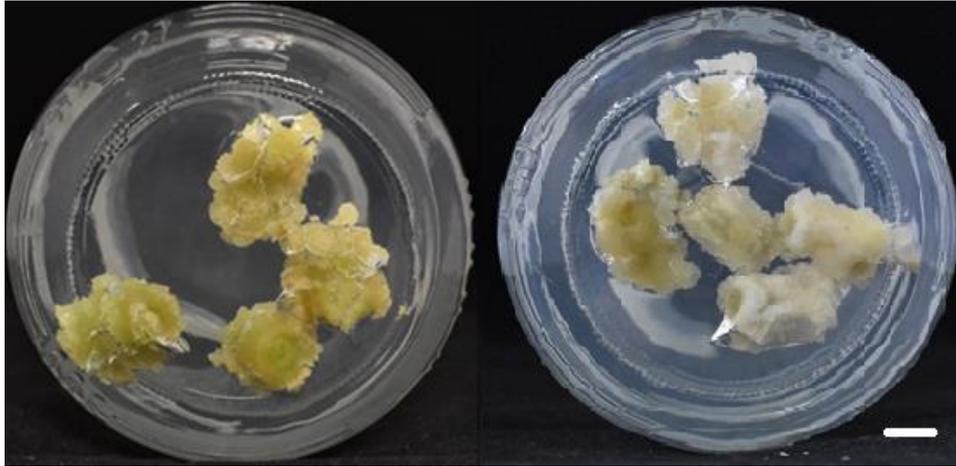


Figura 11. Explantes de hipocótilo PV2 cultivado en medio de cultivo DB (drcha.) y DK (izqda..) durante 30 días. La barra representa 1cm.

Como se ha producido el primer paso de la respuesta embriogénica, formación de callo desorganizado, pero no se ha completado el proceso, estos explantes se van a subcultivar al mismo medio del que provienen para ver si la respuesta embriogénica necesita de más tiempo para producirse.

En cuanto a la respuesta de los explantes procedentes de raíz, en este caso sí que se observó una diferencia clara en función del medio de cultivo empleado (Figura 12).

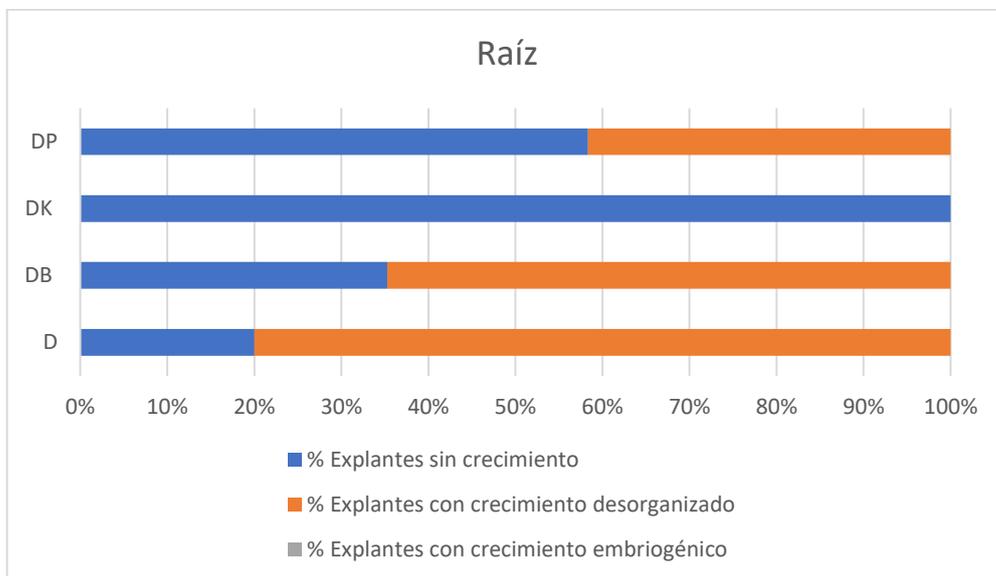


Figura 12. Eficacia de la regeneración de los explantes de raíz PV2 cultivados durante 30 días según el medio embriogénico.

En el medio D, en el que solo se añadió una auxina, se alcanzaron los valores más altos de generación de callo desorganizado, un 80%. Por el contrario, en el medio DK no

se consiguió ningún tipo de regeneración y en los otros dos medios en los que se mezclaba una auxina con una citoquinina la respuesta fue variable (Figura 13).

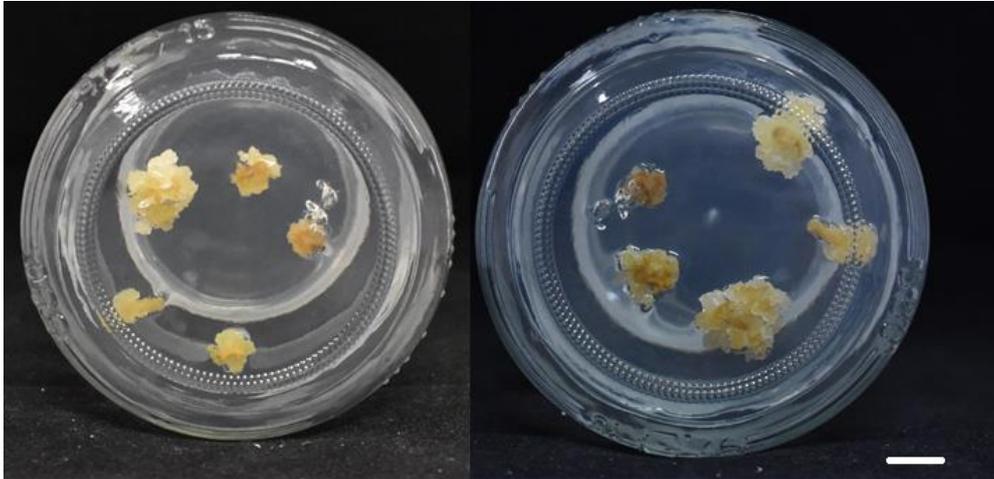


Figura 13. Explantes de raíz PV2 cultivados durante 30 días en medio de cultivo DB (dcha.) y DP (izda.). La barra representa 1cm.

En todos los casos el proceso embriogénico se detuvo en la etapa de formación de callo desorganizado. Con este tipo de explantes pensamos seguir la misma estrategia que en el anterior, aumentar el tiempo de exposición del callo desorganizado al medio con 2,4-D para ver si de esta forma se consigue la formación de estructuras embriogénicas.

4.5 Evaluación de la respuesta organogénica

En los siguientes experimentos se evaluó la respuesta organogénica de los explantes de cotiledón, hipocótilo y raíz, en medios con distintas combinaciones de reguladores del crecimiento.

4.5.1 Respuesta organogénica de segmentos de cotiledón

Se evaluó la respuesta morfogénica de los explantes de cotiledón en estado ontogénico 3 y de microexplantes obtenidos a partir de ellos en medio NB. Se empleó ese medio porque en otras especies con las que trabaja el grupo había dado buen resultado con este tipo de explante. Se evaluó la respuesta organogénica de más de 160 segmentos cultivados durante 30 días en condiciones de fotoperiodo (Figura 14).

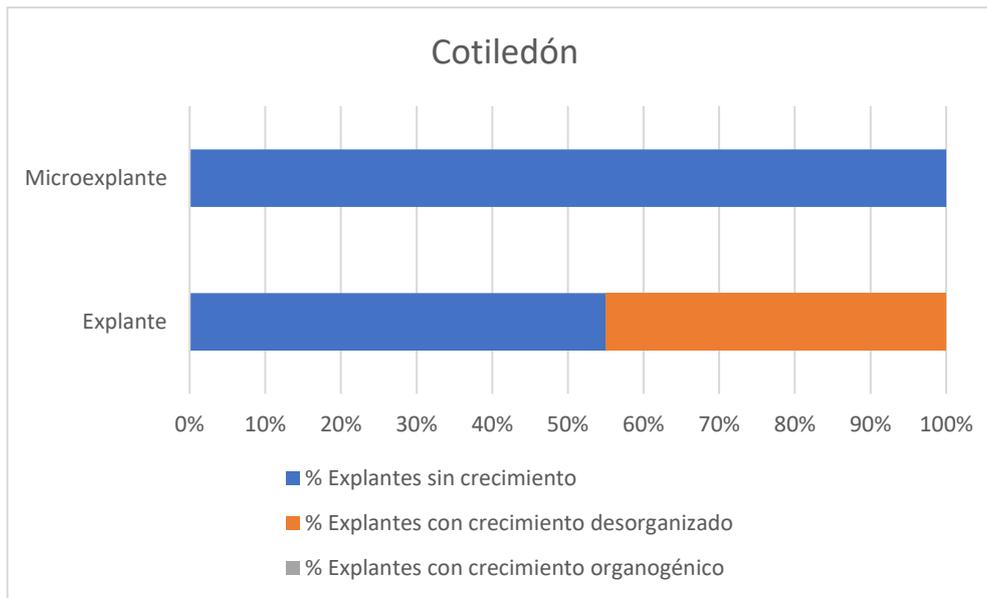


Figura 14. Eficacia de la regeneración de los explantes y microexplantes de cotiledón PV2 en medio NB tras 30 días de cultivo.

En los microexplantes no se produjo ningún tipo de crecimiento, ni siquiera de callo desorganizado. Además, se observó la emisión al medio de cultivo de sustancias marrones procedentes del explante. Este fenómeno se conoce como oxidación polifenólica y es un problema habitual en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Al ser una reacción de oxidación su incidencia es mayor cuanto más se exponen estas sustancias que se encuentran en el interior de los tejidos al contacto con el oxígeno del aire. Por tanto, es normal que los microexplantes, con una mayor superficie de corte que los explantes, padezcan en mayor medida este problema y, por tanto, tengan más problemas para producir callo desorganizado. En los explantes de cotiledón sí hubo crecimiento desorganizado en el 45% de los cultivados, pero el proceso morfogénico se detuvo en esta etapa, ya que no llegaron a desarrollarse estructuras diferenciadas.

Este resultado fue similar al obtenido por Arellano y colaboradores (2009) en el que los explantes de cotiledón produjeron callos desorganizados, pero no estructuras organogénicas. Para el futuro nos planteamos ampliar los tipos y combinaciones de reguladores del desarrollo, añadir agentes antioxidantes al medio de cultivo para minimizar los problemas de oxidación polifenólica y probar con explantes de cotiledón más jóvenes que los que se obtienen en el estado ontogénico 3.

4.5.2 Respuesta organogénica en explantes de hipocótilo y raíz

En este experimento se evaluó la respuesta organogénica de los explantes de hipocótilo y raíz, en medios con distintas combinaciones de reguladores del crecimiento. Tanto los explantes de raíz como los de hipocótilo se obtuvieron de plántulas en estado ontogénico 3 y se cultivaron durante 30 días en condiciones de fotoperiodo, pasado este tiempo se contabilizó el número de explantes sin crecimiento, con crecimiento desorganizado y con crecimiento organogénico. En total, se evaluó la respuesta organogénica de más de 50 explantes de raíz e hipocótilo respectivamente.

La cantidad de explantes de raíz que desarrollaron callos desorganizados fue variable entre los medios utilizados. El que presentó un mejor resultado fue el medio NB en el que más del 40% de los explantes produjeron este tipo de callo (Figura 15).

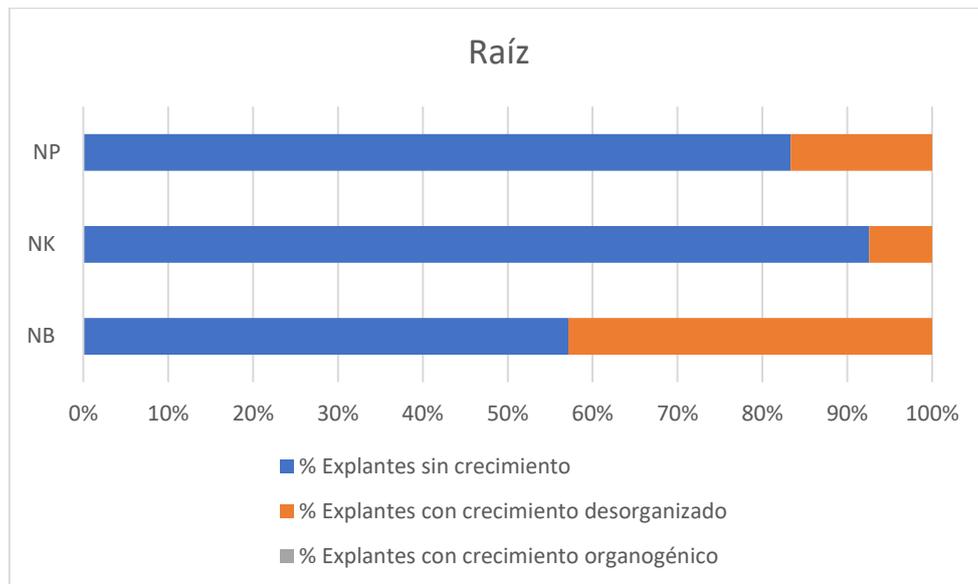


Figura 15. Eficacia de la regeneración de los explantes de raíz PV2 cultivados durante 30 días en diferentes medios organogénicos.

Como ocurrió en el caso de la embriogénesis ningún explante produjo ninguna estructura organogénica (Figura 16).

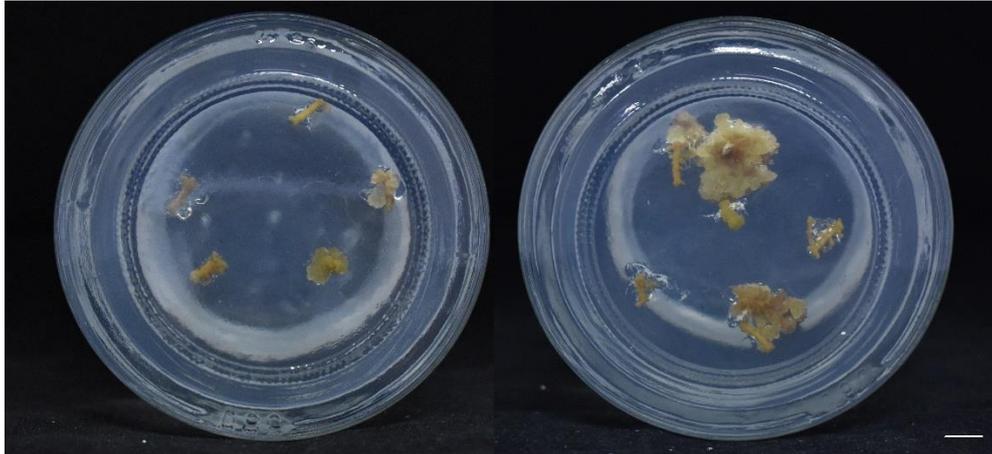


Figura 16. Explantes de raíz PV2 cultivados durante 30 días en medio de cultivo NP (izqda.) y NB (dcha.). La barra representa 1cm.

Al evaluar los resultados obtenidos a partir de hipocótilo comprobamos que en todos los medios se consiguieron explantes que desarrollen callos desorganizados con valores superiores al 40% (Figura 17).

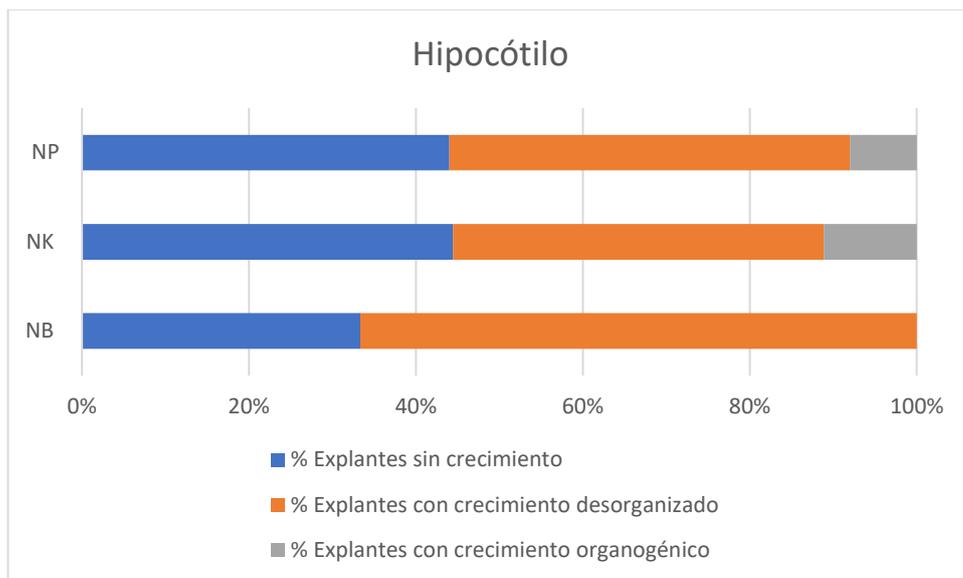


Figura 17. Eficacia de la regeneración de los explantes de hipocótilo PV2 tras 30 días de cultivo según medios de cultivo organogénicos.

Además, se obtuvo una respuesta organogénica, aunque no era la que se buscaba (desarrollo de la parte aérea de la planta). En los medios NP y NK algunos explantes formaron raíces adventicias (Figura 18).

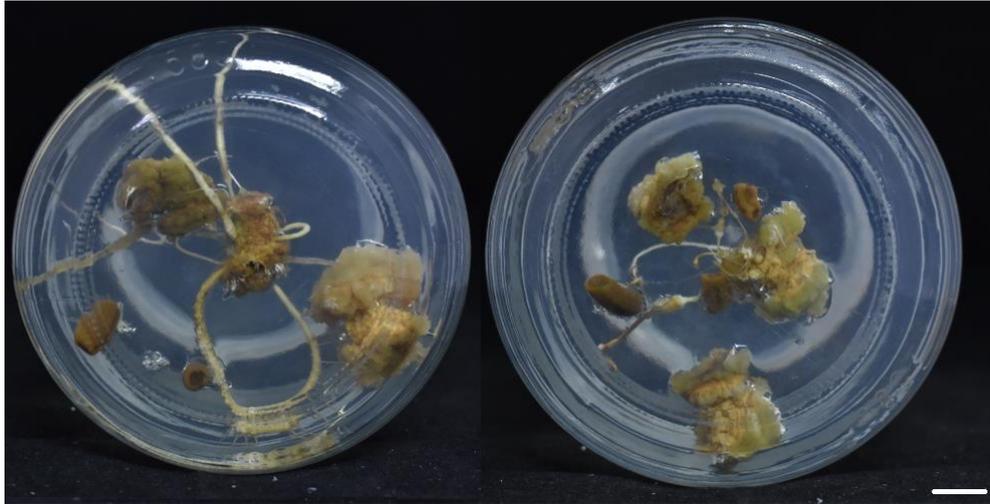


Figura 18. Explantes de hipocótilo PV2 cultivados durante 30 días en medio NK (izqda.) y NP (drcha.) La barra representa 1cm.

El resultado coincide con un experimento realizado anteriormente (Arellano et al, 2009) donde los explantes de hipocótilo produjeron una buena cantidad de callos desorganizados, pero no pudieron regenerar ningún brote, aunque si se observó la regeneración de raíces adventicias. Como ya se ha comentado en experimentos anteriores, habrá que aumentar el tiempo de cultivo y tipos de medio, sin olvidar las medidas que minimicen los problemas de oxidación polifenólica, para lograr las condiciones adecuadas para la regeneración adventicia de nuevos brotes que nos permita la aplicación en métodos de mejora biotecnológica en esta especie de elevado interés económico.

5 Conclusiones

Tras los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir lo siguiente:

- Tras el manejo de siete variedades de judía seca, se ha puesto a punto un método de esterilización de semillas que nos ha permitido obtener material axénico en cinco de estas variedades. Sin embargo, la baja tasa de germinación o la germinación no sincrónica nos ha hecho elegir únicamente la variedad PV2 para llevar a cabo el resto de experimentos.

- Se han establecido los estados ontogénicos de desarrollo a partir de semilla esterilizada lo cual nos ha permitido establecer que el estado 3, el más adecuado para la obtención de los explantes, se produce cinco días tras la esterilización de las semillas.

- Se ha conseguido la brotación axilar de los ápices meristemáticos en los tres medios de cultivo evaluados. En todos ellos se ha formado perfectamente la parte aérea de la planta (tallo y hojas) y un sistema radicular adventicio funcional por lo que estas condiciones pueden usarse también para la clonación de plantas.

- Se ha conseguido la formación de callo desorganizado en diferentes medios y tipos de explante cultivados en medios embriogénicos. Sin embargo, no se ha observado la formación de ninguna estructura embriogénica en ellos. El aumento del tiempo de cultivo y el diseño de nuevos medios de cultivo pueden ayudar a lograr este objetivo.

- Se ha conseguido la regeneración de raíces adventicias a partir de explantes de hipocótilo. Sin embargo, tampoco se ha conseguido la regeneración adventicia de nuevos brotes a partir de explantes de hipocótilo, raíz o cotiledón. Se han observado problemas de oxidación polifenólica que pueden dificultar dicha regeneración y cuya solución pueden mejorar resultados futuros con esta especie.

6 Bibliografía

- Arellano, J., Fuentes, S.I., Castillo-España, P. et al. (2009). Regeneration of different cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) via indirect organogenesis. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 96, 11–18.
- Barrera-Moreno, J.J. (2018). TRANSFORMACIÓN GENÉTICA MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens* EN FRIJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris* L.) 92pags.
- Calva, C.G. & Ríos L.E. (1999). Cultivo de callos y acumulación de metabolitos secundarios. En: Rodríguez V. R., Calva C. G., Ramos R. E. G., Salazar M. A. (Eds.) Aspectos aplicados de la biotecnología. pp 267-301.
- Camarena, F., Chura, J. & Blas, R. (2012). Mejoramiento genético y biotecnológico de plantas. Universidad Nacional Agraria La Molina. La Molina. Lima-Perú. pp277.
- Collado, R. y Bermúdez Caraballos, I. García, L. R.; Veitía, N.; Torres, D., Romero, C., & Angenon, G. (2016). Epicotyl sections as targets for plant regeneration and transient transformation of common bean using *Agrobacterium tumefaciens*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 52(5), 500–511.
- Collado, R., Bermúdez Caraballos, I., García, L. R., Veitía, N., Torres, D., Romero Martínez, Concepción y Martirena Ramírez, A. y Angenon, G. (2015) *Agrobacterium-mediated transformation of Phaseolus vulgaris L. using indirect organogenesis*. *Scientia Horticulturae*, 195. pp. 89-100.
- Cuéllar, M.E. & Morales, F.J.(2006). La mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) como plaga y vectora de virus en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Colombiana de Entomología* 32(1): 1-9.
- Debouck, D.G & Hidalgo, R. (1984). Morfología de la Planta de frijol Común. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO. p. 7-44.
- Espinoza-Montesinos, E.A. (2009). “EVALUACIÓN DE 16 GENOTIPOS SELECCIONADOS EN DOS DENSIDADES DE SIEMBRA DE FRIJOL CANARIO CV. CENTENARIO (*Phaseolus vulgaris* L.) POR SU CALIDAD Y RENDIMIENTO EN CONDICIONES DE COSTA CENTRAL”. Tesis. Lima, Perú: Universidad Nacional Agraria La Molina. Escuela de postgrado. 179 p.

- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2021) (<http://faostat.fao.org>) [Consulta:07 Julio 2021]
- Gilmore, B., J.R. Myers and D. Kean. (2002). Annu. Rpt. Bean Improv. Coop. 45:64-65.
- Gisbert Doménech, M.C. & Picó Sirvent, M.B. (2015). Utilización del rescate de embriones en programas de mejora vegetal.
- Hernández López, Víctor M., Vargas-Vázquez, Ma. Luisa P., Muruaga-Martínez, José S., Hernández-Delgado, Sanjuana., & Mayek-Pérez, Netzahualcóyotl. (2013). ORIGEN, DOMESTICACIÓN Y DIVERSIFICACIÓN DEL FRIJOL COMÚN. AVANCES Y PERSPECTIVAS. Revista Fitotecnia Mexicana, 36(2),95-104. ISSN: 0187-7380.
- Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T., Gerszberg, A. et al. (2019). Regeneration of *Phaseolus vulgaris* from epicotyls and hypocotyls via direct organogenesis. Sci Rep 9, 6248.
- Jones, A.L. (1999) PHASEOLUS BEAN: Post-harvest Operations. Centro Internacional de Agricultura Tropical. 24 pp.
- Kaplan, L. (1965). Archeology and domestication in American *Phaseolus* (Beans). Econ Vol.10, pp 358–368.
- Lewis, G.P., Schrire, B.D., Mackinder, B.A., Rico, L., Clark, R. (2013). A 2013 linear sequence of legume genera set in a phylogenetic context — A tool for collections management and taxon sampling, South African Journal of Botany, Vol. 89, pp. 76-84.
- Llorente, B.E. (2002). Aislamiento, purificación, caracterización y producción *in vitro* de peptidasas de alcaucil coagulantes de la leche. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas. Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales. pp 28-42.
- Lépiz, I. R. (2000). Simposio: contribución de la fitopatología al mejoramiento de los cultivos agrícolas. El caso del frijol. Rev. Mex. Fitopatol. 17:54-72.
- Lema, M.M., Terán, H., Otto, K., Scheartz, H.F., Singh, S.P. (2008). Mejora genética de la resistencia a *Sclerotinia* en judía. Actas de la Asociación Española de Leguminosas, 3: 157-158.
- Martínez-Núñez, L. & Gago-Mariño, J. (2008). Micropropagación vegetal. Alumnos de tercer ciclo, laboratorio de Biotecnología Vexetal. Universidad de Vigo.

- Miklas, P.N., R. Delorme, R. Hannan, and M.H. Dickson. (1999). Using a subsample of the core collection to identify new sources of resistance to white mold in common bean. *Crop Sci.* 39:569–573.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación [Consulta:07 Julio 2021].
- Morales-Soto, A. & Lamz-Piedra, M. (2020). Métodos de mejora genética en el cultivo del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) frente al Virus del Mosaico Dorado Amarillo del Frijol (BGYMV). *Cultivos Tropicales*, vol. 41, no. 4, e10.
- Olmedilla, B., Farré, R., Asensio, C., & Martín, M. (2010). Papel de las leguminosas en la alimentación actual. *Actividad Dietética*,14(2), 72-76.
- Perea, M. (2009). Cultivo de Tejidos Vegetales *In Vitro*. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. Facultad de Ciencias. 148pp.
- Saburido-Álvarez, M.S. & Herrera-Estrella, A. (2015). El frijol en la era genómica. *Revista digital universitaria*, Vol. 16, Num. 2.
- Skoog F. & Miller C.O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. *Symposia of the society for Experimental Biology* 11:118-131.
- Street, H.E. (1977). Cell (suspension) cultures techniques. *Plant Tissue and Cell Culture*, Ed.: Herbert Edward Street, Leicester, Inglaterra. pp 61-102.
- Van Houtte, L.B., (1849). *Flore des serres et des jardin de l'Europe* Fl. Serres vol. 5: p. 433