

# AN IMPROVED METHOD FOR *in vitro* REGENERATION OF COMMON BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.)

## MÉTODO EFICIENTE DE REGENERACIÓN *in vitro* DE FRIJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris* L.).

Anareli Quintero-Jiménez, Elsa Espinosa-Huerta, J. Alberto Acosta-Gallegos,  
H. Salvador Guzmán-Maldonado, M. Alejandra Mora-Avilés\*

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Unidad de Biotecnología de Plantas. km 7.5, Carretera Celaya-San Miguel de Allende. Apartado Postal 112. 38110 Celaya, Guanajuato. (mora.alejandra@inifap.gob.mx).

### ABSTRACT

*In vitro* regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a requirement for genetic transformation which involves induction and development to the whole plant. Success in regeneration of common bean from tissue organ culture has been achieved to some extent in the last years. However, genotype effects in regeneration response as well as efficiency and reproducibility have been a limiting factor. Embryos, from four different varieties, were excised from sterilized mature seeds and cultured in Murashige and Skoog (MS) or Gamborg (GM) media containing 6-benzylaminopurine (BAP) ( $10 \text{ mg}^{-1}$ ) and adenine (A) (0 or  $20 \text{ mg}^{-1}$ ). Efficient regeneration was achieved when inducing formation of differentiation of cells like bud clusters at the internodal segment of the embryo axes in the four varieties studied. One way analysis of variance and Tukey media comparison ( $p \leq 0.05$ ) showed that regeneration efficiency varied considerably between the two basic media. GM media provided high bud cluster formation (97.8 to 100 %) and full plant regeneration (93 %), whereas MS medium showed lower bud cluster formation (15 to 73 %), and full plant regeneration (29 %). It is provided evidence of how the culture media and growth regulators influence the regeneration of common bean, when seeking for an efficient transformation protocol.

**Key words:** Adenine, bud clusters, embryonic axes, gamborg medium, organogenesis.

### RESUMEN

La regeneración *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es un requisito para la transformación genética que involucra inducción y desarrollo de una planta completa. La regeneración del frijol común a partir del cultivo de tejidos se ha alcanzado con cierto grado de éxito en los últimos años. Sin embargo, los efectos del genotipo en la capacidad regenerativa, así como la eficiencia y la reproductibilidad han sido factores limitantes. Se extrajeron embriones, de cuatro variedades diferentes, de semillas maduras esterilizadas y cultivadas en medios de cultivo Murashige y Skoog (MS) o Gamborg (GM) con 6-bencilaminopurina (BAP) ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) y adenina (A) (0 o  $20 \text{ mg L}^{-1}$ ). La regeneración eficiente se obtuvo al inducir la formación de células diferenciadas como grupos de yemas en el segmento internodal de los ejes embrionarios en las cuatro variedades estudiadas. El análisis de varianza de una vía y la comparación de medias por la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) mostró que la eficiencia de regeneración varió considerablemente entre los dos medios de cultivo básicos. El cultivo GM produjo una alta formación de grupos de yemas (97.8 a 100 %) y regeneración de plantas completas (93 %), mientras que el cultivo MS mostró una menor formación de grupos de yemas (15 a 73 %) y regeneración de plantas completas (29 %). Esto proporciona evidencia sobre cómo los medios de cultivo y los reguladores del crecimiento influyen en la regeneración del frijol común, cuando se busca un protocolo de transformación eficiente.

**Palabras clave:** adenina, grupos de yemas, ejes embrionarios, medio Gamborg, organogénesis.

### INTRODUCCIÓN

El frijol común es un alimento básico y una de las principales fuentes de proteína en la dieta de la población de Latinoamérica y África del

\* Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: October, 2008. Approved: September, 2009.

Published as Note in *Agrociencia* 44: 57-64. 2010.

## INTRODUCTION

Common bean is a staple food and one of the main sources of protein in the diet of population from Latin America and East Africa (Cruz de Carvalho *et al.*, 2000). Common bean breeding programs intend to incorporate characteristics such as drought tolerance, resistance to pests and diseases, as well as increased nutritional quality (CIAT, 2008). Currently, several genetic engineering techniques are used to improve these characteristics however; common bean regeneration using published methods was not easily reproducible (Dillen *et al.*, 2000; Cruz de Carvalho *et al.*, 2000; Veltcheva *et al.*, 2002).

Heterologous or homoeologous gene transfer is becoming a common approach in genetic improvement programs. This process, together with traditional plant breeding methods, could accelerate the development of new cultivars with specific characteristics such as drought resistance, acid soil adaptation, upright architecture, long shelf life and nutritional quality (Aragao *et al.*, 2002).

The basis of the regeneration of common bean with high efficiency in a broad spectrum genetic material will allow including genetic transformation as part of the common bean breeding programs, now in progress by our group. Improvement of regeneration system protocol is focused on increasing the array of races of common bean in which the protocol can be applied. These genotypes are part of our common bean national breeding program due to their agronomical and quality advantages.

The objective of the present study was to develop an improved and reproducible method for organogenic bud induction from embryonic axis of four common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material

Mature seeds four common bean cultivars G13637 Apetito (G1) (CIAT), ICA Palmar G4523 (IP) (CIAT), Pinto Saltillo (PS) (Reg. No. FRI-035-161181) (Castillo *et al.*, 1997) and Flor de Mayo Anita (FMA) (1494-FRI-032-220302/C) (Castellanos *et al.*, 2003) were sterilized with gas chlorine (commercial chlorine (Cloralex®) and 12N HCl (v/v 5:0.16) in a desiccator and they were used as explants donors.

Este (Cruz de Carvalho *et al.*, 2000). Los programas de mejoramiento genético del frijol común buscan incorporar características como tolerancia a la sequía, resistencia a plagas y enfermedades, así como aumentar la calidad nutricional (CIAT, 2008). Actualmente, se usan diversas técnicas de ingeniería genética para mejorar estas características; sin embargo, la regeneración del frijol común mediante el uso de métodos publicados no fue fácilmente reproducible (Dillen *et al.*, 2000; Cruz de Carvalho *et al.*, 2000; Veltcheva *et al.*, 2002).

La transferencia de genes heterólogos u homólogos se está convirtiendo en un enfoque común en los programas de mejoramiento genético. Este proceso, aunado a métodos tradicionales para el mejoramiento genético de la planta, podrían acelerar el desarrollo de nuevos cultivares con características específicas, como resistencia a la sequía, adaptación a los suelos ácidos, arquitectura vertical, larga vida de anaquel y calidad nutricional (Aragao *et al.*, 2002).

La regeneración del frijol común de alta eficiencia a partir de material genético de amplio espectro permitirá incluir a la transformación genética como parte de los programas de mejoramiento genético del frijol común, actualmente en desarrollo por nuestro grupo. El mejoramiento del protocolo para la regeneración se centra en aumentar la selección de razas de frijol común en las que se puede aplicar el protocolo. Estos genotipos son parte de nuestro programa de mejoramiento genético del frijol común por sus ventajas agronómicas y de calidad.

El objetivo del presente estudio fue desarrollar un método mejorado y reproducible para la inducción de yemas organogénicas a partir de ejes embrionarios de cuatro cultivares de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se esterilizaron semillas maduras de cuatro cultivares de frijol común G13637 Apetito (G1) (CIAT), ICA Palmar G4523 (IP) (CIAT), Pinto Saltillo (PS) (Reg. No. FRI-035-161181) (Castillo *et al.*, 1997) y Flor de Mayo Anita (FMA) (1494-FRI-032-220302/C) (Castellanos *et al.*, 2003) con gas cloro (cloro comercial Cloralex®) y HCl 12N (v/v 5:0.16) en un desecador y se usaron como donadores de explantes.

**Culture media****Induction and multiplication media (IMM)**

The media (IMM) consisted of GM (Gamborg *et al.*, 1968) or MS (Murashige and Skoog, 1962) amended with myo-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), pyridoxine (1 mg L<sup>-1</sup>), thiamine (10 mg L<sup>-1</sup>), sucrose (2 %) Phytigel® (2.8 mg L<sup>-1</sup>), benzyl aminopurine-HCl (10 mg L<sup>-1</sup>) and adenine hemisulphate [0 mg L<sup>-1</sup> (GM0 or MS0) or 20 mg L<sup>-1</sup> (GMA or MSA)]; these last two as a growth regulators, pH 5.8 adjusted with 1N NaOH.

Embryos were cultivated for 5 d in IMM. Then, meristematic shoots and roots were removed and embryonic axes were cultivated in the same media. Explants were transferred to fresh IMM every two weeks until bud differentiation. Regeneration efficiency was measured as the number of embryos with bud cluster divided by the number of embryos times 100. Experimental treatments consisted of nine petri dishes containing 10 embryos each, per cultivar.

**Elongation and rooting medium (ERM)**

The medium (ERM) consisted of the same components as the IMM, with no growth regulators. Bud clusters with differentiated shoots were transferred to ERM for complete development, elongation and rooting. Growth conditions were the same as the previous stage. *In vitro* regenerated plantlets were acclimatized and grown in greenhouse at 22-25 °C, photoperiod 16 h light and 8 h darkness with a light quality in photosynthetic active radiation 400-700 nm.

**RESULTS AND DISCUSSION**

The results of the present work improve the *in vitro* regeneration protocol published by our group (Delgado-Sánchez *et al.*, 2006). Previous reports of regeneration of *P. vulgaris* needed improve the efficiency during differentiation of transformed lines. Some variables like selection of explants, growth conditions, addition of hormones and basal culture (MS or GM) and differentiation route modify the *in vitro* regeneration process (Zambre *et al.*, 2001; De Clercq *et al.*, 2002; Veltcheva *et al.*, 2002).

**Bud cluster formation**

Embryos were aseptically cultivated in IMM with no contamination and no damage derived from an efficient sterilization process. Both, GM

**Medios de cultivo****Medios de inducción y multiplicación (IMM)**

El medio (IMM) consistió en GM (Gamborg *et al.*, 1968) o MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con mio-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), piroxidina (1 mg L<sup>-1</sup>), tiamina (10 mg L<sup>-1</sup>), sacarosa (2 %), Phytigel® (2.8 mg L<sup>-1</sup>), bencilaminopurina-HCl (10 mg L<sup>-1</sup>) y hemisulfato de adenina [0 mg L<sup>-1</sup> (GM0 o MS0)] o 20 mg L<sup>-1</sup> (GMA o MSA)]; estos últimos como reguladores del crecimiento, pH 5.8 ajustado con NaOH 1N.

Los embriones se cultivaron 5 d en IMM. Después, se removieron los meristemas apicales y radiculares y los ejes embrionarios se cultivaron en el mismo medio. Los explantes se transfirieron a IMM fresco cada dos semanas hasta la diferenciación de las yemas. La eficiencia de regeneración se midió como el número de embriones con grupos de yemas divididos por el número de embriones multiplicado por 100. Los tratamientos experimentales consistieron en nueve cajas de petri que contenían 10 embriones cada una, por cultivar.

**Medio de elongación y enraizamiento (ERM)**

El medio (ERM) consistió en los mismos componentes que el IMM, sin reguladores de crecimiento. Los grupos de yemas con brotes diferenciados fueron transferidos a ERM para su completo desarrollo, elongación y enraizamiento. Las condiciones de crecimiento fueron las mismas que en la etapa previa. Las plántulas regeneradas *in vitro* se aclimataron y se cultivaron en invernadero a 22-25 °C, fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad con una calidad de la luz bajo radiación fotosintéticamente activa (400-700 nm).

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

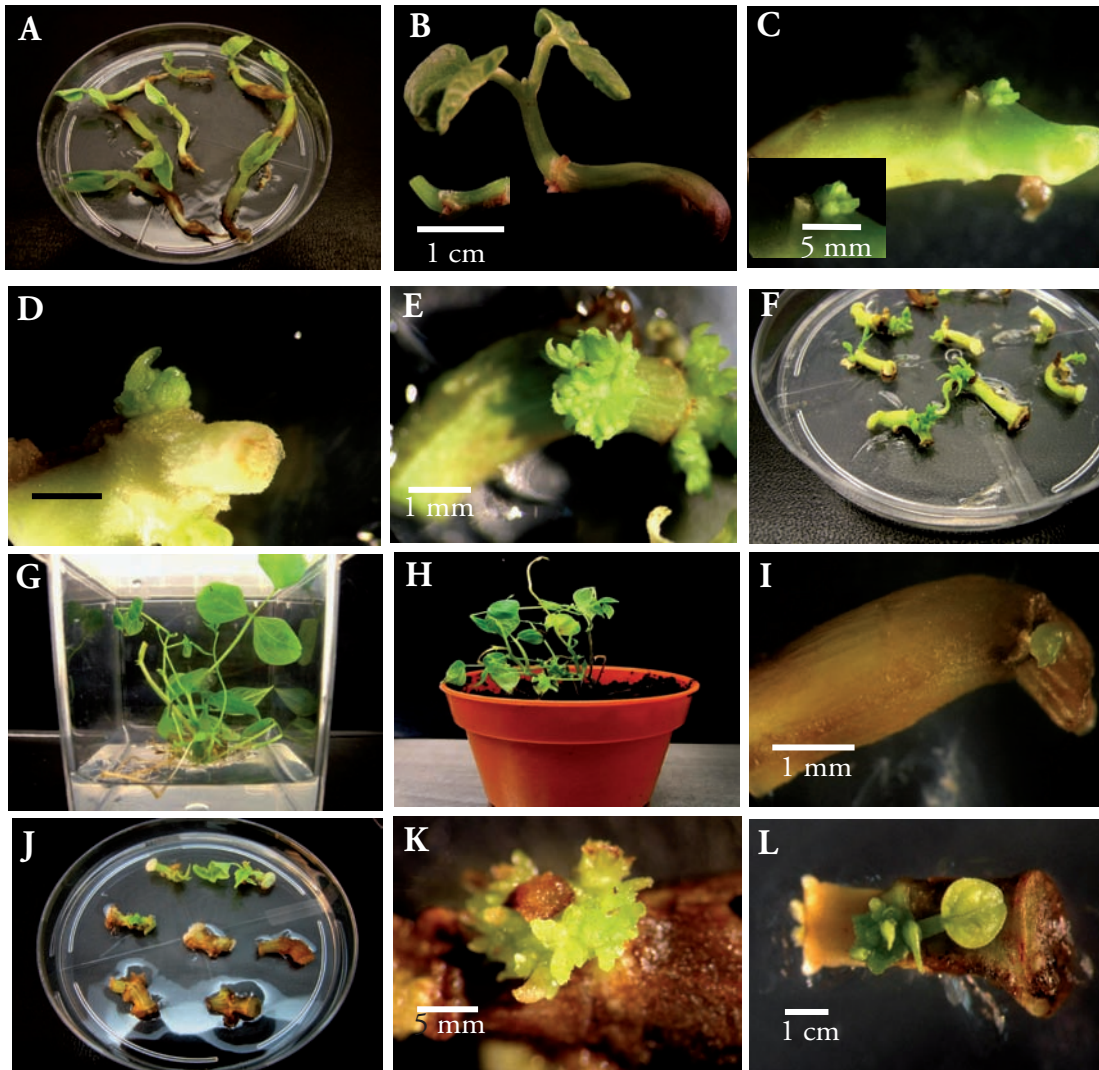
Los resultados del presente trabajo mejoran el protocolo de regeneración *in vitro* publicado por nuestro grupo (Delgado-Sánchez *et al.*, 2006). Reportes previos sobre la regeneración de *P. vulgaris* requerían mejorar la eficiencia durante la diferenciación de las líneas transformadas. Algunas variables, como la selección de explantes, condiciones de crecimiento, adición de hormonas y cultivo basal (MS o GM) y la ruta de diferenciación modifican el proceso de regeneración *in vitro* (Zambre *et al.*, 2001; De Clercq *et al.*, 2002 y Veltcheva *et al.*, 2002).

**Formación de grupos de yemas**

Los embriones se cultivaron asepticamente sin contaminación y sin daños, derivados de un eficiente

and MS basal media induced two meristematic bud clusters (0.5 mm wide) per embryonic axis in all four common bean cultivars showing an intense green color (Figures 1C; 1I). There were differences

proceso de esterilización en IMM. Tanto el medio basal GM como el MS indujeron dos grupos de yemas meristemáticas (0.5 mm de ancho) por eje embrionario en los cuatro cultivares de frijol común de



**Figure 1.** Flor de Mayo Anita *in vitro* regeneration representative of the four cultivars studied under GM0 and MS0 treatment. A) Embryos cultivated for 5 d in GM0 induction medium; B) meristematic shoots and roots removed after 5 d in GM0; C) embryonic axes with bud clusters at the internode area 4 d after excision (AE); D) shoot differentiation in GM0 medium 25 d AE; E) formation of differentiated leaves 6 mm wide; F) 2-3 trifoliate leaves and differentiated stems and roots were obtained 55 d AE; G) 5-7 cm plantlets with a 2-3 trifoliate leaves and differentiated stems and roots 55 d in elongation-rooting medium; H) regenerated plantlets (15 cm tall) transferred to soil; I) bud cluster formation in MS0 10 d AE; J) oxidation in tissue on embryonic axes cultivated in MS0 medium AE; K) first differentiated shoots 40 d AE in MS0; L) oxidation in bud clusters cultivated in MS0 decreased regeneration efficiency.

**Figura 1.** Regeneración *in vitro* de frijol cv. Flor de Mayo Anita representativa de cuatro cultivares estudiados bajo tratamientos GM0 y MS0. A) Embriones cultivados por 5 d en medio de inducción GM0; B) meristemos apicales y radiculares removidos después de 5 d en GM0; C) ejes embrionarios con grupos de yemas en el área de internodo 4 d después de la escisión (AE); D) diferenciación de brotes en medio GM0 25 d AE; E) formación de hojas diferenciadas de 6 mm de ancho; F) 2-3 hojas trifoliadas, tallos y raíces diferenciados 55 d AE; G) plántulas de 5-7 cm con 2-3 hojas trifoliadas y tallos diferenciados 55 d en medio de enraizamiento y elongación; H) plantas regeneradas (15 cm alto) transferidas a suelo; I) formación de grupos de yemas en MS0 10 d AE; J) oxidación del tejido en ejes embrionarios cultivados en MS0 AE; K) primeros brotes diferenciados 40 d AE en MS0; L) oxidación de grupos de yemas cultivadas en MS0 decrece la eficiencia de regeneración.

( $p \leq 0.05$ ) in bud cluster formation rates among the four cultivars in GM0 and GMA (Table 1). IP and FMA formed organogenic bud clusters after 4 d in culture after excision (AE) (93.5 and 96.7 %), while cultivars PS and G1 formed bud clusters after 4 d in culture AE (94.4 and 98.9 %) at the internode area.

Embryonic axes cultivated in MS0 and MSA treatments showed more than 90 % of bud cluster formation after 10 d in culture AE (Figure 1I); however, oxidation was observed in the tissue (Figure 1J), reducing further shoot differentiation. FMA showed high bud cluster formation efficiency in this media (61-73 %); however, this was not the case for the other cultivars that had a reduced efficiency G1 (31.1 %), IP (28.8 to 46.7 %) and PS (15.6 to 17.8%) (Table 1). Differences in response were found in FMA and IP ( $p \leq 0.05$ ) cultivated in MS0 or MSA; however, no differences were observed for cultivars G1 and PS cultivated in MS media, suggesting no significant effect of adenine in regeneration induction (Table 1).

color verde intenso (Figuras 1C; 1I). Se registraron diferencias ( $p \leq 0.05$ ) en los índices de formación de grupos de yemas entre los cuatro cultivares en GM0 y GMA (Cuadro 1). IP y FMA formaron grupos de yemas organogénicos después de 4 d en cultivo después de la escisión (AE) (93.5 y 96.7 %), mientras que los cultivares PS y G1 formaron grupos de yemas después de 4 d en cultivo AE (94.4 y 98.9 %) en el segmento internodal.

Los ejes embrionarios cultivados en los tratamientos MS0 y MSA mostraron una formación de grupos de yemas después de 10 d en cultivo AE (Figura 1I) mayor a 90 %; sin embargo, se observó oxidación en el tejido (Figura 1J), lo cual inhibió la diferenciación de brotes. FMA mostró una alta eficiencia de formación de grupos de yemas en este medio (61-73 %); sin embargo, no ocurrió lo mismo con los otros cultivares que tenían una eficiencia reducida de G1 (31.1 %), IP (28.8 a 46.7 %) y PS (15.6 a 17.8 %) (Cuadro 1). Se encontraron diferencias en la respuesta en FMA e IP ( $p \leq 0.05$ ) cultivados en MS0 o MSA, pero no

**Table 1. *In vitro* regeneration response and plant development of four common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. Cuadro 1. Respuesta de regeneración *in vitro* y desarrollo de plantas en cuatro cultivares de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).**

Cultivar	Medium	Average of Ea with Bc <sup>†</sup>	No. of Ea with Bc <sup>†</sup> (%)	Average shoot formation/Bc <sup>†</sup>	Average plant development/Bc <sup>†</sup>	No. of Ea with plants <sup>†</sup> (%)
FMA	GM0	88 a <sup>¶</sup>	97.8	26.6	3.7 a <sup>¶</sup>	97.8
	GMA	86 b	95.6	26.2	3.9 a	95.6
	MS0	66 c	73.3	8.3	0.7 c	42.2
	MSA	55 d	61.1	5.7	0.7 c	50.0
G1	GM0	90 a	100	28.8	4.2 a	100
	GMA	88 a	97.8	25.8	3.9 a	97.8
	MS0	28 e	31.1	3.2	0.4 c	24.4
	MSA	28 e	31.1	3.0	0.3 c	28.9
IP	GM0	87 a	96.7	25.8	3.1 a	96.7
	GMA	81 b	90.0	21.2	2.3 b	87.8
	MS0	42 d	46.7	4.8	0.4 c	36.7
	MSA	26 e	28.9	2.9	0.3 d	25.6
PS	GM0	87 a	96.7	25.1	1.5 b	84.4
	GMA	83 b	92.2	24.5	1.4 b	83.3
	MS0	16 e	17.8	2.0	0.3 d	15.6
	MSA	14 e	15.6	2.0	0.2 d	13.3

<sup>†</sup> Values from 3 experiments with 10 embryos per petri dish and three replicates ♦ Valores de 3 experimentos con 10 embriones por caja de petri y tres repeticiones.

<sup>¶</sup> Different letters show statistical differences between means (Tukey;  $p \leq 0.05$ ) ♦ Letras diferentes muestran diferencias estadísticas entre medias (Tukey;  $p \leq 0.05$ ).

Ea: embryonic axes; Bc: bud clusters ♦ Ea: ejes embrionarios; Bc: grupos de yemas.

FMA: Flor de Mayo Anita; G1: G13637; IP: ICA Palmar; PS: Pinto SaltilloD.

## Shoot differentiation

Bud clusters in GMA or GM0 media increased in size within 8 d AE (1.5 mm wide × 1 mm height) (Figure 1D). Shoot differentiation started at 24 d AE showing a range of 21-26 shoots per bud cluster (Figure 1E) and forming differentiated leaves of 6 mm wide (Figure 1F, Table 1). However, the shoot differentiation started at 40 d AE in MSA or MS0 media, forming 2 to 8 shoots per bud cluster. More than 50 % of the embryonic axes and bud clusters were completely oxidized in the MS media decreasing shoot development in all genotypes (Figure 1L). The differences in basal media were evident in embryonic axis response. MS medium used in most of the studies has been less effective than GM medium regardless of concentration in growth regulators (Mohamed *et al.*, 1991). Apparently, a differential in macroelements concentration of GM *vs.* MS is a key component for shoot differentiation.

Addition of adenine hemisulphate was reported for somatic embryogenesis induction and in organogenic bud cluster formation (Delgado-Sánchez *et al.*, 2006). However, in our study, there was no significant effect on bud cluster formation or shoot development when it was combined with BAP regardless of basal media.

Shoot differentiation in GM media as opposed to other reports where differentiation route based on organogenesis of *P. acutifolius* and *P. vulgaris* showed several drawbacks, such as no differentiation of initial structures (Zambre *et al.*, 1998; Dillen *et al.*, 2000). Analogous to our observations, Muñoz *et al.* (personal communication) reported absence of apical and root meristems, induced *de novo* shoot formation as clusters or organogenic calli in MS basal medium added with thidiazuron and indol acetic acid, followed by transfers to low BAP (1 mg L<sup>-1</sup>) concentrations for shoot maintaining and development.

## Plant development

In our previous report, the efficiency of full plant regeneration and development (number of regenerated plants/number of induced shoots × 100) was 83 % for FJM (Delgado-Sánchez *et al.*, 2006). Here, we report an efficiency of 83 to 100 % depending on the cultivar in GM basal media (Figure

se observaron diferencias en los cultivares G1 y PS cultivados en un medio MS, lo que sugiere que la adenina no tuvo efectos significativos en la inducción de la regeneración (Cuadro 1).

## Diferenciación de brotes

Los grupos de yemas en los medios GMA o GM0 crecieron en tamaño en 8 d AE (1.5 mm ancho × 1 mm altura) (Figura 1D). La diferenciación de brotes inició en 24 d AE, mostrando entre 21-26 brotes por grupos de yemas (Figura 1E) y formando hojas diferenciadas de 6 mm de ancho (Figura 1F, Cuadro 1). Sin embargo, la diferenciación de brotes inició en 40 d AE en medio MSA o MS0, formando de 2 a 8 brotes por grupos de yemas. Más de 50 % de los ejes embrionarios y de los grupos de yemas se oxidaron completamente en el medio MS reduciendo el desarrollo de los brotes en todos los genotipos (Figura 1L). Los medios basales mostraron diferencias evidentes en la respuesta de los ejes embrionarios. El medio MS usado en la mayoría de los estudios ha sido menos efectivo que el medio GM a pesar de la concentración en los reguladores de crecimiento (Mohamed *et al.*, 1991). Aparentemente, un diferencial en la concentración de macroelementos de GM *vs.* MS es un factor clave para la diferenciación de brotes. Existen reportes de la adición de hemisulfato de adenina para la inducción de embriogénesis somática en la formación de grupos de yemas organogénicos (Delgado-Sánchez *et al.*, 2006). Sin embargo, en el presente estudio no hubo efecto significativo sobre la formación de grupos de yemas o el desarrollo de brotes cuando se combinó con BAP, a pesar del medio basal.

La diferenciación de brotes en el medio GM se contrapone a otros reportes donde la ruta de diferenciación basada en la organogénesis de *P. acutifolius* y *P. vulgaris* mostró varios inconvenientes, como la no diferenciación de estructuras iniciales (Zambre *et al.*, 1998b; Dillen *et al.*, 2000). De manera análoga a las presentes observaciones, Muñoz *et al.* (comunicación personal) reportaron ausencia de meristemos apicales y radiculares, la formación inducida de brotes *de novo* como grupos o callos organogénicos en medio basal MS adicionado con thidiazuron y ácido indolacético, seguido de transferencias a bajas concentraciones de BAP (1 mg L<sup>-1</sup>) para el mantenimiento y desarrollo de los brotes.

1H). In both reports, FMA tested had an increase in regeneration efficiency. Organogenic response in both reports was consistent, providing evidence of repeatability for cultivars G1, IP and PS 25-50 % to 97.8 %.

Fully developed plants (Figure 1I) transferred to greenhouse, showed a similar phenotypic appearance as plants from seed germination. Flowering, pod filling and morphology of the regenerated plants showed typical genotype characteristics.

### Cultivar response

Regeneration efficiency for FMA and G1 lines was higher in all four treatments compared to IP and PS (Table 1). GM basal medium induced higher bud cluster formation (90 to 100 %), shoot differentiation and plant development efficiency (83-100 %) than MS basal medium (13 to 50 %) in all four cultivars ( $p \leq 0.05$ ). No differences were observed when adenine was included in either of basal media ( $p=0.208$ ) at any of the stages of differentiation and development of the regeneration process (Table 1).

### CONCLUSIONS

The protocol described here showed an improved organogenic differentiation response using embryonic axis; besides this protocol may be adapted to a other cultivars in México. The procedure is reproducible resulting in the development of whole plants comparable to germinated plants. Finally, this regeneration protocol provides a reliable protocol during genetic transformation of common bean in breeding programs.

### LITERATURE CITED

- Aragao, F. J. L., G. R. Vianna, M. M. C. Albino, and E. L. Rech. 2002. Transgenic dry bean tolerant to the herbicide glufosinate ammonium. *Crop Sci.* 42: 1298-1302.
- Castellanos, R. J. Z., H. S. Guzmán-Maldonado, J. de J. Muñoz-R, y J. A. Acosta-Gallegos. 2003. Flor de Mayo Anita, nueva variedad de frijol para la región central de México. *Rev. Fitotec. Mex.* 26: 209-211.
- Castillo, R. A., F. J. Ibarra-Pérez, J. A. Acosta-Gallegos, E. B. Cázares, H. P. Fernández, M. R. Ochoa, G. S. Núñez, R. S. Rosales, y H. R. Zandate. 1997. Ensayos uniformes de frijol en el Altiplano semiárido de México en 1996/1997. Informe de Investigación 1997. SAGAR-INIFAP-B/C CRSP-Campo Experimental Valle Guadiana Durango, Dgo., México pp: 1-31.

### Desarrollo de la planta

En un reporte anterior, la eficiencia de la regeneración y el desarrollo de toda la planta (número de plantas regeneradas/número de brotes inducidos X 100) fue 83 % para FJM (Delgado-Sánchez et al., 2006). Aquí se reporta una eficiencia de 83 a 100 %, dependiendo del cultivar en medio basal GM (Figura 1H). En ambos reportes FMA registró un incremento en la eficiencia de regeneración. La respuesta organogénica en ambos reportes fue consistente, lo que proporcionó evidencia de reproducibilidad para los cultivares G1, IP y PS de 25-50 a 97.8 %.

Las plantas completamente desarrolladas (Figura 1I) que fueron transferidas a invernadero mostraron una apariencia fenotípica semejante a la de las plantas germinadas por semillas. La floración, el llenado de vainas y la morfología de las plantas regeneradas mostraron las características clásicas del genotipo.

### Respuesta del cultivar

La eficiencia de regeneración de las líneas FMA y G1 fue mayor en los cuatro tratamientos, comparados con IP y PS (Cuadro 1). El medio basal GM indujo mayor formación de grupos de yemas (90 a 100 %), diferenciación de brotes y eficiencia de desarrollo de la planta (83-100 %) que el medio basal MS (13 a 50 %) en los cuatro cultivares ( $p \leq 0.05$ ). No se observaron diferencias cuando se incluyó adenina en alguno de los medios basales ( $p=0.208$ ) en ninguno de los estadios de diferenciación y desarrollo del proceso de regeneración (Cuadro 1).

### CONCLUSIONES

El protocolo aquí descrito muestra una mejor respuesta organogénica con el uso de ejes embrionarios; además este protocolo puede adaptarse a otros cultivares en México. Este procedimiento es reproducible, lo que lleva al desarrollo de plantas completas comparables a las plantas germinadas. Finalmente, este protocolo de regeneración proporciona un protocolo confiable durante la transformación genética del frijol común en programas de mejoramiento de cultivos.

—Fin de la versión en Español—

- CIAT. 2008. Improved beans for the developing world. Annual Report 2008. 302 p.
- Cruz de Carvalho, B. M., Y. Van Le, A. T. Zuily-Fodil, T. Pharm, and K. T. Thanh Van. 2000. Efficient whole plant regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using thin-cell layer culture and silver nitrate. *Plant Sci.* 159: 223-232.
- De Clercq, J., M. Zambre, M. Van Montagu, W. Dillen, and G. Angenon. 2002. An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation procedure for *Phaseolus acutifolius* A. Gray. *Plant Cell Rep.* 21: 333-340.
- Delgado-Sánchez, P., M. Saucedo-Ruiz, S.H. Guzmán-Maldonado, E. Villordo-Pineda, M. González-Chavira, S. Fraire-Velázquez, J.A. Acosta-Gallegos, and A. Mora-Avilés. 2006. An organogenic regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Sci.* 170: 822-827.
- Dillen, W., M. Zambre, J. A. De Clercq, Goossens, J. Kapila, E. Vranová, M. Van Montagu, and G. Angenon. 2000. In vitro regeneration and *Agrobacterium* – mediated transformation of *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) and *P. acutifolius* A. Gray (Tepary bean). *Acta Hort.* 521:59-66.
- Gamborg, O. L., R. A. Miller, K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspensions cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151-158.
- Mohamed, M. F., Coyne, D. P., Read, P. E. 1993. Shoot organogenesis in callus induced from pedicel explants of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 118:158-162.
- Mohamed, M. F. P. E. Read, and D. P. Coyne. 1991. Plant regeneration *in vitro* from the embryonic axes of common and tepary beans. *Ann. Rep. Bean Improv. Crop.* 34:150-151.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497.
- Veltcheva, M., D. Svetleva, and S. Petkova. 2002. *In vitro* regeneration of *Phaseolus vulgaris* L. *Ann. Rep. Bean Impr. Coop.* 45:246-247.
- Zambre, M., J. De Clercq, E. Vranová, M. Van Montagu, G. Angenon, and W. Dillen, 1998. Plant regeneration from embryo-derived callus in *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) and *P. acutifolius* A. Gray (tepary bean). *Plant Cell Rep.* 17:626-630.
- Zambre, M. P. Geerts, A. Maquet, M. Van Montagu, W. Dillen, and G. Angenon. 2001. regeneration of fertile plants from callus in *Phaseolus polyanthus* Greenman (Year bean). *Ann. Bot.* 88:371-377.