

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**



**“Evaluación de la regeneración *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedades CENTA Costeño II y CENTA Chaparrastique mediante la técnica de organogénesis directa e indirecta”**

**POR:**

**BR. JOSÉ ALFREDO, AGUIRRE ALFARO  
BR. JOSÉ ADONAY, MELÉNDEZ HERNÁNDEZ**

**SAN SALVADOR, 22 DE JULIO 2022**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS  
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA**



**“Evaluación de la regeneración *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedades CENTA Costeño II y CENTA Chaparrastique mediante la técnica de organogénesis directa e indirecta”**

**POR:**

**BR. JOSÉ ALFREDO, AGUIRRE ALFARO  
BR. JOSÉ ADONAY, MELÉNDEZ HERNÁNDEZ**

**REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
INGENIERO AGRÓNOMO**

**SAN SALVADOR, 22 DE JULIO 2022**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**RECTOR**

MSC. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

**SECRETARIO GENERAL**

ING. FRANCISCO ANTONIO ALARCÓN SANDOVAL

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**

**DECANO**

PHD. FRANCISCO LARA ASCENCIO

**SECRETARIO**

ING. AGR. BALMORE MARTÍNEZ SIERRA

**JEFE DEL DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA**

ING. AGR. M.SC. FIDEL ÁNGEL PARADA BERRIOS

**DOCENTES DIRECTORES**

ING. AGR. M.SC. JULIO CESAR ORTIZ PAVÓN

ING. AGR. OSCAR ALONSO RODRÍGUEZ GRACIAS

**COORDINADOR GENERAL DE PROCESOS DE GRADUACION**

ING. AGR. MARIO ALFREDO PEREZ ASCENCIO

## Resumen

La investigación se realizó en el área de Cultivo de Tejidos del Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador en el periodo de julio del 2021 a enero del 2022.

Se establecieron cuatro protocolos para la regeneración del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) común de importancia comercial mediante la organogénesis directa e indirecta con diferentes concentraciones de Bencilaminopurina (BAP). En ambos métodos se evaluaron los indicadores números de brotes, número de hojas y número de raíces y la eficiencia de regeneración. Para la organogénesis directa se cultivaron ejes embriogénicos de las variedades CENTA Costeño II y CENTA Chaparrastique en medio de cultivo semisólido, el cual consistió de las sales minerales MS y BAP (0,1 y 5 mg/L). No se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $p\text{-valor} = 0.0673 > 0.01$ ) en el promedio de brotes por explante. Sin embargo, al revisar los promedios de las combinaciones se observó una tendencia en la que la combinación variedad Costeño II Chaparrastique y dosis 1 mg/L de BAP presenta el mayor número de brotes por explante (0.98). Para la organogénesis indirecta se precultivaron nudos cotiledonales y meristemas de las variedades antes mencionadas por 14 días en TZD (Tidiazuron) y AIA (Ácido Indol Acético). Luego fueron transferidos al medio de inducción y regeneración de brotes (MIB), el cual consistió de las sales MS adicionadas con BAP (0, 2.25 y 6.75mg/L). Con el precultivo se obtuvo formación de brotes múltiples y se determinó que los nudos cotiledonales responden de manera más eficiente que los meristemas de las mismas variedades. En ambos métodos se observó formación de hojas y raíces. Este informe describe un sistema eficiente de regeneración de frijol común a través de organogénesis directa e indirecta, que puede servir de referencia para su posterior investigación de transformación genética.

**Palabras clave:** Frijol común, *Phaseolus vulgaris* L., cultivo *in vitro*, organogénesis directa, organogénesis indirecta.

## **Agradecimientos**

A la vida por darme la oportunidad de llegar al último tramo de mi formación profesional.

A mi difunta abuela Blanca Adela Alfaro por darme toda su dedicación y amor.

A mi madre Dolores Alfaro Cortez por darme la vida y por todo su esfuerzo y dedicación hacia mi persona.

A Kennia Julissa Ramírez Lovo por su apoyo incondicional en todos estos años de conocerla y por creer en mí.

A todas aquellas personas que de un modo u otro nos han acompañados y ayudado en este largo viaje de nuestras vidas.

**José Alfredo Aguirre Alfaro**

A Dios por proveer a mi familia durante todo mi tiempo de estudio

A mi familia por haberme apoyado en todos los aspectos para formarme profesionalmente.

Al Ing. Agr. M.Sc Julio Cesar Pavón asesor principal, por su calidad profesional, orientación y enseñanzas durante el desarrollo de este proyecto de investigación. .

Al Ing. Agr. Oscar Alonso Rodríguez Gracias por su valioso aporte en la parte estadística, redacción y presentación del presente trabajo.

A la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador por formarme como ingeniero agrónomo.

A todas las personas que me ayudaron de una u otra manera durante mis años académicos en la Universidad.

**José Adonay Meléndez Hernández**

## **Dedicatoria**

A mi madre, quien es mi mayor fuente de motivación para salir adelante día a día a pesar de todas las adversidades que he afrontado a lo largo de mi formación profesional.

A mi querida difunta abuela Blanca Adela Alfaro quien fue muy importante en el desarrollo de gran parte de mi vida.

A Kennia Julissa Ramírez Lovo, por tener fe en mí y darme un aliento de esperanza en los momentos difíciles de mi vida.

Al Ing. Agr. M.Sc Julio Cesar Pavón por su calidad humana y enseñanzas, por su apoyo y orientación constante e incondicional, por su comprensión y por la confianza depositada en mí para culminar exitosamente este proyecto.

A nuestros compañeros del Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agronómicas por brindarnos su ayuda y apoyo en todo momento de nuestra investigación.

**José Alfredo Aguirre Alfaro**

Dedico esta etapa de mi vida a:

Dios por permitirme culminar esta etapa.

Mis padres Santiago Meléndez Alvarado y María Susana Hernández, por todo el apoyo económico y motivacional a lo largo de la carrera.

**José Adonay Meléndez Hernández**

## Índice general

Resumen.....	IV
Agradecimientos.....	V
Dedicatoria.....	VI
Índice de Cuadros .....	IX
Índice de Figuras .....	X
Índice de Anexos .....	XI
1 Introducción.....	1
2 Revisión Bibliográfica.....	2
2.1 Generalidades del frijol común.....	2
2.2 Origen y distribución .....	2
2.3 Taxonomía.....	2
2.4 Morfología de la planta .....	2
2.5 Fenología y hábitos de crecimiento.....	3
2.6 Requerimientos climáticos y edáficos .....	4
2.7 Mejoramiento genético del cultivo.....	5
2.8 Manejo agronómico del cultivo.....	6
2.8.1 Preparación del suelo .....	6
2.8.2 Épocas de siembra.....	6
2.8.3 Sistemas de siembra.....	7
2.8.4 Fertilización.....	7
2.8.5 Control de malezas .....	7
2.9 Plagas y enfermedades de importancia.....	8
2.9.1 Mosca blanca .....	8
2.9.2 Bacteriosis común .....	8
2.9.3 Mancha angular o requemo amarillo.....	8
2.9.4 Mustia hilachosa .....	8
2.9.5 Antracnosis.....	9
2.9.6 La roya .....	9
2.9.7 Mosaico Común (VMCF).....	9
2.9.8 Virus del Mosaico dorado amarillo (BGYMV).....	9
2.10 Variedades de frijol utilizadas.....	9
2.10.1 CENTA Chaparrastique.....	10
2.10.2 CENTA Costeño II.....	11
2.11 Cultivo <i>in vitro</i> .....	12
2.12 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. ....	12
2.13 Micropropagación .....	13

2.14	Organogénesis y sus etapas .....	14
2.15	Ventajas de la técnica.....	14
2.16	Selección del explante.....	14
2.17	Protocolos de desinfección .....	14
2.18	Medios de cultivo .....	15
3	Materiales y Métodos.....	16
3.1	Ubicación del estudio.....	16
3.2	Metodología de laboratorio .....	16
3.3	Material vegetal.....	16
3.4	Organogénesis directa.....	17
3.4.1	Desinfección de semillas y disección de explantes (ejes embrionarios) .....	17
3.4.2	Inducción y regeneración de brotes (organogénesis directa).....	17
3.4.3	Evaluación de la respuesta morfológica.....	17
3.5	Organogénesis indirecta.....	18
3.5.1	Desinfección de semillas y germinación .....	18
3.5.2	Disección de explantes (nudos cotiledonales y meristemos) e inducción de callo en explantes .....	18
3.5.3	Inducción y regeneración de brotes.....	18
3.5.4	Evaluación de la respuesta morfológica.....	19
3.6	Metodología estadística.....	19
4	Resultados.....	22
4.1.	Organogénesis directa.....	22
4.1.1	Número de brotes.....	22
4.1.2	Número de hojas .....	23
4.1.3	Número de raíces .....	24
4.1.4	Eficiencia a la regeneración <i>in vitro</i> por organogénesis directa.....	25
4.2.	Organogénesis indirecta a partir de nudos cotiledonales .....	25
4.2.1.	Número de brotes.....	25
4.2.2.	Número de hojas .....	26
4.2.3.	Número de raíces .....	27
4.2.4.	Eficiencia a la regeneración <i>in vitro</i> por organogénesis indirecta.....	27
4.3.	Organogénesis indirecta a partir de meristemos.....	28
4.3.1.	Número de brotes.....	28
4.3.2.	Número de hojas .....	29
4.3.3.	Número de raíces .....	29
4.3.4.	Eficiencia a la regeneración <i>in vitro</i> por organogénesis indirecta.....	30
5.	Discusión .....	31

6. Conclusiones.....	36
7 Recomendaciones.....	37
8 Bibliografía.....	38
9 Anexos.....	44

### Índice de Cuadros

Cuadro 1. Análisis de Varianza (ANVA) con Arreglo Factorial 2x3 a utilizar en los ensayos de Evaluación de la regeneración in vitro de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedades CENTA Costeño II y CENTA Chaparrastique mediante la técnica de organogénesis directa e indirecta.....	21
Cuadro 2. Medios de cultivo con diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) a evaluar en el ensayo de organogénesis directa e indirecta en cada una de las dos variedades de frijol.....	22
Cuadro A-1. Efecto del genotipo y Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de brotes, hojas, raíces y eficiencia de regeneración a partir de ejes embrionarios de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	46
Cuadro A-2. Resumen de análisis de varianza para la variable número de brotes a partir de ejes embrionarios.....	47
Cuadro A-3. Resumen de análisis de varianza para la variable número de hojas a partir de ejes embrionarios.....	47
Cuadro A-4. Resumen de análisis de varianza para la variable número de raíces a partir de ejes embrionario.....	47
Cuadro A-5. Efecto del genotipo y Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de brotes, hojas, raíces y eficiencia de regeneración a partir de nudos cotiledonales de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	48
Cuadro A-6. Resumen de análisis de varianza para la variable número de brotes a partir de nudos cotiledonales.....	49
Cuadro A-7. Resumen de análisis de varianza para la variable número de hojas a partir de nudos cotiledonales.....	49
Cuadro A-8. Resumen de análisis de varianza para la variable número de raices a partir de nudos cotiledonales.....	49
Cuadro A-9. Efecto del genotipo y Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de brotes, hojas, raíces y eficiencia de regeneración a partir de meristemos de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	50

Cuadro A-10. Resumen de análisis de varianza para la variable número de brotes a partir de meristemas.....	51
Cuadro A-11. Resumen de análisis de varianza para la variable número de hojas a partir de meristemas.....	51
Cuadro A-12. Resumen de análisis de varianza para la variable número de raíces a partir de meristemas.....	51

### Índice de Figuras

Figura 1. Estrategia experimental de la investigación.....	16
Figura 2. Efecto del genotipo y Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de brotes a partir de ejes embrionarios de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	23
Figura 3. Efecto del genotipo y Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de hojas a partir de ejes embrionarios de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	24
Figura 4. Efecto del genotipo y Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de raíces a partir de ejes embrionarios de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ).....	25
Figura 5. Efecto del genotipo y Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de brotes a partir de nudos cotiledonales de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	26
Figura 6. Efecto del genotipo y Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de hojas a partir de nudos cotiledonales de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	27
Figura 7. Efecto del genotipo y Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de raíces a partir de nudos cotiledonales de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	28
Figura 8. Efecto del genotipo y Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de brotes a partir de meristemas de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	29
Figura 9. Efecto del genotipo y Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de hojas a partir de meristemas de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	30
Figura 10. Efecto del genotipo y Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de raíces a partir de meristemas de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	31
Figura A-3. Regeneración <i>in vitro</i> de <i>P. vulgaris</i> L. Organogénesis directa variedades Costeño II y Chaparrastique obtenidos de ejes embrionarios a los 42 días de haber concluido el ensayo.....	45
Figura A-4. Regeneración <i>in vitro</i> de <i>P. vulgaris</i> L. Organogénesis indirecta variedades Costeño II y Chaparrastique. (A) y (B) Meristemo y nudo cotiledonal después de haber transcurrido 14 días en un precultivo con TDZ y AIA. Barras = 1cm. ....	46
Figura A-5. Regeneración <i>in vitro</i> de <i>P. vulgaris</i> L. Organogénesis indirecta variedades	

Costeño II y Chaparrastique obtenidos de nudos cotiledonales a los 28 días de haber concluido el ensayo. ....	47
Figura A-6. Regeneración <i>in vitro</i> de <i>P. vulgaris</i> L. Organogénesis indirecta variedades Costeño II y Chaparrastique obtenidos de meristemos a los 28 días de haber concluido el ensayo.....	48
Figura A-7. Aclimatación de Variedades Centa Costeño II y Centa Chaparrastique a los 35 días. ....	49

### **Índice de Anexos**

Anexo 1. Protocolo específico de regeneración <i>in vitro</i> para ejes embrionario de la variedad de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) CENTA Chaparrastique.....	56
Anexo 2. Protocolo específico de regeneración <i>in vitro</i> para ejes embrionario de la variedad de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) CENTA Costeño II.....	58
Anexo 3. Protocolo específico de regeneración <i>in vitro</i> para nudos cotiledonales de la variedad de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) CENTA Costeño II.....	60
Anexo 4. Protocolo específico de regeneración <i>in vitro</i> para meristemos de la variedad de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) CENTA Costeño II.....	62

## 1 Introducción

De los cientos de especies de leguminosas distribuidas por todo el mundo la más importante es el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Con el 22% de proteínas, el frijol representa una fuente relevante de nutrientes esenciales para la humanidad y constituye un componente esencial en la dieta de países en desarrollo de Latinoamérica, África y Asia. Su producción mundial anual supera los 30 millones de toneladas métricas (Aragão y Campos 2007; Gepts *et al.* 2008; Ramírez y Rangel 2011).

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es un cultivo de gran importancia alimentaria. En El Salvador el consumo de proteínas alcanza 52.4 gramos por persona por día, de las cuales se estima que 4.2 gramos son provenientes del frijol (FAO 1989). La producción del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) ha experimentado un aumento en su producción (65.5% hasta el año 2014) debido en parte al apoyo del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) con la entrega de insumos agrícolas como la semilla mejorada de frijol (MAG 2012; Zelada 2014; Superintendencia de Competencia 2015). Sin embargo, las pérdidas en la producción de frijol que se han registrado en los últimos años a causa del cambio climático ha incrementado el déficit en la demanda interna (Zelada 2014; Superintendencia de Competencia 2015).

Debido a múltiples factores que afectan la producción del cultivo frijol a nivel mundial. Es indispensable la creación de nuevas variedades de frijol que tengan un alto grado de tolerancia a dichos factores (Lizana *et al.* 2006; Grajales *et al.* 2008; Blair *et al.* 2012). La biotecnología vegetal, junto con los métodos de mejoramiento convencionales, podrían facilitar el mejoramiento del frijol, al proporcionarle una mayor resistencia o tolerancia a factores que producen estrés tanto biótico como abiótico (Veltcheva *et al.* 2005). El trabajo de investigación estuvo enfocado a la búsqueda de nuevas metodologías biotecnológicas que sirvan de instrumentos en investigaciones futuras para mejorar genéticamente las variedades de interés nacional. Se logró determinar la respuesta morfogénica a la regeneración *in vitro* mediante organogénesis directa e indirecta de las variedades de frijol común CENTA Costeño II y CENTA Chaparrastique. Además, se estableció un protocolo eficiente de regeneración *in vitro* de las variedades de frijol antes mencionado

## 2 Revisión Bibliográfica

### 2.1 Generalidades del frijol común

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) perteneciente a la familia de las leguminosas es una especie diploide con 22 cromosomas y un genoma de tamaño mediano (Gepts *et al.* 2008; McClean *et al.* 2008).

El género *Phaseolus* incluye cinco especies domesticadas: *P. vulgaris*, *P. lunatus*, *P. acutifolius*, *P. coccineus ssp. coccineus* y *P. dumosus* (Freytag 2002).

### 2.2 Origen y distribución

Los primeros trabajos sobre el origen y evolución del frijol se remontan a Miranda-Colín (1967) y Gentry (1969), quienes afirmaron que la forma silvestre de frijol se encuentra en Mesoamérica. Posteriormente, se han propuesto centros de origen y domesticación alternativos que trabajos sucesivos han ratificado (Kwak *et al.* 2009).

El frijol común comprende dos grupos genéticos, el Mesoamericano y el Andino, que difieren en sus estructuras y niveles de diversidad genética, tanto en poblaciones silvestres como en las domesticadas (Beebe *et al.* 2000, 2001; Papa y Gepts 2003).

### 2.3 Taxonomía

Según CIAT (1984) la clasificación taxonómica del frijol común es la siguiente:

Orden: Rosales

Familia: Leguminosae

Subfamilia: Papilionoidae

Tribu: Phaseolae

Subtribu: Phaseolinae

Género: *Phaseolus*

Especie: *vulgaris*

### 2.4 Morfología de la planta

Morfológicamente su raíz principal puede alcanzar una profundidad de uno a dos metros. Las raíces laterales desarrollan una radícula cónica. Estas estructuras poseen nódulos, encontrándose en su interior bacterias simbióticas que fijan el nitrógeno del aire (CIAT 1984). El tallo puede ser identificado como el eje central de la planta, está formado por una sucesión

de nudos y entrenudos; es herbáceo y con sección cilíndrica o levemente angular; puede ser erecto, semiprostrado o prostrado, según el hábito de crecimiento de la variedad (CENTA 2018).

Las hojas según Parsons (1999) son de dos tipos. Hojas cotiledonales, las cuales son las dos primeras hojas que surgen luego de la emergencia epigea, de forma acorazonada, sencilla y opuesta. Hojas verdaderas, que son pinnadas, trifoliadas y pubescentes e insertadas en los nudos del tallo y las ramas. Las flores tienen formas y colores variados, conformándose de cinco sépalos, cinco pétalos, diez estambres y un pistilo. El estandarte es el pétalo más grande y se sitúa en la parte superior de la corola. Las alas son los dos pétalos laterales y la quilla son los dos pétalos inferiores, unidos por los bordes laterales.

El fruto es una vaina con dos valvas, las cuales provienen del ovario comprimido. Debido que el fruto es una vaina, esta especie se clasifica como leguminosa. Las vainas son generalmente glabras o subglabras con pelos muy pequeños; a veces la epidermis es cerosa (CIAT 1984). Las semillas no poseen albumen, por tanto, las reservas nutritivas se concentran en los cotiledones. Además, las semillas pueden tener varias formas tales como cilíndricas, de riñón y esféricas. Internamente la semilla está constituida solamente por el embrión el cual está formado por la plúmula, las dos hojas primarias, el hipocótilo, los dos cotiledones y la radícula. La semilla tiene una amplia variación de color (blanco, rojo, crema, negro, café entre otras), de forma y de brillo (CIAT 1984).

## **2.5 Fenología y hábitos de crecimiento**

El desarrollo de la planta de frijol comprende dos fases sucesivas que son: vegetativa y reproductiva (CENTA 2008). La fase vegetativa se inicia en el momento que la semilla dispone de condiciones favorables para germinar, y termina cuando aparecen los primeros botones florales. En esta fase se forma la mayor parte de la estructura vegetativa que la planta necesita para iniciar su reproducción (Miranda-Colín 1967). La fase reproductiva termina cuando el grano alcanza el grado de madurez necesario para la recolecta; a pesar de ser esta fase predominantemente reproductiva, durante ella las variedades indeterminadas continúan, aunque con menor intensidad, produciendo estructuras vegetativas (CIAT 1984).

Según la FAO (2018), la fenología del desarrollo de las plantas de *P. vulgaris* incluye varias etapas desde la siembra hasta la cosecha. Cada etapa de desarrollo está asociada con cambios fisiológicos, como el tamaño, la morfología, la composición química y la composición

hormonal. Presenta diez fases fenológicas durante su desarrollo, divididas en 5 etapas vegetativas y 5 reproductivas: germinación (V0), emergencia (V1), hojas primarias (V2), primera hoja trifoliada (V3), tercera hoja trifoliada (V4); botón floral o prefloración (R5), floración (R6), formación de vainas (R7), llenado de vainas (R8) y maduración (R9). En las variedades determinadas, el desarrollo vegetativo del tallo principal termina antes de la floración, mientras que en las indeterminadas generalmente acaba en la etapa R8, que es cuando inicia también la defoliación.

Según CENTA (2018), el frijol común presenta los siguientes hábitos de crecimiento denominados como tipos y que van del uno al cuatro:

Tipo I: Hábito de crecimiento determinado arbustivo. El tallo y las ramas terminan en una inflorescencia desarrollada. Cuando esta inflorescencia está formada, el crecimiento del tallo y las ramas se detiene.

Tipo II A: Hábito de crecimiento indeterminado arbustivo: tallo erecto sin aptitud para trepar, aunque termina en una guía corta. Las ramas no producen guías.

Tipo II B: Hábito de crecimiento indeterminado arbustivo: tallo erecto, con aptitud para trepar, termina en una guía larga.

Tipo III: Hábito de crecimiento indeterminado postrado: plantas postradas o semi-postradas con ramificación bien desarrolladas.

Tipo IV: Hábito de crecimiento indeterminado trepador.

## **2.6 Requerimientos climáticos y edáficos**

La planta crece bien entre temperaturas promedios de 15 a 27°C, pero es importante reconocer que existe un amplio rango de tolerancia entre diferentes variedades. La importancia de la luz se fundamenta en primer lugar por su indispensable función para la fotosíntesis, en segunda instancia afecta la fenología y morfología de la planta por medio de reacciones de fotoperiodo y elongación (CENTA 2008). El cultivo de frijol se adapta perfectamente en ambientes con elevaciones que oscilan de los 400-1500 msnm.

Actualmente con el desarrollo de nuevas variedades realizado por CENTA, existen genotipos que se adaptan a elevaciones muchos menores, por ejemplo, la variedad CENTA Costeño II que se puede sembrar desde 30msnm en ciertas épocas del año (CENTA 2015) y CENTA Chaparrastique que se adapta desde 200-900msnm (CENTA 2011).

El agua es vital para el crecimiento y rendimiento. Ambas situaciones dependen de su disponibilidad. Existen líneas y variedades que muestran alguna tolerancia a deficiencias hídricas con rendimientos aceptables en esas condiciones, tolerancia que puede estar basada en la mayor capacidad de extracción de agua de capas profundas del suelo (CENTA 1996). El frijol también requiere suelos con buena aireación y drenaje, de textura franco, francos arenosos y francos arcillosos (CENTA 2015). Además, es un cultivo que no tolera los suelos compactos. El pH óptimo oscila entre 6.5 y 7.5 (CENTA 1996).

En El Salvador, el cultivo de frijol está distribuido por zonas productoras, que se diferencian en cuatro regiones: Región I (departamentos de Ahuachapán, Santa Ana y Sonsonate); Región II (departamentos de Chalatenango, La Libertad, San Salvador y Cuscatlán); Región III (departamentos de La Paz, Cabañas y San Vicente); y Región IV (departamentos de Usulután, San Miguel, Morazán y La Unión) (CENTA 2015).

## **2.7 Mejoramiento genético del cultivo**

Desde que se estableció la capacidad de modificar plantas mediante ingeniería genética, los investigadores han modificado un gran número de especies de plantas para satisfacer los requisitos agrícolas. Casi treinta años después de los primeros enfoques de la modificación genética de cultivos, es posible transformar muchas leguminosas de grano (Svetleva *et al.* 2003). Sin embargo, una de las especies más importantes para la nutrición humana es *Phaseolus vulgaris*, que aún carece de algunas herramientas prácticas para la investigación genómica, como la transformación genética de rutina. Las dificultades comprobadas hacia la regeneración *in vitro* obstaculizan significativamente las posibilidades de mejora del frijol común que presenta muchas limitaciones bióticas y abióticas. Aunque se ha logrado un progreso notable, la tasa de recuperación de las líneas transgénicas sigue considerándose baja (Gepts *et al.* 2008).

Las plantas transgénicas de frijol que se han logrado obtener a la fecha, provienen del uso de dos métodos de transformación genética. Entre ellos se tiene un método biológico indirecto y por lo tanto natural, basado en el empleo de una bacteria llamada *Agrobacterium tumefaciens*. Otra de las herramientas que existen para la introducción directa de ácidos nucleicos a células vegetales es la biobalística. Dicha técnica representa un método físico de transformación y consiste en el bombardeo de tejidos con micropartículas cubiertas con DNA o con cualquier otra biomolécula que se pretenda introducir a células vegetales (Arias-Ortiz *et al.* 2007).

También existe la mutagénesis, que consiste en la aplicación de diferentes agentes mutagénicos: los compuestos químicos que actúan directa o indirectamente sobre el ADN y los mutagénicos físicos como las irradiaciones ionizantes y la luz ultravioleta (Moh 1972). Además, el Mejoramiento asistido por marcadores moleculares (MAS) se suma a estos métodos de transformación y los hay de tres tipos: morfológicos (rasgos); bioquímicos (proteínas de almacenamiento de semillas e isoenzimas) y polimorfismos moleculares o basados en ADN, que se pueden utilizar para establecer vínculos con rasgos de interés agrícola (Svetleva *et al.* 2003). Otro método más reciente es la edición génica, que es una técnica dirigida que permite producir cambios en secuencias específicas del ADN, con alta eficiencia y limitado número de mutaciones en regiones no blanco (Bortesi *et al.* 2014).

## **2.8 Manejo agronómico del cultivo**

### **2.8.1 Preparación del suelo**

Según Rosas (2003), la preparación del terreno se inicia con un pase de arado a una profundidad de 20 a 30cm, seguido de dos pases de rastra, para obtener un suelo sin terrones y lograr suelos sueltos que ofrecen condiciones favorables para el establecimiento y desarrollo del cultivo, además de todo lo antes mencionado también se reduce la presencia de plagas y enfermedades.

Si el terreno es de ladera, la siembra debe hacerse siguiendo las curvas de nivel (perpendicular a la pendiente) para reducir la pérdida de suelo y lavado de sus nutrientes y para incrementar la productividad de frijol y otros cultivos, y conservar el suelo y agua, se recomienda el empleo de zanjas o acequias de ladera y la labranza mínima continua (Rosas 2003).

### **2.8.2 Épocas de siembra**

Según CENTA (2018), para el cultivo de frijol en El Salvador se reconocen 3 épocas. Época de Mayo: en esta época está en función del comportamiento de las lluvias en las cuales se sugiere que la humedad del suelo alcance por lo menos 20cm de profundidad para dar inicio a la siembra. Que en promedio su ocurrencia se da entre el 25 de mayo al cinco de junio. En esta época el sistema de siembra predominante es el monocultivo. Época de Agosto: esta época de siembra generalmente está condicionada a la madurez fisiológica del maíz, debido a que es el relevo el sistema predominante, su implementación actualmente es coincidente con el periodo del 15 de agosto al 15 de septiembre. Época de Apante: Esta época se efectúa bajo riego o humedad residual. Se recomienda el periodo de siembra del 15 de noviembre al

15 de diciembre. A fin de escapar a dos plagas importantes del cultivo del frijol la mosca blanca y chicharrita (*Bemisia tabaci* y *Empoasca kraemeri*), y la incidencia de las enfermedades fungosas es menor. Esta época es la más recomendable para la producción de semilla y grano.

### **2.8.3 Sistemas de siembra**

En cuanto a los sistemas de siembra, CENTA (2008), menciona que el frijol puede ser cultivado en monocultivo: Puede hacerse en cualquier época de siembra y consiste en sembrar el frijol solo, con distanciamientos entre surcos de 50 a 60cm y a 7.5-10cm entre plantas (10-13 plantas por metro lineal), más que todo cuando es un suelo preparado con maquinaria agrícola. En asocio: El frijol puede sembrarse en asocio con todos aquellos cultivos en los cuales no haya competencia por luz, incluyendo cultivos perennes en sus primeros años de plantación. En El Salvador el asocio más común es con maíz o maíz-frijol y también intercalado, el cual es el sistema de siembra más utilizado en el país y consiste en sembrar frijol en un terreno donde hay maíz que ha llegado a su madurez fisiológica, intercalando el frijol entre los surcos de maíz. El frijol se siembra a ambos lados del surco de maíz, separados de éste 20 a 25cm; el distanciamiento entre plantas es 10 a 20cm, con posturas de una o dos semillas, respectivamente.

### **2.8.4 Fertilización**

Según CENTA (2008) de preferencia, resultará más efectivo fertilizar con atención a las recomendaciones de un análisis de suelo, caso contrario aplicar los abonos en función de la experiencia en frijol y al grado de conocimiento de las parcelas a cultivar. La fertilización se puede hacer por dos vías, al suelo: se aplica a la siembra dos quintales de fórmula 18-46-0 por manzana y al aporco (25 a 30 días después de la siembra) se aplica en banda a la hilera de plantas, de 0.5 a 1.0 quintales de urea por manzana, incorporándola inmediatamente mediante el aporco. La fertilización vía foliar se puede realizar uno a dos aplicaciones de fertilizantes foliares, que contienen los micronutrientes necesarios, una semana después del aporco y se complementa la fertilización vía foliar con metalosato multimineral en dosis de 1L/mz en la etapa de inicio de botón floral y 15 días después.

### **2.8.5 Control de malezas**

Un manejo adecuado de malezas permite que las plantas de frijol se desarrollen más vigorosas, pues no sufren por la competencia por espacio, luz, agua y nutrientes (Rosas 2003). Según CENTA (2008) se debe incorporar las malezas durante la preparación del terreno

mediante un paso de arado profundo, luego complementar el control manual con el químico, según se describe a continuación: Control manual: dos deshierbas, entre los 15 a 20 y 30 a 35 días después de la siembra (previo a la floración). Control químico: antes de la siembra (12-15 días) aplicar Glifosato (1.0L/mz para gramíneas y hoja ancha). Antes de la germinación (después de siembra ó 1 ó 2 días después) para gramíneas y hojas ancha aplicar Pendimetalín (1.25L/mz) (Glifosato (0.7L/ mz). Después de la germinación aplicar Fluazifop p-Butil (1.0L/ mz).

## **2.9 Plagas y enfermedades de importancia**

### **2.9.1 Mosca blanca**

(*Bemisia tabaci*): Es considerada la plaga más importante del frijol. La mosca blanca y los geminivirus que transmiten se han convertido en un severo problema fitosanitario en varios cultivos de gran importancia socioeconómica en América Tropical (CIAT 1975).

### **2.9.2 Bacteriosis común**

(*Xanthomonas campestris* pv. *Phaseoli*): esta enfermedad produce manchas acuosas irregulares en el envés de las hojas. Las áreas afectadas se tornan flácidas e inicialmente son rodeadas por un margen de color verde amarillo-limón, que luego se convierte en un tejido necrótico color marrón (CENTA 2008).

### **2.9.3 Mancha angular o requemo amarillo**

(*Phaeoisariopsis griseola*): los síntomas pueden aparecer inicialmente en las hojas primarias, y se generalizan en las plantas después de la floración o inicio de la formación de vainas (CENTA 2018). En ataques severos, las hojas se tornan amarillentas y mueren, resultando en la defoliación prematura de las plantas. En las vainas, las manchas son ovaladas y circulares, con centros café-rojizos y ocasionalmente con bordes oscuros (CENTA 2018).

### **2.9.4 Mustia hilachosa**

(*Thanatephorus cucumeris*): La mustia ataca el follaje, tallos, ramas y vainas del frijol, en cualquier etapa de desarrollo del cultivo. Los síntomas aparecen como pequeñas lesiones acuosas circulares de uno a tres milímetros de diámetro, que a medida que se desarrolla la infección adquieren un color café, delimitado por un halo oscuro. Las manchas en las hojas adquieren un color gris-verdoso a café-oscuro que da la apariencia de ser provocadas por escaldaduras. Las hojas se adhieren entre sí y se produce defoliación severa (CENTA 2008).

### **2.9.5 Antracnosis**

(*Colletotrichum lindemuthianum*): La antracnosis puede afectar cualquier órgano aéreo (excepto flores) y en cualquier etapa de desarrollo; aunque los síntomas severos se observan en pecíolos, hojas y vainas. En el follaje, los síntomas se aprecian a lo largo de las nervaduras en el haz de las hojas, consistentes en lesiones de color ladrillo a púrpura (CENTA 2018).

### **2.9.6 La roya**

(*Uromyces appendiculatus*): Los síntomas iniciales consisten en manchas circulares cloróticas o blanquecinas, en las que luego se observan pústulas café-rojizas (uremias) que aparecen en las hojas. Una pústula contiene miles de uredosporas, y puede estar rodeada de un borde clorótico o necrótico dependiendo de la raza fisiológica, la variedad y las condiciones ambientales. Una infección severa causa reducción en el rendimiento hasta en un 50% (CENTA 2008).

### **2.9.7 Mosaico Común (VMCF)**

Transmitido por *Aphis gossypii*, *Aphis fabae* y *Acyrtosiphon pisum*. Se caracteriza por presentar plantas con síntomas en hojas conocidos como mosaico, que se manifiesta con áreas verde-claro en la lámina foliar y verde-oscuro en las nervaduras; las hojas se distorsionan debido a su arrugamiento y/o enrollamiento hacia adentro (CENTA 2018).

### **2.9.8 Virus del Mosaico dorado amarillo (BGYMV)**

Transmitido por la mosca blanca (*Bemisia tabaci*) es la enfermedad viral de mayor importancia en El Salvador y su incidencia ha aumentado con el tiempo, con la probabilidad de ser más severa por efecto del comportamiento climático (CENTA 2018).

### **2.10 Variedades de frijol utilizadas**

Se utilizaron en la investigación las variedades CENTA Costeño II y CENTA Chaparrastique, las cuales fueron seleccionadas por su importancia a nivel nacional. Actualmente ambas variedades son producidas por el Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA) y son entregadas por el Gobierno a los agricultores como semilla mejorada en los paquetes agrícolas. Tanto el CENTA Costeño II como el CENTA Chaparrastique son variedades características agronómicas que las hacen preferibles (descritas más adelante) como el color rojo brillante de los granos, el cual es muy semejante al índice de color del grano de la variedad Rojo de Seda.

### 2.10.1 CENTA Chaparrastique

Fue introducida a El Salvador en el 2005, desarrollada por la Universidad Agrícola Zamorano, proviene de la cruce simple SRC 1-12-1-47-7EAP 9510-77, experimentalmente fue denominada MER 2226-41. Bajo dicha denominación fue validada durante 2008/09 en campo, donde demostró buenas características agronómicas y alto potencial de rendimiento (CENTA 2011).

Entre las características agronómicas más sobresalientes de esta variedad están (CENTA 2011):

Habito de crecimiento:	II-B Guía intermedia
Días a floración:	36-38
Días a madurez fisiológica:	68-70
Reacción a virus del mosaico dorado amarillo:	Resistente
Reacción a virus del mosaico común:	Resistente
Reacción a mancha angular:	Tolerante
Reacción a mustia hilachosa:	Tolerante
Reacción a roya:	Tolerante
Altas temperaturas:	Tolerante
Humedad limitada:	Tolerante
Rendimiento potencial:	35qq/mz
Adaptación	200-900 msnm

Esta variedad de frijol tiene la característica de presentar un color de testa rojo claro brillante con un peso promedio para 100 semillas de 23 a 25g. Las semillas son de forma ovoide. El número de semillas por vaina es de seis a siete (CENTA 2011).

En el 2005, producto de las evaluaciones realizadas, MER 2226-41 fue seleccionada en los Ensayos Centroamericanos de Adaptación y Rendimiento (ECAR), donde sobresalió por su resistencia al virus del mosaico dorado amarillo y potencial rendimiento, alcanzando rendimientos promedios de 1897kg/ha (29-21qq/mz) (CENTA 2011).

Durante el 2006, esta línea de frijol fue evaluada en los Ensayos Regionales a nivel nacional en nueve localidades de El Salvador, presentando buen potencial de rendimiento, superior al testigo mejorado CENTA San Andrés, obteniendo valores de 2200kg/ha (33.9qq/mz) (CENTA 2011).

A partir del año 2008 pasa a la fase de validación en finca de agricultores, donde este material ratifica sus características respecto a las variedades locales y mejoradas con las que comparada. En ese año, el material genético alcanzó rendimientos promedios de 1,523.2kg/ha (23.45qq/mz) superando a las variedades testigos en un 20.1%; y en el 2009 obtuvieron rendimientos promedios de 1437.2kg/ha (22.13qq/mz), superando en 412.9kg/ha a las variedades comparadas utilizadas ese año (CENTA 2011).

El análisis económico realizado a nivel de validación refleja una Tasa de Retorno Marginal (TRM) de 15.73, cuando se usa esta variedad.

### **2.10.2 CENTA Costeño II**

En el 2007 fueron introducidos en El Salvador los ensayos para sequía y baja fertilidad, PASEBAF-2007, procedentes de la Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano. Su origen proviene de las cruces /S/B166/ PRF 9653-16B-1/S/B136/MC-1P-MQ, que experimentalmente fue denominada MDSX 14797-6-1. Con esta denominación fue validada durante los años 2010/2011 en fincas de agricultores, ubicadas en zonas tradicionales y no tradicionales (altas temperaturas) para el cultivo, donde demostró buenas características agronómicas, adaptabilidad a estas condiciones, tolerancia a plagas y enfermedades, y alto potencial de rendimiento. Por estas características demostradas, la línea MDSX 14797-6-1 se liberó con el nombre de CENTA COSTEÑO II (CENTA 2014).

Entre las características agronómicas más sobresalientes de esta variedad están (CENTA 2014):

Habito de crecimiento:	II-B Indeterminado arbustivo
Días a floración:	33-35
Días a madurez fisiológica:	70-72
Reacción a virus del mosaico dorado:	Resistente
Reacción a virus del mosaico común:	Resistente
Reacción a mancha angular:	Tolerante
Reacción a bacteriosis:	Tolerante
Reacción a mustia hilachosa:	Susceptible
Altas temperaturas:	Tolerante
Humedad limitada:	Tolerante
Color del grano:	Rojo claro
Número de granos por vaina:	6-7

Número de vainas por planta:	16-18
Color de la vaina:	Crema
Peso seco de 100 granos:	26 gramos
Rendimiento potencial:	2,272 kg/ha (35 qq/mz)
Adaptación:	30-1200 msnm

En los años 2007-2008 en ensayos conducidos en siembras de agosto y noviembre en diferentes localidades, la nueva variedad mostró los mayores rendimientos promedio, en comparación con otras líneas promisorias y variedades locales. Durante los años 2010-2011, fue validada en campos de agricultores donde se obtuvo rendimientos superiores a los testigos locales que fueron utilizados como comparadores (CENTA 2014).

En las parcelas de validación establecidas, al final de cada ciclo de cultivo, se realizaron evaluaciones participativas con agricultores, donde los resultados de las pruebas de degustación indican que MDSX 14797-6-1 fue preferido por sus características tales como: color del grano, sabor del caldo y mejor rendimiento (CENTA 2014).

### **2.11 Cultivo *in vitro***

El cultivo *in vitro* es una técnica biotecnológica que utiliza el término de totipotencia celular, el fundamento de este concepto describe que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece, independientemente de su función. La respuesta de totipotencia celular de regeneración de plantas ocurre en presencia de niveles de citoquininas y auxinas apropiados para el cultivo que se esté utilizando (Criollo *et al.* 2016).

### **2.12 Cultivo *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* L.**

El mayor obstáculo que limita el potencial de las herramientas biotecnológicas para el mejoramiento genético de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) está relacionado a su baja respuesta a la regeneración *in vitro* (fenómeno conocido como recalcitrancia al cultivo *in vitro*) (Estrada *et al.* 2007, Kwapata *et al.* 2010).

Muchos protocolos para regeneración *in vitro* de *P. vulgaris* L. han sido reportados aun cuando el género *Phaseolus* ha sido considerado como recalcitrante (Veltcheva *et al.* 2005). En su mayoría los protocolos de regeneración de *P. vulgaris* están basados en organogénesis directa o desarrollo de brotes desde células meristemáticas y solo existen unos pocos protocolos

basados en la regeneración mediante organogénesis indirecta (Mohamed *et al.* 1993; Arellano *et al.* 2009; Collado *et al.* 2013).

Al utilizar un sistema de regeneración indirecta de *P. vulgaris*, Mohamed *et al.* (1993) y Zambre *et al.* (1998) regeneraron (aunque con poca eficiencia) plantas a partir de callos derivados de pedúnculos y cotiledones respectivamente. Por otro lado, Delgado-Sánchez *et al.* (2006) reportaron un protocolo de regeneración eficiente de *P. vulgaris* a través de organogénesis directa desde ejes embrionarios de semillas maduras de dos genotipos comerciales.

En dos estudios García *et al.* (2008, 2010) lograron una regeneración directa de alta frecuencia, con ejes embrionarios como explantes. Posteriormente utilizaron ejes embrionarios derivados de plántulas de 5 días de edad de *P. acutifolius* y obtuvieron alta frecuencia de regeneración directa.

Gatica *et al.* (2010) desarrollaron un método para la regeneración directa de 5 variedades costarricenses de frijol común mediante la utilización de ejes embrionarios y diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento: 0, 5 y 10mg/L de bencilaminopurina (BAP). Quintero-Jiménez *et al.* (2010) mejoraron el protocolo de regeneración *in vitro* publicado por Delgado-Sánchez *et al.* (2006), al sustituir las sales de Murashige y Skoog (1962) por las propuestas por Gamborg *et al.* (1968).

Recientemente, Collado *et al.* (2013) lograron vía organogénesis indirecta regenerar brotes y eventualmente plantas fértiles al utilizar nudos cotiledonales como explantes con concentraciones de 0, 2.25, 4.50, 6.75 y 9.0mg/L BAP. Este protocolo es uno de los más eficientes reportado hasta la fecha y tiene como base la utilización de tidiazurón para la formación de callos y la bencilaminopurina para la regeneración de brotes.

### **2.13 Micropropagación**

Consiste en generar plantas en condiciones controladas. Primero se inicia con el cultivo de tejidos *in vitro*, en el cual el material vegetal que se utiliza es una célula, tejido u órgano de una planta. Estos materiales pueden provenir de tejidos como tallos, raíz, meristemos, embriones, etc (Narváez 2009).

#### **2.14 Organogénesis y sus etapas**

La organogénesis es una técnica de la biotecnología vegetal, la cual permite la formación de tallos, yemas y raíces a partir de diferentes explantes como hojas, tallos, flores, callos, meristemos o células en suspensión. Esta técnica normalmente se da en dos etapas, la primera consta de la producción y el crecimiento de tallos a partir de callos, hojas, cotiledones, hipocótilos, etc. En la segunda etapa se realiza el enraizamiento (Narváez 2009).

La organogénesis, uno de los principales métodos de regeneración de plantas, puede clasificarse en indirecta y directa. La primera tiene lugar a partir de la siembra de un explante en donde se observa el crecimiento de una aglomeración de células en forma desordenada y sin ningún funcionamiento. Seguidamente ocurre una fase intermedia de formación de callos. Mientras que la organogénesis directa, consiste en que a partir de una siembra de diferentes explantes y con las condiciones respectivamente adecuadas, se puede inducir la regeneración de brotes, raíces o flores de una parte de la planta sin necesidad de fases intermedias de callo. Este proceso morfogénico se induce artificialmente por medio de reguladores de crecimiento (RC) (George y Debergh 2008).

#### **2.15 Ventajas de la técnica**

Una de las grandes ventajas de la organogénesis es la enorme capacidad de multiplicación a escala industrial, permitiendo obtener en un solo proceso estructuras completas con ápice y raíz, que pueden ser almacenadas y encapsuladas perfectamente con las condiciones ambientales requeridas (Narváez 2009).

#### **2.16 Selección del explante**

La selección del explante es el paso más importante para el éxito en la micropropagación debido a que esto dependerá del objetivo trazado. Además, el explante deberá encontrarse bajo condiciones fitosanitarias adecuadas sin ningún tipo de lesión epitelial, maltrato o enfermedad causada por patógenos (Mroginski y Roca 1991). Los embriones utilizados para la micropropagación *in vitro* generalmente son embriones, meristemos, tallos, raíces, anteras, protoplastos, entre otros (Pérez 2006).

#### **2.17 Protocolos de desinfección**

Los procesos de desinfección son seleccionados a partir del explante que se desea trabajar, existen productos asépticos que sus mecanismos de acción pueden comprometer algunos

tejidos del explante; como la oxidación (Villamizar 2005).

Existen varios compuestos químicos que son utilizados en tejidos vegetales en protocolos de desinfección, los más utilizados son Etanol al 70%, Hipoclorito de sodio y soluciones jabonosas. Entre los menos utilizados se encuentran Cloruro de mercurio al 1-1.5% o hipoclorito de calcio al 6-12%, el nitrato de plata, peróxido de hidrogeno y el uso de tensoactivos como el Tween 80 o soluciones yodadas. Como complementos en el protocolo de desinfección se adicionan diferentes antibióticos y anti fúngicos para garantizar la asepsia de los explantes durante el proceso de propagación (Mroginski y Roca 1991).

### **2.18 Medios de cultivo**

La composición de los medios de cultivo dependerá exclusivamente del objetivo trazado y el tipo de planta a propagar (Torrescano De Labra 2014). Entre los componentes que se debe tener un medio de cultivo se encuentran los Macronutrientes (C, H, P, K, O, S, Ca y Mg); los micronutrientes (Zn, Cu, Mo, etc.); las vitaminas y los reguladores de crecimiento. El medio de cultivo más utilizado es el medio basal MS (Murashige & Skoog), en el cual se puede trabajar con la mayoría de explantes, modificándose según la necesidad (Villamizar 2005).

Los reguladores de crecimiento se pueden presentar de forma natural o sintética. Las auxinas son un grupo de hormonas que ayudan a la estimulación de la división celular (Mroginski y Roca 1991). Las auxinas más utilizadas son ANA, AIA, AIB, 2,4D. En el caso de las citoquininas la Kinetina, 6-BAP y Zeatina son utilizadas para romper la dominancia apical y estimular la brotación de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas. Las giberelinas por su parte, son utilizadas para la estimulación fisiológica, algunas de ellas ayudan para el alargamiento celular (Villamizar 2005).

Existen varias vitaminas utilizadas en procesos de micropropagación, entre las cuales la más utilizada es la vitamina C o ácido cítrico por su acción antioxidante en los explantes (Benítez 2006).

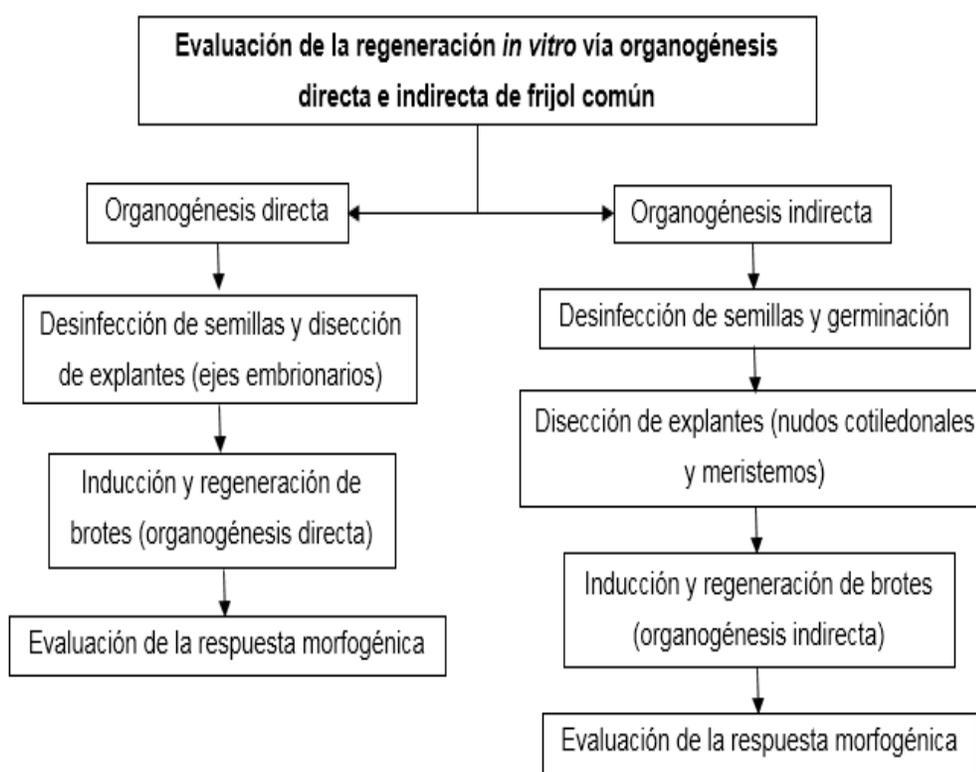
### 3 Materiales y Métodos

#### 3.1 Ubicación del estudio

La investigación se llevó a cabo en el área de Cultivo de Tejidos del Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador. La ubicación geográfica del laboratorio es 13°43'06" Norte y 89°12'11" Oeste. El estudio se realizó en el periodo de julio del 2021 a enero del 2022.

#### 3.2 Metodología de laboratorio

La investigación se llevó a cabo con la estrategia experimental descrita en la Figura 1.



**Figura 1.** Estrategia experimental de la investigación.

#### 3.3 Material vegetal

Se utilizaron semillas maduras de dos variedades de frijol (CENTA Costeño II y CENTA Chaparrastique) de no más de un año poscosecha. Las semillas utilizadas fueron donadas por el Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal "Enrique Álvarez Córdova" (CENTA).

### **3.4 Organogénesis directa**

#### **3.4.1 Desinfección de semillas y disección de explantes (ejes embrionarios)**

En una cámara de flujo laminar se desinfectaron las semillas superficialmente con alcohol etílico al 70% durante 1 minuto y posteriormente con hipoclorito de sodio (NaClO) al 1% y Tween 20 (tres gotas/100mL) en agitación manual durante 20 minutos. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril. Las semillas permanecieron en imbibición con agua destilada estéril durante 16-18 horas (a  $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) previo a la disección de los explantes. Transcurrido el tiempo de imbibición de las semillas, se extrajeron los embriones cigóticos con la ayuda de pinzas y bisturí estériles en cámaras de flujo laminar. A los embriones cigóticos se les cortó el meristemo radicular y las hojas cotiledonales para formar el eje embrionario (Figura A-1). Después de la disección de los ejes embrionarios, se realizó una segunda desinfección con NaClO al 0.1% durante 10 minutos en agitación manual, seguido de tres lavados con agua destilada estéril.

#### **3.4.2 Inducción y regeneración de brotes (organogénesis directa)**

Los ejes embrionarios fueron cultivados en frascos con 25ml de medio de cultivo semisólido, el cual consistió de las sales minerales MS (Murashige y Skoog 1962) suplementados con 100mg/L de mioinositol, 0.1mg/L de tiamina, 0.5mg/L de ácido nicotínico, 0.5mg/L de piridoxina, 2mg/L de glicina, 30g/L de sacarosa y 8g/L de phytigel.

Los tratamientos consistieron en medios de cultivo con tres diferentes dosis de bencilaminopurina (BAP): 0, 1 y 5mg/L (Gatica *et al.* 2010). El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.7 con HCl o NaOH antes de esterilizarlo en autoclave durante 21 min a  $121^{\circ}\text{C}$  y 1.07 kg/cm. Los ejes embrionarios se cultivaron en los tratamientos durante 42 días en condiciones de fotoperíodo 16 horas luz / 8 horas oscuridad a  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  y  $58 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ . Se realizó un subcultivo a los 21 días después de iniciado el ensayo.

#### **3.4.3 Evaluación de la respuesta morfogénica**

La evaluación de la respuesta a la regeneración *in vitro* se evaluó para cada variedad de frijol mediante los siguientes indicadores: número de brotes, número de hojas y número de raíces. Adicionalmente se calculó la eficiencia de regeneración a través de la formula [(número de ejes embrionarios con brotes de *novo* / total de número de ejes embrionarios) x 100] la cual fue tomada de Gatica *et al.* (2010). Los tratamientos se evaluaron después de 21 y 42 días de iniciado el ensayo. Además, se llevó un registro fotográfico.

### **3.5 Organogénesis indirecta**

#### **3.5.1 Desinfección de semillas y germinación**

En una cámara de flujo laminar se desinfectaron las semillas superficialmente con alcohol etílico al 70% durante 1 minutos y posteriormente con hipoclorito de sodio (NaClO) al 3% y Tween 20 (3 gotas/100mL) en agitación constante durante 10 minutos. Posteriormente, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril.

Las semillas se colocaron en medios de cultivo de germinación que consistió en las sales minerales MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementados con 100mg/L de mioinositol, 0.1mg/L de tiamina, 0.5mg/L de ácido nicotínico, 0.5mg/L de piridoxina, 2mg/L de glicina, 1mg/L de BAP, 30g/L sacarosa y 8g/L phytigel. El pH del medio se ajustó a 5.7 con NaOH o HCl antes de esterilizarlo en autoclave a 121 °C y 1.5MPa durante 20 minutos.

Se cultivaron un total de 500 de semillas en frascos de vidrio de 250mL con 25mL de medio y 20 semillas cada uno. La temperatura de germinación fue de  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  y en absoluta oscuridad durante siete días.

#### **3.5.2 Disección de explantes (nudos cotiledonales y meristemos) e inducción de callo en explantes**

Transcurridos los siete días de germinación, se disectaron los explantes que consistieron en el nudo cotiledonal de los embriones cigóticos germinados y los meristemos (Figura A-2). Todos los nudos cotiledonales se cultivaron en placas Petri, mientras que los meristemos se cultivaron en frascos, ambos con 25mL de medio compuesto de las sales minerales MS y suplementado con 100mg/L de mioinositol, 0.1mg/L de tiamina, 0.5mg/L de ácido nicotínico, 0.5mg/L de piridoxina, 2mg/L de glicina, 0.2mg/L de Tidiazurón (TDZ), 0.05mg/L de Ácido Indol acético (AIA), 30g/L de sacarosa y 8g/L de phytigel. El pH se ajustó a 5.7 con HCL o NaOH antes de esterilizarlos en autoclave durante 20 minutos a  $121^{\circ}\text{C}$  y 1.5MPa.

Los nudos cotiledonales se cultivaron durante 14 días, de los cuales, los primeros siete días fueron colocados en completa oscuridad y los restantes siete días en condiciones de fotoperiodo 16 horas luz / 8 horas oscuridad a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  y  $58 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ . Mientras que los meristemos fueron cultivados únicamente en las condiciones de fotoperiodo antes mencionadas.

#### **3.5.3 Inducción y regeneración de brotes**

Transcurrido los 14 días en los medios de inducción de callos (MIC), los nudos y meristemos

fueron transferidos al medio de inducción y regeneración de brotes (MIB), el cual consistió de las sales MS adicionadas con diferentes concentraciones de BAP: 0, 2.25 y 6.75mg/L (Collado *et al.* 2013). El pH de los medios se ajustó a 5.7 con HCl o NaOH antes de esterilizarlo en autoclave durante 20 minutos a 121°C y 1.5MPa. Posteriormente se hizo un subcultivo o refrescamiento en el mismo medio por otros 14 días.

Para nudos cotiledonales cada tratamiento consistió en cinco repeticiones, tres frascos por repetición y tres explantes por frasco con 25ml de medio MIB. Para meristemos fueron cuatro repeticiones, tres frascos por repetición y cuatro explantes por frasco. Tanto los nudos como los meristemos se cultivaron en condiciones de fotoperiodo 16 horas luz / 8 horas oscuridad a  $25\pm 1^\circ\text{C}$  y  $58\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ . Se realizó un subcultivo a los 14 días después de iniciado el ensayo con MIB.

#### **3.5.4 Evaluación de la respuesta morfogénica**

Se evaluaron mediante los indicadores números de brotes, número de hojas y número de raíces para ambas variedades. Se calculó la eficiencia de regeneración a través de la fórmula  $[(\text{número de nudos cotiledonales con brotes de } \textit{ovo} / \text{total de número de nudos cotiledonales}) \times 100]$  la cual fue tomada de Gatica *et al.* (2010).

Después de 28 días de cultivo en los tratamientos de inducción de brotes y regeneración, se realizó la toma de datos de los indicadores y se llevó un registro fotográfico.

#### **3.6 Metodología estadística**

Para la organización, procesamiento y análisis de los datos sobre la regeneración *in vitro* vía organogénesis directa e indirecta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedades CENTA Costeño y CENTA Chaparrastique, se utilizaron métodos descriptivos univariados como tablas de frecuencias, representaciones gráficas, medidas de tendencia central y medidas de dispersión, e intervalos de confianza.

A todas las variables cuantitativas se les aplicó análisis bivariado correlación de Pearson. También, a todas las variables se les aplicó el Análisis de Varianza (ANVA), específicamente un arreglo factorial 2x3 (Cuadro 1) bajo el Diseño Completamente al Azar (DCA). Esto por las condiciones controladas del laboratorio (luz, temperatura y humedad) y características del material experimental (homogéneo). Se establecieron seis tratamientos con tres repeticiones.

Previo a la aplicación de la técnica del Análisis de Varianza (ANVA) se verificó que los datos cumplieran con los supuestos de homogeneidad de varianzas y distribución normal.

Para verificar el supuesto de normalidad se aplicó las pruebas de normalidad Kolmogorov-Smirnov, y en el caso de la homogeneidad de varianzas se ejecutó el test de Levene. Con el propósito de demostrar cuál de los medios de cultivo suplementados con BAP y variedades de frijol común presentan mejor respuesta a la regeneración *in vitro*, se aplicó la prueba estadística de comparación de medias de Tukey. Todo el análisis se realizó con un nivel de significancia estadística (alfa)  $\alpha$  del 1% = 0.05 y mediante la utilización de hojas de cálculo de Microsoft Excel® y el programa estadístico SPSS® 25.

Las variables independientes fueron los medios de cultivo y las variedades de frijol y la variable dependiente fue la respuesta a la morfogénesis. Los tratamientos para el método de organogénesis directa fueron 0, 1 y 5mg/L de BAP (Cuadro 2) (Gatica *et al.* 2010). Cada tratamiento tuvo tres repeticiones y cada repetición consistió en tres frascos con tres explantes cada uno. Fueron 27 explantes por tratamientos y 162 en total. Para el método de organogénesis indirecta los tratamientos consistieron en 0mg/L, 2.25mg/L y 6.75mg/L de BAP (Cuadro 2) (Collado *et al.* 2013). Para nudos cotiledonales cada tratamiento consistió en cinco repeticiones, tres frascos por repetición y tres explantes por frasco. Para meristemas fueron cuatro repeticiones, tres frascos por repetición y cuatro explantes por frasco. Fueron 45 explantes por tratamientos y 135 en total para los nudos cotiledonales y para los meristemas 48 explantes por tratamiento y 144 en total.

Según Argüellas y Carvajal (2013), el modelo matemático lineal aditivo que define a un Diseño Completamente al Azar bajo un arreglo factorial 2x3 es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + [FA_j + FB_k + (FA \times FB)] + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

$i = 1, 2, \dots, r$  Con  $r$ , como el número de repeticiones.

$j = 1, 2, \dots, a$  Con  $a$ , (como el número de niveles o modalidad del factor A.

$k = 1, 2, \dots, b$  Con  $b$ , (como el número de niveles o modalidad del factor B.

$Y_{ijk}$  = Variable aleatoria observada en la  $j$ -ésima repetición del  $i$ -ésimo tratamiento.

$\mu$  = Media general.

$FA_j$  = Efecto del  $j$ -ésimo nivel o modalidad del factor A.

FB= Efecto del k-esimo nivel o modalidad del factor B.

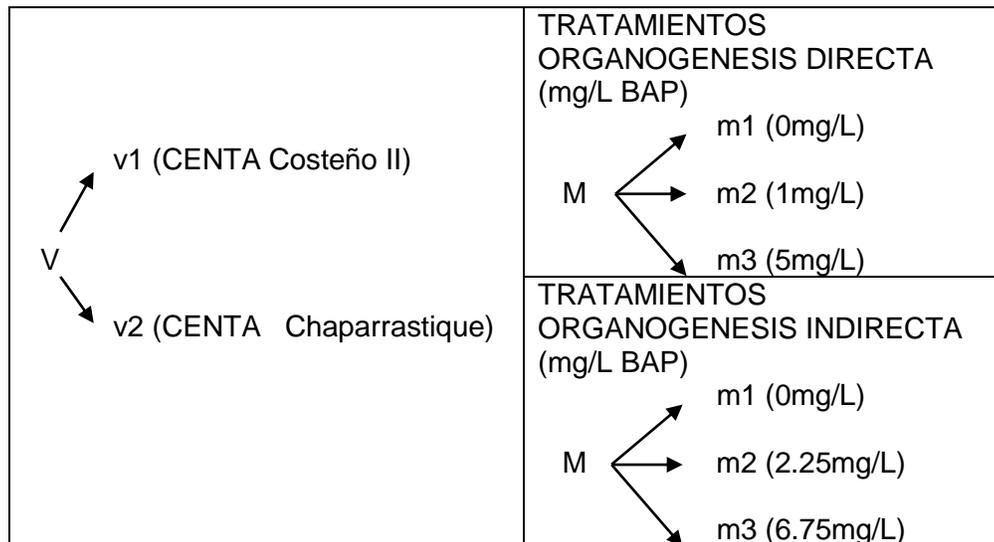
(FA\*FB)jk= Efecto de la interacción de los factores A y B.

Eijk = Efecto del error experimental independiente.

Cuadro 1: Análisis de Varianza (ANVA) con Arreglo Factorial 2x3 a utilizar en los ensayos de Evaluación de la regeneración *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedades CENTA Costeño II y CENTA Chaparrastique mediante la técnica de organogénesis directa e indirecta.

Fuente de variación	Grados de libertad (GL)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrados medios (CM)	Fcal	Ftab 1%
Factor A	2-1=1	SCFACT. A	$\frac{SCFACT. A}{g. l. FACT. A}$	$\frac{CMFACT. A}{CM EE}$	
Factor B	3-1=2	SCFACT. B	$\frac{SCFACT. B}{g. l. FACT. B}$	$\frac{CMFACT. B}{CM EE}$	
Interacción AxB	1 x 2=2	SCINT. AxB	$\frac{SCINT. AxB}{g. l. INT. AxB}$	$\frac{CMFACT. AxB}{CM EE}$	
Variación no controlada (Error Experimental)	17-5=12	SCEE	$\frac{SC EE}{g. l. EE}$		
Total	18-1=17				

Cuadro 2. Medios de cultivo con diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) a evaluar en el ensayo de organogénesis directa e indirecta en cada una de las dos variedades de frijol.

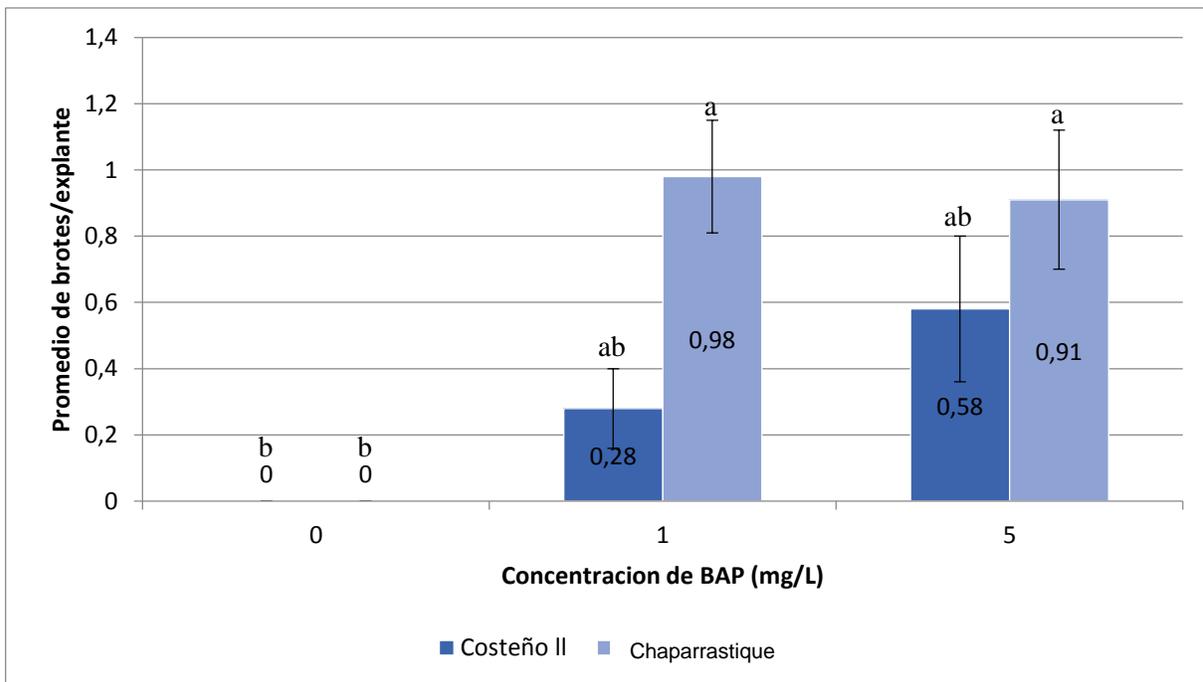


## 4 Resultados

### 4.1. Organogénesis directa

#### 4.1.1 Número de brotes

Los brotes fueron regenerados a partir de ejes embrionarios como respuesta morfogénica a la regeneración *in vitro* de *P. vulgaris* de las variedades CENTA Costeño II y CENTA Chaparrastique (Figura A-3). La combinación de la variedad Chaparrastique y la concentración de 1mg/L de BAP produjeron la cantidad mayor de brotes por explante (0,98). Caso contrario con los tratamientos en ausencia de BAP no se observó respuesta favorable a la regeneración (Figura 2).



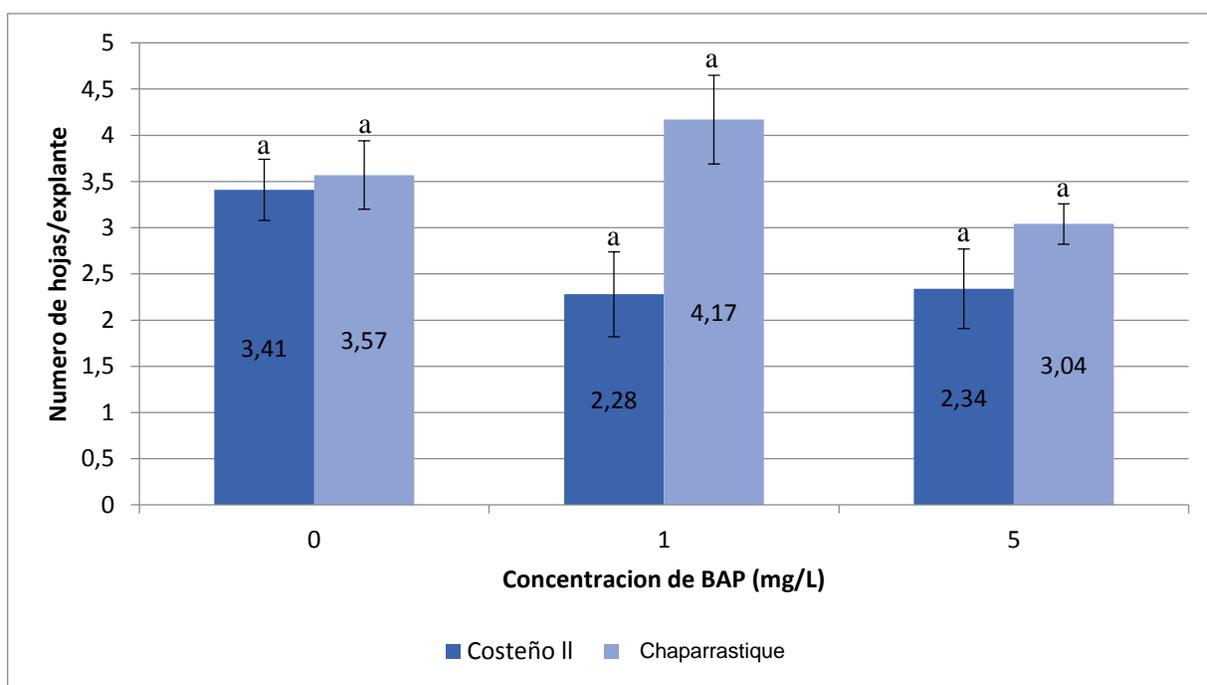
Las mismas letras sobre cada barra denotan promedios iguales estadísticamente con la prueba de comparación de medias Tukey ( $P < 0.01$ ).

**Figura 2:** Efecto del genotipo y Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de brotes a partir de ejes embrionarios de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L).

No se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $p\text{-valor} = 0.0673 > 0.01$ ) en el promedio de brotes por explante (Cuadro A-2). Sin embargo, al revisar los promedios de las combinaciones se observa una tendencia en la que la combinación variedad CENTA Chaparrastique y la concentración de 1mg/L de BAP presenta el mayor número de brotes por explante (Cuadro A-1).

#### 4.1.2 Número de hojas

Las hojas fueron regeneradas a partir de ejes embrionarios como respuesta morfológica a la regeneración *in vitro* de *P. vulgaris* de las variedades CENTA Costeño II y CENTA Chaparrastique (Figura A-3). El mayor número de hojas obtenidas por organogénesis directa fue la combinación variedad CENTA Chaparrastique con la concentración de 1mg/L de BAP con 4.17 hojas por explante. La combinación CENTA Costeño II con la concentración de 1.0mg/L de BAP produjo el menor número, con 2.28 hojas por explante (Figura 3).



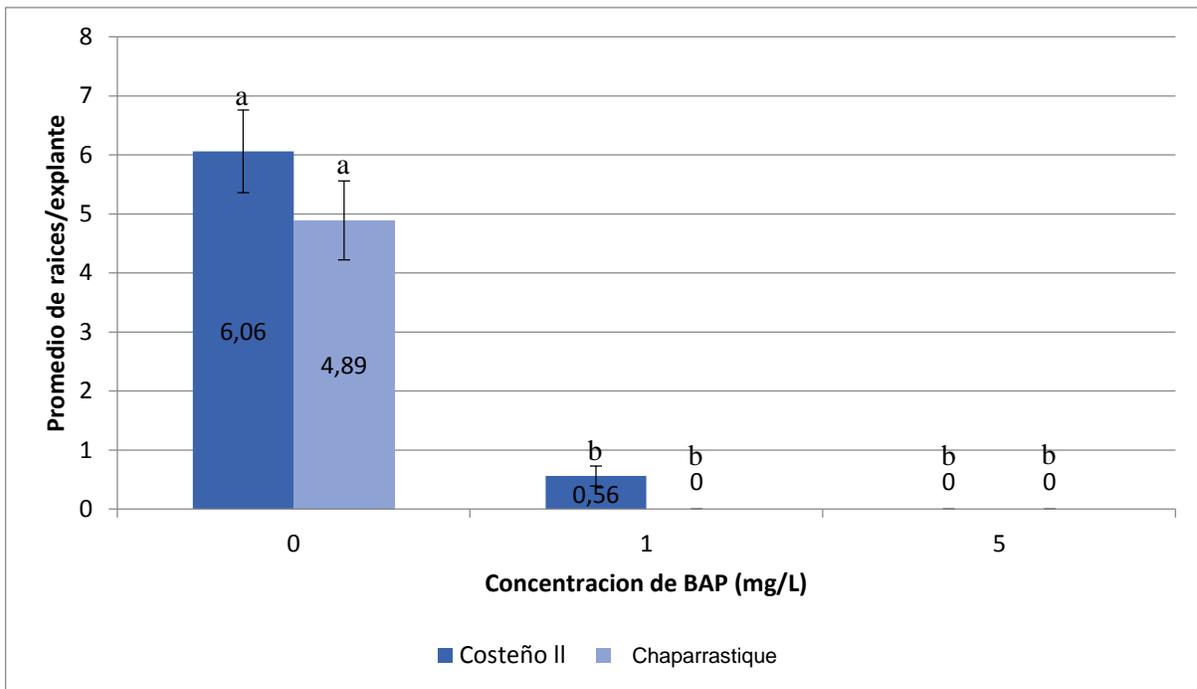
Las mismas letras sobre cada barra denotan promedios iguales estadísticamente con la prueba de comparación de medias Tukey ( $P < 0.01$ ).

**Figura 3:** Efecto del genotipo y Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de hojas a partir de ejes embrionarios de frijol común (*Phaseolus vulgaris*).

No se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $p\text{-valor} = 0.0975 > 0.01$ ) en el promedio de hojas por explante (Cuadro A-3). Sin embargo, en los promedios de las combinaciones se observa una leve tendencia que la combinación variedad CENTA Chaparrastique y la concentración de 1mg/L de BAP presenta el mayor número de hojas por explante (Cuadro A-1).

### 4.1.3 Número de raíces

Las raíces fueron regeneradas a partir de ejes embrionarios como respuesta morfológica a la regeneración *in vitro* de *P. vulgaris* de las variedades CENTA Costeño II y CENTA Chaparrastique (Figura A-3). El mayor número de raíces obtenidas por organogénesis directa fue la combinación variedad CENTA Costeño II y la concentración de 0mg/L de BAP con 6.06 raíces. En los tratamientos en que se adicionó BAP no hubo respuesta favorable a la regeneración de raíces (Figura 4).



Las mismas letras sobre cada barra denotan promedios iguales estadísticamente con la prueba de comparación de medias Tukey ( $P < 0.01$ ).

**Figura 4:** Efecto del genotipo y Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de raíces a partir de ejes embrionarios de frijol común (*Phaseolus vulgaris*).

Al realizar el análisis de varianza de la variable número de raíces por organogénesis directa, no se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $p\text{-valor} = 0.3735 > 0.01$ ) (Cuadro A-4). Sin embargo, en los promedios de las combinaciones se observa la tendencia que la combinación variedad CENTA Costeño II en ausencia de BAP presenta el mayor número de raíces por explante (Cuadro A-1).

#### 4.1.4 Eficiencia a la regeneración *in vitro* por organogénesis directa

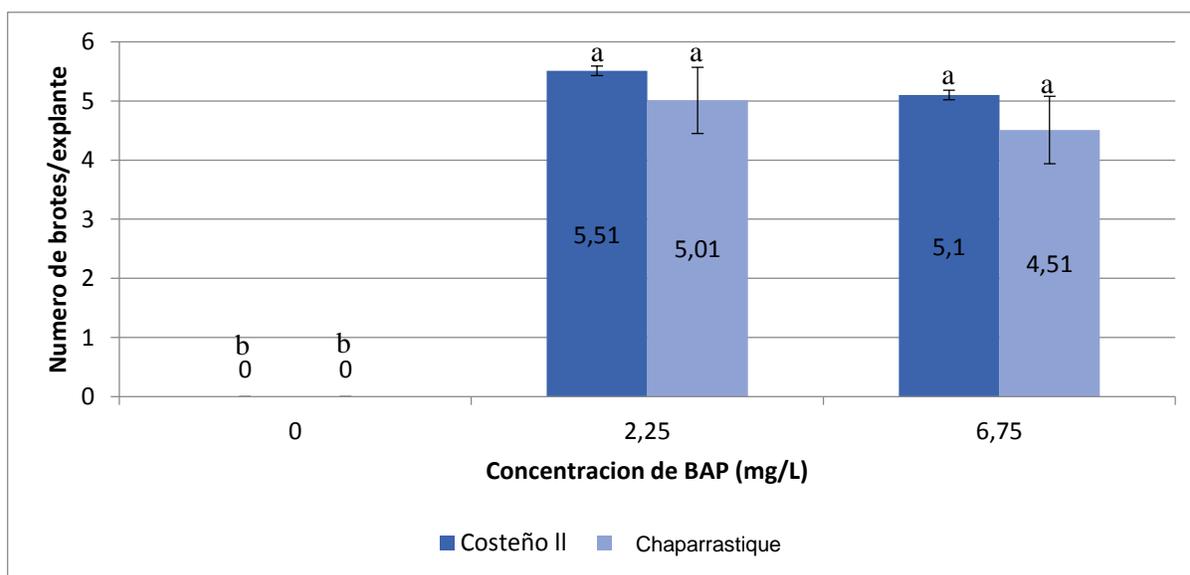
La eficiencia es un parámetro que permite cuantificar en porcentaje la respuesta morfológica de los explantes. Según los resultados obtenidos la variedad CENTA Chaparrastique y la concentración de 5.0mg/L de BAP produjo el mayor porcentaje de eficiencia con 57% (Cuadro A-1).

Al analizar los resultados de las variables evaluadas (número de brotes, hojas, raíces y eficiencia de regeneración) se estableció un protocolo específico de regeneración *in vitro* para ejes embrionario de la variedad de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) CENTA Chaparrastique (Anexo 1).

#### 4.2. Organogénesis indirecta a partir de nudos cotiledonales

##### 4.2.1. Número de brotes

Los brotes fueron regenerados a partir de nudos cotiledonales como respuesta morfológica a la regeneración *in vitro* de *P. vulgaris* de las variedades CENTA Costeño II y CENTA Chaparrastique (Figura A-5). El mayor número de brotes obtenido por organogénesis indirecta fue la combinación variedad CENTA Costeño II y concentración de 2.25mg/L BAP con 5.51 brotes por explante. En los tratamientos en ausencia de BAP no se obtuvo respuesta favorable a la regeneración de brotes (Figura 5).



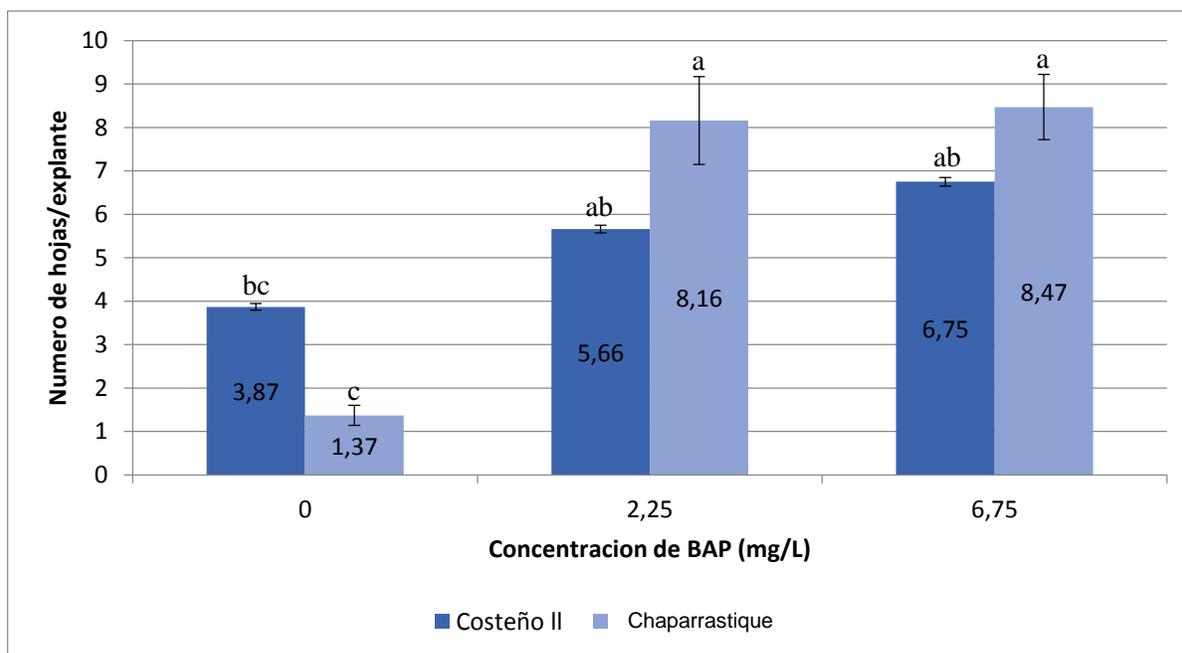
Las mismas letras sobre cada barra denotan promedios iguales estadísticamente con la prueba de comparación de medias Tukey ( $P < 0.01$ ).

**Figura 5:** Efecto del genotipo y Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de brotes a partir de nudos cotiledonales de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).

Al realizar el análisis de varianza de la variable número de brotes por organogénesis indirecta, no se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $p$ -valor= 0.6890 > 0.01) (Cuadro A-6); sin embargo, al revisar los promedios de las combinaciones hay una tendencia en la que la combinación variedad CENTA Costeño II y la concentración de 2.25 mg/L de BAP presenta la mayor cantidad de brotes por explante (Cuadro A-5).

#### 4.2.2. Número de hojas

Las hojas fueron regeneradas a partir de nudos cotiledonales como respuesta morfológica a la regeneración *in vitro* de *P. vulgaris* de las variedades CENTA Costeño II y CENTA Chaparrastique (Figura A-5). El mayor número de hojas obtenidas por organogénesis indirecta (nudos cotiledonales) fue la combinación variedad CENTA Chaparrastique y concentración de 6.75mg/L BAP con 8.47 hojas por explante. Mientras que la variedad CENTA Chaparrastique en ausencia de BAP produjo los menores resultados con 1.37 hojas por explante (Figura 6)



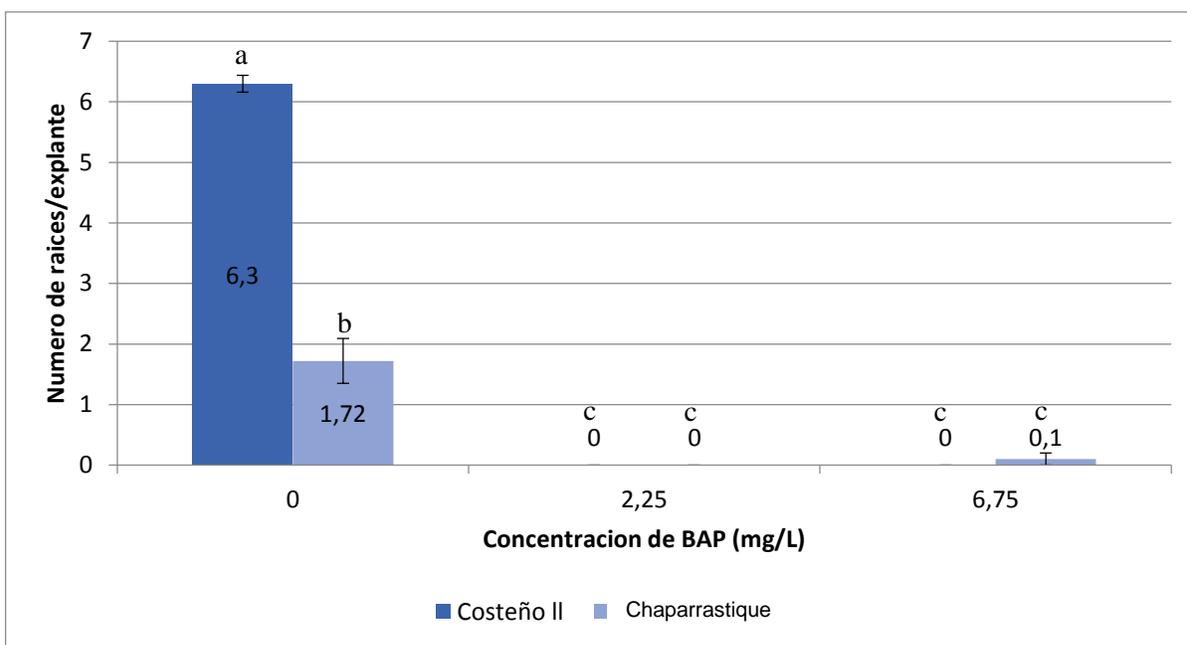
Las mismas letras sobre cada barra denotan promedios iguales estadísticamente con la prueba de comparación de medias Tukey ( $P < 0.01$ ).

**Figura 6:** Efecto del genotipo y Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de hojas a partir de nudos cotiledonales de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).

Al realizar el análisis de varianza de la variable número de hojas por organogénesis indirecta se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $p$ -valor= 0.0012 < 0.01) (Cuadro A-7).

#### 4.2.3. Número de raíces

Las raíces fueron regeneradas a partir de nudos cotiledonales como respuesta morfológica a la regeneración *in vitro* de *P. vulgaris* de las variedades CENTA Costeño II y CENTA Chaparrastique (Figura A-5). Obteniéndose los mayores resultados en los tratamientos donde no se adicionó dicha citoquinina. Caso contrario a los tratamientos adicionados con BAP (Figura 7).



Las mismas letras sobre cada barra denotan promedios iguales estadísticamente con la prueba de comparación de medias Tukey ( $P < 0.01$ ).

**Figura 7:** Efecto del genotipo y Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de raíces a partir de nudos cotiledonales de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).

Al realizar el análisis de varianza de la variable número de raíces por organogénesis indirecta (nudos cotiledonales), se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $p$ -valor=  $0.0001 < 0.01$ ) (Cuadro A-8).

#### 4.2.4. Eficiencia a la regeneración *in vitro* por organogénesis indirecta

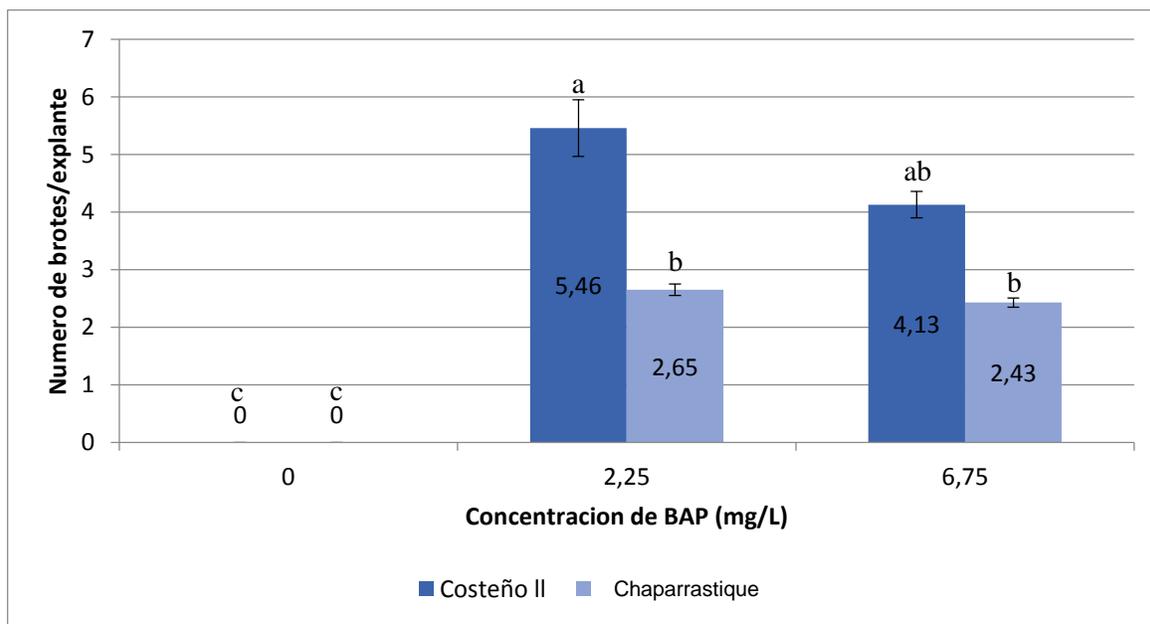
La eficiencia es un parámetro que permite cuantificar en porcentaje la respuesta morfológica de los explantes. Según los resultados la variedad CENTA Costeño II y concentración de 6.75mg/L de BAP produjeron los mayores porcentajes de eficiencia con 98% (Cuadro A-5).

Al analizar los resultados de las variables evaluadas (número de brotes, hojas, raíces y eficiencia de regeneración) se estableció un protocolo específico de regeneración *in vitro* para nudos cotiledonales de la variedad de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) CENTA Costeño II (Anexo 2).

### 4.3. Organogénesis indirecta a partir de meristemos

#### 4.3.1. Número de brotes

Los brotes fueron regenerados a partir de meristemos como respuesta morfogénica a la regeneración *in vitro* de *P. vulgaris* de las variedades Costeño II y Chaparrastique. El mayor número de brotes obtenido fue la combinación variedad CENTA Costeño II y concentración de 2.25mg/L BAP con 5.46 brotes por explante. Mientras que las combinaciones con ausencia de BAP no produjeron respuesta favorable (Figura 8).



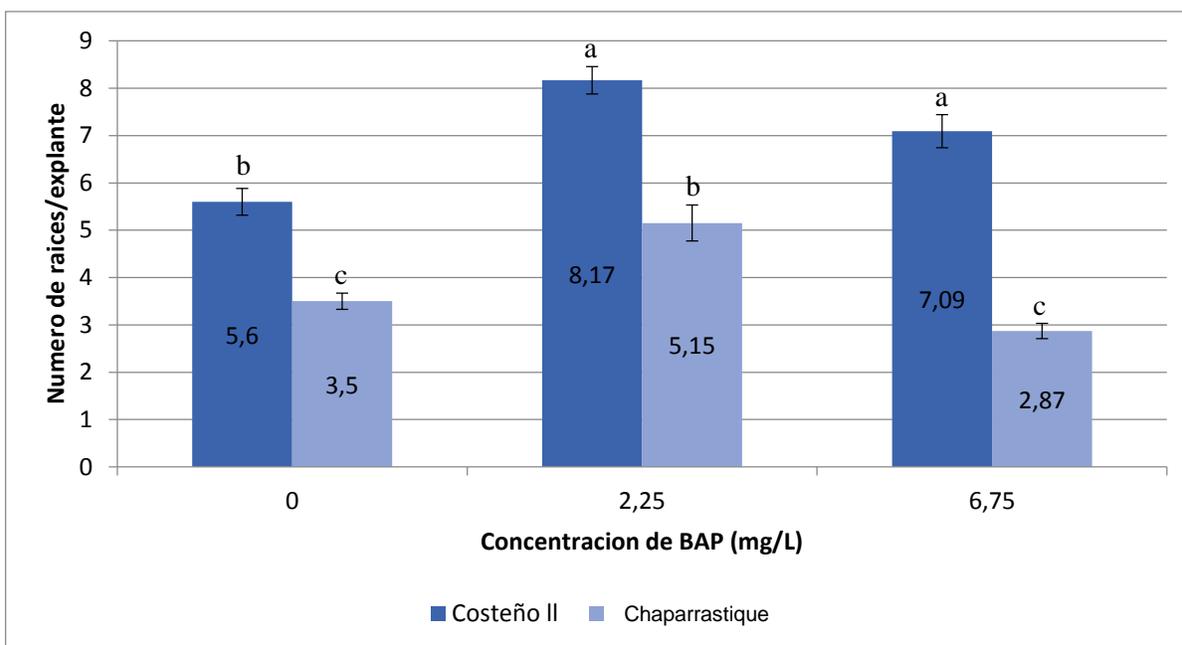
Las mismas letras sobre cada barra denotan promedios iguales estadísticamente con la prueba de comparación de medias Tukey ( $P < 0.01$ ).

**Figura 8:** Efecto del genotipo y Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de brotes a partir de meristemos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).

Al realizar el análisis de varianza de la variable número de brotes por organogénesis indirecta, se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $p$ -valor= 0.0012 < 0.01) (Cuadro A-10); sin embargo, al revisar los promedios de las combinaciones hay una tendencia en que la variedad Costeño II y la concentración de 2.25mg/L de BAP produjo la mayor cantidad de brotes por explante (Cuadro A-9).

#### 4.3.2. Número de hojas

Las hojas fueron regeneradas a partir de meristemos como respuesta morfogénica a la regeneración *in vitro* de *P. vulgaris* de las variedades CENTA Costeño II y CENTA Chaparrastique. El mayor número de hojas obtenidas por organogénesis indirecta (meristemos) fue la combinación variedad CENTA Costeño II y concentración de 2.25mg/L BAP con 8.17 hojas por explante. Mientras que la combinación de la variedad CENTA Chaparrastique con la concentración de 6.75mg/L de BAP produjo la menor cantidad de hojas por explante (2.87) (Figura 9).



Las mismas letras sobre cada barra denotan promedios iguales estadísticamente con la prueba de comparación de medias Tukey ( $P < 0.01$ ).

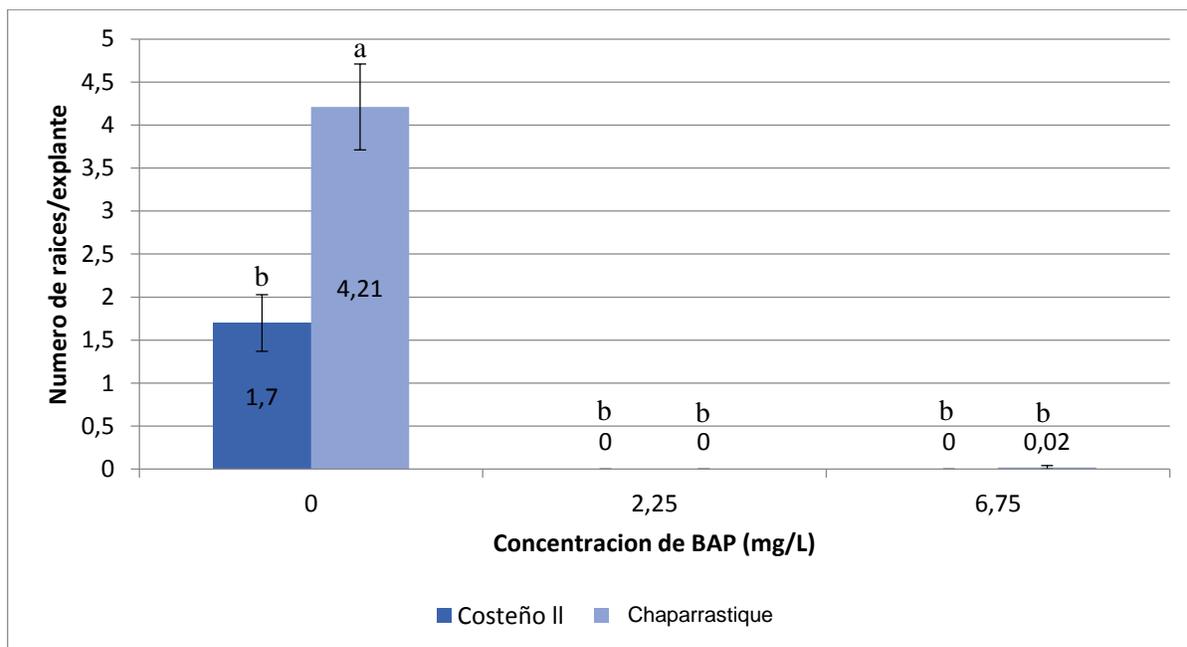
**Figura 9:** Efecto del genotipo y Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de hojas a partir de meristemos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).

Al realizar el análisis de varianza de la variable número de brotes por organogénesis indirecta (nudos cotiledonales), se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $p$ -valor= 0.0030 < 0.01) (Cuadro A-11).

#### 4.3.3. Número de raíces

Las raíces fueron regeneradas a partir de meristemos como respuesta morfogénica a la regeneración *in vitro* de *P. vulgaris* de las variedades CENTA Costeño II y CENTA Chaparrastique. El mayor número de raíces obtenidas por organogénesis indirecta fue la combinación variedad CENTA Chaparrastique en ausencia de BAP con 1.70 raíces por

explante. Mientras que los tratamientos adicionados con BAP no presentaron respuesta favorable a la regeneración de raíces (Figura 10).



Las mismas letras sobre cada barra denotan promedios iguales estadísticamente con la prueba de comparación de medias Tukey ( $P < 0.01$ ).

**Figura 10:** Efecto del genotipo y Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de raíces a partir de meristemos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).

Al realizar el análisis de varianza de la variable número de raíces por organogénesis indirecta (meristemos), se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $p$ -valor =  $0.0008 < 0.01$ ) (Cuadro A-12).

#### 4.3.4. Eficiencia a la regeneración *in vitro* por organogénesis indirecta

La eficiencia es un parámetro que permite cuantificar en porcentaje la respuesta morfogénica de los explantes. En esta investigación variedad CENTA Costeño II y dosis de 2.25 y 6.75 mg/L de BAP produjeron porcentajes de eficiencia más uniformes (100%) (Cuadro A-9).

Al analizar los resultados de las variables evaluadas (número de brotes, hojas, raíces y eficiencia de regeneración) se estableció un protocolo específico de regeneración *in vitro* para meristemos de la variedad de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) CENTA Costeño II (Anexo 3).

## 5. Discusión

El cultivo *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* es considerado ineficiente y de baja reproducibilidad (Zambre *et al.* 2001; Quinteros-Jiménez *et al.* 2010; Martínez *et al.* 2015); lo cual ha sido evidenciado en esta investigación. El interés de obtener sistemas de regeneración *in vitro* de variedades de frijol radica en el potencial uso de esta herramienta en programas de mejoramiento genético de este cultivo (Delgado-Sánchez *et al.* 2006).

Las dos vías de regeneración de plantas organogénesis directa e indirecta fueron estudiadas en esta investigación mediante el uso de ejes embrionarios, nudos cotiledonales y meristemas como explantes.

### Organogénesis directa

La organogénesis directa es un método de regeneración *in vitro* de tejidos vegetales que permite la formación de estructuras morfogénicas (brotes, hojas, raíces, entre otros), directamente del tejido vegetal utilizado como explante (George y Debergh 2008). En frijol común esta vía de regeneración ha sido evaluada principalmente mediante la utilización de ejes embrionarios como explantes (Quinteros-Jiménez *et al.* 2010; Gatica *et al.* 2010; Yu *et al.* 2021). Aunque se han descrito varios protocolos en la literatura para la regeneración directa del frijol, el desarrollo de un sistema de cultivo *in vitro* óptimo persiste como un desafío importante (Veltcheva *et al.* 2005). Esto es conocido como recalcitrancia al cultivo *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* (Martínez *et al.* 2015). En esta investigación la recalcitrancia del frijol común ha sido evidenciada mediante la baja respuesta morfogénica de las variedades CENTA Costeño II Y CENTA Chaparrastique a partir de ejes embrionarios.

Se ha considerado que el desarrollo de nuevas estructuras a través de la organogénesis directa está en función de muchos factores, pero se ha demostrado que la capacidad regenerativa y la respuesta a las condiciones de crecimiento dependen de la especie, del genotipo, del contenido y tipo de nutrientes en el medio y del tipo de explante. Aunque existen muchos protocolos de regeneración *in vitro* de *Phaseolus vulgaris*, un sistema eficiente y reproducible de esta especie parece todavía eludir a la comprensión de la morfogénesis *in vitro* de esta especie. *Phaseolus vulgaris* parece ser la especie más difícil de regenerar *in vitro* en comparación con otras especies de *Phaseolus* tales como *P. acutifolius*, *P. coccineus*, *P. polyanthus*, ya que en estas especies se ha logrado regenerar plantas enteras, en contraste con *P. vulgaris* donde la mayor respuesta ha sido la producción de brotes (Delgado-Sánchez *et al.* 2006). Esto sugiere al menos un protocolo específico de especie y en el caso de esta

investigación un protocolo específico por variedad. Esto debido a que se obtuvo un promedio de brotes por explante diferente en cada variedad (0.98 para la variedad CENTA Chaparrastique y 0.28 para la variedad CENTA Costeño II con 1mg/L de BAP). En el caso del procedimiento establecido por Gatica *et al.* (2010), la investigación se realizó en cinco variedades costarricenses y el número de brotes y hojas difirió notablemente entre ellas, lo que nuevamente sugiere un protocolo específico por genotipo.

De igual forma, la composición del medio de inducción de brotes es importante en el proceso de regeneración por organogénesis, porque es el medio quien define en parte los resultados (Santalla *et al.* 1998). En el caso de esta investigación se evidenció que un medio compuesto por las sales MS suplementado con diferentes concentraciones de BAP producen respuestas morfológicas diferentes. Esto es similar con los resultados obtenidos por Gatica *et al.* (2010) que sugirió que BAP combinado con Adenina Sulfato (AS), mejora el proceso de organogénesis. Así mismo, Martínez *et al.* (2015) obtuvieron con una variedad mexicana de frijol (Bayomex) inducción de brotes en los ejes embrionarios con una concentración de 2.1 mg/L de BAP y produjo en promedio ocho brotes por explante. De igual forma Quinteros-Jiménez *et al.* (2010) evaluaron cuatro variedades de frijol en los medios Murashige y Skoog y Gamborg. La regeneración difirió significativamente entre los dos medios básicos; Gamborg indujo una alta formación de brotes organogénicos, mientras que los medios Murashige y Skoog mostraron una formación de brotes más baja e inconsistente, evidenciándose así la influencia de la composición del medio en la respuesta morfológica del frijol (Hnatuszko-Konka *et al.* 2019).

La eficiencia de regeneración es un parámetro muy utilizado en el cultivo *in vitro* para referirse al porcentaje de formación de brotes *de novo* a partir del explante. En esta investigación se estableció la eficiencia de regeneración de cada tipo de explante utilizado en ambas variedades y se encontró que la utilización de ejes embrionarios produce la menor de las eficiencias (35% y 55% CENTA Costeño II y CENTA Chaparrastique), mientras que los nudos cotiledonales y los meristemas produjeron eficiencias de arriba del 93% para ambas variedades. Estos resultados son comparables a los reportados por Gatica *et al.* (2010) quienes reportaron para variedades costarricenses de frijol eficiencias en el rango del 7% hasta un máximo de 96% mediante la utilización de ejes embrionarios como explantes. De igual forma Quinteros-Jiménez *et al.* (2010) obtuvieron un amplio rango de eficiencias en el medio Murashige y Skoog (15-73 %). Bajo estos parámetros comparativos de eficiencias de regeneración en diferentes variedades de frijol, las eficiencias encontradas en las variedades

salvadoreñas evaluadas en esta investigación son similares y aceptables. La eficiencia de regeneración también permitió en esta investigación establecer los protocolos específicos para cada variedad mediante la utilización de explantes específicos.

En los tratamientos evaluados se observó formación de hojas y raíces. La variable formación de hojas no mostró diferencias estadísticamente significativas en ambas variedades (CENTA Costeño II y CENTA Chaparrastique). Esto podría ser explicado con base en que tampoco el número de brotes por explante resultó ser diferente entre los tratamientos. Estos resultados son distintos a los obtenidos por Gatica y sus compañeros en el año 2010 (en promedio 0.89 a 0.00 hojas por explante) independientemente del cultivar. Caso contrario con la variable número de raíces por explante, donde observaron diferencias significativas en el número de raíces formadas entre los tratamientos evaluados (3.53 a 0.00 raíces por explante). Lo antes mencionado contrasta con esta investigación, ya que el mayor número de raíces por explante se obtuvo en el medio de inducción sin reguladores de crecimiento y se observó que a medida que aumentaban las concentraciones de BAP, el número de raíces por explante disminuyó. En este sentido, Delgado-Sanchez *et al.* (2006) informaron que la ausencia o bajas concentraciones de BAP solo inducen a la formación de raíces y el alargamiento del tallo. En presencia de BAP esto puede ser resuelto mediante un subcultivo en medio de enraizamiento, lo cual ha sido reportado mediante la utilización de Ácido Indol Butírico (IBA), Acido Indol Acético (IAA) o Acido Indol Naftalenacético (NAA) (Kwapata *et al.* 2010). Puesto que el factor más limitante para la brotación y enraizamiento de plantas de frijol común *in vitro* es la alta proliferación de callos que bloquean la formación de raíces y generan compuestos fenólicos que provocan la muerte por oxidación (Arnaldos *et al.* 2001).

### **Organogénesis indirecta**

La estrategia de la organogénesis indirecta es la formación de callos a partir de un segmento o tejido inicial para su posterior multiplicación y formación de brotes, que finalmente regeneren en plántulas (George y Debergh 2008). En el género *Phaseolus* se han reportado investigaciones con diferentes explantes mediante esta vía de regeneración (Ahmed *et al.* 2002; Collado *et al.* 2008; Arellano *et al.* 2009; Dang y Wei, 2009). Algunos autores de estas investigaciones describieron la inducción de callo morfogénico a partir de explantes de nudos cotiledonales (García *et al.* 2008; Collado *et al.* 2013). También se ha reportado la obtención de callos y regeneración de brotes a partir de meristemos apicales como explante (Arellano *et al.* 2009).

Esta estrategia fue evaluada en la presente investigación donde se precultivaron nudos cotiledonales y meristemas en Tidiazurón (TDZ) y Acido Indol Acético (AIA), para formación y proliferación de callos. Collado *et al.* (2013), mencionan que el precultivo en TDZ y AIA de nudos cotiledonales de diferentes variedades de frijol promueve la formación de callos nodulares verdes. Sin embargo, en esta investigación no se obtuvo en ninguna de las variedades evaluadas (CENTA Costeño II y CENTA Chaparrastique) formación de estructuras callogénicas a partir de nudos cotiledonales y meristemas. En contraste una múltiple formación de brotes fue desarrollada en presencia de TDZ y AIA en un periodo de precultivo de 14 días. Estos resultados son similares con los reportados por García *et al.* (2008), quienes evaluaron como precultivo TDZ (1 mg/L) y BAP (1 mg/L). Es importante destacar que las yemas múltiples producidas por este grupo de investigadores fueron obtenidas en medios de cultivos que contenían TDZ, por lo que no fue necesaria la adición de más citoquininas en los medios de cultivo para lograr la regeneración de plantas. Según Malik y Saxena (1992) y De Carvalho *et al.* (2000), la continua exposición de los explantes en medios de cultivo con TDZ no siempre es necesaria, debido a que los materiales vegetales pueden adquirir autosuficiencia después de determinado tiempo en contacto con esta citoquinina.

Así mismo, Dang y Wei en el año 2009 mostraron que la adición de BAP y TDZ al medio mejora la inducción de brotes. En dicha investigación el TDZ fue más eficiente que el BAP. Sin embargo, los resultados de las variedades CENTA Costeño II y CENTA Chaparrastique en diferentes dosis de BAP posteriores al precultivo con TDZ, difieren con los obtenidos por todos los investigadores antes mencionados. Puesto que para nudos cotiledonales y meristemas los mayores números de brotes se obtuvieron en presencia de BAP, aun cuando todos los explantes se precultivaron en medio que contenía TDZ y AIA.

De los brotes regenerados se obtuvo también formación de hojas. A partir de nudos cotiledonales de la variedad CENTA Chaparrastique, los mejores resultados se obtuvieron con las dosis de 2.25 y 6.75 mg/L de BAP. Mientras que al utilizar meristemas como explante, la variedad Costeño II produjo los mejores resultados, exactamente en las mismas concentraciones antes mencionadas. Esto coincide con la afirmación de Hnatuszko-Konka *et al.* (2019), en el indican que el tipo de explantes determina la tasa de inducción de callos y formación de brotes en ambas vías de organogénesis, lo cual podría explicar parcialmente la diferencia en el número de hojas.

También se observó el efecto de la ausencia de BAP en la formación de raíces a partir de meristemas con promedios de 0-4.21 raíces por explante, obteniéndose los mejores resultados

para la variedad Chaparrastique. En el caso de los nudos cotiledonales el promedio por explante osciló entre 0-6.30 raíces por explante. De igual forma los mejores resultados se obtuvieron en los tratamientos con ausencia de BAP, pero en la variedad Costeño II. En esta investigación no se realizó un periodo de enraizamiento con ningún regulador de crecimiento. Sin embargo, en otras investigaciones se han utilizado auxinas (como IBA) para inducir al desarrollo de raíces y esta ha demostrado tener un efecto positivo (Dang y Wey 2009). Además, los compuestos fenólicos *in vitro* causan el ennegrecimiento y la muerte de las células, lo que impide el enraizamiento (Kwapata *et al.* 2010). Con la finalidad de eliminar los problemas fenólicos Yu *et al.* (2021) utilizaron 3,0 mg/L de carbón activado al medio de enraizamiento para superar la influencia de las sustancias fenólicas en el enraizamiento de los brotes *in vitro* en presencia de citoquininas.

## 6. Conclusiones

- La recalcitrancia de *Phaseolus vulgaris* fue evidenciada en esta investigación mediante la organogénesis directa e indirecta en las variedades CENTA Costeño II y CENTA Chaparrastique.
- La adición de BAP al medio de cultivo mejora la regeneración en cuanto al número de brotes en ambas vías de regeneración, independientemente de la variedad de frijol común.
- En el caso de los meristemas los mejores resultados se obtienen con la variedad CENTA Costeño II y en dosis de 2.25mg/L de BAP.
- El precultivo con TDZ y AIA durante 14 días en ambas variedades no genera callos morfogénicos pero si la formación de yemas múltiples.
- Se estableció un sistema de regeneración *in vitro* como primera investigación en estas variedades salvadoreñas de frijol común.

## **7 Recomendaciones**

Utilizar preferentemente la vía de organogénesis indirecta mediante nudos cotiledonales o meristemas como explantes, debido a su eficiencia en la formación de brotes.

La utilización de nudos cotiledonales como explantes mediante organogénesis indirecta y una concentración de 2.25mg/L de BAP para la morfogénesis y regeneración de las variedades CENTA Costeño II y CENTA Chaparrastique.

Realizar subcultivos con intervalos máximos de 14 días para lograr mejores resultados tanto para nudos cotiledonales como para meristemas de las variedades CENTA Costeño II y CENTA Chaparrastique.

## 8 Bibliografía

- Ahmed, EE; Bisztray, GY; Velich, I. 2002. Plant regeneration from seedling explants of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Acta Biologica Szegediensis. 46(3-4):27-28.
- Aragão, FJL; Campos, FAP. 2007. Common Bean and Cowpea. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Springer Berlin Heidelberg. 263-276.
- Arellano, J; Fuentes, SI; Castillo-Espana, P; Hernandez, G. 2009. Regereneration of different cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) via indirect organogénesis. Plant Cell Tissue Organ Cult. 96:223-36.
- Argüellas Cárdenas, JH; Carvajal Rojas, GH. 2013. Estadística y Diseño de Experimentos. Aplicaciones prácticas para diseño de experimentos en sistemas agropecuarios tropicales. Bogotá. Colombia. 70p.
- Arias-Ortiz, CF; Ascacio-Martínez, JA; Barrera Saldaña, HA; Bolívar-Zapata, FG; BoschGuha, P; Cárdenas-Cota, HM; De la Torre-Martínez, M. 2007. Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna. 2ª ed. ISBN: 978-970-640-352-0.
- Arnaldos, TL; Muñoz, R; Ferrer, MA; Calderon, AA. 2001. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria ananasa* cv. Chandler) callus culture. Plant Physiology. 113:315-322.
- Beebe, SD; Rengifo, J; Gaitan, E; Duque, MC; Tohme, J. 2001. Diversity and origin of Andean landraces of common bean. Crop Science. 41:854-862.
- Beebe, SD; Skroch, PW; Tohme, J; Duque, MC; Pedraza, F; Nienhuis, J. 2000. Structure of genetic diversity between common bean land races of Middle America origin based on correspondence analysis of RAPD. Crop Science. 49:264-273.
- Benítez, DE. 2006. Vitaminas y oxidorreductores antioxidantes: defensa ante el estrés oxidativo. Revista Cubana Invest Biomed. 1-8.
- Blair, MW; Galeano, CH; Tovar, E; Torres, MCM; Castrillón, AV; Beebe, SE; Rao, IM. 2012. Development of a Mesoamerican intra-genepool genetic map for quantitative trait loci detection in a drought tolerant susceptible common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cross. Molecular Breeding. 29(1):71-88.ç
- Bortesi, L; Fischer, R. 2014. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. Biotechnol. Adv. 33: 41-52
- CENTA (Centro Nacional De Tecnología Agropecuaria y Forestal). 1996 Guía técnica, Programa de granos básicos cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*). San Andrés, La Libertad, El Salvador, C.A.

- CENTA (Centro Nacional De Tecnología Agropecuaria y Forestal). 2008 Guía Técnica para el Manejo de Variedades de Frijol. Programa de Granos Básicos. 24.
- CENTA (Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal). 2011. CENTA Chaparrastique. Nueva variedad de frijol de grano rojo con alto potencial de rendimiento y resistencia a las principales plagas y enfermedades. San Andrés, La Libertad.2.
- CENTA (Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal). 2014. CENTA Costeño II. Variedad de frijol grano rojo para condiciones de humedad limitada y altas temperaturas. Programa de Granos Básicos.
- CENTA (Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal). 2015. El cultivo de frijol en El Salvador.
- CENTA (Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal). 2018. CULTIVO DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.). Programa de granos básicos. 37.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1975. El potencial del frijol y de otras leguminosas de grano comestible en América Latina. Colombia.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1984. Morfología de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Cali. Colombia.
- Collado, R; Veitía, N; Bermúdez-Carabaloso, I; García, LR; Torres, Romero, D; Rodríguez Lorenzo, JL; Angenon G. 2013. Efficient *in vitro* plant regeneration by indirect organogenesis for different cultivars of common bean. *Scientia horticultrae*. 153:109-116.
- Criollo, H; Insuasti, K; Delgado, W. 2016. Regeneración *in vitro* de plántulas de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav. Sendt). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*. 253.
- Dang, W; Wei, Z.M. 2009. High frequency plant regeneration from the cotyledonary node of common bean.. *Biologia Plantarum*. 53(2):312-316.
- Delgado-Sánchez, P; Saucedo Ruiz, M; Guzmán Maldonado, SH; Villordo Pineda, E; González Chavira, M; Fraire Velázquez, S; Acosta Gallegos, JA; Mora Avilés, A. 2006. An organogenic plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant science*. 170(4):822-827.
- Estrada, G; Guillén, G; Olivares, JE; Díaz, C; Alvarado, X; Sánchez, F. 2007. La transformación genética y genómica del frijol. *Biotecnología*. 14:281-290.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 1989. Food balance sheets, 1975-77 Average. Roma, Italia.

- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2018. Legumbres. Pequeñas semillas, grandes soluciones. ISBN 978-92-5-131129-5. 292.
- Freytag, GF; Debouck DG. 2002. Taxonomy, distribution, and ecology of the genus *Phaseolus* (Leguminosae-Papilionideae) in North America, Mexico and Central America. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 36(2). 95-104.
- Gamborg, OL; Miller, RA; Ojima, K. 1968. Requerimientos de nutrientes de cultivos en suspensión de células de raíz de soja. *Exp. Cell Res.* 50:151-158.
- García, LR; Collado, R; Angenon, G; Torres, D; Romero, C; Bermúdez-Caraballosa, I; Veitía, N; Ramírez, M. 2008. Organogénesis indirecta en *Phaseolus vulgaris* L. cv. CIAP 7247. *Biología Vegetal*. 8(2): 81-86.
- García, LR; Collado, R; Bermúdez-Caraballosa, I; Veitía, N; Torres, D; Romero, C. 2008. Regeneration of plants via direct organogenesis in *Phaseolus vulgaris* L. *Biología Vegetal*. 8:109-114.
- García, LR; Pérez, J; Kosky, RG; Bermúdez-Caraballosa, I; Veitía, N; Collado, R; Padrón, Y; Torres, D; Romero, C; Reyes, M. 2010. Regeneración de plantas vía embriogénesis somática en *Phaseolus acutifolius* A. Gray. *Biología Vegetal*. 10(3):143-149.
- Gatica Arias, AM; Valverde, JM; Fonseca, PR; Melara, MW. 2010. In vitro plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris*): effect of N6-benzylaminopurine and adenine sulphate. *Electronic Journal of Biotechnology*. 13:1-8.
- Gentry, HS. 1969. Origin of the common bean, *Phaseolus vulgaris*. *Econ. Bot.* 23:55-69.
- George, EF; Debergh, PC. 2008. Micropropagation: Uses and Methods. *Plant propagation by tissue culture*. 29-64.
- Gepts, P; Aragão, FJL; Barros, E; Blair, MW; Brondani, R; Broughton, W; Galasso, I; Hernández, G; Kami, J; Lariguet, P. 2008. Genomics of *Phaseolus* beans, a major source of dietary protein and micronutrients in the tropics. *Genomics of Tropical Crop Plants*. 113-143.
- Grajales, M; Beebe, SE; Rao, IM; Cajiao, C. 2008. Selection for drought resistance in common bean also improves yield in phosphorus limited and favorable environments. *Crop science*. 48(2):582-592.
- Hnatuszko-Konka, K; Kowalczyk, T; Gerszberg, A; Glinska, S; Grzegorzczak-Karolak, I. 2019. Regeneration of *Phaseolus vulgaris* from epicotyls and hypocotyls via direct organogenesis. *Sci Rep*. 9:6248.
- Kwak, M; Kami, JA; Gepts, P. 2009. The putative Mesoamerican domestication center of *Phaseolus vulgaris* is located in the Lerma-Santiago Basin of Mexico. *Crop Science*.

49:554-563.

- Kwapata, K; Sabzikar, R; Sticklen, MB; Kelly, JD. 2010. In vitro morphogenesis and regeneration studies in common beans. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 100:97-105.
- Lizana, C; Wentworth, M; Martinez, JP; Villegas, D; Meneses, R; Murchie, EH; Pastenes, C; Lercari, B; Vernieri, P; Horton, P. 2006. Differential adaptation of two varieties of common bean to abiotic stress I. Effects of drought on yield and photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*. 57(3):685-697.
- MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería). 2012. Consultado 04 feb. 2021. Disponible en [http://old.mag.gob.sv/index.php?option=com\\_phocadownload&view=category&download=345:informe-de-encuesta-de-intenciones-de-siembra-de-granos-basicos-2012&id=19:informes-de-primera-encuesta-agropecuaria-de-propositos-multiples&Itemid=227](http://old.mag.gob.sv/index.php?option=com_phocadownload&view=category&download=345:informe-de-encuesta-de-intenciones-de-siembra-de-granos-basicos-2012&id=19:informes-de-primera-encuesta-agropecuaria-de-propositos-multiples&Itemid=227)
- Malik, KA; Saxena, PK. 1992. Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L.: high-frequency induction of direct shoot formation in intact seedlings by N6-benzylaminopurine and thidiazuron.. *Planta*. 186: 384-389.
- Martínez Castillo, B; Rodríguez de la O, JL; J. Mascorro Gallardo, O; Iturriaga, G. 2015. In vitro Plants of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Obtained by Direct Organogenesis. *Journal of Agricultural Science*. 7(11): 1916-9752.
- McClean, P; Lavin, M; Gepts, P; Jackson, SA. 2008. *Phaseolus vulgaris*: a diploid model for soybean. *Springers Science & Business*. 55-76.
- Miranda-Colín, S. 1967. Origen de *Phaseolus vulgaris* L. (frijol común). *Agrociencia* 1:99-104.
- Moh, CC. 1972. Induced seed-coat colour mutation in beans and their significance for bean improvement. *International Atomic Energy Agency*. 3:67-74.
- Mohamed, MF; Coyne, DP; Read, PE. 1993. Shoot organogenesis in callus induced from pedicel explants of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *American Journal of Plant Sciences* .118(1): 158-62.
- Mroginski, L; Roca, WM. 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. (en línea). Consultado 24 de abr. 2021. Disponible en <https://cgspace.cgiar.org/handle/10569/54686>
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15(3):473-497.
- Narváez, GS. 2009. Regeneración de brotes a partir de hojas provenientes de plantas *in vitro* de rosa variedad Akito (*Rosa sp.* Var Akito). Sangolquí.

- Papa, R; Gepts, PL. 2003. Asymmetry of gene flow and differential geographical structure of molecular diversity in wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mesoamerica. *Theoretical and Applied Genetics*. 106:239-250.
- Parsons, DB. 1999. Fríjol y chícharo. 2° edición. México.
- Pérez, JL. 2006. Embriogénesis somática en frijol terapi. Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas. 1-88.
- Quintero-Jiménez, A; Espinosa-Huerta, E; Acosta-Gallegos, J; Guzmán-Maldonado, H; Mora-Avilés, M. 2010. Organogenesis improvement and sprout regeneration in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*.102:381-386.
- Ramirez, JCR; Rangel, IBEU. 2011. El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. *Revista Fuente Año*. 3(8):5-9.
- Rosas, JC. 2003. El cultivo de frijol común en América Tropical. Escuela Agrícola Panamericana/Zamorano. Honduras.
- Santalla, M; Power, JB; Davey, MR.1998. Efficient in vitro shoot regeneration responses of *Phaseolus vulgaris* and *P. coccineus*. *Euphytica* 102:195–202.
- Superintendencia de Competencia. 2015. Caracterización de la agroindustria del frijol rojo y sus condiciones de competencia en El Salvador (2007-2014) (en línea). Consultado 07 feb. 2021. Disponible en [https://www.sc.gob.sv/wp-content/uploads/estudios\\_IE/estudios\\_PDF/Estudio\\_Frijol.pdf](https://www.sc.gob.sv/wp-content/uploads/estudios_IE/estudios_PDF/Estudio_Frijol.pdf)
- Svetleva, D; Velcheva, M; Bhowmik, G. 2003. Biotechnology as a useful tool in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) improvement. *Euphytica* 131:189–200.
- Torrescano De Labra, L. 2014. Cultivo in vitro y evaluación de la expresión transitoria del gen uidA en *Phaseolus vulgaris*. Instituto Politécnico Nacional. 1-88.
- Veltcheva, M., Svetleva, D., Petkova, S., Perl, A. 2005. Invitro regeneration and genetic transformation of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) - problems and progress. *Scientia Horticulturae*. 107:2-10.
- Villamizar, EA. 2005. Estandarización del protocolo in vitro para el establecimiento de encenillo (*Weinmannia tomentosa*) y el rodante (*Escallonia mytilloides*) en el laboratorio de cultivos del jardín botánico José Celestino Mutis. Colombia.
- Yu, Y; Liu, D; Liu, C; Yan, Z; Yang, X; Feng, G. 2021. In vitro regeneration of *Phaseolus vulgaris* L. via direct and indirect organogénesis. *Plant Biotechnology Reports*.15:279–288.
- Zambre, MA; De Clercq, J; Vranova, E; Van Montagu, M; Angenon, G; Dillen, W. 1998. Plant regeneration from embryo-derived callus in *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) and

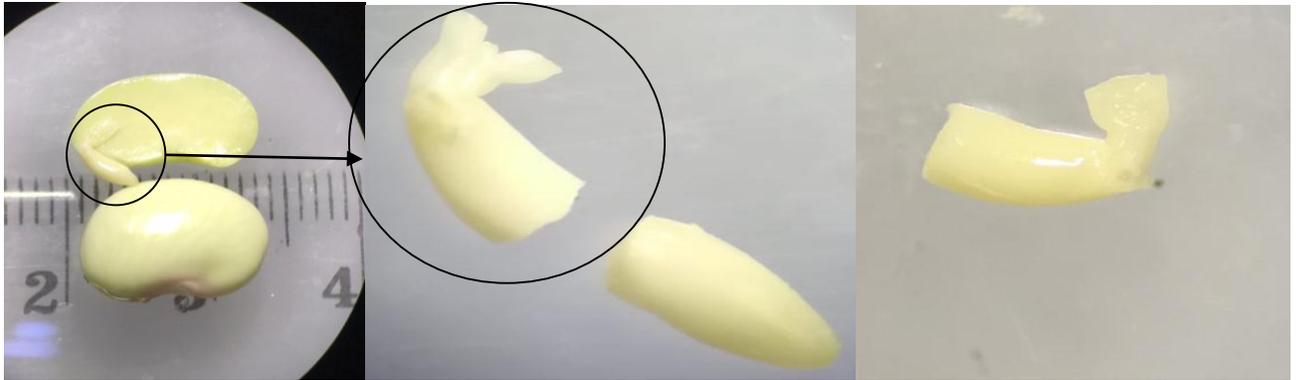
*P. acutifolius* A. Gray (terapy bean). Plant Cell Reports. 17(8):626-630.

Zelada, LI. 2014. La producción y comercialización del frijol en El Salvador (en línea).

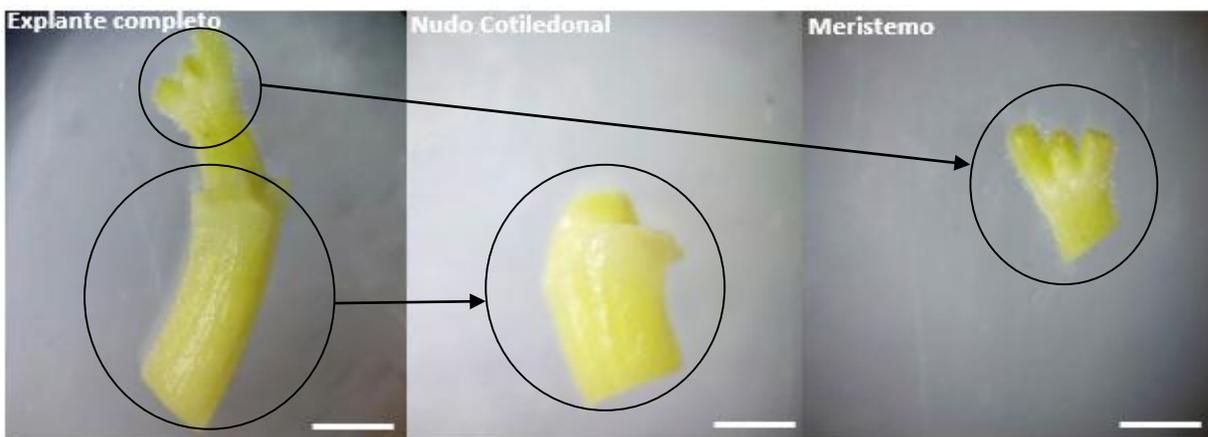
Consultado 05 feb. 2021. Disponible en

<http://revistas.ues.edu.sv/index.php/coyunec/article/view/416>

## 9 Anexos



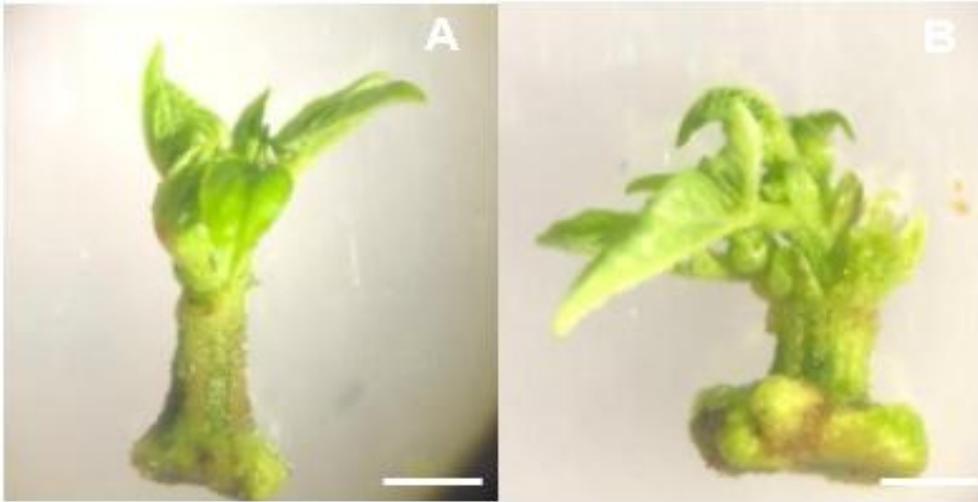
**Figura A-1:** Diseción de ejes embrionarios (vista en estereoscopio). Las barras blancas representan 1cm.



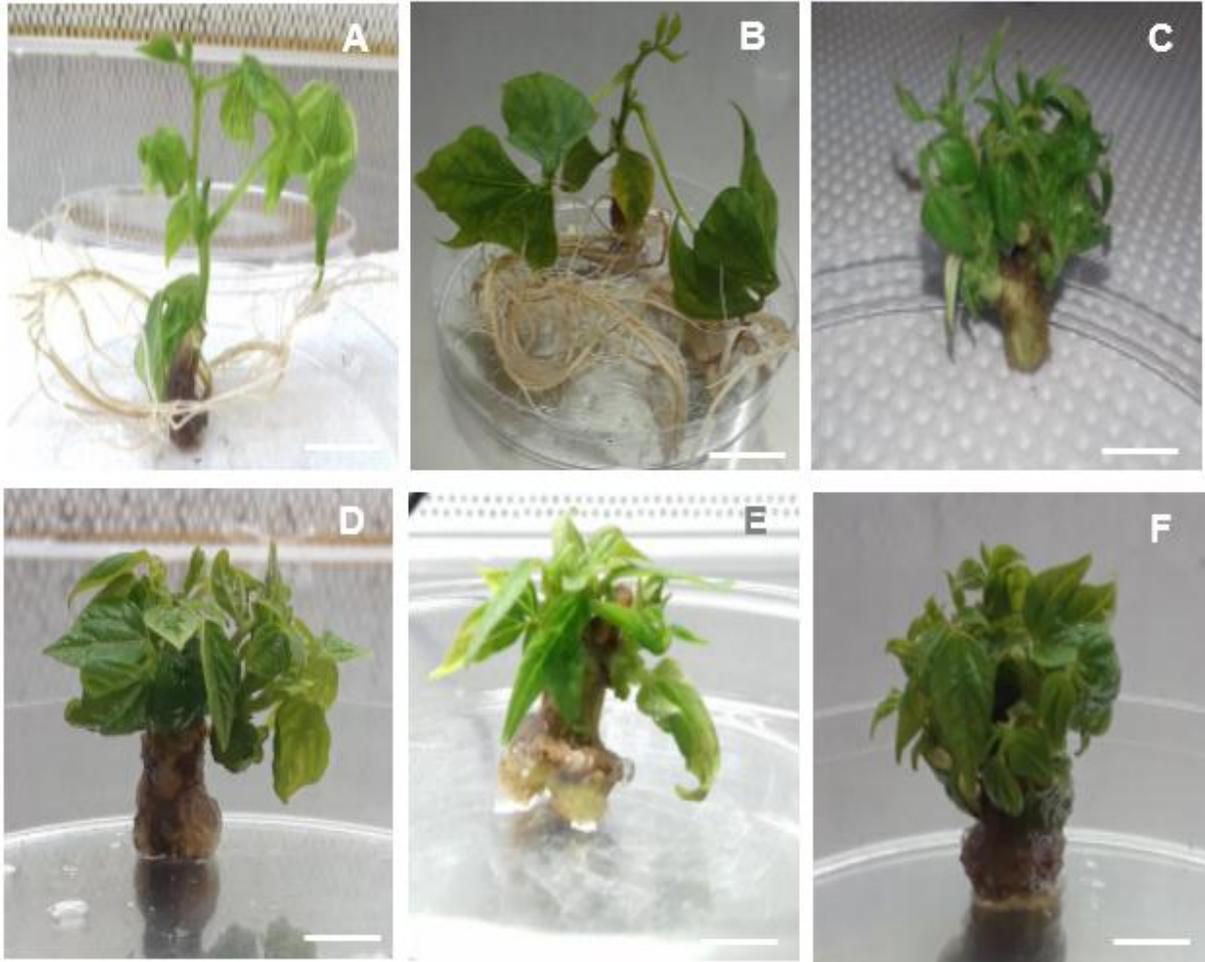
**Figura A-2:** Diseción de explantes (nudos cotiledonales y meristemos). Las barras blancas representan 1cm.



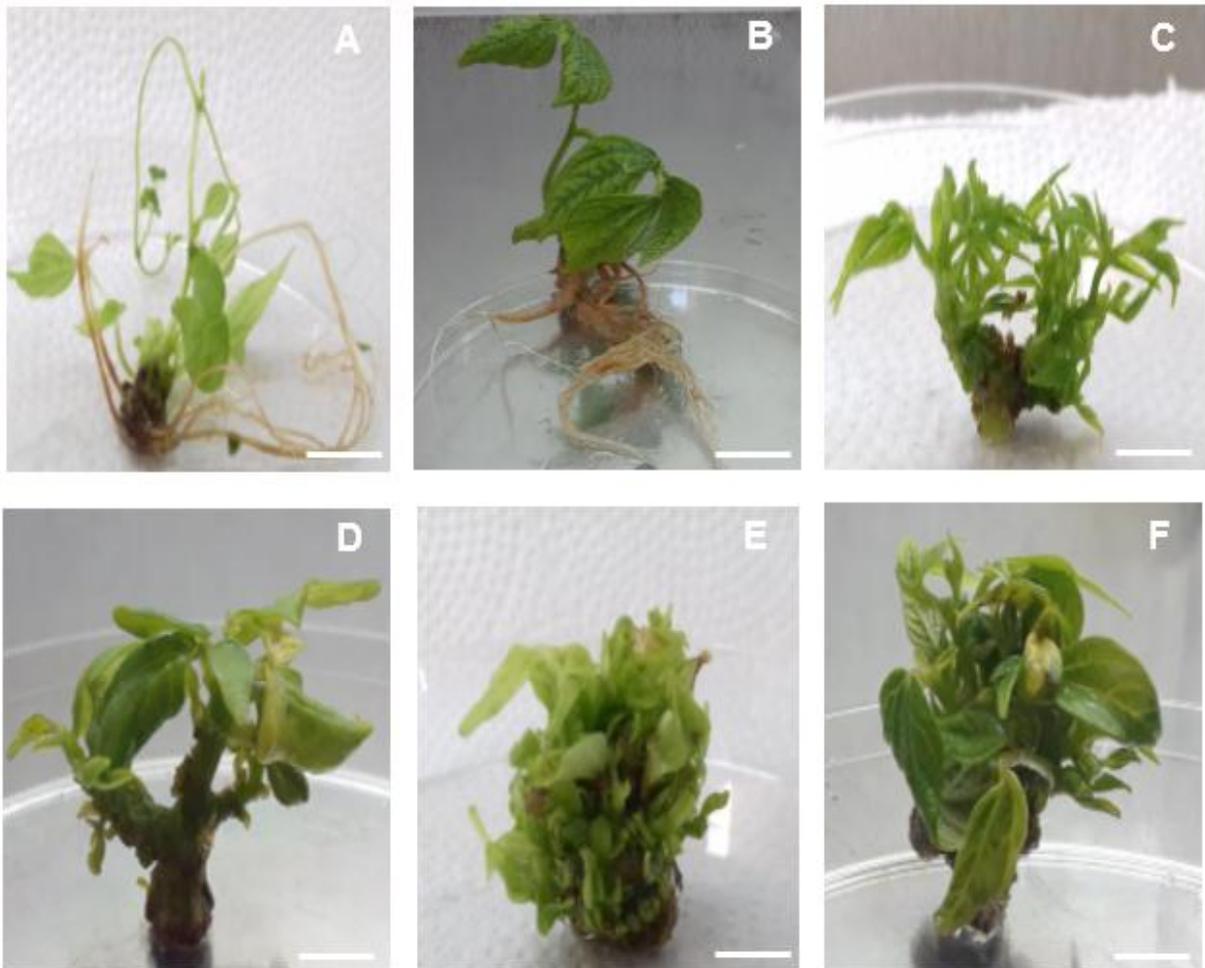
**Figura A-3:** Regeneración *in vitro* de *P. vulgaris* L. Organogénesis directa variedades Costeño II y Chaparrastique obtenidos de ejes embrionarios a los 42 días de haber concluido el ensayo. **(A)** Ejes embrionarios con presencia de oxidación. **(B)** Explante muerto debido a la poca eficiencia a la regeneración *in vitro*. **(C)** y **(D)** Las dos variedades en estudio suplementadas con 0mg/L de BAP se observó una producción de raíces y hojas en cada explante, sin embargo, no se logró regenerar ningún brote. **(G)** y **(H)** Var. Costeño II y Chaparrastique respectivamente suplementado con 1mg/L de BAP se evidenció respuesta favorable a la regeneración de brotes. **(E)** y **(F)** Var. Costeño II y Chaparrastique suplementado con 5mg/L de BAP se obtuvo respuesta favorable a la producción de brotes. Las Barras blancas representan 1cm.



**Figura A-4:** Regeneración *in vitro* de *P. vulgaris* L. Organogénesis indirecta variedades Costeño II y Chaparrastique. **(A)** y **(B)** Meristemo y nudo cotiledonal respectivamente, después de haber transcurrido 14 días en un precultivo con TDZ y AIA. Las barras blancas representan 1cm.



**Figura A-5:** Regeneración *in vitro* de *P. vulgaris* L. Organogénesis indirecta variedades Costeño II y Chaparrastique obtenidos de nudos cotiledonales a los 28 días de haber concluido el ensayo. **(A)** y **(B)** Var. Costeño II y Chaparrastique suplementadas con 0mg/L de BAP con producción de raíces y hojas, sin embargo, no se logró regenerar ningún brote. **(C)** y **(D)** Var. Costeño II y Chaparrastique suplementado con 2.25mg/L de BAP se evidenció respuesta favorable a la regeneración de brotes y hojas. **(E)** y **(F)** Var. Costeño II y Chaparrastique suplementado con 6.75mg/L de BAP con respuesta favorable a la producción de brotes. Las barras blancas representan 1cm.



**Figura A-6:** Regeneración *in vitro* de *P. vulgaris* L. Organogénesis indirecta variedades Costeño II y Chaparrastique obtenidos de meristemas a los 28 días de haber concluido el ensayo. **(A)** y **(B)** Var. Costeño II y Chaparrastique suplementadas con 0mg/L de BAP con producción de raíces y hojas en cada explante, sin embargo, no se logró regenerar ningún brote. **(C)** y **(D)** Var. Costeño II y Chaparrastique respectivamente suplementado con 2.25mg/L de BAP se evidenció respuesta favorable a la regeneración de brotes y hojas. **(E)** y **(F)** Var. Costeño II y Chaparrastique suplementadas con 6.75mg/L de BAP con respuesta favorable a la producción de brotes y hojas. Las barras blancas representan 1cm.



**Figura A-7:** Aclimatación de Variedades Centa Costeño II y Centa Chaparrastique a los 35 días. La barra blanca representa 1cm.

Cuadro A-1. Efecto del genotipo y Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de brotes, hojas, raíces y eficiencia de regeneración a partir de ejes embrionarios de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).

Variables	Genotipo de frijol	Dosis de BAP	Promedio	Error estándar
Número de brotes	CENTA	0.00	0.00	0.00 (b) <sup>1</sup>
		1.00	0.98	0.17 (a)
		5.00	0.91	0.21 (a)
	CENTA Costeño II	0.00	0.00	0.00 (b)
		1.00	0.28	0.12 (ab)
		5.00	0.58	0.22 (ab)
Número de hojas	CENTA	0.00	3.57	0.37 (a)
		1.00	4.17	0.48 (a)
		5.00	3.04	0.22 (a)
	CENTA Costeño II	0.00	3.41	0.33 (a)
		1.00	2.28	0.46 (a)
		5.00	2.34	0.43 (a)
Número de raíces	CENTA	0.00	4.89	0.67 (a)
		1.00	0.00	0.00 (b)
		5.00	0.00	0.00 (b)
	CENTA Costeño II	0.00	6.06	0.70 (a)
		1.00	0.56	0.17 (b)
		5.00	0.00	0.00 (b)
Eficiencia a la regeneración <i>in vitro</i> (%)	CENTA	0.00	0	
		1.00	55	
		5.00	57	
	CENTA Costeño II	0.00	0	
		1.00	43	
		5.00	35	

<sup>1</sup>Las mismas letras dentro de cada variable denotan promedios iguales estadísticamente con la prueba de comparación de medias Tukey ( $P < 0.01$ ).

Cuadro A-2. Resumen de análisis de varianza para la variable número de brotes a partir de ejes embrionarios.

<b>Variable</b>	<b>CME</b>	<b>CV</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Nivel de significancia para tratamientos (p-valor)</b>
Número de brotes	0.31	69.69	0.66	0.0673

CME: Coeficiente medio del error.

CV: Coeficiente de variación.

R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinación.

Cuadro A-3. Resumen de análisis de varianza para la variable número de hojas a partir de ejes embrionarios.

<b>Variable</b>	<b>CM E</b>	<b>CV</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Nivel de significancia para tratamientos (p-valor)</b>
Número de hojas	1.96	27.8 9	0.4 3	0.0975

CME: Coeficiente medio del error.

CV: Coeficiente de variación.

R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinación.

Cuadro A-4. Resumen de análisis de varianza para la variable número de raíces a partir de ejes embrionarios.

<b>Variable</b>	<b>CM E</b>	<b>CV</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Nivel de significancia para tratamientos (p-valor)</b>
Número de raíces	0.85	47.4 8	0.9 1	0.3735

CME: Coeficiente medio del error.

CV: Coeficiente de variación.

R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinación.

Cuadro A-5. Efecto del genotipo y Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de brotes, hojas, raíces y eficiencia de regeneración a partir de nudos cotiledonales de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).

Variables	Genotipo de frijol	Dosis de BAP	Promedio	Error estándar
Número de brotes	CENTA Costeño II	0.00	0.00	0.00 (b) <sup>1</sup>
		2.25	5.51	0.08 (a)
	CENTA Chaparrastique	6.75	5.10	0.08 (a)
		0.00	0.00	0.00 (b)
		2.25	5.01	0.56 (a)
		6.75	4.51	0.57 (a)
Número de hojas	CENTA Costeño II	0.00	3.87	0.08 (bc)
		2.25	5.66	0.09 (ab)
	CENTA Chaparrastique	6.75	6.75	0.10 (ab)
		0.00	1.37	0.23 (c)
		2.25	8.16	1.01 (a)
		6.75	8.47	0.75 (a)
Número de raíces	CENTA Costeño II	0.00	6.30	0.14 (a)
		2.25	0.00	0.00 (c)
	CENTA Chaparrastique	6.75	0.00	0.00 (c)
		0.00	1.72	0.37 (b)
		2.25	0.00	0.00 (c)
		6.75	0.10	0.10 (c)
Eficiencia a la regeneración <i>in vitro</i> (%)	CENTA Costeño II	0.00	0	
		2.25	93	
	CENTA Chaparrastique	6.75	98	
		0.00	0	
		2.25	96	
		6.75	89	

<sup>1</sup>Las mismas letras dentro de cada variable denotan promedios iguales estadísticamente con la prueba de comparación de medias Tukey ( $P < 0.01$ ).

Cuadro A-6. Resumen de análisis de varianza para la variable número de brotes a partir de nudos cotiledonales.

<b>Variable</b>	<b>CM E</b>	<b>CV</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Nivel de significancia para tratamientos (p-valor)</b>
Número de brotes	0.25	24.3 7	0.9 1	0.6890

CME: Coeficiente medio del error.

CV: Coeficiente de variación.

R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinación.

Cuadro A-7. Resumen de análisis de varianza para la variable número de hojas a partir de nudos cotiledonales.

<b>Variable</b>	<b>CME</b>	<b>CV</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Nivel de significancia para tratamientos (p-valor)</b>
Número de hojas	18.1 0	24.7 4	0.7 9	0.0012

CME: Coeficiente medio del error.

CV: Coeficiente de variación.

R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinación.

Cuadro A-8. Resumen de análisis de varianza para la variable número de raíces a partir de nudos cotiledonales.

<b>Variable</b>	<b>CME</b>	<b>CV</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Nivel de significancia para tratamientos (p-valor)</b>
Número de raíces	17.85	39.03	0.96	0.0001

CME: Coeficiente medio del error.

CV: Coeficiente de variación.

R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinación.

Cuadro A-9. Efecto del genotipo y Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de brotes, hojas, raíces y eficiencia de regeneración a partir de meritemos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).

Variables	Genotipo de frijol	Dosis de BAP	Promedio	Error estándar
Número de brotes	CENTA Costeño II	0.00	0.00	0.00 (c)
		2.25	5.46	0.49 (a)
	CENTA Chaparrastique	6.75	4.13	0.23 (ab)
		0.00	0.00	0.00 (c)
		2.25	2.65	0.10 (b)
		6.75	2.43	0.08 (b)
Número de hojas	CENTA Costeño II	0.00	5.60	0.28 (b)
		2.25	8.17	0.29 (a)
	CENTA Chaparrastique	6.75	7.09	0.35 (a)
		0.00	3.50	0.17 (c)
		2.25	5.15	0.38 (b)
		6.75	2.87	0.16 (c)
Número de raíces	CENTA Costeño II	0.00	1.70	0.33 (b)
		2.25	0.00	0.00 (b)
	CENTA Chaparrastique	6.75	0.00	0.00 (b)
		0.00	4.21	0.50 (a)
		2.25	0.00	0.00 (b)
		6.75	0.02	0.02 (b)
Eficiencia a la regeneración <i>in vitro</i> (%)	CENTA Costeño II	0.00	0	
		2.25	100	
	CENTA Chaparrastique	6.75	100	
		0.00	0	
		2.25	100	
		6.75	96	

<sup>1</sup>Las mismas letras dentro de cada variable denotan promedios iguales estadísticamente con la prueba de comparación de medias Tukey ( $P < 0.01$ ).

Cuadro A-10. Resumen de análisis de varianza para la variable número de brotes a partir de meristemos.

<b>Variable</b>	<b>CME</b>	<b>CV</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Nivel de significancia para tratamientos (p-valor)</b>
Número de brotes	4.01	25.83	0.93	0.0012

CME: Coeficiente medio del error.

CV: Coeficiente de variación.

R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinación.

Cuadro A-11. Resumen de análisis de varianza para la variable número de hojas a partir de meristemos.

<b>Variable</b>	<b>CM E</b>	<b>CV</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Nivel de significancia para tratamientos (p-valor)</b>
Número de hojas	0.28	9.7 3	0.9 4	0.0030

CME: Coeficiente medio del error.

CV: Coeficiente de variación.

R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinación.

Cuadro A-12. Resumen de análisis de varianza para la variable número de raíces a partir de meristemos.

<b>Variable</b>	<b>CME</b>	<b>CV</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Nivel de significancia para tratamientos (p-valor)</b>
Número de raíces	4.18	62.63	0.90	0.0008

CME: Coeficiente medio del error.

CV: Coeficiente de variación.

R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinación.

Anexo 1. Protocolo específico de regeneración *in vitro* para ejes embrionario de la variedad de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) CENTA Chaparrastique.

**PROTOKOLO DE REGENERACION *IN VITRO* VIA ORGANOGENESIS DIRECTA PARA EJES EMBRIONARIOS DE FRIJOL COMUN (*Phaseolus vulgaris* L.) Var. CENTA CHAPARRASTIQUE.**

**1. Desinfección de semillas**

Desinfecte las semillas con alcohol etílico al 70% durante 1 minuto en agitación constante.

Deseche el alcohol y continúe la desinfección con una solución de NACIO al 1% adicionada con tres gotas de Tween 20 por cada 100 ml de agua.

Agite por 20 minutos.

Haga tres lavados con agua destilada estéril o hasta eliminar la solución desinfectante.

**2. Imbibición de semillas**

Coloque las semillas en un enlenmeyer con agua estéril y selle el frasco con plastic grap.

Deje en imbibición durante 16-18 horas (a  $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

**3. Extracción de ejes embrionarios**

Retire la cubierta seminal y disecte los ejes embrionarios con la ayuda de pinzas y bisturí estériles en cámaras de flujo laminar.

Corte el meristemo radicular y hojas cotiledonales.

Coloque los ejes embrionarios en un frasco con agua destilada hasta terminar de extraer todos los explantes para evitar deshidratación.

**4. Desinfección de ejes embrionarios**

Desinfecte los ejes embrionarios con NACIO al 0.1% durante 10 minutos en agitación constante.

Haga tres lavados con agua destilada estéril.

### **5. Cultivo de ejes embrionarios en condiciones de fotoperíodo**

Coloque los ejes embrionarios en forma vertical en frascos con 25 ml de medio semisólido MS (Murashige y Skoog 1962) con PH 5.7 suplementado con 100 mg/L de mioinositol, 0.1 mg/L de tiamina, 0.5 mg/L de ácido nicotínico, 0.5 mg/L de piridoxina, 2 mg/L de glicina, 30 g/L de sacarosa, 8 g/L de agar y 1 ml/L de BAP.

Mantenga durante 21 días en condiciones de 16 horas luz / 8 horas oscuridad a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  y  $58 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ .

### **6. Subcultivo de ejes embrionarios**

Al cabo 21 días transfiera los explantes al mismo medio de cultivo y manténgalo en las condiciones descritas anteriormente.

### **7. Evaluación de la regeneración**

Transcurridos 42 días de iniciado el ensayo evalúe la respuesta a la regeneración *in vitro* mediante los siguientes indicadores: número de brotes, número de hojas y número de raíces.

Anexo 2. Protocolo específico de regeneración *in vitro* para ejes embrionario de la variedad de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) CÉNTA Costeño II.

**PROCOTOLO DE REGENERACION *IN VITRO* VIA ORGANOGENESIS DIRECTA PARA EJES EMBRIONARIOS DE FRIJOL COMUN (*Phaseolus vulgaris* L.) Var CÉNTA COSTEÑO II.**

**1. Desinfección de semilla**

Desinfecte las semillas con alcohol etílico al 70% durante 1 minuto en agitación constante.

Deseche el alcohol y continúe la desinfección con una solución de NACIO al 1% adicionada con tres gotas de Tween 20 por cada 100 ml de agua.

Agite por 20 minutos.

Haga tres lavados con agua destilada estéril o hasta eliminar la solución desinfectante.

**2. Imbibición de semillas**

Coloque las semillas en un enlenmeyer con agua estéril y selle el frasco con plastic grap.

Deje en imbibición durante 16-18 horas (a  $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

**3. Extracción de ejes embrionarios**

Retire la cubierta seminal y disecte los ejes embrionarios con la ayuda de pinzas y bisturí estériles en cámaras de flujo laminar.

Corte el meristemo radicular y hojas cotiledonales.

Coloque los ejes embrionarios en un frasco con agua destilada hasta terminar de extraer todos los explantes para evitar deshidratación.

**4. Desinfección de ejes embrionarios**

Desinfecte los ejes embrionarios con NACIO al 0.1% durante 10 minutos en agitación constante.

Haga tres lavados con agua destilada estéril.

### **5. Cultivo de ejes embrionarios en condiciones de fotoperíodo**

Coloque los ejes embrionarios en forma vertical en frascos con 25 ml de medio semisólido MS (Murashige y Skoog 1962) con PH 5.7 suplementado con 100 mg/L de mioinositol, 0.1 mg/L de tiamina, 0.5 mg/L de ácido nicotínico, 0.5 mg/L de piridoxina, 2 mg/L de glicina, 30 g/L de sacarosa, 8 g/L de agar y 1 ml/L de BAP.

Mantenga durante 21 días en condiciones de 16 horas luz / 8 horas oscuridad a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  y  $58 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ .

### **6. Subcultivo de ejes embrionarios**

Al cabo 21 días transfiera los explantes al mismo medio de cultivo y manténgalo en las condiciones descritas anteriormente.

### **7. Evaluación de la regeneración**

Transcurridos 42 días de iniciado el ensayo evalúe la respuesta a la regeneración *in vitro* mediante los siguientes indicadores: número de brotes, número de hojas y número de raíces.

Anexo 3. Protocolo específico de regeneración *in vitro* para nudos cotiledonales de la variedad de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) CENTA Costeño II.

**PROTOCOLO DE REGENERACION *IN VITRO* VIA ORGANOGENESIS INDIRECTA PARA NUDOS COTILEDONALES DE FRIJOL COMUN (*Phaseolus vulgaris* L.) Var. CENTA COSTEÑO II.**

**1. Desinfección de semillas**

Desinfecte las semillas con alcohol etílico al 70% durante 1 minuto en agitación constante.

Deseche el alcohol y continúe la desinfección con una solución de NACIO al 1% adicionada con tres gotas de Tween 20 por cada 100 ml de agua.

Agite por 10 minutos.

Haga tres lavados con agua destilada estéril o hasta eliminar la solución desinfectante.

**2. Germinación de semillas**

Coloque las semillas en frascos con 25 ml de medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con PH 5.7 suplementado con 100 mgL<sup>-1</sup> de mioinositol, 0.1 mgL<sup>-1</sup> de tiamina, 0.5 mgL<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 0.5 mgL<sup>-1</sup> de piridoxina, 2 mgL<sup>-1</sup> de glicina, 1 mgL<sup>-1</sup> de BAP, 30 gL<sup>-1</sup> sacarosa y 3 gL<sup>-1</sup> agar.

Déjelas germinar a 25 ± 2 C° y en absoluta oscuridad durante siete días.

**3. Disección de nudos cotiledonales**

Transcurridos los siete días de germinación con la ayuda de pinzas y bisturí estériles en cámaras de flujo laminar disecte los nudos cotiledonales.

Corte el meristemo radicular y cotiledonal.

**4. Precultivo de nudos cotiledonales**

Coloque los nudos cotiledonales en placas petri con 25 ml de medio MS con PH de 5.7 suplementado con 100 mgL<sup>-1</sup> de mioinositol, 0.1 mgL<sup>-1</sup> de tiamina, 0.5 mgL<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 0.5 mgL<sup>-1</sup> de piridoxina, 2 mgL<sup>-1</sup> de glicina, 0.2mgL<sup>-1</sup> de Tidiazurón (TDZ), 0.05 mgL<sup>-1</sup> de Ácido Indol acético (AIA), 30 gL<sup>-1</sup> de sacarosa y 8 gL<sup>-1</sup> de agar.

Mantenga durante 14 días (siete en oscuridad y siete en condiciones de fotoperiodo 16 horas luz / 8 horas oscuridad a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  y  $58\ \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ).

#### **5. Transferencia de nudos cotiledonales al medio de inducción y regeneración de brotes (MIB)**

Transfiera los explantes al MIB con PH 5.7 y compuesto por MS adicionado con 2.25 mg/L de BAP.

Mantenga en condiciones de fotoperiodo 16 horas luz / 8 horas oscuridad a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  y  $58\ \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  durante 14 días.

#### **6. Evaluación de la regeneración**

Transcurridos 28 días de iniciado el ensayo evalúe la respuesta a la regeneración *in vitro* mediante los siguientes indicadores: número de brotes, número de hojas y número de raíces.

Anexo 4. Protocolo específico de regeneración *in vitro* para meristemas de la variedad de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) CENTA Costeño II.

**PROTOCOLO DE REGENERACION *IN VITRO* VIA ORGANOGENESIS INDIRECTA PARA MERISTEMOS DE FRIJOL COMUN (*Phaseolus vulgaris* L.) Var. CENTA COSTEÑO II.**

**1. Desinfección de semillas**

Desinfecte las semillas con alcohol etílico al 70% durante 1 minuto en agitación constante.

Deseche el alcohol y continúe la desinfección con una solución de NACIO al 1% adicionada con tres gotas de Tween 20 por cada 100 ml de agua.

Agite por 10 minutos.

Haga tres lavados con agua destilada estéril o hasta eliminar la solución desinfectante.

**2. Germinación de semillas**

Coloque las semillas en frascos con 25 ml de medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con PH 5.7 suplementado con 100 mgL<sup>-1</sup> de mioinositol, 0.1 mgL<sup>-1</sup> de tiamina, 0.5 mgL<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 0.5 mgL<sup>-1</sup> de piridoxina, 2 mgL<sup>-1</sup> de glicina, 1 mgL<sup>-1</sup> de BAP, 30 gL<sup>-1</sup> sacarosa y 3 gL<sup>-1</sup> agar.

Déjelas germinar a 25 ± 2 C° y en absoluta oscuridad durante siete días.

**3. Disección de meristemas**

Transcurridos los siete días de germinación con la ayuda de pinzas y bisturí estériles en cámaras de flujo laminar disecte los meristemas.

Corte en la parte superior del nudo cotiledonal y las hojas cotiledonales.

#### **4. Precultivo de meristemos**

Coloque los meristemos en frascos con 25 ml de medio MS con PH de 5.7 suplementado con 100 mg/l-1 de mioinositol, 0.1 mg/l-1 de tiamina, 0.5 mg/l-1 de ácido nicotínico, 0.5 mg/l-1 de piridoxina, 2 mg/l-1 de glicina, 0.2mg/l-1 de Tidiazurón (TDZ), 0.05 mg/l-1 de Ácido Indol acético (AIA), 30 gl-1 de sacarosa y 8 gl-1 de agar.

Mantenga durante 14 días en condiciones de fotoperiodo 16 horas luz / 8 horas oscuridad a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  y  $58\ \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ .

#### **5. Transferencia de meristemos al medio de inducción y regeneración de brotes (MIB)**

Transfiera los explantes al MIB con PH 5.7 y compuesto por MS adicionado con 2.25 mg/L de BAP.

Mantenga en condiciones de fotoperiodo 16 horas luz / 8 horas oscuridad a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  y  $58\ \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  durante 14 días.

#### **6. Evaluación de la regeneración**

Transcurridos 28 días de iniciado el ensayo evalúe la respuesta a la regeneración *in vitro* mediante los siguientes indicadores: número de brotes, número de hojas y número de raíces.