

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

**NOMBRE DE LA INVESTIGACION**

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.

**TITULO A OBTENER: INGENIERO AGRONOMO**

**AUTORES**

<b>Nombres, apellidos</b>	<b>Institución y dirección</b>	<b>Teléfono y E-mail</b>	<b>Firma</b>
Br. José Alfredo, Aguirre Alfaro	COM LOS AMATES 1° DE MAYO CL PPAL # 17, Soyapango	73065738 <a href="mailto:aa15049@ues.edu.sv">aa15049@ues.edu.sv</a>	
Br. José Adonay, Meléndez Hernández	Cantón Santa Lucía, Zacatecoluca, La Paz.	73931540 <a href="mailto:mh15024@ues.edu.sv">mh15024@ues.edu.sv</a>	
Ing. Agr. M.Sc. Julio Cesar Ortiz Pavón	Universidad de El Salvador Departamento de Fitotecnia	61896961 <a href="mailto:julio.ortiz@ues.edu.sv">julio.ortiz@ues.edu.sv</a>	
Ing. Agr. Oscar Alonso Rodríguez Gracias	Universidad de El Salvador Departamento de Fitotecnia	77731325 <a href="mailto:oscar.gracias@ues.edu.sv">oscar.gracias@ues.edu.sv</a>	

**Visto bueno:**

**Coordinador General de Procesos de Graduación del Departamento de Fitotecnia**

Ing. Agr. Mario Alfredo Pérez Ascencio

Firma \_\_\_\_\_

**Director General de Procesos de Graduación de la Facultad**

Ing. Agr. Enrique Alonso Alas García

Firma \_\_\_\_\_

**Jefe del Departamento de Fitotecnia.**

Ing. Agr. M.Sc. Fidel Ángel Parada Berrios

Firma \_\_\_\_\_

Sello:

**Lugar y fecha:** Ciudad Universitaria, 07 de julio 2022.

Organogénesis directa de dos cultivares de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) a partir de ejes embrionarios, nudos cotiledonales y meristemos.

Aguirre-Alfaro, JA<sup>1</sup>; Meléndez-Hernández, JA<sup>1</sup>; Ortiz-Pavón, JC<sup>2</sup>; Rodríguez-Gracias, OA<sup>2</sup>.

<sup>2</sup> Docentes directores. Universidad de El Salvador, Departamento de Fitotecnia.

## Resumen

Se establecieron protocolos para la regeneración del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) de importancia comercial mediante la organogénesis directa con ejes embrionarios, nudos cotiledonales y meristemos de las variedades CENTA Costeño II y CENTA Chaparrastique con diferentes concentraciones de Bencilaminopurina (BAP). Se evaluaron los indicadores números de brotes, número de hojas y número de raíces y la eficiencia de regeneración. Los ejes embriogénicos se cultivaron en medio de cultivo semisólido, el cual consistió de las sales minerales MS y BAP (0,1 y 5mg/L). La combinación variedad Costeño Chaparrastique y dosis 1 mg/L de BAP presentó el mayor número de brotes por explante (0.98). Los nudos cotiledonales y meristemos de las variedades antes mencionadas se precultivaron durante 14 días en TZD y AIA. 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 meristemos de las mismas variedades. En todos los explantes se observó formación de hojas y raíces. Este informe describe protocolos eficientes de regeneración de frijol común a través de organogénesis directa, que puede servir de referencia para su posterior investigación de transformación genética.

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

## Introducción

*Phaseolus vulgaris* L. es un cultivo de gran importancia alimentaria. Debido a su aporte nutricional en proteínas (22%) y representa una fuente relevante de nutrientes esenciales para la humanidad y constituye un componente principal en la dieta de países en desarrollo de Latinoamérica, África y Asia. El consumo mundial de esta leguminosa es aproximadamente de 3,570g per cápita. 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). A pesar de su importancia, las tasas de crecimiento de la producción están limitadas por patógenos virales, fúngicos y bacterianos, insectos, falta de tolerancia a la sequía y deficiencias nutricionales (Aragão *et al.* 1996).

Por lo tanto, existe un interés considerable en el desarrollo de nuevos cultivares de frijol con características agronómicas útiles (Aragão *et al.* 1996; Lizana *et al.* 2006; Blair *et al.* 2012). 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). 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). Sin embargo, 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). También, 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. Además, el tipo de explantes no solo determina el número de brotes producidos por cada explante durante la organogénesis directa, sino que también afecta la tasa de inducción de callos en la organogénesis indirecta (Hnatuszko-Konka *et al.* 2019).

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 (Delgado-Sánchez *et al.* 2006; García *et al.* 2008, Gatica *et al.* 2010) 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).

Por tanto el objetivo del presente estudio fue determinar la respuesta morfogénica a la regeneración *in vitro* mediante organogénesis directa con diferentes tipos de explantes de las variedades de frijol común CENTA Costeño II y CENTA Chaparrastique para establecer

protocolos eficientes de regeneración *in vitro* de las variedades de frijol antes mencionadas.

## **Materiales y métodos**

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.

### **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).

### **Desinfección de semillas y disección de explantes**

En cámara de flujo laminar se desinfectaron las semillas superficialmente con alcohol etílico al 70% durante 1 minuto y posteriormente con hipoclorito de sodio 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  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) previo a la disección de los ejes embrionarios. Transcurrido el periodo de imbibición, a los embriones cigóticos se les cortó el meristemo radicular y las hojas cotiledonales para formar el eje embrionario. Después de la disección de los ejes embrionarios, se realizó una segunda desinfección con hipoclorito de sodio al 0.1% durante 10 minutos en agitación manual, seguido de tres lavados con agua destilada estéril.

Para nudos cotiledonales y los meristemos, las semillas previamente desinfectadas fueron germinadas en medios suplementados con las sales minerales y vitaminas descritas por Murashige y Skoog (1962) adicionado con 1mg/L de BAP y 30g/L de sacarosa. El periodo de germinación consistió de 7 días en completa oscuridad y en  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Transcurridos los siete días de germinación de las semillas, se disectaron los explantes que consistieron en el nudo cotiledonal de los embriones cigóticos germinados y los meristemos.

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

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 minutos a 121°C y 1.07kg/cm.

Los nudos cotiledonales y los meristemas se precultivaron en placas Petri y en frascos, respectivamente, ambos con 25mL de medio compuesto de las sales minerales y vitaminas MS y suplementado con 0.2mg/L de Tidiázurón (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 y se esterilizaron en las mismas condiciones antes descritas. Este periodo de precultivo para los nudos cotiledonales comprendió siete días en completa oscuridad y posteriormente siete días en condiciones de fotoperiodo 16 horas luz / 8 horas oscuridad a 25±1°C y 58µmol/m<sup>2</sup>/s. Mientras que los meristemas fueron precultivados únicamente en las condiciones de fotoperiodo antes mencionadas durante 14 días.

Transcurrido los 14 días de precultivo, los nudos y meristemas fueron transferidos al medio de inducción y regeneración de brotes, el cual consistió de las sales minerales y vitaminas MS adicionadas con diferentes concentraciones de BAP: 0, 2.25 y 6.75mg/L (Collado *et al.* 2013).

Los ejes embrionarios fueron cultivados durante 42 días con un subcultivo o refrescamiento en el mismo a los 21 días, mientras que los nudos y meristemas se cultivaron durante 28 días y se realizó un subcultivo a los 14 días. Las condiciones de cultivo para todos los explantes consistió en un fotoperíodo 16 horas luz / 8 horas oscuridad a 25±1°C y 58µmol/m<sup>2</sup>/s.

El ensayo con ejes embrionarios consistió de 3 repeticiones por tratamiento y cada repetición estuvo compuesta de 3 frascos con tres explantes cada uno. Los nudos y meristemas fueron cultivados en tratamientos con 5 repeticiones de 3 frascos cada uno y 3 explantes por frasco. Todos los frascos contenían aproximadamente 25mL del medio de regeneración respectivo.

### **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 fórmula descrita por Gatica *et al.* (2010): [(número de ejes embrionarios, nudos o meristemas con brotes de *novo*

/total de número de ejes embrionarios, nudos o meristemos) x 100]. La respuesta morfogénica fue evaluada a los 28 días de iniciado el ensayo con los nudos y meristemos, mientras que los ejes embrionarios se evaluaron a los 42 días.

### **Análisis estadístico**

A las variables se les aplicó el Análisis de Varianza (ANVA), específicamente un arreglo factorial 2x3 bajo el Diseño Completamente al Azar (DCA). Las variables independientes fueron los medios de cultivo y las variedades de frijol y la variable dependiente fue la respuesta a la morfogénesis. Se aplicó la prueba estadística de comparación de medias de Tukey con un nivel de significancia estadística (alfa)  $\alpha$  del 1% = 0.05. Se utilizaron hojas de cálculo de Microsoft Excel® y el programa estadístico SPSS® 25 para el análisis respectivo.

### **Resultados**

#### **Efecto del genotipo sobre el número promedio de brotes, hojas y raíces de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) independientemente de la concentración de BAP.**

La formación de brotes comenzó con un cambio en la morfología de los ejes embrionarios, tales como el aumento del diámetro y longitud (Figura 1A) y la aparición de yemas apicales. Para nudos cotiledonales y meristemos la respuesta morfogénica a la regeneración *in vitro* o la formación de yemas múltiples comenzó con cambios en la morfología de los explantes precultivados en TDZ y AIA, como aumento en los tamaños y cambios de coloración (de blanco a verde) (Figura 1B y C). Inicialmente en ambos explantes el precultivo se desarrolló para inducir a la formación de estructuras callogénicas. Sin embargo, ambas variedades no desarrollaron formación de estas estructuras (Figura 1F y G). En contraste una múltiple formación de aparentes yemas múltiples se obtuvo durante el periodo de 14 días de precultivo de ambos explantes. Los explantes con las yemas regeneradas se cultivaron en el medio de inducción hasta que se desarrollaron los brotes. El Cuadro 1 muestra el efecto del genotipo sobre el número promedio de brotes, hojas y raíces inducidos a partir de ejes embriogénicos de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) independientemente de la concentración de BAP. El promedio de brotes, hojas y raíces no difirió significativamente entre los cultivares evaluados. La mayor formación de brotes se obtuvo mediante la variedad CENTA Chaparrastique > CENTA Costeño II. De igual forma no se observaron diferencias significativas en el número de raíces formadas a partir de ejes embrionarios cultivados en el medio de inducción suplementado con las diferentes concentraciones de BAP.

Cuadro 1. Efecto del genotipo sobre el número promedio de brotes, hojas y raíces inducidos a partir de ejes embrionarios de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) independientemente de la concentración de BAP. Los datos se registraron después de 42 días de cultivo en medio de inducción suplementado con diferentes concentraciones de BAP.

<b>Genotipo</b>	<b>Brotes<sup>1</sup></b>	<b>Hojas<sup>1</sup></b>	<b>Raíces<sup>1</sup></b>
CENTA Costeño II	0.58±0.22 <sup>2</sup> (b)	3.41±0.33 (a)	6.06±0.70 (a)
CENTA Chaparrastique	0.98±0.17 (a)	4.17±0.48 (a)	4.89±0.67 (a)

<sup>1</sup>Los valores representan la formación promedio de brotes, hojas y raíces por genotipo en tres frascos con dos explantes cada uno y tres replicas.

<sup>2</sup>Media ± EE. Las mismas letras dentro de las columnas denotan medias estadísticamente iguales con la prueba de Tukey (P <0.01).

El cuadro 2 muestra el efecto del genotipo sobre el número promedio de brotes, hojas y raíces inducidos a partir de nudos cotiledonales y meristemos de ambas variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) independientemente de la concentración de BAP. El número promedio de brotes no difirió para nudos cotiledonales, pero difirió significativamente para meristemos entre las variedades evaluadas. Independientemente de la significancia y del tipo de explante la mayor formación de brotes múltiples se obtuvo mediante la variedad CENTA Costeño II > CENTA Chaparrastique. Por otro lado, se observaron diferencias significativas en el número de hojas y raíces formadas a partir de nudos cotiledonales y meristemos cultivados en el medio de inducción suplementado con las diferentes concentraciones de BAP.

Cuadro 2. Efecto del genotipo y del tipo de explante (nudos cotiledonales y meristemos) sobre el número promedio de brotes, hojas y raíces de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) independientemente de la concentración de BAP. Los datos se registraron después de 28 días de cultivo en medio de inducción suplementado con diferentes concentraciones de BAP.

<b>Genotipo</b>	<b>Explante</b>	<b>Brotes<sup>1</sup></b>	<b>Hojas<sup>1</sup></b>	<b>Raíces<sup>1</sup></b>
CENTA Costeño II	Nudos cotiledonales	5.51±0.08 <sup>2</sup> (a)	6.75±0.10 (ab)	6.30±0.14 (a)
	Meristemos	5.46±0.49 (a)	8.17±0.29 (a)	1.70±0.33 (b)
CENTA Chaparrastique	Nudos cotiledonales	5.01±0.56 (a)	8.47±0.75 (a)	1.72±0.37 (b)
	Meristemos	2.65±0.10 (b)	5.15±0.38 (b)	4.21±0.50 (a)

<sup>1</sup>Los valores representan la formación promedio de brotes, hojas y raíces por genotipo en tres frascos con tres explantes cada uno y cinco replicas (nudos cotiledonales) y en tres frascos con cuatro explantes cada uno y

cuatro replicas (meristemos).

<sup>2</sup>Media  $\pm$  EE. Las mismas letras dentro de las columnas denotan medias estadísticamente iguales para cada tipo de explante con la prueba de Tukey (P <0.01).

**El efecto de la concentración de BAP y el tipo de explante sobre el número promedio de brotes, raíces y hojas inducidos a partir de ejes embrionarios, nudos cotiledonales y meristemos de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) independientemente del genotipo.**

Para ejes embrionarios al comparar los resultados independientemente el cultivar, no se observaron diferencias significativas para el número de hojas pero si para el número de brotes y raíces (Cuadro 3). El mayor número de raíces se obtuvo en el medio de inducción sin citoquinina (BAP). Se observó que a medida que aumentaban las concentraciones de BAP, el número de raíces por explante disminuía.

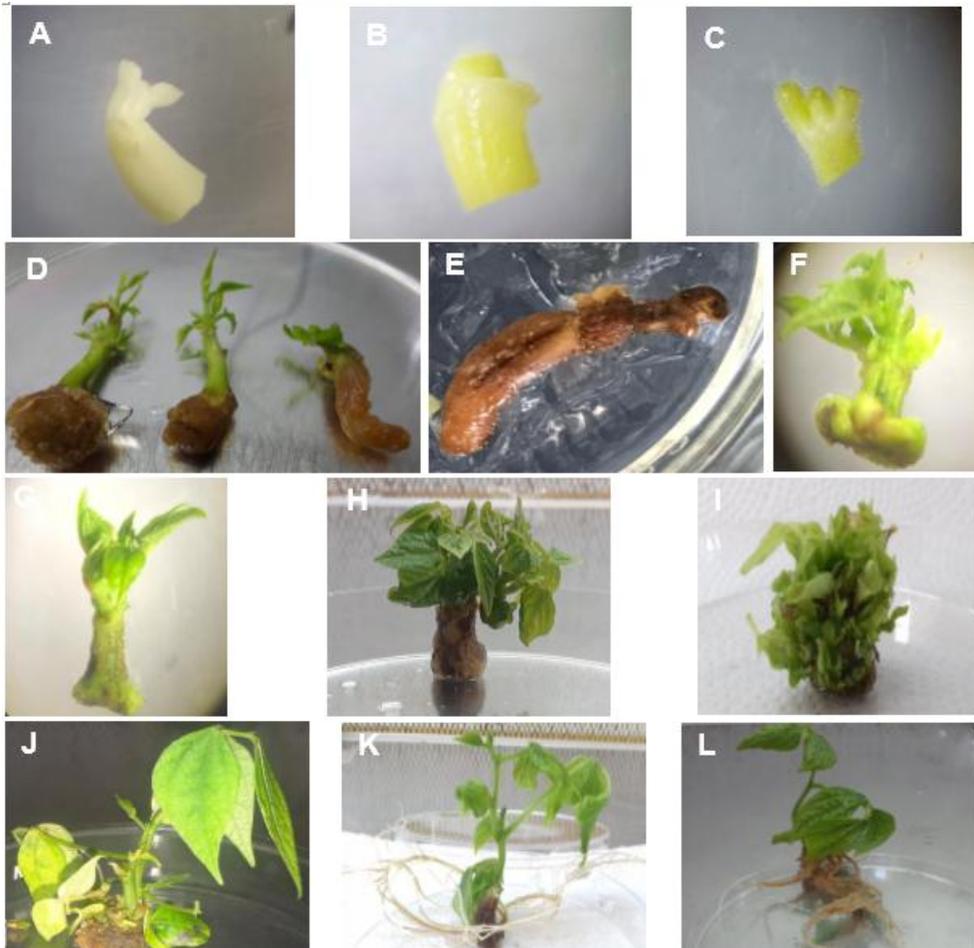
Cuadro 3. Efecto de la concentración de BAP sobre el número promedio de brotes, hojas y raíces inducidas a partir de ejes embrionarios de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) independientemente del genotipo. Los datos se registraron después de 42 días de cultivo en medio de inducción suplementado con diferentes concentraciones de BAP.

TRATAMIENTOS	VARIABLES MORFOGENICAS		
BAP (mg/L)	Brotes <sup>1</sup>	Hojas <sup>1</sup>	Raíces <sup>1</sup>
0	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>2</sup> (b)	3.49 $\pm$ 0.35 (a)	5.47 $\pm$ 0.68 (a)
1	0.63 $\pm$ 0.14 (a)	3.22 $\pm$ 0.47 (a)	0.28 $\pm$ 0.08 (b)
5	0.74 $\pm$ 0.21 (a)	2.69 $\pm$ 0.32 (a)	0.00 $\pm$ 0.00 (b)

<sup>1</sup>Los valores representan la formación promedio de brotes, hojas y raíces por genotipo en tres frascos con dos explantes cada uno y tres replicas.

<sup>2</sup>Media  $\pm$  EE. Las mismas letras dentro de las columnas denotan medias estadísticamente iguales con la prueba de Tukey (P <0.01).

De igual forma, el efecto de la concentración de BAP y sobre el número promedio de brotes, raíces y hojas inducidos a partir de nudos cotiledonales y meristemos de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) independientemente del genotipo y del explante se muestra en el Cuadro 4. El mayor número promedio de raíces por explante se obtuvo en el medio de inducción sin BAP y se determinó que la concentración de BAP es inversamente proporcional al número de raíces por explante.



**Figura 1. Regeneración morfológica a partir de ejes embrionarios, nudos cotiledonales y meristemas de *Phaseolus vulgaris* L.**

**(A), (B)** y **(C)**. Ejes embrionarios, nudos cotiledonales y meristemas respectivamente utilizados como explantes en diferentes concentraciones de BAP. **(D)**. Explantes con oxidación fenólica observada en la investigación. **(E)**. Explante sin respuesta morfológica debido a la poca eficiencia a la regeneración *in vitro*. **(F)** y **(G)**. Precultivo con TDZ y IAA por 14 días para nudos cotiledonales y meristemas. **(H)**. Grupo de hojas formadas en nudo cotiledonal después de 28 días en medio de inducción. **(I)**. Propagación de racimos de yemas formados en meristemas después de 28 días en medio de inducción. **(J), (K)** y **(L)**. Planta de frijol desarrollada a partir de ejes embrionarios, nudos cotiledonales y meristemas respectivamente.

Además, independientemente la variedad y el tipo de explante, el medio de inducción suplementado con 2.25mg/L de BAP produjo un mayor número promedio de brotes. Por otro lado, no se observaron brotes en los medios con ausencia de BAP. Es de relevancia

mencionar que las hojas y raíces formadas en estos medios corresponden a los nudos cotiledonales y meristemos germinados y no a brotes regenerados.

Cuadro 4. Efecto de la concentración de BAP y el tipo de explante sobre el número promedio de brotes, hojas y raíces inducidas a partir de nudos cotiledonales y meristemos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) independientemente del genotipo. Los datos se registraron después de 28 días de cultivo en medio de inducción suplementado con diferentes concentraciones de BAP.

EXPLANTE	TRATAMIENTOS	VARIABLES MORFOGENICAS		
	BAP (mg/L)	Brotes <sup>1</sup>	Hojas <sup>1</sup>	Raíces <sup>1</sup>
Nudos Cotiledonales	0	0.00±0.00 <sup>2</sup> (c)	2.62±0.15 (c)	4.01±0.25 (a)
	2.25	5.26±0.32 (a)	6.91±0.55 (a)	0.00±0.00 (c)
	6.75	4.80±0.32 (a)	7.61±0.42 (a)	0.05±0.05 (c)
Meristemos	0	0.00±0.00 (c)	4.55±0.22 (b)	2.95±0.41 (b)
	2.25	4.05±0.29 (b)	6.66±0.33 (a)	0.00±0.00 (c)
	6.75	3.28±0.15 (ab)	4.98±0.25 (b)	0.01±0.01 (c)

<sup>1</sup>Los valores representan la formación promedio de brotes, hojas y raíces por genotipo en tres frascos con tres explantes cada uno y cinco replicas (nudos cotiledonales) y en tres frascos con cuatro explantes cada uno y cuatro replicas (meristemos).

<sup>2</sup>Media ± EE. Las mismas letras dentro de las columnas denotan medias estadísticamente iguales para cada tipo de explante con la prueba de Tukey (P <0.01).

Para ejes embrionarios, independientemente el cultivar, el medio de inducción suplementado con 5mg/L de BAP produjo el mayor número promedio de brotes. Por otro lado, no se observaron brotes en el medio de inducción con ausencia de BAP. Es importante destacar que las hojas y raíces desarrolladas con 0mg/L de BAP corresponden a los ejes embrionarios germinados y no brotes desarrollados. El Cuadro 5 muestra el efecto del BAP sobre el número promedio de brotes inducidos a partir de ejes embrionarios de ambas variedades de *Phaseolus vulgaris* en medio de inducción suplementado con diferentes dosis de BAP, las cuales resultaron en una respuesta diferencial. En las variedades evaluadas no se indujeron yemas organogénicas con la concentración de 0mg/L de BAP. Pero la adición de esta citoquinina al medio de inducción mejoró la formación de brotes.

Cuadro 5. Efecto de BAP sobre el número de brotes inducidos a partir de ejes embriogénicos de *Phaseolus vulgaris* L. después de 42 días de cultivo en medio de inducción suplementado con diferentes concentraciones de BAP.

Brotes (Eficiencia %)		
Concentración de BAP (mg/L)	CENTA Chaparrastique <sup>1</sup>	CENTA Costeño II <sup>1</sup>
0	0±0.00 <sup>2</sup> b (0)	0±0.00 c (0)
1	0.98±0.17 a (55)	0.28±0.12 b (43)
5	0.91±0.21 a (57)	0.58±0.22 a (35)

<sup>1</sup>Los valores representan la formación promedio de brotes, hojas y raíces por genotipo en tres frascos con dos explantes cada uno y tres replicas.

<sup>2</sup>Media ± EE. Las mismas letras dentro de las columnas denotan medias estadísticamente iguales con la prueba de Tukey (P <0.01).

En la variedad CENTA Chaparrastique el mayor número promedio de brotes y el mayor porcentaje de eficiencia se obtuvo con la concentración de 1mg/L de BAP. Para la variedad CENTA Costeño II los mejores resultados se obtuvieron con la concentración de 5mg/L de BAP. Los brotes se regeneraron a partir de los grupos de yemas apicales y se desarrollaron en plantas con hojas y raíces aparte normales hasta el día 35 de aclimatación.

El Cuadro 6 muestra el efecto del BAP sobre el número de brotes inducidos a partir de nudos cotiledonales y meristemas de *Phaseolus vulgaris* de las variedades CENTA Costeño II y CENTA Chaparrastique en medio de inducción suplementado con diferentes dosis de BAP. Estos resultados fueron bastante similares en las variedades y explantes evaluados. Puesto que, en los medios con ausencia de BAP no se indujeron yemas organogénicas después de 28 días de cultivo. Mientras que la adición de BAP al medio de cultivo mejoró la formación de brotes múltiples en ambos tipos de explantes de ambas variedades. Para nudos cotiledonales de las variedades CENTA Costeño II y CENTA Chaparrastique el mayor promedio de brotes se obtuvo con la concentración de 2.25mg/L de BAP. La misma tendencia se repitió cuando se usó meristemas de ambas variedades como explantes. Los porcentajes de eficiencia de los medios suplementados con BAP fueron significativos en comparación a los medios con ausencia de BAP. Sin embargo los meristemas mostraron mayor eficiencia en comparación a los nudos cotiledonales, con la diferencia que los primeros parecieron tener un desarrollo más lento en comparación a los nudos cotiledonales.

Cuadro 6. Efecto de BAP sobre el número de brotes inducidos a partir de nudos cotiledonales y meristemos de *Phaseolus vulgaris* L. después de 28 días de cultivo en medio de inducción suplementado con diferentes concentraciones de BAP.

Brotes (Eficiencia %)			
Tipo de explante	Concentración de BAP (mg/L) <sup>1</sup>	CENTA Costeño II <sup>1</sup>	CENTA Chaparrastique <sup>1</sup>
Nudos cotiledonales	0.00	0±0.00 <sup>2</sup> b (0)	0±0.00 b (0)
	2.2g5	5.51±0.08 a (93)	5.01±0.56 a (96)
	6.75	5.10±0.08 a (98)	4.51±0.57 a (89)
Meristemos	0.00	0±0.00 c (0)	0±0.00 c (0)
	2.25	5.46±0.49 a (100)	2.65±0.10 b (100)
	6.75	4.13±0.23 b (100)	2.43±0.08 b (96)

<sup>1</sup>Los valores representan la formación promedio de brotes, hojas y raíces por genotipo en tres frascos con tres explantes cada uno y cinco replicas (nudos cotiledonales) y en tres frascos con cuatro explantes cada uno y cuatro replicas (meristemos).

<sup>2</sup>Media ± EE. Las mismas letras dentro de las columnas denotan medias estadísticamente iguales para cada tipo de explante con la prueba de Tukey (P <0.01).

## Discusión

En el género *Phaseolus* se han reportado investigaciones con diferentes explantes mediante esta vía de regeneración (Collado *et al.* 2008; Arellano *et al.* 2009; Gatica *et al.* 2010). Algunos autores de estas investigaciones describieron la inducción y regeneración de brotes a partir de explantes de nudos cotiledonales (García *et al.* 2008; Collado *et al.* 2013) y a partir de meristemos apicales como explante (Arellano *et al.* 2009). De igual forma mediante el uso de ejes embrionarios de diferentes variedades de frijol común (Gatica *et al.* 2010).

Aunque se han descrito varios protocolos en la literatura para la regeneración directa de frijol a partir de ejes embrionarios, nudos cotiledonales y meristemos 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.

*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 con las mismas dosis de BAP aplicadas. 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.

Inicialmente se precultivaron nudos cotiledonales y meristemas en medio MS adicionado con Tiazurón (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 (1mg/L) y BAP (1mg/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 Cruz 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.

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. Obteniéndose formación de brotes en presencia de BAP, mientras que en ausencia de este, no se encontró desarrollo de brotes en los diferentes explantes evaluados de ambas variedades de *P. angularis*. 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. Malik y Saxena (1991) informaron que 5µM de BAP tuvieron un efecto favorable sobre la formación de brotes de explantes de hojas cultivadas de *P. vulgaris*

en comparación con los explantes cultivados en medio MS sin BAP. Así mismo, Martínez *et al.* (2015) obtuvieron que una variedad mexicana de frijol (Bayomex) mostró inducción de brotes en los ejes embrionarios con una concentración de 2.1mg/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 & Skoog y Gamborg. La eficiencia de regeneración difirió significativamente entre los dos medios básicos; Gamborg indujo una alta formación de brotes organogénicos (98-100 %), mientras que los medios Murashige y Skoog mostraron una formación de brotes más baja e inconsistente (15-73 %). Evidenciándose la influencia de la composición del medio, la eficiencia obtenida en esta investigación en el medio MS suplementado con las diferentes concentraciones de BAP fue baja para ejes embrionarios y osciló entre el 0-57% para CENTA Chaparrastique y 0-43% para CENTA Costeño II (Cuadro 5).

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 para nudos cotiledonales y meristemas 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 (Cuadro 6).

De igual forma el genotipo y tipo de explante ejercen efecto sobre la respuesta morfológica, esto debido a que las variedades y explantes evaluados presentaron diferentes repuestas morfológicas al analizar el número de brotes por explante (Cuadro 1 y 2). Esto es respaldado por Deglene *et al.* (1997), quienes consideran que el desarrollo de nuevas estructuras a través de la organogénesis 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. Mientras que al adicionar BAP al medio de inducción los meristemas demostraron tener una mayor tasa de eficiencia en comparación a los nudos cotiledonales (Cuadro 6). Sin embargo, los brotes regenerados a partir de meristemas parecieron tener un desarrollo menor en comparación a los desarrollados por nudos cotiledonales.

De los brotes regenerados se observó formación de hojas en los tres explantes evaluados (Figura 1H e I). La variable formación de hojas para ejes embrionarios no mostró diferencias

estadísticamente significativas en ambas variedades (CENTA Costeño II y CENTA Chaparrastique) (Cuadro 3). 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. A partir de nudos cotiledonales de la variedad CENTA Chaparrastique, los mejores resultados se obtuvieron con la dosis de 2.25mg/L de BAP. Mientras que al utilizar meristemas como explante, la variedad Costeño II produjo los mejores resultados, exactamente en la misma concentración antes mencionadas (Cuadro 4). Esto coincide con la afirmación de Hnatuszko-Konka *et al.* (2019), en el indican que el tipo de explante 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 desarrolladas por cada tipo de explante cultivados en las mismas concentraciones de BAP.

También se observó el efecto de la ausencia de BAP en la formación de raíces a partir de ejes embrionarios, meristemas y nudos cotiledonales (Cuadro 3 y 4). El mayor número de raíces por explante se obtuvo en los medios 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. Esto se debe a que concentraciones altas de citoquininas retrasan la formación de raíces (Van Staden *et al.* 2008). 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 esta investigación no se realizó un periodo de enraizamiento con ningún regulador de crecimiento. Sin embargo, 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) para inducir al desarrollo de raíces y esta ha demostrado tener un efecto positivo (Dang y Wey 2009). 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 (Figura 1D) (Arnaldos *et al.* 2001). Con la misma finalidad de eliminar los problemas fenólicos Yu *et al.* (2021) utilizaron 3mg/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.

## Conclusiones

La recalcitrancia de *Phaseolus vulgaris* fue evidenciada en esta investigación mediante la organogénesis directa con los tres tipos de explantes de las variedades CENTA Costeño II y CENTA Chaparrastique. La adición de BAP al medio de cultivo mostró mejora en la regeneración en cuanto al número de brotes, independientemente de la variedad de frijol común.

## Recomendaciones

Utilizar preferentemente nudos cotiledonales o meristemos como explantes, debido a su eficiencia en la formación de brotes y subcultivos con intervalos máximos de 14 días para lograr mejores resultados tanto para nudos cotiledonales como para meristemos de las variedades CENTA Costeño II y CENTA Chaparrastique.

## Bibliografía

- Ahmed, EE; Bisztray. GYD; Velich, I. (2002) Plant regeneration from seedling explants of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Acta Biol Szeged*. 46:27–28.
- Aragão, FJL; Barros, LMG; Brasileiro, ACM; Ribeiro, SG; Smith, FD; Sanford, JC; Faria, JC; Rech, EL. 1996. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theoretical and Applied Genetics*. 93:142-150.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Cruz de Carvalho, MHC; Le, BV; Zuily-Fodil, Y; Thi, ATP; Kiem, TTV. (2000) Efficient whole plant regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using Thin-cell-layer culture and silver nitrate. *Plant Science* 159:223-232.
- Dang, W; Wei, Z.M. 2009. High frequency plant regeneration from the cotyledonary node of common bean.. *Biologia Plantarum*. 53(2):312-316.
- Deglène, L; Lesignes, P; Alibert G; Sarrafi, A. 1997. Genetic control of organogenesis in cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, February. 48(2):127-130.
- 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.
- García, LR; Collado, R; Bermúdez-Carabaloso, I; Veitía, N; Torres, D; Romero, C. 2008. Regeneration of plants via direct organogenesis in *Phaseolus vulgaris* L. *Biotechnología Vegetal*. 8:109-114.
- 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.
- George, EF; Debergh, PC. 2008. Micropropagation: Uses and Methods. *Plant propagation by tissue culture*. 29-64.
- 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; Grzegorzczuk-Karolak, I. 2019. Regeneration of *Phaseolus vulgaris* from epicotyls and hypocotyls via direct organogenesis. *Sci Rep*. 9:6248.
- 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-

- 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.
- 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.
- 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.
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15(3):473-497.
- 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.
- Santalla, M; Power, JB; Davey, MR.1998. Efficient in vitro shoot regeneration responses of *Phaseolus vulgaris* and *P. coccineus*. *Euphytica* 102:195–202.
- Van Staden, J; Zazimalova, E. and George, EF. 2008. Plant growth regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonist. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer. 1:205-226
- 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.
- 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.