

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



“Regeneración *in vitro* vía organogénesis directa e indirecta de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) var. CENTA Sequía, mediante variables morfológicas para el establecimiento de protocolos eficientes de regeneración *in vitro* de frijol”

POR:

BR. LINDA KATHERINE CATIVO PARADA

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

SAN SALVADOR, 29 DE NOVIEMBRE DE 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 ORTÍZ PAVÓN

ING. AGR. OSCAR ALONSO RODRÍGUEZ GRACIAS

COORDINADOR GENERAL DE PROCESOS DE GRADUACIÓN

ING. AGR. MARIO ALFREDO PÉREZ 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 marzo del 2022.

Se estableció un protocolo para la regeneración del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) de importancia comercial en el salvador, 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, número de raíces y la eficiencia de regeneración. Para la organogénesis directa se cultivaron ejes embriogénicos de la variedad CENTA Sequía en medio de cultivo semisólido, el cual consistió de las sales minerales MS y BAP (0,1 y 5 mg.L⁻¹). Se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas (p -valor= 0.0001 > 0.01) en el promedio de brotes por explante. Se observó que la dosis 1 mg.L⁻¹ de BAP presenta el mayor número de brotes por explante (0.99). Para la organogénesis indirecta se precultivaron nudos cotiledonales y meristemos de la variedad antes mencionada por 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 6.75 mg.L⁻¹). 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. Esto proporciona evidencia sobre cómo los medios de cultivo y los reguladores del crecimiento influyen en la regeneración del frijol común, cuando se busca un protocolo de transformación eficiente. 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 Dios por darme la vida todo este tiempo de estudio, por proveerme lo que necesite en cada paso y por darme la sabiduría para salir adelante.

A mi familia por haberme apoyado en todos los aspectos para formarme profesionalmente, principalmente a mi madre que me brindo su apoyo en todo momento.

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 en la presente investigación.

A todas las personas que me ayudaron de una u otra manera durante mis años académicos en la Universidad, amigos, compañeros y a cada uno de los que Dios puso en mi camino para poder llegar a este momento.

A la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador por formarme como ingeniero agrónomo y tener maestros de calidad.

A la Universidad de El Salvador Por abrir sus puertas para mi preparación académica, brindándome una formación de calidad en mi proceso de desarrollo profesional basada en valores, principios y ética, para integrar y construir una sociedad de bien.

Dedicatoria

Principalmente a Dios porque su amor y bondad no tienen fin, me dio la fortaleza para seguir adelante permitiéndome sonreír ante todos a pesar de las pruebas y adversidades.

A mi madre Margarita de Cativo, quien me apoyó desde principio a fin de mi carrera, siendo ella la promotora de motivación y un ejemplo a seguir, gracias por enseñarme consejos para hacer de mí una mejor persona, gracias a ti esta meta está cumplida.

En esta ocasión también agradezco a mi hermana a la cual amo mucho, por brindarme su apoyo incondicional, por creer en mi capacidad para luchar por mis ideales. De igual manera agradecer a mis tías por su apoyo moral y económico deseándome siempre buena suerte en todo para seguir perseverando.

A mis catedráticos que a través de los años se esforzaron para compartir sus conocimientos y así poder ser buenos profesionales.

Finalmente, a mis compañeros y amigos porque conviví buenos momentos, y sin esperar nada a cambio compartieron sus conocimientos, ideas, alegrías y tristezas.

Glosario

Aclimatación: Adaptación de un organismo a un ambiente que le provoca algún tipo de cambio fisiológico.

Adenina: base nitrogenada que forma parte de los nucleótidos del ADN y el ARN. Por su estructura química, la adenina es una purina y en la doble cadena del ADN siempre se enfrenta a una timina.

Auxina: Sustancia reguladora del crecimiento vegetal que controla la elongación celular, entre otros procesos.

Ácido naftalenacético (ANA): activa la división y elongación de las células, promueve la formación de raíces. Adventicio: designa una estructura que se desarrolla a partir de zonas poco usuales, como las yemas o cualquier otra parte distinta de las axilas de las hojas.

Agar: Polisacárido que se obtiene generalmente de algas rojas y se emplea para solidificar medios de cultivo.

Abiótico: Relacionado con los factores físicos o químicos del ambiente, como la temperatura, humedad, salinidad, etc.

6-Bencilaminopurina (BAP): Kinetina particularmente efectiva para promover la morfogénesis.

Bioteología: Toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos en usos específicos.

Biótico: Relativo a la vida. En agronomía, relacionado con factores biológicos que afectan el rendimiento de un cultivo: insectos, hongos, bacterias, virus, nemátodos, etc.

Brote de novo: ápice aéreo vegetativo nuevo.

Callo: Callus. Tejido cicatricial en una herida. Acúmulo celular en un cultivo de tejido en desarrollo. Masa de células indiferenciadas (tejido vegetal).

Cromosoma: En eucariontes, unidad estructural que consiste en una molécula de ADN asociada a proteínas.

Cultivo de tejidos: Procedimientos utilizados para mantener y crecer células y tejidos vegetales o animales y órganos vegetales (tallos, raíces, embriones) en cultivo aséptico (*in vitro*).

Diploide: Organismo o célula que posee dos juegos completos de cromosomas homólogos y por lo tanto dos copias (alelos) de cada gen.

Embrión: Rudimento del esporófito joven, cuando la ovocélula después de fecundada ha constituido un cuerpo primordial de células diploides (2n).

Explante: Parte de un vegetal que se cultivará in vitro, pueden ser protoplastos –células desprovistas de pared celular- células, tejidos u órganos.

Esterilización: Eliminación de microorganismos por medios físicos o químicos.

Fotoperíodo: Duración relativa de la variación de luz y oscuridad; se refiere especialmente al efecto fisiológico.

Genes: Segmentos específicos de ADN que controlan las estructuras y las funciones celulares.

Genotipo: Constitución genética completa de una célula u organismo. También suele referirse a los alelos de uno o más loci específicos.

Hormona: Sustancia química producida normalmente en pequeñas cantidades en una parte del organismo, desde donde es transportada a otra parte del organismo en la que produce un efecto específico.

In vitro: Designa los procesos biológicos que se realizan fuera de los organismos vivos. Literalmente “en vidrio”.

Meristemo: Región de la planta formado por células con capacidad de división.

Meristemo apical: Meristema del ápice o del extremo de tallos y raíces.

Medio de cultivo: mezcla de sustancias en las cuales pueden crecer células, tejidos u órganos.

Micropropagación: multiplicación vegetativa de plantas in vitro.

Morfogénesis: proceso de desarrollo y crecimiento de diferentes estructuras de acuerdo con el empleo de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo.

Nudo: Parte del tallo donde está implantada una hoja o rama.

Nutrientes: Son las sustancias presentes en los alimentos y que resultan útiles para el metabolismo.

Organismo Genéticamente Modificado (OGM): Cualquier organismo cuyo material genético ha sido modificado de una manera que no se produce en la naturaleza. Entran en esta definición las modificaciones producidas por las técnicas de ADN recombinante o ingeniería genética, por la microinyección directa y por fusión celular.

Organogénesis: Proceso morfogénico muy frecuentes en el cultivo in vitro de especies vegetales por el cual pueden obtenerse tallos, raíces o flores.

pH: Símbolo que representa la concentración relativa de iones hidrógeno en una solución. Los valores del pH oscilan entre 0 y 14. El pH 7 es neutro, menos de 7, ácido y más de 7, alcalino.

Proteínas: Macromoléculas formadas por muchos aminoácidos enlazados por uniones peptídicas.

Regeneración: Cuando se refiere al cultivo de tejidos vegetales, consiste en la formación de las partes aéreas o embriones a partir de un callo o una suspensión de células, permitiendo la recuperación de una planta completa.

Subcultivo: Proceso mediante el cual los explantes son subdivididos y transferidos a medio de cultivo fresco.

Tejido: Grupo de células similares organizadas en una unidad estructural y funcional.

Variable independiente: Es la causa que afecta los resultados del experimento y está representada por los distintos niveles del factor cuyo efecto se quiere medir (tratamientos) o que se quiere controlar (bloques).

Vitaminas: Grupo de compuestos orgánicos utilizadas en pequeñas cantidades, necesarias para el funcionamiento metabólico.

Variable dependiente: Es el rasgo o carácter de interés cuyas mediciones constituyen los datos u observaciones del experimento.

Variedad: Grupo de plantas o animales de rango inferior a la especie; algunos botánicos consideran que las variedades son equivalentes a las subespecies, y otros las consideran divisiones de las subespecies.

Vegetativo: Relativo a la propagación por procesos asexuales; también relativo a las partes de la planta no reproductoras. También se refiere a todos aquellos tejidos u órganos que no están implicados en la reproducción.

INDICE

Contenido	pág.
Resumen.....	iv
Agradecimientos.....	v
Dedicatoria.....	vi
Glosario.....	vii
1. Introducción.....	1
2. Revisión bibliográfica.....	2
2.1 Generalidades del frijol común.....	2
2.1.1 Origen y domesticación.....	2
2.1.2 Descripción botánica y Taxonomía del cultivo.....	2
2.1.3 Morfología de la planta.....	4
2.1.4 Fenología y hábitos de crecimiento del cultivo de frijol.....	5
2.1.5 Genética del frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....	6
2.1.6 Mejoramiento genético del cultivo.....	6
2.2 Variedad CENTA sequía.....	7
2.3 Cultivo <i>in vitro</i>	8
2.4 Micropropagación.....	8
2.5 Organogénesis y sus etapas.....	8
2.5.1 Ventajas de la técnica.....	9
2.6 Selección del explante.....	9
2.6.1 Protocolos de desinfección.....	9
2.7 Medios de cultivo.....	9
3. Materiales y métodos.....	11
3.1 Ubicación del estudio.....	11
3.2 Metodología de campo.....	11
3.3 Metodología de laboratorio.....	11
3.4 Material vegetal.....	12
3.5 Organogénesis directa.....	12
3.5.1 Desinfección de semillas y disección de explantes.....	12
3.5.2 Inducción y regeneración de brotes.....	12
3.5.3 Evaluación de la respuesta morfogénica.....	13
3.6 Organogénesis indirecta.....	13
3.6.1 Desinfección de semillas y germinación.....	13
3.6.2 Disección de explantes (nudos cotiledonales y meristemos) e inducción de callo en explantes.....	13

3.6.3	Inducción y regeneración de brotes	14
3.6.4	Evaluación de la respuesta morfogénica	14
3.7	Metodología estadística	15
3.7.1	Modelo lineal aditivo del ANVA bajo un DCA	15
3.7.2	Tabla del ANVA bajo un DCA	16
4.	Resultados	18
4.1	Organogénesis directa	18
4.1.1	Número de brotes	18
4.1.2	Número de hojas	19
4.1.3	Número de raíces	19
4.1.4	Eficiencia a la regeneración <i>in vitro</i> por organogénesis directa	20
4.2	Organogénesis indirecta a partir de meristemas	23
4.2.1	Número de brotes	23
4.2.2	Número de hojas	24
4.2.3	Número de raíces	24
4.2.4	Eficiencia a la regeneración <i>in vitro</i> por organogénesis indirecta	25
4.3	Organogénesis indirecta a partir de nudos cotiledonales	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	33
6.	Conclusiones	37
7.	Recomendaciones	38
8.	Bibliografía	39
9.	Anexos	44

Índice de cuadros

Cuadro 1.	Ejemplo de cómo se expresa la tabla de ANVA	16
Cuadro 2.	Medios de cultivo con diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) a evaluar en la variedad CENTA sequía	17

Índice de figuras

Figura 1.	Estrategia experimental de la investigación.	11
Figura 2.	Efecto de Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de brotes a partir de ejes embrionarios de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	18

Figura 3. Efecto de Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de hojas a partir de ejes embrionarios de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	19
Figura 4. Efecto de Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de raíces a partir de ejes embrionarios de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	20
Figura 5. Efecto de Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de brotes a partir de meristemos de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	23
Figura 6. Efecto de Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de hojas a partir de meristemos de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	24
Figura 7. Efecto de Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de raíces a partir de meristemos de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	25
Figura 8. Efecto de Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de brotes a partir de nudos cotiledonales de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	28
Figura 9. Efecto de Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de hojas a partir de nudos cotiledonales de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	29
Figura 10. Efecto del genotipo y Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de raíces a partir de meristemos de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	30

Índice de anexos

Cuadro A-1. Efecto de 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.) variedad CENTA Sequía.....	44
Cuadro A-2. Resumen de análisis de varianza para las variables número de brotes, numero de hojas, numero de raíces y eficiencia (%) a partir de ejes embrionarios por organogénesis directa.....	44
Cuadro A-3. Efecto de 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.) variedad CENTA Sequía.....	45
Cuadro A-4. Resumen de análisis de varianza para las variables número de brotes, numero de hojas, numero de raíces y eficiencia (%) a partir de meristemos por organogénesis indirecta.....	45
Cuadro A-5. Efecto de 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.) variedad CENTA Sequía.....	46

Cuadro A-6. Resumen de análisis de varianza para las variables número de brotes, número de hojas, número de raíces y eficiencia (%) a partir de nudos cotiledonales por organogénesis indirecta.....	46
Figura A-1. Disección de ejes embrionarios.....	47
Figura A-2. Disección de explantes.....	47
Figura A-3. Organogénesis directa a partir de ejes embrionarios.....	48
Figura A-4. Organogénesis indirecta a partir de nudos cotiledonales.....	49
Figura A-5. Organogénesis indirecta mediante meristemas.....	50
Figura A-6. Aclimatación de variedad CENTA Sequia a los 48 días.....	50

1. Introducción

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L), es la leguminosa alimenticia más importante para el consumo humano directo, ya que representa el 50% del grano de leguminosas consumidas en el mundo (FAO 2005). Su producción ha alcanzado un carácter universal y constituye un valioso componente de la dieta humana por ser una fuente importante de proteínas, vitaminas y minerales con especial relevancia en la dieta de las poblaciones en América, sobre todo en los países en vías de desarrollo (Ulloa *et al.* 2011).

En El Salvador el consumo de proteínas alcanza los 52.4 gramos por persona por día, de las cuales se estima que 4.2 gramos son provenientes de frijol, por lo que este grano suministra el 8% de la disponibilidad total de proteínas (CENTA 2008).

Es indispensable la creación de nuevas variedades de frijol que tengan un alto grado de tolerancia a diversos 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).

Uno de los objetivos de esta investigación fue determinar la respuesta morfogénica a la regeneración *in vitro* mediante organogénesis directa e indirecta de frijol común variedad CENTA sequía. Además, se buscó establecer un protocolo eficiente de regeneración *in vitro* de la variedad. El trabajo de investigación estaba encaminado a la búsqueda de nuevas metodologías biotecnológicas que sirvan de instrumentos en investigaciones futuras para mejorar genéticamente la variedad de interés nacional como lo es CENTA sequía.

2. Revisión bibliográfica

2.1 Generalidades del frijol común

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L) es uno de los cultivos más antiguos de América, se dice que México es su centro de origen. El frijol se cultiva extensamente en diferentes partes del mundo. En El Salvador es la fuente de proteínas más importante en la dieta humana, ya que el país cuenta con condiciones ecológicas aptas para producir frijol (Tapia y Camacho, 1988).

La tribu Phaseoleae es por mucho, el grupo más importante económicamente debido que contiene el 75% de las leguminosas comercializadas en todo el mundo (Broughton *et al.* 2003).

2.1.1 Origen y domesticación

Poblaciones silvestres del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L) se encuentran desde el centro de México hasta el Norte de Argentina, particularmente en las regiones de niveles mesotérmicos, vegetación baja y estación alterna. Difieren de las formas cultivadas en la ramificación más largas y profundas; en el tamaño menor de las hojas, vainas y semillas, estas últimas de testa más dura e impermeable, la latencia es más larga e irregular y en ciertos tipos de raíces carnosas y profundas; indican que su ciclo de vida puede exceder del año (León 2000).

2.1.2 Descripción botánica y Taxonomía del cultivo

La planta de frijol es anual, herbácea, se cultiva esencialmente para obtener las semillas y granos, los cuales tienen un alto grado de proteínas, siendo alrededor del 22% (CENTA 2019).

2.1.2.1 Clasificación Taxonómica del frijol común

Según CIAT (1986) la clasificación taxonómica del frijol común es la siguiente:

Orden: Rosales

Familia: Leguminosae

Subfamilia: Papilionoidae

Tribu: Phaseolae

Subtribu: Phaseolinae

Género: *Phaseolus*

Especie: *vulgaris*

2.1.2.2 Descripción botánica

2.1.2.2.1 Raíz

En las primeras etapas de desarrollo el sistema radical está formado por la radícula del embrión, la cual se convierte posteriormente en la raíz principal o primaria. Pocos días después se observan las raíces secundarias que se desarrollan en la parte superior o cuello de la raíz principal. Sobre las raíces secundarias se desarrollan las raíces terciarias y otras subdivisiones como los pelos absorbentes, los cuales se encuentran en todos los puntos de crecimiento de la raíz. Aunque generalmente se distingue la raíz, el sistema radical tiende a ser fasciculado, fibroso en algunos casos, pero con una amplia variación, incluso dentro de una misma variedad (CENTA 2019).

2.1.2.2.2 Tallo

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 2019).

2.1.2.2.3 Hojas

Son de dos tipos: simples y compuestas. Los cotiledones constituyen el primer par de hojas, proveen de sustancias de reserva a la planta durante la germinación y emergencia, y elaboran los primeros carbohidratos a través de la fotosíntesis en sus cloroplastos. Son de poca duración, el segundo par y primeras hojas verdaderas, se desarrollan en el segundo nudo; son simples, opuestas y cortadas. A partir del tercer nudo se desarrollan las hojas compuestas, las cuales son alternas, de tres folíolos, un peciolo y un raquis. Presentan variación en cuanto tamaño, color y pilosidad, esta variación está relacionada, con la variedad y las condiciones ambientales de luz y humedad (CENTA 2019).

2.1.2.2.4 Flor

La flor contiene los órganos sexuales de la planta. Las flores masculinas llamados estambres y las femeninas llamadas pistilos. La flor de frijol no se abre mientras esta no ha sido polinizada, por lo que se clasifica como una planta autógama. Básicamente existen dos tipos de color de flor, blanco para variedades de grano rojo y moradas para variedades de grano negro (CENTA 2019).

2.1.2.2.5 Semilla

La semilla es la unidad reproductora de las plantas. Es el producto que se obtiene después de la floración y de otros fenómenos que se dan dentro de la flor. La semilla es de varios colores, dependiendo de la variedad: rojas, negras, blancas, amarillas, entre otras (CENTA 2019).

2.1.3 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 1986). 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, semipostrado o postrado, 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 (Parsons 1999).

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 1986). Las semillas no poseen albumen, por lo 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 1986).

2.1.4 Fenología y hábitos de crecimiento del cultivo de frijol

2.1.4.1 La fase vegetativa

Se inicia en el momento en 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 (CIAT 1986).

2.1.4.2 La fase reproductiva

Se inicia con la aparición de los primeros botones o racimos florales y termina cuando el grano alcanza el grado de madurez necesario para la cosecha; a pesar de ser esta fase eminentemente reproductiva, durante ella las variedades indeterminadas continúan, aunque con menor intensidad, producen estructuras vegetativas (CIAT 1986).

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.

2.1.4.3 Hábitos de crecimiento

Según CIAT (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: Habito de crecimiento indeterminado arbustivo: tallo erecto, con aptitud para trepar, termina en una guía larga.

Tipo III: Habito de crecimiento indeterminado postrado: plantas postradas o semipostradas con ramificación bien desarrolladas.

Tipo IV: Habito de crecimiento indeterminado trepador.

2.1.5 Genética del frijol (*Phaseolus vulgaris*)

El frijol es una especie diploide ($2n = 2x = 22$), anual y predominantemente autógama. El tamaño del genoma de frijol es pequeño (635 Mpb / genoma haploide) y similar en su naturaleza como diploide verdadero al de arroz (340 hasta 560 Mpb / genoma haploide). El tamaño de los cromosomas mitóticos y meióticos es de aproximadamente 1-3 μ m de longitud, la mayoría de los cromosomas son metacéntricos o submetacéntricos, y presentan una media de 1.9 quiasmas por cromosomas bivalentes en la meiosis por un entrecruzamiento por brazo del cromosoma (Estrada et al. 2007).

En cuanto a estudios de genómica en frijol común se han reconocido familias pequeñas de genes, como los genes de la actina donde se describieron seis miembros. También se han descrito familias grandes, como los genes análogos de resistencia y genes que codifican para las kinasas. Además, se han identificado muchos genes involucrados en resistencia, producción de isoflavonas y color de la testa (Broughton *et al.* 2003).

2.1.6 Mejoramiento genético del cultivo

El mejoramiento genético se ha convertido en la mejor opción en términos económicos, ecológicos y de sostenibilidad para incrementar y/o estabilizar la producción de frijol en condiciones de sequía (Rosales-Serna *et al.* 2000).

Aunque no es reconocido como una especie tolerante a sequía, el frijol posee estrategias que le confieren dicha tolerancia (Beebe *et al.* 2013).

El progreso de mejoramiento para tolerancia a sequía en frijol ha sido lento, aunque se han obtenido avances en cuanto a los criterios a utilizar, para seleccionar líneas tolerantes a estrés hídrico (Beebe *et al.* 2013; White *et al.* 2009).

Existe un considerable interés mundial por el desarrollo de métodos no convencionales de mejoramiento genético en la agricultura, tales como la modificación genética, vía

transgénesis o por inducción de mutaciones por irradiación o por métodos químicos. El objetivo es generar plantas tolerantes a factores de estrés biótico (plagas, patógenos, enfermedades) o abiótico (condiciones ambientales adversas) que no pueden ser obtenidas por métodos tradicionales, los cuales pueden utilizar solamente la variabilidad genética disponible en los recursos genéticos primarios de la especie, tales como variedades locales, o especies silvestres relacionadas y reproductivamente compatibles con ella (Jiménez 2008). El mejoramiento asistido con marcadores genéticos (SAM) es una esperanzadora tecnología que permite acelerar el desarrollo de nuevas variedades con rasgos determinados sin necesidad de intervenir en el genoma de las variedades actualmente existentes (Gómez 2007).

2.2 Variedad CENTA sequía

Es una variedad de grano color rojo, desarrollada por el CENTA con la colaboración del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Posee alto potencial de rendimiento, tolerancia a las principales enfermedades que afectan al cultivo y buen color de grano para su comercialización (Cuadro 2). Su principal atributo es la tolerancia a sequía moderada y altas temperaturas (CENTA 2018).

Esta variedad es una alternativa sostenible para reducir los efectos ocasionados por el cambio climático en el cultivo de frijol (CENTA 2018).

Entre las características agronómicas más sobresalientes de esta variedad están (CENTA 2018):

Habito de crecimiento	II B (guía corta)
Días a floración	33-35
Días a madurez fisiológica	65
Color de grano	Rojo claro
Forma del grano	Arriñonada
Número de granos por vaina	6-7
Numero de vainas por planta	20
Color de vaina	Crema
Reacción al virus del mosaico dorado amarillo	Resistente
Rección al virus del mosaico común	Resistente
Reacción a mancha angular	Ligeramente tolerante

Reacción a mustia hilachosa	Susceptible
Reacción a bacteriosis	Susceptible
Altas temperaturas	Tolerante
Humedad limitada	Tolerante
Peso de 100 granos (g)	23
Rendimiento potencial (qq/mz)	35
Adaptación (msnm)	300-900
Contenido de hierro (ppm)	46
Contenido de zinc (ppm)	30

2.3 Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* es una técnica biotecnológica de reproducción en condiciones totalmente asépticas, en la que a partir de un pequeño segmento inicial de tejido de cualquier parte de la planta es posible regenerar en poco tiempo miles o millones de plantas genéticamente iguales a la planta madre, cuando a este tejido le es aplicado un estímulo por medio de variables físicas y químicas controladas en un medio de cultivo (Albarracín s.f.).

2.4 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).

2.5 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 es un proceso bifásico, según los estudios de inducción de la formación de órganos a partir del cultivo de callos. Sus dos fases son la citodiferenciación, que da lugar a un primordio, y la organogénica, que determinará el tipo de órgano que se formará

a partir del primordio. La naturaleza bifásica de la organogénesis podría explicar el amplio espectro de tratamientos efectivos para la inducción de órganos a partir del callo (Apezato *et al.* 2004).

2.5.1 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).

2.6 Selección del explante

La selección del explante es un aspecto clave para tener éxito en el Cultivo de Tejidos, ya que dependiendo de su ubicación en la planta, del tipo de tejido que contiene, de su edad cronológica y fisiológica, de su contenido endógeno de hormonas, entre otros, se comportará de una manera o de otra (Albarracín s.f.).

2.6.1 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 (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 tenso activo como el Tween 80 o soluciones yodadas. Como complementos en el protocolo de desinfección se adicionan diferentes antibióticos y antifúngicos para garantizar la asepsia de los explantes durante el proceso de propagación (Mroginski y Roca 1991).

2.7 Medios de cultivo

La composición de los medios de cultivo dependerá exclusivamente del objetivo trazado y el tipo de planta a propagar. Entre los componentes que se debe tener un medio de cultivo se encuentran los Macronutrientes (C, H, O, 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 vegetal son compuestos sintetizados químicamente u obtenidos de otros organismos, son similares a las fitohormonas y cumplen un papel importante en la regulación de diferentes procesos bioquímicos a nivel celular en los organismos vegetales (Alcántara *et al.* 2019).

Auxinas son un tipo de fitohormonas especializadas en diferentes procesos a nivel vegetal. Los principales puntos de acción se encuentran a nivel celular, donde tienen la capacidad de dirigir e intervenir en los procesos de división, elongación y diferenciación celular (George *et al.* 2008).

Dentro de las auxinas más conocidas a nivel vegetal se encuentra el ácido 3-indolacético (AIA) que es la principal auxina producida de manera natural, aunque también se conocen otro tipo de auxinas que son producidas de manera sintética como el ácido indol-butírico (IBA), el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el ácido α -naftalenacético (NAA). (George *et al.* 2008).

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 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 corresponde a una investigación del tipo experimental y se realizó en el periodo de julio de 2021 a marzo de 2022.

3.2 Metodología de campo

La investigación propuesta es del tipo experimental y estrictamente de laboratorio razón por la cual no cuenta con una metodología de campo.

3.3 Metodología de laboratorio

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

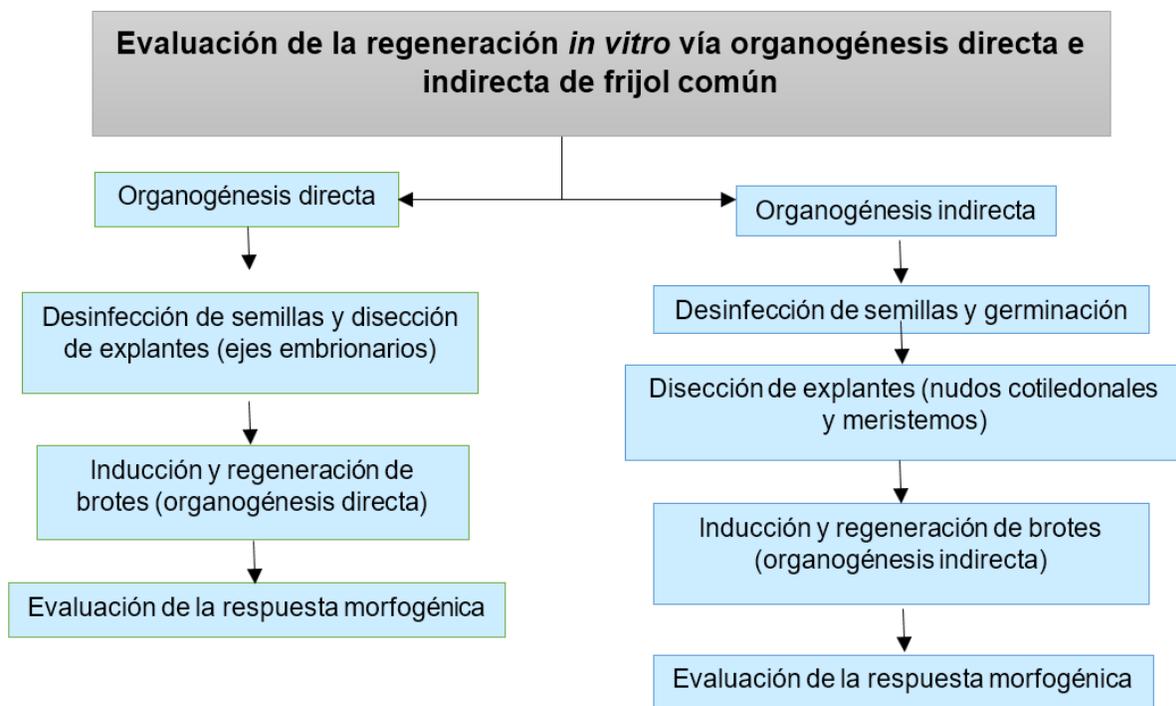


Figura 1. Estrategia experimental para la realización de la investigación.

3.4 Material vegetal

Se utilizaron semillas maduras de la variedad de frijol CENTA sequía de no más de un año de cosecha. Las semillas utilizadas fueron donadas por el Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Córdova” (CENTA).

3.5 Organogénesis directa

3.5.1 Desinfección de semillas y disección de explantes

Las semillas se desinfectaron superficialmente en una cámara de flujo laminar, de acuerdo con lo descrito por Solís-Ramos *et al.* (2019). Las semillas se sumergieron durante un minuto en alcohol etílico al 70% seguido de un lavado con hipoclorito de sodio NaOCl al 1% y Tween 20 durante 20 minutos. Posterior a ello, las semillas se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se dejaron en agua durante 16 horas.

Transcurrido el tiempo de imbibición, se disectaron los embriones cigóticos de las semillas en cámaras de flujo laminar con ayudas de pinzas y bisturí. Los explantes consistieron en ejes embrionarios que estuvieron conformados en los embriones cigóticos sin la radícula y las hojas cotiledonales. Una vez disectados los explantes, se realizó un segundo lavado con NaOCl al 0.1% durante diez minutos y un lavado final con agua destilada estéril.

3.5.2 Inducción y regeneración de brotes

Se cultivaron los ejes embrionarios en placas Petri con 25 ml de medio de cultivo semisólido el cual estaba compuesto de sales minerales MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementados con 100 mg.L⁻¹ de mioinositol, 1 mg.L⁻¹ de tiamina, 30 g.L⁻¹ de sacarosa y 8 g.L⁻¹ de agar. 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°C y 1,070 g.cm⁻¹

Los tratamientos consistieron en medios de cultivo con tres diferentes dosis de Bencilaminopurina (BAP): 0, 1 y 5 mg.L⁻¹, dichos tratamientos se conformaron por tres placas Petri con tres ejes embrionarios cada una y cinco repeticiones por cada tratamiento.

Los explantes se cultivaron en los tratamientos durante 42 días en condiciones de fotoperíodo 16 horas luz / 8 horas oscuridad a 25±1°C y 58 μmol.m⁻².s⁻¹. Se realizó un subcultivo a los 21 días después de iniciado el ensayo.

3.5.3 Evaluación de la respuesta morfogénica

La evaluación de la respuesta a la regeneración *in vitro* de la variedad CENTA sequía se realizó con los indicadores siguientes: número de brotes, número de hojas y número de raíces. Adicionalmente, se calculó la eficiencia de regeneración a través de la fórmula.

$$\frac{\text{número de ejes embrionarios con brotes de } \textit{nov}o}{\text{total de número de ejes embrionarios}} \times 100$$

Los tratamientos se evaluaron después de 21 y 42 días de iniciado el ensayo, y se llevó un registro fotográfico.

3.6 Organogénesis indirecta

3.6.1 Desinfección de semillas y germinación

En una cámara de flujo laminar se desinfectaron las semillas superficialmente con alcohol etílico al 70% durante 1.5 minutos, luego con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 3.5% y Tween 20 (3 gotas/100 ml) en agitación constante durante 15 minutos. Seguido de esto se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril. Se colocaron las semillas en un medio de cultivo de germinación que estuvo conformado por sales minerales MS (Murashige y Skoog 1962) suplementados con 1 mg.L⁻¹ de tiamina, 1.13 mg.L⁻¹ de BAP, 30 g.L⁻¹ sacarosa y 3 g.L⁻¹ agar. El pH del medio se ajustó a 5.7 con NaOH o HCl y se procedió a esterilizarlo en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Se cultivaron un total de 1000 de semillas en frasco de vidrio de 250 ml. Cada frasco contenía 30 ml de medio y 10 semillas. La temperatura de germinación fue de 25°C ± 2 C y en absoluta oscuridad durante 7 días.

3.6.2 Disección de explantes (nudos cotiledonales y meristemos) e inducción de callo en explantes

Transcurridos los 7 días de germinación, se disectaron los explantes que consistieron en los meristemos y los nudos cotiledonales (con ambos cotiledones) de los embriones cigóticos germinados. Todos los explantes se cultivaron en placas Petri, mientras que los meristemos se cultivaron en frascos, ambos con 25 ml de medio de inducción de callos (MIC) el cual estaba compuesto de las sales minerales MS y 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, 0.2 mg.L⁻¹ de Tidiazurón (TDZ), 0.05 mg.L⁻¹ de Ácido indolacético (AIA),

30 mg.L⁻¹ de sacarosa y 8 g.L⁻¹ de agar. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.7 con HCL o NaOH antes de esterilizarlo en autoclave durante 20 min a 121°C y 1,070 g.cm⁻¹.

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±1°C y 58 μmol.m⁻².s⁻¹. Mientras que los meristemas fueron cultivados únicamente en las condiciones de fotoperiodo antes mencionadas.

3.6.3 Inducción y regeneración de brotes

Transcurrido los 14 días en los medios de inducción de callos (MIC), los nudos y meristemas 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 6.75 mg.L⁻¹. 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 1.5 MPa. 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 meristemas fueron cuatro repeticiones, tres frascos por repetición y cuatro explantes por frasco. Tanto los nudos como los meristemas se cultivaron en condiciones de fotoperiodo 16 horas luz / 8 horas oscuridad a 25±1°C y 58μmol.m⁻².s⁻¹. Se realizó un subcultivo a los 14 días después de iniciado el ensayo con MIB.

3.6.4 Evaluación de la respuesta morfogénica

La respuesta a la regeneración *in vitro* vía organogénesis indirecta de la variedad CENTA Sequía se evaluó mediante los indicadores número de brotes, número de hojas y número de raíces. Se utilizó la misma fórmula aplicada en la organogénesis directa para calcular la

eficiencia de regeneración $\frac{\text{número de nudos cotiledonales con brotes de } \textit{novo}}{\text{total de número de nudos cotiledonales}} \times 100$

Después de 14 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.

3.7 Metodología estadística

Para el procesamiento y análisis estadístico de los datos, 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) bajo el Diseño Completamente al Azar (DCA), esto por las características del material experimental (material homogéneo, 100% puro y se trabajó bajo condiciones controladas).

Se establecieron 3 tratamientos con 5 repeticiones para la organogénesis directa e indirecta. Previo a la aplicación de la técnica del Análisis de Varianza (ANVA) se verificó que los datos cumplan con los distribución normal y homogeneidad de varianzas.

Con el propósito de demostrar cuál de los medios de cultivo suplementados con BAP presentan la mejor respuesta en 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 α del 1% = 0.01 y mediante la utilización de hojas de cálculo de Microsoft Excel, programas estadísticos SPSS® 25 e Infostat® 2020. Las variables independientes son los medios de cultivo y la variedad de frijol y la variable dependiente es la respuesta a la morfogénesis.

Los tratamientos para el método de organogénesis directa fueron 0 mg.L⁻¹ de BAP, 1 mg.L⁻¹ de BAP y 5 mg.L⁻¹ de BAP (Cuadro 1) (Gatica-Arias *et al.* 2010). Cada tratamiento estuvo conformado por cinco repeticiones y cada repetición consistió en tres placas petri con dos explantes cada uno. Fueron 30 explantes por tratamientos y 90 en total. Para el método de organogénesis indirecta los tratamientos consistieron en 0 mg.L⁻¹ de BAP, 2.25 mg.L⁻¹ de BAP y 6.75 mg.L⁻¹ de BAP (Collado *et al.* 2013). Cada tratamiento tuvo cinco repeticiones y cada repetición consistió en tres placas petri con dos explantes cada uno. Fueron 30 explantes por tratamientos y 90 en total.

3.7.1 Modelo lineal aditivo del ANVA bajo un DCA

El modelo aditivo lineal para un diseño completamente al azar es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij} \quad i = 1, \dots, k \quad j = 1, \dots, n_i$$

Donde:

Y_{ij} el valor o rendimiento observado en el i-ésimo tratamiento, j-ésima repetición.

μ Es el efecto de la media general .

α_i Es el efecto del i-ésimo tratamiento, definido como la diferencia entre la media del i-ésimo tratamiento y la media global; esto es $\alpha_i = \mu_i - \mu$.

ε_{ij} Es el efecto del error experimental en el i-ésimo tratamiento, j-ésima repetición, la cual cumple los supuestos: (i) Normalidad con media cero (ii) independencia (iii) homogeneidad de varianza.

k Es el número de tratamientos.

n_i Es el número de repeticiones para el i-ésimo tratamiento.

3.7.2 Tabla del ANVA bajo un DCA

Para obtener la tabla de ANVA es necesario determinar:

Las fuentes de variación En un experimento bajo un DCA con un sólo factor, las fuentes de variación son:

- 1) Tratamientos
- 2) Error experimental
- 3) Total

Expresar la tabla de ANVA.

Cuadro 1. Ejemplo de cómo se expresa la tabla de ANVA

Causa de Variación	Suma de cuadrados (SC)	Grados de libertad (gl)	Cuadrados Medios (CM)	F
Tratamientos	SC_{trat}	$k-1$	$CM_{Trat} = \frac{SC_{Trat}}{k-1}$	$\frac{CM_{Trat}}{CM_{Error}}$
Error Experimental	SC_{error}	$n-k$	$CM_T = \frac{SC_{tratamientos}}{k-1}$	
Total	SC_{total}	$n-1$		

Comparación y grado de significación.

Si $F_{cal} < F_{crit}$ H_0 no se rechaza.

Si $F_{cal} > F_{crit}$ H_0 se rechaza.

Cuadro 2. Medios de cultivo con diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) a evaluar en la variedad CENTA sequía.

Organogénesis directa		Organogénesis indirecta	
Variables	Indicadores	Variables	Indicadores
Regeneración <i>in vitro</i>	Numero de brotes Numero de hojas Numero de raíces	Regeneración <i>in vitro</i>	Numero de brotes Numero de hojas Numero de raíces
Eficiencia de regeneración	% de regeneración mediante formula.	Eficiencia de regeneración	% de regeneración mediante formula
Tratamientos			
Tratamientos organogénesis directa		Tratamientos organogénesis indirecta	
BAP		BAP	
0	mg.l ⁻¹	0	mg.l ⁻¹
1	mg.l ⁻¹	2.25	mg. l ⁻¹
5	mg.l ⁻¹	1.75	mg.l ⁻¹

4. Resultados

4.1 Organogénesis directa

4.1.1 Número de brotes

Los brotes se regeneraron a partir de ejes embrionarios como respuesta morfogénica a diferentes dosis de BAP en la variedad CENTA Sequía (Figura A-3). La dosis de 1 mg.L⁻¹ de BAP produjo la mayor cantidad de brotes por explante (0.99), seguido de la dosis de 5 mg.L⁻¹ de BAP con 0.88 brotes por explante (Cuadro A-1). En los tratamientos con ausencia de BAP no se observó respuesta favorable a la regeneración de brotes de *novo* (Figura 2).

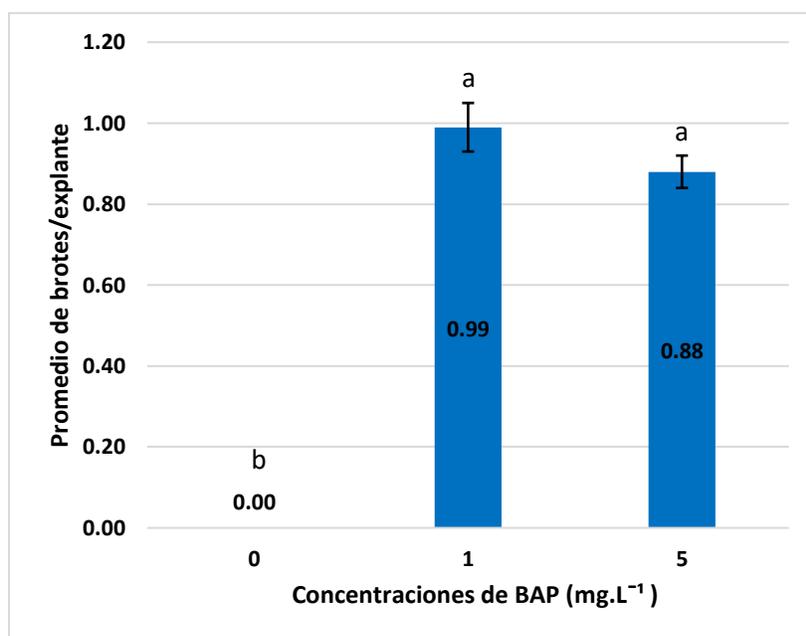


Figura 2. Efecto de Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de brotes a partir de ejes embrionarios de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

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

Además, el análisis estadístico indica que existen diferencias altamente significativas (p -valor= 0.0001 < 0.01) en el promedio de brotes por explante, lo cual indica que la utilización de Bencilaminopurina (BAP) tiene efectos favorables en la regeneración de brotes de *novo* (Cuadro A-2).

4.1.2 Número de hojas

El número de hojas también fue otra variable en la investigación, estas se regeneraron a partir de ejes embrionarios en la variedad CENTA Sequia (Figura A-3). El mayor número de hojas obtenidas por organogénesis directa fue en la concentración de 1 mg.L⁻¹ de BAP con 3.61 hojas por explante, seguido de la concentración de 5 mg.L⁻¹ de BAP con 2.81 hojas por explante (Cuadro A-1). La ausencia de BAP produjo el menor número de hojas, con 1.03 hojas por explante (Figura 3).

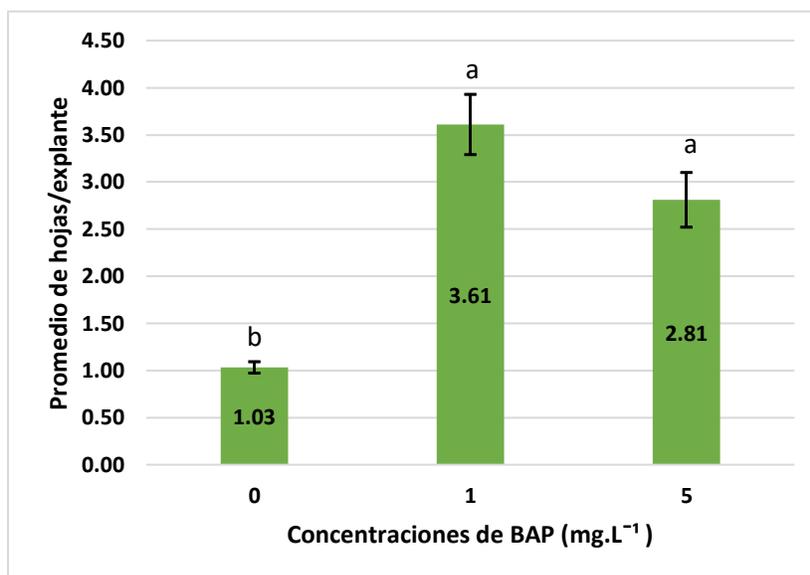


Figura 3. Efecto de Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de hojas a partir de ejes embrionarios de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

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

Además, el análisis estadístico indica que existen diferencias altamente significativas (p -valor= 0.0001 < 0.01), lo cual nos demuestra que la utilización de diferentes dosis de Bencilaminopurina (BAP) tiene efectos diferentes en la regeneración de hojas (Cuadro A-2).

4.1.3 Número de raíces

Las raíces fueron también una respuesta morfogénica a la regeneración *in vitro* a partir de ejes embrionarios de la variedad CENTA Sequía (Figura A-3). El mayor número de raíces obtenidas por organogénesis directa fue en la ausencia de BAP con 4.43 raíces por explante

(Cuadro A-1). En los tratamientos donde se adicionó BAP al medio de cultivo no hubo respuesta favorable a la regeneración de raíces (Figura 4).

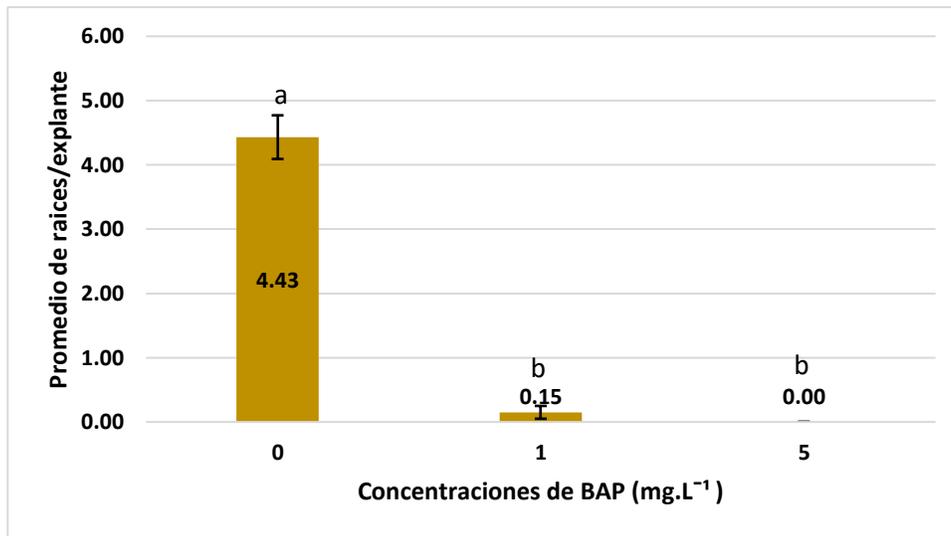


Figura 4. Efecto de Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de raíces a partir de ejes embrionarios de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

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

Al realizar el análisis de varianza de la variable número de raíces por organogénesis directa, se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas (p -valor = $0.0001 < 0.01$), lo cual nos demuestra que la presencia de Bencilaminopurina (BAP) no promueve la regeneración de raíces (Cuadro A-2).

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

En esta investigación se cuantificó el porcentaje de la respuesta morfogénica de los explantes mediante el parámetro conocido como eficiencia de regeneración. Según los resultados obtenidos, la concentración de 1 mg.L^{-1} de BAP produjo el mayor porcentaje de eficiencia con 99% seguido de la concentración de 5 mg/L de BAP con una eficiencia del 88%. En los tratamientos con ausencia de BAP no se observó respuesta favorable a la regeneración de brotes de *novo* (Cuadro A-1). Adicionalmente, al analizar los resultados de la eficiencia de regeneración se pudo establecer un protocolo específico de regeneración *in vitro* para ejes embrionario de la variedad CENTA Sequía de *Phaseolus vulgaris* L.

PROTOCOLO DE REGENERACIÓN *IN VITRO* VÍA ORGANOGÉNESIS DIRECTA PARA EJES EMBRIONARIOS DE FRIJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris L.*) VARIEDAD CENTA SEQUÍA.

1. Desinfección de semillas

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

Descarte el alcohol y continúe con la desinfección con solución de NaOCl 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 los que sean necesarios hasta eliminar la solución desinfectante.

2. Imbibición de semillas

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

Deje en imbibición durante 16-18 horas a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

3. Extracción de ejes embrionarios

Separe la testa 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 NaOCl al 1% durante 10 minutos en agitación constante.

Haga tres lavados con agua destilada estéril.

5. Cultivo de ejes embrionarios en condiciones de fotoperíodo

Ubique 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⁻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, 30 gl.L⁻¹ de sacarosa, 8 gl.L⁻¹ de agar y 1 mg.L⁻¹ de BAP.

Cultive durante 21 días en condiciones de 16 horas luz / 8 horas oscuridad a 25±1°C y 58 μmol/m²/s.

6. Subcultivo de ejes embrionarios

Al cumplir los 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 y porcentaje de eficiencia.

4.2 Organogénesis indirecta a partir de meristemos

4.2.1 Número de brotes

Se regeneraron brotes a partir de meristemos, en la variedad CENTA Sequía (Figura A-5). En este caso, la concentración de 6.75 mg.L⁻¹ de BAP produjo la mayor cantidad de brotes por explante (3.57), seguido de la concentración de 2.25 mg.L⁻¹ de BAP con 2.65 brotes por explante (Cuadro A-1). En los tratamientos con ausencia de BAP no se observó respuesta favorable a la regeneración de múltiples brotes (Figura 5).

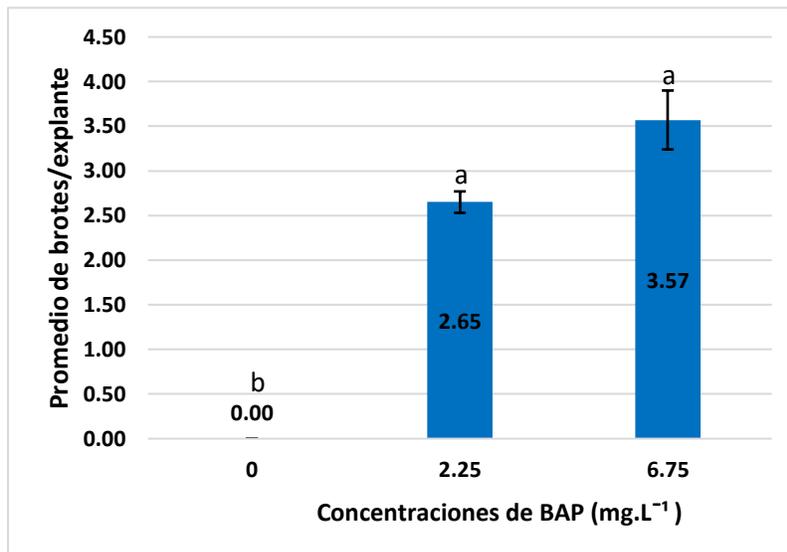


Figura 5. Efecto de Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de brotes a partir de meristemos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

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

Estadísticamente el análisis de varianza demuestra que existen diferencias altamente significativas ($p\text{-valor} = 0.0001 < 0.01$). Lo cual nos demuestra que la utilización de diferentes dosis de Bencilaminopurina (BAP) tiene efectos diferentes en la regeneración de brotes (cuadro A-4).

4.2.2 Número de hojas

La formación de hojas fue también una variable evaluada como respuesta a la adición de BAP en el medio de cultivo (Figura A-5). Se observó que la concentración de 2.25 mg.L⁻¹ de BAP produjo la mayor cantidad de hojas con un promedio de 3.23 hojas por explante (Cuadro A-3). En los tres tratamientos se observó respuesta favorable a la regeneración de hojas (Figura 6).

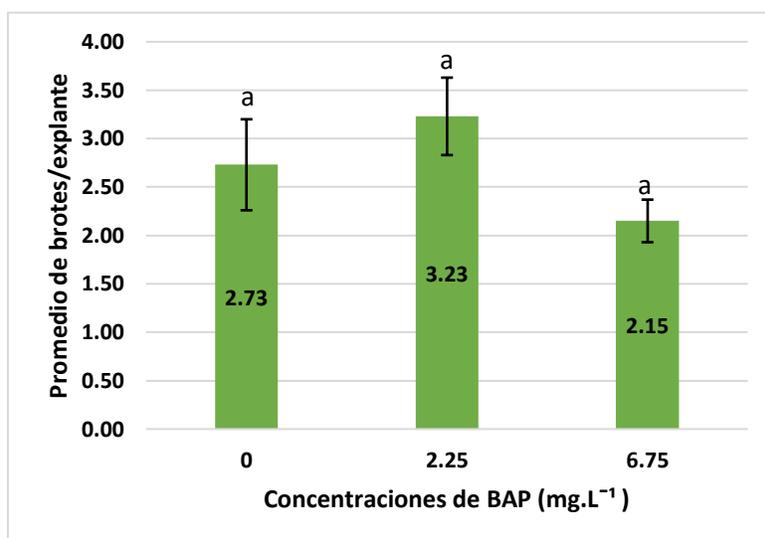


Figura 6. Efecto de Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de hojas a partir de meristemos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

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

Al realizar el análisis de varianza de la variable número de hojas por organogénesis indirecta, no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p\text{-valor} = 0.1895 > 0.01$). Lo cual nos demuestra que la adición o ausencia de Bencilaminopurina (BAP) en el medio nutritivo, no tiene efectos diferentes en la regeneración de hojas a partir de meristemos mediante el método indirecto (cuadro A-4).

4.2.3 Número de raíces

Las raíces se regeneraron a partir de meristemos como respuesta morfogénica a la regeneración *in vitro* de la variedad CENTA Sequía (Figura A-5). La dosis con ausencia de BAP produjo la cantidad mayor de raíces con 3.19 raíces por explante (Cuadro A-3). En los tratamientos con presencia de BAP no se observó respuesta favorable a la regeneración de raíces (Figura 7).

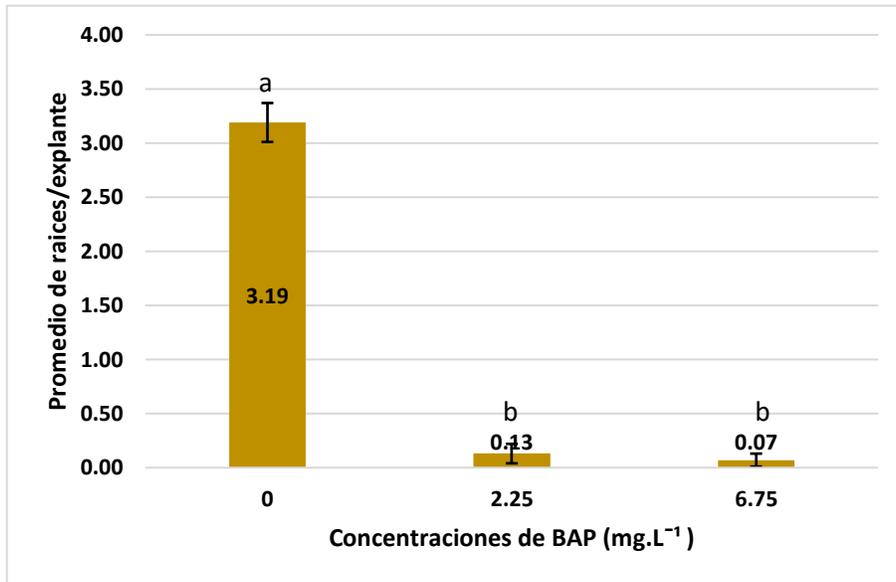


Figura 7. Efecto de Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de raíces a partir de meristemos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

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

Se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas ($p\text{-valor} = 0.0001 < 0.01$). En esta ocasión nos indica que la adición de Bencilaminopurina (BAP) no tiene efectos favorables en la regeneración de raíces (cuadro A-4)

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

La eficiencia a la regeneración *in vitro* también fue evaluada en el método de organogénesis indirecta. Se encontraron diferentes eficiencias de regeneración de acuerdo a las concentraciones de BAP utilizadas (Cuadro A-3). En ausencia de BAP no se obtuvo eficiencia, mientras que para la concentración de 2.25 mg.L⁻¹ de BAP se obtuvo una eficiencia del 66%, la concentración de 6.75 mg.L⁻¹ de BAP fue la que mejores resultados evidencio con una eficiencia del 89%. La eficiencia de regeneración permitió establecer un protocolo específico de regeneración *in vitro* para meristemos de la variedad CENTA Sequía.

PROTOCOLO DE REGENERACIÓN *IN VITRO* VÍA ORGANOGÉNESIS INDIRECTA PARA MERISTEMOS DE FRIJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris* L.) VARIEDAD CENTA SEQUÍA.

1. Desinfección de semillas

Desinfecte las semillas con alcohol etílico al 70% durante 1.5 minuto en agitación constante.

Descarte el alcohol y continúe la desinfección con una solución de NaOCl al 3.5% adicionada con tres gotas de Tween 20 por cada 100 ml de agua.

Agite por 15 minutos.

Haga tres lavados con agua destilada estéril o los que sean necesarios 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 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, 1 mg.L⁻¹ de BAP, 30 g.L⁻¹ sacarosa y 3 g.L⁻¹ agar.

Déjelas germinar a 25 ± 1 C° y en absoluta oscuridad durante siete días.

3. Disección de meristemos

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

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, 0.2 mg.L⁻¹ de Tidiazurón (TDZ), 0.05 mg.L⁻¹ de Ácido Indol acético (AIA), 30 g.L⁻¹ de sacarosa y 8 g.L⁻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 meristemas al medio de inducción y regeneración de brotes (MIB)

Transfiera los explantes al MIB con Ph 5.7 y compuesto por MS adicionado con $0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP, $2.25\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP y $6.75\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 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, número de raíces y porcentaje de eficiencia.

4.3 Organogénesis indirecta a partir de nudos cotiledonales

4.3.1 Número de brotes

Se regeneraron brotes a partir de nudos cotiledonales como respuesta morfogénica a la regeneración *in vitro* de la variedad CENTA Sequía (Figura A-4). La concentración de 2.25 mg.L⁻¹ de BAP produjo la mayor cantidad de brotes con 3.64 brotes por explante; finalmente la concentración de 6.75 mg.L⁻¹ de BAP con 2.86 brotes promedio por explante (Cuadro A-5). El tratamiento con ausencia de BAP produjo la menor cantidad de brotes con 0.29 brotes por explante (Figura 8).

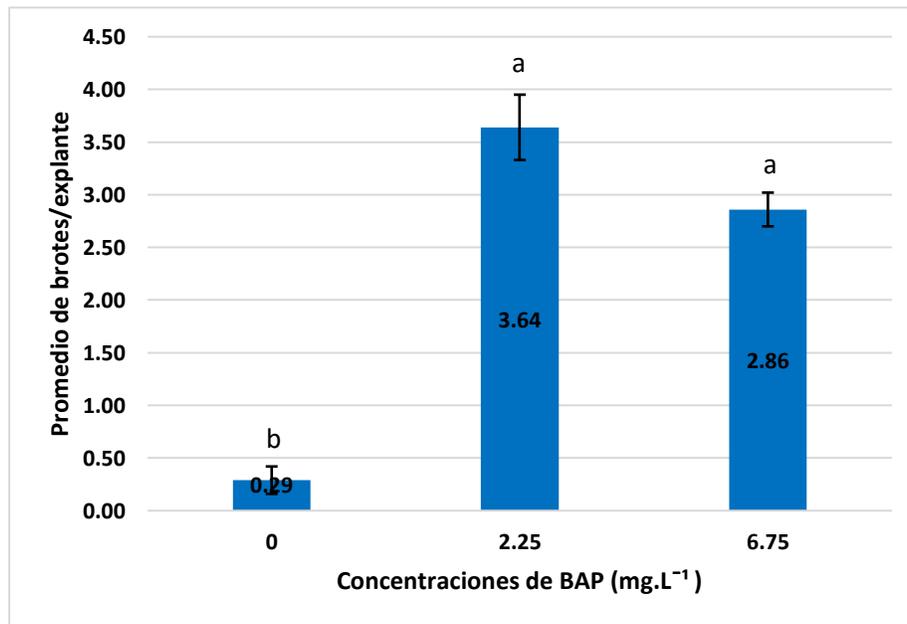


Figura 8. Efecto de Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de brotes a partir de nudos cotiledonales de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

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

Estadísticamente la variable número de brotes por organogénesis indirecta, demostró diferencias altamente significativas ($p\text{-valor} = 0.0001 < 0.01$). Esto nos indica que la adición de BAP al medio nutritivo provoca efectos favorables en la regeneración de brotes de *novo* (Cuadro A-6)

4.3.2 Número de hojas

Formación de hojas a partir de nudos cotiledonales como respuesta morfogénica a la regeneración *in vitro* de la variedad CENTA Sequía (Figura A-4). La concentración de 2.25 mg.L⁻¹ de BAP produjo la mayor cantidad de hojas con 9.31 hojas promedio por explante; finalmente la concentración de 6.75 mg.L⁻¹ de BAP con 8.33 hojas promedio por explante (Cuadro A-5). El tratamiento con ausencia de BAP produjo la menor cantidad de hojas con 3.02 hojas por explante (Figura 9).

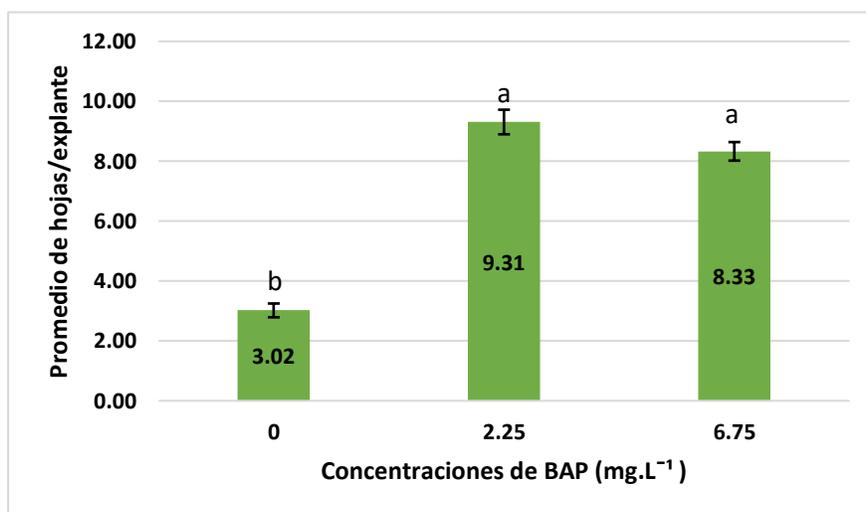


Figura 9. Efecto de Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de hojas a partir de nudos cotiledonales de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

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

Al realizar el análisis de varianza de la variable número de hojas por organogénesis directa, se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas (p -valor = $0.0001 < 0.01$). Esto significa que la presencia de BAP en el medio favorece a la regeneración de hojas (Cuadro A-6)

4.3.3 Número de raíces

Las raíces se regeneraron a partir de nudos cotiledonales como respuesta morfogénica a la regeneración *in vitro* de la variedad CENTA Sequía (Figura A-4). La dosis con ausencia de BAP produjo la mayor cantidad de raíces con 2.48 raíces por explante (Cuadro A-5). En los tratamientos con presencia de BAP no se observó respuesta favorable a la regeneración de raíces (Figura 10).

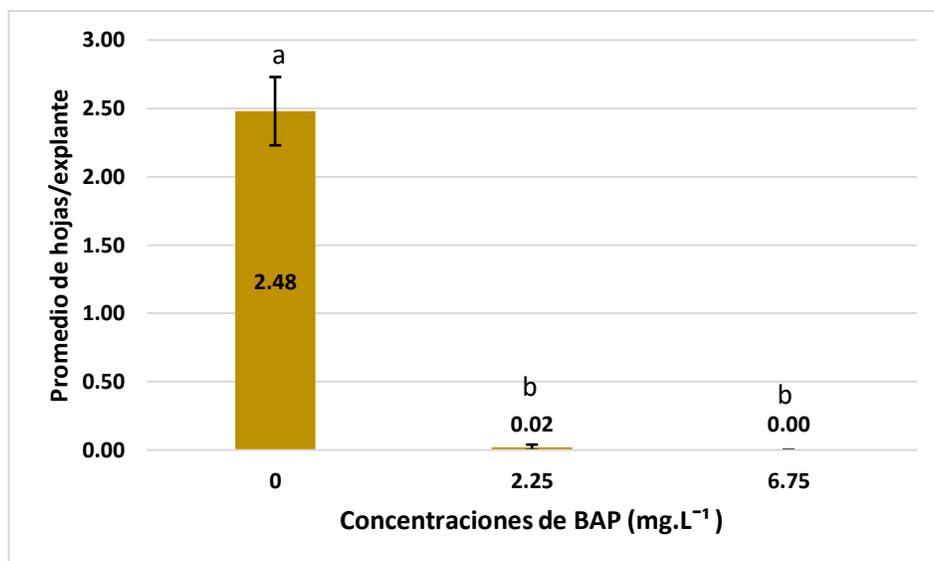


Figura 10. Efecto de Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de raíces a partir de meristemas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

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

Al realizar el análisis de varianza de la variable número de raíces por organogénesis directa, se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas ($p\text{-valor} = 0.0001 < 0.01$). Lo que indica que la adición de BAP en el medio nutritivo no tiene efectos favorables en la regeneración de raíces (Cuadro A-6).

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

La eficiencia de regeneración también se evaluó en el método indirecto a partir de nudos cotiledonales. Según los resultados, la concentración de 2.25 mg.L⁻¹ de BAP produjo el mayor porcentaje de eficiencia con 91, seguido de la concentración de 6.75 mg.L⁻¹ de BAP con una eficiencia del 72% y finalmente en los tratamientos con ausencia de BAP se obtuvo una eficiencia del 7% (Cuadro A-5). Por lo que al analizar los resultados de las variables evaluadas estableció un protocolo específico de regeneración *in vitro* para nudos cotiledonales de la variedad CENTA Sequia de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).

PROTOCOLO DE REGENERACIÓN *IN VITRO* VÍA ORGANOGÉNESIS INDIRECTA PARA NUDOS COTILEDONALES DE FRIJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris* L.) VARIEDAD CENTA SEQUÍA.

1. Desinfección de semillas

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

Descarte el alcohol y continúe con la desinfección con solución de NaOCl al 3.5% adicionada con tres gotas de Tween 20 por cada 100 ml de agua.

Agite por 15 minutos.

Haga tres lavados con agua destilada estéril o los que sean necesarios 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 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, 1 mg.L⁻¹ de BAP, 30 g.L⁻¹ sacarosa y 3 g.L⁻¹ agar, no más de 10 semillas por frasco.

Déjelas germinar a 25 ± 1 C° en absoluta oscuridad durante siete días.

3. Disección de nudos cotiledonales

Transcurridos siete días de germinación con la ayuda de pinzas y bisturí estériles en cámara 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 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, 0.2 mg.L⁻¹ de Tidiazurón (TDZ), 0.05 mg.L⁻¹ de Ácido Indol acético (AIA), 30 g.L⁻¹ de sacarosa y 8 g.L⁻¹ de agar.

Mantenga durante 14 días (siete en oscuridad y siete en condiciones de fotoperiodo 16 horas luz / 8 horas oscuridad a 25±1°C y 58 µmol/m²/s).

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

Transfiera los explantes al MIB con P 5.7 y compuesto por MS adicionado con 0 mg.L⁻¹ de BAP, 2.25 mg.L⁻¹ de BAP y 6.75 mg.L⁻¹ de BAP.

Mantenga en condiciones de fotoperiodo 16 horas luz / 8 horas oscuridad a 25±1°C y 58 µmol/m²/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, número de raíces y porcentaje de eficiencia.

5. Discusión

La regeneración *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* L, aun cuando ha sido descrita con cierto grado de éxito en los últimos años, es todavía un proceso difícil y de baja eficiencia (Gatica *et al.* 2010). Al respecto, se conoce que existen muchos factores que intervienen en la organogénesis de esta especie, entre los cuales se citan los siguientes: el genotipo (Collado *et al.* 2013), tipo de nutrientes en el medio (Hnatuzko-konka *et al.* 2019), tipos de explantes (Iglesias *et al.* 2018; Hnatuzko-konka *et al.* 2019; Collado *et al.* 2013), edad de la semilla (Collado *et al.* 2013) y agentes antioxidantes (Hnatuzko-konka *et al.* 2019; Cruz de Carvalho *et al.* 2000)

En la presente investigación se evaluaron tres tipos de explantes (ejes embrionarios, nudos cotiledonales y meristemos) y diferentes concentraciones de BAP mediante la vía de regeneración de organogénesis directa.

Organogénesis mediante ejes embrionarios como explantes

En general, *Phaseolus vulgaris* L. es considerado como recalcitrante a la regeneración *in vitro* (Delgado-Sánchez *et al.* 2006; Mohamed *et al.* 2006; Kwapata *et al.* 2010). Veltcheva (2005) menciona que los cultivares de frijol domesticados son recalcitrantes al tener menos potencial de regeneración, en comparación con los materiales silvestres. En esta investigación la recalcitrancia del frijol común fue evidenciada por medio de la baja respuesta morfogénica de la variedad CENTA Sequía, a partir de la utilización de ejes embrionarios como explantes. Con especies de *Phaseolus* tales como *P. acutifolius*, *P. coccineus*, *P. polyanthus*, el cual es un frijol menos domesticado se ha logrado regenerar plantas enteras, en contraste con *Phaseolus vulgaris* L. donde la mayor respuesta ha sido la producción de brotes (Delgado-Sánchez *et al.* 2006).

Comúnmente, *Phaseolus vulgaris* L. ha sido cultivado *in vitro* mediante la utilización de ejes embrionarios como explantes (Gatica *et al.*, 2010), (Iglesias *et al.* 2018). Por ejemplo, Gatica *et al.* (2010) desarrollaron un protocolo de regeneración *in vitro* en cinco variedades de *Phaseolus vulgaris* L. costarricenses, en un medio MS (Murashige y Skoog 1962) adicionado con BAP y sulfato de adenina (AS). El medio de cultivo con 5 mg.L⁻¹ BAP y la dosis con 20 ó 40 mg.L⁻¹ AS fueron las combinaciones reportadas con el promedio más alto de formación de brotes (0.66 a 0.56 brotes por explante). En la presente investigación la variedad CENTA Sequía produjo los mejores resultados con la dosis de 1 mg.L⁻¹ de BAP (aproximadamente un brote por explante), aun en la ausencia de AS que no fue estudiada

en esta investigación. Cabe resaltar que no se desarrollaron brotes de *novο* en los tratamientos sin BAP, lo que sugiere que el BAP es esencial para el desarrollo de los brotes de *novο* (Gatica *et al.* 2010).

La composición del medio es otro factor que influye en la regeneración *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* L. (Gatica *et al.* 2010). Aun cuando el medio MS (Murashige y Skoog 1962) no produce las mejores eficiencias de regeneración en *Phaseolus vulgaris* L.; es todavía el medio más utilizado para la regeneración *in vitro* de esta especie. (Gatica *et al.* 2010; Kwapata *et al.* 2010; Hnatuzko-konka *et al.* 2019; Collado *et al.* 2013). En la presente investigación se demostró que un medio compuesto por las sales minerales de MS suplementado con diferentes concentraciones de BAP produjo respuestas morfogénicas diferentes en cuanto al número de brotes, número de raíces y número de hojas. Kwapata *et al.* (2010) desarrollaron un protocolo eficiente de para la regeneración *in vitro* de múltiples brotes a partir de ejes embrionarios de 10 variedades de frijol común. Estos investigadores usaron 63 formulaciones de medios que consistieron en las combinaciones de citoquininas (BAP y TDZ) con auxinas (ácido naftalenacético (ANA) y AIA). La regeneración de múltiples brotes, se obtuvo en un medio MS con la combinación de 2.5 mg.L⁻¹ BAP y 0.1 mg.L⁻¹ AIA. Estos resultados son similares a los encontrados en esta investigación donde los mejores resultados se obtuvieron con la dosis de 1 mg.L⁻¹ de BAP con 0.99 brotes por explante.

La formación de hojas fue otra respuesta morfogénica observada en esta investigación. Esta variable mostró diferencias significativas con la dosis de 1 mg.L⁻¹ de BAP como la mejor al producir un promedio de 3.61 hojas por explante. Por otro lado, la regeneración de raíces se vio afectada en presencia de este regulador de crecimiento. En este sentido, Delgado-Sanchez *et al.* (2006) reportaron que la ausencia o bajas concentraciones de BAP solo inducen a la formación de raíces y el alargamiento del tallo.

Así mismo, en la presente investigación se pudo demostrar el efecto de la composición del medio, donde se obtuvo una eficiencia de regeneración con un rango de 88-99%. Quintero Jiménez *et al.* (2010) regeneraron plantas de cuatro cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. a partir de ejes embrionarios cultivados en un medio de Gamborg (Gamborg *et al.* 1968) con 10 mg L⁻¹ BAP y obtuvieron eficiencias de regeneración muy buenas, pero la mejor fue en el cultivar Apetito G13637 con un rango de eficiencia del 98-100%. Estos resultados son comparables con la eficiencia de regeneración de la variedad CENTA Sequía aun cuando el medio nutritivo que se utilizó fue el descrito por Murashige y Skoog (1962).

Organogénesis mediante nudos cotiledonales y meristemos como explantes

La utilización de ejes embrionarios, no ha sido la única forma de regeneración *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* (Mohamed *et al.*, 1993; Zambre *et al.*, 1998; Arellano *et al.*, 2009). Algunos autores han descrito la inducción de callo morfogénico a partir de explantes de nudos cotiledonales (García *et al.* 2006; Arellano *et al.* 2009; Collado *et al.* 2013) y meristemos (Arellano *et al.* 2009; Collado *et al.* 2013).

En esta investigación se buscó inicialmente desarrollar la vía de organogénesis indirecta a partir de los nudos cotiledonales y meristemos de la variedad CENTA Sequía. Sin embargo, se encontró que en la estrategia experimental se obtuvieron respuestas morfogénicas características de la organogénesis directa (formación directa de brotes a partir de los explantes). Los nudos cotiledonales y meristemos se precultivaron en Tidiazurón (TDZ) y Acido Indol Acético (AIA), como descrito en Collado *et al.* (2013) y se encontró que a partir de nudos cotiledonales la dosis que produjo el mayor número de brotes, en ausencia de formación de callos fue la de 2.25 mg.L⁻¹ de BAP. Estos resultados difieren a lo reportado por Collado *et al.* (2013) donde describen que la proliferación de callos de diferentes cultivares se obtuvo solo cuando los explantes se precultivaron en un medio con TDZ y AIA.

En la presente investigación, los resultados indican que la combinación TDZ / IAA no benefició a la inducción de callos, pero si a la proliferación de múltiples brotes. Esta respuesta ha sido previamente reportada por Cruz de Carvalho *et al.* (2000), quienes mencionan que el TDZ al estar involucrado en la síntesis y/o acumulación de citoquininas en cultivos de tejidos vegetales promueven la formación de estas estructuras morfogénicas.

En el caso de los meristemos los mejores resultados se obtuvieron con la dosis de 6.75 mg.L⁻¹ de BAP con 3.57 brotes por explante. De igual forma que con los nudos cotiledonales, estos resultados no corresponden a lo previamente reportado por Collado *et al.* (2013). Sin embargo, se ha reportado que el TDZ suprime el crecimiento del meristemo apical e induce la formación de los meristemos laterales o axilares, lo que da como resultado múltiples brotes (Tzitzikas *et al.* 2004).

A partir de nudos cotiledonales se obtuvo también formación de hojas. Los mejores resultados se obtuvieron independientemente de la dosis de 2.25 y 6.75 mg.L⁻¹ de BAP. Curiosamente, en la formación de hojas a partir de meristemos, la presencia o ausencia de BAP no produjo ninguna diferencia estadística en la formación de estas. También se

observó el efecto de la ausencia de BAP en la formación de raíces a partir de meristemas con promedios de 0.07 a 3.29 raíces por explante. En el caso de los nudos cotiledonales el promedio por explante osciló entre 0.00 - 2.48 raíces por explante. De igual forma los mejores resultados se obtuvieron en los tratamientos con ausencia de BAP. Al respecto Collado menciona que la formación de raíces de estos explantes es similar a la encontrada en esta investigación con raíces de más de 3 cm de largo. (Collado *et al.* 2013).

Coelho y Benedito (2008) describieron que durante el desarrollo de la semilla de frijol común se sintetizan y almacenan auxinas, citoquininas y giberelinas en los cotiledones. Estas hormonas vegetales almacenadas en el cotiledón son una posible causa de la respuesta diferencial entre los explantes probados para la variedad CENTA Sequía y pueden, en combinación con reguladores de crecimiento exógenos agregados al medio crear un equilibrio hormonal que favorezca la formación de estructuras morfogénicas (brotes y hojas) en los explantes, principalmente nudos cotiledonales. Esta idea puede explicar parcialmente la respuesta diferencial de los nudos cotiledonales y los meristemas en su respuesta morfogénica.

En cuanto a la eficiencia de regeneración mediante estos explantes, se encontró que utilizando nudos cotiledonales se obtuvo una eficiencia del 91% con dosis de 2.25 mg.L^{-1} de BAP y utilizando meristemas como explante se obtuvo una eficiencia del 89% con dosis de 6.75 mg.L^{-1} Collado *et al.* (2013) y Cruz de Carvalho *et al.* (2000) no reportan explícitamente el porcentaje de regeneración mediante la utilización de esos explantes, sin embargo, si la eficiencia de regeneración a partir de estos explante se compara con la de los ejes embrionarios se puede mencionar que la utilización de nudos cotiledonales y meristemas es más eficiente que la utilización de meristemas en la variedad CENTA Sequía. Protocolo específico de regeneración *in vitro* para ejes embrionario de la variedad de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) CENTA Sequía.

6. Conclusiones

El comportamiento morfogénico de la variedad de frijol CENTA Sequía mediante la organogénesis directa a partir de ejes embrionarios se manifestó con la formación de hojas y brotes, pero no de raíces.

El comportamiento morfogénico de la variedad de frijol CENTA Sequía mediante la organogénesis indirecta a partir de nudos cotiledonales y meristemas no se manifestó con la formación de callo mediante un precultivo de 14 días en medios MS adicionado con 0.2 mg.L⁻¹ de Tiazurón (TDZ), 0.05 mg.L⁻¹ de Ácido Indol acético (AIA).

El medio de cultivo con 1 y 5 mg.L⁻¹ de BAP presento mejor respuesta a la regeneración *in vitro* en cuanto al número de brotes y el número de hojas en la organogénesis directa mediante ejes embrionarios.

Para los nudos cotiledonales y meristemas la adición de al menos 2.25 mg.L⁻¹ de BAP mejora la regeneración de brotes posterior a un precultivo con TDZ y AIA.

La adición de BAP al medio de cultivo no favorece a la formación de raíces en ningunos de los explantes evaluados.

El estudio permitió establecer un protocolo de regeneración *in vitro* eficiente para la variedad CENTA Sequía.

7. Recomendaciones

La dosis de 2.25 mg.L^{-1} de BAP en la vía de regeneración por organogénesis indirecta (Nudos cotiledonales), ya que este método tiene mejor eficiencia en la formación de brotes.

No utilizar en un precultivo TDZ y AIA para la formación de callo embriogénico a partir de meristemas y nudos cotiledonales en la variedad CENTA sequía debido a que esto genera únicamente múltiples brotes.

Evaluar otros reguladores de crecimiento a diferentes concentraciones para conocer la respuesta a la formación de brotes, hojas y raíces en la variedad CENTA sequía.

Utilizar los protocolos de regeneración *in vitro* formulados en esta investigación, para los diferentes explantes de frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*) de la variedad CENTA sequía.

8. Bibliografía

- Albarracín Acosta, CP. 2012. Evaluación de la eficiencia de un sistema de inmersión temporal frente al método de propagación convencional en la multiplicación *in vitro* de cilantro cimarrón (*Eryngium foetidum*) a partir de hojas, yemas y segmentos nodales. Tesis Ing. Biotecnología. Sangolquí, EC, 203 p.
- Alcántara Cortes JS; Acero Godoy J; Alcántara Cortés JD; Sánchez Mora RM. 2019. Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. En línea. Consultado 11 de jun 2021. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v17n32/1794-2470-nova-17-32-109.pdf>
- Apezzato, B. y Machado, S.R. Ultrastructural analysis of *in vitro* direct and indirect organogenesis. Revista Brasil. Bot. 2004, vol. 27, no. 3, p. 429-437.
- Arellano, J; Fuentes, S; Castillo España, P; Hernández, G. 2009. Regeneration of different cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) via indirect organogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 96(1):11-18.
- Beebe. S. E. Rao. I. M. Blair. M. W. & Acosta Gallegos JA. (2013). Phenotyping common beans for adaptation to drought. Font Physiol, 4, 1-20. doi:10.3389/fphys.2013.00035.
- Benítez, DE. 2006. Vitaminas y oxidorreductores antioxidantes: defensa ante el estrés oxidativo. Revista Cubana Invest Biomed. 1-8.
- Broughton. W. J. Hernández. G. Blair. M. Beebe. S. Gepts. P. & Vanderleyden. J. 2003. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. Plant Soil, 252(1), 55-128. doi:10.1023/A:1024146710611
- CENTA (Centro Nacional de Tecnología Agropecuario). 2018. Variedad de frijol negro brillante “CENTA sequía”. En línea. Consultado 08 feb. 2021. Disponible en <http://centa.gob.sv/docs/guias/granos%20basicos/DOCUMENTO%20T%C3%89CNICO%20CENTA%20SEQUIA.pdf>
- CENTA (Centro Nacional de Tecnología Agropecuario). 2019. CULTIVO DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.). En línea. Consultado 11 de jun 2021. Disponible en: http://centa.gob.sv/docs/guias/granos%20basicos/Guia%20Centa_Frijol%202019.pdf

- CENTA (Centro Nacional de Tecnología Agropecuario). 2008. Guía Técnica para el Manejo de Variedades de Frijol: Programa de granos básicos. En línea. Consultado 6 feb. 2021. Disponible en <http://www.centa.gob.sv/docs/guias/granos%20basicos/Guia%20Tecnica%20Frijol.pdf>
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1986. Etapas de desarrollo de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). En línea. Consultado 08 feb. 2021. Disponible en http://ciat-library.ciat.cgiar.org/ciat_digital/ciat/28093.pdf
- Coelho CMM, Benedito VA. 2008. Seed development and reserve compound accumulation in Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Seed Sci. Biotechnol.* 2: 42-52
- Collado, R; Veitía, N; Bermúdez-Caraballosa, I; García, L; Torres, D; Romero, C; Lorenzo, J; Angenon, G. 2013. Efficient *in vitro* plant regeneration via indirect organogenesis for different common bean cultivars. *Scientia Horticulturae* 153:109-116
- Cruz de Carvalho, MH, Van Le B, Zuily-Fodil Y, Pham Thi AT, Tran Thanh Van K (2000) Efficient whole plant regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using thin-cell-layer culture and silver nitrate. *Plant Sci* 159: 223–232
- Delgado Sánchez, P, Saucedo Ruiz M, Guzmán Maldonado SH, Villordo Pineda E, González Chavira M, Fraire Velázquez S, Acosta Gallegos JA, Mora Aviles A. 2006. An organogenic plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris* L). *Plant Science* 170:822_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, IT). 2005. Efectos de los desastres en la agricultura (diapositivas). En línea. Consultado 6 feb. 2021. Disponible en <http://www.acqweather.com/FAO%20EFECTOS%20DE%20LOS%20DESASTRES.pdf>
- 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.

- 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.
- Gatica Arias, AM; Muñoz Valverde, J; Ramírez Fonseca, P; Valdez Melara, M. 2010. *In vitro* plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris*): effect of N6-benzylaminopurine and adenine sulphate. *Electronic Journal of Biotechnology* 13(1):6-7.
- George EF, Hall MA, Klerk GJ De. *Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors*. In: *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*. 2008. p. 1–501.
- Gómez Posada, S. 2007. Fitomejoramiento (en línea). Pereira, CO. Consultado 1 feb. 2015. Disponible en http://datateca.unad.edu.co/contenidos/30162/Curso_de_Fitomejoramiento/protocolo.html
- 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.
- Iglesias, D. Collado, R. Ruiz, L. Torres, D. 2018. Tecnología vegetal. Comparación de tres explantes para la regeneración vía organogénesis indirecta de *Phaseolus vulgaris* L. En línea. Consultado: 26 abr. 2022. Disponible en: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/582/html>
- Kwapata, K, Sabzikar R, Sticklen MB, Kelly JD. 2010. *In vitro* regeneration and morphogenesis studies in common bean. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 100: 97_105
- León, J. 2000. Botánica de los cultivos tropicales. En línea. Consultado 6 feb. 2021. Disponible en <https://books.google.com.sv/books?id=NBtu79LJ4h4C&pg=PA191&lpg=PA191&dq=ramificacion+del+frijol&source=bl&ots=ebAMpYrSE&sig=JRMI1BgiqYI7GNmDb>

[7NvNI0hAgA&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwju6laOzPLLAhUCHB4KHxfOBSUQ6AEIGjAA#v=onepage&q=amificacion%20del%20frijol&f=false](https://www.researchgate.net/publication/271104046/Differential_adaptation_of_two_varieties_of_common_bean_to_abiotic_stress_I_Effects_of_drought_on_yield_and_photosynthesis)

- 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.
- Mohamed, M, Read P, Coyne D. 1993. El preacondicionamiento oscuro, CPPU y tidiazurón promueven la organogénesis de los brotes en explantes de nodos de plántulas de habas y habas. *Sociedad Estadounidense de Ciencias Hortícolas* 117 (4): 668 – 672
- Mohamed, S, Sung JM, Jeng TL, Wang CS. 2006. Organogenesis of *Phaseolus angularis* L.: high efficiency of adventitious shoot regeneration from etiolated seedlings in the presence of N6- benzylaminopurine and thidiazuron. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 86 (2): 187-199
- 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, Toshio y SKOOG, Folke. Un medio revisado para un crecimiento rápido y bioensayos con cultivos de tejido de tabaco. *Physiologia Plantarum*, 1962, no. 15, pág. 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.
- Parsons, D. B. 1999. Fríjol y chícharo. 2º edición. México, trillas s,a de c,v.
- 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.
- Rosales-Serna. R. Ramírez-Vallejo. P. Acosta Gallegos JA. Castillo-González. F. & Kelly. J. D. 2000. Grain yield and drought tolerance of common bean under field conditions. *Agrociencia*, 34(2), 153-165.

- Rosas, JC. 2003. El cultivo de frijol común en América Tropical. Escuela Agrícola Panamericana/Zamorano. Honduras.
- Solís-Ramos, L; González-Estrada, T; Nahuath-Dzib, S; Zapata-Rodriguez, L; Castaño, E. 2009. Overexpression of WUSCHEL in *C. chinense* causes ectopic morphogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 96(3):279-287.
- Tapia, H.; Camacho, A 1988. Manejo integrado de la producción de frijol basado en labranza cero. Editorial GTZ. Managua, Nicaragua. p. 181.
- Tzitzikas, E., M. Bergervoet, K. Raemakers, J. Vincken, A. Lammeren y R. Visser. 2004. Regeneration of pea (*Pisum sativum* L.) by a cyclic organogenic system. *Plant Cell Reports* 23, 453-460.
- Ulloa, JA; Ulloa, PR; Ramírez, JC; Ulloa, BE. 2011. El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. En línea. Consultado 6 feb. 2021. Disponible en <http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-08/1.pdf>
- Veltcheva, M, Svetleva, D. Regeneración *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* L. mediante organogénesis a partir de explantes de pecíolos. *Journal Central European Agriculture*, abril de 2005, vol. 6, no. 1, pág. 53-58.
- 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.
- White. J. W. Ochoa. R. M. Ibarra. F. P. & Singh. S. P. 2009. Inheritance of seed yield, maturity and seed weight of common bean (*Phaseolus vulgaris*) under semi-arid rainfed conditions. *J Agr Sci*, 122(02), 265. doi:10.1017/S0021859600087451.
- 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.

9. Anexos

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

Variables	Dosis de BAP	Promedio	Error estándar
Numero de brotes	0.00	0.00	0.00 (b)
	1.00	0.99	0.06 (a)
	5.00	0.88	0.04 (a)
Numero de hojas	0.00	1.03	0.06 (b)
	1.00	3.61	0.32 (a)
	5.00	2.81	0.29 (a)
Numero de raíces	0.00	4.43	0.34 (a)
	1.00	0.15	0.10 (b)
	5.00	0.00	0.00 (b)
Eficiencia a la regeneración <i>in vitro</i> (%)	0.00	0	
	1.00	99	
	5.00	88	

¹Las 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 las variables número de brotes, número de hojas, número de raíces y eficiencia (%) a partir de ejes embrionarios por organogénesis directa.

Variable	CME	CV	R ²	Nivel de significancia para tratamientos
Número de brotes	0.01	7.72	0.90	0.0001
Número de hojas	1.04	49.60	0.37	0.0001
Número de raíces	0.05	17.45	0.92	0.0001
Eficiencia (%)	1.66	30.92	0.85	0.0001

CME: Coeficiente medio del error.

CV: Coeficiente de variación.

R²: Coeficiente de determinación.

Cuadro A-3. 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 (*Phaseolus vulgaris*) variedad CENTA Sequía.

Variab les	Dosis de BAP	Promedio	Error estándar
Numero de brotes	0.00	0.00	0.00 b
	2.25	2.65	0.12 a
	6.75	3.57	0.33 a
Numero de hojas	0.00	2.73	0.47 a
	2.25	3.27	0.40 a
	6.75	2.15	0.22 a
Numero de raíces	0.00	3.19	0.18 a
	2.25	0.13	0.09 b
	6.75	0.07	0.06 b
Eficiencia a la regeneración <i>in vitro</i> (%)	0.00	0	
	2.25	66	
	6.75	89	

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

Cuadro A-4. Resumen de análisis de varianza para las variables número de brotes, numero de hojas, numero de raíces y eficiencia (%) a partir de meristemos por organogénesis indirecta.

Variable	CME	CV	R²	Nivel de significancia para tratamientos
Número de brotes	0.05	14.28	0.88	0.0001
Número de hojas	0.17	24.03	0.08	0.1895
Número de raíces	0.03	14.57	0.92	0.0001
Eficiencia (%)	1.87	39.55	0.77	0.0001

CME: Coeficiente medio del error.

CV: Coeficiente de variación.

R²: 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*) variedad CENTA Sequía.

Variables	Dosis de BAP	Promedio	Error estándar
Numero de brotes	0.00	0.29	0.13 b
	2.25	3.64	0.31 a
	6.75	2.86	0.16 a
Numero de hojas	0.00	3.02	0.23 b
	2.25	9.31	0.41 a
	6.75	8.33	0.31 a
Numero de raíces	0.00	2.48	0.25 a
	2.25	0.15	0.02 b
	6.75	0.00	0.00 b
Eficiencia a la regeneración <i>in vitro</i> (%)	0.00	7	
	2.25	91	
	6.75	72	

¹Las 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 las variables número de brotes, numero de hojas, numero de raíces y eficiencia (%) a partir de nudos cotiledonales por organogénesis indirecta.

Variable	CME	CV	R²	Nivel de significancia para tratamientos
Número de brotes	0.06	15.20	0.83	0.0001
Número de hojas	0.06	8.94	0.86	0.0001
Número de raíces	0.01	9.55	0.97	0.0001
Eficiencia (%)	2.10	38.46	0.73	0.0001

CME: Coeficiente medio del error.

CV: Coeficiente de variación.

R²: Coeficiente de determinación.

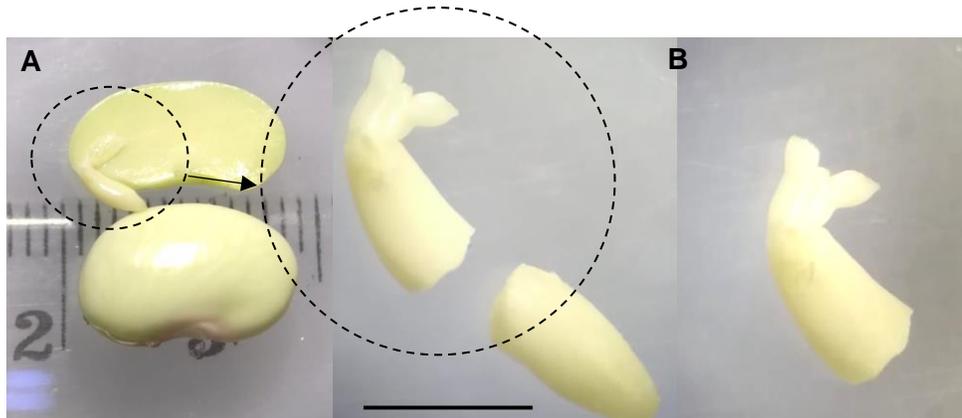


Figura A-1. Disección de ejes embrionarios **(A)** Embrión cigótico. **(B)** Eje embrionario disectado. (vista en estereoscopio). Barras = 0.5 cm.

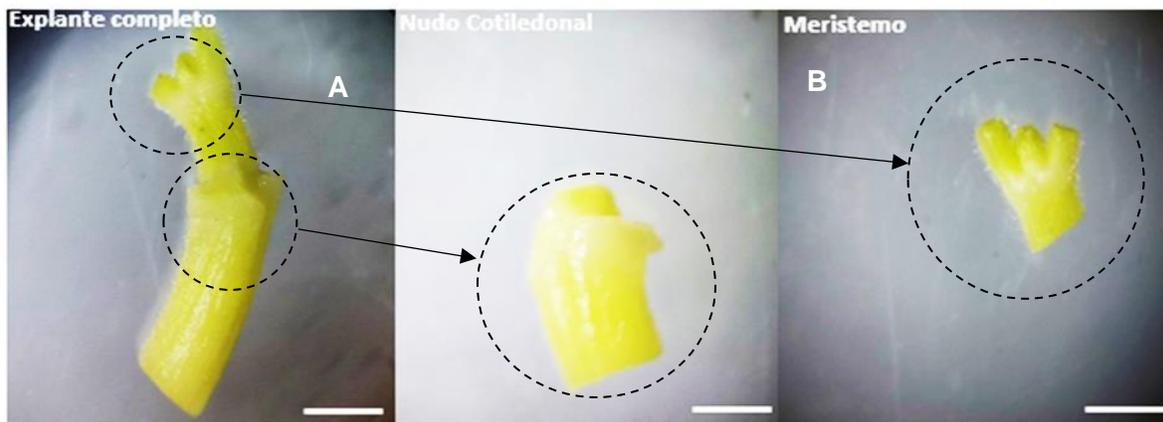


Figura A-2. Disección de explantes. **(A)** Embrión cigótico de *Phaseolus vulgaris* L. de siete días de germinación *in vitro*. **(B)** Nudo cotiledonal disectado. **(C)** Meristemos separado del nudo cotiledonal. Barras = 0.5cm.



Figura A-3. Organogénesis directa a partir de ejes embrionarios de la variedad CENTA sequía de *P. vulgaris* L. a los 42 días de cultivo *in vitro* **(A)** Respuesta morfogénica con 0 mg.L^{-1} de BAP se observó una producción de raíces y hojas en cada explante, sin embargo, no se logró regenerar ningún brote. **(B)** Desarrollo de brotes en medio con 1 mg.L^{-1} de BAP. **(C)** Explantes cultivados con 5 mg.L^{-1} de BAP se obtuvo respuesta favorable a la producción de brotes y hojas. Barras = 1cm.

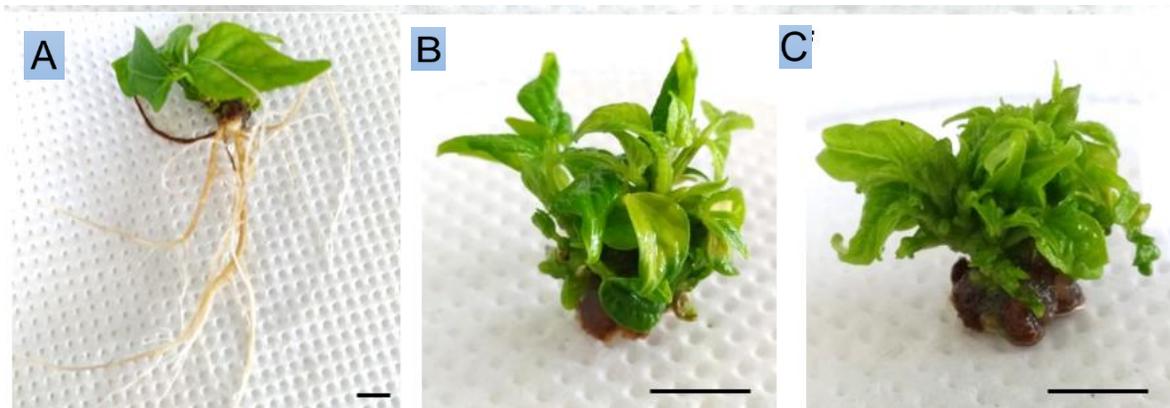


Figura A-4. Regeneración *in vitro* de *P. vulgaris* L. Organogénesis indirecta variedad CENTA Sequía obtenidos de nudos cotiledonales a los 28 días. **(A)** Variedad CENTA Sequía suplementada con 0 mg.L^{-1} de BAP, con producción de raíces y hojas, sin embargo, no se logró regenerar ningún brote. **(B)** Variedad CENTA Sequía suplementada con 2.25 mg.L^{-1} de BAP, se evidenció respuesta favorable a la regeneración de brotes y hojas. **(C)** Variedad CENTA Sequía suplementada con 6.75 mg.L^{-1} de BAP, con respuesta favorable a la producción de brotes. Barras = 1cm.



Figura A-5. Organogénesis indirecta variedad CENTA Sequía obtenidos de meristemos a los 28 días de haber concluido el ensayo. **(A)** producción de raíces y hojas en ausencia de BAP, sin embargo, no se logró regenerar ningún brote. **(B)** respuesta favorable a la regeneración de brotes y hojas con 2.25 mg.L^{-1} de BAP **(C)** formación de brotes y hojas con la concentración de 6.75 mg.L^{-1} de BAP Barras = 0.5cm.



Figura A-6. Acclimatización

Figura A-6. Acclimatización a los 48 días.