

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

Código: AI-2214

**NOMBRE DE LA INVESTIGACIÓN**

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.

**TITULO A OBTENER: INGENIERA AGRONOMO**

**AUTORES**

<b>Nombres, apellidos</b>	<b>Institución y dirección</b>	<b>Teléfono y E-mail</b>	<b>Firma</b>
Br. Linda Katherine Cativo Parada	Comunidad el cacao #1, calle antigua a Soyapango km. 4	7560-5629 Cp14057es.edu.sv	
Ing. Agr. M.Sc. Julio Cesar Ortiz Pavón	Universidad de El Salvador Departamento de Fitotecnia	61896961 julio.ortiz@ues.edu.sv	
Ing. Agr. Oscar Alonso Rodríguez Gracias	Universidad de El Salvador Departamento de Fitotecnia	77731325 oscar.gracias@ues.edu .sv	

**Visto bueno:**

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

Ing. Agr. Mario Alfredo Pérez Ascencio

Firma \_\_\_\_\_

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

Ing. Agr. Enrique Alonso Alas García

Firma \_\_\_\_\_

**Jefe del Departamento de Fitotecnia.**

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

Firma \_\_\_\_\_

Sello:

**Lugar y fecha:** Ciudad Universitaria, 21 de noviembre de 2022.

Organogénesis directa e indirecta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) a partir de ejes embrionarios, nudos cotiledonales y meristemos. Cativo-Parada, LK<sup>1</sup>; Ortiz-Pavón, JC<sup>2</sup>; Rodríguez-Gracias, OA<sup>2</sup>. 2 Docentes directores. Universidad de El Salvador, Departamento de Fitotecnia.

## Resumen

Se establecieron protocolos para la regeneración *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad CENTA Sequía, mediante la evaluación de la organogénesis directa e indirecta con diferentes concentraciones de Bencilaminopurina (BAP). En ambos métodos se evaluaron el número de brotes, hojas, raíces y la eficiencia de regeneración. Para la organogénesis directa se cultivaron ejes embrionarios en el medio Murashige y Skoog (1962) (MS) suplementado con BAP (0,1 y 5 mg.L<sup>-1</sup>). Se observó que la dosis 1 mg.L<sup>-1</sup> 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 Tidiazurón (TDZ) y Ácido indolacético (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<sup>-1</sup>). No se lograron regenerar estructuras calogénicas con el precultivo en ambos explantes, sin embargo, se obtuvo formación de múltiples brotes 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 reguladores del crecimiento en el medio de cultivo influyen en la regeneración del frijol común, y confirma la recalcitrancia de esta especie al cultivo *in vitro*. Se observó formación de hojas y raíces. Este informe describe un sistema eficiente de regeneración de frijol común de la variedad CENTA Sequía a través de la organogénesis, que puede servir de referencia para su posterior utilización en programas de mejoramiento apoyados con herramientas biotecnológicas.

**Palabras clave:** Frijol común, cultivo *in vitro*, organogénesis directa, organogénesis indirecta, Bencilaminopurina.

## Abstract.

Appropriate protocols for the *in vitro* regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) variety CENTA Sequía were established, by evaluating direct and indirect organogenesis with different concentrations of Bencilaminopurine (BAP). In both methods, the number of shoots, leaves, roots and regeneration efficiency were evaluated. For direct organogenesis, embryonic axes were cultured in Murashige and Skoog (1962) (MS) medium supplemented with BAP (0.1 and 5

mg.L<sup>-1</sup>). It was found that the 1 mg.L<sup>-1</sup> dose of BAP presented the highest number of shoots per explant (0.99). For indirect organogenesis, cotyledonal nodes and meristems of the aforementioned variety were precultured for 14 days in Thidiazuron (TDZ) and Indoleacetic Acid (IAA). They were then transferred to the shoot induction and regeneration medium (MIB), which consisted of MS sales added with BAP (0, 2.25 and 6.75 mg.L<sup>-1</sup>). It was not possible to regenerate callogenic structures with the preculture in both explants, however, the formation of multiple shoots was obtained and it was concluded that the cotyledonal nodes respond more efficiently than the meristems of the same varieties. This provides evidence on how growth regulators in the culture medium influence common bean regeneration, and confirms the recalcitrance of this species to in vitro culture. The formation of leaves and roots was discovered. This report describes an efficient system for the regeneration of common bean of the CENTA Sequia variety through organogenesis, which can serve as a reference for its subsequent use in breeding programs supported by biotechnological tools.

**Keywords:** Common bean, in vitro culture, direct organogenesis, indirect organogenesis, Bencilaminopurine.

## 1. Introducción

*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).

Actualmente, 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).

Collado *et al.* (2013) lograron vía organogénesis indirecta regenerar brotes (3 brotes por callo) y eventualmente plantas fértiles al utilizar callos en medios suplementados con 2,25 ó 4,50 mg.L<sup>-1</sup>

de N6-benzilaminipurina. Nudos cotiledonales con uno o dos cotiledones de semillas de 4 meses de madurez resultaron óptimos para la inducción de callos en medios adicionados con 0,04 mg.L<sup>-1</sup> de Tidiazurón.

Gatica-Arias *et al.* (2010) desarrollaron un método de regeneración directa de cinco cultivares costarricenses. Este método utilizó como explantes ejes embrionarios y requirió la adición de N6-benzilaminipurina y sulfato de adenina al medio de regeneración, Resultados parecidos obtuvieron Quintero-Jiménez *et al.* (2010) al optimizar también el medio de regeneración.

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* a partir de tres tipos de explantes (ejes embrionarios, nudos cotiledonales y meristemas). El presente estudio buscó desarrollar nuevas metodologías biotecnológicas que sirvan de instrumentos en investigaciones futuras para mejorar genéticamente variedades de interés nacional como lo es CENTA sequía.

## **2. Materiales y métodos**

### **2.1. 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.

### **2.2. 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).

### **2.3. Metodología de laboratorio**

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

Las semillas se desinfectaron superficialmente en una cámara de flujo laminar. 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.

Para los nudos cotiledonales y meristemas, 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<sup>-1</sup> de tiamina, 1.13 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, 30 g.L<sup>-1</sup> sacarosa y 3 g.L<sup>-1</sup> 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.

### **2.3.2. Inducción y regeneración de brotes**

Los ejes embrionarios se cultivaron 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<sup>-1</sup> de mioinositol, 1 mg.L<sup>-1</sup> de tiamina, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa y 8 g.L<sup>-1</sup> de agar. Los tratamientos consistieron en medios de cultivo con tres diferentes dosis de Bencilaminopurina (BAP): 0, 1 y 5 mg.L<sup>-1</sup> (Gatica *et al.* 2010). El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.7 con HCl o NaOH antes de esterilizarlo en autoclave durante 21 min a 121°C y 1,070 g.cm<sup>-1</sup>.

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

Trascurridos los 7 días de germinación, los nudos cotiledonales y meristemas se disectaron y cultivaron en placas Petri 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<sup>-1</sup> de mioinositol, 0.1 mg.L<sup>-1</sup> de tiamina, 0.5 mg.L<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 0.5 mg.L<sup>-1</sup> de piridoxina, 2 mg.L<sup>-1</sup> de glicina, 0.2 mg.L<sup>-1</sup> de Tiazurón (TDZ), 0.05 mg.L<sup>-1</sup> de Ácido indolacético (AIA), 30 mg.L<sup>-1</sup> de sacarosa y 8 g.L<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup>.

Trascurrido 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<sup>-1</sup>. 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.

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

### **2.3.3. Evaluación de la respuesta morfogénica**

La evaluación de la respuesta a la regeneración *in vitro* se evaluó para cada variedad de frijol mediante los siguientes indicadores: número de brotes, hojas y raíces. Adicionalmente se calculó la eficiencia de regeneración a través de la formula descrita por Gatica *et al.* (2010): [(número de ejes embrionarios, nudos o meristemas con brotes de novo /total de número de ejes embrionarios, nudos o meristemas) x 100]. La respuesta morfogénica fue evaluada a los 28 días de iniciado el ensayo con los nudos y meristemas y a los 42 días en los ejes embrionarios.

### **2.3.4. Análisis estadístico**

Se aplicó el Análisis de Varianza (ANVA) a cada una de las variables en estudio, bajo un Diseño Completamente al Azar (DCA). Para 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 con un nivel de significancia estadística (alfa)  $\alpha$  del 1% = 0.01. Se utilizaron hojas de cálculo de Microsoft Excel® y los programas estadísticos SPSS® 25 e Infostat® 2020 para el análisis respectivo. La variable independiente fue los medios de cultivo y la variable dependiente fue la respuesta morfogénica.

## **3. Resultados**

### **Efecto de la concentración de BAP y el tipo de explante sobre el número promedio de brotes, raíces y hojas inducidos a partir de ejes embrionarios, nudos cotiledonales y meristemas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)**

La utilización de BAP en el medio de cultivo permite en los ejes embrionarios regenerar estructuras morfológicas como brotes y hojas. (Figura 1) (Cuadro 1). Al comparar los resultados, se observaron diferencias altamente significativas en las tres variables morfológicas evaluadas.

En el caso de los brotes y las hojas la dosis con mejor respuesta fue la de 1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, el mayor número de raíces se obtuvo en el medio de inducción con ausencia de BAP.



Figura 1. Regeneración morfológica a partir de ejes embrionarios, nudos cotiledonales y meristemos de *Phaseolus vulgaris* L. **(A)** Ejes embrionarios, **(B)** Nudos cotiledonales **(C)** Meristemos respectivamente utilizados como explantes en diferentes concentraciones de BAP. **(D)** y **(E)** Precultivo con TDZ y AIA por 14 días para meristemos y nudos cotiledonales. **(F)** y **(G)**. Formación de hojas y tallos en meristemos y nudo cotiledonales después de 28 días en medio de inducción. **(H)**, **(I)** y **(J)** Planta de frijol desarrollada a partir de ejes embrionarios, nudos cotiledonales y meristemos respectivamente.

Cuadro 1. Efecto de la concentración de BAP sobre el número promedio de brotes, hojas y raíces inducidas a partir de ejes embrionarios de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) independientemente del genotipo.

Tratamientos	Variables morfológicas		
	BAP (mg.L <sup>-1</sup> )	Brotes <sup>1</sup>	Hojas <sup>1</sup>
0	0.00±0.00 <sup>2</sup> (b)	1.03±0.06 (b)	4.43±0.34 (a)
1	0.99±0.06 (a)	3.61±0.32 (a)	0.15±0.10 (b)
5	0.88±0.04 (a)	2.81±0.29 (a)	0.00±0.00 (b)

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

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

De igual forma, en nudos cotiledonales y meristemas, el mayor número promedio de raíces por explante se obtuvo en el medio de inducción sin BAP. La dosis de 2.25 mg.L<sup>-1</sup> de BAP resultó en el mayor número de brotes (3.61) y hojas (9.31) en nudos cotiledonales.

En meristemas la dosis con mejores resultados para número de brotes fue la de 6.75 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, para número de hojas fue la dosis de 2.25 mg.L<sup>-1</sup> (Cuadro 2).

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

Explantos	Tratamientos	Variables morfológicas		
		BAP (mg.L <sup>-1</sup> )	Brotes <sup>1</sup>	Hojas <sup>1</sup>
Nudos cotiledonales	0	0.29±0.13(b)	3.02±0.23(b)	2.48±0.25(a)
	2.25	3.64±0.31(a)	9.31±0.41(a)	0.15±0.02(b)
	6.75	2.86±0.16(a)	8.33±0.31(a)	0.00±0.00(b)
Meristemas	0	0.00±0.00(b)	2.73±0.47(a)	3.19±0.18(a)
	2.25	2.65±0.12(a)	3.27±0.40(a)	0.13±0.09(b)
	6.75	3.57±0.33(a)	2.15±0.22(a)	0.07±0.06(b)

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

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



Para ejes embrionarios, el medio de inducción suplementado con 1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP produjo el mayor número promedio de brotes. A diferencia de las dosis con ausencia de BAP donde no se observaron brotes en el medio de inducción. Es importante destacar que las hojas y raíces desarrolladas con 0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP corresponden a los ejes embrionarios germinados y no brotes desarrollados. El Cuadro 3 muestra el efecto del BAP sobre el número promedio de brotes inducidos a partir de ejes embrionarios de la variedad CENTA Sequía de *Phaseolus vulgaris* L en medio de inducción suplementado con diferentes dosis de BAP. En la variedad evaluada no se indujeron yemas organogénicas con la concentración de 0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Pero la adición de esta citoquinina al medio de inducción mejoró la formación de brotes.

Cuadro 3. Efecto de BAP sobre el número de brotes inducidos a partir de ejes embriogénicos de *Phaseolus vulgaris* L. después de 42 días de cultivo en medio de inducción suplementado con diferentes concentraciones de BAP.

<b>Brotes (Eficiencia %)</b>	
<b>Concentración de BAP (mg.L<sup>-1</sup>)<sup>1</sup></b>	<b>Variedad CENTA Sequia<sup>1</sup></b>
0	0±0.00 <sup>2</sup> b (0)
1	5.10±0.08 a (99)
5	4.51±0.57 a (88)

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

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

El mayor número promedio de brotes y el mayor porcentaje de eficiencia se obtuvo con la concentración de 1mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Los brotes se regeneraron a partir de los grupos de yemas apicales y se desarrollaron en plantas con hojas y raíces aparentemente normales hasta el día 30 de aclimatación. El Cuadro 4 muestra el efecto del BAP sobre el número de brotes inducidos a partir de nudos cotiledonales y meristemos de *Phaseolus vulgaris* L. en medio de inducción suplementado con diferentes dosis de BAP. Estos resultados fueron bastante similares en los explantes evaluados. Puesto que, en los medios con ausencia de BAP no se indujeron yemas organogénicas después de 28 días de cultivo. Mientras que la adición de BAP al medio de cultivo mejoró la formación de brotes múltiples en ambos tipos de explantes. Para nudos cotiledonales el mayor promedio de brotes se obtuvo con la concentración de 2.25 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. En cambio, al utilizar meristemos como explantes los mejores resultados se obtuvieron con la concentración de 6.75 mg.L<sup>-1</sup>. Los porcentajes de eficiencia de los medios suplementados con BAP fueron significativos en comparación a los medios con ausencia de BAP. Sin embargo, los meristemos mostraron menor eficiencia en comparación a los nudos cotiledonales.

Cuadro 4. Efecto de BAP sobre el número de brotes inducidos a partir de nudos cotiledonales y meristemos de *Phaseolus vulgaris* L. después de 28 días de cultivo en medio de inducción suplementado con diferentes concentraciones de BAP.

Brotes (Eficiencia %)		
Explantos	Concentración de BAP (mg.L <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	Variedad CENTA Sequia <sup>1</sup>
Nudos cotiledonales	0	0.12±0.09 b (7)
	2.25	3.51±0.57 a (91)
	6.75	2.43±0.23 a (72)
Meristemos	0	0.00±0.00 b (0)
	2.25	2.51±0.22 a (66)
	6.75	3.05±0.33 a (89)

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

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

#### 4. Discusión

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<sup>-1</sup> BAP y la dosis con 20 ó 40 mg.L<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> 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 novo en los tratamientos sin BAP, lo que sugiere que el BAP es esencial para el desarrollo de los brotes de novo (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<sup>-1</sup> BAP y 0.1 mg.L<sup>-1</sup> AIA. Estos resultados son similares a los encontrados en esta investigación donde los mejores resultados se obtuvieron con la dosis de 1 mg.L<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> 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* L. (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 Tiazurón (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<sup>-1</sup> 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 / AIA 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<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> 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 meristemos 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 meristemos 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<sup>-1</sup> de BAP y utilizando meristemos como explante se obtuvo una eficiencia del 89% con dosis de 6.75 mg.L<sup>-1</sup> 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 meristemos es más eficiente que la utilización de meristemos en la variedad CENTA Sequía.

## 5. 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.

En 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<sup>-1</sup> de Tiazurón (TDZ), 0.05 mg.L<sup>-1</sup> de Ácido Indol acético (AIA).

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

## 6. Recomendaciones

La cantidad de 2.25 m.L<sup>-1</sup> de BAP para la regeneración por organogénesis indirecta (nudo 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.

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.

## 7. Bibliografía

- 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.
- 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>
- 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-Caraballoso, 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
- 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>
- 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.
- 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
- 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
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.