

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS



**“Regeneración *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) variedad CENTA Costeño II, mediante organogénesis directa de semillas inmaduras y maduras.”**

**POR:**

**OSCAR STANLEY RIVERA RIVERA**

**UNIVERSIDAD UNIVERSITARIA, SEPTIEMBRE DEL 2023**

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



**“Regeneración *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) variedad CENTA Costeño II, mediante organogénesis directa de semillas inmaduras y maduras.”**

**POR:**

**OSCAR STANLEY RIVERA RIVERA**

**REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**INGENIERO AGRÓNOMO**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, SEPTIEMBRE DEL 2023**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**RECTOR**

MSc. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

**SECRETARIO GENERAL**

MSc. FRANCISCO ANTONIO ALARCÓN SANDOVAL

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**

**DECANO**

Dr. FRANCISCO LARA ASCENCIO

**SECRETARIO**

ING. AGR. BALMORE MARTÍNEZ SIERRA

**JEFE DEL DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA**

---

ING. AGR. MSc. FIDEL ÁNGEL PARADA BERRIOS

**DOCENTES DIRECTORES**

---

ING. AGR. MSc. JULIO CESAR ORTIZ PAVÓN

---

ING. AGR. OSCAR ALONSO RODRÍGUEZ GRACIAS

**COORDINADOR GENERAL DE PROCESOS DE GRADUACION**

---

ING. AGR. MARIO ALFREDO PEREZ ASCENCIO

## RESUMEN

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador, ubicada en la zona noreste del Departamento de San Salvador, en el periodo de abril a octubre del año 2022.

Se evaluaron dos estados de madurez de semillas sexuales de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L) para la regeneración *in vitro* de la variedad CENTA Costeño II. Adicionalmente, se evaluaron diferentes concentraciones de bencilaminopurina para la regeneración de estructuras organogénicas a partir de nudos cotiledonales. Se evaluaron los indicadores números de brotes, número de hojas y número de raíces y la eficiencia de regeneración. Por medio de la organogénesis directa se realizó un cultivo de frijol de semillas de 12 meses postcosecha, luego se cosecharon las vainas inmaduras de 25 días después de floración y se diseccionaron ejes embrionarios se precultivaron en medios de ms suplementados con 1 mg.l<sup>-1</sup> de BAP y AIA (Ácido Indol Acético). Luego se obtuvieron nudos cotiledonales de las plántulas y fueron transferidos al medio de inducción y regeneración de brotes (MIB), el cual consistió de las sales MS adicionadas con BAP (0, 2.25 y 6.75mg/L). Con el precultivo se obtuvo formación de brotes múltiples y se determinó que los nudos cotiledonales de semillas maduras en dosis de 6.75 mg.l<sup>-1</sup> de BAP responden de manera más eficiente que con semillas inmaduras de 25DDF a pesar que no hubo diferencia significativa en los resultados estadístico. Este informe describe una comparación en la utilización tanto de semillas maduras como inmaduras para un eficiente sistema de regeneración *in vitro* de frijol común a través de organogénesis directa, que puede servir de referencia para posteriores investigaciones de transformación genética.

**Palabras clave:** *Phaseolus vulgaris* L, cultivo *in vitro*, BAP, organogénesis directa, madurez de la semilla.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, les agradezco a mi madre Sindi Guadalupe Rivera que siempre me ha brindado su apoyo incondicional para poder cumplir todos mis objetivos personales y académicos. También es la que me han brindado el soporte material y económico para poder concentrarme en los estudios y nunca abandonarlos.

Le agradezco muy profundamente a mi tutor el Ing. Agr. M.Sc Julio Cesar Pavón por su dedicación y paciencia, sin sus palabras y correcciones precisas no hubiese podido lograr llegar a esta instancia tan anhelada.

Agradecerles a todos mis compañeros los cuales muchos de ellos se han convertido en mis amigos, cómplices y hermanos. Gracias por las horas compartidas, los trabajos realizados en conjunto y las historias vividas.

Por último, agradecer a la Facultad de Ciencias Agronómicas que me ha exigido tanto, pero al mismo tiempo me ha permitido obtener mi tan ansiado título. Agradezco a cada directivo por su trabajo y por su gestión, sin lo cual no estarían las bases ni las condiciones para aprender conocimientos

## **DEDICATORIA**

A Dios por permitirme finalizar esta etapa importante en mi vida.

También le dedico el resultado de este trabajo a toda mi familia por su apoyo completo.

A mi madre Sindi Guadalupe Rivera que me apoyo y contuvo los momentos malos y en los menos malos. Gracias por enseñarme a afrontar las dificultades sin perder nunca la cabeza ni morir en el intento.

## ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PAGINA
RESUMEN.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
DEDICATORIA.....	vi
ÍNDICE DE CUADROS .....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
INDICE DE ANEXOS.....	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	2
2.1 Generalidades del frijol común.....	2
2.2 Origen y distribución.....	2
2.3 Taxonomía .....	2
2.4 Morfología de la planta.....	2
2.5 Fenología y hábitos de crecimiento .....	3
2.6 Requerimientos climáticos y edáficos.....	4
2.7 Mejoramiento genético del cultivo.....	5
2.8 Variedad de frijol en estudio .....	6
2.8.1 CENTA Costeño II.....	6
2.9 Cultivo <i>in vitro</i> .....	7
2.10 Micropropagación .....	8
2.11 Organogénesis y sus etapas.....	8
2.12 Utilización de explantes maduros e inmaduros de leguminosas .....	8
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
3.1 Descripción del estudio.....	10
3.2 Adquisición de la semilla madura .....	10
3.3 Metodología de campo .....	10

3.4 Metodología de laboratorio.....	11
3.4.1 Semillas inmaduras.....	12
3.4.2 Semillas maduras.....	13
3.5 Metodología estadística.....	14
4. <b>RESULTADOS</b> .....	17
4.1. Efecto de la madurez de la semilla (factor A) en la regeneración <i>in vitro</i> de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	17
4.1.1. Número de brotes.....	17
4.1.2. Número de hojas.....	18
4.1.3. Número de raíces.....	18
4.1.4. Eficiencia a la generación (%).....	19
a. Efecto de los medios de cultivo suplementados con sales minerales de MS (factor B) en la regeneración <i>in vitro</i> de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) a partir de nudos cotiledonales.....	20
4.2.1. Número de brotes.....	20
4.2.2. Número de hojas.....	21
4.2.3. Número de raíces.....	22
4.2.4. Eficiencia a la generación (%).....	22
4.3. Efecto de la combinación de la madurez de la semilla (factor A) y los medios de cultivo suplementados con sales minerales de MS (factor B) en la regeneración <i>in vitro</i> de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) a partir de nudos cotiledonales.....	24
4.3.1. Número de brotes.....	24
4.3.2. Número de hojas.....	24
4.3.3. Número de raíces.....	25
4.3.4. Eficiencia a la generación (%).....	25
5. <b>DISCUSIÓN</b> .....	28

6.	<b>CONCLUSIONES</b> .....	31
7.	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	32
8.	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	33
9.	<b>ANEXOS</b> .....	39

### ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Análisis de Varianza (ANVA) con Arreglo Factorial 2x3 a utilizar en los ensayos de Evaluación de la regeneración <i>in vitro</i> de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedad CENTA Costeño II mediante la técnica de organogénesis directa con semillas maduras e inmaduras.....	15
Cuadro 2.	Medios de cultivo de MS con diferentes concentraciones de BAP, para evaluar la organogénesis indirecta en frijol común variedad CENTA Costeño II.....	16
Cuadro 3.	Medidas resumen y análisis de varianza (ANOVA) del efecto de la madurez de la semilla (factor A) en la regeneración <i>in vitro</i> de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) Var. CENTA Costeño II.....	20
Cuadro 4.	Medidas resumen y análisis de varianza (ANOVA) del efecto de las dosis de BAP (factor B) en la regeneración <i>in vitro</i> de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) a partir de nudos cotiledonales.....	23
Cuadro 5.	Medidas resumen y análisis de varianza (ANOVA) del efecto del factor A por el factor B en la regeneración <i>in vitro</i> de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) a partir de nudos cotiledonales.....	27

### ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estrategia experimental de la investigación. El diagrama incluye los pasos críticos planteados en los objetivos, así como la evaluación de los resultados de ambas edades de las semillas de frijol común.....	11
Figura 2.	Efecto de la madurez de la semilla (factor A) en la regeneración <i>in vitro</i> de brotes de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. Variedad CENTA Costeño II. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.01$ ). Las barras corresponden al error estándar.....	17
Figura 3.	Efecto de la madurez de la semilla (factor A) en la regeneración <i>in vitro</i> de hojas de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. Variedad CENTA Costeño II. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.01$ ). Las barras corresponden al error estándar.....	18
Figura 4.	Efecto de la madurez de la semilla (factor A) en la regeneración <i>in vitro</i> de raíces de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. Variedad CENTA Costeño II. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.01$ ). Las barras corresponden al error estándar.....	19

Figura 5. Efecto de la madurez de la semilla (factor A) en el porcentaje de la eficiencia de regeneración <i>in vitro</i> de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. Variedad CENTA Costeño II. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.01$ ). Las barras corresponden al error estándar.....	19
Figura 6. Efecto de la dosis de BAP (factor B) en la regeneración <i>in vitro</i> de brotes de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. Variedad CENTA Costeño II. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.01$ ). Las barras corresponden al error estándar.....	21
Figura 7. Efecto de la dosis de BAP (factor B) en la regeneración <i>in vitro</i> de hojas de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. Variedad CENTA Costeño II. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.01$ ). Las barras corresponden al error estándar.....	21
Figura 8. Efecto de la dosis de BAP (factor B) en la regeneración <i>in vitro</i> de raíces de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. Variedad CENTA Costeño II. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.01$ ). Las barras corresponden al error estándar.....	22
Figura 9. Efecto de la Interacción del Factor A x Factor B en el porcentaje de la eficiencia de regeneración <i>in vitro</i> de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. Variedad CENTA Costeño II. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.01$ ). Las barras corresponden al error estándar.....	23
Figura 10. Efecto de la Interacción del Factor A x Factor B en la regeneración <i>in vitro</i> de brotes de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. Variedad CENTA Costeño II. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.01$ ). Las barras corresponden al error estándar.....	24
Figura 11. Efecto de la Interacción del Factor A x Factor B en la regeneración <i>in vitro</i> de hojas de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. Variedad CENTA Costeño II. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.01$ ). Las barras corresponden al error estándar.....	25
Figura 12. Efecto de la Interacción del Factor A x Factor B en la regeneración <i>in vitro</i> de raíces de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. Variedad CENTA Costeño II. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.01$ ). Las barras corresponden al error estándar.....	25
Figura 13. Efecto de la Interacción del Factor A x Factor B en el porcentaje de la eficiencia de regeneración <i>in vitro</i> de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. Variedad CENTA Costeño II. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.01$ ). Las barras corresponden al error estándar.....	26

## INDICE DE ANEXOS

Figura A-1. Ubicación y Metodología de campo para la obtención de vainas inmaduras de frijol Var. CENTA Costeño II: UV: Ubicación del vivero. PSF: Preparación del sustrato para siembra del frijol. SF: Siembra del frijol. CF: Cultivo del frijol.....	41
--	----

Figura A-2. Desinfección de semillas maduras y vainas de frijol CENTA Costeño II: MPD: Materiales para la desinfección. SM: Semillas maduras de frijol. PSHS: Preparación de la solución de hipoclorito de sodio. DSYV: Desinfección de semillas y vainas.....	41
Figura A-3. Disección de vainas y semillas de frijol Var. CENTA Costeño II: VSI: Vainas de frijol con semillas inmaduras. DVYS: Disección de vainas y semillas de frijol. OSI: Obtención de semillas inmaduras. SID: Semillas inmaduras disectada. EEIM: Eje embrionario de semillas maduras e inmaduras. MDG: Medios de germinación...	42
Figura A-4. Regeneración <i>in vitro</i> de semillas maduras Var. CENTA Costeño II: NC-0: Nudo cotiledonal con 0 mg.l <sup>-1</sup> de BAP. NC-2.25: Nudo cotiledonal con 2.25 mg.l <sup>-1</sup> de BAP. NC-6.75: Nudo cotiledonal con 6.75 mg.l <sup>-1</sup> de BAP.....	42
Figura A-5. Regeneración <i>in vitro</i> de semillas inmaduras Var. CENTA Costeño II: NC-0: Nudo cotiledonal con 0 mg.l <sup>-1</sup> de BAP. NC-2.25: Nudo cotiledonal con 2.25 mg.l <sup>-1</sup> de BAP. NC-6.75: Nudo cotiledonal con 6.75 mg.l <sup>-1</sup> de BAP.....	43

## 1. INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es una de las especies de leguminosas más importantes y que están distribuidas por todo el mundo. Con el 22% de proteínas, el frijol representa una fuente relevante de nutrientes esenciales para la humanidad y constituye un componente esencial en la dieta de países en desarrollo de Latinoamérica, África y Asia (Aragão y Campos 2007). Su producción mundial anual supera los 30 millones de toneladas métricas (Gepts et al., 2008; Ramírez y Rangel 2011). El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es un cultivo de gran importancia alimentaria. En El Salvador el consumo de proteínas alcanza 52.4 gramos por persona por día, de las cuales se estima que 4.2 gramos son provenientes del frijol (FAO 1989).

La producción del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) en El Salvador ha experimentado un aumento en su producción (65.5% hasta el año 2014) debido en parte al apoyo del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) con la entrega de insumos agrícolas como la semilla mejorada de frijol (MAG 2012; Zelada 2014; Superintendencia de Competencia 2015).

El mayor obstáculo que limita el potencial de las herramientas biotecnológicas para el mejoramiento genético de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) está relacionado a su baja respuesta tanto a la regeneración *in vitro* como a la transformación genética, ya que las legumbres son notoriamente recalcitrantes (Veltcheva y Svetleva, 2005; Estrada et al. 2007, Kwapata et al. 2010). Sin embargo, aún con las actuales dificultades se ha logrado crear nuevas variedades de frijol mediante la utilización de herramientas biotecnológicas (Lizana et al. 2006; Grajales et al. 2008; Blair et al. 2012).

Los objetivos que persigue esta investigación es determinar la respuesta morfológica a la regeneración *in vitro* mediante organogénesis directa de semillas de diferentes edades de la variedad de frijol común CENTA Costeño II. Además, se busca establecer un protocolo eficiente de regeneración *in vitro* de la variedad de frijol antes mencionada. El trabajo de investigación está encaminado a la búsqueda de nuevas metodologías y técnicas biotecnológicas que sirvan de instrumentos en investigaciones futuras para agilizar las reproducciones de la variedad de interés nacional como es el CENTA Costeño II.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Generalidades del frijol común

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

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

### 2.2 Origen y distribución

Los primeros trabajos sobre el origen y evolución del frijol se remontan a Miranda-Colín (1967) y Gentry (1969), quienes afirmaron que la forma silvestre de frijol se encuentra en Mesoamérica. Posteriormente, se han propuesto centros de origen y domesticación alternativos que trabajos sucesivos han ratificado (Kwak *et al.* 2009). El frijol común comprende dos grupos genéticos, el Mesoamericano y el Andino, que difieren en sus estructuras y niveles de diversidad genética, tanto en poblaciones silvestres como en las domesticadas (Beebe *et al.* 2000, 2001; Papa y Gepts 2003).

### 2.3 Taxonomía

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

Orden: Rosales

Familia: Leguminosae

Subfamilia: Papilionoidae

Tribu: Phaseolae

Subtribu: Phaseolinae

Género: *Phaseolus*

Especie: *vulgaris*

Nombre Científico: *Phaseolus vulgaris* L.

### 2.4 Morfología de la planta

#### Raíz

Morfológicamente su raíz principal puede alcanzar una profundidad de uno a dos metros. Las raíces laterales desarrollan una radícula cónica. Estas estructuras poseen nódulos, encontrándose en su interior bacterias simbióticas que fijan el nitrógeno del aire (CIAT 1984).

**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 2018).

**Hojas**

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.

**Flores**

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).

**Frutos**

El fruto es una vaina con dos valvas, las cuales provienen del ovario comprimido. Debido que el fruto es una vaina, esta especie se clasifica como leguminosa. Las vainas son generalmente glabras o subglabras con pelos muy pequeños; a veces la epidermis es cerosa (CIAT 1984).

**Semillas**

La semilla no posee 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 1984).

**2.5 Fenología y hábitos de crecimiento**

El desarrollo de la planta de frijol comprende dos fases sucesivas que son: vegetativa y reproductiva (CENTA 2008). La fase vegetativa se inicia en el momento 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 (Miranda-Colín 1967). La fase reproductiva

termina cuando el grano alcanza el grado de madurez necesario para la recolecta; a pesar de ser esta fase predominantemente reproductiva, durante ella las variedades indeterminadas continúan, aunque con menor intensidad, produciendo estructuras vegetativas (CIAT 1984).

Según la FAO (2018), la fenología del desarrollo de las plantas de *P. vulgaris* incluye varias etapas desde la siembra hasta la cosecha. Cada etapa de desarrollo está asociada con cambios fisiológicos, como el tamaño, la morfología, la composición química y la composición hormonal. Presenta diez fases fenológicas durante su desarrollo, divididas en cinco etapas vegetativas y cinco reproductivas: germinación (V0), emergencia (V1), hojas primarias (V2), primera hoja trifoliada (V3), tercera hoja trifoliada (V4); botón floral o prefloración (R5), floración (R6), formación de vainas (R7), llenado de vainas (R8) y maduración (R9). En las variedades determinadas, el desarrollo vegetativo del tallo principal termina antes de la floración, mientras que en las indeterminadas generalmente acaba en la etapa R8, que es cuando inicia también la defoliación.

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

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

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

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

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

Tipo IV: Hábito de crecimiento indeterminado trepador.

## **2.6 Requerimientos climáticos y edáficos**

La planta crece bien entre temperaturas promedios de 15 a 27°C, pero es importante reconocer que existe un amplio rango de tolerancia entre diferentes variedades. La importancia de la luz se fundamenta en primer lugar por su indispensable función para la fotosíntesis, en segunda instancia afecta la fenología y morfología de la planta por medio

de reacciones de fotoperiodo y elongación (CENTA 1996). El cultivo de frijol se adapta perfectamente en ambientes con elevaciones que oscilan de los 400-1500 msnm.

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

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

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

## **2.7 Mejoramiento genético del cultivo**

Desde que se estableció la capacidad de modificar plantas mediante ingeniería genética, los investigadores han modificado un gran número de especies de plantas para satisfacer los requisitos agrícolas. Casi treinta años después de los primeros enfoques de la modificación genética de cultivos, es posible transformar muchas leguminosas de grano (Svetleva *et al.* 2003).

Sin embargo, una de las especies más importantes para la nutrición humana es *Phaseolus vulgaris*, que aún carece de algunas herramientas prácticas para la investigación genómica, como la transformación genética de rutina. Las dificultades comprobadas hacia la regeneración in vitro obstaculizan significativamente las posibilidades de mejora del frijol común que presenta muchas limitaciones bióticas y abióticas. Aunque se ha logrado un progreso notable, la tasa de recuperación de las líneas transgénicas sigue siendo baja (Gepts *et al.* 2008).

Las plantas transgénicas de frijol que se han logrado obtener a la fecha, provienen del uso de diversos métodos de transformación genética. Entre ellos se tiene un método biológico indirecto y por lo tanto natural, basado en el empleo de una bacteria llamada *Agrobacterium tumefaciens*. Otra de las herramientas que existen para la introducción directa de ácidos nucleicos a células vegetales es la biobalística. Dicha técnica representa un método físico de transformación y consiste en el bombardeo de tejidos con micropartículas cubiertas con ADN o con cualquier otra biomolécula que se pretenda introducir a células vegetales (Bolívar Zapata, 2007). También existe la mutagénesis, que consiste en la aplicación de diferentes agentes mutagénicos: los compuestos químicos que actúan directa o indirectamente sobre el ADN y los mutagénicos físicos como las irradiaciones ionizantes y la luz ultravioleta (Moh 1972). Además, el Mejoramiento asistido por marcadores moleculares (MAS) se suma a estos métodos de transformación y los hay de tres tipos: morfológicos (rasgos); bioquímicos (proteínas de almacenamiento de semillas e isoenzimas) y polimorfismos moleculares o basados en ADN, que se pueden utilizar para establecer vínculos con rasgos de interés agrícola (Svetleva *et al.* 2003). Otro método más reciente es la edición génica, que es una técnica dirigida que permite producir cambios en secuencias específicas del ADN, con alta eficiencia y limitado número de mutaciones en regiones no blanco (Bortesi *et al.* 2014).

## **2.8 Variedad de frijol en estudio**

### **2.8.1 CENTA Costeño II**

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

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

Habito de crecimiento:	II-B Indeterminado arbustivo
Días a floración:	35-36
Días a madurez fisiológica:	70-72
Reacción a virus del mosaico dorado:	Resistente
Reacción a virus del mosaico común:	Resistente
Reacción a mancha angular:	Tolerante
Reacción a bacteriosis:	Tolerante
Reacción a mustia hilachosa:	Susceptible
Altas temperaturas:	Tolerante
Humedad limitada:	Tolerante
Color del grano:	Rojo claro
Número de granos por vaina:	6-7
Número de vainas por planta:	16-18
Color de la vaina:	Crema
Peso seco de 100 granos:	26 gramos
Rendimiento potencial:	2,272 kg/ha (35 qq/mz)
Adaptación:	30-1200 msnm

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

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

### **2.9 Cultivo *in vitro***

El cultivo *in vitro* es una técnica biotecnológica que utiliza el término de totipotencia celular, el fundamento de este concepto describe que cualquier célula vegetal contiene una copia

íntegra del material genético de la planta a la que pertenece, independientemente de su función. La respuesta de totipotencia celular de regeneración de plantas ocurre en presencia de niveles de citoquininas y auxinas apropiados para el cultivo que se esté utilizando (Criollo *et al.* 2016).

### **2.10 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).

### **2.11 Organogénesis y sus etapas**

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

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

### **2.12 Utilización de explantes maduros e inmaduros de leguminosas**

La capacidad que posee una célula o grupo de células para convertirse en embriogénica también depende de su estado fisiológico y de diferenciación (Gueye *et al.* 2009). La edad fisiológica del explante interfiere en el uso continuo de un protocolo de regeneración y si factores como este no se mantienen constantes, la organogénesis se ve afectada (Thorpe and Biondi, 1981)

Virtualmente todas las partes de la planta se han utilizado como explantes para protocolos de regeneración *in vitro* (Flick *et al.* 1983; Murashige, 1974); no obstante, los tejidos juveniles poseen un alto grado de actividad meristemática y tienden a tener más plasticidad *in vitro* (Evans *et al.* 1981).

El potencial organogénético de un explante es inversamente proporcional a su edad fisiológica, por lo que se debe tomar en cuenta la etapa o edad fisiológica del explante a utilizar en organogénesis de cultivos *in vitro* (Alleweldt *et al.* 1962). A partir de secciones de tallo cercanas a los ápices caulinares se puede producir mayor cantidad de meristemoides que a partir de la porción baja del tallo.

En maní, plantas enteras pueden regenerarse por cultivo de tejidos vía organogénesis a partir de explantes obtenidos de cotiledones (maduros e inmaduros) hojas inmaduras y otros (McKently *et al.*, 1990 y 1991; Cheng *et al.*, 1992)

En su trabajo con discos de hojas de *Echeverría elegans*, Raju *et al.* (1970) demostraron que los tejidos inmaduros, los parcialmente maduros y los maduros producían hojas, raíces, yemas respectivamente. Pierik *et al.* (1974) indujeron únicamente la regeneración *in vitro* a partir de tejidos inmaduros de *Anthurium sp.*

Al igual Polanco y Ruiz (1997) mencionan que se puede obtener resultados excelentes con la utilización de semillas inmaduras de un tamaño específico y adecuado para la regeneración de brotes.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Descripción del estudio**

La investigación se llevó a cabo en el área de Cultivo de Tejidos del Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador en el periodo de abril 2022 a agosto del 2022. La ubicación geográfica del laboratorio es 13°43'06" Norte y 89°12'11" Oeste. El estudio corresponde a una investigación del tipo experimental (Figura A-1).

#### **3.2 Adquisición de la semilla madura**

Las semillas de frijol maduro de la variedad CENTA Costeño II fueron donadas por Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal "Enrique Álvarez Córdova", en base a una colaboración con el proyecto financiado por la SIC-UES (La Secretaría de Investigaciones Científicas de la Universidad de El Salvador) para el mejoramiento genético del frijol común, que se desarrolla actualmente en el área de Cultivo de Tejido Vegetales en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agronómicas. Las semillas fueron entregadas con su respectivo número de lote e identificación de la variedad.

#### **3.3 Metodología de campo**

La fase de campo se llevó a cabo en el vivero de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador. Se llenarán 15 bolsas con medidas de 9x12", con un distanciamiento de 10 cm entre bolsas, colocando 4 a 5 semillas por bolsa. A cabo de 15 días se aplicará fertilizante 18-46-0. Cada semana se realizó limpieza del área y la observación de hongos o plagas en el cultivo para su tratamiento respectivo. A los 25 días después de la floración se realizó la cosecha de las vainas inmaduras y su introducción en el laboratorio (Figura A-1).

### 3.4 Metodología de laboratorio

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

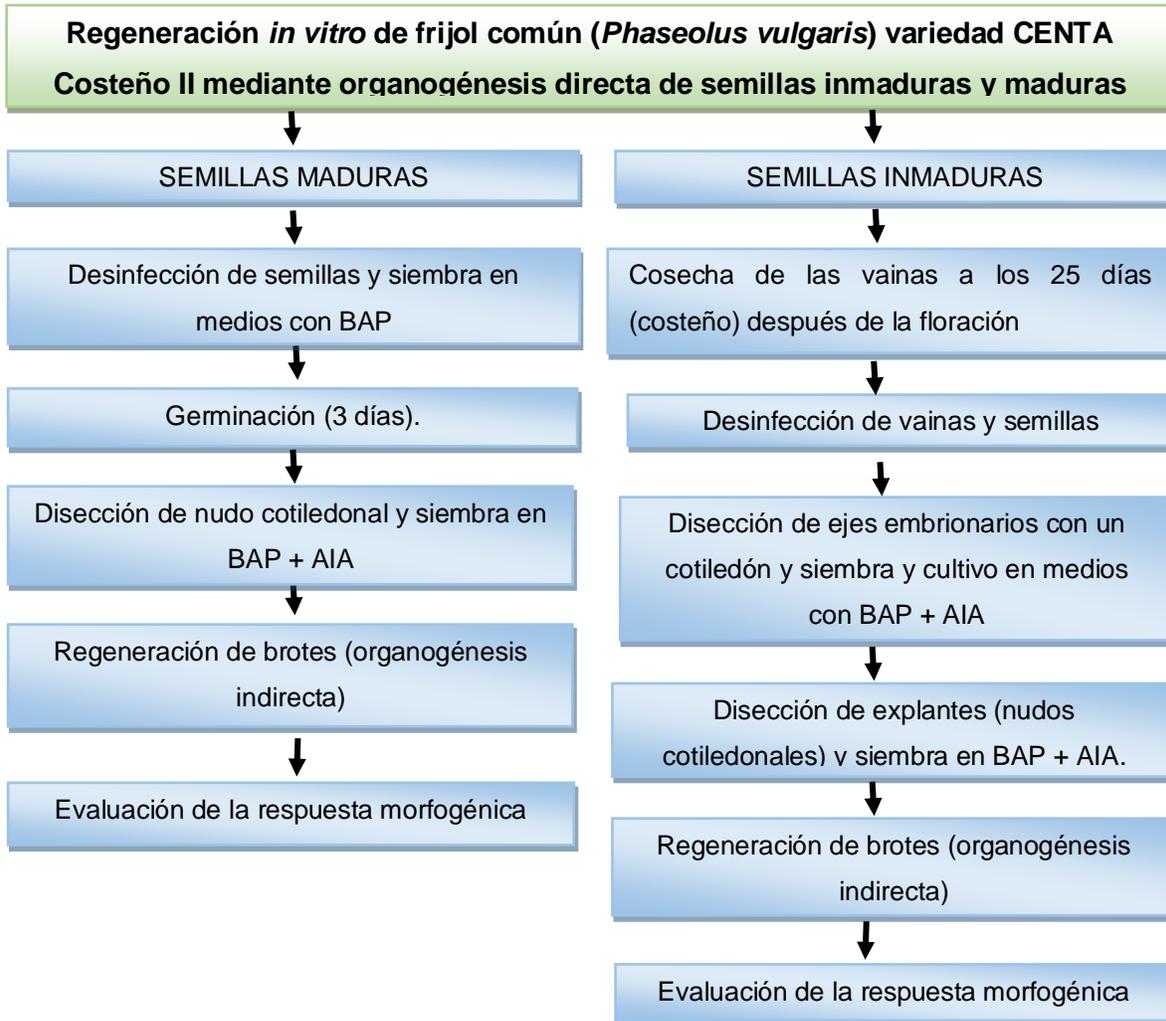


Figura 1. Estrategia experimental de la investigación. El diagrama incluye los pasos críticos planteados en los objetivos, así como la evaluación de los resultados de ambas edades de las semillas de frijol común.

### 3.4.1 Semillas inmaduras

- **Desinfección de vainas y germinación**

Se utilizaron semillas de la variedad de frijol CENTA Costeño II de 25 días después de la floración (Figura A-2). En una cámara de flujo laminar se desinfectaron las vainas superficialmente con alcohol etílico al 70% durante 1 minuto y posteriormente con hipoclorito de sodio (NaClO) al 3% y Tween 20 (3 gotas/100) en agitación constante durante 20 minutos. Posteriormente, se realizaron 6 lavados con agua destilada estéril (Figura A-2).

Se realizó la extracción de las semillas de las vainas y se disectaron los embriones cigóticos con un cotiledón (Figura A-2). Estos explantes se colocaron en medios de cultivo de germinación que consistió en sales minerales MS (Murashige y Skoog 1962) con  $100 \text{ mg.l}^{-1}$  de mioinositol,  $0.1 \text{ mg.l}^{-1}$  de tiamina,  $0.5 \text{ mg.l}^{-1}$  de ácido nicotínico,  $0.5 \text{ mg.l}^{-1}$  de piridoxina,  $2 \text{ mg.l}^{-1}$  de glicina,  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  de BAP,  $0.05 \text{ mg.l}^{-1}$  de Ácido indol acético (AIA),  $30 \text{ g.l}^{-1}$  sacarosa y  $3 \text{ g.l}^{-1}$  agar (Figura A-2). El pH del medio se ajustó a 5.7 con NaOH o HCl antes de esterilizarlo en autoclave a  $120^\circ$  durante 20 min. Se cultivaron un total de 300 explantes en cajas Petri con 30 ml de medio y 5 explantes por caja. La temperatura utilizada fue de  $25^\circ \pm 2^\circ$  y en absoluta oscuridad durante siete días.

- **Disección de explantes (nudos cotiledonales), inducción y regeneración de brotes**

Se disectaron los explantes que consistieron en el nudo cotiledonal, de los ejes embrionarios inmaduros + un cotiledón desarrollado en el medio. Todos los explantes se cultivaron en placas Petri con 30 ml de medio de inducción de brotes (MIB) con sales minerales de MS adicionadas con carbón activado ( $3 \text{ g.l}^{-1}$ ) y suplementados en diferentes dosis de BAP: 0, 2.25 y  $6.75 \text{ mg.l}^{-1}$  (Figura A-3). El pH de los medios se ajustó a 5.7 con HCL o NaOH antes de esterilizarlo en autoclave durante 21 min a  $121^\circ$  y  $1.07 \text{ kg cm}^{-1}$ .

Para la inducción y regeneración de brotes se utilizaron tres frascos tipo Gerber con 25 ml de medio MIB, 4 explantes por frasco y 3 repeticiones. Los explantes se cultivaron en condiciones de condiciones de fotoperiodo 16 horas luz / 8 horas oscuridad a  $25 \pm 1^\circ$  y  $58 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ .

- **Evaluación de la respuesta morfogénica**

Se evaluó mediante los indicadores número de brotes, número de hojas y número de raíces. Para la respuesta a la regeneración *in vitro* vía organogénesis indirecta de la variedad se utilizó la fórmula para calcular la eficiencia de regeneración [(número de callos con brotes / total de número de nudos cotiledonales) x 100]. A los 21 días de cultivo en los tratamientos de inducción de brotes y regeneración se realizó la toma de datos de los indicadores y se llevará un registro fotográfico (Cuadro 1).

### 3.4.2 Semillas maduras

- **Desinfección de semillas y germinación**

Se utilizaron semillas de la variedad de frijol (CENTA Costeño II) de 12 meses postcosecha (Figura A-2). En una cámara de flujo laminar se desinfectaron las semillas superficialmente con alcohol etílico al 70% durante 30 segundos y posteriormente con hipoclorito de sodio (NaClO) al 3% y Tween 20 (3 gotas/100 ml) en agitación constante durante 10 minutos. Posteriormente, se realizó tres lavados con agua destilada estéril. Las semillas se colocaron en medios de cultivo de germinación que consistió en las sales minerales MS (Murashige y Skoog 1962) suplementados con 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, 1.13 mg.l<sup>-1</sup> de BAP, 30 g.l<sup>-1</sup> de sacarosa y 3 g.l<sup>-1</sup> de agar (Figura 11). El pH del medio se ajustó a 5.7 con NaOH o HCl antes de esterilizarlo en autoclave a 120° durante 20 minutos. Se cultivaron un total de 300 semillas en frasco de vidrio de 250 ml. Cada recipiente contenía 30-50 ml de medio y 10 semillas. La temperatura de germinación fue de 25°± 2° y en absoluta oscuridad durante tres días.

- **Dissección de explantes (nudos cotiledonales), inducción y regeneración de brotes**

La inducción y regeneración de brotes y la evaluación de la respuesta morfológica se realizó con los mismos medios y métodos descritos con las semillas inmaduras (Figura A-3).

### 3.5 Metodología estadística

Para la organización, procesamiento y análisis de los datos sobre la regeneración *in vitro* vía organogénesis directa de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad CENTA Costeño II, 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 aplicaron análisis bivariado correlación de Pearson. También, a todas las variables se les aplicaron el Análisis de Varianza (ANVA), específicamente un arreglo factorial 2x3 (Cuadro 1) con los diferentes factores: el factor A que serán las semillas maduras e inmaduras y el factor B que son las 3 diferentes dosis del medio de cultivo a utilizarse para la regeneración de brotes; todo esto bajo el Diseño Completamente al Azar (DCA). Esto por las condiciones controladas del laboratorio (luz, temperatura y humedad) y características del material experimental (homogéneo). Se establecerán seis tratamientos con tres repeticiones. Previo a la aplicación de la técnica del Análisis de Varianza (ANVA) se verificaron que los datos cumplan con los supuestos de homogeneidad de varianzas y distribución normal. Para verificar el supuesto de normalidad se aplicó la herramienta grafica Q-Q Plot y en el caso de la homogeneidad de varianzas se ejecutó el diagrama de dispersión.

Las variables independientes fueron las diferentes dosis de los medios de cultivo, la edad de frijol y la variable dependiente es la respuesta a la morfogénesis. Los tratamientos consistieron en la aplicación de tres concentraciones de BAP: 0, 2.25 y 6.75 mg.l<sup>-1</sup> (Cuadro 2). Cada tratamiento tenía tres repeticiones y cada repetición consistió en tres placas Petri con ocho explantes cada uno. Fueron 24 explantes por tratamientos/ variedad y 144 explantes por tratamiento/ variedad en total.

Con el propósito de demostrar cuál de las dosis de medios (MS) suplementado con BAP: 0, 2.25 y 6.75 mg.l<sup>-1</sup> y la edad del frijol común presentará mejor respuesta a la regeneración *in vitro*, se aplicaron la prueba estadística de comparación de medias de Tukey. Todo el análisis se realizó con un nivel de significancia estadística (alfa)  $\alpha$  del 1% = 0.01 y mediante la utilización de hojas de cálculo de Microsoft Excel y el programa estadístico infostat 2020.

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

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

Donde:

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

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

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

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

$\mu$  = Media general.

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

$FB_k$  = Efecto del  $k$ -ésimo nivel o modalidad del factor B.

$(FA \times FB)_{jk}$  = Efecto de la interacción de los factores A y B.

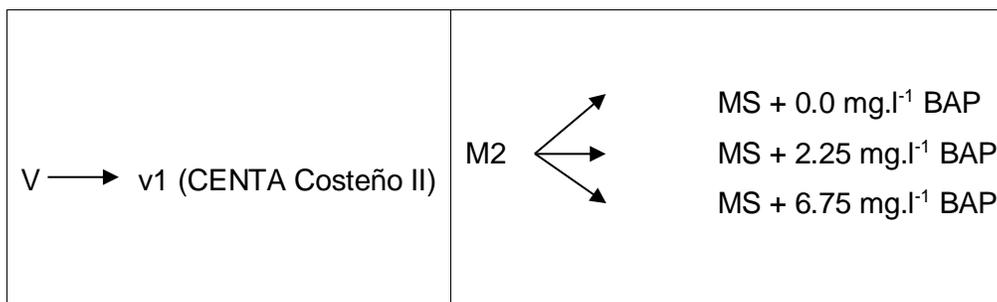
$\epsilon_{ijk}$  = Efecto del error experimental independiente.

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

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

Fuente: Elaboración propio.

**Cuadro 2. Medios de cultivo de MS con diferentes concentraciones de BAP, para evaluar la organogénesis directa en frijol común variedad CENTA Costeño II.**



Fuente: Elaboración propia.

Simbología: V= Variedad de frijol    M= Medio de cultivos con diferentes dosis.

#### 4. RESULTADOS

Los resultados de la regeneración *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad CENTA Costeño II mediante organogénesis directa a partir de semillas inmaduras (25 días después de la floración) y maduras (semillas no mayores de 12 meses después de la cosecha) y cultivados en medios suplementados con BAP (0, 2.25 y 6.75 mg.l<sup>-1</sup>) se presentan a continuación.

##### 4.1. Efecto de la madurez de la semilla (factor A) en la regeneración *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

###### 4.1.1. Número de brotes

Al aplicar el análisis de varianza (ANOVA) se demostró estadísticamente (p-valor de 0.6116 >(α) de 0.01) que la madurez de la semilla de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L. Var. CENTA Costeño II) no generaron diferencias significativas en el número de brotes a través de la regeneración *in vitro* (Cuadro 3) de nudos cotiledonales de semillas maduras e inmaduras. Sin embargo, en las figuras A-4 y A-5, se observa que las semillas maduras mostraron mayor número de brotes con un valor medio de 3.40 y las semillas inmaduras generaron el menor número de brotes con una media de 3.23.

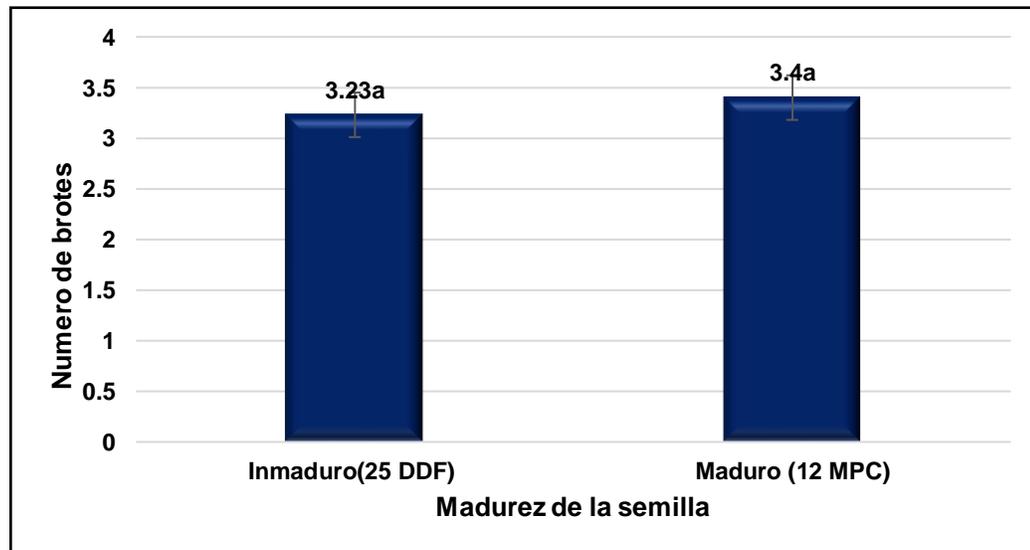


Figura 2: Efecto de la madurez de la semilla (factor A) en la regeneración *in vitro* de brotes de *Phaseolus vulgaris* L. Variedad CENTA Costeño II. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.01$ ). Las barras corresponden al error estándar.

#### 4.1.2. Número de hojas

Al realizar el análisis de varianza (ANOVA) se encontró que con un valor de  $p = 0.0009 < (\alpha)$  de 0.01, la comparación del uso de semilla de *Phaseolus vulgaris* L. Var. CENTA Costeño II, en estado inmaduras (25 DDF) con respecto a las semillas maduras (12 MPC), generaron diferencias estadísticas significativas en el número de hojas (Cuadro 3). En las figuras A-4 y A-5, se observa que las semillas maduras mostraron mayor número de hojas con un valor medio de 5.13, y las semillas inmaduras generaron el menor número de hojas con una media de 3.02.

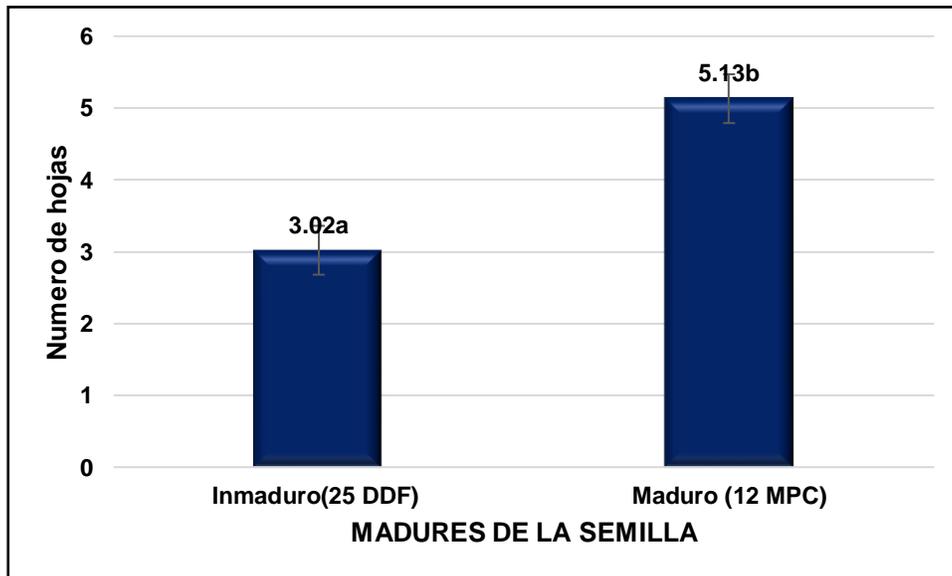


Figura 3. Efecto de la madurez de la semilla (factor A) en la regeneración in vitro de hojas de *Phaseolus vulgaris* L. Variedad CENTA Costeño II. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.01$ ). Las barras corresponden al error estándar.

#### 4.1.3. Número de raíces

Mediante el análisis de varianza (ANOVA) ( $p$ -valor de  $0.0001 < \alpha$  de 0.01) se encontró que existen diferencias estadísticas significativas en el número de raíces regeneradas a partir de nudos cotiledonales aislados de semillas maduras e inmaduras de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L. Var. CENTA Costeño II) (Cuadro 3). En las figuras A-4 y A-5, se observa que las semillas maduras mostraron mayor número de raíces con un valor medio de 2, y las semillas inmaduras generaron el menor número de raíces con una media de 0.36.

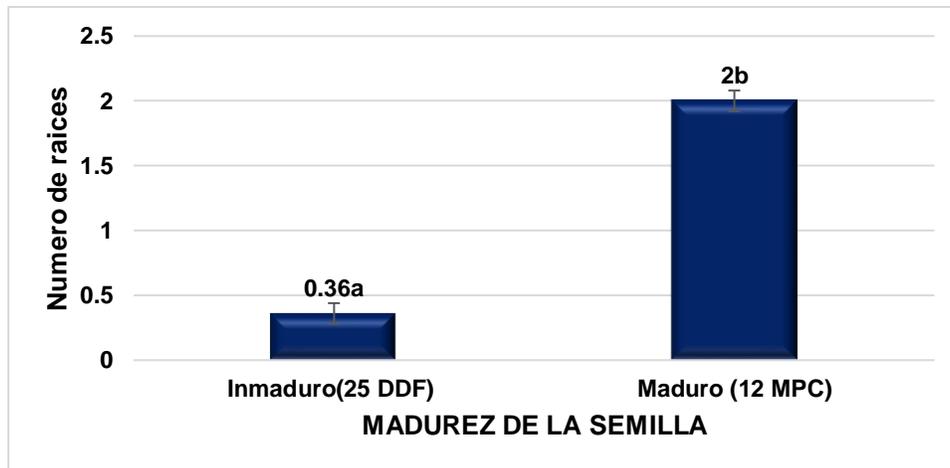


Figura 4. Efecto de la madurez de la semilla (factor A) en la regeneración *in vitro* de raíces de *Phaseolus vulgaris* L. Variedad CENTA Costeño II. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.01$ ). Las barras corresponden al error estándar.

#### 4.1.4. Eficiencia a la generación (%)

Se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $p$ -valor de  $0.0001 < \alpha$  de 0.01) en cuanto a la influencia de la madurez de la semilla sobre la eficiencia de regeneración *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L. Var. CENTA Costeño II (Cuadro 3). En las figuras A-4 y A-5, se observa que las semillas maduras mostraron mayor eficiencia de regeneración con un valor medio de 91.36%, y las semillas inmaduras generaron la menor eficiencia de regeneración con una media de 68.52%.

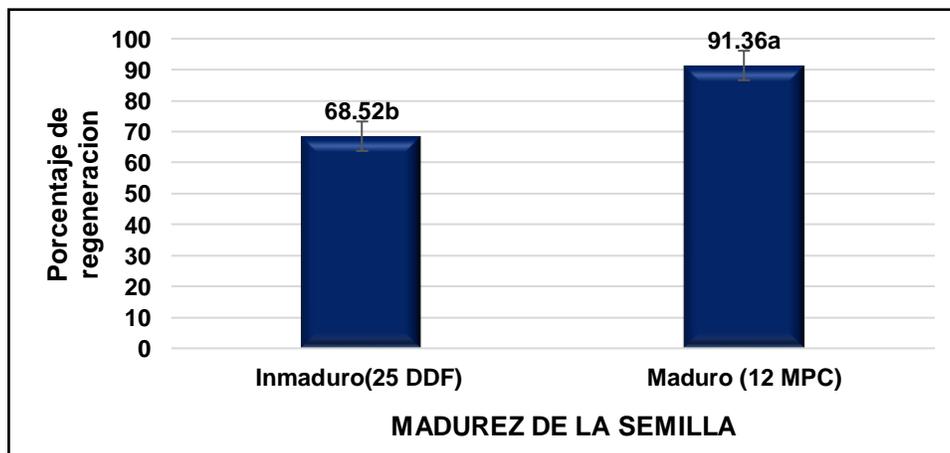


Figura 5. Efecto de la madurez de la semilla (factor A) en el porcentaje de la eficiencia de regeneración *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* L. Variedad CENTA Costeño II. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.01$ ). Las barras corresponden al error estándar.

Cuadro 3. Medidas resumen y análisis de varianza (ANOVA) del efecto de la madurez de la semilla (factor A) en la regeneración *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) Var. CENTA Costeño II

Madurez de la semilla (factor A)	Variables	Media aritmética	Desviación estándar	Coficiente de variación	p-valor
Inmaduras	Número de brotes	3.23	2.15	66.62	0.6116 <sup>NDS</sup>
Maduras		3.4	2.65	78.02	
Inmaduras	Número de hojas	3.02	2.11	69.86	0.0009 <sup>DS</sup>
Maduras		5.13	1.8	35.06	
Inmaduras	Número de raíces	0.36	0.55	152.99	0.0001 <sup>DS</sup>
Maduras		2	3.01	150.71	
Inmaduras	Eficiencia a la generación (%)	68.5	29.4	42.9	0.0052 <sup>DS</sup>
Maduras		91.3	9.26	10.13	

Fuente: Elaboración propia.

NDS: No diferencias significativas

DS: Diferencias significativa

**a. Efecto de los medios de cultivo suplementados con sales minerales de MS (factor B) en la regeneración *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) a partir de nudos cotiledonales.**

**4.2.1. Número de brotes**

Al realizar el análisis de varianza (ANOVA) se llegó a la conclusión que p-valor 0.9143 > ( $\alpha$ ) de 0.01, que la comparación del uso de diferentes dosis de BAP en semillas de *Phaseolus vulgaris* L. Var. CENTA Costeño II, no generaron diferencias estadísticas significativas en el número de brotes a través de la regeneración *in vitro* (Cuadro 4). Sin embargo, en las figuras A-4 y A-5, se observa que la dosis 6.75 de BAP mostraron mayor número de brotes con un valor medio de 3.61, y la dosis 0 BAP generaron el menor número de brotes con una media de 3.

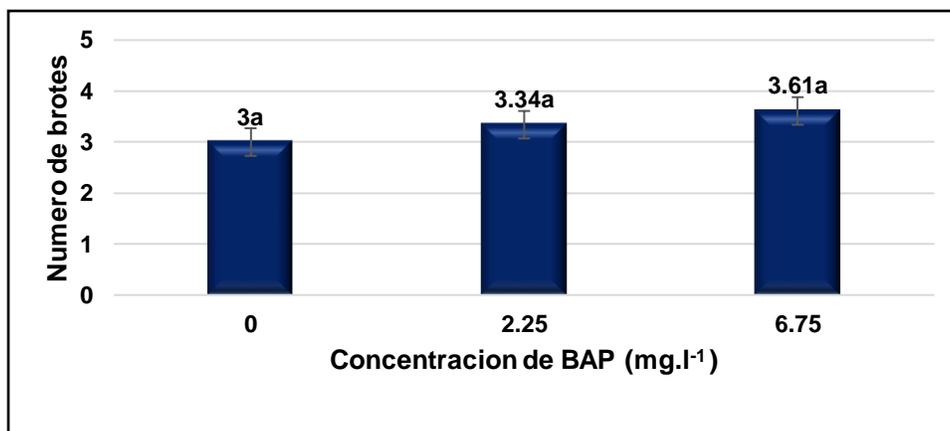


Figura 6. Efecto de la dosis de BAP (factor B) en la regeneración *in vitro* de brotes de *Phaseolus vulgaris* L. Variedad CENTA Costeño II. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.01$ ). Las barras corresponden al error

#### 4.2.2. Número de hojas

Al aplicar el análisis de varianza (ANOVA) se demostró estadísticamente ( $p$ -valor de 0.0017  $< (\alpha)$  de 0.01) que la dosis de BAP aplicada a la semilla de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L. Var. CENTA Costeño II), generaron diferencias significativas en el número de hojas a través de la regeneración *in vitro* (Cuadro 4) de nudos cotiledonales de semillas maduras e inmaduras. En las figuras A-4 y A-5, se observa que la dosis 6.75 de BAP mostraron mayor número de hojas con un valor medio de 6.31, y la dosis 0 BAP generaron el menor número de hojas con una media de 2.58.

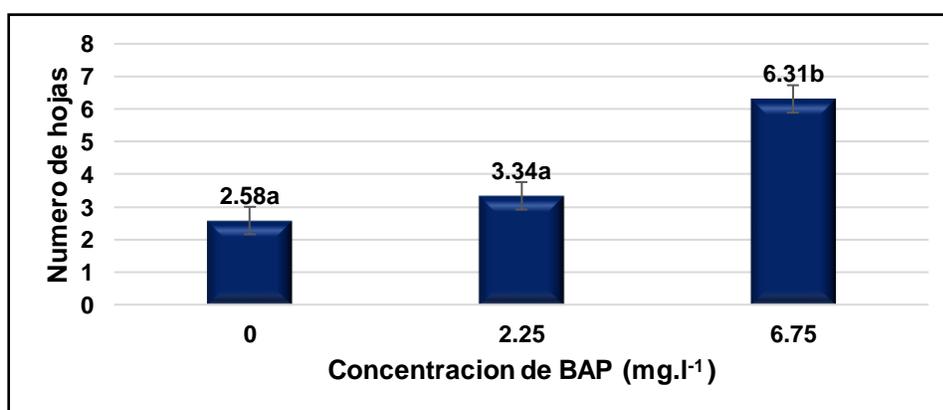


Figura 7. Efecto de la dosis de BAP (factor B) en la regeneración *in vitro* de hojas de *Phaseolus vulgaris* L. Variedad CENTA Costeño II. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.01$ ). Las barras corresponden al error estándar.

#### 4.2.3. Número de raíces

Se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $p$ -valor de  $0.0017 < \alpha$  de  $0.01$ ) en cuanto a la influencia de la dosis de BAP sobre la eficiencia de regeneración *in vitro* de raíces en semillas (*Phaseolus vulgaris* L. Var. CENTA Costeño II) (Cuadro 4). En las figuras A-4 y A-5, se observa que la dosis 6.75 de BAP mostraron mayor número de raíces con un valor medio de 3.54, y las dosis 0 y 2.25 BAP generaron el menor número de raíces con una media de 0.

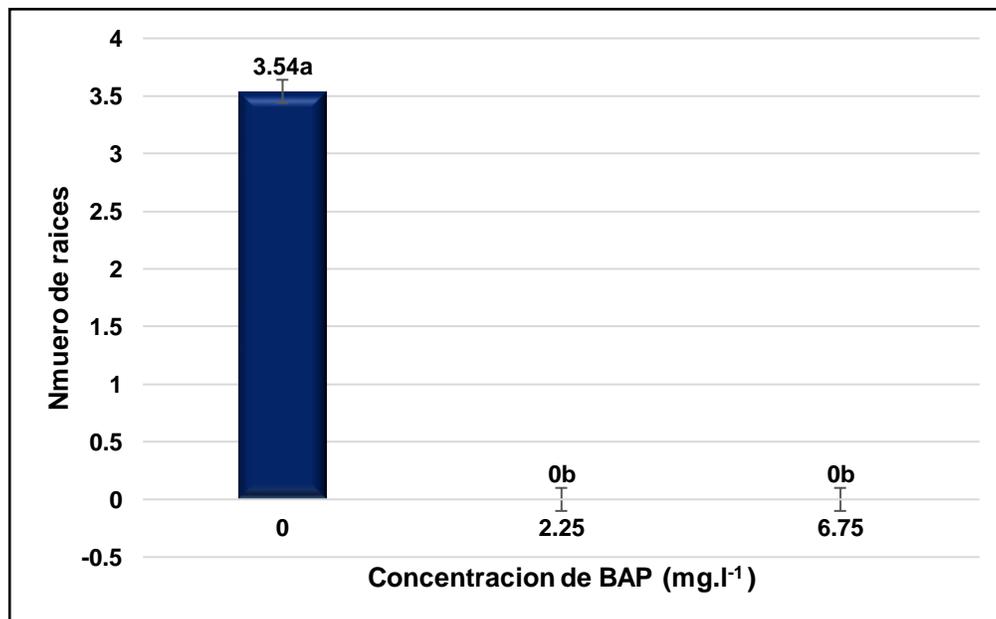


Figura 8. Efecto de la dosis de BAP (factor B) en la regeneración *in vitro* de raíces de *Phaseolus vulgaris* L. Variedad CENTA Costeño II. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.01$ ). Las barras corresponden al error estándar.

#### 4.2.4. Eficiencia a la generación (%)

Mediante el análisis de varianza (ANOVA) ( $p$ -valor de  $0.0001 < \alpha$  de  $0.01$ ) se encontró que existen diferencias estadísticas significativas en la eficiencia de regeneración a partir de nudos cotiledonales aislados de semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L. Var. CENTA Costeño II) (Cuadro 4). En las Figuras A-4 y A-5 se observa que la dosis 6.75 de BAP mostro mayor eficiencia de regeneración con un valor medio de 100%, y la menor dosis genero la menor eficiencia de regeneración con una media de 64.35%.

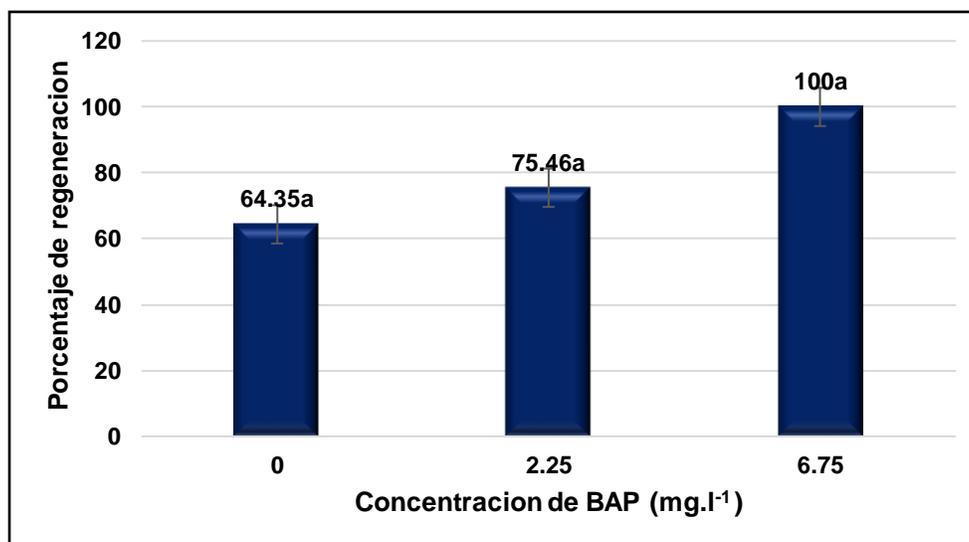


Figura 9. Efecto de la Interacción del Factor A x Factor B en el porcentaje de la eficiencia de regeneración *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* L. Variedad CENTA Costeño II. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.01$ ). Las barras corresponden al error estándar

Cuadro 4. Medidas resumen y análisis de varianza (ANOVA) del efecto de las dosis de BAP (factor B) en la regeneración *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) a partir de nudos cotiledonales

Dosis de BAP	Variabes	Media aritmética	Desviación estándar	Coficiente de variación	p-valor
0	Número de brotes	3	3.31	110.23	0.3463 <sup>NDS</sup>
2.25		3.34	2.21	66.25	
6.75		3.61	1.63	45.08	
0	Número de hojas	2.58	1.28	49.63	0.0001 <sup>DS</sup>
2.25		3.34	1.79	53.69	
6.75		6.31	1.46	23.07	
0	Número de raíces	3.54	2.72	76.84	0.0001 <sup>DS</sup>
2.25		0	0	sd	
6.75		0	0	sd	
0	Eficiencia a la generación (%)	64.4	19.44	30.21	0.0029 <sup>DS</sup>
2.25		75.5	28.51	37.78	
6.75		100	0	0	

Fuente: Elaboración propia.

NDS: No diferencias significativas

DS: Diferencias significativa

### 4.3. Efecto de la combinación de la madurez de la semilla (factor A) y los medios de cultivo suplementados con sales minerales de MS (factor B) en la regeneración *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) a partir de nudos cotiledonales

#### 4.3.1. Número de brotes

Mediante el análisis de varianza (ANOVA) ( $p$ -valor de  $0.0001 < \alpha$  de  $0.01$ ) se encontró que existen diferencias estadísticas significativas en la interacción de Factor A x Factor B en la regeneración de brotes a partir de nudos cotiledonales aislados de semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L. Var. CENTA Costeño II) (Cuadro 5). En la figura 21, se observa que la interacción semilla inmadura con la dosis de 0 de BAP mostraron mayor número de brotes con un valor medio de 6, y la interacción semilla madura con la dosis 0 BAP generaron el menor número de brotes con una media de 0.

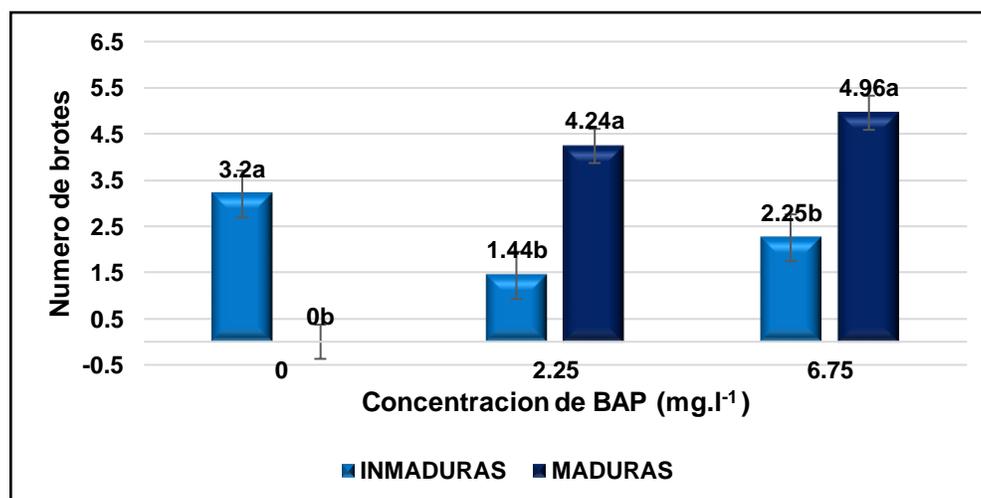


Figura 10. Efecto de la Interacción del Factor A x Factor B en la regeneración *in vitro* de brotes de *Phaseolus vulgaris* L. Variedad CENTA Costeño II. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.01$ ). Las barras corresponden al error estándar.

#### 4.3.2. Número de hojas

No se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $p$ -valor de  $0.3562 > \alpha$  de  $0.01$ ) en cuanto en la interacción de Factor A x Factor B sobre la eficiencia de regeneración *in vitro* de hojas en semillas (*Phaseolus vulgaris* L. Var. CENTA Costeño II) (Cuadro 5). Sin embargo, en la figura 22, se observa que la interacción semilla madura con la dosis de 6.75 de BAP mostraron mayor número de brotes con un valor medio de 7.11, y las Interacciones semillas inmaduras con la dosis 0 y 2.25 BAP generaron el menor número de brotes con una media de 1.78.

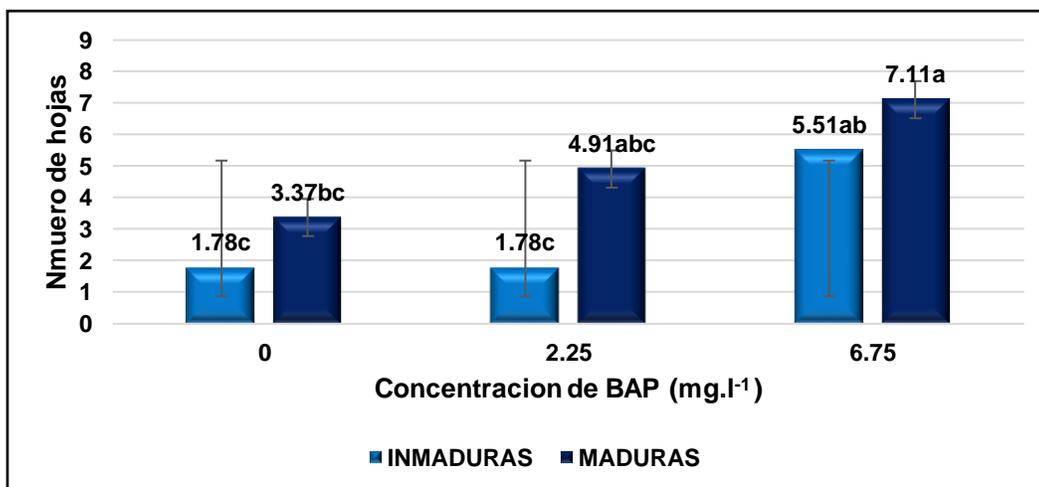


Figura 11. Efecto de la Interacción del Factor A x Factor B en la regeneración *in vitro* de hojas de *Phaseolus vulgaris* L. Variedad CENTA Costeño II. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.01$ ). Las barras corresponden al error estándar.

#### 4.3.3. Número de raíces

Al aplicar el análisis de varianza (ANOVA) se demostró estadísticamente ( $p$ -valor de 0.0001  $< (\alpha)$  de 0.01) que la interacción de Factor A x Factor B de la semilla de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L. Var. CENTA Costeño II), generaron diferencias significativas en el número de raíces a través de la regeneración *in vitro* (Cuadro 5). En la figura 23, se observa que la interacción semilla madura con la dosis de 0 de BAP mostraron mayor número de raíces con un valor medio de 6, y las Interacciones semillas inmaduras y maduras con la dosis 2.25 y 6.75 BAP generaron el menor número de raíces con una media de 0.

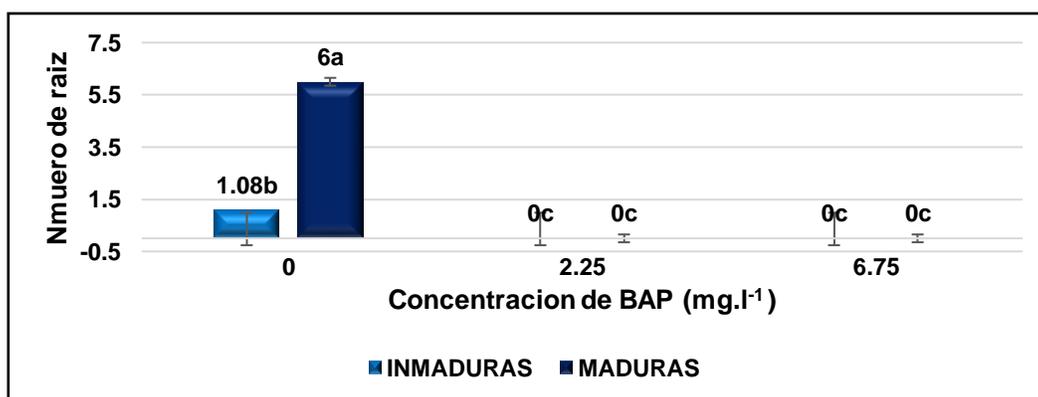


Figura 12. Efecto de la Interacción del Factor A x Factor B en la regeneración *in vitro* de raíces de *Phaseolus vulgaris* L. Variedad CENTA Costeño II. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.01$ ). Las barras corresponden al error estándar.

CENTA Costeño II, generaron diferencias estadísticas significativas en el porcentaje de regeneración *in vitro* (Cuadro 5). En la figura 24, se observa que la interacción semilla madura e inmadura con la dosis de 6.75 de BAP mostraron mayor eficiencia de regeneración con un valor medio de 100%, y las Interacciones semillas inmaduras con 0 BAP generaron la menor eficiencia de regeneración con una media de 47.22%.

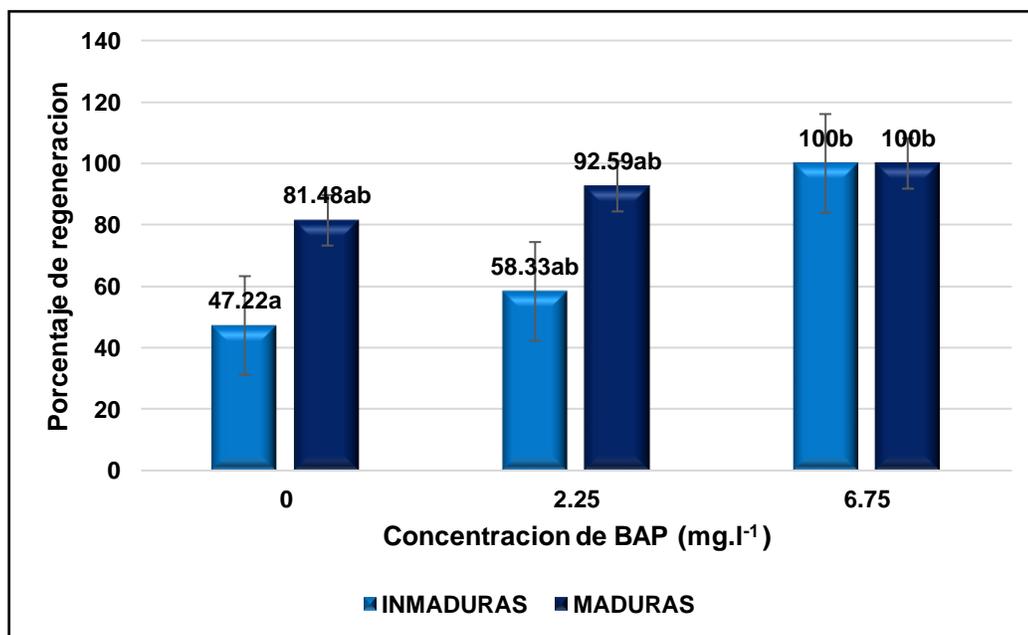


Figura 13. Efecto de la Interacción del Factor A x Factor B en el porcentaje de la eficiencia de regeneración *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* L. Variedad CENTA Costeño II. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.01$ ). Las barras corresponden al error estándar.

Cuadro 5. Medidas resumen y análisis de varianza (ANOVA) del efecto del factor A por el factor B en la regeneración *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) a partir de nudos cotiledonales

FACTOR A, EDAD DE LA SEMILLA	FACTOR B, DOSIS	Variables	Media aritmética	Desviación estándar	Coefficiente de variación	p-valor
1	0	BROTOS	6	0.58	9.71	0.0001 <sup>DS</sup>
2	0	BROTOS	0	0	sd	
1	2.25	BROTOS	1.44	0.51	35.3	
2	2.25	BROTOS	5.24	1.09	20.76	
1	6.75	BROTOS	2.25	0.44	19.57	
2	6.75	BROTOS	4.96	0.95	19.05	
1	0	HOJAS	1.78	1.05	59.08	0.3562 <sup>NDS</sup>
2	0	HOJAS	3.37	1.04	30.97	
1	2.25	HOJAS	1.78	0.79	44.48	
2	2.25	HOJAS	4.91	0.27	5.56	
1	6.75	HOJAS	5.51	1.49	26.98	
2	6.75	HOJAS	7.11	1.08	15.12	
1	0	RAIZ	1.08	0.22	20.06	0.0001 <sup>DS</sup>
2	0	RAIZ	6	0.58	9.71	
1	2.25	RAIZ	0	0	sd	
2	2.25	RAIZ	0	0	sd	
1	6.75	RAIZ	0	0	sd	
2	6.75	RAIZ	0	0	sd	
1	0	%	47.22	4.81	10.19	0.0942 <sup>NDS</sup>
2	0	%	81.48	6.41	7.87	
1	2.25	%	58.33	33.33	57.14	
2	2.25	%	92.59	6.41	6.93	
1	6.75	%	100	0	0	
2	6.75	%	100	0	0	

NDS: No diferencias significativas

DS: Diferencias significativa

## 5. DISCUSIÓN

La regeneración de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. mediante el cultivo de tejidos se ha descrito hasta la fecha con cierto grado de éxito (Somers *et al.* 2003). Adicionalmente, la regeneración *in vitro* de *P. vulgaris* L., considerada como recalcitrante, es todavía un proceso difícil y de baja eficiencia debido a los múltiples factores que intervienen en la respuesta a la morfogénesis como lo son el genotipo (Parrot *et al.* 1992), el medio de cultivo (Chandra y Pental, 2003), el tipo o estado de especialización del explante (Bohmer *et al.* 1995) y por las condiciones de cultivo (Mroginski y Kartha 1984; Polanco *et al.* 1997; Bean *et al.* 1997; Hnatuszko-Konka *et al.* 2019).

La utilización de semillas inmaduras o tejidos juveniles presentan frecuentemente una mayor aptitud para la organogénesis adventicia que los tejidos que provienen de órganos adultos o senescentes (George 1993). En muchas especies los cotiledones expandidos de plántulas producen más brotes adventicios que todo el embrión, hipocótilo, o cualquier otro tejido de la plántula, convirtiéndolos en el mejor explante (Din *et al.* 2016).

Özcan *et al.* (1996), utilizó semillas de *Vicia pannonica* de aproximadamente 15 días después de la polinización, Estos investigadores tomaron como explantes ejes embrionarios y nudos cotiledonales inmaduros y encontraron que los ejes embrionarios inmaduros mostraron mayor capacidad de regeneración que los cotiledones inmaduros en la mayoría de los medios probados con un promedio de 7.5 brotes por explante. Los resultados de la presente investigación son contrastantes con dicho reporte debido que la utilización de explantes de semillas maduras o inmaduras no produjeron diferencias significativas, lo que indica que no hay un efecto de la madurez de la semilla en la mejora de la regeneración de brotes.

Kostukova (1997) menciona que la utilización de semillas inmaduras como explantes para la regeneración *in vitro* de leguminosas (*Pisum sativum*) mejora la formación de estructuras morfogénicas. Este investigador reportó que mediante el uso de embriones inmaduros aislados de semillas *P. sativum* a los 15 días después de la floración se obtienen hasta 1.8 brotes por explante. En la presente investigación, los nudos cotiledonales de plántulas regeneradas a partir de semillas inmaduras (25DDF) produjeron 3.23 brotes por explante, mientras que los explantes de maduras (12MPC) regeneraron 3.4 brotes por explante. Aunque no existieron diferencias significativas en el número de brotes en ambos tipos de explante (semillas maduras e inmaduras), se observa que la mejor regeneración se obtuvo

mediante los nudos cotiledonales de semillas maduras. Estos datos son contrastantes con los reportados por Kostukova (1997). Diferente fue el caso de Polanco et al. (1997), el uso de los dos estados de madurez de semillas de lentejas (*Lens culinaris* Medik.) en medios de cultivos de BAP, sus resultados en ambos estados fueron similares (20 brotes por explante). Por su parte Delgado-Sanchez (2006), con un protocolo de regeneración organogénica en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) utilizando ejes embrionarios derivados de semillas maduras de cultivares (FJM) y (FMA), obtuvo como resultado 6 brotes por explante. También Collado et al. (2011), emplearon cotiledones de semillas inmaduras de 13 a 20 días después de la floración con un resultado de 4.6 brotes por explante. Recientemente, Alfaro y Hernández (2022) utilizando semillas maduras de *Phaseolus vulgaris* L. Var CENTA Costeño II, obtuvieron como resultado con un promedio de 0.98 brotes por explante. En esta investigación con la misma variedad CENTA Costeño II en estado maduro se obtuvieron 3.4 brotes por explante y en el caso de las inmaduras 3.2 brotes respectivamente.

Por otro lado, la composición del medio de cultivo para la inducción de brotes es importante en el proceso de regeneración a través de la organogénesis directa de leguminosas como *P. vulgaris* L. (Bajaj and Dhanju. 1979; Williams and McHughen. 1986; Saxena and King. 1987; Polanco et al. 1988; Sing and Raghuvanshi. 1989; Malik and Saxena. 1992; Polanco et al. 1997; Santalla et al. 1998). En la investigación realizada se evaluaron tres dosis de BAP (0, 2.25 y 6.75 mg.l<sup>-1</sup>) y se encontró que la dosis 6.75 mg.l<sup>-1</sup> de BAP produjo el mayor número promedio de brotes (3.6 por explante), hojas (6.1 por explante) y la mayor eficiencia de regeneración (100%). Gaticas-Arias et al. (2009) y Malik et al. (1991) mencionan que el medio de inducción suplementado con 5 mg.l<sup>-1</sup> de BAP resultó en un mayor número promedio de brotes en diferentes genotipos y explantes de frijol común.

Singh et al. (2002), evaluaron la regeneración múltiple de brotes a partir de ejes embrionarios de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en medio de MS con diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP) (0.5 y 1.0 mg.l<sup>-1</sup>), obteniendo su mejor respuesta con la mayor dosis de 1 mg.l<sup>-1</sup> con 7.6 brotes por explante. También Chandra et al. (2015), lograron una regeneración *in vitro* eficiente de *Vigna radiata* L. a través de organogénesis directa utilizando explantes de nódulos cotiledonales (con cotiledones) extraídos de plántulas de 5 días cultivadas en medio MS que contenían 0,5 mg.l<sup>-1</sup> de BAP. La regeneración de brotes se logró en medio B5 suplementado con 1.0 mg.l<sup>-1</sup> de BAP con

un aproximado de número de brotes entre 2 a 16 por explante. Los resultados de estos reportes son comparables con los de la presente investigación, en el sentido que la regeneración mejora en presencia y a medida aumenta la cantidad de BAP en los medios de cultivo. Esta idea ha sido ya reportada anteriormente por Pradip *et al* (2013), quienes mencionan que con el aumento de la concentración de BAP la tasa de frecuencia de regeneración de brotes aumenta, pero el crecimiento de brotes es siempre es reducido y en su investigación mencionan que la máxima formación de brotes fue de 8.75 por explante en medio MS suplementado con 2.0 mg.l<sup>-1</sup> de BAP y 1.5 mg.l<sup>-1</sup> de NAA.

La eficiencia de regeneración es un parámetro muy utilizado en el cultivo *in vitro* para referirse al porcentaje de formación de brotes *de novo* a partir del explante (Alfaro y Hernández, 2022). Delgado-Sanchez. (2006), menciona que la eficiencia de regeneración de *Phaseolus vulgaris* L. varió considerablemente en los medios de cultivo suplementados con diferentes dosis de BAP. La dosis de 10 mg.l<sup>-1</sup> de BAP mostró una mayor formación de brotes y regeneración completa de la planta (83%), mientras que la dosis 5 mg.l<sup>-1</sup> mostro un 50 % de regeneración *in vitro*. Los resultados de esta investigación en cuanto a la eficiencia de regeneración mostraron que el Factor A (madurez de las semillas) no causa un efecto en la regeneración de la variedad CENTA Costeño II, mientras que el Factor B (dosis de BAP 0, 2.25 y 6.75 mg.l<sup>-1</sup>) si producen mejoras en la regeneración con la dosis de 6.75 mg.l<sup>-1</sup> de BAP como la mejor concentración de este regulador para obtener un 100% de eficiencia. También se ha reportado que el aumento de más de 4 mg.l<sup>-1</sup> de BAP reduce la eficiencia de regeneración *in vitro* en *Vigna mungo* L (Pradip *et al*. 2013). Pradip *et al*. (2013) mencionan que la máxima frecuencia de regeneración (72.4%) se alcanzó en medio MS suplementado con 2.0 mg.l<sup>-1</sup> de BAP y 1.5 mg.l<sup>-1</sup> de NAA después de 8 semanas de cultivo.

## 6. CONCLUSIONES

- La recalcitrancia de *Phaseolus vulgaris* L. es principal factor que afecta la realización de protocolos de regeneración *in vitro*, lo cual ha sido manifestado en la presente investigación con la variedad CENTA Costeño II.
- En la comparación de los estados de madurez de la semilla para la obtención de los explantes, no se observó diferencia significativa en cuanto a la regeneración de brotes, hojas y raíces, aunque se observó mejores resultados la utilización de explantes de semillas maduras.
- En cuanto a la dosis adecuada en la regeneración *in vitro* de *Phaseolus vulgaris*, los mejores resultados se obtuvieron con 6.75 mg.l<sup>-1</sup> de BAP.
- Adicionalmente, la combinación ideal entre la edad de la semilla y la dosis de BAP es la de la semilla madura (12mpc) con la aplicación de 6.75 mg.l<sup>-1</sup> de BAP.
- Los resultados de la utilización de semillas inmaduras también fueron afectados por el manejo agronómico que se le realizó durante su desarrollo hasta la cosecha de las vainas inmaduras.

## 7. RECOMENDACIONES

- La utilización de explantes de semillas maduras de la variedad CENTA Costeño II debido a su facilidad de manejo y obtención de explantes.
- La adición de  $6.75 \text{ mg.l}^{-1}$  de BAP en medio MS, debido a la mejora en la regeneración de brotes, hojas, raíces y eficiencia de la regeneración de la Variedad CENTA Costeño II.
- La utilización de semillas maduras (12MPC) y la dosis de  $6.75 \text{ mg.l}^{-1}$  de BAP en la realización de protocolos de regeneración *in vitro* de la Variedad CENTA Costeño II.
- La evaluación de diferentes etapas o estadios de madurez de la semilla de frijol para la obtención de explantes en futuros protocolos de regeneración *in vitro* de la variedad CENTA Costeño II.
- Al realizar siembra para la obtención de semillas inmaduras se debe realizar en áreas controladas específicamente en invernaderos para la adquirir vainas sin daños físicos y sin enfermedades para que no afecte en la regeneración.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre Alfaro, JA & Melendez Hernandez, JA. 2022. Evaluación de la regeneración in vitro de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) Variedades CENTA Costeño II y CENTA Chaparrastique mediante la técnica de organogénesis directa e indirecta.
- Alleveltdt, G. y Radler, F. 1962. Interrelationship between photoperiodic behavior of grapes and growth of plant tissue cultures. *Plant Physiol.* 37:376-379.
- Aragão, FJL; Campos, FAP. 2007. Common Bean and Cowpea. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer Berlin Heidelberg. 263-276.
- Bajaj, YPS; Kumar, P; Labana, KS y Singh, MM. 1981. Regeneration of plants from seedling explants and callus cultures of *Arachis hypogaea*. *Ind. J. Exp. Biol.* 19:1026-1029.
- Bean, SJ; Gooding, PS; Mullineaux, PM; Davies, DR. (1997). A simple system for pea transformation. John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney, Norwich, NR4 7UH, UK.
- Beebe, SD; Skroch, PW; Tohme, J; Duque, MC; Pedraza, F; Nienhuis, J. 2000. Structure of genetic diversity between common bean land races of Middle America origin based on correspondence analysis of RAPD. *Crop Science.* 49:264-273.
- Beebe, SD; Rengifo, J; Gaitan, E; Duque, MC; Tohme, J. 2001. Diversity and origin of Andean landraces of common bean. *Crop Science.* 41:854-862.
- Blair, MW; Galeano, CH; Tovar, E; Torres, MCM; Castrillón, AV; Beebe, SE; Rao, IM. 2012. Development of a Mesoamerican intra-genepool genetic map for quantitative trait loci detection in a drought tolerant susceptible common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cross. *Molecular Breeding.* 29(1):71-88.
- Bolívar Zapata, FG. 2007. Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna. México D. F.
- Böhmer, P; Meyer, B y Jacobsen, HJ. (1995). Alta frecuencia inducida por tidiazuron de inducción de brotes y regeneración de plantas en callos de guisantes derivados de protoplastos. *Plant Cell Reports*, 15(1–2), 26–29.
- Bortesi, L; Fischer, R. 2014. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnol. Adv.* 33: 41-52
- Carlota, F; Trabace T y Sunseri F. 1997. High frequency of plant regeneration in sunflower from cotyledon way somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 16: 295 - 298.
- CENTA (Centro Nacional De Tecnología Agropecuaria y Forestal). 1996. Guía Técnica Cultivo de Frijol. Programa de Granos Básicos. San Andrés, La Libertad, El Salvador, C.A.

- CENTA (Centro Nacional De Tecnología Agropecuaria y Forestal). 2008 Guía Técnica para el Manejo de Variedades de Frijol. Programa de Granos Básicos. 24.
- CENTA (Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal). 2014. CENTA Costeño II. Variedad de frijol grano rojo para condiciones de humedad limitada y altas temperaturas. Programa de Granos Básicos.
- CENTA (Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal). 2015. El cultivo de frijol en El Salvador.
- CENTA (Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal). 2018. CULTIVO DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.). Programa de granos básicos. 37.
- Chandra, A y Pental, D. (2003). Regeneración y transformación genética de leguminosas de grano: Una visión general. *Ciencia actual*, 84(3), 381–387.
- Cheng, M; His, DCH and Phillips, GC. 1992. In vitro regeneration of Valencia type Peanut (*Arachis hypogaea* L.) from Cultured Petiolules, Epicotyl Sections and Other Seedling Explants." *Peanut Science* 19: 82-87.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1984. Morfología de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Cali. Colombia.
- Criollo, H; Insuasti, K; Delgado, W. 2016. Regeneración *in vitro* de plántulas de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav. Sendt). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*. 253.
- Collado, R; García, LR; Angenon, G, Torres, D; Romero, C; Bermúdez, I & Veitía, N. 2011. Formación de embriones somáticos a partir de cotiledones inmaduros en *Phaseolus vulgaris* cv. CIAP 7247 (en línea). Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Cuba. *Biotecnología Vegetal* Vol. 11, No. 4: 235 – 240. Consultado el 5 de jul. 2021. Disponible en: <https://biblat.unam.mx/hevila/Biotecnologiavegetal/2011/vol11/no4/4.pdf>
- Delgado-Sánchez, P; Saucedo Ruiz, M; Guzmán Maldonado, SH; Villordo Pineda, E; González Chavira, M; Fraire Velázquez, S; Acosta Gallegos, JA; Mora Avilés, A. 2006. An organogenic plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant science*. 170(4):822-827.
- Din, AR; Ahmad, FI; Wagiran, A; Samad, AA.; Rahmat, Z. & Sarmidi, R. (2016). Improvement of efficient in vitro regeneration potential of mature callus induced from Malaysian upland rice seed (*Oryza sativa* cv. Panderas). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(1), S69-S77. doi: 10.1016/j.sjbs.2015.10.022

- Estrada, G; Guillén, G; Olivares, JE; Díaz, C; Alvarado, X; Sánchez, F. 2007. La transformación genética y genómica del frijol. *Biotecnología*. 14:281-290.
- Evans, DA; Sharp, WR. y Flick, CE. 1981. Growth and behavior of cell cultures: Embryogenesis and organogenesis. En: Thorpe, T. A. (ed.). *Tissue culture: Methods and applications in agriculture*. Academic Press, Nueva York. p. 45-113.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 1989. *Food balance sheets, 1975-77 Average*. Roma, Italia.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2018. *Legumbres. Pequeñas semillas, grandes soluciones*. ISBN 978-92-5-131129-5. 292.
- Flick, CE; Evans, DA. y Sharp, WR. 1983. Organogenesis. En: Evans, D. A.; Sharp, W. R.; Ammirato, P. V. y Yamada, Y. (éds.). *Handbook of plant cell culture*. MacMillan Publishing, Nueva York. v. 1, p. 13-81.
- Freytag, GF; Debouck DG. 2002. Taxonomy, distribution, and ecology of the genus *Phaseolus* (Leguminosae-Papilionideae) in North America, Mexico and Central America. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 36(2). 95-104.
- Gatica-Arias, AM; Valverde, JM; Fonseca, PR; Melara, MW. 2010. In vitro plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris*): effect of N6-benzylaminopurine and adenine sulphate. *Electronic Journal of Biotechnology*.13:1-8.
- Gentry, HS. 1969. Origin of the common bean, *Phaseolus vulgaris*. *Econ. Bot.* 23:55-69.
- George, EF. 1993. *Plant propagation by Tissue Culture. The Technology. Part 1. Exegetics Ltd.* Edington. 574 pp
- George, EF; Debergh, PC. 2008. Micropropagation: Uses and Methods. *Plant propagation by tissue culture*. 29-64.
- Gepts, P; Aragão, FJL; Barros, E; Blair, MW; Brondani, R; Broughton, W; Galasso, I; Hernández, G; Kami, J; Lariguet, P. 2008. Genomics of *Phaseolus* beans, a major source of dietary protein and micronutrients in the tropics. *Genomics of Tropical Crop Plants*.113-143.
- Grajales, M; Beebe, SE; Rao, IM; Cajiao, C. 2008. Selection for drought resistance in common bean also improves yield in phosphorus limited and favorable environments. *Crop science*. 48(2):582-592.
- Gueye, B; Morcillo, F; Collin, M; Gargani, D; Overvoorde, P; Aberlenc-Bertossi, F; Tranbarger, TJ; Sane, D; Tregear, JW; Borgel, A. and Verdeil, JL. 2009. Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in response to 2,4-D treatment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 99: 35-45.

- Hnatuszko-Konka, K; Kowalczyk, T; Gerszberg, A; Glinska, S; Grzegorzczak-Karolak, I. (2019). Regeneration of *Phaseolus vulgaris* from epicotyls and hypocotyls via direct organogenesis.
- Kosturkova, G; Mehandjiev, A; Dobрева, I & Tzvetkova, V. 1997. Sistemas de regeneración de embriones inmaduros de genotipos de guisantes búlgaros. Instituto de Genética. Academia de Ciencias de Bulgaria. Revista Plant Cell Reports 48: 139–142.
- Kwak, M; Kami, JA; Gepts, P. 2009. The putative Mesoamerican domestication center of *Phaseolus vulgaris* is located in the Lerma-Santiago Basin of Mexico. Crop Science. 49:554-563.
- Kwapata, K; Sabzikar, R; Sticklen, MB; Kelly, JD. 2010. In vitro morphogenesis and regeneration studies in common beans. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 100:97-105.
- Lizana, C; Wentworth, M; Martinez, JP; Villegas, D; Meneses, R; Murchie, EH; Pastenes, C; Lercari, B; Vernieri, P; Horton, P. 2006. Differential adaptation of two varieties of common bean to abiotic stress I. Effects of drought on yield and photosynthesis. Journal of Experimental Botany. 57(3):685-697.
- MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería). 2012. Consultado 04 feb. 2021. Disponible en: [http://old.mag.gob.sv/index.php?option=com\\_phocadownload&view=category&download=345:informe-de-encuesta-de-intenciones-de-siembra-de-granos-basicos-2012&id=19:informes-de-primera-encuesta-agropecuaria-de-propositos-multiples&Itemid=227](http://old.mag.gob.sv/index.php?option=com_phocadownload&view=category&download=345:informe-de-encuesta-de-intenciones-de-siembra-de-granos-basicos-2012&id=19:informes-de-primera-encuesta-agropecuaria-de-propositos-multiples&Itemid=227)
- Malik, KA; Saxena, PK. 1992. Thidiazuron induces high frequency shoot regeneration in intact seedlings of pea (*Pisum sativum*), chickpea (*Cicer arietinum*), and lentil (*Lens culinaris*), Aust. J. Plant physiol.
- McClean, P; Lavin, M; Gepts, P; Jackson, SA. 2008. *Phaseolus vulgaris*: a diploid model for soybean. Springer Science & Business. 55-76.
- McKently, AH; Moore, GA. and Gardner, FP. 1990. In vitro plant regeneration of peanut from seed explants. Crop Sci. 30: 192-196. 33.
- McKently, AH; Moore, G.A. and Gardner, FP. 1991. Regeneration of peanut and perennial peanut from cultured leaf tissue. Crop Sci. 31:833-837
- McKently, AH. 1991. Direct somatic embryogenesis from axes of mature peanut embryos. In vitro Cell Dev. Biol. 27P: 197-200. 31.
- Miranda-Colín, S. 1967. Origen de *Phaseolus vulgaris* L. (frijol común). Agrociencia 1:99-104.

- Moh, CC. 1972. Induce seeds-coat colour mutations in beans and their significance for beans improvement. In: Induce Mutations and Plants.
- Mroginski, L; Roca, WM. 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. (en línea). Consultado 24 de abr. 2021. Disponible en
- Murashige, T y Skoog, F. 1962. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobáceo tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Murashige, T. 1964. Analysis of the inhibition of organ formation in tobáceo tissue culturé by gibberellin. *Physiol. Plant.* 17:636-643. 1974. Plant propagaron through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25:135-165.
- Murashige, T y Nakano, R. 1968. The light requirement for shoot initiation in tobáceo callus cultures. *Amer. J. Bot.* 55(supl.):710.
- Narváez, GS. 2009. Regeneración de brotes a partir de hojas provenientes de plantas *in vitro* de rosa variedad Akito (*Rosa sp.* Var Akito). Sangolquí.
- Ozcan, S; Barghchi, M; Firek, S & Draper, J. 1992. Regeneración de brotes adventicios de alta frecuencia a partir de cotiledones inmaduros de guisante (*Pisum sativum* L.). Departamento de Botánica, Universidad de Leicester. Reino Unido. *Revista Plant Cell Reports* 11:44-47.
- Papa, R; Gepts, PL. 2003. Asymmetry of gene flow and differential geographical structure of molecular diversity in wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mesoamerica. *Theoretical and Applied Genetics.* 106:239-250.
- Parrot, WA; Bailey, RE; Durham and Mathews, HV. 1992. Tissue culture and regeneration of legumes. In *Biotechnology and Crop Improvement in Asia*, ed. J.P.Moss. p. 115-148. India: ICRISAT.
- Parsons, DB. 1999. Fríjol y chícharo. 2º edición. México.
- Pathak, N; Tiwari, S y Mishra, MK. 2017. Regeneración de plántulas de cultivo de explantes inmaduros en *Glycine max* (L.) Merrill. *Investigación de leguminosas: una revista internacional*, 40 (1), 69-73.
- Pierik, RLM y Van Der Meys, JAJ. 1974. Plantlet formation in callus tissue of *Anthurium andreaeanum* Lind. *Scientia Hort.* 2:193.
- Polanco MC, Peláez MI, Ruiz ML (1988) Factors affecting callus and shoot formation in *in vitro* cultures of *Lens culinaris* Medik. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 15:175–182
- Polanco MC. (1997). Effect of benzylaminopurine on *in vitro* and *in vivo* root development in lentil, *Lens culinaris* Medik. Area de Genética, Facultad de Biología, Universidad de León, E-24071 León, Spain.

- Pradrip, M and Chandra, RV. 2013. Rapid In Vitro Plant Regeneration of Black Gram (*Vigna mungo* L. Hepper) Var. Sarala, an Important Legume Crop
- Raju, MVS. y Mann, HE. 1970. Regenerative studies on the detached leaves of *Echeveria elegans*: Anatomy and regeneration of leaves in sterile culture. *Can. J. Bot.* 48:1887-1891.
- Saxena, PK; King, J. 1987. Morphogenesis in lentil: plant regenerations from callus culture of *Lens culinaris* Medik. *Plant sci.*
- Singh, RK; Srivastava, HK; Jaiswal, DV. 2002. High frequency multiple shoot regeneration from decapitated embryo axes of chickpea and establishment of plantlets in the open environment. *Biol, Plant.*
- Somers, DA; Samac, DA, Olhoft, PM. (2003). Avances recientes en la transformación de leguminosas. *Plant Physiol* 131:892–899
- Superintendencia de Competencia. 2015. Caracterización de la agroindustria del frijol rojo y sus condiciones de competencia en El Salvador (2007-2014).
- Svetleva, D; Velcheva, M; Bhowmik, G. 2003. Biotechnology as a useful tool in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) improvement. *Euphytica* 131:189–200.
- Thorpe, TA. 1980. Organogenesis in vitro: Structural, physiological and biochemical aspects. *International review of cytology, Supplement 11A.* Academic Press, Nueva York. p.71-111.
- Velcheva, M., Svetleva, D., Petkova, S., Perl, A. 2005. In vitro regeneration and genetic transformation of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) - problems and progress. *Scientia Horticulturae.* 107:2-10.
- Zelada, LI. 2014. La producción y comercialización del frijol en El Salvador.

## 9. ANEXOS



Figura A-1. Ubicación y Metodología de campo para la obtención de vainas inmaduras de frijol Var. CENTA Costeño II: F1: Ubicación del vivero. F2: Preparación del sustrato para siembra del frijol. F3: Siembra del frijol. F4: Cultivo del frijol.

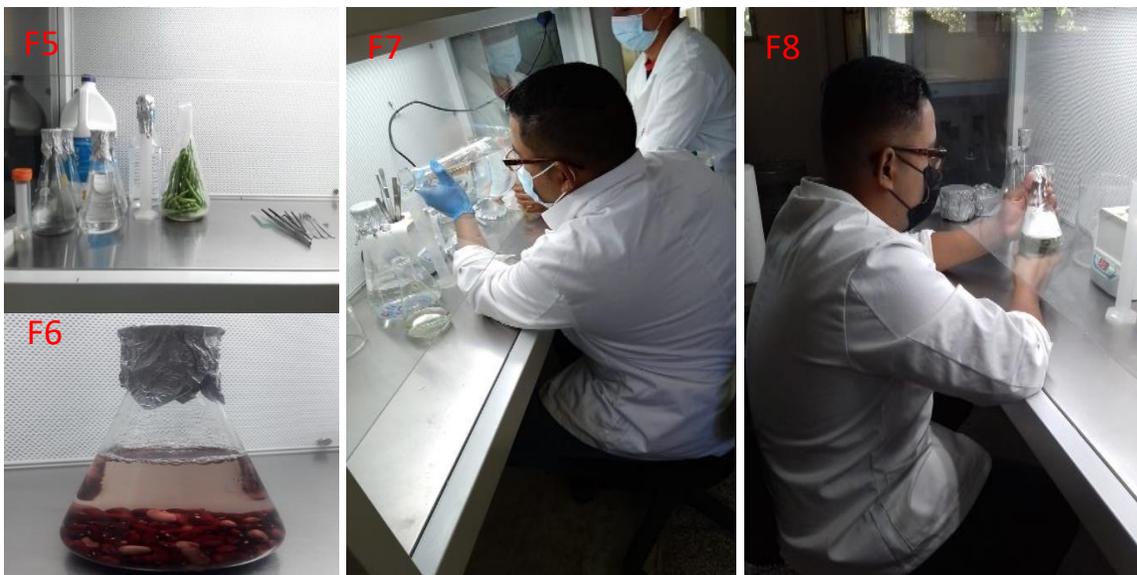


Figura A-2. Desinfección de semillas maduras y vainas de frijol CENTA Costeño II: F5: Materiales para la desinfección. F6: Semillas maduras de frijol. F7: Preparación de la solución de hipoclorito de sodio. F8: Desinfección de semillas y vainas.

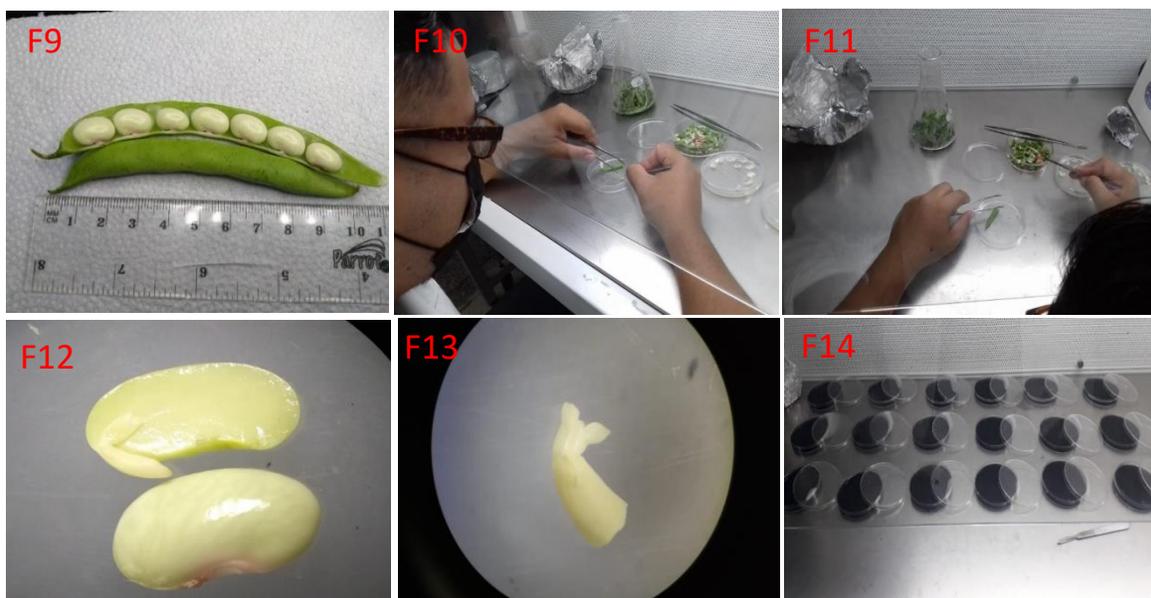


Figura A-3. Disección de vainas y semillas de frijol Var. CENTA Costeño II: F9: Vainas de frijol con semillas inmaduras. F10: Disección de vainas y semillas de frijol. F11: Obtención de semillas inmaduras. F12: Semillas inmaduras disectada. F13: Eje embrionario de semillas maduras e inmaduras. F14: Medios de germinación.

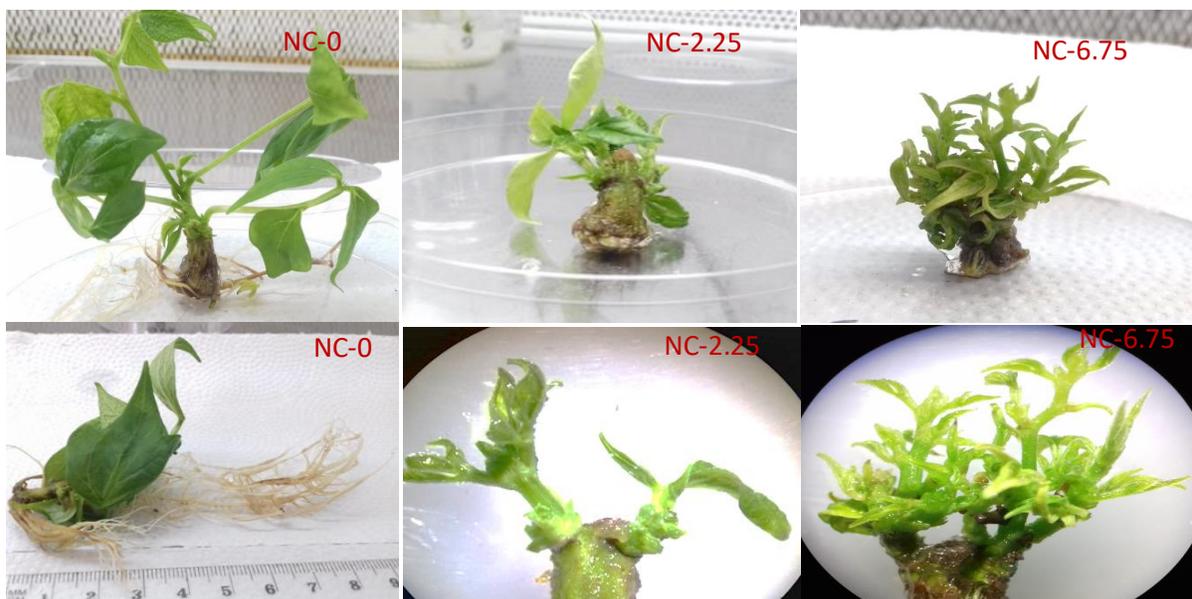


Figura A-4. Regeneración *in vitro* de semillas maduras Var. CENTA Costeño II: NC-0: Nudo cotiledonal con  $0 \text{ mg.l}^{-1}$  de BAP. NC-2.25: Nudo cotiledonal con  $2.25 \text{ mg.l}^{-1}$  de BAP. NC-6.75: Nudo cotiledonal con  $6.75 \text{ mg.l}^{-1}$  de BAP.

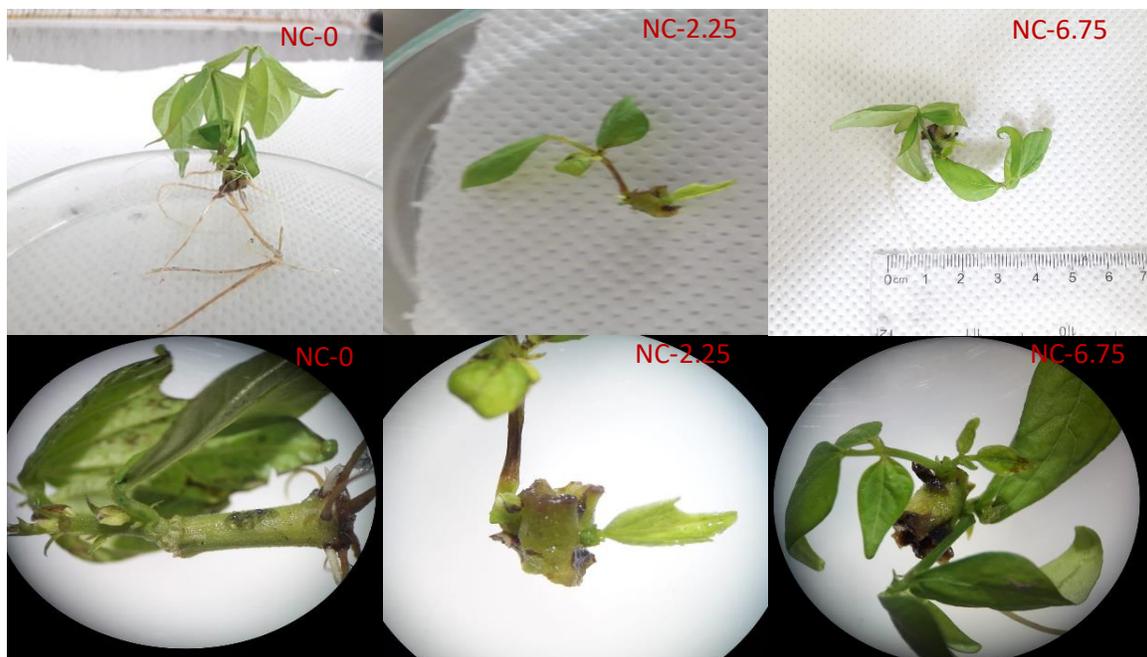


Figura A-5. Regeneración *in vitro* de semillas inmaduras Var. CENTA Costeño II: NC-0: Nudo cotiledonal con  $0 \text{ mg.l}^{-1}$  de BAP. NC-2.25: Nudo cotiledonal con  $2.25 \text{ mg.l}^{-1}$  de BAP. NC-6.75: Nudo cotiledonal con  $6.75 \text{ mg.l}^{-1}$  de BAP.