

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN

Código AI-2307

NOMBRE DE LA INVESTIGACION:

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

TITULO A OBTENER: INGENIERO AGRONOMO

AUTORES:

Nombre, Apellidos	Institución y Dirección	Teléfono y Email	Firma
Br. Oscar Stanley Rivera Rivera	36 ave norte s Apto Larinez casa # 3, Bo Lourdes, San Salvador		
Ing. Agr. M.Sc. Julio Cesar Ortiz Pavón	Universidad de El Salvador Departamento de Fitotecnia		
Ing. Agr. Oscar Alonso Rodríguez Gracias	Universidad de El Salvador Departamento de Fitotecnia		

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: San salvador, Ciudad Universitaria, septiembre de 2023.	

Regeneración *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) variedad CENTA Costeño II, mediante organogénesis directa de semillas inmaduras y maduras Rivera Rivera, OS1; Ortiz-Pavón, JC2; Rodríguez-Gracias, OA2. 2 docentes del Departamento de Fitotecnia de la Facultad de Ciencias agronómicas, Universidad de El Salvador.

Resumen

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) constituye una importante fuente para la alimentación humana. Por ello, la búsqueda de variedades con mayores potencialidades es un reto eminente en esta especie. El cultivo de tejidos en *Phaseolus vulgaris* L. resulta muy difícil, lo cual es causado entre otros factores por su condición variedad dependiente y su recalcitrancia. Por ello el objetivo de esta investigación fue evaluar la regeneración del frijol común utilizando N6- bencilaminopurina (BAP) para la regeneración *in vitro* de la variedad CENTA Costeño II mediante la utilización de explantes de maduras (12 meses post cosecha, MPC) y explantes de semillas inmaduras (25 días después de la floración, DDF). Se evaluaron los indicadores números de brotes, número de hojas y número de raíces y la eficiencia de regeneración. Se cosecharon vainas inmaduras de 25 días después de floración y se diseccionaron ejes embrionarios para precultivarse en medios de MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementados con 1 mg.l⁻¹ de BAP y 1 mg.l⁻¹ de AIA (Ácido Indol Acético). Luego se obtuvieron nudos cotiledonales de las plántulas y fueron transferidos a diferentes concentraciones de BAP (0, 2.25 y 6.75 mg.l⁻¹). Se determinó que los nudos cotiledonales de semillas maduras en dosis de 6.75 de BAP responden aparentemente de manera más eficiente que con semillas inmaduras de 25DDF a pesar de que no hubo diferencia significativa en la utilización de los explantes de diferente edad. 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 para la variedad CENTA Costeño II.

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

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).

Sin embargo, el mayor obstáculo que limita el potencial de las herramientas biotecnológicas para el mejoramiento genético de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) está relacionado a su baja respuesta tanto a la regeneración *in vitro* como a la transformación genética, ya que las leguminosas 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 de esta investigación fue 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 de la variedad CENTA Costeño II y desarrollar protocolos de regeneración y mejoramiento de esta.

Materiales y métodos

Descripción del estudio

La investigación se llevó a cabo en el área de cultivo de tejidos vegetales 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.

Adquisición del material vegetal.

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 (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.

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 llenaron 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 aplicó 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.

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. 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/100ml) en agitación constante durante 20 minutos. Posteriormente, se realizaron 6 lavados con agua destilada estéril.

Se realizó la extracción de las semillas de las vainas y se disectaron los embriones cigóticos con un cotiledón. Estos explantes se colocaron en medios de cultivo de germinación que consistió en sales minerales MS (Murashige y Skoog 1962) con 100 mg.l⁻¹ de mioinositol, 0.1 mg.l⁻¹ de tiamina, 0.5 mg.l⁻¹ de ácido nicotínico, 0.5 mg.l⁻¹ de piridoxina, 2 mg.l⁻¹ de glicina, 1 mg.l⁻¹ de Bencilaminopurina (BAP), 0.05 mg.l⁻¹ de Ácido indol acético (AIA), 30 g.l⁻¹ sacarosa y 3 g.l⁻¹ agar. El pH del medio se ajustó a 5.7 con NaOH o HCl antes de esterilizarlo en autoclave a 120° 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.

Dissección de explantes, inducción y regeneración de brotes

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

Para la inducción y regeneración de brotes se utilizaron tres frascos tipo Gerber con 25 ml de medio, 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 $58 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$.)

Semillas maduras

Desinfección de semillas y germinación

Se utilizo semillas de la variedad de frijol (CENTA Costeño II) de 12 meses postcosecha. 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^{-1} de mioinositol, 0.1 mg.l^{-1} de tiamina, 0.5 mg.l^{-1} de ácido nicotínico, 0.5 mg.l^{-1} de piridoxina, 2 mg.l^{-1} de glicina, 1.13 mg.l^{-1} de BAP, 30 g.l^{-1} sacarosa y 3 g.l^{-1} agar. El pH del medio se ajustó a 5.7 con NaOH o HCl antes de esterilizarlo en autoclave a 120° durante 20 minutos. Se cultivaron un total de 300 de 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 $25^{\circ} \pm 2^{\circ}$ y en absoluta oscuridad durante tres días.

Dissección de explantes, 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.

Evaluación de la respuesta morfogénica

La evaluación de la respuesta a la regeneración *in vitro* se evaluó para cada edad de la semilla de frijol mediante los siguientes indicadores: número de brotes, número de hojas y número de raíces. Adicionalmente se calculó la eficiencia de regeneración a través de la fórmula descrita por Gatica *et al.* (2010): $[(\text{nudos con brotes de } \textit{novo} / \text{total de número de nudos}) \times 100]$. La respuesta morfogénica fue evaluada a los 28 días (maduras) y 21 días (inmaduras) de iniciado el ensayo con los nudos.

Análisis Estadístico

A todas las variables se les aplicaron el Análisis de Varianza (ANVA), específicamente un arreglo factorial 2x3 con los diferentes factores: el factor A que fueron 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). Se aplicó la prueba estadística de comparación de medias de Tukey con un nivel de significancia estadística (alfa) α del 1% = 0.05. Se utilizaron hojas de cálculo de Microsoft Excel® y el programa estadístico INFOSTAT 2022 para el análisis respectivo.

Resultados

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

La formación de brotes comenzó con la hinchazón de los nudos cotiledonales y el cambio de color de blanco a verde. Las diferentes yemas axilares se multiplicaron cultivándolos en el medio de inducción hasta que se desarrollaron los brotes (Figura 1). El Cuadro 1 muestra el efecto de la edad de la semilla sobre el número promedio de brotes, hojas y raíces inducidas a partir de nudos cotiledonales de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) independientemente de la concentración de BAP. El número promedio de brotes no difirió significativamente entre las edades de frijol común evaluados pero si en el número de hojas, raíces y en la eficiencia de regeneración. A pesar de no mostrar diferencia significativa en brotes pero si en hojas raíces y eficiencia, la mejor edad del explante para la regeneración *in vitro* fue las semillas maduras.

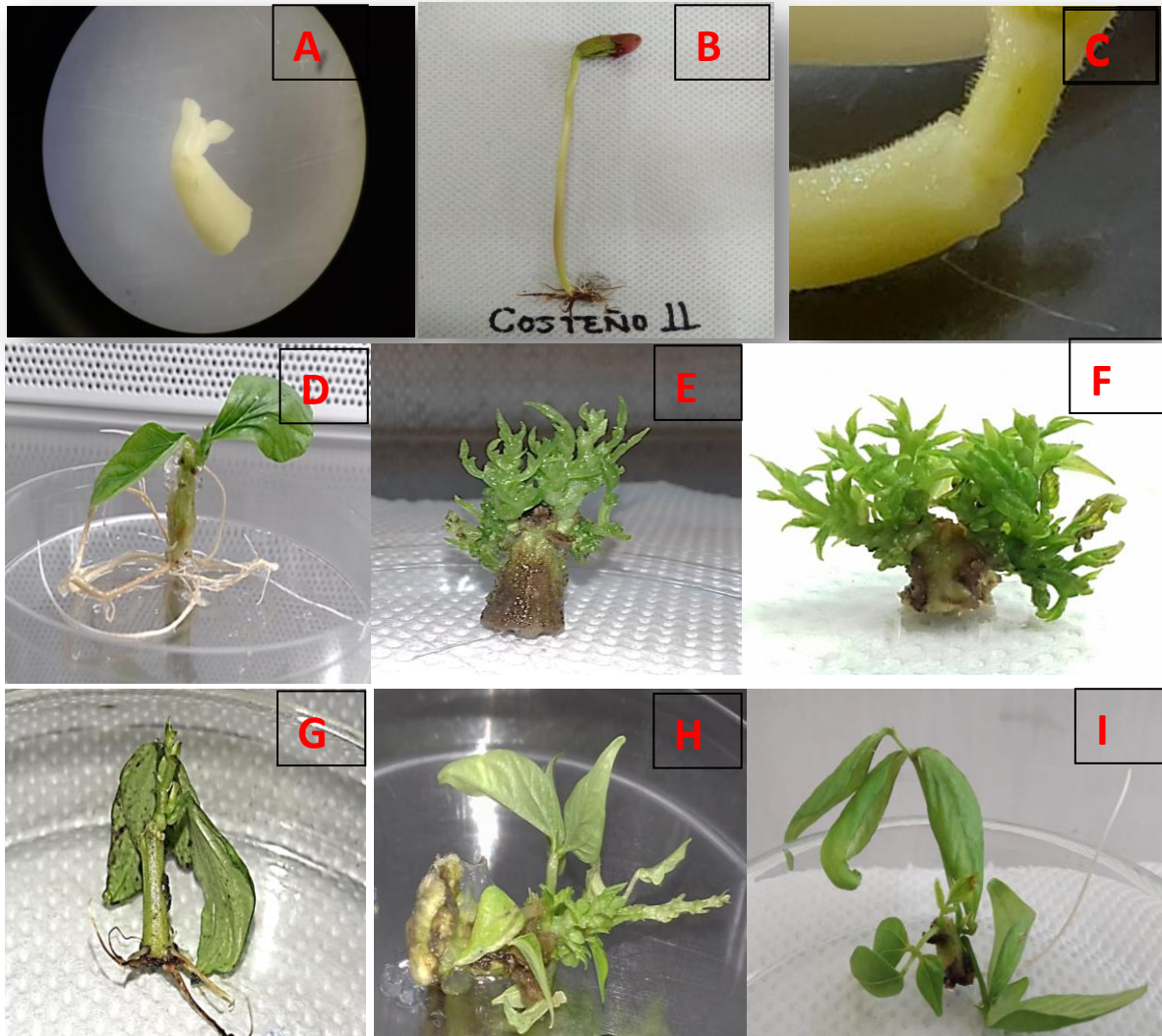


Figura 1. Regeneración morfológica a partir de nudos cotiledonales de semillas maduras e inmaduras de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L) de Var CENTA Costeño II

(A). Eje embrionario para germinación en ambas edades de semillas de frijol. (B). Plantula de frijol para extracción de nudos cotiledonales respectivamente utilizados como explantes en diferentes concentraciones de BAP. (C). Nudo cotiledonal extraído de la plántula de frijol en ambas edades. (D). Regeneración in vitro de semilla madura en 0 BAP. (E). Regeneración in vitro de semilla madura en 2.25 BAP. (F). Regeneración in vitro de semilla madura en 6.75 BAP. (G). Regeneración in vitro de semilla inmadura en 0 BAP. (H). Regeneración in vitro de semilla inmadura en 2.25 BAP. (I). Regeneración in vitro de semilla inmadura en 6.75 BAP.

Cuadro 1. Efecto de la edad de la semilla sobre el número promedio de brotes, hojas y raíces inducidos a partir de nudos cotiledonales de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) independientemente de la concentración de BAP.

EDADES DE LA SEMILLA	BROTOS¹	HOJAS¹	RAICES¹	EFICIENCIA DE REGENERACION¹
INMADURAS (25 DDF)	3.23 ± 0.29 ^{2a}	3.02 ± 0.29 ^{2a}	0.36 ± 0.07 ^{2a}	68.5 ± 4.00 ^{2a}
MADURAS (12 MPC)	3.4 ± 0.36 ^{2a}	5.13 ± 0.24 ^{2b}	2 ± 0.41 ^{2b}	91.3 ± 1.26 ^{2b}

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

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

El efecto de la dosis de BAP (0, 2.25 y 6.75 mg.l⁻¹) sobre el número promedio de brotes, hojas y raíces de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) independientemente de la edad de la semillas

El efecto de la concentración de BAP sobre el número medio de brotes, raíces y hojas inducidos a partir de nudos cotiledonales de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) independientemente de la edad de la semilla se muestra en el Cuadro 2. Independientemente de la edad de la semilla, no difirió estadísticamente en el número de brotes, pero si se observaron diferencias significativas en el número de hojas, raíces y eficiencia de regeneración formadas entre los tratamientos evaluados. por explante se obtuvo en el medio de inducción agotado de BAP. Se observó que a medida que aumentaban las concentraciones de BAP, disminuía el número de raíces por explante.

Cuadro 2. Efecto de las dosis de BAP sobre el número promedio de brotes, hojas y raíces inducidos a partir de nudos cotiledonales de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) independientemente de la edad de la semilla.

DOSIS DE BAP (mg.l⁻¹)	BROTOS¹	HOJAS¹	RAICES¹	EFICIENCIA DE REGENERACION¹
0	3 ± 0.45 ^{2a}	2.58 ± 0.17 ^{2a}	3.54 ± 0.37 ^{2a}	64.4 ± 2.65 ^{2a}
2.25	3.34 ± 0.30 ^{2a}	3.34 ± 0.24 ^{2a}	0 ± 0.00 ^{2b}	75.5 ± 3.88 ^{2a}
6.75	3.61 ± 0.22 ^{2a}	6.31 ± 0.20 ^{2b}	0 ± 0.00 ^{2b}	100 ± 0.00 ^{2b}

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

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

Efecto de la combinación de la madurez de la semilla (factor A) y los medios de cultivo con las diferentes dosis de BAP (factor B) sobre la regeneración *in vitro*

El efecto de la combinación de la edad de la semilla y la concentración de BAP sobre el número medio de brotes, raíces y hojas inducidos a partir de nudos cotiledonales de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) se muestra en el cuadro 3. Puesto que, en los medios con ausencia de BAP no se indujeron yemas organogénicas después de 21 días (inmaduras) y 28 días (maduras) de cultivo. Mientras que la adición de BAP al medio de cultivo mejoró la formación de brotes múltiples en ambos tipos de explantes de ambas edades. Para nudos cotiledonales de semillas madura mostro el mayor promedio de brotes, hojas y raíces con la concentración de 6.75 mg.l⁻¹ de BAP. Los porcentajes de eficiencia de los medios suplementados con BAP fueron significativos en comparación a los medios con ausencia de BAP.

Cuadro 3. Efecto de la combinación de la edad de las semillas (factor A) y los medios de cultivo con las diferentes dosis de BAP (factor B) sobre el número promedio de brotes, hojas y raíces inducidos a partir de nudos cotiledonales de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).

EDAD DE LA SEMILLAS	DOSIS	BROTOS ¹	HOJAS ¹	RAICES ¹	EFICIENCIA ¹
INMADURAS	0	6 ± 0.08 ^{2a}	1.78 ± 0.14 ^{2c}	1.08 ± 0.03 ^{2b}	47.22 ± 0.65 ^{2a}
MADURAS	0	0 ± 0 ^{2b}	3.37 ± 0.14 ^{2bc}	6 ± 0.08 ^{2a}	81.48 ± 0.87 ^{2ab}
INMADURAS	2.25	1.44 ± 0.07 ^{2b}	1.78 ± 0.11 ^{2c}	0 ± 0 ^{2c}	58.33 ± 4.54 ^{2ab}
MADURAS	2.25	5.24 ± 0.15 ^{2a}	4.91 ± 0.04 ^{2abc}	0 ± 0 ^{2c}	92.59 ± 0.87 ^{2ab}
INMADURAS	6.75	2.25 ± 0.06 ^{2b}	5.51 ± 0.20 ^{2ab}	0 ± 0 ^{2c}	100 ± 0 ^{2b}
MADURAS	6.75	4.96 ± 0.13 ^{2a}	7.11 ± 0.15 ^{2a}	0 ± 0 ^{2c}	100 ± 0 ^{2b}

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

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

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 utilizó 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, Aguirre y Melendez (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; Anju and McHughen. 1986; Saxena and King. 1987; Polanco *et al.* 1988; Malik and Saxena. 1992; Polanco *et al.* 1997; Hnatuszko-Konka, *et al.* 2019). En la investigación realizada se evaluaron tres dosis de BAP (0, 2.25 y 6.75 mg.l⁻¹) y se encontró que la dosis 6.75 mg.l⁻¹ 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⁻¹ 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 6-bencilaminopurina (BAP) (0.5 y 1.0 mg.l⁻¹), obteniendo su mejor respuesta con la mayor dosis de 1 mg.l⁻¹ 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⁻¹ de BAP. La regeneración de brotes se logró en medio B5 suplementado con 1.0 mg.l⁻¹ 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 Pradit *et al* (2015), 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.

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 (Aguirre y

Melendez, 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⁻¹ de BAP mostró una mayor formación de brotes y regeneración completa de la planta (83%), mientras que la dosis 5 mg.l⁻¹ 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⁻¹) si producen mejoras en la regeneración con la dosis de 6.75 mg.l⁻¹ 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⁻¹ 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 (68.3 %) se alcanzó en medio MS suplementado con 2.0 mg.l⁻¹ de BAP y 1.5 mg.l⁻¹ de NAA después de 8 semanas de cultivo.

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. Además 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. Por otro lado, en cuanto a la dosis adecuada en la regeneración *in vitro* de *Phaseolus vulgaris*, los mejores resultados se obtuvieron con 6.75 mg.l⁻¹ 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⁻¹ de BAP.

Los resultados de la utilización de semillas inmaduras también fueron afectados por el manejo agronómico que se le realizo durante su desarrollo hasta la cosecha de las vainas inmaduras.

Recomendaciones

La utilización de explantes de semillas maduras de la variedad CENTA Costeño II debido a su facilidad de manejo y obtención de explantes. También recomendar la adición de 6.75 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 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.

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.
- Anju Gulati, Pat Schryer y Alan McHughen. "Regeneración y microinjerto de brotes de lentejas". *Biología Celular y del Desarrollo In Vitro. Planta* 37, no. 6 (2001): 798–802. <http://www.jstor.org/stable/4293550>.
- 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.
- 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.
- Böhmer, P; Meyer, B y Jacobsen, HJ. (1995). Alta frecuencia inducida por tiazuron de inducción de brotes y regeneración de plantas en callos de guisantes derivados de protoplastos. *Plant Cell Reports*, 15(1–2), 26–29.

- Chandra, A y Pental, D. (2003). Regeneración y transformación genética de leguminosas de grano: Una visión general. *Ciencia actual*, 84(3), 381–387.
- 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.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 1989. Food balance sheets, 1975-77 Average. Roma, Italia.
- Gatica-Arias, AM; Valverde, JM; Fonseca, PR; Melara, MW. 2010. In vitro plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris*): effect of N6-benzylaminopurine and adenine sulphate. *Electronic Journal of Biotechnology*.13:1-8.
- George, EF. 1993. Plant propagation by Tissue Culture. The Technology. Part 1. Exegetics Ltd.Edington. 574 pp
- Gepts, P; Aragão, FJL; Barros, E; Blair, MW; Brondani, R; Broughton, W; Galasso, I; Hernández, G; Kami, J; Lariguet, P. 2008. Genomics of *Phaseolus* beans, a major source of dietary protein and micronutrients in the tropics. *Genomics of Tropical Crop Plants*.113-143.

- Grajales, M; Beebe, SE; Rao, IM; Cajiao, C. 2008. Selection for drought resistance in common bean also improves yield in phosphorus limited and favorable environments. *Crop science*. 48(2):582-592.
- Hnatuszko-Konka, K; Kowalczyk, T; Gerszberg, A; Glinska, S; Grzegorzczak-Karolak, I. (2019). Regeneration of *Phaseolus vulgaris* from epicotyls and hypocotyls via direct organogenesis.
- Kosturkova, G; Mehandjiev, A; Dobрева, I & Tzvetkova, V. 1997. Sistemas de regeneración de embriones inmaduros de genotipos de guisantes búlgaros (en línea). Instituto de Genética. Academia de Ciencias de Bulgaria. *Revista Plant Cell Reports* 48: 139–142. Consultado el 29 de jun. 2021. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1005841430607>
- 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
- 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.*
- 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.

- 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.) (en línea). Departamento de Botánica, Universidad de Leicester. Reino Unido. Revista Plant Cell Reports 11:44-47. Consultado el 2 de jul. 2021. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00231838>
- 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.
- 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.
- Saxena, PK; King, J. 1987. Morphogenesis in lentil: plant regenerations from callus culture of *Lens culinaris* Medik. Plant sci.
- Sancak, C; Mirici, S; & Özcan, S. 2000. High frequency shoot regeneration from immature embryo explants of Hungarian vetch. University of Ankara, Turquia.
- 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).

Vasanth, K., Lakshmiprabha, A. y Jayabalan, N. (2006). Aminoácidos mejoran la regeneración de plantas a partir del cotiledón y el eje embrionario del maní (*Arachis hypogaea* L.). Revista india de ciencia de cultivos, 1 (1-2), 79-83.

Veltcheva, M., Svetleva, D., Petkova, S., Perl, A. 2005. Invitro regeneration and genetic transformation of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) - problems and progress. Scientia Horticulturae. 107:2-10.

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