

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS**



“Organogénesis *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) var. CENTA EAC”

POR:

JENNIFER NOHEMY ROMERO PALACIOS

CIUDAD UNIVERSITARIA, AGOSTO 2023

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA



“Organogénesis *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) var. CENTA EAC”

POR:

JENNIFER NOHEMY ROMERO PALACIOS

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE:

INGENIERA AGRÓNOMO

CIUDAD UNIVERSITARIA, AGOSTO 2023

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR:

LIC. M.Sc. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL:

ING. M.Sc. FRANCISCO ANTONIO ALARCÓN SANDOVAL

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS

DECANO:

DR. FRANCISCO LARA ASCENCIO

SECRETARIO:

ING. AGR. BALMORE MARTINEZ SIERRA

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

ING. AGR. M.Sc. FIDEL ÁNGEL PARADA BERRIOS

DOCENTES DIRECTORES

ING. AGR. M.Sc. JULIO CÉSAR ORTÍZ PAVÓN

LIC. SANTOS WILMAR MORALES ARÉVALO

COORDINADOR GENERAL DE PROCESOS DE GRAUDACIÓN

ING. AGR. MARIO ALFREDO PÉREZ ASCENCIO

RESUMEN

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador ubicado en el Departamento de San Salvador en el período comprendido de septiembre de 2021 a abril de 2022.

El objetivo de esta investigación fue evaluar la respuesta a la regeneración *in vitro* mediante organogénesis directa e indirecta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) var. CENTA EAC en medios de cultivos suplementados con tres diferentes concentraciones de Benzilaminapurina (BAP). Para los métodos se utilizaron ejes embrionarios, nudos cotiledonales y meristemas como explantes y en ambos métodos se evaluaron los indicadores números de brotes, número de hojas, número de raíces y la eficiencia de regeneración. Para la organogénesis directa se cultivaron ejes embriogénicos de la variedad CENTA EAC en medio de cultivo semisólido, el cual consistió de las sales minerales MS y BAP (0,1 y 5 mg^l⁻¹). Se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas (p-valor= 0.0001 > 0.01) en el promedio de brotes por explante. Se observó que la dosis 5 mg^l⁻¹ de BAP presenta el mayor número de brotes por explante (0.86). Para la organogénesis indirecta se precultivaron nudos cotiledonales y meristemas de las variedades antes mencionadas por 14 días en TZD y AIA. Luego fueron transferidos al medio de inducción y regeneración de brotes (MIB), el cual consistió de las sales MS adicionadas con BAP (0, 2.25 y 6.75 mg^l⁻¹). Con el precultivo se obtuvo formación de brotes múltiples y se determinó que los nudos cotiledonales responden de manera más eficiente que los meristemas. Esto proporciona evidencia sobre cómo los medios de cultivo y los reguladores del crecimiento influyen en la regeneración del frijol común, cuando se busca un protocolo de transformación eficiente. En ambos métodos se observó formación de hojas y raíces.

Esta investigación se estableció un protocolo eficiente de regeneración de frijol común a través de organogénesis directa e indirecta, que puede servir de referencia para su posterior investigación de transformación genética.

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

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a Dios Todo poderoso, por haberme puesto en el camino a todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron a mi formación profesional, y al desarrollo de este trabajo.

A mi familia en agradecimiento especial, por acompañarme desde el inicio de mis estudios universitarios, por brindarme su apoyo económico, moral, espiritual, para poder lograr mi meta y sueño.

A mis asesores de tesis Ing. Agr. M.Sc. Julio César Ortíz Pavón y el Lic. Santos Wilmar Morales Arévalo, por el aporte académico y científico que me brindaron para realizar mi proyecto de investigación de tesis.

Al equipo de docentes que participaron en el comité observador In. Agr. Balmore Martínez Sierra, Ing. Agr. M.Sc. Sigfredo Ramos Cortez e Ing. Agr. Héctor Parada Flores por apoyarme en el desarrollo del proyecto de investigación.

A nuestros amigos y compañeros por su valiosa amistad, comprensión, apoyo y ayuda durante todos los años de estudio y durante la realización de mi trabajo de investigación.

A la Facultad de Ciencias Agronómicas, por facilitarnos sus instalaciones durante toda nuestra formación académica.

A la Universidad de El Salvador, nuestra alma mater, por ser la mejor institución para la formación profesional y que nos ha permitido crecer en ella a lo largo de nuestra carrera, por brindarnos las herramientas básicas necesarias para nuestro desarrollo académico.

Jennifer Romero

DEDICATORIA

A Dios Todopoderoso por haberme brindado la vida y permitirme levantarme cada día para dar lo mejor, por brindarme sabiduría, darme entendimiento, fortaleza y voluntad para cumplir mis metas.

A mis padres Carlos Romero y Noemí Palacios por darme el amor, cariño y apoyo; en especial a mi padre por apoyarme siempre, brindarme su amor incondicional, su comprensión, paciencia y sabios consejos.

A mi abuela (Q.E.P.D.) María de la Paz Mendoza por haberme acompañado en todo momento por brindarme su apoyo y comprensión; por haberme mostrado que con amor, fuerza, deseos y coraje todos los sueños se pueden cumplir y por darme el mejor ejemplo de respeto, superación, humildad y alegría.

A mis hermanas Leydi Romero y Yoselin Romero, por siempre apoyarme e incentivarme a seguir dando lo mejor de mí, por el acompañamiento, por su cariño, amor, comprensión y ayuda en cada momento de mi formación.

A mi tía Yeni Romero por el apoyo incondicional y acompañarme en mi formación profesional.

A mi novio César Laínez por acompañarme en los momentos de alegrías y tristezas a lo largo de mi carrera brindándome su apoyo, amor y comprensión.

A mis amigos y compañeros a quienes quiero y aprecio mucho por su comprensión y apoyo que me brindaron en todo momento.

Al Ing. Agr. M.S.c. Julio César Ortíz Pavón por su disposición y apoyo para lograr este objetivo.

A los docentes que han formado parte durante todo el proceso de mi educación a quienes les doy gracias por los valores inculcados y los conocimientos que he adquirido a través de todos estos años.

INDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
Resumen.....	IVV
Agradecimientos.....	V
Dedicatoria	VI
1. INTRODUCCION	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1. Generalidades del frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	2
2.2. Clasificación taxonómica de la especie.....	2
2.3. Morfología de la especie	3
2.4. Hábitos de crecimiento.....	3
2.5. Fenología del cultivo	4
2.6. Requerimientos edáfoclimáticos del cultivo.....	4
2.7. Manejo agronómico del cultivo.....	4
2.7.1. Preparación del suelo.....	4
2.7.2. Siembra.....	5
2.7.3. Fertilización	5
2.7.4. Control de malezas	6
2.8. Plagas y enfermedades.....	6
2.8.1. Mosca blanca	6
2.8.2. Mosaico común	7
2.8.3. Mustia hilachosa.....	7
2.8.4. Antracnosis.....	7
2.8.5. Mancha angular.....	7
2.8.6. Roya.....	8
2.9. Genética del cultivo de frijol.....	8
2.9.1. Acervo genético Andino.....	8
2.9.2. Acervo genético Mesoamericano	9
2.10. Importancia económica y social de cultivo de frijol.....	9
2.11. Variedad de frijol CENTA EAC	10
2.12. Mejoramiento genético del frijol.....	11
2.13. Cultivo <i>in vitro</i>	11
2.14. Micropropagación.....	11
2.15. Organogénesis y sus etapas	12
2.16. Ventajas de la técnica	12
2.17. Selección del explante.....	12

2.18. Protocolos de desinfección.....	12
2.19. Medios de cultivo.....	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1. Descripción del lugar de estudio	14
3.2. Metodología de laboratorio.....	14
3.3. Material vegetal	15
3.4. Organogénesis directa	15
3.4.1. Desinfección de semillas y disección de explantes.....	15
3.4.2. Inducción y regeneración de brotes (organogénesis directa).....	15
3.4.3. Evaluación de la respuesta morfogenica.....	16
3.5. Organogénesis indirecta.....	16
3.5.1. Desinfección de semillas y germinación.....	16
3.5.2. Disección de explantes (nudos cotiledonales y meristemos) e inducción de callo	16
3.5.3. Inducción y regeneración de brotes	17
3.5.4. Evaluación de la respuesta morfogenica.....	17
3.6. Metodología estadística.....	18
4. RESULTADOS	20
4.1. Organogénesis directa	20
4.1.1. Número de brotes.....	20
4.1.2. Número de hojas	20
4.1.3. Número de raíces.....	21
4.1.4. Eficiencia a la regeneración <i>in vitro</i> por organogénesis directa.....	22
4.2. Organogénesis indirecta a partir de nudos cotiledonales	23
4.2.1. Número de brotes.....	23
4.2.2. Número de hojas	24
4.2.3. Número de raíces.....	24
4.2.4. Eficiencia a la regeneración <i>in vitro</i> por organogénesis directa (nudos cotiledonales).....	25
4.3. Organogénesis indirecta a partir de meristemos	26
4.3.1. Número de brotes.....	26
4.3.2. Número de hojas	26
4.3.3. Número de raíces.....	27
4.3.4. Eficiencia a la regeneración <i>in vitro</i> por organogénesis indirecta (meristemos).....	28
5. DISCUSIÓN	29
6. CONCLUSIONES.....	33
7. RECOMENDACIONES	34
8. BIBLIOGRÁFIAS	35
9. ANEXOS	39

INDICE DE CUADROS

CONTENIDO	PÁGINA
Cuadro 1. Análisis de Varianza (ANVA) con un Diseño Completamente al Azar utilizado en los ensayos de Evaluación de la regeneración <i>in vitro</i> de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedades CENTA EAC mediante la técnica de organogénesis directa e indirecta.	19
Cuadro 2. Diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) a evaluar en medios de cultivo en el ensayo de organogénesis directa e indirecta en la variedad de frijol CENTA EAC.....	19

INDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	PÁGINA
Figura 1. Estrategia experimental de la investigación. El diagrama incluye los pasos planteados para la evaluación en ambas vías de regeneración <i>in vitro</i>	14
Figura 2: Eje embrionario en frijol común.....	16
Figura 3: Nudo cotiledonal y meristemo	17
Figura 4: Efecto de la Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de brotes a partir de ejes embrionarios de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	20
Figura 5: Efecto de la Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de hojas a partir de ejes embrionarios de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	21
Figura 6: Efecto de la Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de raíces a partir de ejes embrionarios de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	22
Figura 7: Efecto de la Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de brotes a partir de nudos cotiledonales de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	23
Figura 8: Efecto de la Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de hojas a partir de nudos cotiledonales de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	24

Figura 9: Efecto de la Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de raíces a partir de cotiledonales de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedad CENTA EAC.	
Figura 10: Efecto de la Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de brotes a partir de meristemos de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	26
Figura 11: Efecto de la Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de hojas a partir de meristemos de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	27
Figura 12: Efecto de la Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de raíces a partir de meristemos de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	28

INDICE DE ANEXOS

CONTENIDO	PÁGINA
Cuadro A-1. Efecto de Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de brotes, hojas, raíces y eficiencia de regeneración a partir de ejes embrionarios de frijol <i>Phaseolus vulgaris</i> L. variedad CENTA EAC.	39
Cuadro A-2. Resumen de análisis de varianza para la variable número de brotes a partir de ejes embrionarios por organogénesis directa.	39
Cuadro A-3. Resumen de análisis de varianza para la variable número de hojas a partir de ejes embrionarios por organogénesis directa.	40
Cuadro A-4. Resumen de análisis de varianza para la variable número de raíces a partir de ejes embrionarios por organogénesis directa.	40
Cuadro A-5. Efecto de Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de brotes, hojas, raíces y eficiencia de regeneración a partir de nudos cotiledonales de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. variedad CENTA EAC.....	40
Cuadro A-6. Resumen de análisis de varianza para la variable número de brotes a partir de nudos cotiledonales por organogénesis directa.....	41
Cuadro A-7. Resumen de análisis de varianza para la variable número de hojas a partir de nudos cotiledonales por organogénesis directa.....	41

Cuadro A-8. Resumen de análisis de varianza para la variable número de raíces a partir de cotiledonales por organogénesis directa.....	41
Cuadro A-9. Efecto de Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de brotes, hojas, raíces y eficiencia de regeneración a partir de meristemos de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. variedad CENTA EAC.....	41
Cuadro A-10. Resumen de análisis de varianza para la variable número de brotes a partir de meristemos por organogénesis directa.....	42
Cuadro A-12. Resumen de análisis de varianza para la variable número de raíces a partir de meristemos por organogénesis directa.....	42
Cuadro A-13. Protocolo específico de regeneración <i>in vitro</i> para ejes embrionario de la variedad de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) CENTA EAC.....	43
Cuadro A-14. Protocolo específico de regeneración <i>in vitro</i> para nudos cotiledonales de la variedad de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) CENTA EAC.....	45
Cuadro A-15. Protocolo específico de regeneración <i>in vitro</i> para meristemos de la variedad de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) CENTA EAC.....	47
Figura A-1. Disección de ejes embrionarios (vista en estereoscopio) Barras = 1 cm.....	49
Figura A-2. Disección de explantes (nudos cotiledonales y meristemis). Barras = 1 cm.	49
Figura A-3. Regeneración vía organogénesis directa a partir de ejes embrionarios de la variedad CENTA EAC de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. a los 21 y 42 días de cultivo in.....	50
Figura A-4. Regeneración vía organogénesis indirecta variedad CENTA EAC obtenidos de nudos cotiledonales a los 28 días de haber concluido el ensayo	51
Figura A-5. Regeneración vía organogénesis indirecta variedad CENTA EAC obtenidos a partir de meristemos a los 28 días de haber concluido el ensayo.....	52

1. INTRODUCCION

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una leguminosa de gran valor en la dieta alimenticia humana, ya que posee un alto contenido de proteína vegetal de buena calidad (22.1%), grasas (1.7%), carbohidratos (61.4%) y alto contenido de aminoácidos esenciales. La productividad del cultivo es altamente afectada por factores biológicos, edáficos y climáticos, que podrían ser superados con la obtención de variedades mejoradas (Delgado-Sánchez *et al.*, 2006)

Para el país el cultivo del frijol es de mucha importancia, ya que forma parte de la dieta alimenticia de los salvadoreños, genera fuentes de empleo y un sistema de subsistencia para las familias del área rural. Su índice de producción ha decrecido en los últimos años, ya que ha sido afectado por irregularidades del ambiente. Debido a estos sucesos, en otros países se han realizado estudios de mejora genética en la búsqueda de resistencia a sequía en muchos cultivos, especialmente en maíz y trigo (Veltcheva *et al.*, 2005).

La biotecnología juntamente con los programas de mejoramiento genético convencional permite facilitar el mejoramiento genético del frijol para resistencia o tolerancia a factores bióticos y abióticos, así como el incremento en la calidad de las semillas (Veltcheva *et al.*, 2005; CIAT, 2008; Gatica *et al.*, 2010).

La regeneración de plantas de frijol común a partir del cultivo de tejidos se ha descrito con cierto grado de éxito en los últimos años. No obstante, la regeneración *in vitro* es todavía un proceso difícil y de baja eficiencia (Gatica *et al.*, 2010). Asimismo, los efectos del genotipo en la capacidad regenerativa, así como en la reproducibilidad han sido factores limitantes (Delgado-Sánchez *et al.*, 2006, Kwapata *et al.*, 2010, Quintero-Jiménez *et al.*, 2010). Los avances de la investigación en el cultivo *in vitro* en otras especies vegetales abren la posibilidad de que esta técnica se incorpore a los programas convencionales de mejoramiento genético y permita mejorar la producción y la calidad del frijol.

Debido a que la regeneración *in vitro* es un factor importante a incorporar en los programas de mejoramiento asistidos por la biotecnología, se hizo la evaluación morfológica en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) var. CENTA EAC mediante la regeneración *in vitro* a partir de dos métodos diferentes. Además, se estableció un protocolo de regeneración *in vitro* de la variedad de frijol común CENTA EAC.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Generalidades del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L., $2n = 2x = 22$) corresponde a una de las leguminosas que poseen semillas comestibles más importantes para la humanidad y su cultivo es uno de los más ancestrales del mundo (Broughton *et al.*, 2003; Gepts, 2008; Ramírez y Rangel, 2011).

El frijol es un cultivo que ha sido sembrado desde hace 4000 años. Se considera nativo de la zona ubicada entre México y Guatemala (Tapia, 1988). Su amplia adaptación, ha permitido que sea una plantación de las más comunes en América. Intensamente cultivada desde el trópico hasta las zonas templadas, aunque es una especie termófila, es decir, no soporta las heladas. Se cultiva para obtener las semillas las cuales tienen un alto porcentaje de proteínas, alrededor de un 22% o más. La semilla puede ser consumida tanto en estado inmaduro como seco (Tapia, 1988).

Durante todo este tiempo ha venido desarrollándose una diversidad de tipos y calidades de frijol; se considera que en total existen alrededor de 150 especies, destacándose cuatro especies que el hombre ha domesticado: *Phaseolus vulgaris* L. (frijol común), *Phaseolus lunatus* L. (frijol blanco), *Phaseolus coccineus* L. (frijol ayocote), y *Phaseolus acutifolius* Gray (frijol tepari) (Broughton *et al.*, 2003).

La producción de frijol se reporta en 129 países de los cinco continentes. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO, 1991) América Latina es la zona de mayor producción y consumo con el 45% a nivel mundial, donde es considerado como uno de los productos básicos de la economía campesina.

2.2. Clasificación taxonómica de la especie

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) pertenece a la familia de las *Papilionaceas*, la más numerosa de las leguminosas y a una de las tribus de mayor valor económico como la *Faseoleas* (CIAT, 2008).

2.3. Morfología de la especie

Es una hierba trepadora, con hojas trifoliadas y legumbre dehiscente en dos valvas, su género es el *Phaseolus* y su especie es el *vulgaris*.

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 (Género *Rhizobium*) simbióticas que fijan el nitrógeno del aire. Las hojas son de dos tipos: a) hojas cotiledonales, las cuales son las dos primeras hojas que surgen luego de la emergencia epigea, siendo de forma acorazonada, sencilla y opuesta y b) hojas verdaderas, que son pinnadas, trifoliadas y pubescentes. La inflorescencia aparece en forma de racimo, en las axilas de las hojas (Parsons, 1999).

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. Al fruto se le denomina legumbre. El color de la vaina puede ser verde, amarillo, blanco o plateado. Las semillas, están encerradas en una vaina o legumbre. Existe una amplia variabilidad de semillas que difieren en tamaño, forma y color (Parsons, 1999).

2.4. Hábitos de crecimiento

Según CENTA (2008), el frijol común presenta los siguientes hábitos de crecimiento denominados como tipos y que van del uno al cinco:

- I) 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.
- II) 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.
- III) Tipo II B: Hábito de crecimiento indeterminado arbustivo: tallo erecto, con aptitud para trepar, termina en una guía larga.
- IV) Tipo III: Hábito de crecimiento indeterminado postrado: plantas postradas o semi-postradas con ramificación bien desarrolladas.

V) Tipo IV: Habito de crecimiento indeterminado trepador

2.5. Fenología del cultivo

Las etapas de desarrollo del frijol son diez: cinco de desarrollo vegetativo las cuales son V0: Germinación, V1: Emergencia, V2: Hojas primarias, V3: Primera hoja trifoliada, V4: Tercera hoja trifoliada, y cinco de desarrollo reproductivo R5: Prefloración, R6: Floración, R7: Formación de vainas, R8: Llenado de vainas, R9: Maduración, requiriéndose de 62 a 77 días después de la siembra para completar la madurez (Rosas, 2003).

2.6. Requerimientos edafoclimáticos del cultivo

El agua es vital para el crecimiento y rendimiento. Ambas situaciones dependen de su disponibilidad. Existen líneas y variedades que muestran buena tolerancia a deficiencias hídricas, lo cual permite rendimientos aceptables en esas condiciones. Dicha tolerancia puede estar basada en la mayor capacidad de extracción de agua de capas profundas del suelo. 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 (CENTA, 2008).

La importancia de la luz se fundamenta en primer lugar por su indispensable interferencia para la fotosíntesis, en segunda instancia afecta la fenología y morfología de la planta por medio de reacciones de fotoperiodo y elongación. El rango de elevación es amplio, pero en general se cultiva de 400 a 1500 msnm debido a la presencia de una diversidad de factores que intervienen. Requiere suelos fértiles con buen contenido de materia orgánica. Las texturas de suelo más adecuadas son las medias o moderadamente pesadas con buena aireación y drenaje ya que es un cultivo que no tolera suelos compactos. El pH óptimo fluctúa entre 6.5 y 7.5 dentro de este límite la mayoría de los elementos nutritivos del suelo presentan una máxima disponibilidad para la planta (Rosas, 2003).

2.7. Manejo agronómico del cultivo

2.7.1. Preparación del suelo

La preparación del terreno se inicia con un pase de arado a una profundidad de 20 a 30cm, seguido de dos pases de rastra, para obtener un suelo sin terrones y lograr suelos sueltos que ofrecen condiciones favorables para el establecimiento y desarrollo del cultivo, además de todo lo antes mencionado también se reduce la presencia de plagas y enfermedades (Rosas, 2003).

Para la preparación del terreno se recomienda incorporar los rastrojos, si en el cultivo anterior hubo poca o ninguna presencia de plagas y enfermedades. Eliminar los rastrojos mediante quema, o rotar cultivos o buscar otro sitio, si en el cultivo anterior se presentaron muchas enfermedades y plagas las cuales pueden permanecer en el suelo hasta tres años (CENTA, 2008).

2.7.2. Siembra

Para el cultivo de frijol común, se reconocen tres épocas de siembra: a) época de mayo, que inicia el 15 de mayo y finaliza el 15 de junio, cuando las lluvias están bien establecidas; b) época de agosto, en este caso la siembra oscila entre el 15 de agosto y el 15 de septiembre, la siembra generalmente está condicionada a la madurez fisiológica del maíz, cuando se siembra en relevo con este cultivo y c) época de apante, acá la siembra se efectúa bajo riego o humedad residual y se recomienda hacerla entre el 15 de noviembre y el 15 de diciembre (CENTA, 1992).

2.7.3. Fertilización

Al igual que la mayoría de las plantas el frijol requiere de varios elementos para crecer y desarrollarse adecuadamente (Parsons, 1999). La finalidad de la fertilización es poner a disposición de la planta los nutrientes que necesita para un buen rendimiento. Cuando los suelos son pobres o están agotados una fertilización adecuada proporciona los nutrientes necesarios para el buen crecimiento, desarrollo y productividad del cultivo (Rosas, 2003).

La fertilización se puede realizar al suelo aplicando a la siembra 90 kg de fórmula 18–46–0 por manzana y al aporco (25 a 30 días después de la siembra), aplicar en banda a la hilera de plantas, de 22 a 45 kg de urea por manzana, incorporándola inmediatamente mediante el aporco. La fertilización foliar se realiza para obtener cultivos de buen desarrollo y productivos, se pueden realizar de uno a dos aplicaciones de fertilizantes foliares, una semana después del aporco. Se debe evitar el exceso de fertilizante, ya que bajo condiciones de alta humedad se producen plantas demasiado vigorosas con tallos suculentos y frágiles (CENTA, 2008).

2.7.4. Control de malezas

Según Rosas (2003) un manejo adecuado de malezas permite que las plantas de frijol se desarrollen más vigorosas, pues no sufren por la competencia por espacio, luz, agua y nutrientes.

Se debe incorporar las malezas durante la preparación del terreno mediante un paso de arado profundo, luego complementar el control manual con el químico, según se describe a continuación: Control manual: dos deshierbas, entre los 15 a 20 y 30 a 35 días después de la siembra (previo a la floración). Control químico: antes de la siembra (12- 15 días) aplicar Glifosato (1.0L/mz para gramíneas y hoja ancha). Antes de la germinación (después de siembra ó 1 ó 2 días después) para gramíneas y hojas ancha aplicar Pendimetalín (1.25L/mz) (Glifosato (0.7L/ mz). Después de la germinación aplicar Fluazifop p-Butil (1.0L/ mz) (CENTA, 2008).

2.8. Plagas y enfermedades

Es conveniente recordar que el desarrollo de una enfermedad está determinado por la presencia del patógeno, de un genotipo susceptible a este y de unas condiciones ambientales específicas que favorecen a ambos y al establecimiento de la relación patógeno-hospedante (CIAT, 2008).

La previsión y el manejo adecuado y oportuno de insectos y enfermedades resultan más efectivos y rentables que los controles realizados a la suerte o por costumbre, y permite a la planta un mejor desarrollo, pues no sufre daños que alteren su crecimiento ni afecten la calidad de la cosecha. Es de suma importancia saber reconocer los insectos y las enfermedades que afectan al cultivo, y el momento y método para prevenirlos o controlarlos (Rosas, 2003).

2.8.1. Mosca blanca

Es considerada la plaga más importante del frijol (*Bemisia tabaci*). La mosca blanca y los geminivirus que transmiten se han convertido en un severo problema fitosanitario en varios cultivos de gran importancia socioeconómica en América Tropical (CIAT 1975).

2.8.2. Mosaico común

(VMCF) se pueden presentar síntomas causados por las cepas necróticas del virus, consistentes en una reacción de hipersensibilidad, expresada con la muerte del tejido desde los trifolios más jóvenes hacia el resto de la planta (CENTA 2008).

2.8.3. Mustia hilachosa

La mustia hilachosa (*Thanatephorus cucumeris*), conocida también como telaraña por los síntomas que produce, es una enfermedad seria en zonas cálidas y húmedas de los trópicos de América Latina y el Caribe. En algunas ocasiones, la enfermedad se presenta en zonas cercanas a los 1200 msnm, particularmente en época lluviosa. Ataca en cualquier estado de desarrollo de la planta y causa severa necrosis del follaje y las vainas (CENTA 2008).

Las lesiones iniciales aparecen en las hojas primarias, como manchas necróticas de 5-10 mm, con centros pardos y bordes verde claro. En condiciones de alta humedad y temperatura cálida, estas lesiones crecen en forma irregular y rápidamente. Las lesiones pueden abarcar todo el follaje; las hojas infectadas se cubren de micelio y se producen pequeños esclerocios. Las condiciones secas detienen el desarrollo de la enfermedad (CENTA 2008).

2.8.4. Antracnosis

Es ocasionada por el hongo *Colletotrichum lindemuthianum*. El patógeno tiene la capacidad de infectar desde que se inicia la germinación hasta el estado de madurez fisiológica e incluso a la semilla (Araya 1989).

Colletotrichum lindemuthianum produce lesiones necróticas, húmedas y ligeramente hundidas en el tallo y los pecíolos. En las hojas se observa necrosis a lo largo de las venas primarias y secundarias. Los síntomas más evidentes se encuentran en las vainas, donde se producen lesiones necróticas, redondas y hundidas, desde donde el hongo puede alcanzar 7-12 los tejidos de la semilla e infectarla, causándole deformaciones y decoloraciones al tegumento (Araya 1989).

2.8.5. Mancha angular

Phaeoisariopsis griseola Se presenta con mayor severidad en condiciones de temperatura entre 16 y 28°C. La planta es susceptible durante todo su período de crecimiento, pero en el campo se observan síntomas severos después de la sexta semana de la siembra. La vaina también es afectada y la semilla puede transmitir el patógeno. 13 Hifas de color oliváceo y

septadas. Los conidióforos son simples, de color marrón pálido a marrón, lisos y septados, con una ligera dilatación en el ápice. Las conidias son redondeadas en el ápice y truncadas en la base, de color marrón pálido oliváceo, con 2-6 septos y miden 35-70 x 5-7,5 μm (Araya 1989).

2.8.6. Roya

Los síntomas iniciales de *Uromyces appendiculatus* consisten en manchas circulares cloróticas o blanquecinas, en las que luego se observan pústulas café-rojizas (uremias) que aparecen en las hojas. Una pústula contiene miles de uredosporas, y puede estar rodeada de un borde clorótico o necrótico dependiendo de la raza fisiológica, la variedad y las condiciones ambientales. Una infección severa causa reducción en el rendimiento hasta en un 50% (CENTA 2008).

2.9. Genética del cultivo de frijol

El frijol es una especie diploide ($2n = 2x = 22$), anual y predominantemente autógama. El tamaño del genoma de frijol es pequeño (635 millones de pares de bases (Mpb / genoma haploide) y similar en su naturaleza como diploide verdadero al de *Oryza sativa* (arroz) (340 hasta 560 Mpb /genoma haploide. El tamaño de los cromosomas mitóticos y meióticos es de aproximadamente 1-3 μm de longitud, la mayoría de cromosomas son metacéntricos o submetacéntricos, y presentan una media de 1.9 quiasmas por cromosomas bivalentes en la meiosis por un entrecruzamiento por brazo del cromosoma (Rosas, 2003).

El concepto de acervo genético ha sido introducido para describir la facilidad con la que se pueden utilizar los recursos genéticos disponibles para la producción y el mejoramiento de las plantas (Jenkins, 2000). Un acervo genético es un conjunto de genotipos caracterizados por tener frecuencias alélicas específicas, asociaciones similares de alelos, adaptación diferencial a las condiciones ambientales. (Rosas, 2003).

2.9.1. Acervo genético Andino

Según Rosas (2003) los frijoles cultivados de acervo genético Andino (Sur América) se caracterizan por una semilla grande (más de 40g de peso por cada 1000 semillas), hoja lanceolada y aguda, pubescencia en las hojas densa y larga, inflorescencia de un solo nudo, base del pétalo lisa y la posición del ápice de la vaina es central.

2.9.2. Acervo genético Mesoamericano

Según Rosas (2003) los frijoles cultivados de acervo genético Mesoamericano (México y Centroamérica) son de semillas de menor tamaño (entre 25 y 40g de peso por cada 100 semillas), hoja acorazonada y ovalada, pubescencia en las hojas escasa y corta, inflorescencia de varios nudos, base del pétalo rayada y la posición del ápice de la vaina es placentaria.

2.10. Importancia económica y social de cultivo de frijol

La importancia de esta leguminosa como cultivo es fundamental para la economía rural, como una fuente de ocupación e ingreso, así como una garantía para su seguridad alimentaria (Hernández, 2009). El frijol es cultivado por agricultores de escala en regiones de América Latina, África y Asia, donde se encuentran más los países en proceso de desarrollo en los que se genera aproximadamente el 77% de la producción mundial. Sin embargo, para países desarrollados de Europa y América del Norte, el frijol común es manejado como un cultivo de alta tecnología que genera un rubro de exportación de aproximadamente el 23% de la producción mundial (Jenkins, 2000).

A nivel regional el cultivo de frijol genera más de 619,400 empleos y participan más de un millón y medio de productores, de los cuales cerca del 70% lo hacen para su autoconsumo con ventas marginales de excedentes (IICA 2014).

Durante todo el proceso de manejo del cultivo de frijol se generan muchas fuentes de empleos directos e indirectos, que van desde su producción hasta su comercialización, de ahí la importancia social en los países donde este cultivo se desarrolla (Jenkins, 2000).

En El Salvador, el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una parte importante de la canasta básica del hogar y de la dieta diaria de la mayoría de las personas porque se considera una fuente económica de proteínas. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO, 1991) en El Salvador, la ingesta proteica promedio diaria per cápita es de solo 52,4 gramos, de los cuales se estima que 4,2 gramos provienen del frijol, lo que significa que este grano aporta el 8% de la disponibilidad total de proteínas.

En el país, la producción de frijol no es permanente. El ciclo de producción va de julio del año en curso a marzo del año siguiente, y alcanza el mejor punto de producción en noviembre, debido a que la producción de frijol en la mayoría de los meses es insuficiente, el país se ve en la necesidad importar para abastecer para el mercado local (Hernández, 2009).

2.11. Variedad de frijol CENTA EAC

CENTA EAC es un cultivar de frijol color rojo claro proviene de la cruce simple Negro Vaina Blanca/BCN 20-02- 94, realizada por el Programa de Investigaciones en Frijol (PIF), en Zamorano, Honduras.

Uno de los principales problemas que históricamente ha experimentado El Salvador es un crecimiento económico bajo y lento, como resultado de una estructura productiva desarticulada y poco diversificada, con poca capacidad para generar empleo y mejorar los niveles de empleabilidad en los territorios. Este débil crecimiento económico obedece fundamentalmente a la baja productividad, a los altos costos de producción y al bajo nivel de inversión productiva nacional, entre otros factores (CENTA 2011)

Es por ello que la importancia de esta variedad de semilla radica en mejorar los niveles de vida de los agricultores y también que este cultivar es uno de los que se brindan dentro del país para uso de consumo en un plan de seguridad alimentaria por medio de paquetes agrícolas a los productores.

Entre las características agronómicas más sobresalientes de esta variedad están (CENTA 2011):

Habito de crecimiento:	II-B Guía intermedia
Días a floración:	35
Días a madurez fisiológica:	67
Reacción a virus del mosaico dorado amarillo:	Resistente
Reacción a virus del mosaico común:	Resistente
Reacción a mustia hilachosa:	Tolerante
Reacción a roya:	Susceptible
Altas temperaturas:	Tolerante
Humedad limitada:	Tolerante
Rendimiento potencial:	36 qq/mz
Adaptación	50-800 msnm

2.12. Mejoramiento genético del frijol

Según Pabón Calderón (2011) en los programas de mejoramiento de Novak y Brunner, afirman que es necesario contar con una amplia base genética que garantice suficiente variabilidad para tener probabilidades de seleccionar los genotipos. Este programa consiste en tres fases: generación de la variabilidad genética, selección de genotipos, y evaluación de los genotipos seleccionados con caracteres agronómicos ideales. Adicionalmente, se requiere un sistema que involucre herramientas complementarias al sistema de mejora convencional, en el que se encuentran el cultivo de tejidos *in vitro*, la inducción de mutaciones y la transformación genética.

En la actualidad la tecnología de Organismos Genéticamente Modificados (OGM) es muy utilizada y se diferencia de la mutación inducida ya que en éste método no se introduce material genéticamente modificado ajeno a la planta. Lo único que hace esta herramienta es reorganizar su identidad genética para mejorar, por ejemplo, su rendimiento, su sabor, su tamaño o su resistencia a plagas y patógenos. Además, esta técnica no deja radiación residual en la planta (Pabón Calderón, 2011).

2.13. Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* es una técnica biotecnológica de reproducción en condiciones totalmente asépticas, en la que a partir de un pequeño segmento inicial de tejido de cualquier parte de la planta es posible regenerar en poco tiempo miles o millones de plantas genéticamente iguales a la planta madre, cuando a este tejido le es aplicado un estímulo por medio de variables físicas y químicas controladas en un medio de cultivo (Albarracín, 2012).

La habilidad de hacer que células de plantas formen órganos y hasta plantas enteras es una importante herramienta en el mejoramiento de cualquier especie, lo que permite el acceso a técnicas como mutagénesis *in vitro*, selección *in vitro*, utilización de variantes somaclonales, rápida micropropagación y en especial la transformación genética (Gamborg y Phillips, 2001).

2.14. 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, raíces, meristemos, embriones, entre otros. (Gepts, 1998).

2.15. 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. 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, entre otros. En la segunda etapa se realiza el enraizamiento (Narváez, 2009).

La organogénesis como 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 aparente 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 directa de brotes, raíces o flores de una parte de la planta sin necesidad de fases intermedias de callo. (Narváez 2009). Este proceso morfogénico se induce artificialmente por medio de reguladores de crecimiento (Narváez, 2009).

2.16. Ventajas de la técnica

Una de las grandes ventajas de la organogénesis es la enorme capacidad de multiplicación a escala industrial, que permite obtener en un solo proceso estructuras completas con ápice y raíz, que pueden ser almacenadas y encapsuladas perfectamente con las condiciones ambientales requeridas (Narváez, 2009).

2.17. Selección del explante

La selección del explante es uno de los pasos más importante para el éxito en la micropropagación debido a que esto dependerá del objetivo trazado. Además, el explante deberá encontrarse bajo condiciones fitosanitarias adecuadas sin ningún tipo de lesión epitelial, maltrato o enfermedad causada por patógenos (Mroginski y Roca 1991). Los explantes utilizados para la micropropagación *in vitro* generalmente son embriones, meristemas, tallos, raíces, anteras, protoplastos, entre otros (Narváez, 2009).

2.18. Protocolos de desinfección

Los procesos de desinfección son seleccionados a partir del explante que se desea trabajar. Existen productos asépticos que sus mecanismos de acción pueden causar daños a algunos

tejidos del explante tal como la oxidación (Villamizar, 2005).

Existen varios compuestos químicos que son utilizados en tejidos vegetales en protocolos de desinfección, los más utilizados son Etanol al 70%, Hipoclorito de sodio y soluciones jabonosas. Entre los menos utilizados se encuentran Cloruro de mercurio al 1-1.5% o hipoclorito de calcio al 6-12%, el nitrato de plata, peróxido de hidrogeno y el uso de tensos activos como el Tween 80 o soluciones yodadas. Como complementos en el protocolo de desinfección se adicionan diferentes antibióticos y anti fúngicos para garantizar la asepsia de los explantes durante el proceso de propagación (Villamizar, 2005).

2.19. Medios de cultivo

La composición de los medios de cultivo dependerá exclusivamente del objetivo trazado y el tipo de planta a propagar (Torrescano De Labra, 2014). Entre los componentes que debe tener un medio de cultivo se encuentran los Macronutrientes (C, H, O, P, K, O, S, Ca y Mg); los micronutrientes (Zn, Cu, Mo, etc.); las vitaminas y los reguladores de crecimiento. El medio de cultivo más utilizado es el medio basal MS (Murashige & Skoog), en el cual se puede trabajar con la mayoría de explantes, modificándose según la necesidad (Villamizar, 2005).

Los reguladores de crecimiento se pueden presentar de forma natural o sintética. Las auxinas son un grupo de hormonas que ayudan a la estimulación de la división celular (Mroginski y Roca, 1991). Las auxinas más utilizadas son ácido 1- naftalenacético (ANA), ácido 3-indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D). En el caso de las citoquininas la Kinetina, 6-BAP y Zeatina son utilizadas para romper la dominancia apical y estimular la brotación de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas. Las giberelinas por su parte, son utilizadas para la estimulación fisiológica, algunas de ellas ayudan para el alargamiento celular (Villamizar, 2005).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Descripción del lugar de estudio

La investigación se llevó a cabo en el área del Cultivo de Tejidos del Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador, cuya ubicación geográfica es la siguiente: 13°43'06" Norte y 89°12'11" Oeste.

3.2. Metodología de laboratorio

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

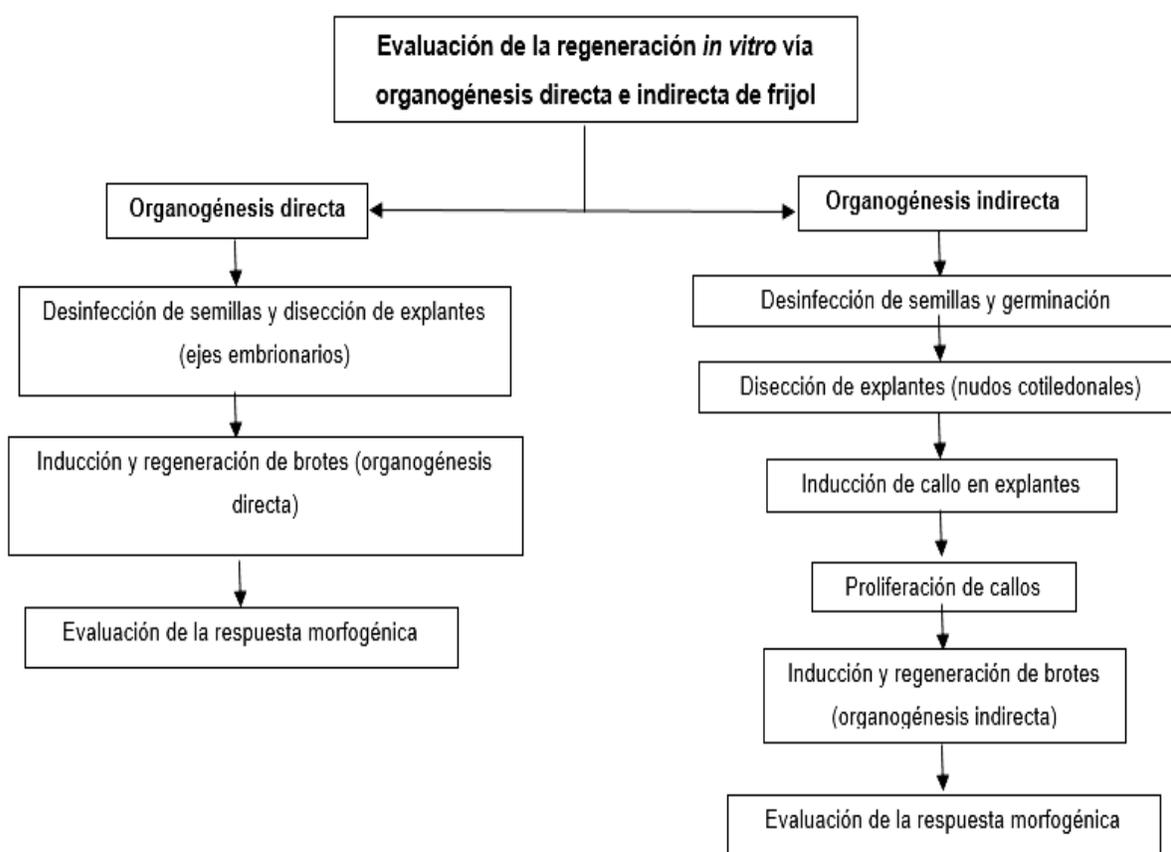


Figura 1. Estrategia experimental de la investigación. El diagrama incluye los pasos planteados para la evaluación en ambas vías de regeneración *in vitro*.

3.3. Material vegetal

Se utilizaron semillas maduras de la variedad CENTA EAC de no más de un año de poscosecha. Estas fueron donadas por el Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrriquez Álvarez Córdova” (CENTA).

3.4. Organogénesis directa

3.4.1. Desinfección de semillas y disección de explantes

Las semillas se desinfectaron superficialmente con alcohol etílico al 70% durante 1 minuto en una cámara de flujo laminar y luego con hipoclorito de sodio (NaClO) al 1% y Tween 20 (3 gotas/100 ml) durante 20 minutos en agitación manual constante. Luego con agua destilada estéril se realizaron 3 lavados. Durante 16-18 horas las semillas permanecieron en imbibición con agua destilada estéril (a $26 \pm 2^\circ\text{C}$) previo a la disección de los explantes.

Posterior a la imbibición de las semillas, en cámara de flujo laminar se extrajeron los embriones cigóticos con pinzas y bisturí estériles. Se cortó el meristemo radicular y las hojas cotiledonales a los embriones cigóticos para formar el eje embrionario. Cuando todos los ejes embrionarios fueron disectados, se llevó a cabo una segunda desinfección con hipoclorito de sodio al 0.1% durante 10 minutos en agitación manual, luego con agua destilada estéril se realizaron 3 lavados.

3.4.2. Inducción y regeneración de brotes (organogénesis directa)

Los ejes embrionarios fueron cultivados en frascos de vidrio con 25 ml de medio de cultivo semisólido compuesto por las sales minerales MS (Murashige y Skoog 1962) suplementados con 100 mg l^{-1} de mioinositol, 1 mg l^{-1} de tiamina, 0.5 mg l^{-1} de ácido nicotínico, 0.5 mg l^{-1} de piridoxina, 2 mg l^{-1} de glicina, 30 g l^{-1} de sacarosa y 8 g l^{-1} phytigel.

Los tratamientos consistieron en tres diferentes medios de cultivos con las siguientes dosis de Bencilaminopurina (BAP): 0, 1 y 5 mg l^{-1} . Se ajustó a 5.7 el pH del medio de cultivo con HCl o NaOH antes de esterilizarlo en autoclave durante 21 min a 121°C y 1.07 kg/cm . Durante 42 días se cultivaron los explantes en los tratamientos en condiciones de fotoperiodo de 2,000 – 2,500 lux, 16 horas luz / 8 horas oscuridad a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Se realizó un subcultivo a los 21 días después de haber iniciado el ensayo.

3.4.3. Evaluación de la respuesta morfogénica

Se evaluó la respuesta a la regeneración *in vitro* mediante los indicadores siguientes: número de brotes, número de hojas y número de raíces. También la eficiencia de regeneración se calculó a través de siguiente formula [(número de ejes embrionarios con brotes de novo / total de número de ejes embrionarios) x 100] (Gatica *et. al* 2010). Después de 21 y 42 días de iniciado el ensayo se evaluó los tratamientos y se llevó un registro fotográfico.



Figura 2. Eje embrionario en frijol común.

3.5. Organogénesis indirecta

3.5.1. Desinfección de semillas y germinación

Las semillas se desinfectaron superficialmente con alcohol etílico al 70% durante 30 segundos en una cámara de flujo laminar (BIOBASE modelo BBS-H1800) y luego con hipoclorito de sodio al 3% y Tween 20 (3 gotas/100 ml) durante 10 minutos en agitación manual constante. Luego con agua destilada estéril se realizaron 3 lavados.

Los medios de cultivo de germinación donde se colocaron las semillas consistieron en 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 mg l⁻¹ de BAP, 30 g l⁻¹ sacarosa y 8 g l⁻¹ phytigel. Antes de esterilizar en autoclave a 120°C durante 20 minutos se ajustó el pH medio a 5.7 con NaOH o HCl. En frascos de vidrio de 250 ml se cultivaron un total de 150 semillas de las cuales se distribuyeron 10 semillas en cada recipiente con 25 ml de medio, a una temperatura de germinación de 25°C ± 2 C y durante 7 días en oscuridad absoluta.

3.5.2. Disección de explantes (nudos cotiledonales y meristemos) e inducción de callo

Después de la germinación, los explantes fueron disectados con ayuda de pinzas y bisturí en condiciones asépticas. Los explantes consistieron en nudos cotiledonales de los embriones cigóticos germinados y los meristemos apicales. Los nudos cotiledonales se cultivaron en placas Petri mientras que los meristemos en frascos vidrios, ambos con 25 ml de medio de

inducción de callos (MIC) compuesto de las sales minerales MS y suplementado con 100 mg l^{-1} de mioinositol, 0.1 mg l^{-1} de tiamina, 0.5 mg l^{-1} de ácido nicotínico, 0.5 mg l^{-1} de piridoxina, 2 mg l^{-1} de glicina, 0.2 mg l^{-1} de Tidiazurón (TDZ), 0.05 mg l^{-1} de Ácido Indolacético (AIA), 30 g l^{-1} de sacarosa y 8 g l^{-1} phytigel. Antes de esterilizar en autoclave durante 20 min a 121°C y $1,070 \text{ g.cm}^{-1}$, el pH del medio de cultivo se ajustó a 5.7 con HCl o NaOH.

En los primeros siete días se colocaron los nudos cotiledonales en completa oscuridad y los otros siete días en condiciones de fotoperiodo 16 horas luz / 8 horas oscuridad a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y $58 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$. Los meristemos se cultivaron solamente en las condiciones de fotoperiodo.

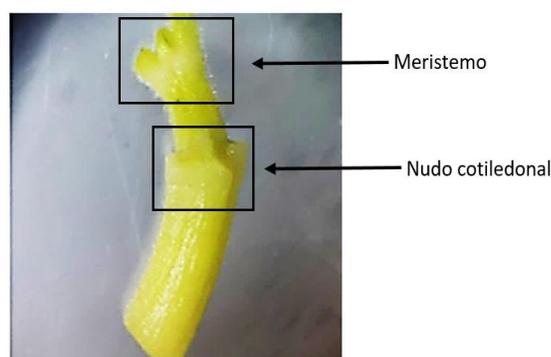


Figura 3. Nudo cotiledonal y meristemo.

3.5.3. Inducción y regeneración de brotes

Después de haber transcurrido los 14 días en los medios de inducción de callo (MIC) los explantes fueron transferidos al medio de inducción de brotes (MIB), compuesto de las sales MS adicionadas con diferentes concentraciones de BAP: 0, 2.25 y 6.75 mg l^{-1} . Antes de esterilizarlo en autoclave durante 20 min a 121°C y $1,070 \text{ g.cm}^{-1}$ el pH del medio MPC se ajustó a 5.7 con HCl o NaOH. Se realizó un subcultivo a los 14 días en el mismo medio por 14 días más. Las condiciones en las que se cultivaron estos tratamientos fue en fotoperiodo 16 horas luz / 8 horas oscuridad a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y $58 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$.

3.5.4. Evaluación de la respuesta morfogénica

Mediante los indicadores número de brotes, número de hojas y número de raíces se evaluó la respuesta a la regeneración. Para calcular la eficiencia de regeneración se utilizó la fórmula [(número de ejes embrionarios con brotes de novo / total de número de ejes embrionarios) x 100] (Gatica *et. al.*, 2010). Se llevó una toma de datos y un registro fotográfico luego de 28 días de cultivo.

3.6. Metodología estadística

Para el análisis de los datos se realizó en un primer momento una estadística descriptiva como tablas de frecuencias, gráficos, medidas de tendencia central, medidas diferencial con el propósito de observar el campo variable medios de cultivos.

Una vez se realizó el análisis descriptivo se llevó a cabo un análisis inferencial ANOVA con un Diseño Completamente al Azar (DCA) con tres tratamientos y cinco repeticiones, con el propósito de demostrar cuál de los medios de cultivo suplementados con BAP presentan mejor respuesta a la regeneración *in vitro*, se aplicó la prueba estadística de comparación de medias de Tukey. Todo el análisis se realizó con un nivel de significancia estadística (alfa) α del 1% = 0.01 y mediante la utilización de hojas de cálculo de Microsoft Excel® y el programa estadístico INFOSTAT.

Como variable independiente fueron los medios de cultivo (diferentes concentraciones de BAP) y la variable dependiente fue la respuesta a la morfogénesis *in vitro* (número de brotes, número de hojas, número de raíces y porcentaje de eficiencia). Para el método de organogénesis directa los tratamientos fueron: 0 mg l⁻¹, 1 mg l⁻¹ y 5 mg l⁻¹ de BAP (Cuadro 2). Cada tratamiento consistió en cinco repeticiones y cada repetición de tres frascos con tres explantes cada uno. En total se utilizarán 135 explantes. En el método de organogénesis directa los tratamientos fueron: 0 mg l⁻¹, 2.25 mg l⁻¹ y 6.75 mg l⁻¹ de BAP (Cuadro 2). Al igual que en la organogénesis directa para los nudos cotiledonales y meristemas los tratamientos consistieron en cinco repeticiones y cada repetición de tres frascos con tres explantes cada uno. En total se utilizarán 135 explantes.

El modelo matemático lineal aditivo que define a un Diseño Completamente al Azar es el siguiente (Martínez, 1988):

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

Donde:

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

μ = es el efecto de la media general.

α_i es el efecto del i-ésimo tratamiento, definido como la diferencia entre la media del i-ésimo tratamiento y la media global.

ϵ_{ij} es el efecto del error experimental en el i-ésimo tratamiento, j-ésima repetición.

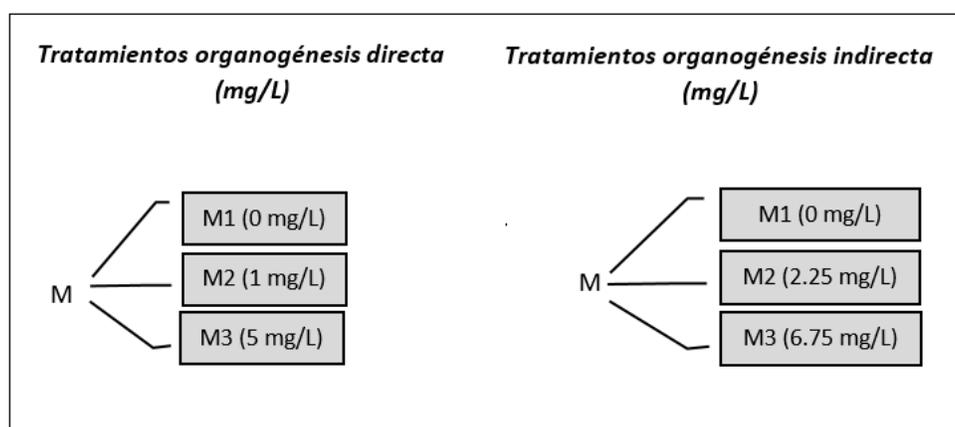
k es el número de tratamientos.

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

Cuadro 1: Análisis de Varianza (ANVA) con un Diseño Completamente al Azar utilizado en los ensayos de Evaluación de la regeneración in vitro de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedades CENTA EAC mediante la técnica de organogénesis directa e indirecta.

<i>Fd.v.</i>	<i>Gl.</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>Fc.</i>	<i>P-valor</i>
<i>TRA.</i>	3-1=2	SC TRAT	SCTrat / g.l. Trat	Ftrat= CM trat/ CM Error	
<i>ERROR</i>	3(5-1)= 12	SC ERR	SCTrat / g.l. Error		
<i>TOTAL</i>	(3x5)-1= 14				

Cuadro 2. Diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) a evaluar en medios de cultivo en el ensayo de organogénesis directa e indirecta en la variedad de frijol CENTA EAC.



4. RESULTADOS

4.1. Organogénesis directa

4.1.1. Número de brotes

Los brotes se regeneraron a partir de ejes embrionarios como respuesta morfológica a diferentes dosis de BAP en la variedad CENTA EAC (Figura A-3). La dosis de 5 mg l^{-1} de BAP produjo la mayor cantidad de brotes por explante (0.86), seguido de la dosis de 1 mg l^{-1} con 0.68 brotes por explante (Cuadro A-1). En el tratamiento con ausencia de BAP no se observó respuesta favorable a la regeneración de brotes de *novo* (Figura 2).

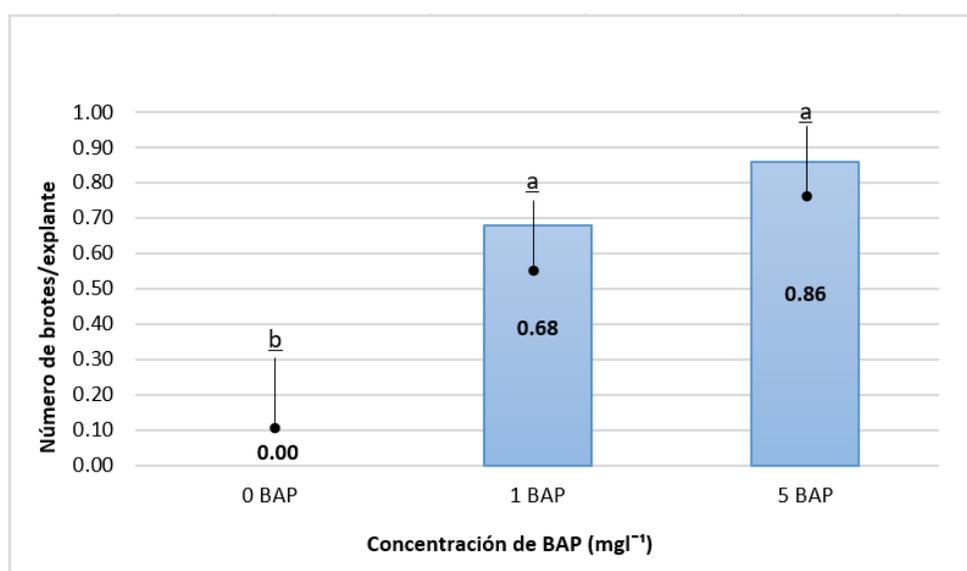


Figura 4: Efecto de la Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de brotes a partir de ejes embrionarios de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).

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

Se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas ($p\text{-valor} = 0.0001 < 0.01$) en el promedio de brotes por explante (Cuadro A-2).

4.1.2. Número de hojas

Las hojas fueron regeneradas a partir de ejes embrionarios como respuesta morfológica a la regeneración *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* L. de la variedad CENTA EAC. Se obtuvo el mayor número de hojas en la concentración de 5 mg l^{-1} de BAP, el menor número de hojas lo produjo el tratamiento sin adición de BAP (Figura 3).

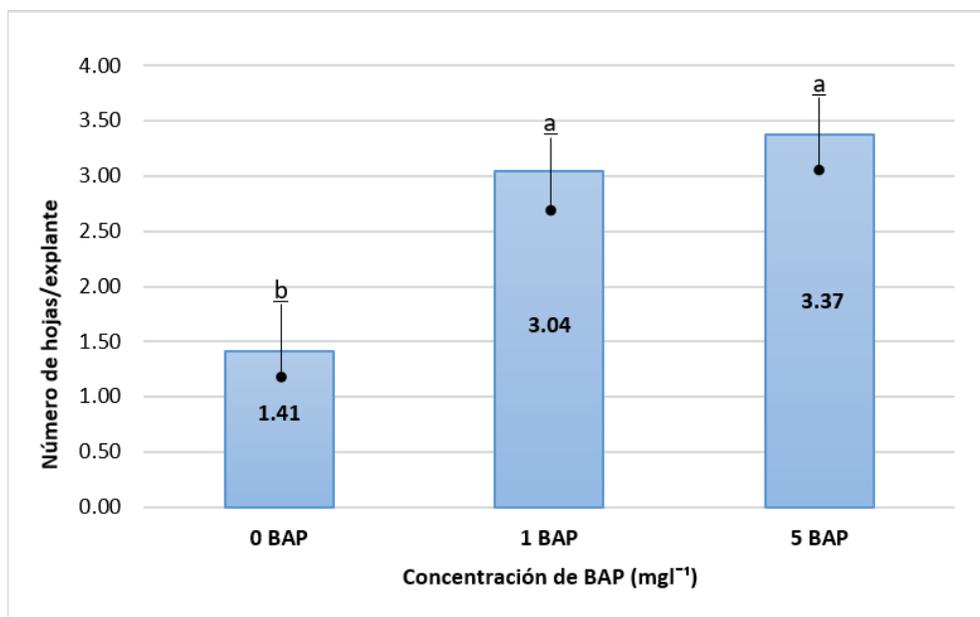


Figura 5: Efecto de la Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de hojas a partir de ejes embrionarios de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).

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

En el promedio de hojas por explante se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas ($p\text{-valor} = 0.0001 < 0.01$).

4.1.3. Número de raíces

Otra variable incluida en la investigación fue la regeneración de raíces a partir de ejes embrionarios de *Phaseolus vulgaris* L. de la variedad CENTA EAC. El mayor número de raíces se produjo en el tratamiento donde no se adiciono BAP, mientras que los tratamientos con BAP (1 y 5 mg l⁻¹) obtuvieron una menor respuesta a la regeneración. (Figura 4).

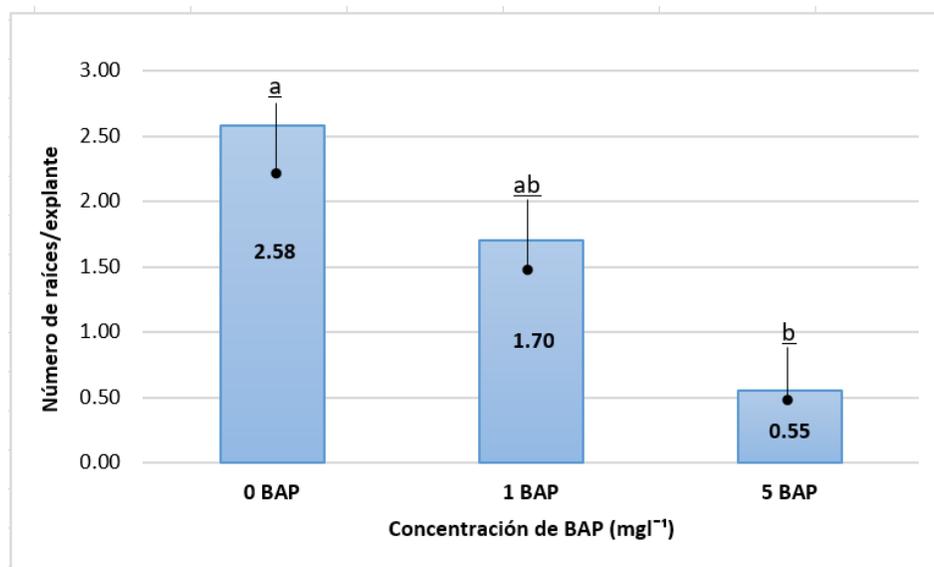


Figura 6: Efecto de la Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de raíces a partir de ejes embrionarios de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).

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

Se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas (p -valor = 0.0020 < 0.01) en el promedio de raíces por explante.

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

La eficiencia es un parámetro que permite cuantificar en porcentaje la respuesta morfogénica de los explantes a la regeneración *in vitro*. En los resultados que se obtuvieron se refleja que la concentración de 5 mg l⁻¹ de BAP produjo el mayor porcentaje de eficiencia en un 68% (Cuadro A-1).

$$[(41/60) \times 100] = 68\%$$

Además, después de analizar los resultados de las variables evaluadas (números de brotes, hojas, raíces y eficiencia de regeneración) se estableció un protocolo de regeneración *in vitro* para ejes embrionarios de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad CENTA EAC. (Cuadro A-13)

4.2. Organogénesis indirecta a partir de nudos cotiledonales

4.2.1. Número de brotes

Los brotes fueron regenerados a partir de nudos cotiledonales como respuesta morfológica a la regeneración in vitro de *Phaseolus vulgaris* L. de la variedad CENTA EAC. El mayor número de brotes lo obtuvo el tratamiento con la concentración 6.75 mg.l⁻¹, al contrario del tratamiento sin concentración de BAP que no produjo una respuesta favorable a la regeneración. (Figura 5).

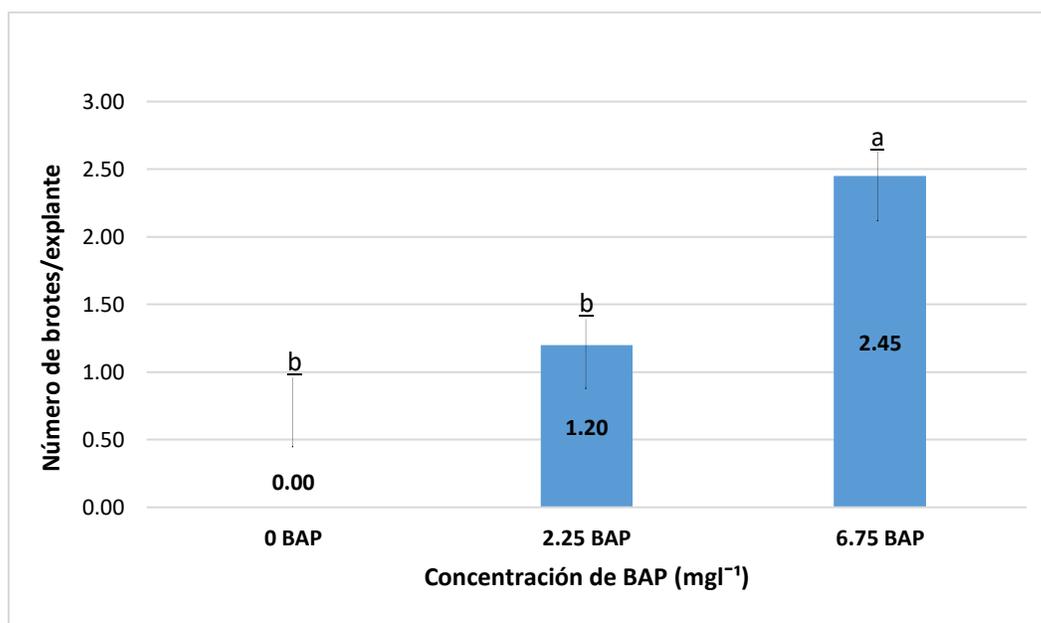


Figura 7: Efecto de la Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de brotes a partir de nudos cotiledonales de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).

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

Al realizar el análisis de varianza se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas (p -valor = 0.0001 < 0.01) en el promedio de brotes por explante.

4.2.2. Número de hojas

La regeneración *in vitro* se ve reflejada en la formación de estructuras morfológicas tales como hojas. Esto se vio reflejado en la investigación debido a la formación de hojas a partir de nudos cotiledonales de la variedad CENTA EAC. La concentración de 6.75 mg l⁻¹ de BAP fue la que obtuvo mayores resultados con 5.69 hojas promedio por explante (Cuadro A-5). El tratamiento con ausencia de BAP produjo la menor cantidad de hojas con 1.02 hojas por explante (Figura 6).

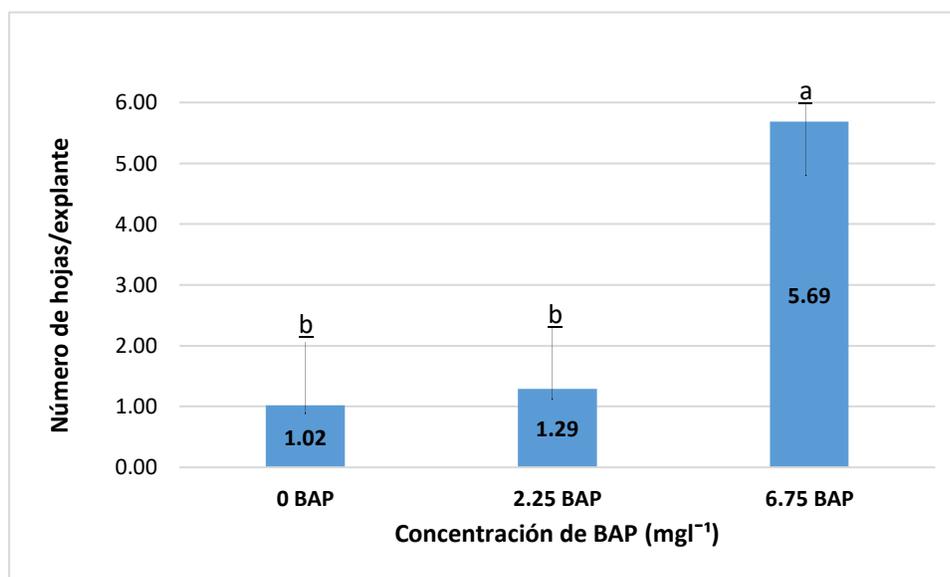


Figura 8: Efecto de la Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de hojas a partir de nudos cotiledonales de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).

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

Al realizar la organogénesis directa en el análisis de varianza de la variable número de hojas, se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas (p -valor = $0.0001 < 0.01$).

4.2.3. Número de raíces

El número de raíces fue otra variable en esta investigación, se regeneraron a partir de nudos cotiledonales como respuesta morfogénica a la regeneración *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* L. Obteniéndose los mayores resultados en el tratamiento donde no se adicionó BAP al contrario del tratamiento con adición de 6.75 mg l⁻¹ de BAP que no presentó respuesta favorable a la regeneración de raíces (Figura 7).

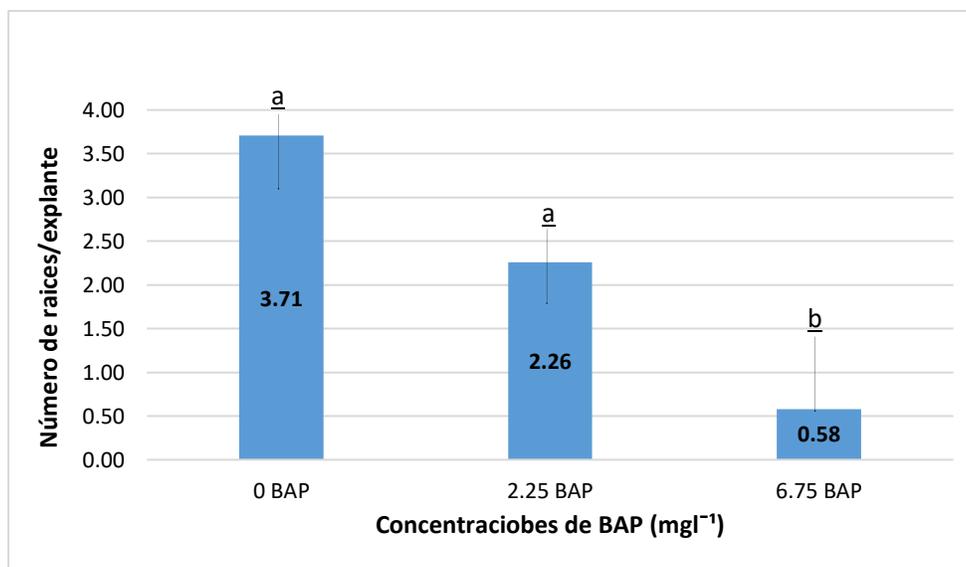


Figura 9: Efecto de la Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de raíces a partir de nudos cotiledonales de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad CENTA EAC.

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

Al realizar el análisis de varianza de la variable número de raíces, se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p\text{-valor} = 0.0002 < 0.01$).

4.2.4. Eficiencia a la regeneración *in vitro* por organogénesis directa (nudos cotiledonales)

Como resultados a la eficiencia por medio de nudos cotiledonales se obtuvo que la concentración de 6.75 mg l⁻¹ de BAP produjo el mayor porcentaje de eficiencia en un 90% (Cuadro A-5).

$$[(54/60) \times 100] = 90\%$$

Después de analizar los resultados de las variables evaluadas (números de brotes, hojas, raíces y eficiencia de regeneración) se estableció un protocolo de regeneración *in vitro* para nudos cotiledonarios de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad CENTA EAC. (Cuadro A-14)

4.3. Organogénesis indirecta a partir de meristemos

4.3.1. Número de brotes

Se regeneraron brotes a partir de meristemos, esto como respuesta morfológica a la regeneración *in vitro* de la variedad CENTA EAC de *Phaseolus vulgaris* L. donde se obtuvo que el tratamiento en la concentración 6.75 mg l⁻¹ produce la mayor cantidad de brotes por explante, al contrario del tratamiento con concentración de 2.25 mg l⁻¹ de BAP y el tratamiento sin adición de BAP que produjeron menores resultados (Figura 8).

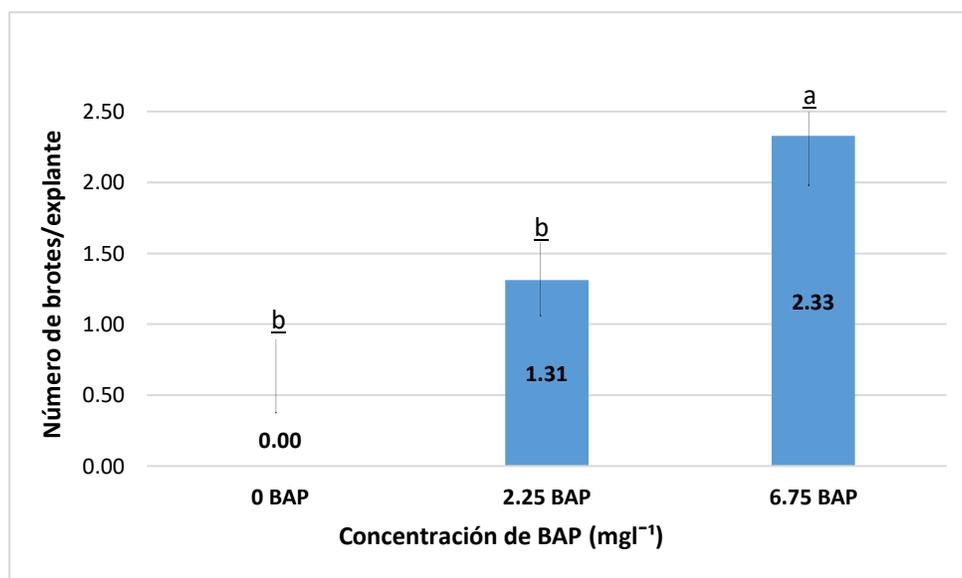


Figura 10: Efecto de la Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de brotes a partir de meristemos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).

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

En el promedio de brotes por explante se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas (p -valor = 0.0005 < 0.01).

4.3.2. Número de hojas

Se formaron hojas a partir de meristemos como respuesta morfológica a la regeneración *in vitro* de la variedad CENTA EAC. La concentración de 6.75 mg l⁻¹ de BAP con 4.49 hojas promedio por explante (Cuadro A-9). El tratamiento con ausencia de BAP produjo la menor cantidad de hojas con 1.93 hojas por explante (Figura 9).

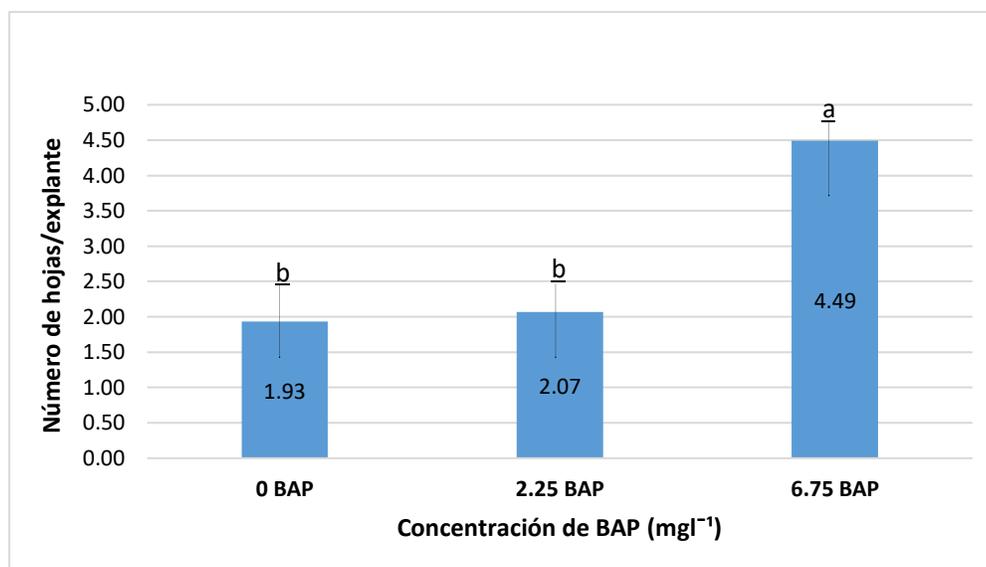


Figura 11: Efecto de la Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de hojas a partir de meristemos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).

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

Al realizar el análisis de varianza de la variable número de hojas por organogénesis indirecta (meristemos), se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas (p -valor = $0.0001 < 0.01$).

4.3.3. Número de raíces

La formación de raíces fue una variable también evaluada como respuesta morfológica a la regeneración *in vitro* a partir de meristemos (Figura A-5). La concentración de 0mg/L de BAP produjo la cantidad mayor de raíces con 0.69 raíces por explante (Cuadro A-9). En el tratamiento con presencia de 6.75 mg l⁻¹ BAP no se observó respuesta favorable a la regeneración de raíces (Figura 10).

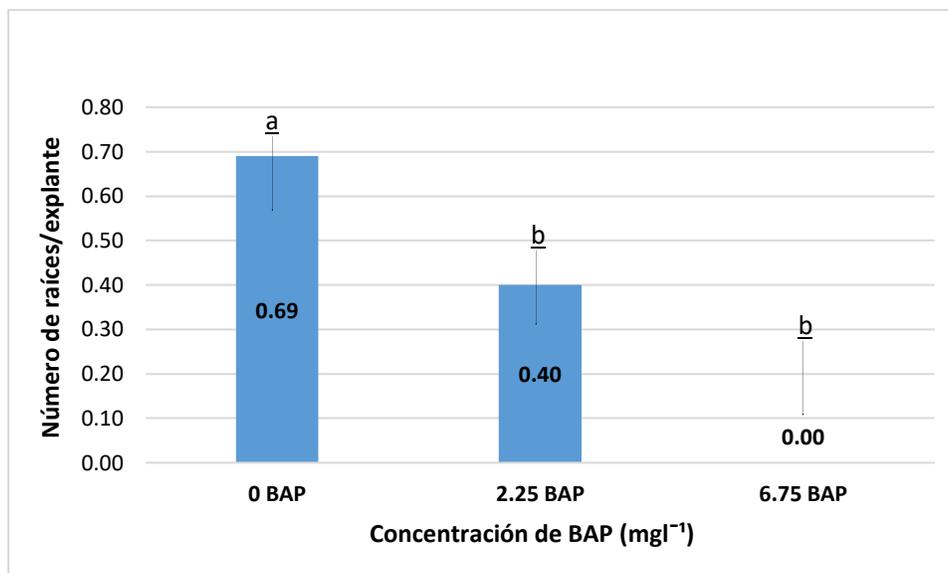


Figura 12: Efecto de la Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de raíces a partir de meristemos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).

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

No se encontraron diferencias estadísticas significativas (p -valor = 0.0308 > 0.01) en el promedio de raíces por explante.

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

La eficiencia a la regeneración *in vitro* fue evaluada en el método de organogénesis indirecta. Se encontraron diferentes eficiencias de regeneración de acuerdo a las concentraciones de BAP utilizadas (Cuadro A-9). En ausencia de BAP no se obtuvo eficiencia, mientras que para la concentración de 2.25 mg l⁻¹ de BAP se obtuvo una eficiencia del 60%, la concentración de 6.75 mg l⁻¹ de BAP fue la que mejores resultados evidencio con una eficiencia del 85%.

$$[(51/60) \times 100] = 85\%$$

Después de analizar los resultados de las variables evaluadas (números de brotes, hojas, raíces y eficiencia de regeneración) se estableció un protocolo de regeneración *in vitro* para meristemos de frijol común *Phaseolus vulgaris* L. variedad CENTA EAC. (Cuadro A-15)

5. DISCUSION

En el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) existe un gran interés de obtener sistemas de regeneración *in vitro* eficientes y reproducibles de cultivares específicos, debido a los usos potenciales que esta herramienta biotecnológica permite en los programas de mejoramiento genético de este cultivo (Delgado-Sánchez *et al.*, 2006).

Las dos vías para regenerar *in vitro* *Phaseolus vulgaris* L. son la organogénesis directa e indirecta (Martínez *et al.*, 2015). Sin embargo, la respuesta a cada una de ellas depende de varios factores tales como el tipo de explante, los medios nutritivos, reguladores de crecimiento y el genotipo (Martínez *et al.* 2015).

Organogénesis directa

Aunque se han descrito varios protocolos en la literatura para la regeneración directa de frijol, el desarrollo de un sistema de cultivo *in vitro* óptimo persiste como un desafío importante (Veltcheva *et al.*, 2005). Esto es debido a la recalcitrancia al cultivo *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* L. (Delgado-Sánchez *et al.*, 2006; Mohamed *et al.*, 2006; Kwapata *et al.*, 2010). Svetleva *et al.* (2003) y Veltcheva (2005) mencionan que los cultivares de frijol domesticados son recalcitrantes al tener menos potencial de regeneración, en comparación con los materiales silvestres. En esta investigación la recalcitrancia del frijol común fue evidenciada mediante la baja respuesta morfogénica a partir de ejes embrionarios.

El desarrollo de nuevas estructuras a través de la organogénesis directa está en función de muchos factores, pero se ha demostrado que la capacidad regenerativa y la respuesta a las condiciones de crecimiento dependen de la especie (Delgado-Sánchez *et al.*, 2006), del contenido y tipo de nutrientes en el medio (Santalla *et al.*, 1998) y del tipo de explante (Martínez *et al.*, 2015).

Por otra parte, la composición del medio de cultivo es importante en el proceso de regeneración a través de organogénesis ya que este medio es el encargado de producir brotes (Santalla *et al.*, 1998). En su mayoría los protocolos de regeneración de *Phaseolus vulgaris* L. consisten en medios suplementados con las sales MS y diferentes concentraciones de citoquininas tales como el BAP (Santalla *et al.* 1998). En el caso de esta investigación se observó que un medio compuesto por las sales MS suplementado con diferentes concentraciones de BAP juega un papel muy importante para la formación de estructuras organogénicas y producen respuestas morfogénicas diferentes debido a que se obtuvo un

promedio de brotes mayor en la concentración de 5 mg^l⁻¹ de BAP. Según Martínez *et al.* (2015) obtuvieron con una variedad mexicana de frijol (Bayomex) inducción de brotes en los ejes embrionarios con una concentración de 2.1 mg^l⁻¹ de BAP y produjo en promedio ocho brotes por explante. De igual forma Gatica *et al.* (2010), desarrollaron un protocolo de regeneración *in vitro* en cinco variedades de *Phaseolus vulgaris* L. de Costa Rica, en un medio MS con 100 mg^l⁻¹ de myo-inositol, 1 mg^l⁻¹ de tiamina, 30 g^l⁻¹ de sacarosa, BAP (0, 5 y 10 mg^l⁻¹), 0, 20 y 40 mg^l⁻¹ de sulfato de adenina (SA) y 8 g^l⁻¹ de agar. El medio de cultivo MS con 5 mg^l⁻¹ BAP y la combinación con 20 o 40 mg^l⁻¹ de sulfato de adenina (SA) fue en donde se obtuvo el promedio más alto de formación de brotes.

En esta investigación también se observó la formación de hojas y raíces. En ambas variables se produjeron diferencias altamente significativas entre las diferentes concentraciones de BAP. Sin embargo, la ausencia de BAP obtuvo los mejores resultados en cuanto a la formación de raíces y se observó que a medida se agregó concentraciones de BAP, el número de raíces por explante disminuye. Delgado-Sanchez *et al.* (2006) informaron que la ausencia o bajas concentraciones de BAP solo inducen a la formación de raíces y el alargamiento del tallo, lo cual explica que la ausencia de BAP produjera un buen desarrollo de raíces.

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. En esta investigación la mejor eficiencia de regeneración fue mediante la utilización de 5 mg^l⁻¹ de BAP con 68%. Estos resultados son comparables a los reportados por Gatica *et al.* (2010) quienes reportaron para variedades costarricenses de frijol eficiencias en el rango del 7% hasta un máximo de 96% mediante la utilización de ejes embrionarios como explantes. Así mismo, Quintero Jiménez *et al.*, (2010) regeneraron plantas de *Phaseolus vulgaris* a partir de ejes embrionarios cultivados en un medio de Gamborg que contenía 10 mg^l⁻¹ BAP en los cultivares Apetito G13637 (98-100%), Flor de Mayo Anita (96-98%), ICA Palmar G4523 (88-97%) y Pinto Saltillo (83-84%), demostrando que la eficiencia obtenida en el medio MS suplementado con diferentes concentraciones de BAP fue buena, con un rango de 0-99%.

Organogénesis indirecta

La estrategia de la organogénesis indirecta es la formación de callos a partir de un segmento o tejido inicial para su posterior multiplicación y formación de brotes, que finalmente regeneren en plántulas (George y Debergh, 2008). En el género *Phaseolus* se ha reportado mediante esta vía de regeneración la utilización de diferentes explantes tales como ejes embrionarios (Collado *et al.* 2008), nudos cotiledonales (Aguirre y Meléndez, 2022), meristemos (Aguirre y Meléndez, 2022),

En esta investigación se precultivaron nudos cotiledonales y meristemos en Tiazurón (TDZ) y Acido Indol Acético (AIA), para formación y proliferación de callos. Collado *et al.* (2013), mencionan que el precultivo en TDZ y AIA de nudos cotiledonales de diferentes variedades de frijol promueve la formación de callos nodulares verdes. Por otra parte, el TDZ puede estar involucrado en la síntesis y/o acumulación de citoquininas en cultivos de tejidos vegetales (Cruz de Carvalho *et al.*, 2000). Sin embargo, en esta investigación no se obtuvo formación de estructuras callogénicas a partir de los nudos cotiledonales ni de los meristemos. En contraste una múltiple formación de brotes fue desarrollada en presencia de TDZ y AIA en un periodo de precultivo de 14 días. Estos resultados son similares con los reportados por García *et al.* (2008), quienes evaluaron como precultivo 1 mg l⁻¹ TDZ y 1 mg l⁻¹ BAP.

Por otro lado, Dang y Wei en el año 2009 mostraron que la adición de BAP y TDZ al medio de cultivo mejora la inducción de brotes. En dicha investigación el TDZ fue más eficiente que el BAP. Sin embargo, los resultados de la variedad CENTA EAC en diferente dosis de BAP posteriores al precultivo con TDZ, difieren con los obtenidos antes mencionados ya que para nudos cotiledonales y meristemos los mayores números de brotes se obtuvieron en presencia de BAP.

A partir de nudos cotiledonales se obtuvo la formación de brotes y hojas en los cuales los mejores resultados se obtuvieron en las concentraciones de 2.25 mg l⁻¹ y 6.75 mg l⁻¹ de BAP. También, al utilizar meristemos como explantes se obtuvo resultados (0.00 a 2.33 brotes por explante) (1.43 a 4.49 hojas por explante) exactamente en las mismas concentraciones que los nudos cotiledonales. Esto difiere con la afirmación de Hnatuszko-Konka *et al.* (2019), en el indican que el tipo de explantes determina la tasa de inducción de callos y formación de brotes en esta vía de organogénesis.

Para la formación de raíces en nudos cotiledonales los promedios fueron de 0.58 a 3.71 por explante y para los meristemas de 0.00 a 0.69. Obteniéndose los mejores resultados en ambos tratamientos con ausencia de BAP. Sin embargo, Dang y Wei (2009) utilizaron auxinas (como IBA) para inducir al desarrollo de raíces y esta ha demostrado tener un efecto positivo. Este resultado es diferente al de la investigación puesto que no fue necesario incluir un tipo de auxina para lograr la formación de raíces.

6. CONCLUSIONES

Se logró evidenciar la capacidad morfogenética de explantes de *Phaseolus vulgaris* L. a partir de ejes embrionarios, nudos cotiledonales y meristemos a partir de un protocolo de propagación *in vitro*.

Los brotes obtenidos en esta investigación fueron formaciones de *novo* y se desarrollaron a partir de ejes embrionarios, nudos cotiledonales y meristemos.

La regeneración de brotes *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* L. variedad CENTA EAC mejora al adicionar BAP al medio de cultivo en ambas vías de regeneración.

El tratamiento testigo obtuvo los mejores rendimientos en la formación de raíces.

La concentración de 5 mg l^{-1} de BAP fue la mejor para la formación de brotes y hojas *in vitro*, vía organogénesis directa.

No se logró la formación de callo mediante la organogénesis indirecta.

Para los nudos cotiledonales y meristemos la adición de BAP mejora la regeneración de brotes, aun cuando todos los explantes se precultiven en medio con 0.2 mg l^{-1} de TDZ y 0.05 mg l^{-1} de AIA.

La recalcitrancia de *Phaseolus vulgaris* se evidenció en esta investigación mediante la organogénesis directa e indirecta.

7. RECOMENDACIONES

Desarrollar protocolos de regeneración in vitro específicos por genotipo de *Phaseolus vulgaris*.

Implementar otros reguladores de crecimiento a diferentes concentraciones para observación de brotes y raíces.

Utilizar una concentración de 6.75 mg l^{-1} para la obtención de brotes para la variedad CENTA EAC y nudos cotiledonales como explantes mediante organogénesis indirecta.

Realizar subcultivos con intervalos máximos de 14 días para lograr mejores resultados tanto para nudos cotiledonales como para meristemos.

Para evitar contaminaciones se recomienda aumentar los tiempos de exposición de los protocolos de desinfección en el método directo e indirecto.

8. BIBLIOGRAFÍAS

- Aguirre, J; Meléndez, J. 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. Tesis de Ingeniero Agrónomo: Universidad de El Salvador, El Salvador, 74 p.
- Albarracín Acosta, CP. 2012. Evaluación de la eficiencia de un sistema de inmersión temporal frente al método de propagación convencional en la multiplicación in vitro de cilantro cimarrón (*Eryngium foetidum*) a partir de hojas, yemas y segmentos nodales. Tesis Ing. Biotecnología. Sangolquí, EC, 203 p.
- Araya, C. 1999. Estatus de las principales enfermedades del cultivo de frijol, y posibilidades organizativas para su manejo integrado. CATIE. <http://web.catie.ac.cr/informacion/Rmip/rmip55/art2-b.htm>.
- Broughton, W; Hernandez, G; Blair, M; Beebe, S; Gepts, P; Vanderleyden, J. 2003. Beans (*Phaseolus* spp.)—model food legumes. *Plant and Soil* 252(1):55-128.
- CENTA (Centro Nacional de Tecnología Agrícola y Forestal). 2008. Guía Técnica Cultivo de Frijol. Programa de Granos Básicos. 24p.
- CENTA (Centro Nacional de Tecnología Agrícola y Forestal). 1992
- CENTA (Centro Nacional de Tecnología Agrícola y Forestal). 2011. Guía Técnica Cultivo de Frijol variedad CENTA EAC. Programa de Granos Básicos. 20p.
- CIAT (2008) Improved beans for the developing world. Annual Report 2008. pp. 302 Cali.
- Collado, R; Veitía, N; Bermúdez-Carabaloso, I; García, LR; Torres, Romero, D; Rodríguez Lorenzo, JL; Angenon G. 2013. Efficient in vitro plant regeneration by indirect organogenesis for different cultivars of common bean. *Scientia horticultrae*. 153:109-116
- Dang, W; Wei, Z.M. 2009. High frequency plant regeneration from the cotyledonary node of common bean.. *Biologia Plantarum*. 53(2):312-316

- Delgado-Sánchez, A; Bibler, R; Lavin, M. 2006. Phylogeny of the genus *Phaseolus* (Leguminosae): a recent diversification in an ancient landscape. *Systematic Botany* 31(4):779-791.
- FAO. 1991. Leguminosas forrajeras tropicales. Editado por la organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia. 707 p.
- Gatica Arias, AM; Muñoz Valverde, J; Ramírez Fonseca, P; Valdez Melara, M. 2010. *In vitro* plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris*): effect of N6-benzylaminopurine and adenine sulphate. *Electronic Journal of Biotechnology* 13(1):6-7.
- Gamborg, OL y Phillips GC. 2001. *Plant Cell, Tissues and Organ Culture: fundamental methods*. (Ed): Springer-Verlag, Berlin, 358 p.
- George, EF; Debergh, PC. 2008. *Micropropagation: Uses and Methods*. Plant propagation by tissue culture. 29-64.
- Gepts, P. 1998. Origin and evolution of common bean: past events and recent trends. *HortScience* 33(7):1124-1130.
- Hnatuszko-Konka, K; Kowalczyk, T; Gerszberg, A; Glinska, S; Grzegorzczuk-Karolak, I. 2019. Regeneration of *Phaseolus vulgaris* from epicotyls and hypocotyls via direct organogenesis. *Sci Rep*. 9:6248.
- Hernández Fonseca, JC. 2009. *Cultivo de Frijol (Phaseolus vulgaris)*, Manual de recomendaciones técnicas de cultivo de frijol. 79p.
- Hernández Ríos, I; García Herrera, EJ; Pastor López, FJ; Tarango Arámbula, LA; Becerra Rivas, JJ; Torres Torres, ME; Martínez Castañeda, O; Valverde Castañeda, A; García, AB. 2003. Programa Estratégico de Necesidades de Investigación y Transferencia de Tecnología en el Estado de San Luis Potosí: caracterización de la cadena agroalimentaria del Frijol de riego e identificación de sus demandas tecnológicas.
- , H., Jones, T., Cheng, M., 2007. Callo organogénico como el objetivo para la regeneración y transformación de plantas mediante *Agrobacterium* en soja (*Glycine max* (L.) Merr.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 43, 558-568.

- IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, CR). 2014. Cadenas de valor de maíz blanco y frijol en Centro América: actores, problemas y acciones para su competitividad (en línea). Ed. R Rivera. San José, CR. 127 p. Consultado 25 jun. 2021. Disponible en <http://www.iica.int>, <http://www.observatorioedsicta.info>.
- Jenkins, JB. 2000. Genética. Barcelona, ES, Reverté. S.A. p. 512.
- Kwapata, K; Sabzikar, R; Sticklen, M; Kelly, J. 2010. In vitro regeneration and morphogenesis studies in common bean. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 100(1):97-105.
- Malik, KA; Saxena, PK. 1992. Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L.: high-frequency induction of direct shoot formation in intact seedlings by N6-benzylaminopurine and thidiazuron.. *Planta*. 186: 384-389.
- Martínez Garza. A. 1988. Diseños Experimentales. Métodos de teoría. Editorial Trillas. México D.F.
- Martínez Castillo, B; Rodríguez de la O, JL; J. Mascorro Gallardo, O; Iturriaga, G. 2015. In vitro Plants of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Obtained by Direct Organogenesis. *Journal of Agricultural Science*. 7(11): 1916-9752.
- Mohamed, MF; Coyne, DP; Read, PE. 2006. Shoot organogenesis in callus induced from pedicel explants of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of the American Society for Horticultural Science* 118(1):158-162.
- Mroginski, L; Roca, WM. 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. (en línea). Consultado 24 de may. 2021. Disponible en <https://cgspace.cgiar.org/handle/10569/54686>
- Narváez, GS. 2009. Regeneración de brotes a partir de hojas provenientes de plantas in vitro de rosa variedad Akito (*Rosa* sp. Var Akito). Sangolquí.
- Pabón Calderón, LA. 2011. Inducción de mutaciones mediante radiaciones gamma de (*Passiflor edulis* sim var. *edulis*). (en línea). Tesis Mag. Sc. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá DC, CO. Consultado 01 jul. 2021. Disponible en <http://www.bdigital.unal.edu.com>
- Parsons, D. B. 1999. Fríjol y chícharo. 2º edición. México, Trillas S.A. de C.V.

- Quintero Jiménez et al, (2010). Método eficiente de regeneración *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L) vol.44, n.1, pp.57-64. ISSN 2521-9766.
- Ramírez, JCR; Rangel, IBEU. 2011. El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. Revista Fuente Año 3(8):5-9.
- Rosas, J.C. 2003. Recomendaciones para el manejo agronómico del cultivo de frijol. Programa de Investigaciones en Frijol, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Tegucigalpa Honduras, 33p.
- Santalla, M; Power, JB; Davey, MR.1998. Efficient *in vitro* shoot regeneration responses of *Phaseolus vulgaris* and *P. coccineus*. *Euphytica* 102:195–202
- Svetleva, D; Velcheva, M; Bhowmik, G. 2003. Biotechnology as a useful tool in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) improvement. *Euphytica* 131:189–200.
- Tapia, H. B., C.A. Henríquez. 1988. Manejo Integrado De La Producción De Frijol Basado En Labranza Cero. Managua, Nicaragua.
- Tzitzikas, E., M. Bergervoet, K. Raemakers, J. Vincken, A. Lammeren y R. Visser. 2004. Regeneration of pea (*Pisum sativum* L.) by a cyclic organogenic system. *Plant Cell Reports* 23, 453-460.
- Torrescano De Labra, L. 2014. Cultivo *in vitro* y evaluación de la expresión transitoria del gen en *Phaseolus vulgaris*. Instituto Politécnico Nacional. 1-88.
- Veltcheva, M; Svetleva, D; Petkova, S; Perl, A. 2005. *In vitro* regeneration and genetic transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)-Problems and progress. *Scientia Horticulturae* 107(1):2-10.
- Villamizar, EA. 2005. Estandarización del protocolo *in vitro* para el establecimiento de encenillo (*Weinmannia tomentosa*) y el rodante (*Escallonia mytilloides*) en el laboratorio de cultivos del jardín botánico José Celestino Mutis. Colombia.

9. ANEXOS

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

Variables	Dosis de BAP	Promedio	Error estándar
Número de brotes	0.00	0.00	0.00 (b) ¹
	1.00	0.68	0.12 (a)
	5.00	0.86	0.17 (a)
Número de hojas	0.00	1.41	0.19 (b)
	1.00	3.04	0.23 (a)
	5.00	3.37	0.31 (a)
Número de raíces	0.00	2.58	0.63 (a)
	1.00	1.70	0.18 (ab)
	5.00	0.55	0.15 (b)
Eficiencia a la regeneración in vitro (%)	0.00	0	
	1.00	50	
	5.00	68	

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

Cuadro A-2. Resumen de análisis de varianza para la variable número de brotes a partir de ejes embrionarios por organogénesis directa.

Variable	CME	CV	R ²	Nivel de significancia para tratamientos (p-valor)
Número de brotes	0.02	30.29	0.88	0.0001

CME: Coeficiente medio del error.

CV: Coeficiente de variación.

R²: Coeficiente de determinación.

Cuadro A-3. Resumen de análisis de varianza para la variable número de hojas a partir de ejes embrionarios por organogénesis directa.

Variable	CME	CV	R ²	Nivel de significancia para tratamientos (p-valor)
Número de hojas	0.25	19.21	0.75	0.0001

CME: Coeficiente medio del error.

CV: Coeficiente de variación.

R²: Coeficiente de determinación.

Cuadro A-4. Resumen de análisis de varianza para la variable número de raíces a partir de ejes embrionarios por organogénesis directa.

Variable	CME	CV	R ²	Nivel de significancia para tratamientos (p-valor)
Número de raíces	0.47	43.73	0.65	0.0020

CME: Coeficiente medio del error.

CV: Coeficiente de variación.

R²: Coeficiente de determinación.

Cuadro A-5. Efecto de Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de brotes, hojas, raíces y eficiencia de regeneración a partir de nudos cotiledonales de *Phaseolus vulgaris* L. variedad CENTA EAC.

Variables	Dosis de BAP	Promedio	Error estándar
Número de brotes	0.00	0.00	0.00 (b) ¹
	2.25	1.20	0.09 (b)
	6.75	2.45	0.18 (a)
Número de hojas	0.00	1.02	0.06 (b)
	2.25	1.29	0.15 (b)
	6.75	5.69	0.65 (a)
Número de raíces	0.00	3.71	0.60 (a)
	2.25	2.26	0.42 (a)
	6.75	0.58	0.02 (b)
Eficiencia a la regeneración in vitro (%)	0.00	0	
	2.25	55	
	6.75	90	

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

Cuadro A-6. Resumen de análisis de varianza para la variable número de brotes a partir de nudos cotiledonales por organogénesis directa.

Variable	CME	CV	R ²	Nivel de significancia para tratamientos (p-valor)
Número de brotes	0.08	18.26	0.84	0.0001

CME: Coeficiente medio del error.

CV: Coeficiente de variación.

R²: Coeficiente de determinación.

Cuadro A-7. Resumen de análisis de varianza para la variable número de hojas a partir de nudos cotiledonales por organogénesis directa.

Variable	CME	CV	R ²	Nivel de significancia para tratamientos (p-valor)
Número de hojas	0.74	32.29	0.89	0.0001

CME: Coeficiente medio del error.

CV: Coeficiente de variación.

R²: Coeficiente de determinación.

Cuadro A-8. Resumen de análisis de varianza para la variable número de raíces a partir de nudos cotiledonales por organogénesis directa.

Variable	CME	CV	R ²	Nivel de significancia para tratamientos (p-valor)
Número de raíces	0.90	47.41	0.76	0.0002

CME: Coeficiente medio del error.

CV: Coeficiente de variación.

R²: Coeficiente de determinación.

Cuadro A-9. Efecto de Bencilaminopurina (BAP) sobre el número promedio de brotes, hojas, raíces y eficiencia de regeneración a partir de meristemos de *Phaseolus vulgaris* L. variedad CENTA EAC.

Variables	Dosis de BAP	Promedio	Error estándar
Número de brotes	0.00	0.00	0.00 (b) ¹
	2.25	1.31	0.12 (b)
	6.75	2.33	0.20 (a)
Número de hojas	0.00	1.93	0.13 (b)
	2.25	2.07	0.19 (b)
	6.75	4.49	0.39 (a)

Número de raíces	0.00	0.69	0.27 (a)
	2.25	0.40	0.07 (b)
	6.75	0.00	0.00 (b)
Eficiencia a la regeneración in vitro (%)	0.00	0	
	2.25	60	
	6.75	85	

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

Cuadro A-10. Resumen de análisis de varianza para la variable número de brotes a partir de meristemos por organogénesis directa.

Variable	CME	CV	R ²	Nivel de significancia para tratamientos (p-valor)
Número de brotes	0.11	20.34	0.72	0.0005

CME: Coeficiente medio del error.

CV: Coeficiente de variación.

R²: Coeficiente de determinación.

Cuadro A-11. Resumen de análisis de varianza para la variable número de hojas a partir de meristemos por organogénesis directa.

Variable	CME	CV	R ²	Nivel de significancia para tratamientos (p-valor)
Número de hojas	0.35	20.77	0.81	0.0001

CME: Coeficiente medio del error.

CV: Coeficiente de variación.

R²: Coeficiente de determinación.

Cuadro A-12. Resumen de análisis de varianza para la variable número de raíces a partir de meristemos por organogénesis directa.

Variable	CME	CV	R ²	Nivel de significancia para tratamientos (p-valor)
Número de raíces	0.13	98.40	0.44	0.0308

CME: Coeficiente medio del error.

CV: Coeficiente de variación.

R²: Coeficiente de determinación.

Cuadro A-13. Protocolo específico de regeneración *in vitro* para ejes embrionario de la variedad de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) CENTA EAC.

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

1. Condición de semillas

Utilizar semillas maduras de no más de un año de postcosecha.

2. Desinfección de semillas

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

Descarte el alcohol y continúe con la desinfección con solución de NACOI al 1% adicionada con tres gotas de Tween 20 por cada 100 ml de agua.

Agite por 20 minutos.

Haga tres lavados con agua destilada estéril o los que sean necesarios hasta eliminar la solución desinfectante.

3. Imbibición de semillas

Distribuya las semillas en un enlenmeyer con agua estéril y selle el frasco con plastic grap.

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

4. Extracción de ejes embrionarios

Separe la testa y disecte los ejes embrionarios con la ayuda de pinzas y bisturí estériles en cámaras de flujo laminar.

Corte el meristemo radicular y hojas cotiledonales.

Coloque los ejes embrionarios en un frasco con agua destilada hasta terminar de extraer todos los explantes para evitar deshidratación.

5. Desinfección de ejes embrionarios

Desinfecte los ejes embrionarios con NACOI al 1% durante 10 minutos en agitación constante.

Haga tres lavados con agua destilada estéril.

6. Cultivo de ejes embrionarios en condiciones de fotoperíodo

Ubique los ejes embrionarios en forma vertical en frascos con 25 ml de medio semisólido MS (Murashige y Skoog 1962) con PH 5.7 suplementado con 100 mg^l⁻¹ de mioinositol, 0.1 mg^l⁻¹ de tiamina, 0.5 mg^l⁻¹ de ácido nicotínico, 0.5 mg^l⁻¹ de piridoxina, 2 mg^l⁻¹ de glicina, 30 g^l⁻¹ de sacarosa, 8 g^l⁻¹ de agar y 1 mg^l⁻¹ de BAP.

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

7. Subcultivo de ejes embrionarios

Al cumplir los 21 días transfiera los explantes al mismo medio de cultivo y manténgalo en las condiciones descritas anteriormente

8. Evaluación de la regeneración

Pasados 42 días de iniciado el ensayo evalúe la respuesta a la regeneración *in vitro* mediante los siguientes indicadores: número de brotes, número de hojas y número de raíces y porcentaje de eficiencia.

Cuadro A-14. Protocolo específico de regeneración *in vitro* para nudos cotiledonales de la variedad de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) CENTA EAC.

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

1. Condición de semillas

Utilizar semillas maduras de no más de un año de postcosecha.

2. Desinfección de semillas

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

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

Agite por 15 minutos.

Haga tres lavados con agua destilada estéril o los que sean necesarios hasta eliminar la solución desinfectante.

3. Germinación de semillas

Distribuya las semillas en frascos con 25 ml de medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con PH 5.7 suplementado con 100 mg^l⁻¹ de mioinositol, 0.1 mg^l⁻¹ de tiamina, 0.5 mg^l⁻¹ de ácido nicotínico, 0.5 mg^l⁻¹ de piridoxina, 2 mg^l⁻¹ de glicina, 1 mg^l⁻¹ de BAP, 30 g^l⁻¹ sacarosa y 3 g^l⁻¹ agar, no más de 10 semillas por frasco.

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

4. Disección de nudos cotiledonales

Al cumplir siete días de germinación con la ayuda de pinzas y bisturí estériles en cámara de flujo laminar disecte los nudos cotiledonales.

5. Precultivo de nudos cotiledonales

Coloque los nudos cotiledonales en frascos con 25 ml de medio MS con PH de 5.7 suplementado con 100 mg^l⁻¹ de mioinositol, 0.1 mg^l⁻¹ de tiamina, 0.5 mg^l⁻¹ de ácido nicotínico, 0.5 mg^l⁻¹ de piridoxina, 2 mg^l⁻¹ de glicina, 0.2 mg^l⁻¹ de Tidiazurón (TDZ), 0.05 mg^l⁻¹ de Ácido Indol acético (AIA), 30 gl⁻¹ de sacarosa y 8 gl⁻¹ de agar.

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

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

Pase los explantes al MIB con PH 5.7 y compuesto por MS adicionado con 0 mg^l⁻¹ de BAP, 2.25 mg^l⁻¹ de BAP y 6.75 mg^l⁻¹ de BAP.

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

7. Evaluación de la regeneración

Finalizados 28 días de iniciado el ensayo evalúe la respuesta a la regeneración *in vitro* mediante los siguientes indicadores: número de brotes, número de hojas, número de raíces y porcentaje de eficiencia.

Cuadro A-15. Protocolo específico de regeneración *in vitro* para meristemas de la variedad de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) CENTA EAC.

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

1. Condición de semillas

Utilizar semillas maduras de no más de un año de postcosecha.

2. Desinfección de semillas

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

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

Agite por 15 minutos.

Haga tres lavados con agua destilada estéril o los que sean necesarios hasta eliminar la solución desinfectante.

3. Germinación de semillas

Distribuya las semillas en frascos con 25 ml de medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con PH 5.7 suplementado con 100 mg^l⁻¹ de mioinositol, 0.1 mg^l⁻¹ de tiamina, 0.5 mg^l⁻¹ de ácido nicotínico, 0.5 mg^l⁻¹ de piridoxina, 2 mg^l⁻¹ de glicina, 1 mg^l⁻¹ de BAP, 30 g^l⁻¹ sacarosa y 3 g^l⁻¹ agar.

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

4. Disección de meristemas

Al cumplir los siete días de germinación con la ayuda de pinzas y bisturí estériles en cámara de flujo laminar disecte los meristemas.

Corte en la parte superior del nudo cotiledonal y las hojas cotiledonales.

5. Precultivo de meristemos

Coloque los meristemos en frascos con 25 ml de medio MS con PH de 5.7 suplementado con 100 mg^l⁻¹ de mioinositol, 0.1 mg^l⁻¹ de tiamina, 0.5 mg^l⁻¹ de ácido nicotínico, 0.5 mg^l⁻¹ de piridoxina, 2 mg^l⁻¹ de glicina, 0.2 mg^l⁻¹ de Tidiazurón (TDZ), 0.05 mg^l⁻¹ de Ácido Indol acético (AIA), 30 g^l⁻¹ de sacarosa y 8 g^l⁻¹ de agar.

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

6. Transferencia de meristemos al medio de inducción y regeneración de brotes (MIB)

Pase los explantes al MIB con PH 5.7 y compuesto por MS adicionado con 0 mg^l⁻¹ de BAP, 2.25 mg^l⁻¹ de BAP y 6.75 mg^l⁻¹ de BAP.

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

7. Evaluación de la regeneración

Finalizados 28 días de iniciado el ensayo evalúe la respuesta a la regeneración *in vitro* mediante los siguientes indicadores: número de brotes, número de hojas, número de raíces y porcentaje de eficiencia.

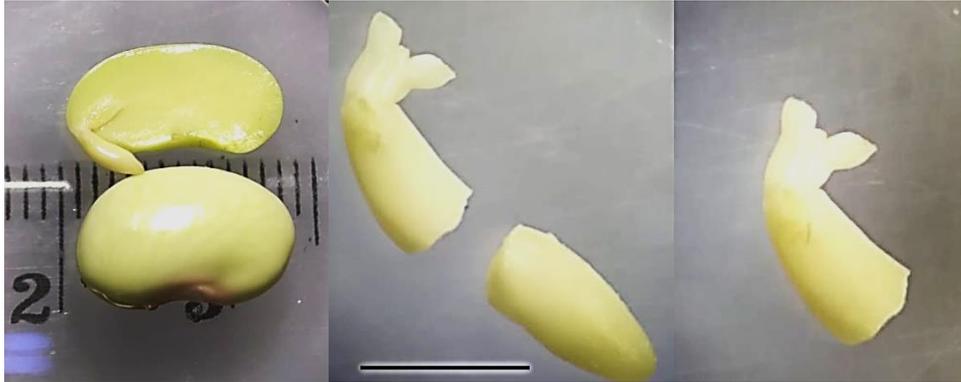


Figura A-1. Disección de ejes embrionarios (vista en estereoscopio) Barras = 1 cm.



Figura A-2. Disección de explantes (nudos cotiledonales y meristemis). Barras = 1 cm.

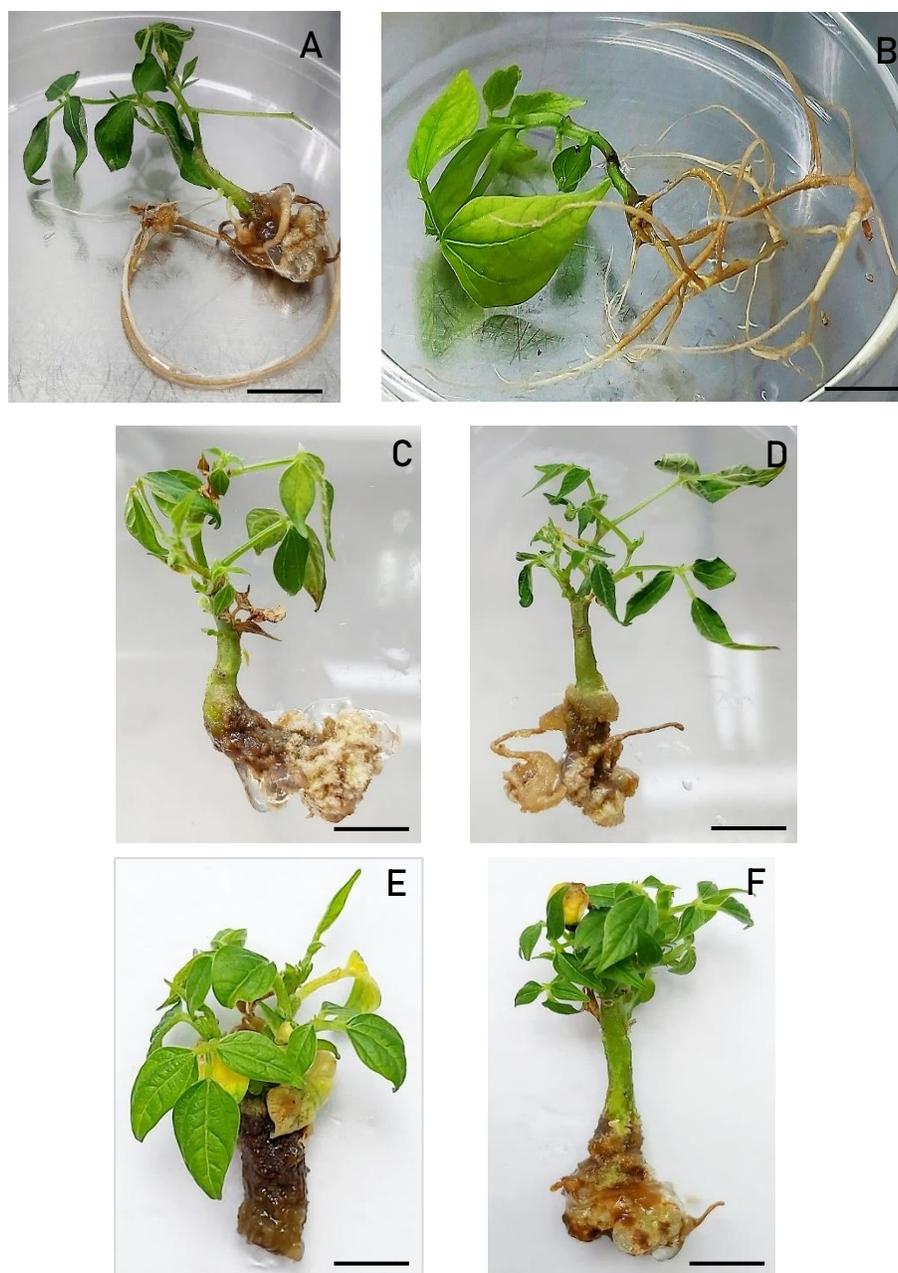


Figura A-3. Regeneración vía organogénesis directa a partir de ejes embrionarios de la variedad CENTA EAC de *Phaseolus. vulgaris* L. a los 21 y 42 días de cultivo *in vitro* (A) y (B) CENTA EAC suplementados con 0 mg l^{-1} de BAP no se observó una regeneración de brotes, pero si una producción de raíces y hojas en cada explante. (C) y (D) CENTA EAC desarrollo de brotes en medio suplementado con 1 mg l^{-1} de BAP. (E) y (F) Medio suplementado con 5 mg l^{-1} de BAP en los explantes se obtuvo respuesta favorable a la producción de brotes y hojas. Barras = 1 cm.

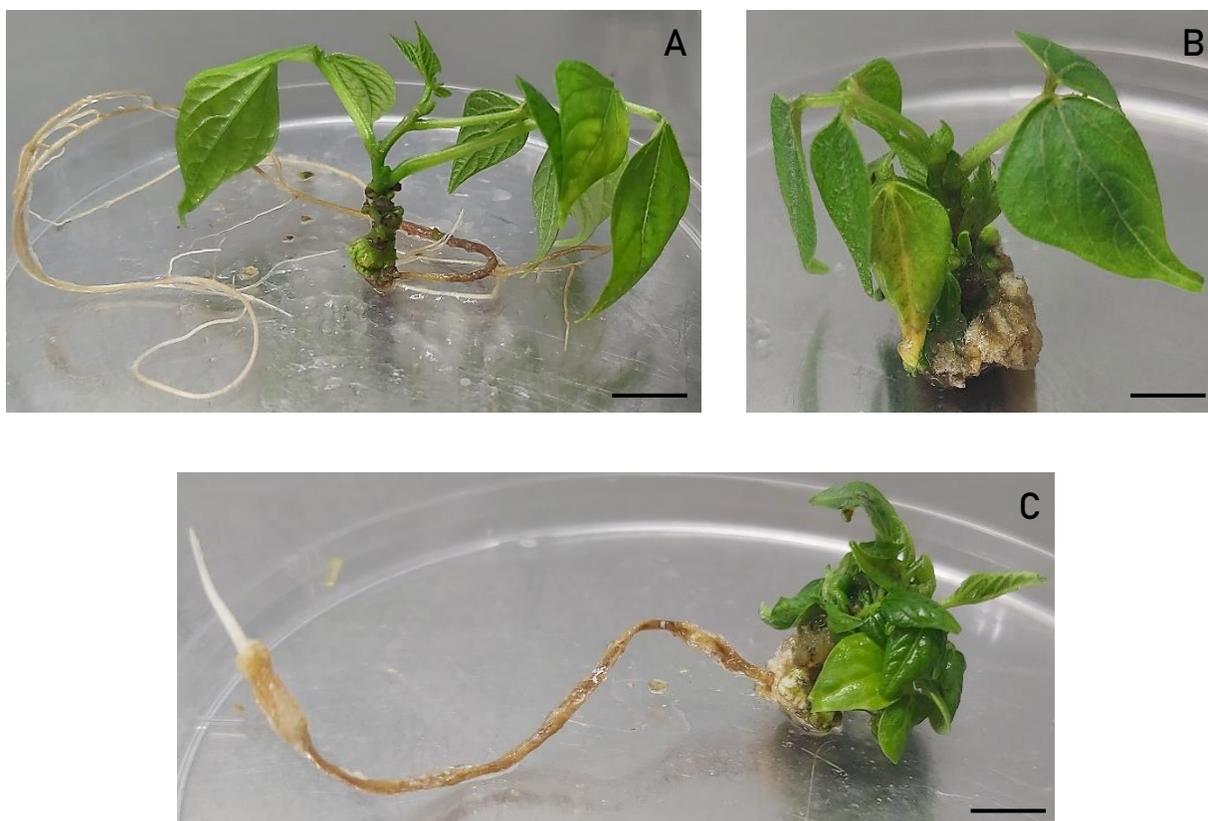


Figura A-4. Regeneración vía organogénesis indirecta variedad CANTA EAC obtenidos de nudos cotiledonales a los 28 días de haber concluido el ensayo. **(A)** Explantes en medio con ausencia de BAP, se logró la producción de raíces y hoja, sin embargo, no se observó la regeneración de brotes. **(B)** En un medio suplementado con 2.25 mg l^{-1} de BAP se produjo una respuesta a la regeneración de brotes. **(C)** Desarrollo de brotes y hojas en una concentración de 6.75 mg l^{-1} de BAP. Barras = 1 cm.

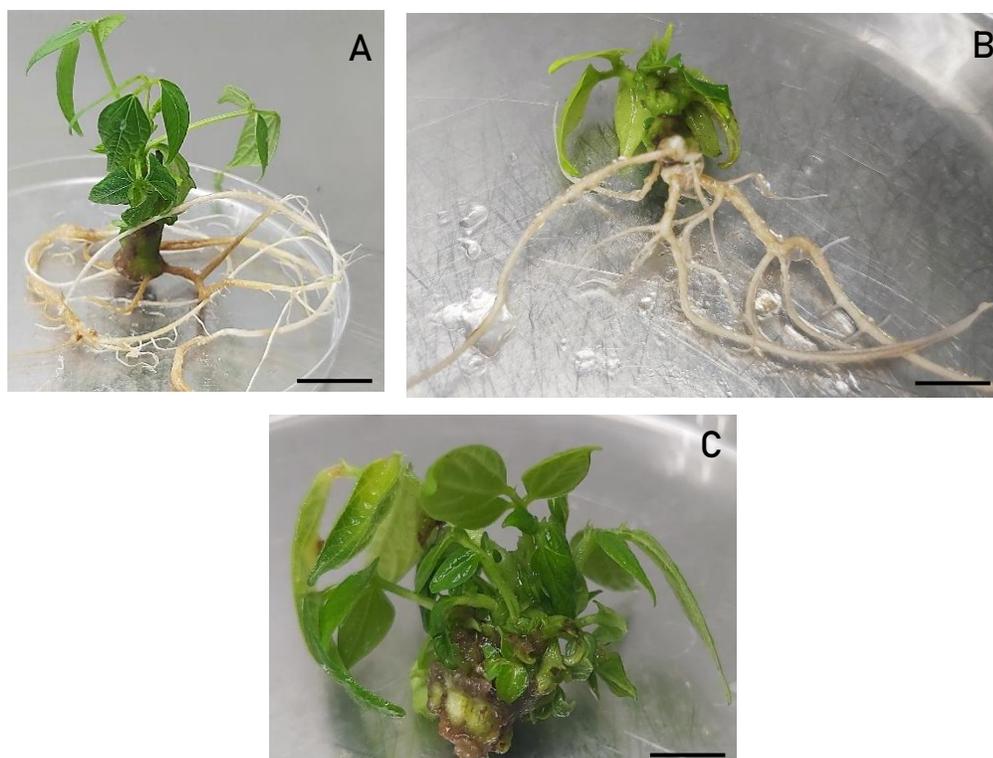


Figura A-5. Regeneración vía organogénesis indirecta variedad CENTA EAC obtenidos a partir de meristemas a los 28 días de haber concluido el ensayo. **(A)** Meristemas suplementados en medio con 0 mg l^{-1} BAP, se logró únicamente la producción de raíces y hojas. **(B)** Con 2.25 mg l^{-1} de BAP en un medio de cultivo se produjo una regeneración de brotes. **(C)** En una concentración de 6.75 mg l^{-1} de BAP se obtuvo el mejor desarrollo de brotes y hojas. Barras = 1 cm.



Figura A-6. Aclimatación de *Phaseolus vulgaris* L. variedad CENTA EAC a los 48 días.