

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

Código: AI-2308

NOMBRE DE LA INVESTIGACIÓN

Organogénesis <i>in vitro</i> de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) var. CENTA EAC
--

TITULO A OBTENER: INGENIERA AGRONOMO

AUTORES

Nombres, apellidos	Institución y dirección	Teléfono y E-mail	Firma
Br. Jennifer Nohemy Romero Palacios	Comunidad Éxodo, psj. 3 av. 3. San Salvador	74892231 rp12018es.edu.sv	
Ing. Agr. M.Sc. Julio Cesar Ortiz Pavón	Universidad de El Salvador Departamento de Fitotecnia	61896961 julio.ortiz@ues.edu.sv	
Lic. Santos Wilmar Morales Árevalo	Universidad de El Salvador Departamento de Fitotecnia	79558504 santos.morales@ues.edu .sv	

Visto bueno:

Coordinador General de Procesos de Graduación del Departamento de Fitotecnia Ing. Agr. Mario Alfredo Pérez Ascencio	Firma _____
Director General de Procesos de Graduación de la Facultad Ing. Agr. Enrique Alonso Alas García	Firma _____
Jefe del Departamento de Fitotecnia. Ing. Agr. M.Sc. Fidel Ángel Parada Berrios	Firma _____
	Sello: _____
Lugar y fecha: Ciudad Universitaria, septiembre de 2023.	

Organogénesis *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) Var. CENTA EAC. Romero-Palacios, JN¹; Ortiz-Pavón, JC²; Morales Árevalo, SW². ²Docentes directores. Universidad de El Salvador, Departamento de Fitotecnia.

Resumen

Se estableció un protocolo para la regeneración *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad CENTA EAC mediante organogénesis en medios de cultivos suplementados con tres diferentes concentraciones de Benzilaminapurina (BAP). Se utilizaron ejes embrionarios, nudos cotiledonales y meristemos como explantes. Para la organogénesis directa se cultivaron ejes embrionarios en medio de cultivo semisólido, el cual consistió de las sales minerales MS (Murashige y Skook, 1962) y BAP (0,1 y 5 mg.L⁻¹) y para la organogénesis indirecta se precultivaron nudos cotiledonales y meristemos de la variedad antes mencionada por 14 días en Tidiazurón (TZD) y Ácido indolacético (AIA). Luego fueron transferidos al medio de inducción y regeneración de brotes el cual consistió de las sales MS adicionadas con BAP (0, 2.25 y 6.75 mg.L⁻¹). Con el precultivo se obtuvo formación de brotes múltiples y se determinó que los nudos cotiledonales responden de manera más eficiente que los meristemos sin embargo, no se logró regenerar estructuras callogénicas en ambos explantes. Esto proporciona evidencia sobre cómo los medios de cultivo y los reguladores del crecimiento influyen en la regeneración del frijol común. Se observó en la organogénesis directa que la dosis 5 mg.L⁻¹ de BAP presenta el mayor número de brotes por explante (0.86) y en la organogénesis indirecta el mayor resultado se obtuvo en la dosis de 6.75 mg.L⁻¹ de BAP. Este informe establece el primer protocolo para la variedad CENTA EAC 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.

Abstract.

A protocol was established for the *in vitro* regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) variety CENTA EAC by organogenesis in culture media supplemented with three different concentrations of Benzilaminapurine (BAP). Embryonic axes, cotyledon nodes and meristems were used as explants. For direct organogenesis, embryogenic axes were cultured in semi-solid culture medium, which consisted of the mineral salts MS (Murashige and Skook, 1962) and BAP (0.1 and 5 mg. L⁻¹) and for indirect organogenesis, cotyledon and meristems knots of the

aforementioned varieties were pre-cultivated for 14 days in Tidiazurón (TZD) and Indoleacetic Acid (AIA). They were then transferred to the sprout induction and regeneration medium (MIB), which consisted of MS salts added with BAP (0, 2.25 and 6.75 mg. L⁻¹). With the preculture was obtained formation of multiple shoots and it was determined that the cotyledon nodes respond more efficiently than the meristems however, it was not possible to regenerate callogenic structures in both explants. This provides evidence on how culture media and growth regulators influence common bean regeneration. It was observed in direct organogenesis that the dose 5 mg. L⁻¹ of BAP presents the highest number of outbreaks per explant (0.86) and in indirect organogenesis the highest result was obtained at the dose of 6.75 mg. L⁻¹ of BAP. This report establishes the first protocol for the CENTA EAC variety of common bean regeneration through direct and indirect organogenesis, which can serve as a reference for its subsequent genetic transformation research.

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

1. Introducción

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. Materiales y métodos

2.1. Ubicación del 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

2.2. 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 "Enríquez Álvarez Córdova" (CENTA)

2.3. Metodología de laboratorio

2.3.1. 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

Para los nudos cotiledonales y meristemos, las semillas se colocaron en medios de cultivo de germinación que 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 $25^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ C}$ y durante 7 días en oscuridad absoluta.

Después de la germinación, los explantes fueron disectados con ayuda de pinzas y bisturí en condiciones asépticas. Los nudos cotiledonales se cultivaron en placas Petri mientras que los meristemos en frascos vidrios, ambos con 25 ml de medio de 17 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.

2.3.2. Inducción y regeneración de brotes

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.

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.

Para los nudos y meristemos 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 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 ± 1°C y 58 μmol/m² /s.

2.3.3. 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 iniciado el ensayo con los nudos y meristemas y a los 42 días en los ejes embrionarios.

2.3.4. Análisis estadístico

A las variables se les aplicó 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. La variable independiente fue los medios de cultivo y la variable dependiente fue la respuesta morfogénica.

3. Resultados

Los medios de cultivo junto con la utilización de BAP permiten en los ejes embrionarios regenerar estructuras morfológicas como brotes y hojas (Figura 1). Al comparar los resultados, se observaron diferencias altamente significativas en las concentraciones de BAP sobre las variables morfológicas evaluadas. En el caso de los brotes y las hojas la dosis con mejor respuesta fue la de 5 mg.L⁻¹ de BAP, el mayor número de raíces se obtuvo en el medio de inducción con ausencia de BAP (Cuadro 1).



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

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

Tratamientos	Variables morfológicas		
	BAP (mg.L ⁻¹)	Brotes ¹	Hojas ¹
0	0.00±0.00 (b)	1.41±0.19 (b)	2.58±0.63 (a)
1	0.68±0.12 (a)	3.04±0.23 (a)	1.70±0.18(ab)
5	0.86±0.17 (a)	3.37±0.31 (a)	0.55±0.15 (b)

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

²Media ± EE. Letras distintas dentro de columnas denotan medias estadísticamente diferentes con la prueba de Tukey (P <0.01).

En los ejes embrionarios, el medio de inducción suplementado con 5 mg.L⁻¹ de BAP produjo el mayor número promedio de brotes. A diferencia de la dosis con ausencia de BAP donde no se observaron brotes en el medio de inducción. Es importante destacar que las hojas y raíces desarrolladas con 0 mg.L⁻¹ de BAP corresponden a los ejes embrionarios germinados y no brotes desarrollados. El Cuadro 1 muestra el efecto del BAP sobre el número promedio de brotes inducidos a partir de ejes embrionarios de la variedad CENTA EAC de *Phaseolus vulgaris* L en medio de inducción suplementado con diferentes dosis de BAP. En la variedad evaluada no se indujeron yemas organogénicas con la concentración de 0 mg.L⁻¹ de BAP y la adición de esta citoquinina al medio de inducción mejoró la formación de brotes.

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

Explantes	Tratamientos	Variables morfológicas		
		BAP (mg.L ⁻¹)	Brotes ¹	Hojas ¹
Nudos cotiledonales	0	0.00±0.00(b) ¹	1.02±0.06(b)	3.71±0.60(a)
	2.25	1.20±0.19(b)	1.29±0.15(b)	2.26±0.42(a)
	6.75	2.45±0.18(a)	5.69±0.65(a)	0.58±0.02(b)
Meristemos	0	0.00±0.00(b) ¹	1.93±0.13(b)	0.69±0.27(a)
	2.25	1.31±0.12(b)	2.07±0.19(b)	0.40±0.07(b)
	6.75	2.33±0.20(a)	4.49±0.39(a)	0.00±0.00(b)

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

²Media ± EE. Letras distintas dentro de columnas denotan medias estadísticamente diferentes con la prueba de Tukey (P <0.01).

A partir de nudos cotiledonales y meristemos, el mayor número promedio de raíces por explante se obtuvo en el medio de inducción sin BAP. La dosis de 6.75 mg.L⁻¹ de BAP en nudos cotiledonales resultó con el mayor número de brotes (2.45) y hojas (5.69).

En meristemos la dosis con mejores resultados para número de brotes fue la de 6.75 mg.L⁻¹ de BAP al igual que en el número de hojas (Cuadro 2).

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

Brotes (Eficiencia %)	
Concentración de BAP (mg.L ⁻¹) ¹	Variedad CENTA EAC ¹
0	0.00±0.00 b (0)
1	0.68±0.06 a (50)
5	0.87±0.24 a (68)

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

²Media ± EE. Letras distintas dentro de columnas denotan medias estadísticamente diferentes con la prueba de Tukey (P <0.01).

La concentración de 5mg.L⁻¹ de BAP obtuvo el mayor número promedio de brotes y el mayor porcentaje de eficiencia. Los brotes se regeneraron a partir de los grupos de yemas apicales y se desarrollaron en plantas con hojas y raíces aparentemente normales hasta el día 30 de aclimatación.

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

Brotes (Eficiencia %)		
Explantes	Concentración de BAP (mg.L ⁻¹) ¹	Variedad CENTA EAC ¹
Nudos cotiledonales	0	0.00±0.00 b ¹ (0)
	2.25	1.20±0.21 b (55)
	6.75	2.45±0.41 a (90)
Meristemos	0	0.00±0.00 b (0)
	2.25	1.31±0.27 b (60)
	6.75	2.33±0.45 a (85)

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

²Media \pm EE. Letras distintas dentro de columnas denotan medias estadísticamente diferentes con la prueba de Tukey (P <0.01).

El Cuadro 4 se muestra el efecto del BAP sobre el número de brotes inducidos a partir de nudos cotiledonales y meristemos de *Phaseolus vulgaris* L. Estos resultados fueron bastante similares en los explantes evaluados. Puesto que, en los medios con ausencia de BAP no se indujeron yemas organogénicas después de 28 días de cultivo. Mientras que al adicionar BAP al medio de cultivo mejoró la formación de brotes múltiples en ambos tipos de explantes. Para nudos cotiledonales el mayor promedio de brotes se obtuvo con la concentración de 6.75 mg.L⁻¹ de BAP al igual que al utilizar meristemos como explantes los mejores resultados también se obtuvieron con la concentración de 6.75 mg.L⁻¹. Los porcentajes de eficiencia de los medios suplementados con BAP fueron significativos en comparación a los medios con ausencia de BAP.

4. Discusión

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

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 30 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 mgL⁻¹ de myo-inositol, 1 mg. L⁻¹ de tiamina, 30 gL⁻¹ de sacarosa, BAP (0, 5 y 10 mg. L⁻¹), 0, 20 y 40 mgL⁻¹ de sulfato de adenina (SA) y 8 gL⁻¹ de agar. El medio de cultivo MS con 5 mgL⁻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%.

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. 2013), nudos cotiledonales (Aguirre y Meléndez, 2022), meristemos (Aguirre y Meléndez, 2022).

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. 2013), nudos cotiledonales (Aguirre y Meléndez, 2022), meristemos (Aguirre y Meléndez, 2022).

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 que 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 meristemos 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.

5. Conclusiones

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

Además, la capacidad morfogenética se manifestó con la formación de brotes y hojas en explantes de *Phaseolus vulgaris* L. variedad CENTA EAC a partir de ejes embrionarios, nudos cotiledonales y meristemas mediante la organogénesis directa e indirecta.

Por otro lado no se manifestó la formación de callo en un precultivo de medios MS adicionado con 0.2 mg. L⁻¹ de Tidiazurón (TDZ), 0.05 mg.L⁻¹ de Ácido Indol acético (AIA) mediante la organogénesis indirecta a partir de nudos cotiledonales y meristemas.

En relación a esto se estableció un protocolo de regeneración *in vitro* eficiente para la variedad CENTA EAC.

6. Recomendaciones

Utilizar una concentración de 6.75 mgL⁻¹ para la obtención de brotes para la variedad CENTA EAC y nudos cotiledonales como explantes mediante organogénesis indirecta.

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

7. Bibliografía

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.

CIAT (2008) Improved beans for the developing world. Annual Report 2008. pp. 302 Cali.

Collado, R; Veitía, N; Bermúdez-Caraballosa, 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.

- Gatica Arias, AM; Muñoz Valverde, J; Ramírez Fonseca, P; Valdez Melara, M. 2010. *In vitro* plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris*): effect of N6-benzylaminopurine and adenine sulphate. *Electronic Journal of Biotechnology* 13(1):6-7.
- George, EF; Debergh, PC. 2008. Micropropagation: Uses and Methods. *Plant propagation by tissue culture*. 29-64.
- Hnatuszko-Konka, K; Kowalczyk, T; Gerszberg, A; Glinska, S; Grzegorzczak-Karolak, I. 2019. Regeneration of *Phaseolus vulgaris* from epicotyls and hypocotyls via direct organogenesis. *Sci Rep*. 9:6248.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Velcheva, 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.