

Organogénesis directa e indirecta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) a partir de ejes embrionarios, nudos cotiledonales y meristemos

Direct and indirect organogenesis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from embryonic axes, cotyledonary nodes and meristems

<https://doi.org/10.46380/ecotemas-2026-3-83>

Linda Katherine Cativo Parada
Universidad de El Salvador, El Salvador
cp14057@ues.edu.sv

Julio César Ortiz Pavón
Universidad de El Salvador, El Salvador
julio.pavon@ues.edu.sv

Oscar Alonso Rodríguez Gracias
Universidad de El Salvador, El Salvador
oscar.gracias@ues.edu.sv

Recibido: 29/11/2025

Aprobado: 09/04/2026

Publicado: 01/07/2026

RESUMEN

Se establecieron protocolos de regeneración in vitro de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad CENTA Sequía mediante la evaluación de la organogénesis directa e indirecta con distintas concentraciones de bencilaminopurina (BAP). En ambos sistemas se cuantificaron el número de brotes, hojas, raíces y la eficiencia de regeneración. En la organogénesis directa, ejes embrionarios cultivados en medio Murashige y Skoog (1962) suplementado con BAP (0, 1 y 5 mg.L⁻¹) presentaron mayor formación de brotes por explante a 1 mg.L⁻¹ (0.99). Para la organogénesis indirecta, nudos cotiledonales y meristemos fueron precultivados durante 14 días en tidiazurón (TDZ) y ácido indolacético (AIA), y posteriormente transferidos al medio de inducción y regeneración de brotes con BAP (0, 2.25 y 6.75 mg.L⁻¹). Aunque no se obtuvo formación de estructuras callogénicas, sí se observó regeneración múltiple de brotes, con mejor respuesta de los nudos cotiledonales frente a los meristemos. Asimismo, se registró formación de hojas y raíces. En conjunto, los resultados evidencian la influencia de los reguladores de crecimiento en la regeneración de frijol común y confirman su recalcitrancia al cultivo in vitro. Este sistema constituye una base metodológica útil para futuros programas de mejoramiento asistido por biotecnología.

Palabras clave: cultivo in vitro, Bencilaminopurina, regeneración, reguladores de crecimiento

ABSTRACT

Protocols for in vitro regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) variety CENTA Sequía were established by evaluating direct and indirect organogenesis under different concentrations of benzylaminopurine (BAP). In both systems, the number of shoots, leaves, roots, and regeneration efficiency were assessed. For direct organogenesis, embryonic axes were cultured on Murashige and Skoog (1962) medium supplemented with BAP (0, 1, and 5 mg L⁻¹), and the highest number of shoots per explant was obtained at 1 mg L⁻¹ (0.99). For indirect organogenesis, cotyledonary nodes and meristems were precultured for 14 days in thidiazuron (TDZ) and indoleacetic acid (IAA), and then transferred to the shoot induction and regeneration medium (MIB), consisting of MS salts supplemented with BAP (0, 2.25, and 6.75 mg L⁻¹). Although no callogenic structures were formed, multiple shoots were obtained, and cotyledonary nodes responded more efficiently than meristems. Leaf and root formation was also observed. Overall, the results demonstrate the influence of growth regulators on common bean regeneration and confirm the species' recalcitrance to in vitro culture. This regeneration system provides a methodological basis for future breeding programs supported by biotechnological tools.

Keywords: in vitro culture, benzylaminopurine, regeneration, growth regulators

INTRODUCCIÓN

Phaseolus vulgaris L. es la leguminosa alimenticia más importante para el consumo humano directo, ya que representa el 50 % del grano de leguminosas consumidas en el mundo (FAO 2005). Su producción ha alcanzado un carácter universal y constituye un valioso componente de la dieta humana por ser una fuente importante de proteínas, vitaminas y minerales con especial relevancia en la dieta de las poblaciones en América, sobre todo en los países en vías de desarrollo (Ulloa *et al.*, 2011).

En El Salvador el consumo de proteínas alcanza los 52.4 gramos por persona por día, de las cuales se estima que 4.2 gramos son provenientes de frijol, por lo que este grano suministra el 8% de la disponibilidad total de proteínas (CENTA, 2008).

Actualmente, es indispensable la creación de nuevas variedades de frijol que tengan un alto grado de tolerancia a diversos factores (Lizana *et al.*, 2006). La biotecnología vegetal, junto con los métodos de mejoramiento convencionales, podrían facilitar el mejoramiento del frijol, al proporcionarle una mayor resistencia o tolerancia a factores que producen estrés tanto biótico como abiótico (Veltcheva *et al.*, 2005).

Collado *et al.* (2013) lograron vía organogénesis indirecta regenerar brotes (3 brotes por callo) y eventualmente plantas fértiles al utilizar callos en medios suplementados con 2,25 ó 4,50 mg.L⁻¹ de N6-benzilaminipurina. Nudos cotiledonales con uno o dos cotiledones de semillas de 4 meses de madurez resultaron óptimos para la inducción de callos en medios adicionados con 0,04 mg.L⁻¹ de Tidiazurón.

Gatica-Arias *et al.* (2010) desarrollaron un método de regeneración directa de cinco cultivares costarricenses. Este método utilizó como explantes ejes embrionarios y requirió la adición de N6-benzilaminopurina y sulfato de adenina al medio de regeneración. Resultados parecidos

obtuvieron Quintero-Jiménez *et al.* (2010) al optimizar también el medio de regeneración.

Uno de los objetivos de esta investigación fue determinar la respuesta morfogénica a la regeneración *in vitro* mediante organogénesis directa e indirecta de frijol común variedad CENTA sequía. Además, se buscó establecer un protocolo eficiente de regeneración *in vitro* a partir de tres tipos de explantes (ejes embrionarios, nudos cotiledonales y meristemos). El presente estudio buscó desarrollar nuevas metodologías biotecnológicas que sirvan de instrumentos en investigaciones futuras para mejorar genéticamente variedades de interés nacional como lo es CENTA sequía.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador. Se utilizaron semillas maduras de la variedad de frijol CENTA sequía de no más de un año de cosecha. Las semillas utilizadas fueron donadas por el Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Córdova” (CENTA).

Metodología de laboratorio

Desinfección de semillas y disección de explantes

Las semillas se desinfectaron superficialmente en una cámara de flujo laminar. Las semillas se sumergieron durante un minuto en alcohol etílico al 70% seguido de un lavado con hipoclorito de sodio NaOCl al 1% y Tween 20 durante 20 minutos. Posterior a ello, las semillas se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se dejaron en agua durante 16 horas. Transcurrido el tiempo de imbibición, se disectaron los embriones cigóticos de las semillas en cámaras de flujo laminar con ayudas de pinzas y bisturí. Los explantes consistieron en ejes embrionarios que estuvieron conformados en los embriones cigóticos sin la radícula y las hojas cotiledonales. Una vez disectados los explantes, se realizó un segundo lavado con NaOCl al 0.1% durante diez minutos y un lavado final con agua destilada estéril.

Para los nudos cotiledonales y meristemos, en una cámara de flujo laminar se desinfectaron las semillas superficialmente con alcohol etílico al 70% durante 1.5 minutos, luego con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 3.5% y Tween 20 (3 gotas/100 mL) en agitación constante durante 15 minutos. Seguido de esto se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril. Se colocaron las semillas en un medio de cultivo de germinación que estuvo conformado por sales minerales MS (Murashige y Skoog 1962) suplementados con 1 mg.L⁻¹ de tiamina, 1.13 mg.L⁻¹ de BAP, 30 g.L⁻¹ sacarosa y 3 g.L⁻¹ agar. El pH del medio se ajustó a 5.7 con NaOH o HCl y se procedió a esterilizarlo en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Se cultivaron un total de 1000 de semillas en frasco de vidrio de 250 mL. Cada frasco contenía 30 mL de medio y 10 semillas. La temperatura de germinación fue de 25°C ± 2 C y en absoluta oscuridad durante 7 días.

Inducción y regeneración de brotes

Los ejes embrionarios se cultivaron en placas Petri con 25 ml de medio de cultivo semisólido el cual estaba compuesto de sales minerales MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementados con 100 mg.L⁻¹ de mioinositol, 1 mg.L⁻¹ de tiamina, 30 g.L⁻¹ de sacarosa y 8 g.L⁻¹ de agar. Los tratamientos consistieron en medios de cultivo con tres diferentes dosis de Bencilaminopurina (BAP): 0, 1 y 5 mg.L⁻¹ (Gatica *et al.* 2010). El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.7 con HCl o NaOH antes de esterilizarlo en autoclave durante 21 min a 121°C y 1,070 g.cm⁻¹.

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

Trascurridos los 7 días de germinación, los nudos cotiledonales y meristemos se disectaron y cultivaron en placas Petri con 25 mL de medio de inducción de callos (MIC) el cual estaba compuesto de las sales minerales MS y suplementado con 100 mg.L⁻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 mg.L⁻¹ de sacarosa y 8 g.L⁻¹ de agar. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.7 con HCL o NaOH antes de esterilizarlo en autoclave durante 20 min a 121°C y 1,070 g.cm⁻¹.

Transcurrido los 14 días en los medios de inducción de callos (MIC), los nudos y meristemos fueron transferidos al medio de inducción y regeneración de brotes (MIB), el cual consistió de las sales MS adicionadas con diferentes concentraciones de BAP: 0, 2.25 y 6.75 mg.L⁻¹. El pH de los medios se ajustó a 5.7 con HCl o NaOH antes de esterilizarlo en autoclave durante 20 minutos a 121°C y 1.5 MPa. Posteriormente se hizo un subcultivo o refrescamiento en el mismo medio por otros 14 días.

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

Evaluación de la respuesta morfogénica

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

Análisis estadístico

Se aplicó el Análisis de Varianza (ANVA) a cada una de las variables en estudio, bajo un Diseño

Completamente al Azar (DCA). Para demostrar cuál de los medios de cultivo suplementados con BAP presentan la mejor respuesta en la regeneración *in vitro*, se aplicó la prueba estadística de comparación de medias de Tukey con un nivel de significancia estadística (alfa) α del 1% = 0.01. Se utilizaron hojas de cálculo de Microsoft Excel® y los programas estadísticos SPSS® 25 e Infostat® 2020 para el análisis respectivo. La variable independiente fue los medios de cultivo y la variable dependiente fue la respuesta morfológica.

RESULTADOS

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

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

Figura 1. Regeneración morfológica a partir de ejes embrionarios, nudos cotiledonales y meristemos de *Phaseolus vulgaris* L.



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

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

Tratamientos	Variables morfogénicas		
BAP (mg.L ⁻¹)	Brotes ¹	Hojas ¹	Raíces ¹
0	0.00±0.00 ² (b)	1.03±0.06 (b)	4.43±0.34 (a)
1	0.99±0.06 (a)	3.61±0.32 (a)	0.15±0.10 (b)
5	0.88±0.04 (a)	2.81±0.29 (a)	0.00±0.00 (b)

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

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

Fuente: elaboración propia

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

En meristemos la dosis con mejores resultados para número de brotes fue la de 6.75 mg.L⁻¹ de BAP, para número de hojas fue la dosis de 2.25 mg.L⁻¹ (Tabla 2).

Tabla 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.) independientemente del genotipo.

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

Nota. Los datos se registraron después de 28 días de cultivo en medio de inducción suplementado con diferentes concentraciones de BAP.

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. Las mismas letras dentro de las columnas denotan medias estadísticamente iguales para cada tipo de explante con la prueba de Tukey (P <0.01).

Fuente: elaboración propia

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

Tabla 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 Sequia ¹
0	0±0.00 ² b (0)
1	5.10±0.08 a (99)
5	4.51±0.57 a (88)

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

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

Fuente: elaboración propia

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

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

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

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. Las mismas letras dentro de las columnas denotan medias estadísticamente iguales para cada tipo de explante con la prueba de Tukey (P <0.01).

Fuente: elaboración propia

DISCUSIÓN

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

Organogénesis mediante ejes embrionarios como explantes

En general, *Phaseolus vulgaris* L. es considerado como recalcitrante a la regeneración in vitro (Delgado-Sánchez *et al.* 2006; Mohamed *et al.* 1992; Kwapata *et al.* 2010). Veltcheva (2005) menciona que los cultivares de frijol domesticados son recalcitrantes al tener menos potencial de regeneración, en comparación con los materiales silvestres. En esta investigación la recalcitrancia del frijol común fue evidenciada por medio de la baja respuesta morfogénica de la variedad CENTA Sequia, a partir de la utilización de ejes embrionarios como explantes. Con especies de *Phaseolus* tales como *P. acutifolius*, *P. coccineus*, *P. polyanthus*, el cual es un frijol menos domesticado se ha logrado regenerar plantas enteras, en contraste con *Phaseolus vulgaris* L. donde la mayor respuesta ha sido la producción de brotes (Delgado-Sánchez *et al.* 2006).

Comúnmente, *Phaseolus vulgaris* L. ha sido cultivado in vitro mediante la utilización de ejes embrionarios como explantes (Gatica *et al.*, 2010, Iglesias *et al.* 2018). Por ejemplo, Gatica *et al.* (2010) desarrollaron un protocolo de regeneración in vitro en cinco variedades de *Phaseolus vulgaris* L. costarricenses, en un medio MS (Murashige y Skoog 1962) adicionado con BAP y sulfato de adenina (AS). El medio de cultivo con 5 mg.L⁻¹ BAP y la dosis con 20 ó 40 mg.L⁻¹ AS

fueron las combinaciones reportadas con el promedio más alto de formación de brotes (0.66 a 0.56 brotes por explante). En la presente investigación la variedad CENTA Sequía produjo los mejores resultados con la dosis de 1 mg.L^{-1} de BAP (aproximadamente un brote por explante), aun en la ausencia de AS que no fue estudiada en esta investigación. Cabe resaltar que no se desarrollaron brotes de novo en los tratamientos sin BAP, lo que sugiere que el BAP es esencial para el desarrollo de los brotes de novo (Gatica et al. 2010).

La composición del medio es otro factor que influye en la regeneración *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* L. (Gatica et al. 2010). Aun cuando el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) no produce las mejores eficiencias de regeneración en *Phaseolus vulgaris* L; es todavía el medio más utilizado para la regeneración *in vitro* de esta especie. (Gatica et al. 2010; Kwapata et al. 2010; Hnatuzko-konka et al. 2019; Collado et al. 2013). En la presente investigación se demostró que un medio compuesto por las sales minerales de MS suplementado con diferentes concentraciones de BAP produjo respuestas morfogénicas diferentes en cuanto al número de brotes, número de raíces y número de hojas. Kwapata et al. (2010) desarrollaron un protocolo eficiente de para la regeneración *in vitro* de múltiples brotes a partir de ejes embrionarios de 10 variedades de frijol común. Estos investigadores usaron 63 formulaciones de medios que consistieron en las combinaciones de citoquininas (BAP y TDZ) con auxinas (ácido naftalenacético (ANA) y (AIA). La regeneración de múltiples brotes, se obtuvo en un medio MS con la combinación de 2.5 mg.L^{-1} BAP y 0.1 mg.L^{-1} AIA. Estos resultados son similares a los encontrados en esta investigación donde los mejores resultados se obtuvieron con la dosis de 1 mg.L^{-1} de BAP con 0.99 brotes por explante.

La formación de hojas fue otra respuesta morfogénica observada en esta investigación. Esta variable mostró diferencias significativas con la dosis de 1 mg.L^{-1} de BAP como la mejor al producir un promedio de 3.61 hojas por explante. Por otro lado, la regeneración de raíces se vio afectada en presencia de este regulador de crecimiento. En este sentido, Delgado-Sanchez et al. (2006) reportaron que la ausencia o bajas concentraciones de BAP solo inducen a la formación de raíces y el alargamiento del tallo.

Así mismo, en la presente investigación se pudo demostrar el efecto de la composición del medio, donde se obtuvo una eficiencia de regeneración con un rango de 88–99%. Quintero Jiménez et al. (2010) regeneraron plantas de cuatro cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. a partir de ejes embrionarios cultivados en un medio de Gamborg (Gamborg et al. 1968) con 10 mg.L^{-1} BAP y obtuvieron eficiencias de regeneración muy buenas, pero la mejor fue en el cultivar Apetito G13637 con un rango de eficiencia del 98–100%. Estos resultados son comparables con la eficiencia de regeneración de la variedad CENTA Sequía aun cuando el medio nutritivo que se utilizó fue el descrito por Murashige y Skoog (1962).

Organogénesis mediante nudos cotiledonales y meristemos como explantes

La utilización de ejes embrionarios, no ha sido la única forma de regeneración *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* L. (Mohamed et al., 1992; Zambre et al., 1998; Arellano et al., 2009). Algunos autores han descrito la inducción de callo morfogénico a partir de explantes de nudos cotiledonales

(Arellano *et al.*, 2009; Collado *et al.*, 2013) y meristemos (Arellano *et al.*, 2009; Collado *et al.*, 2013).

En esta investigación se buscó inicialmente desarrollar la vía de organogénesis indirecta a partir de los nudos cotiledonales y meristemos de la variedad CENTA Sequía. Sin embargo, se encontró que en la estrategia experimental se obtuvieron respuestas morfogénicas características de la organogénesis directa (formación directa de brotes a partir de los explantes). Los nudos cotiledonales y meristemos se precultivaron en Tidiázurón (TDZ) y Ácido Indol Acético (AIA), como descrito en Collado *et al.* (2013) y se encontró que a partir de nudos cotiledonales la dosis que produjo el mayor número de brotes, en ausencia de formación de callos fue la de 2.25 mg.L⁻¹ de BAP. Estos resultados difieren a lo reportado por Collado *et al.* (2013) donde describen que la proliferación de callos de diferentes cultivares se obtuvo solo cuando los explantes se precultivaron en un medio con TDZ y AIA.

En la presente investigación, los resultados indican que la combinación TDZ / IAA no benefició a la inducción de callos, pero sí a la proliferación de múltiples brotes. Esta respuesta ha sido previamente reportada, donde el TDZ al estar involucrado en la síntesis y/o acumulación de citoquininas en cultivos de tejidos vegetales promueven la formación de estas estructuras morfogénicas.

En el caso de los meristemos los mejores resultados se obtuvieron con la dosis de 6.75 mg.L⁻¹ de BAP con 3.57 brotes por explante. De igual forma que con los nudos cotiledonales, estos resultados no corresponden a lo previamente reportado por Collado *et al.* (2013). Sin embargo, se ha reportado que el TDZ suprime el crecimiento del meristemo apical e induce la formación de los meristemos laterales o axilares, lo que da como resultado múltiples brotes (Tzitzikas *et al.*, 2004).

A partir de nudos cotiledonales se obtuvo también formación de hojas. Los mejores resultados se obtuvieron independientemente de la dosis de 2.25 y 6.75 mg.L⁻¹ de BAP. Curiosamente, en la formación de hojas a partir de meristemos, la presencia o ausencia de BAP no produjo ninguna diferencia estadística en la formación de estas. También se observó el efecto de la ausencia de BAP en la formación de raíces a partir de meristemos con promedios de 0.07 a 3.29 raíces por explante. En el caso de los nudos cotiledonales el promedio por explante osciló entre 0.00 – 2.48 raíces por explante. De igual forma los mejores resultados se obtuvieron en los tratamientos con ausencia de BAP. Al respecto Collado menciona que la formación de raíces de estos explantes es similar a la encontrada en esta investigación con raíces de más de 3 cm de largo (Collado *et al.*, 2013).

Coelho y Benedito (2008) describieron que durante el desarrollo de la semilla de frijol común se sintetizan y almacenan auxinas, citoquininas y giberelinas en los cotiledones. Estas hormonas vegetales almacenadas en el cotiledón son una posible causa de la respuesta diferencial entre los explantes probados para la variedad CENTA Sequía y pueden, en combinación con reguladores de crecimiento exógenos agregados al medio crear un equilibrio hormonal que favorezca la formación de estructuras morfogénicas (brotes y hojas) en los explantes, principalmente nudos

cotiledonales. Esta idea puede explicar parcialmente la respuesta diferencial de los nudos cotiledonales y los meristemos en su respuesta morfogénica.

En cuanto a la eficiencia de regeneración mediante estos explantes, se encontró que utilizando nudos cotiledonales se obtuvo una eficiencia del 91% con dosis de 2.25 mg.L⁻¹ de BAP y utilizando meristemos como explante se obtuvo una eficiencia del 89% con dosis de 6.75 mg.L⁻¹ Collado *et al.* (2013) no reportan explícitamente el porcentaje de regeneración mediante la utilización de esos explantes, sin embargo, si la eficiencia de regeneración a partir de estos explante se compara con la de los ejes embrionarios se puede mencionar que la utilización de nudos cotiledonales y meristemos es más eficiente que la utilización de meristemos en la variedad CENTA Sequía.

CONCLUSIONES

El comportamiento morfogénico de la variedad de frijol CENTA Sequía mediante la organogénesis directa a partir de ejes embrionarios se manifestó con la formación de hojas y brotes, pero no de raíces. En la organogénesis indirecta a partir de nudos cotiledonales y meristemos no se manifestó con la formación de callo mediante un precultivo de 14 días en medios MS adicionado con 0.2 mg.L⁻¹ de Tiazurón (TDZ), 0.05 mg.L⁻¹ de Ácido Indol acético (AIA). El estudio permitió establecer un protocolo de regeneración *in vitro* eficiente para la variedad CENTA Sequía.

RECOMENDACIONES

La vía de regeneración por organogénesis indirecta (Nudos cotiledonales) con 2.25 mg.L⁻¹ de BAP ya que este método tiene mejor eficiencia en la formación de brotes. No utilizar en un precultivo TDZ y AIA para la formación de callo embriogénico a partir de meristemos y nudos cotiledonales en la variedad CENTA sequía debido a que esto genera únicamente múltiples brotes. La utilización de los protocolos de regeneración *in vitro* formulados en esta investigación, para los diferentes explantes de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) de la variedad CENTA sequía.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arellano, J.; Fuentes, S.; Castillo España, P. y Hernández, G. (2009). Regeneration of different cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) via indirect organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 96(1): 11-18.
- Centro Nacional de Tecnología Agropecuario. (2008). *Guía Técnica para el Manejo de Variedades de Frijol: Programa de granos básicos*.
- Coelho, C. y Benedito, V. (2008). Seed development and reserve compound accumulation in Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Seed Science and Biotechnology*, 2: 42-52
- Collado, R; Veitía, N; Bermúdez-Caraballoso, I; García, L; Torres, D; Romero, C; Lorenzo, J; Angenon, G. (2013). Efficient *in vitro* plant regeneration via indirect organogenesis for

different common bean cultivars. *Scientia Horticulturae* 153:109–116. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.02.007>

Delgado Sánchez, P.; Saucedo Ruiz, M.; Guzmán Maldonado, S.; Villordo Pineda, E.; González Chavira, M.; Fraire Velázquez, S.; Acosta Gallegos, J. y Mora Aviles, A. (2006). An organogenic plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science* 170: 822–827

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2005). Efectos de los desastres en la agricultura [Diapositiva de PowerPoint]. ACQ Weather. <http://www.acqweather.com/FAO%20EFECTOS%20DE%20LOS%20DESASTRES.pdf>

Gamborg, O.; Miller, R. y Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1):151–158. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(68\)90403-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5)

Gatica Arias, A.; Muñoz Valverde, J.; Ramírez Fonseca, P. y Valdez Melara, M. (2010). *In vitro* plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): effect of N6-benzylaminopurine and adenine sulphate. *Electronic Journal of Biotechnology* 13(1): 6–7. <https://doi.org/10.2225/vol13-issue1-fulltext-7>

Hnatuszko-Konka, K.; Kowalczyk, T.; Gerszberg, A.; Glinska, S. y Grzegorzczak-Karolak, I. (2019). Regeneration of *Phaseolus vulgaris* from epicotyls and hypocotyls via direct organogenesis. *Sci Rep*, 9: 6248. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42723-8>

Iglesias, D.; Collado, R.; Ruiz, L.; Torres, D.; Veitía, N.; Martinera-Ramírez, A.; García, L. y Rivero, L. (2018). Comparación de tres explantes para la regeneración vía organogénesis indirecta de *Phaseolus vulgaris* L. *Bioteología Vegetal* 18(2): 111–116.

Kwapata, K., Sabzikar, R., Sticklen, M., Kelly, J. (2010). *In vitro* regeneration and morphogenesis studies in common bean. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 100: 97–105

Lizana, C.; Wentworth, M.; Martinez, J.; Villegas, D.; Meneses, R.; Murchie, E.; Pastenes, C.; Lercari, B.; Vernieri, P. y Horton, P. (2006). Differential adaptation of two varieties of common bean to abiotic stress: I. Effects of drought on yield and photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 57(3): 685–697. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj062>

Mohamed, M, Read P, Coyne D. (1992). Dark Preconditioning, CPPU, and Thidiazuron Promote Shoot Organogenesis on Seeding Node Explants of Common and Faba Beans. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 117 (4): 668 – 672. <https://doi.org/10.21273/JASHS.117.4.668>

Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

- Quintero-Jiménez, A.; Espinosa-Huerta, E.; Acosta-Gallegos, J.; Guzmán-Maldonado, H. y Mora-Avilés, M. (2010). Enhanced shoot organogenesis and regeneration in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 102(3): 381-386. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9744-2>
- Tzitzikas, E.; Bergervoet, M.; Raemakers, K.; Vincken, J.; Lammeren, A. y Visser, R. (2004). Regeneration of pea (*Pisum sativum* L.) by a cyclic organogenic system. *Plant Cell Reports*, 23(7): 453-460. <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0865-0>
- Ulloa, J.; Ulloa, P.; Ramírez, J. y Ulloa, B. (2011). El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. *Revista Fuente*, 3(8): 5-9.
- Veltcheva, M. y Svetleva, D. (2005). In vitro regeneration of *Phaseolus vulgaris* L. via organogenesis from petiole explants. *Journal of Central European Agriculture*, 6(1): 53-58.
- Zambre, M.; De Clercq, J.; Vranova, E.; Van Montagu, M.; Angenon, G. y Dillen, W. (1998). Plant regeneration from embryo-derived callus in *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) and *P. acutifolius* A. Gray (tepary bean). *Plant Cell Reports*. 17(8): 626-630. <https://doi.org/10.1007/s002990050455>