

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN

Informe final y solicitud de ampliación de vigencia
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN No. 111-A4-013

**"ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS CELULARES MORFOGÉNICOS
PARA EL
MEJORAMIENTO GENÉTICO DEL FRIJOL
(*Phaseolus vulgaris* L.)"**

Presentado por:

MARTA VALDEZ MELARA

PILAR RAMÍREZ FONSECA

LAURA YESENIA SOLÍS RAMOS

ANDRES GATICA ARIAS

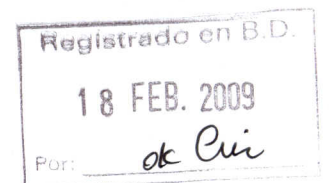
ESCUELA DE BIOLOGÍA

Y

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR



Diciembre 2008



12-12-08

I. DATOS GENERALES DEL PROYECTO

TÍTULO DEL PROYECTO: “ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS CELULARES MORFOGÉNICOS PARA EL MEJORAMIENTO GENÉTICO DEL FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.)”

CÓDIGO DEL PROYECTO: 111-A4-013

VIGENCIA: del 01 enero 2004 al 12 de diciembre del 2008

UNIDAD RESPONSABLE: Escuela de Biología.

INVESTIGADORES PARTICIPANTES

INVESTIGADORA PRINCIPAL: Marta F. Valdez Melara

Unidad Académica: Escuela de Biología

Tiempo de dedicación: 3 h semanales

INVESTIGADORA ASOCIADA: Dra. Pilar Ramírez Fonseca

Unidad Académica: Escuela de Biología y CIBCM

Tiempo de dedicación: 5 h semanales

INVESTIGADORA ASOCIADA: cDra. Laura Yesenia Solís Ramos

Unidad Académica: Escuela de Biología

Tiempo de dedicación: 10 h semanales

INVESTIGADOR ASOCIADO: M.Sc. Andrés Gatica Arias

Unidad Académica: Escuela de Biología

Tiempo de dedicación: 8 h semanales

II. RESUMEN EJECUTIVO DEL PROYECTO

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es uno de los cultivos de mayor importancia en Costa Rica, donde es consumido principalmente por los estratos sociales de menor ingreso económico. Es la principal fuente de proteína, hierro y fibra en la dieta de los costarricenses, principalmente en las zonas rurales. La producción de frijol en Costa Rica se enfrenta a problemas que lo hacen menos competitivo en relación con otros países productores de frijol, tales como altos costos de producción, exceso en el laboreo del suelo, alta dependencia de fertilizantes y agroquímicos, y disminución del uso de semillas de variedades mejoradas. Es un cultivo altamente susceptible al ataque de muchas plagas y a enfermedades, tales como las ocasionadas por hongos, bacterias, y virus transmitidos por insectos. En ese sentido, la aplicación de técnicas biotecnológicas como el cultivo *in vitro* y la ingeniería genética puede ser una valiosa alternativa para contrarrestar el uso de agroquímicos para el control de enfermedades en esta especie.

La presente investigación tiene como objetivo general el desarrollar la metodología y los protocolos experimentales para la regeneración de plantas en condiciones de cultivo *in vitro*, a partir de tejidos somáticos en varios genotipos de frijol de Costa Rica, para la

aplicación ulterior de técnicas biotecnológicas de mejoramiento genético. En ese contexto, se logró establecer los procedimientos experimentales para la inducción de tejidos morfogénicos de cuatro cultivares de frijol común, de importancia agronómica en Costa Rica. Así, se obtuvieron plántulas de los cuatro genotipos examinados: “Guaymi” y “Brunca” (frijol negro), “Bribri” y “Huetar” (frijol rojo).

Realizar esta investigación ha permitido obtener otras fuentes de financiamiento para la ejecución de otros proyectos, tales como los de mejoramiento mutacional por radiaciones ionizantes y biotecnología, y el estudio anatómico e histológico del proceso de regeneración *in vitro* del frijol por medio de microscopía electrónica. Ambos se encuentran en desarrollo y continuarán hasta el 2009. De esa manera, con las metodologías y los protocolos experimentales desarrollados en este proyecto se podrá obtener un producto biotecnológico con características agronómicas deseadas y generar resistencia a enfermedades y plagas o a condiciones ambientales desfavorables que aquejan a tan importante cultivo agronómico. Actualmente se inducen mutaciones por medio de radiaciones gamma en embriones maduros de las variedades “Brunca” y “Bribri”, que son mantenidos en condiciones de cultivo *in vitro*, de los cuales se han obtenido plantas que serán evaluadas para la búsqueda de resistencia a la enfermedad fúngica conocida como “Mustia Hilachosa”.

Es así como los resultados del presente proyecto, están sentando las bases de un futuro plan de manejo integrado de esta especie, que sea coherente con las políticas de conservación del ambiente y de la biodiversidad de Costa Rica y con un impacto positivo sobre la salud humana y el ambiente.

III. GRADO DE AVANCE DEL PROYECTO

OBJETIVOS PLANTEADOS ORIGINALMENTE:

OBJETIVO GENERAL:

Desarrollar la metodología y los protocolos experimentales para la regeneración de plantas en condiciones de cultivo *in vitro*, a partir de tejidos somáticos en varios genotipos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) de Costa Rica, para la aplicación ulterior de técnicas biotecnológicas de mejoramiento genético.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Desarrollar los procedimientos experimentales para la inducción de callos morfogénicos de de frijol común, de importancia agronómica en Costa Rica.
- Desarrollar un sistema que permita la regeneración de plantas fértiles de frijol, a partir de callos somáticos morfogénicos.
- Evaluar la capacidad morfogénica de varios genotipos costarricenses de frijol, en relación con su capacidad para la callogénesis y la regeneración de plantas.
- Validar los procedimientos experimentales para la inducción de callos organogénicos en varios cultivares de frijol común, de importancia agronómica en Costa Rica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS PLANTEADOS EN LA AMPLIACIÓN 2007-2008

1. Optimizar el proceso de organogénesis y regeneración de plantas de frijol, mediante el conocimiento de los eventos histológicos y anatómicos que ocurren en las diversas etapas de desarrollo.
2. Establecer una metodología para la multiplicación de los callos organogénicos de las distintas variedades costarricenses de frijol en Recipientes de Inmersión Temporal Automáticos (RITA's ®). **Esta no podrá llevarse a cabo debido a que los biorreactores requeridos son equipo de otro proyecto financiado por la OEA y no están disponibles para este proyecto. Por lo que no pueden realizarse dichas actividades, ya que el laboratorio no cuenta con RITAs.**
3. Establecer la metodología para la multiplicación a gran escala de las *vitroplantas* de las distintas variedades costarricenses de frijol en bioreactores RITA's ®. **Esta actividad no podrá llevarse a cabo debido a que los biorreactores requeridos son equipo de otro proyecto financiado por la OEA y no están disponibles para este proyecto. Por lo que no pueden realizarse dichas actividades, ya que el laboratorio no cuenta con RITAs.**
4. Establecer una metodología para la transferencia y climatización de las plántulas de frijol regeneradas *in vitro* mediante los sistemas de multiplicación a gran escala.

Dado que no han podido ser concluidos algunos de los objetivos anteriores, se solicita ampliación de vigencia (ver pag. 43 a 45) del proyecto del 01 de enero 2009 al 31 de diciembre del 2010, que permita cumplir satisfactoriamente con los objetivos específicos del proyecto.

* Objetivos no alcanzados a la ampliación

IV. RESUMEN DE LOS AVANCES EN LOS LOGROS DE LOS OBJETIVOS Y LAS ACTIVIDADES

Objetivo programado	Actividad(es) asociada(s) al objetivo	% Avance de las actividades	Duración planteada para la actividad	Resultados obtenidos
1. Desarrollar los procedimientos experimentales para la inducción de callos morfogénicos de varios cultivares de frijol común, de importancia agronómica en Costa Rica.	1.1. Selección de condiciones de cultivo <i>in vitro</i> y de medios de cultivo semi-sólidos para la investigación.	100 %	Enero a Agosto 2004	Métodos experimentales para el cultivo <i>in vitro</i> y la inducción de callos a partir de explantes de frijol
	1.2. Implementación de condiciones de cultivo <i>in vitro</i> y elaboración de los medios de cultivo semi-sólidos.	100 %	Enero a Agosto 2004	Procedimientos y medios de cultivo semi-sólidos, adecuados para el cultivo <i>in vitro</i> de los explantes de frijol.
	1.3. Selección de explantes de frijol para la inducción de callos.	100 %	Septiembre a Octubre de 2004	Explantes de frijol adecuados para la inducción de callos morfogénicos. El mejor explante: el eje embrionario sin raíz, proveniente de plántulas germinadas <i>in vitro</i> durante cuatro días.

2. Desarrollar un sistema que permita la regeneración de plantas fértiles de frijol, a partir de callos morfogénicos	2.1. Ensayos de regeneración de callos de frijol generados en la primera etapa del trabajo. Regeneración de los callos obtenidos con 2,4 - D	100 %	Noviembre 2004 a Junio 2005	Brotos somáticos que no pudieron desarrollar una capacidad de regeneración en este tipo de tratamientos.
	2.2 Ensayos de regeneración de los callos obtenidos con TDZ y AIA	100 %	Noviembre 2004 a Setiembre 2005	Plántulas de la variedad "Brunca", regeneradas a partir de callos organogénicos.
	2.3. Regeneración de plantas fértiles de frijol, a partir de callos organogénicos.	100%	Noviembre 2004 a diciembre 2007	Plántulas obtenidas en cultivo <i>in vitro</i> de las cuatro variedades costarricenses examinadas : Brunca, Huetar, Bribri y Guaymí.
3. Evaluar la capacidad morfogénica de varios genotipos costarricenses de frijol, en relación con su capacidad para la callogénesis y la regeneración de plantas.	3.1. Evaluación de 4 variedades costarricenses: "Guaymí" (frijol negro), "Bibri" (frijol rojo), "Huetar" (rojo claro) y "Brunca" (negra).	90%	Septiembre 2004 a diciembre 2008	Cuatro genotipos de frijol evaluados en relación con su capacidad morfogénica. Para las cuatro variedades, se están evaluando varios sistemas de regeneración de plantas fértiles de frijol en cultivo <i>in vitro</i> .

V. JUSTIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES

Abreviaciones: MS: Murashige & Skoog; TDZ: Thidiazuron; BAP: 6- bencilamino-purina; AIA: ácido indolacético; 2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

Objetivo 1. : Desarrollar los procedimientos experimentales para la inducción de callos morfogénicos de varios cultivares de frijol común, de importancia agronómica en Costa Rica.

Enero 2004 a enero 2005: Se cumplió en un 100 % y comprendió las siguientes actividades:

- Selección de condiciones de cultivo *in vitro* y de los medios de cultivo semi-sólidos para la investigación.
- Implementación de condiciones de cultivo *in vitro* y elaboración de los medios de cultivo semi-sólidos.
- Selección de explantes de frijol para la inducción de callos.

Principales Resultados

- Se optimizó la metodología y los procedimientos experimentales para la inducción de callos morfogénicos de varios cultivares de frijol común, de importancia agronómica en Costa Rica.

Los resultados completos de esta etapa, se presentaron en los informes anteriores. En el anexo 1 se muestra la metodología y procedimientos experimentales para el cultivo *in vitro* del frijol.

Objetivo 2 : Desarrollar un sistema que permita la regeneración de plantas fértiles de frijol, a partir de callos morfogénicos.

Noviembre 2004 – diciembre 2006. Se cumplió en un 100% y comprendió las siguientes actividades:

- En una primera etapa, se llevó a cabo la inducción de callogénesis en dos de las variedades: Bribri y Guaymí, en los tratamientos con 2,4-D y con TDZ. Una vez obtenidos los callos, se realizaron ensayos para obtener la regeneración de plantas y algunos tratamientos para el mantenimiento de los brotes que se generaron.
- En una segunda etapa, se llevó a cabo una evaluación de diferentes concentraciones y/o combinaciones de los reguladores TDZ y AIA para la inducción de callogénesis en dos variedades de frijol costarricense (Brunca y Huetar), para la regeneración de plántulas de frijol *via* organogénesis somática. De la misma manera, se realizaron ensayos de regeneración de callos de frijol producidos en la primera etapa del trabajo. Se obtuvieron algunas plántulas de la variedad “Brunca”, regeneradas a partir de los callos organogénicos. Éstas fueron transferidas a condiciones de invernadero para su evaluación en términos de sus características generales y de su fertilidad.

Principales resultados

Regeneración de los callos obtenidos con 2,4 – D:

- A) Callos provenientes de la callogénesis en oscuridad total con 2,4 – D (4 semanas). En este ensayo se procedió a sembrar los callos provenientes de los explantes T-1, T-2 y T-3 de las variedades Bribri y Guaymí, obtenidos del proceso de callogénesis con 2,4-D en condiciones de oscuridad por 4 semanas; en un medio de cultivo MS con 1mg/l de BAP + 10 % de agua de coco y sometidos a un fotoperíodo de 12 horas luz.
- B) Callos generados en condiciones de fotoperíodo de 12 horas luz en medio de cultivo suplementado con 2,4 – D, durante 4 semanas.
- C) Callos provenientes de la callogénesis del explante "H" de los tratamientos con 2,4 –D en dos condiciones: oscuridad total durante todo el período de callogénesis y fotoperíodo de 12 horas luz.

Regeneración de los callos obtenidos con TDZ y AIA

- A) Tratamiento con callos obtenidos a partir de eje embrionario sin raíz y cotiledón, de las variedades Bribri, Guaymí, Huetar y Brunca en medio de cultivo MS suplementado con 0.1 mg/l de TDZ y 0.05 mg/l de AIA.
- B) Tratamiento con callos obtenidos a partir de embriones "decapitados", de las variedades Bribri, y Guaymí, en dos medios de cultivo: MS + 0.1 mg/l TDZ + 0.05 mg/l AIA y MS + 0.1uM TDZ.

Los resultados completos de esta etapa, se presentan en los informes anteriores. En el anexo 1 se muestra la metodología y procedimientos experimentales para el cultivo *in vitro* del frijol. Las cuatro variedades respondieron al tratamiento de inducción de callos organogénicos. No obstante solo se obtuvieron plantas de las variedades Brunca, Bribri y Guaymí. Esas plantas produjeron flores y frutos.

Objetivo 3: Evaluar la capacidad morfogénica de varios genotipos costarricenses de frijol en relación con su capacidad para la callogénesis y la regeneración de plantas.

Setiembre 2004 – diciembre 2008. Se cumplió en un 90%, y comprendió las siguientes actividades:

- Evaluación de varios explantes de frijol de 4 variedades costarricenses: "Guaymí" (frijol negro), "Bibri" (frijol rojo), "Huetar" (rojo claro) y "Brunca" (negra), que fueron proveídas por la Estación Experimental Fabio Baudrit de la Universidad de Costa Rica.
- Finalización de la evaluación de la capacidad morfogénica de los otros 3 genotipos de frijol costarricense, examinados en la presente investigación. Se utilizaron protocolos experimentales adicionales.
- Optimización de la metodología y los procedimientos experimentales para la inducción de callos morfogénicos y la regeneración de plantas fértiles de los cultivares de frijol costarricense: "Huetar", "Guaymí", "Brunca" y "Bibri". Esta pendiente el establecimiento de algunos tratamientos como los correspondientes a la variedad Bribri, además de evaluaciones de tratamientos ya montados para las otras variedades.

- Falta por realizar la evaluación de la fertilidad de las plantas así como la evaluación y confirmación para todos los genotipos examinados, de otros métodos de morfogénesis *in vitro* tales como el del cultivo de ápices y callos organogénicos (Según Zambre *et al.* 1998 y Albino *et al.* 2005).

Principales resultados:

Inducción de brotes a partir de meristemos apicales de *Phaseolus vulgaris* L. (Se cumplió en un 100%).

Se utilizó la metodología de Aragão *et al.* (1996), con modificaciones. Ese método consiste en obtener múltiples brotes directamente a partir del meristemo apical de embriones maduros de frijol. Este método utiliza el medio de cultivo MS + 10 mg/L BAP para inducir los brotes. Los resultados completos de esta etapa, se presentan en los informes anteriores.

Inducción y regeneración de plántulas de frijol de las variedades Brunca, Huetar, Guaymí y Bribri (Según metodología de Zambre *et al.* 1998 con modificaciones).

Para la inducción de los tejidos morfogénicos se utilizaron como explantes, ejes embrionarios con 5 días de germinación sin radícula ni cotiledones. Los explantes se colocaron en un medio MS, al cual se le adicionó diferentes combinaciones de los reguladores del crecimiento N - phenyl - N' - 1,2,3 - thiadiazol -5- ylurea (TDZ) y ácido indolacético (AIA) como se muestra en el Cuadro 1. Se utilizaron en total 40 explantes de cada variedad y se colocaron cinco explantes por placa petri.

Cuadro 1. Tratamientos y sus respectivas concentraciones de los reguladores del crecimiento TDZ y AIA (mg/L) utilizados para la inducción de tejidos morfogénicos en las variedades costarricenses de frijol (*Phaseolus vulgaris* L).

TDZ \ AIA	0	0.001	0.01	0.025	0.04	0.05
0	T - 1	T - 2	T - 3	T - 4	T - 5	T - 6
0.01	T - 7	T - 8	T - 9	T - 10	T - 11	T - 12
0.03	T - 13	T - 14	T - 15	T - 16	T - 17	T - 18
0.5	T - 19	T - 20	T - 21	T - 22	T - 23	T - 24
0.1	T - 25	T - 26	T - 27	T - 28	T - 29	T - 30

Los explantes permanecen en el medio de inducción en el cuarto de crecimiento durante 30 días (siete días en oscuridad y 23 días en fotoperiodo de 12 horas) a una temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ y una intensidad lumínica promedio de $33.78 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Se utilizaron en total 40 explantes de cada variedad y se colocaron cuatro explantes por placa Petri.

Se registró el porcentaje de explantes que formaron estructuras morfogénicas luego de los 30 días de cultivo. Estas estructuras se retiraron junto con un segmento del explante original con la ayuda de un bisturí y se subcultivaron en los mismos medios de cultivo, por un periodo adicional de 30 días.

Aquellos explantes que no respondieron en los mismos medios de cultivo fueron transferidos. Las estructuras que se obtuvieron, se pesaron en una balanza granataria marca OHAUS los 60 días de cultivo bajo condiciones asépticas.

Regeneración y desarrollo de brotes

Las estructuras obtenidas se transfirieron a un medio MS adicionado con 1 mg/L de BAP para la inducir a la formación de brotes (Zambre *et al.*, 1998; Zambre *et al.*, 2001; Albino, 2005; Albino *et al.*, 2005). Se realizó un subcultivo a los 30 días, en el mismo medio de cultivo.

Para el desarrollo de los brotes, las estructuras con brotes se subcultivaron en un medio MS adicionado con 0.1 mg/L de BAP (Zambre *et al.*, 1998; Zambre *et al.*, 2001). Los subcultivos se realizaron cada 30 días hasta la formación de las plántulas. Se cuantificó el número de brotes formados por estructura cada 30 días y estos son colocado en un medio de cultivo para su enraizamiento.

Enraizamiento de las plántulas

Las plántulas obtenidas se colocaron en frascos de vidrio (170 ml de capacidad), cada uno con aproximadamente 20 ml de un medio MS con 0.5 mg/L de ácido indolbutíco (AIB) (Zambre *et al.*, 1998; Zambre *et al.*, 2001) y son mantenidas hasta la formación de raíces, en un cuarto de crecimiento con una temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ y un fotoperiodo de 12 horas, con una intensidad lumínica promedio de $33.78 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

Aclimatación y mantenimiento de las plántulas

Este procedimiento se realizó en el invernadero de la Escuela de Biología, bajo luz natural. Para esta época del año (época lluviosa), el invernadero presentó una intensidad lumínica promedio de $185 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, una temperatura máxima de 27°C y mínima de 17°C y una humedad relativa entre el 70 % y el 80%.

Se aclimataron las plántulas que tenían raíces de aproximadamente 2 a 3 centímetros de longitud. Se utilizó tierra y granza como sustrato, en una proporción de 3 a 1 respectivamente, y son colocadas en macetas de un tamaño aproximado de 20 centímetros de diámetro por 25 centímetros de profundidad. Posteriormente, se lavaron las raíces de las plántulas con agua potable para retirar los restos de medio de cultivo, luego de su extracción. Las plántulas, son colocaron en las macetas con el sustrato humedecido con agua potable. A los 30 días de la aclimatación, las plantas son abonadas con un fertilizante granulado comercial.

Durante el proceso de aclimatación se evaluó la sobrevivencia, crecimiento, las características agronómicas y la fertilidad de las plantas. Además, se sembraron 10 semillas de cada variedad como control, bajo las mismas condiciones descritas para las plantas a aclimatar.

RESULTADOS PRELIMINARES

A la fecha de la presentación del presente informe se han introducido los tratamientos que se indican en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Tratamientos establecidos a diciembre del 2008 para la evaluación de la inducción de tejidos morfogénicos en las variedades costarricenses de frijol (*Phaseolus vulgaris* L).

Tratamiento	Huetar	Guaymí	Brunca
1	X	X	X
2	X	X	X
3	X	X	X
4	X	X	X
5	X	X	X
6	X	X	X
7	X	X	
8	X	X	X
9	X	X	X
10	X		
11	X		
12	X		X
13	X	X	
14	X		
15			
16	X	X	
17	X	X	
18		X	

Variedad Huetar

Inducción y mantenimiento de tejidos morfogénicos

En el medio de inducción de tejidos morfogénicos, se observó la aparición de un callo verde de aspecto granular en el nudo cotiledonar y en la región apical. Estos resultados coinciden como lo reportado por Zambre *et al.*, (1998) para *Phaseolus acutifolius* en el nudo cotiledonar del explante y tejido calloso color crema oscuro en la base del hipocótilo a los 30 días de cultivo (Figura 1). Además, se dio la formación de brotes en la región apical y en el nudo cotiledonar.

Aún quedan pendientes los experimentos correspondientes a la variedad de Bribí, los cuales se tiene programado su establecimiento en el año 2009.

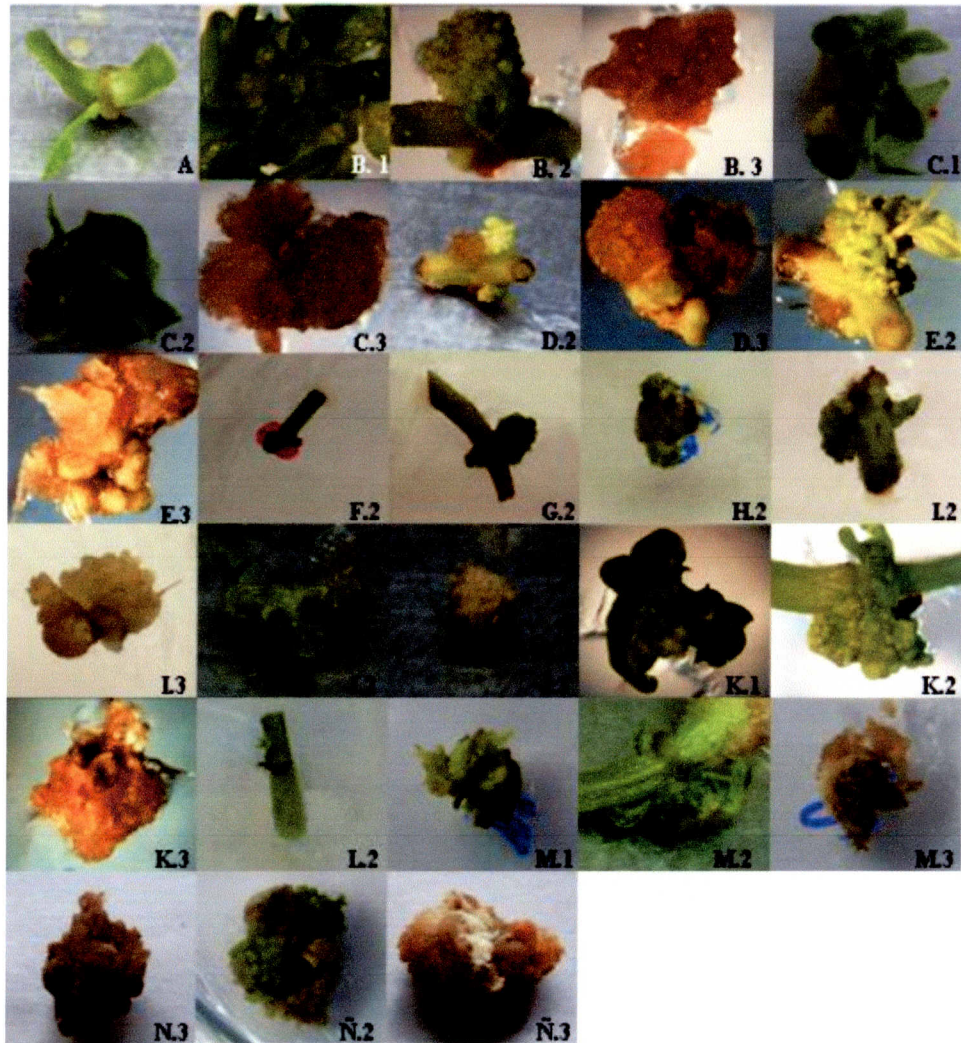


Figura 1. Formación de callo y brotes en la variedad huetar en diferentes combinaciones de TDZ y AIA a los 30 días de cultivo. A: T-1. B: T-3. C: T-4. D: T-5. E: T-6. F: T-7. G: T-8. H: T- 9. I: T-10. J: T-11. K: T-12. L: T-13. M: T-15. N: 16. Ñ: T-18. Los números 1, 2, 3 corresponden a los callos obtenidos en la región apical, nudo cotiledonar y base hipocótilo respectivamente. Obsérvese la formación de brotes en las figuras en el nudo cotiledonar: B.2, C.2, E.2, K.2 y M.2.

Formación de callos

En las figuras 2 y 3 se muestra el porcentaje de formación de callo a partir del nudo cotiledonar, base del hipocótilo y de la región apical a los 30 y 60 días cultivo respectivamente. Así, para la variedad Huetar, se observó que a los 30 días los mayores porcentajes de formación de callo se presentaron en el nudo cotiledonar con el tratamiento de 0,028 mg/L TDZ y sin AIA. El desarrollo de tejido calloso para las regiones apicales fue menor en todos los tratamientos. Sin embargo, a los 60 días, se desarrolló mayor cantidad de callo en el tratamiento 0,04 mg/L TDZ y sin AIA. El mayor número de explantes que formaron callos en más de un 50% en el nudo cotiledonar corresponden a los tratamientos 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 14, 16y 17. En cuanto al callo formado el la base del hipocotilo, la respuesta mayor al 50 % correspondieron a los tratamientos con 0,025 mg/L TDZ y 0.01 mg/L AIA así como el tratamiento con 0.04 mg/L TDZ con 0.03 mg/L AIA. Hubo formación de callo en la región apical en los tratamientos 3, 4, 11 y 12.

Los callos obtenidos a los 60 días de cultivo en los diferentes tratamientos con TDZ y AIA se pesaron con el fin de comparar los tratamientos y determinar si existen diferencias significativas entre ellos.

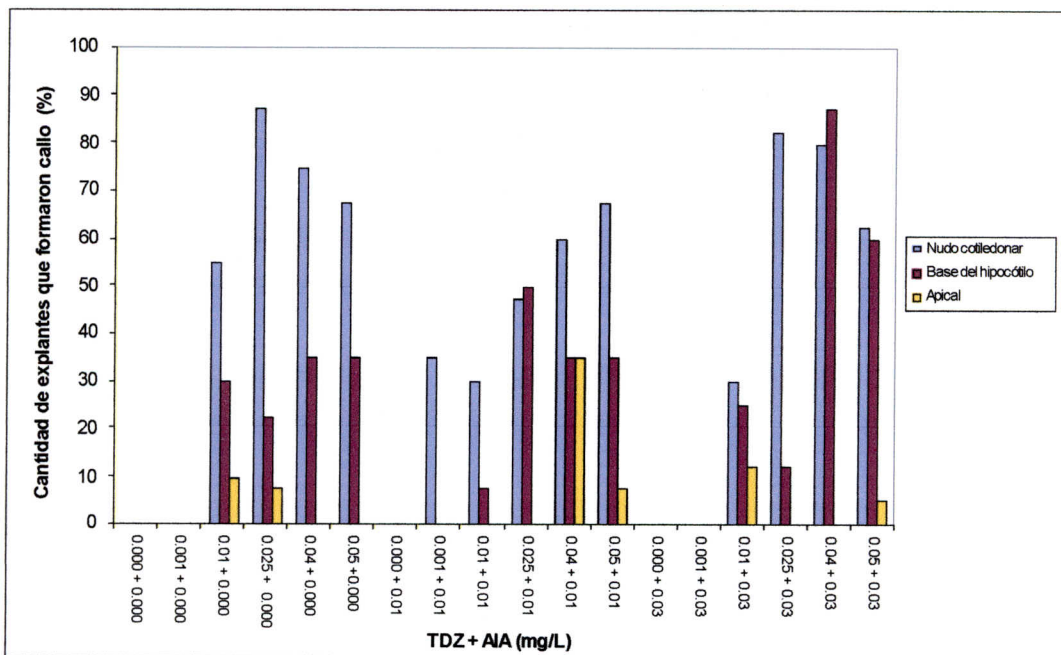


Figura 2. Cantidad de explantes que formaron callo en la variedad Huetar a los 30 días de cultivo en los diferentes tratamientos de TDZ y AIA.

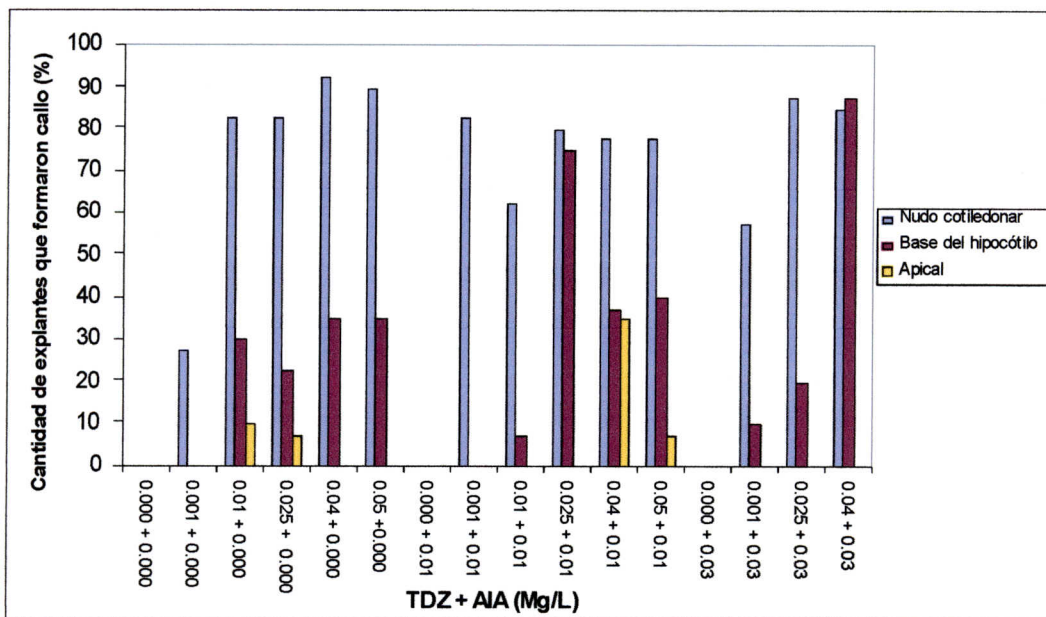


Figura 3. Cantidad de explantes que formaron callo en la variedad Huetar a los 60 días de cultivo en los diferentes tratamientos de TDZ y AIA.

En las figuras 4, 5 y 6 se muestran gráficos de puntos que indican la media y el error estándar. El mayor peso (mg) del tejido calloso obtenido a partir de la base del nudo cotiledonar se obtuvo en el

tratamiento 17 (0.04 mg/L TDZ y 0.03 mg/L AIA), y con menos peso en los tratamientos 1, 2, 7 y 13 (Figura 4).

En la figura 5 se observa que el tratamiento con mayor desarrollo de tejido calloso en los hipocótilos fue el 10 (0,025 mg/L TDZ con 0.01 mg/L AIA) y el tratamiento 17 (0.04 mg/L TDZ con 0.03 mg/L AIA), y los callos con menor peso se presentaron en los tratamientos 1, 2, 7, 8, 9, 13, 14, y 16. Para los callos obtenidos de la región apical el mayor de peso se observó en el tratamiento 12 (0.05 mg/L TDZ con 0.01 mg/L AIA), y en el resto de tratamientos se observó poco peso de los tejidos callosos.

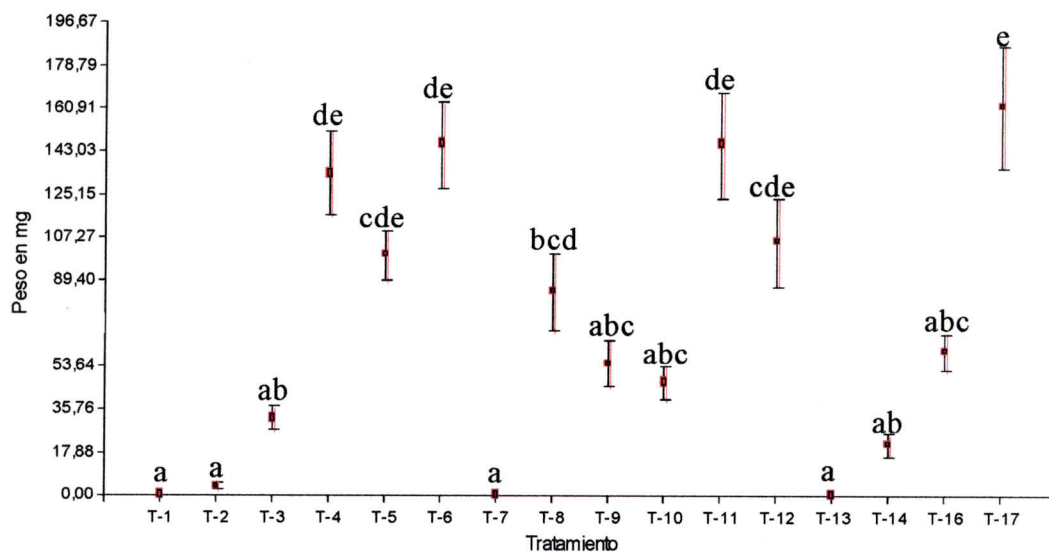


Figura 4. Gráfico de puntos para los callos obtenidos en el nudo cotiledonar, con una probabilidad de $<0,0001$ y un intervalo de confianza del 95%. Las letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

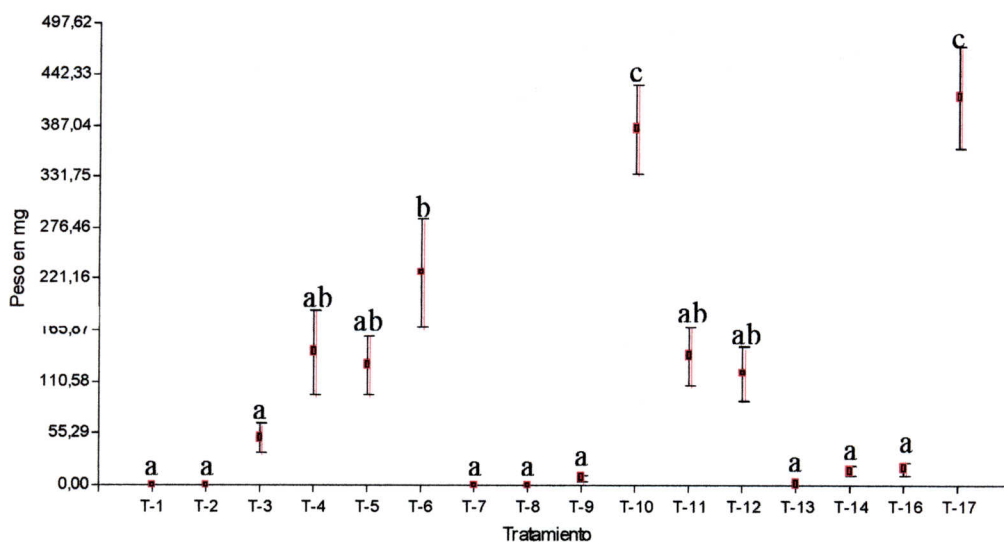


Figura 5. Gráfico de puntos para los callos obtenidos de la base del hipocótilo, con una probabilidad de $<0,0001$ y un intervalo de confianza del 95%. Las letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

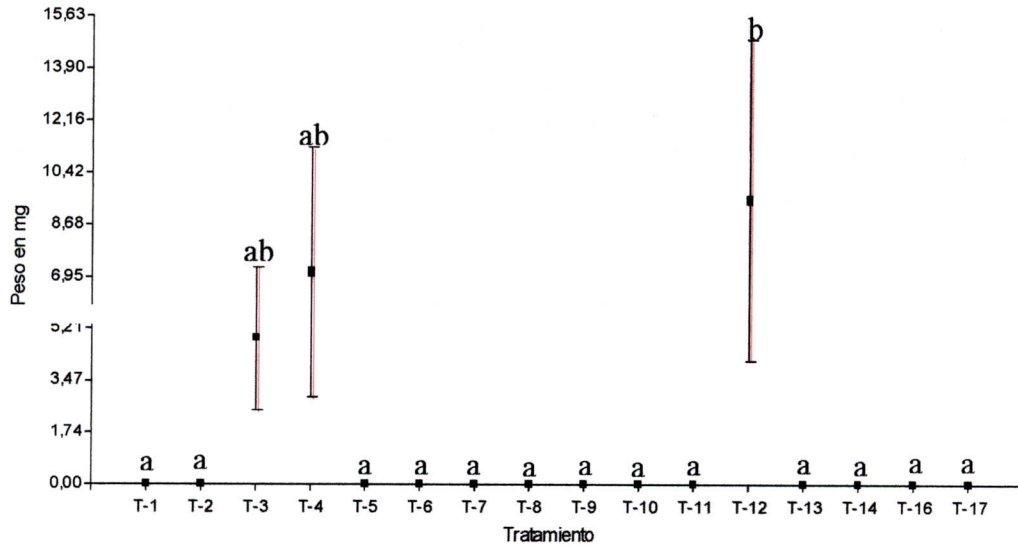


Figura 6. Gráfico de puntos para los callos obtenidos de la región apical, con una probabilidad de $<0,0001$ y un intervalo de confianza del 95%. Las letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

Formación de brotes

En las figuras 7 y 8 se muestran la cantidad de explantes que formaron brotes a partir del nudo cotiledonar y en la región apical y el número de brotes por explante a los 60 días de cultivo. El tratamiento que permitió un poco más del 50% de brotes por tratamiento fue el 0,04 mg/L de TDZ y sin AIA, y aproximadamente en 48% de los explantes se formaron brotes con 0,05 TDZ y sin AIA. Los tratamientos que no presentaron formación de brotes fueron: el control, el tratamiento con 0,025 mg/L TDZ más 0,03 mg/L AIA; y el tratamiento con 0,001 mg/L TDZ sin AIA (figura 7).

Mientras que el mayor promedio de brotes por explante se obtuvo en el medio de cultivo complementado con 0.05 mg/L TDZ y sin AIA (figura 8).

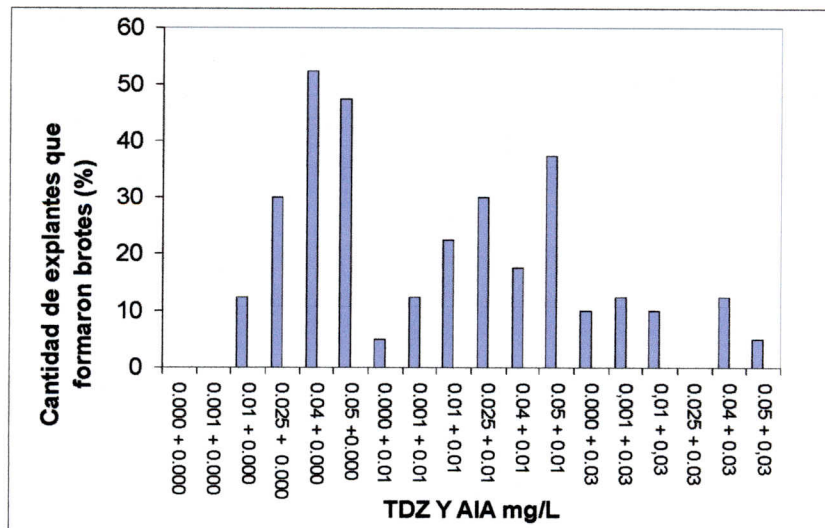


Figura 7. Cantidad de explantes que formaron brotes a los 60 días en la variedad Huetar a los 60 días de cultivo en los diferentes tratamientos de TDZ y AIA.

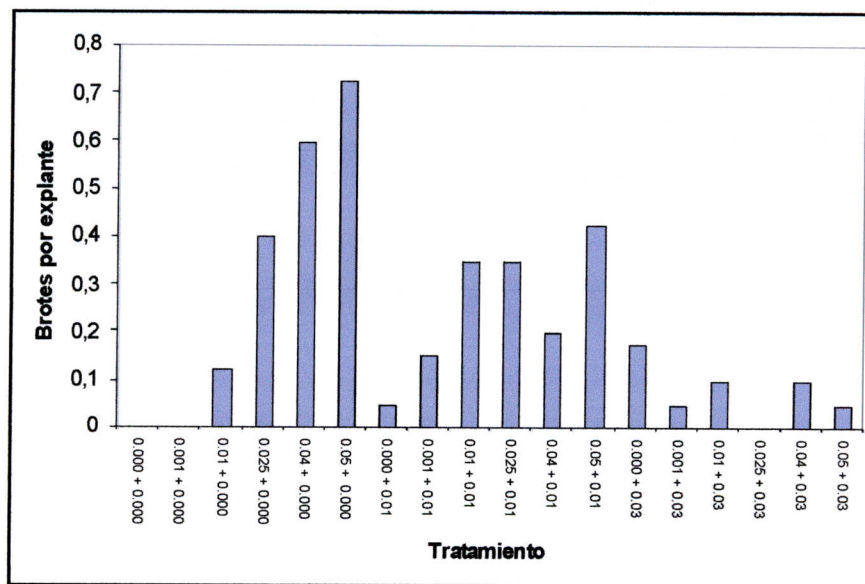


Figura 8. Brotos por explante en la variedad Huetar a los 60 días de cultivo en los diferentes tratamientos con TDZ y AIA.

Regeneración y desarrollo de brotes

Todos los callos obtenidos a partir de la región del nudo apical, cotiledonar, y base del hipocotilo fueron transferidos a un medio de cultivo MS con 1 mg/L de BAP con el fin de introducir la formación de brotes. Se observó a los 60 días de cultivo la formación de hojas aberrantes en los callos obtenidos de la región apical y del nudo cotiledonar (figura 9 A y B) y la formación de raíces en los callos obtenidos del nudo cotiledonar (figura 9 B). Por otro lado, no hubo formación de brotes en los callos obtenidos de la región basal del hipocotilo, pues estos se oxidaron.

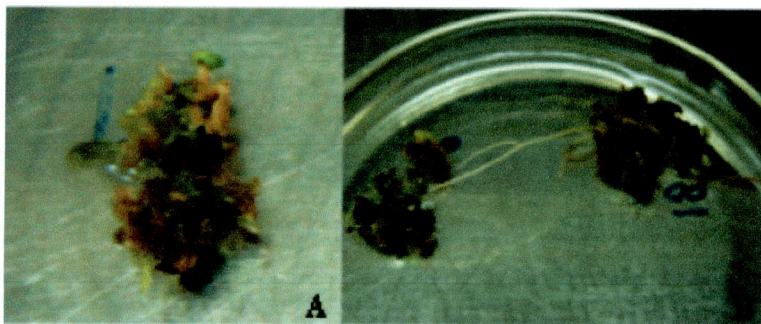


Figura 9. Formación hojas aberrantes en los callos obtenidos de la región apical y cotiledonar. A. Región apical correspondiente al tratamiento 11 y B. Nudo cotiledonar correspondiente al tratamiento 5 en donde también hay formación de raíces.

Se dio la formación de brotes en los callos obtenidos de la región del nudo cotiledonar, correspondientes a los tratamientos 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 14. Sin embargo solamente un brote obtenido en el tratamiento 9 (0.01 mg/L TDZ con 0.01 mg/L AIA), se pudo desarrollar en una plántula después de 5 meses de subcultivo en medio MS con 0.1 mg/L de BAP (medio de desarrollo de brotes)

(figura 10) y los demás se necrosaron. La regeneración de esta plántula tomó alrededor de 9 meses. No se formaron brotes en los callos obtenidos de la región apical.

Para lograr la regeneración de esta plántula, se tuvo que esperar alrededor de 9 meses desde el inicio del proceso de formación de callos. No se formaron brotes en los callos obtenidos de la región apical.

La plántula se sembró en una maceta (figura 11), sin embargo se necrosó a los 8 días de la aclimatación.

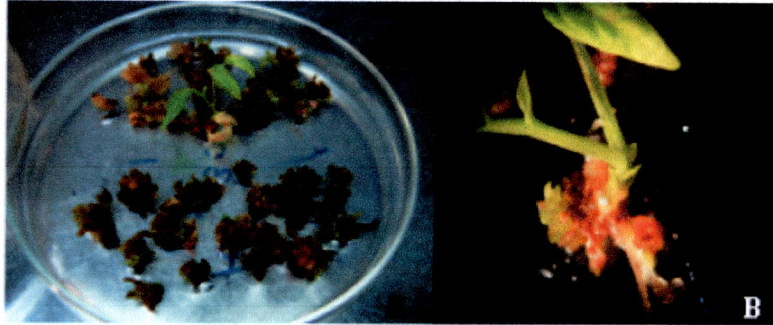


Figura 10. Plántula regenerada obtenida del tratamiento 9 en un medio de cultivo MS con 0.1 mg/L de BAP. A. Placa con callos en el medio de inducción de brotes. B. Observación estereoscópica de la plántula.



Figura 11. Plántula regenerada correspondiente al tratamiento 9 a los tres días de la aclimatación.

Región del nudo cotiledonar

Se realizó un análisis de varianza para comparar las medias obtenidas de las hojas aberrantes, hojas normales, brotes y raíces procedentes de los callos de la región del nudo cotiledonar y las medias obtenidas de las hojas aberrantes procedentes de los callos de la región apical.

Las figuras 12, 13 y 14 muestran la media, el error estándar y las diferencias significativas entre las hojas aberrantes, brotes y raíces obtenidos durante el proceso de regeneración y el desarrollo de los brotes a partir de callos del nudo cotiledonar.

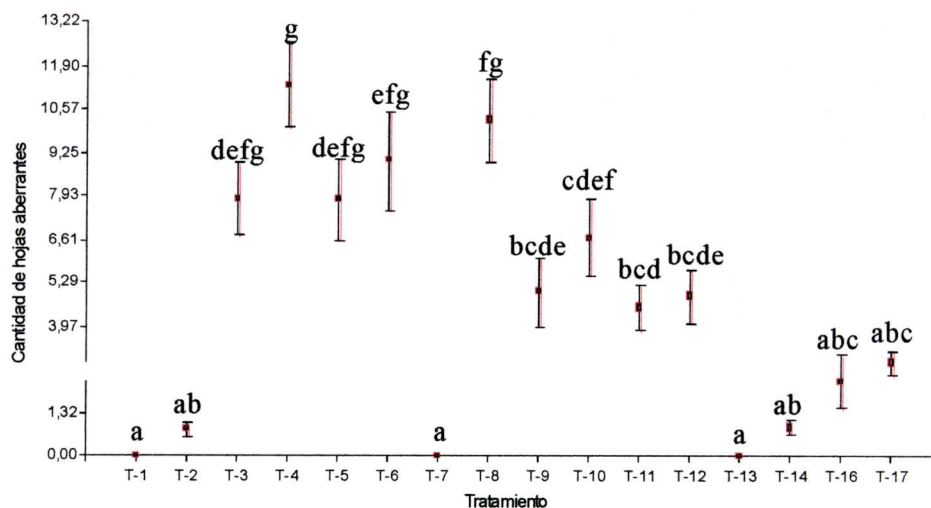


Figura 12. Gráfico de puntos para las hojas aberrantes obtenidas de los callos del nudo cotiledonar, con una probabilidad de $<0,0001$ y un intervalo de confianza del 95%. Las letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

La mayor cantidad de hojas aberrantes se presentó en el tratamiento 4 (0.025 mg/L TDZ sin AIA), y la menor cantidad en los tratamientos 1, 7 y 13 (figura 12).

Se observó una mayor cantidad de tejido calloso a partir del nudo cotiledonar en el tratamiento 3, y en menor cantidad en los tratamientos 1, 7, 13, 16 y 17 (figura 13). Se observó la mayor formación de tejido radicular a partir del nudo cotiledonar en el tratamiento 17 (0.04 mg/L TDZ con 0.03 mg/L AIA), 10 (0.025 mg/L TDZ con 0.01 mg/L AIA) y 8 (0.001 mg/L TDZ con 0.01 mg/L AIA). Y en los demás tratamientos se presentó menor crecimiento radicular (figura 14).

En el tratamiento 2 (0.001 mg/L TDZ sin AIA), se presentó la mayor cantidad de hojas normales a partir de callos del nudo cotiledonar, y en el resto de tratamientos menor cantidad (figura 15). En el tratamiento 11 (0.04 mg/L TDZ con 0.01 mg/L AIA) la mayoría de hojas de la región apical fueron aberrantes (figura 16).

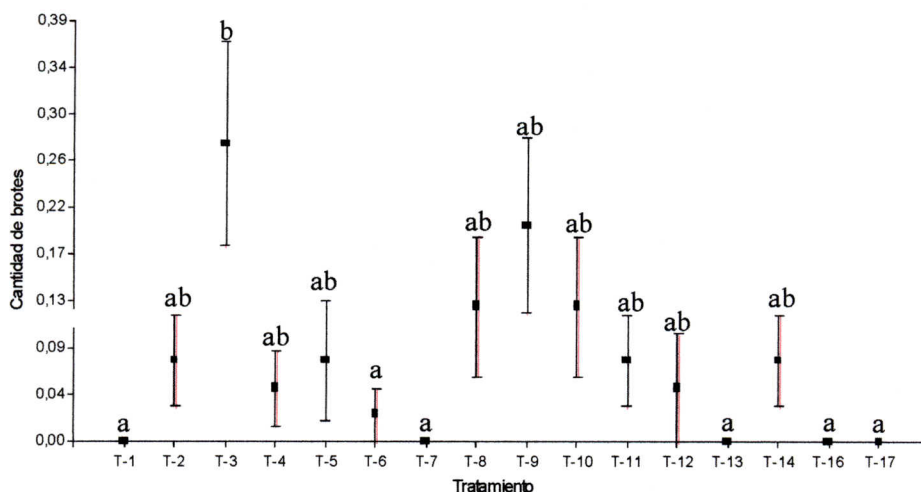


Figura 13. Gráfico de puntos para los brotes obtenidos de los callos del nudo cotiledonar, con una probabilidad de $<0,0001$ y un intervalo de confianza del 95%. Las letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

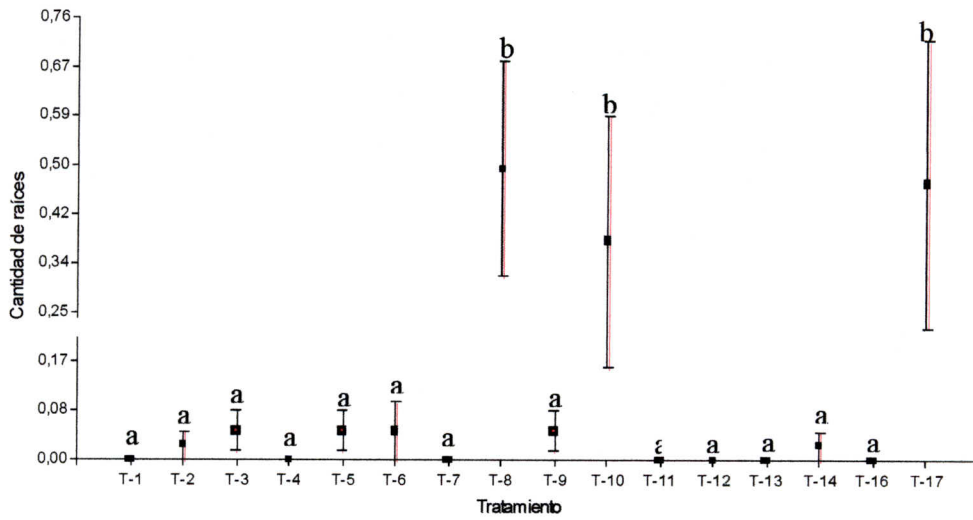


Figura 14. Gráfico de puntos para las raíces obtenidas de los callos del nudo cotiledonar, con una probabilidad de $<0,0001$ y un intervalo de confianza del 95%. Las letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

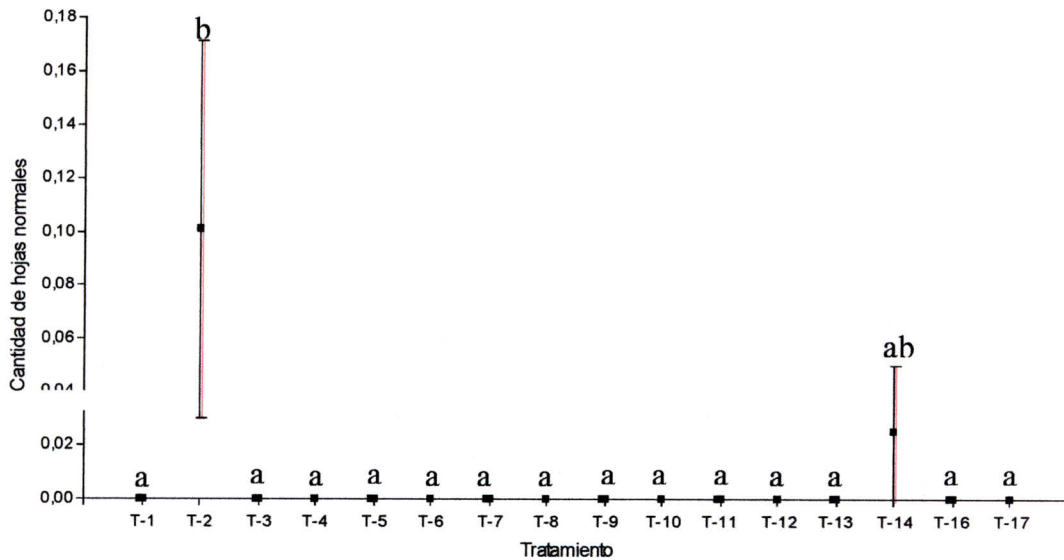


Figura 15. Gráfico de puntos para las hojas normales obtenidas de los callos del nudo cotiledonar, con una probabilidad de $<0,0001$ y un intervalo de confianza del 95%. Las letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

Región apical

La figura 16 muestra la media, el error estándar y las diferencias significativas de las hojas aberrantes obtenidas durante el proceso de regeneración y el desarrollo de los brotes.

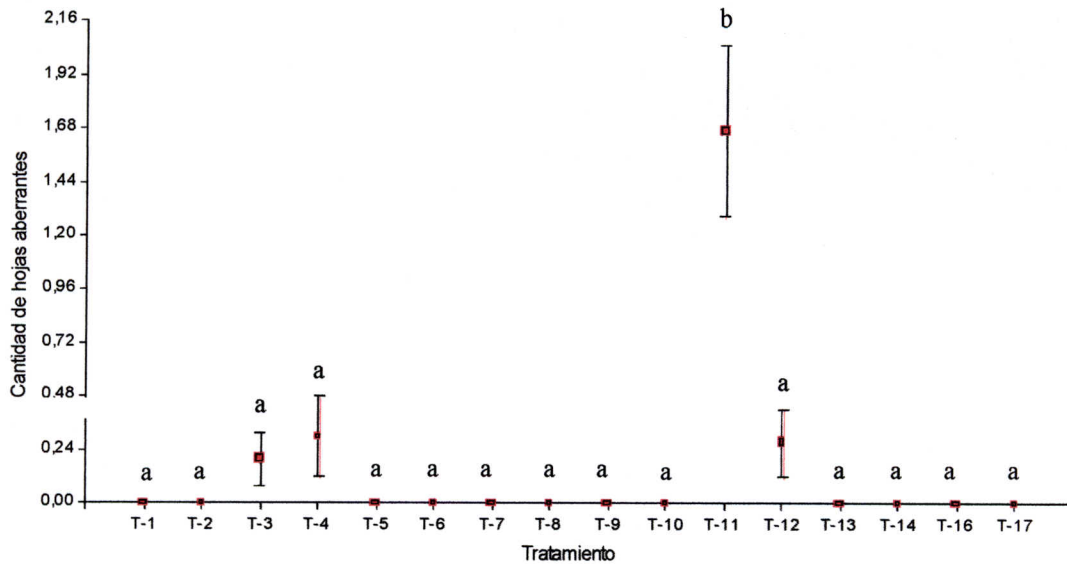


Figura 16. Gráfico de puntos para las hojas aberrantes obtenidas de la región apical, con una probabilidad de $<0,0001$ y un intervalo de confianza del 95%. Las letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

Variedad Brunca

Inducción y mantenimiento de tejidos morfogénicos

Al igual en la variedad Huetar, en la variedad Brunca se observó la aparición de un callo verde de aspecto globular en el nudo cotiledonar y en la región apical, semejante al descrito por Zambre *et al.*, (1998) para *Phaseolus acutifolius* y un callo color crema oscuro en la base del hipocótilo (figura 17) a los 30 días de cultivo en algunos de los tratamientos. Además, en unos de los tratamientos se formaron brotes en el nudo cotiledonar.

En la figura 18 y 19 se muestra la cantidad de explantes que formaron callos en porcentaje, obtenidos a los 30 y 60 días cultivo respectivamente del nudo cotiledonar, base del hipocótilo y de la región apical.

A los 30 días se observó desarrollo de tejido calloso en la base del hipocótilo en el tratamiento 0,04 mg/L TDZ y sin AIA. Como se observa en la figura 19 a los 60 días de cultivo, el mayor número de explantes que formaron callos en más de un 50% en el nudo cotiledonar corresponden a los tratamientos 6, 9 y 12.

En cuanto al callo formado en la base del hipocótilo, la respuesta mayor al 50 % correspondieron a los tratamientos 3, 4, 12 y 18. Hubo formación de callo en la región apical en los tratamientos 4, 5, 6 y 12.

Todos los callos obtenidos a los 60 días de cultivo en los diferentes tratamientos con TDZ y AIA se pesaron.

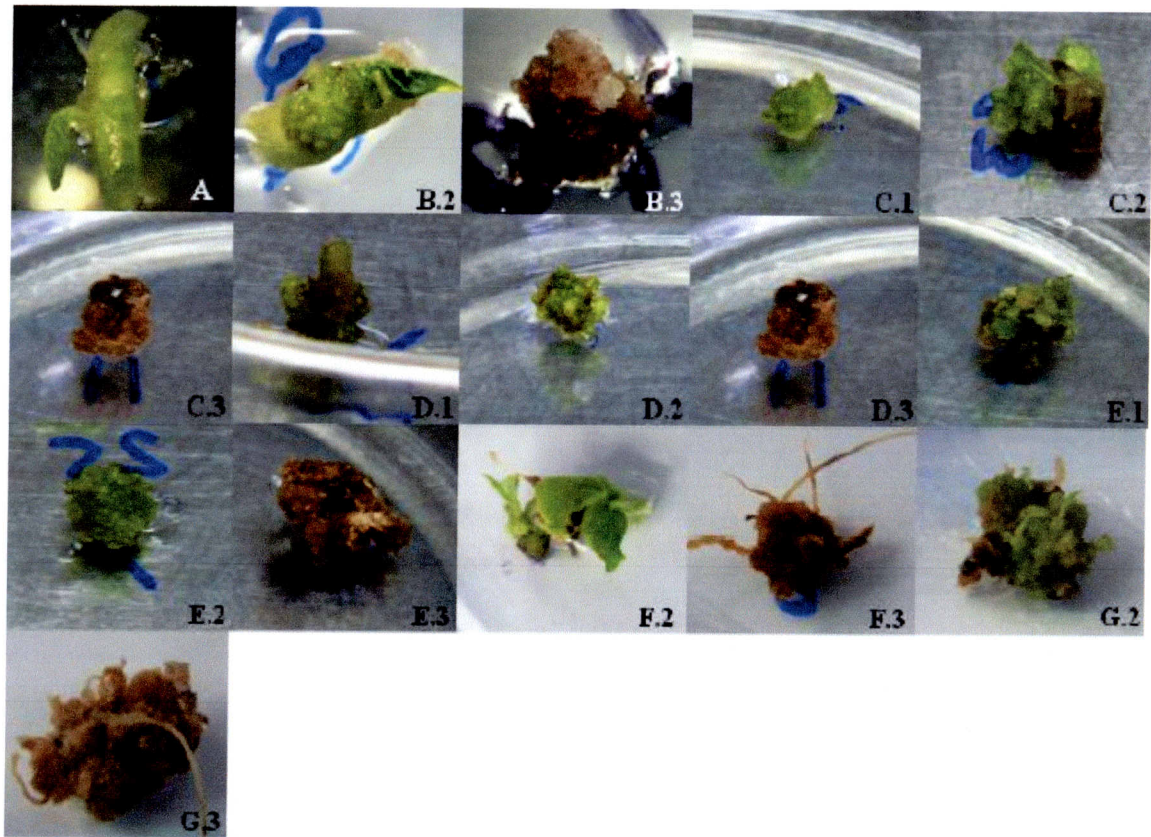


Figura 17. Formación de callo y brotes en la variedad Brunca en diferentes combinaciones de TDZ y AIA a los 30 días de cultivo. A: T-1. B: T-3. C: T-4. D: T-5. E: T-6. F: T-15. G: T-18. Los números 1, 2, 3 corresponden a los callos obtenidos en la región apical, nudo cotiledonar y base hipocótilo respectivamente. Obsérvese la formación de brotes en las figuras en el nudo cotiledonar: B.2, F.2.

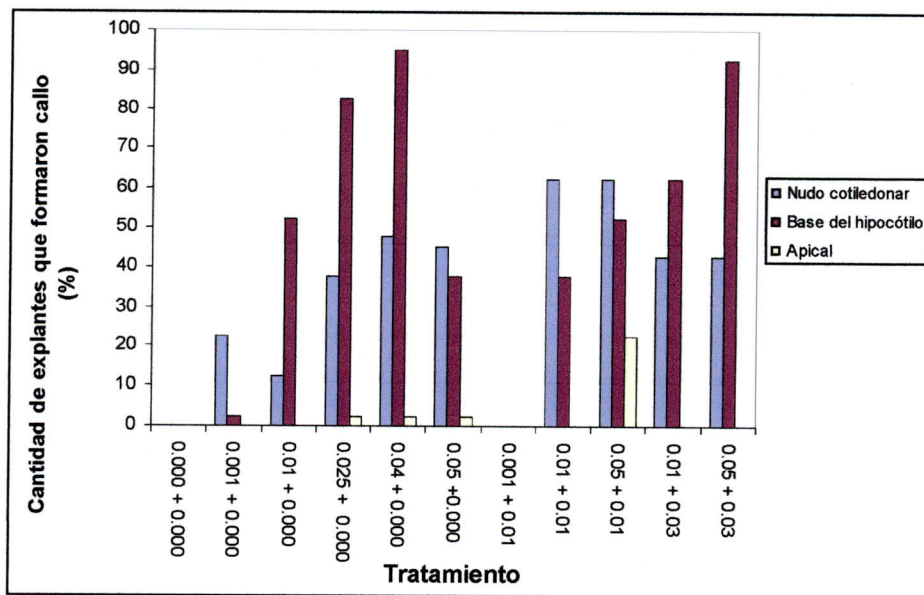


Figura 18. Cantidad de explantes que formaron callo en la variedad Brunca a los 30 días de cultivo en los diferentes tratamientos de TDZ y AIA.

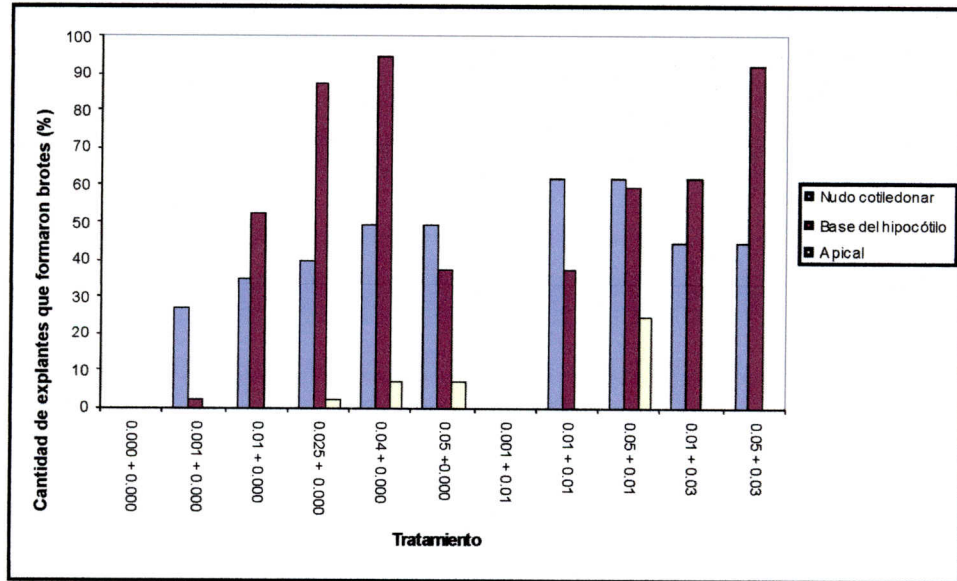


Figura 19. Cantidad de explantes que formaron callo en la variedad Brunca a los 60 días de cultivo en los diferentes tratamientos de TDZ y AIA.

Se realizó un análisis de varianza para comparar los tratamientos y encontrar diferencias significativas entre ellos para los tres tipos de callos que se obtuvieron. En las figuras 20, 21 y 22 se muestran gráficos de puntos que indican la media y el error estándar.

En el nudo cotiledonar se desarrolló tejido calloso de mayor peso en el tratamiento 12 (0.05 mg/L TDZ con 0.01 mg/L AIA) y 5 (0.04 mg/L TDZ sin AIA), y con menor peso en los tratamientos: 1, 2 y 8 (figura 20). De la base del hipocótilo se formó tejido calloso de mayor peso los tratamientos 4 y 5 y con menor peso en los tratamientos 1, 2 y 8 (figura 21). A partir de la región apical se observó el mayor peso en los tratamientos 12 y 5 (figura 22).

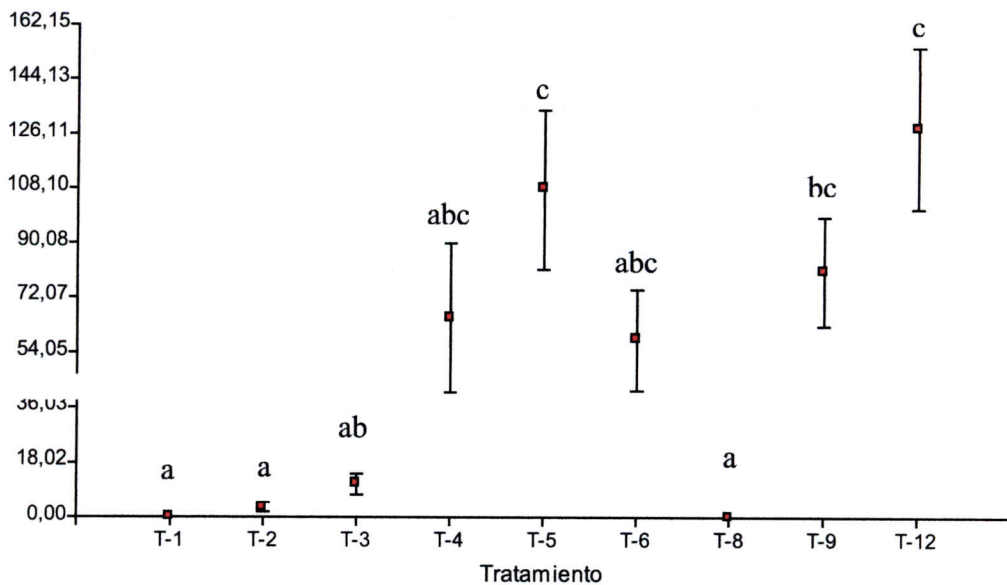


Figura 20. Gráfico de puntos para los callos obtenidos en el nudo cotiledonar, con una probabilidad de $<0,0001$ y un intervalo de confianza del 95%. Las letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

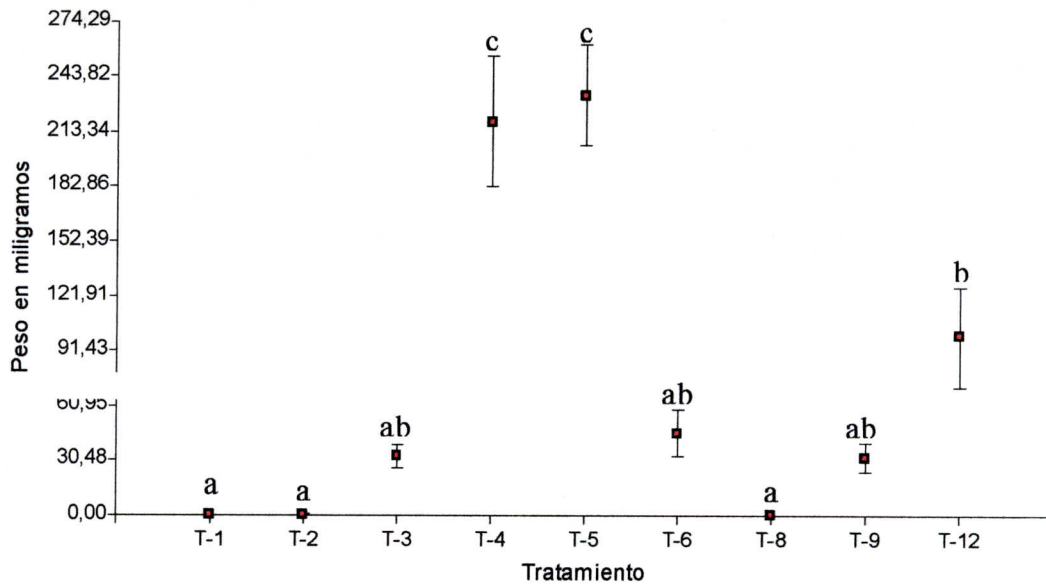


Figura 21. Gráfico de puntos para los callos obtenidos de la base del hipocotilo, con una probabilidad de $<0,0001$ y un intervalo de confianza del 95%. Las letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

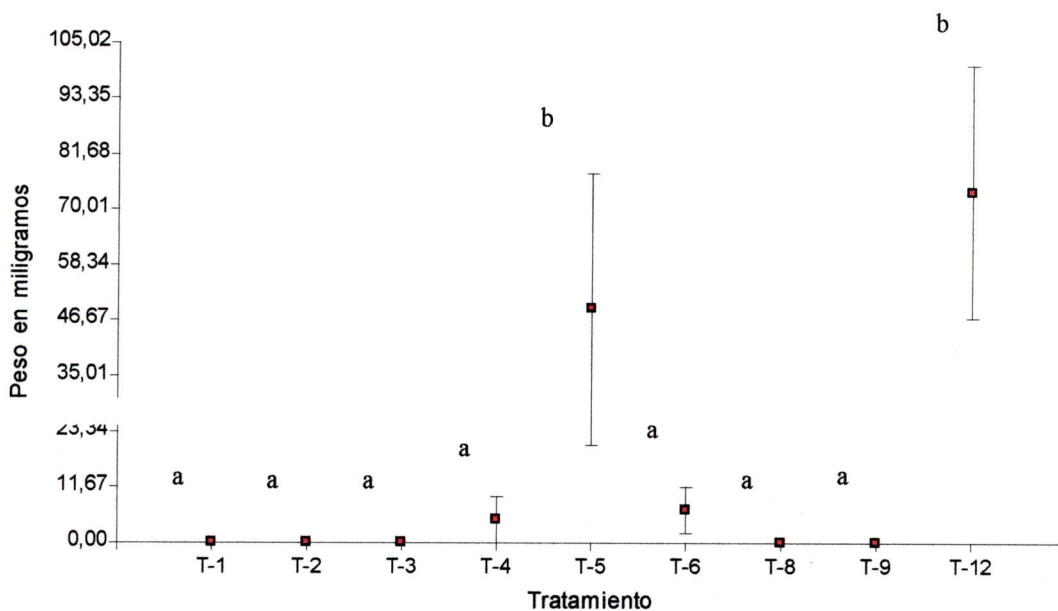


Figura 22. Gráfico de puntos para los callos obtenidos de la región apical, con una probabilidad de $<0,0001$ y un intervalo de confianza del 95%. Las letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

Formación de brotes

En las figura 23 se muestra la cantidad de explantes que formaron brotes y en la figura 24 se muestra el total de brotes por explante a los 60 días de cultivo en el nudo cotiledonar. El mayor porcentaje de brotes se observó en el tratamiento 0,04 mg/L sin AIA y en menor cantidad en el control (figura 23).

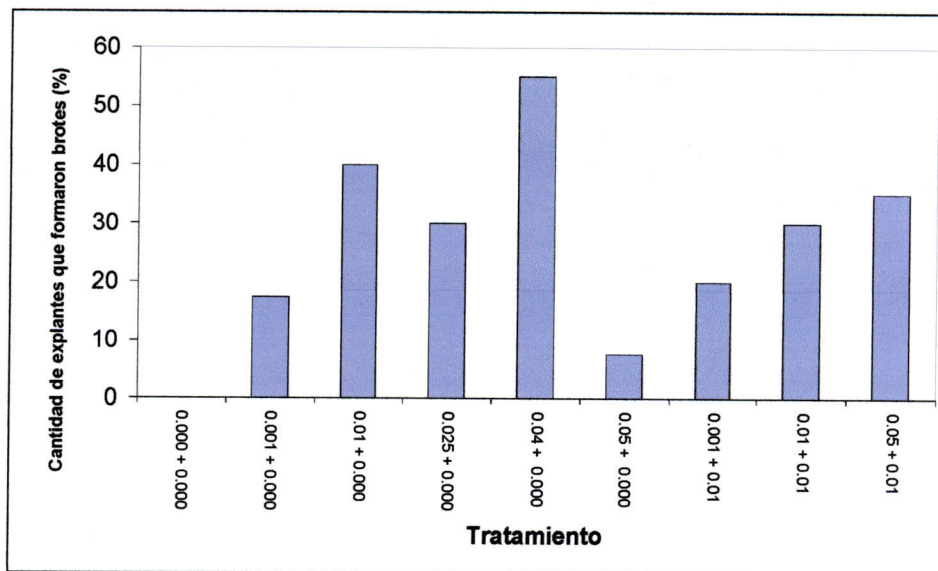


Figura 23. Cantidad de explantes que formaron brotes en la variedad Brunca a los 60 días de cultivo en los diferentes tratamientos de TDZ y AIA.

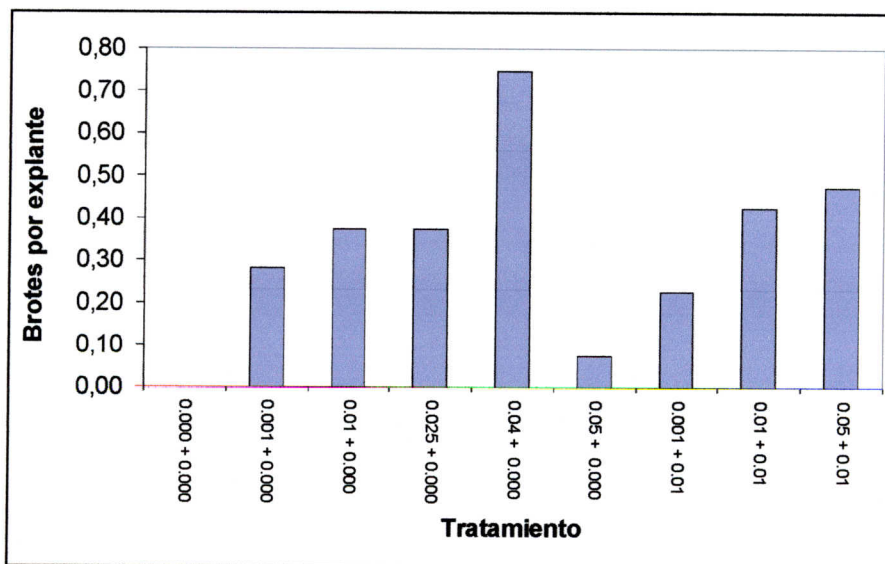


Figura 24. Brotos por explante en la variedad Brunca a los 30 y 60 días de cultivo en los diferentes tratamientos con TDZ y AIA.

Todos los callos obtenidos de la región del nudo apical, cotiledonar, y base del hipocotilo que fueron transferidos a un medio de cultivo MS con 1 mg/L de BAP (medio de inducción de brotes). A los 60 días de cultivo, así como lo obtenido en la variedad Huetar, se presentaron hojas aberrantes en los callos obtenidos del nudo cotiledonar (figura 25 A) y la formación de raíces en los callos obtenidos del nudo cotiledonar (figura 25, B).



Figura 25. Formación hojas aberrantes en los callos obtenidos de la región del nudo cotiledonar. A. Hojas aberrantes correspondientes al tratamiento 5 y B. Formación de raíces correspondiente al tratamiento 5.

Al igual que la variedad Huetar, todos los callos obtenidos de la región basal del hipocótilo se oxidaron y no hubo formación de brotes.

Hubo formación de brotes en los callos obtenidos de la región del nudo cotiledonar, correspondientes a los tratamientos 2, 3, 4, 6, 9 y 12, muchos de los cuales se necrosaron. Se han obtenido plántulas de los tratamientos 2, 3 y 9 (figura 26). Por el momento no se han formado brotes en los callos obtenidos de la región apical.

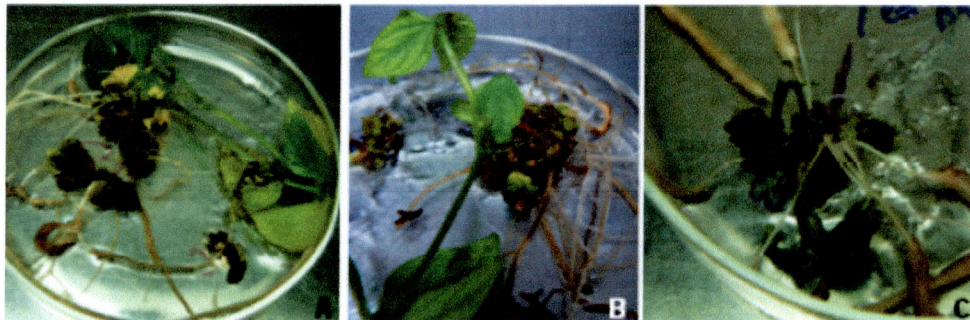


Figura 26. Plántulas regeneradas de la variedad Brunca en un medio de cultivo medio de cultivo MS con 0.1 mg L^{-1} de BAP. A. Tratamiento 3. B. Tratamiento 2. C. Tratamiento 9.

Regeneración y desarrollo de brotes

Se realizó un análisis de varianza para comparar las medias obtenidas de las hojas aberrantes, hojas normales, brotes, raíces y plántulas procedentes de los callos de la región del nudo cotiledonar y las medias obtenidas de las hojas aberrantes procedentes de los callos de la región apical.

Las figuras 27, 28, 29, 30 y 31 muestran la media, el error estándar y las diferencias significativas entre las hojas aberrantes, hojas normales, brotes, raíces y plántulas obtenidas durante el proceso de regeneración y el desarrollo de los brotes.

Los tratamientos que presentaron mayor cantidad de hojas aberrantes fueron el 4 y 5, y menor cantidad los tratamientos 1 y 12 (figura 27). El tratamiento 2 (0.001 mg/L TDZ sin AIA) presentó mayor cantidad de hojas normales (figura 28).

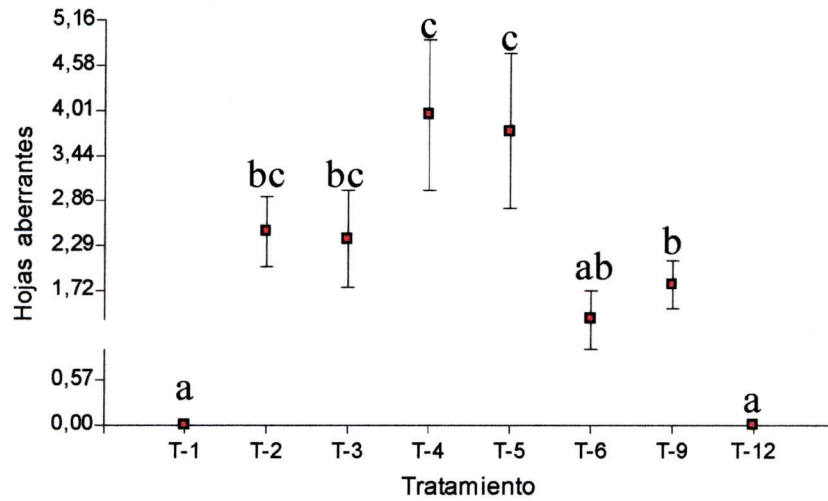


Figura 27. Gráfico de puntos para las hojas aberrantes obtenidas de los callos del nudo cotiledonar, con una probabilidad de $<0,0001$ y un intervalo de confianza del 95%. Las letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

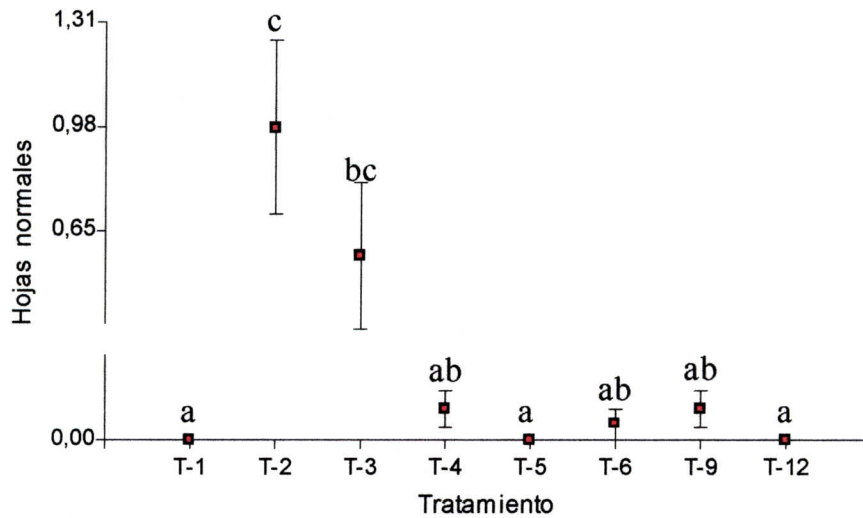


Figura 28. Gráfico de puntos para las hojas normales obtenidas de los callos del nudo cotiledonar, con una probabilidad de $<0,0001$ y un intervalo de confianza del 95%. Las letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$). Comparación de medias por Tukey.

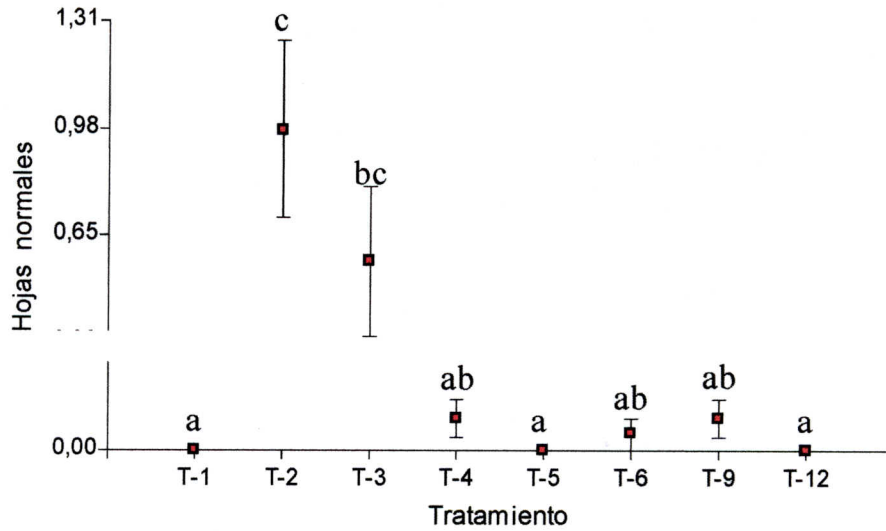


Figura 29. Gráfico de puntos para los brotes obtenidos de los callos del nudo cotiledonar, con una probabilidad de $<0,0001$ y un intervalo de confianza del 95%. Las letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

El tratamiento que permitió el desarrollo de un mayor número de callos de nudo cotiledonar fue el 3 y 2, así como en menor cantidad en los tratamientos 1 y 5 (figura 29).

Se obtuvo un mayor número de plántulas obtenidas de los callos del nudo cotiledonar, en el tratamiento complementado con $0,001 \text{ mg/L}$ TDZ y sin AIA (figura 31).

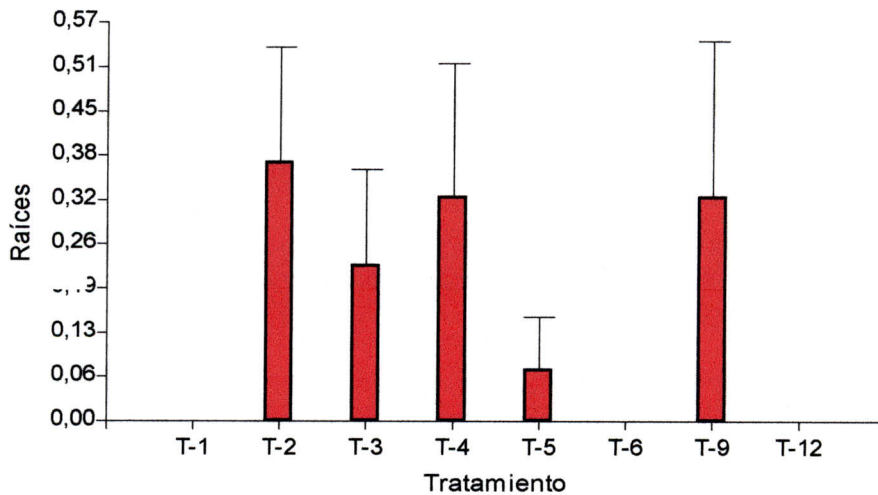


Figura 30. Gráfico de barras para las raíces obtenidas de los callos del nudo cotiledonar, con una probabilidad de $<0,0001$ y un intervalo de confianza del 95%.

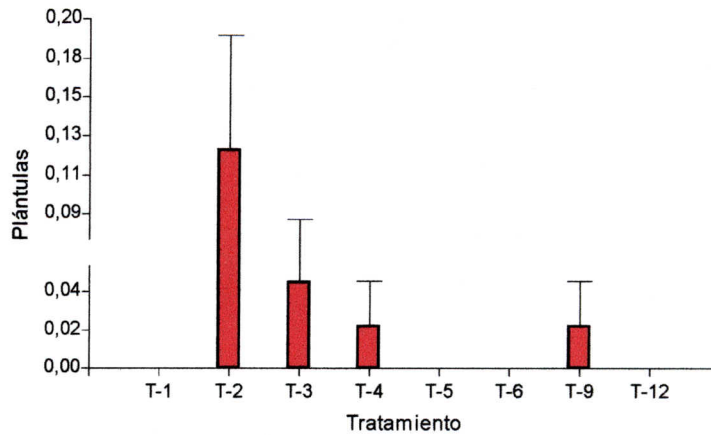


Figura 31. Gráfico de barras para las plántulas obtenidas de los callos del nudo cotiledonar, con una probabilidad de $<0,0001$ y un intervalo de confianza del 95%.

Región apical

La figura 32 muestra la media, el error estándar y las diferencias significativas de las hojas aberrantes obtenidas durante el proceso de regeneración y el desarrollo de los brotes. El tratamiento 5 (0.04 mg/L TDZ y sin AIA) presentó mayor número de hojas aberrantes.

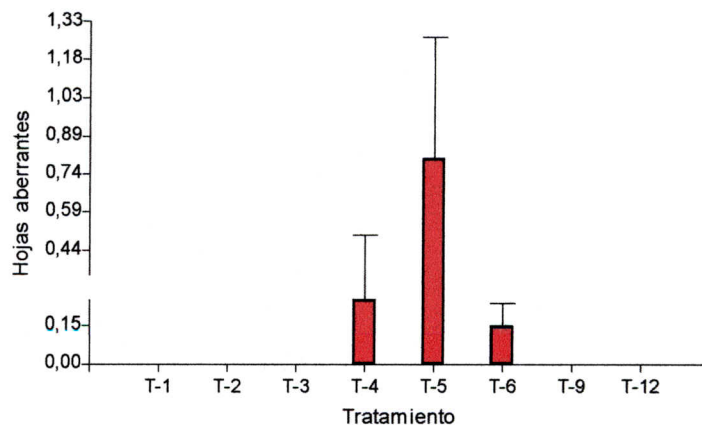


Figura 32. Gráfico de barras para las hojas aberrantes obtenidas de la región apical, con una probabilidad de $<0,0001$ y un intervalo de confianza del 95%.

Variedad Guaymí

Inducción y mantenimiento de tejidos morfogénicos

Al igual en la variedad Huetar y Brunca, en la variedad Guaymí se observó la aparición de un callo verde de aspecto globular en el nudo cotiledonar y en la región apical, semejante al descrito por Zambre *et al.*, (1998) para *Phaseolus acutifolius* y un callo color crema oscuro en la base del hipocótilo (figura 33) a los 30 días de cultivo en algunos de los tratamientos. Además, en unos de los tratamientos se formaron brotes en el nudo cotiledonar.

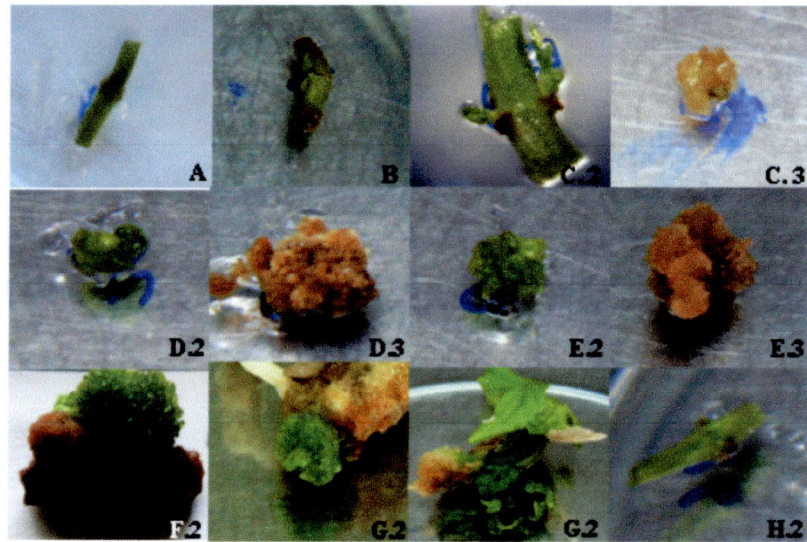


Figura 33. Formación de callo en la variedad Guaymí en diferentes combinaciones de TDZ y AIA a los 30 días de cultivo. A: T-1. B: T-2. C: T-3. D: T-4. E: T-5. F: T-6. G: T-11. H: T-13. Los números 1, 2, 3 corresponden a los callos obtenidos en la región apical, nudo cotiledonar y base hipocótilo respectivamente. Obsérvese la formación de brotes en las figuras en el nudo cotiledonar en C.2 y G.2

En la figura 34 y 35 se muestra la cantidad de explantes que formaron callos en porcentaje, obtenidos a los 30 y 60 días cultivo respectivamente del nudo cotiledonar, base del hipocótilo y de la región apical. A los 30 días se observó mayor desarrollo de tejido calloso en la base del hipocótilo en el tratamiento complementado con 0,01 mg/L TDZ y 0,03 mg/L AIA.

Como se observa en la figura 35, a los 60 días de cultivo. El mayor número de explantes que formaron callos en más de un 50% en el nudo cotiledonar corresponden a los tratamientos 3, 5, 6, 12, 15, 16, 17 y 18. En cuanto al callo formado en la base del hipocótilo, la respuesta mayor al 50% correspondieron a los tratamientos 4, 5, 6, 8, 9, 12, 17 y 18. Hubo formación de callo en la región apical en el tratamiento 12 (0.05 mg/L TDZ con 0.01 AIA).

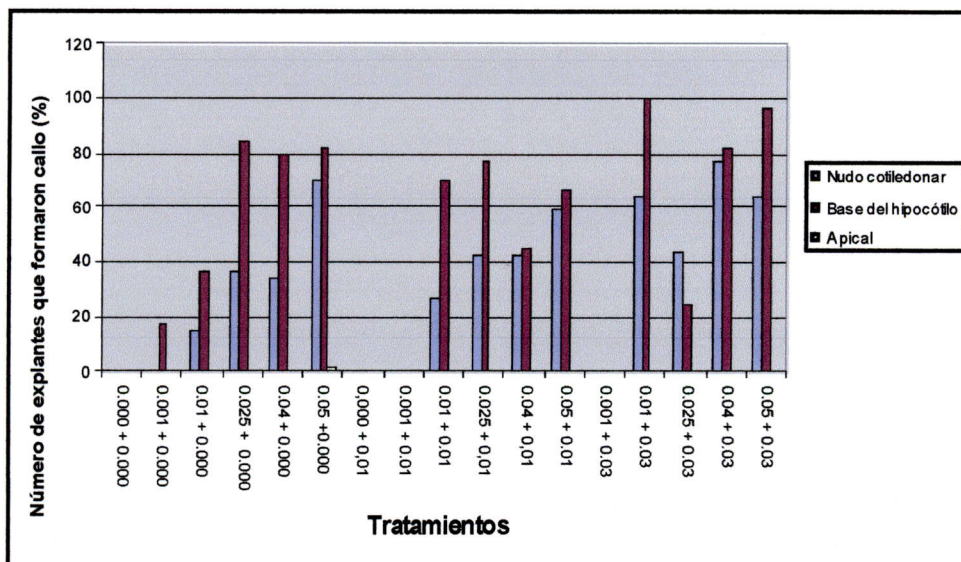


Figura 34. Cantidad de explantes que formaron callo en la variedad Guaymí a los 30 días de cultivo en los diferentes tratamientos de TDZ y AIA.

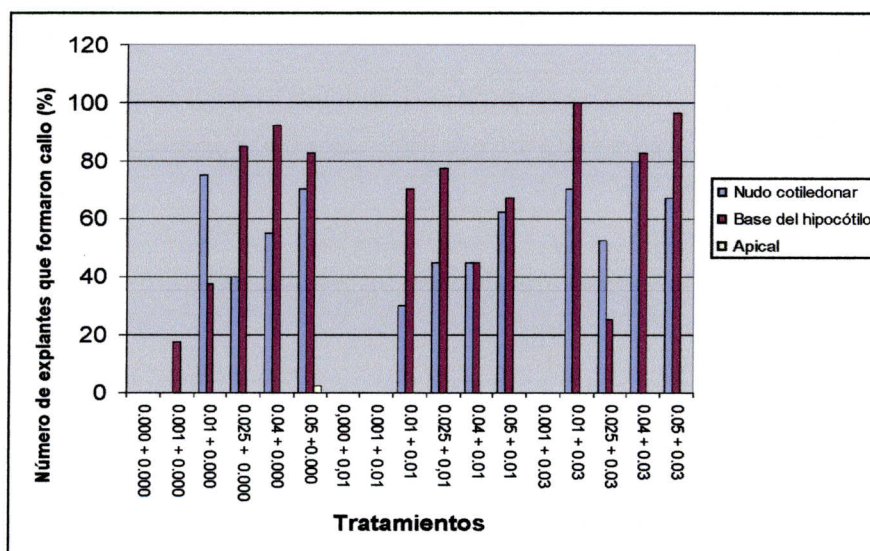


Figura 35. Cantidad de explantes que formaron callo en la variedad Guaymí a los 60 días de cultivo en los diferentes tratamientos de TDZ y AIA.

Todos los callos obtenidos a los 60 días de cultivo en los diferentes tratamientos con TDZ y AIA se pesaron. Se realizó un análisis de varianza para comparar los tratamientos y encontrar diferencias significativas entre ellos para los tres tipos de callos que se obtuvieron. En las figuras 36, 37 y 38 se muestran los gráficos de puntos que indican la media y el error estándar.

El tratamiento 18 (0.05 mg/L TDZ con 0.03 mg/L AIA) se presentó el mayor peso en los callos del nudo cotiledonar (figura 36) y además en el callo de la base del hipocótilo (figura 37). En mayor peso correspondiente a la región apical se obtuvo en el tratamiento 6 (0.05 mg/L TDZ sin AIA) (figura 38).

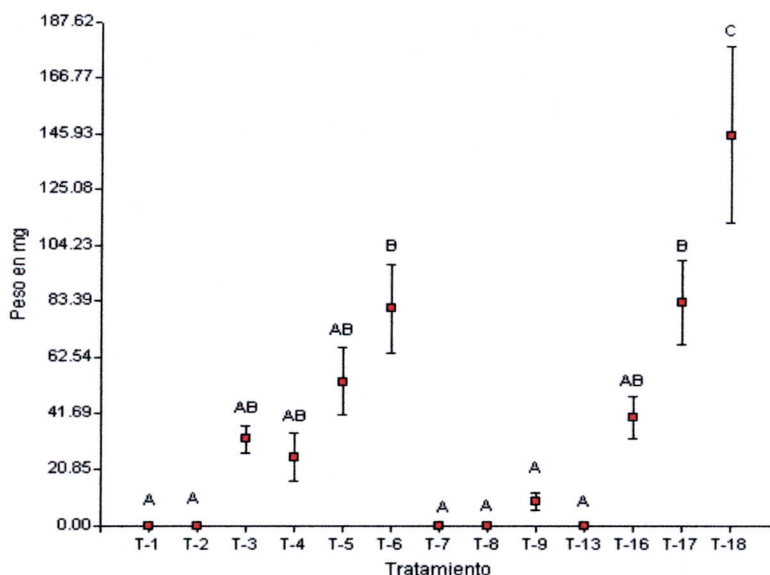


Figura 36. Gráfico de puntos para los callos obtenidos en el nudo cotiledonar, con una probabilidad de $<0,0001$ y un intervalo de confianza del 95%. Las letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

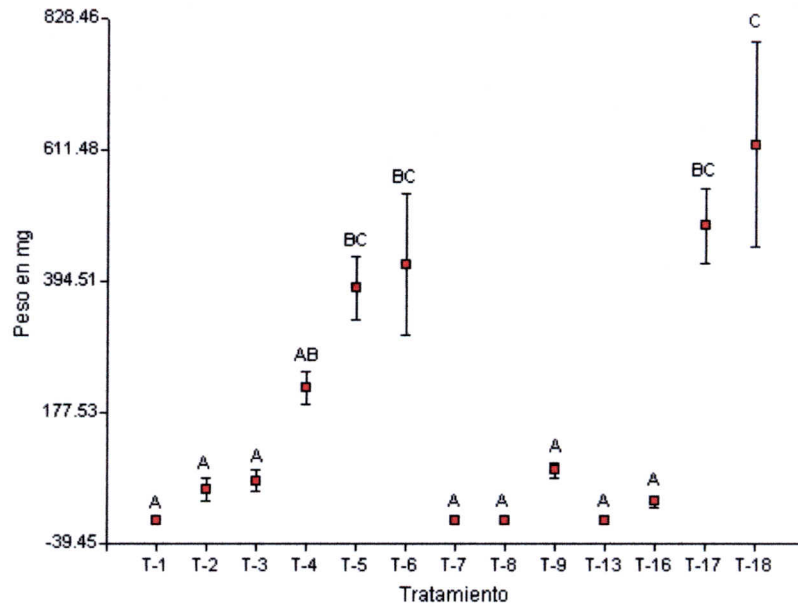


Figura 37. Gráfico de puntos para los callos obtenidos de la base del hipocotilo, con una probabilidad de $<0,0001$ y un intervalo de confianza del 95%. Las letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

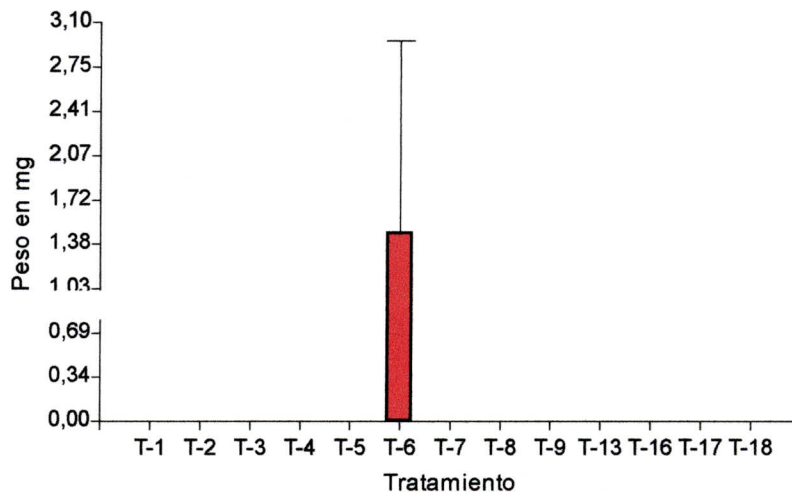


Figura 38. Gráfico de barras para los callos obtenidos de la región apical, con una probabilidad de $<0,0001$ y un intervalo de confianza del 95%.

En las figura 39 se muestra la cantidad de explantes que formaron brotes y en la figura 40 se muestra los brotes por explante a los 60 días de cultivo en el nudo cotiledonar. El mayor número de brotes por explantes observado fue en el tratamiento 7 (sin TDZ y con 0.01 mg/L AIA), y los que presentaron menor cantidad de tratamientos fueron los tratamientos 1 y 2.

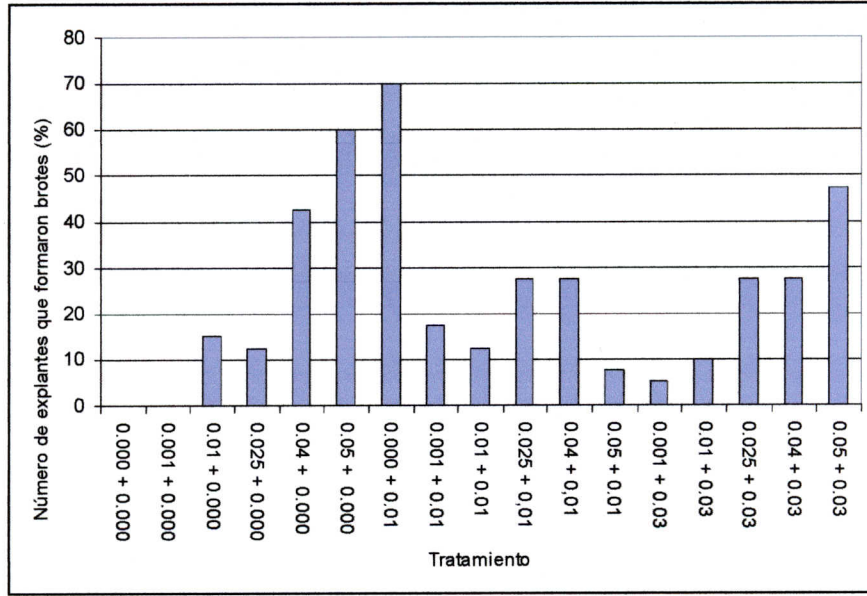


Figura 39. Cantidad de explantes que formaron brotes en la variedad Brunca a los 60 días de cultivo en los diferentes tratamientos de TDZ y AIA.

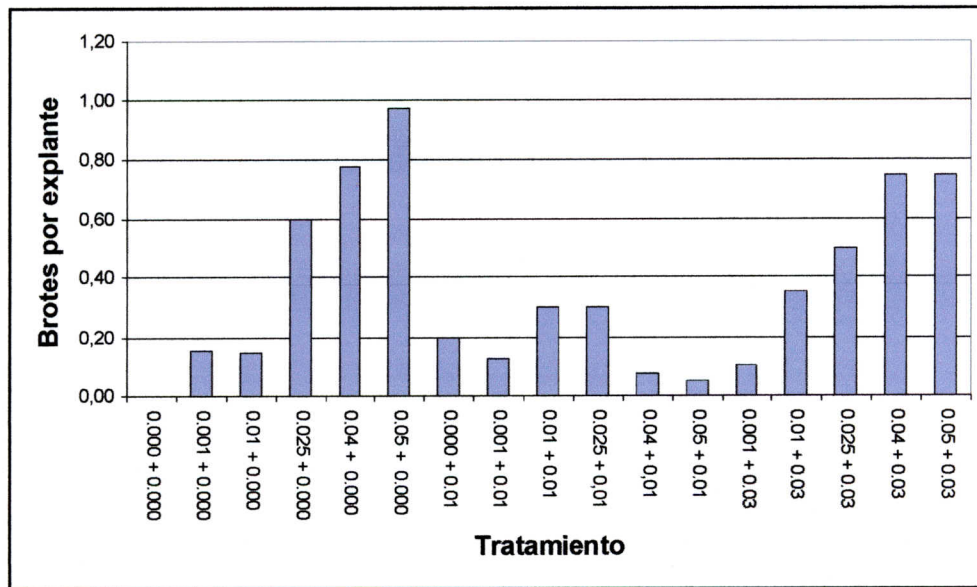


Figura 40. Brotos por explante en la variedad a los 30 y 60 días de cultivo en los diferentes tratamientos con TDZ y AIA

Regeneración y desarrollo de brotes

Todos los callos obtenidos de la región cotiledonar y de la base del hipocotilo que fueron transferidos a un medio de cultivo MS con 1 mg/L de BAP (medio de inducción de brotes). A igual que en la variedad Huetar y Brunca se formaron hojas aberrantes en los callos obtenidos del nudo cotiledonar a partir de los 60 días de cultivo (figura 41 A).



Figura 41. Formación hojas aberrantes en los callos obtenidos de la región del nudo cotiledonar en el tratamiento 6.

Al igual que la variedad Huetar y Brunca, todos los callos obtenidos de la región basal del hipocótilo se oxidaron y no hubo formación de brotes.

Hubo formación de brotes en los callos obtenidos de la región del nudo cotiledonar, correspondientes a los tratamientos 4, 5, 16, 17 y 18, muchos de los cuales se necrosaron. Se han obtenido plántulas de los tratamientos 16 (0.025 mg/L TDZ con 0.03 mg/L AIA) y 17 (0.04 mg/L TDZ con 0.03 mg/L AIA) (figura 41). Por el momento no se han formado brotes en los callos obtenidos de la región apical.



Figura 42. Plántula regenerada de la variedad Guaymí correspondiente al tratamiento 17 en un medio de cultivo MS con 0.1 mg/L de BAP.

Se realizó un análisis de varianza para comparar las medias obtenidas de las hojas aberrantes, hojas normales, brotes, raíces y plántulas procedentes de los callos de la región del nudo cotiledonar. Las figuras 43, 44, 45 y 46 muestran la media, el error estándar y las diferencias significativas entre las hojas aberrantes, hojas normales, brotes, raíces y plántulas obtenidos durante el proceso de regeneración y el desarrollo de los brotes.

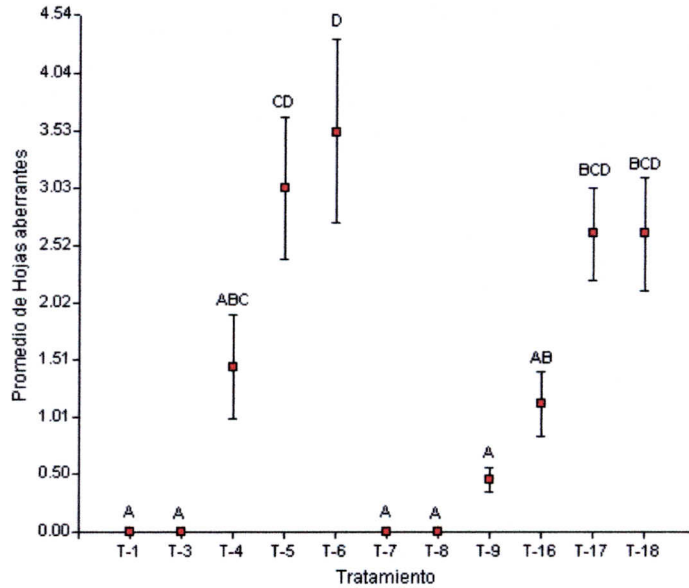


Figura 43. Gráfico de puntos para las hojas aberrantes obtenidas de los callos del nudo cotiledonar, con una probabilidad de $<0,0001$ y un intervalo de confianza del 95%. Las letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

La mayor cantidad de hojas aberrantes de callos del nudo cotiledonar se observaron en el cultivo 6 (0.05 mg/L TDZ sin AIA), y en menor cantidad en los tratamientos 1, 3, 7 y 8 (figura 43). A partir de callos desarrollados en el nudo cotiledonar se presentó mayor cantidad de tejido foliar normal en el tratamiento 5 (0.04 mg/L TDZ sin AIA) y menos en los demás tratamientos (figura 44).

De los callos del nudo cotiledonar se obtuvo mayor promedio de formación de brotes en el tratamiento 5 (0.04 mg/L TDZ sin AIA) (figura 45). Así mismo el tratamiento 18 (0.05 mg/L TDZ con 0.03 mg/L AIA) mostró un mayor promedio de desarrollo radicular (figura 46).

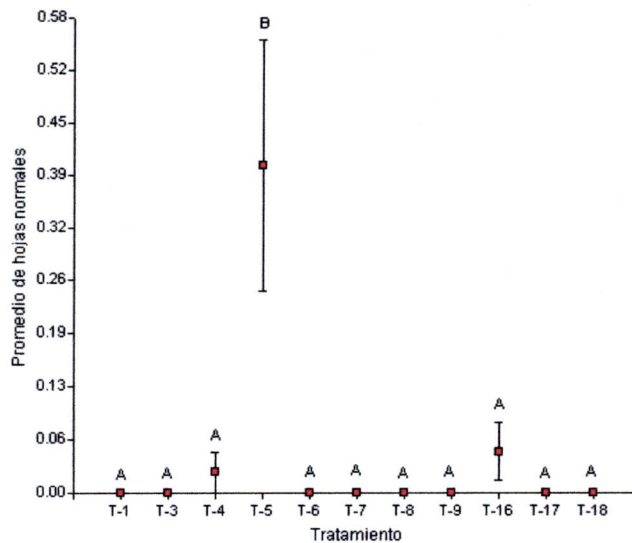


Figura 44. Gráfico de puntos para las hojas normales obtenidas de los callos del nudo cotiledonar, con una probabilidad de $<0,0001$ y un intervalo de confianza del 95%. Las letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

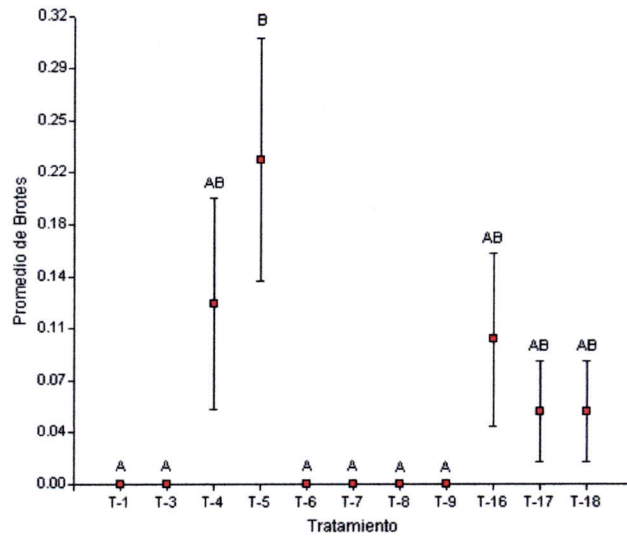


Figura 45. Gráfico de puntos para los brotes obtenidos de los callos del nudo cotiledonar, con una probabilidad de $<0,0001$ y un intervalo de confianza del 95%. Las letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

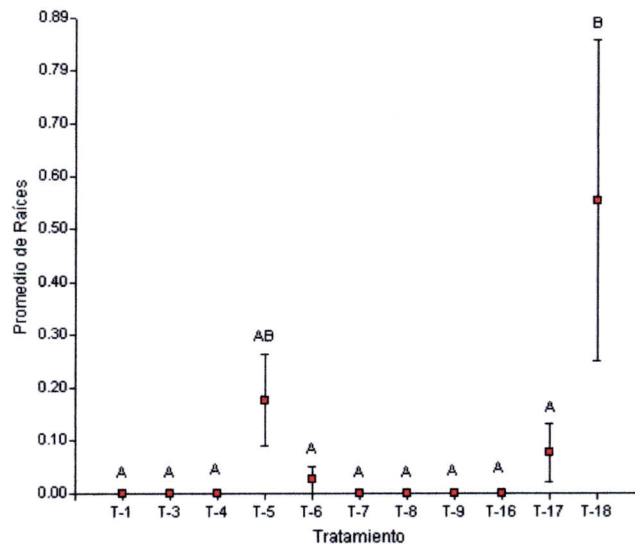


Figura 46. Gráfico de puntos para las raíces obtenidas de los callos del nudo cotiledonar, con una probabilidad de $<0,0001$ y un intervalo de confianza del 95%. Las letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

Inducción y regeneración de plántulas de frijol de las variedades Brunca, Huetar, Guaymí y Bribri (Según metodología de Delgado-Sánchez *et al.* 2006) (Se cumplió en un 100%)

Las semillas de las variedades de frijol costarricense “Bribri”, “Guaymí”, “Huetar”, “Telire” y “Brunca”, se desinfectaron siguiendo el protocolo que se indica en el anexo 1.

Los ejes embrionarios se cultivaron en platos Petri con 20 ml de medio de cultivo MS + 1 mg/L tiamina + 100 mg/L myo-inositol complementado con distintas dosis de BAP (0, 5 y 10 mg/L) y adenina (0, 20 y 40 mg/L) de acuerdo con la metodología descrita por Delgado-Sánchez *et al.* (2006).

Los brotes obtenidos se cultivaron en frascos Gerber con 20 ml de medio MS sin reguladores del crecimiento. Los platos Petri y frascos Gerber se colocaron en el cuarto de crecimiento con un fotoperíodo de 12 h y una temperatura de 26° C.

En el cuadro 3 se muestran los 9 tratamientos establecidos, los cuales corresponden a las distintas combinaciones de BAP y adenina. Para cada uno de los tratamientos se cultivaron 30 ejes embrionarios de cada una de las variedades evaluadas.

Transcurridos treinta días de cultivo, se determinó la cantidad de brotes, hojas y raíces para cada uno de los explantes en los distintos tratamientos. Asimismo, se determinó el porcentaje de explantes que formaron brotes apicales, agregados celulares organogénicos en el ápice o agregados celulares organogénicos en el cotiledón. De igual manera, se determinó el porcentaje de explantes oxidados [(número de explantes oxidados/número de explantes totales)*100] en cada uno de los tratamientos.

Cuadro 3. Combinaciones de BAP y adenina evaluadas en la inducción de callo organogénico en cinco variedades de frijol costarricense.

		BAP (mg/L)		
		0	5	10
Adenina (mgL ⁻¹)	0	T1	T2	T3
	20	T4	T5	T6
	40	T7	T8	T9

Resultados

Se observó un efecto del genotipo en la inducción de callos organogénicos, pues independientemente de la concentración de BAP y adenina utilizada, el mayor promedio de brotes por explante se obtuvo en Brunca > Telire > Bribri > Guaymí > Huetar. Asimismo, el mayor promedio de hojas por explante se obtuvo en Telire > Brunca > Guaymí > Bribri > Huetar. En cuanto al promedio de raíces por explante no se observaron diferencias significativas (Cuadro 4).

Independientemente de la variedad de frijol utilizada, el mayor promedio de brotes por explante se obtuvo con los tratamientos T7 (0 BAP y 40 adenina), T5 (5 BAP y 20 adenina) y T8 (5 BAP y 40 adenina). En cuanto al promedio de hojas por explante, los mejores resultados se obtuvieron con el tratamiento T0 (0 BAP y 0 adenina) y T5 (5 BAP y 20 adenina). Por otro lado, en el tratamiento T0 (0 BAP y 0 adenina) se obtuvo el mayor promedio de raíces por explante (Cuadro 5).

En la figura 47 se muestra el porcentaje de oxidación en cada uno de los tratamientos de BAP y adenina para cada una de las variedades de frijol utilizadas. Independientemente de las

concentraciones de BAP y adenina evaluada, los mayores porcentajes de oxidación se obtuvieron según el siguiente orden: Huetar (0.39 ± 0.03), Brunca (0.25 ± 0.03), Guaymí (0.17 ± 0.02), Telire (0.13 ± 0.02) y Bribri (0.11 ± 0.02). Por otro lado, independientemente de las variedades de frijol, los tratamientos que provocaron la mayor oxidación corresponden a $T7 > T6 > T5 > T3 > T4 > T9 > T8 > T2 > T1$. Como se puede notar, la mayor oxidación se obtuvo en aquellos tratamientos en los cuales se utilizó BAP (5 y 10 mg/L), mientras que en aquellos tratamientos en los que no se utilizó BAP se obtuvo los menores porcentajes de oxidación. En las cinco variedades de frijol se observó una relación entre el porcentaje de formación de brotes y el porcentaje de oxidación. Así, entre menor sea la oxidación mayor es el porcentaje de formación de brotes y viceversa.

En el cuadro 6 se muestra el efecto de las concentraciones de BAP (0, 5 y 10 mg/L) y adenina (0, 20 y 40 mg/L) en la inducción de callos organogénicos en las variedades de frijol costarricenses: "Bribri", "Guaymí", "Huetar", "Telire" y "Brunca". De manera general, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (combinaciones de BAP y adenina) para cada una de las variedades, según la prueba estadística Tukey ($P: 0.05$).

Así, para la variedad Bribri, el mayor promedio de brotes se obtuvo con el tratamiento T5 (0 BAP y 20 adenina). Para la variedad Brunca y Guaymí, el mayor promedio de brotes se obtuvo con el tratamiento T8 (5 BAP y 40 adenina). En la variedad Huetar, el mayor promedio de brotes se obtuvo con el tratamiento T7 (0 BAP y 40 adenina). Por otro lado, para la variedad Telire, el mayor promedio de brotes se obtuvo con los tratamientos T5 (0 BAP y 20 adenina), T7 (0 BAP y 40 adenina), T8 (5 BAP y 40 adenina) y T9 (10 BAP y 40 adenina).

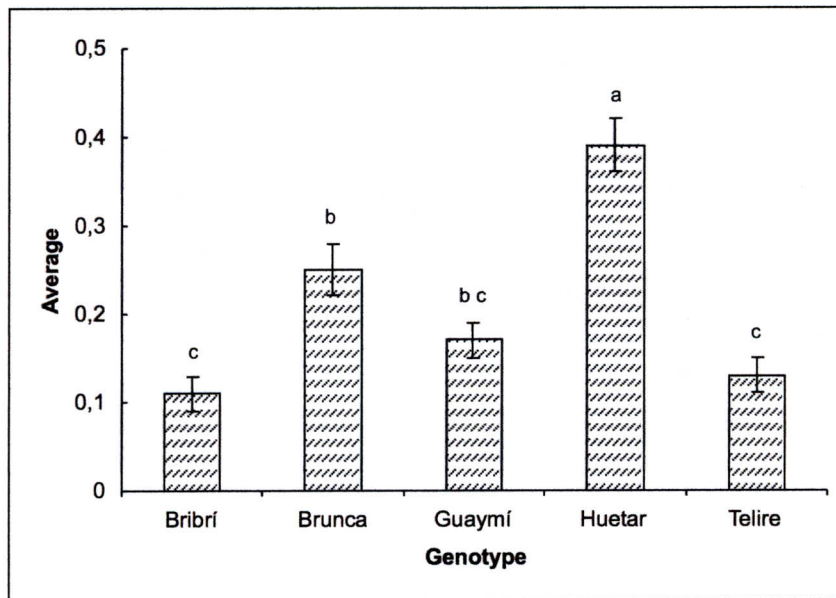


Figura 47. Efecto del genotipo en la oxidación de los ejes embrionarios de cinco variedades costarricenses de frijol (*Phaseolus vulgaris* L. cvs. Bribri, Brunca, Guaymí, Huetar y Telire) independientemente de la concentración de BAP y A. Datos con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí, según la prueba Tukey Unequal N HSD test ($P < 0.05$).

Cuadro 4. Efecto del genotipo en la formación de brotes, raíces y hojas en cinco variedades costarricenses de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Los datos se tomaron 30 días después de iniciado el experimento. Datos con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí, según la prueba Tukey Unequal N HSD test ($P < 0.05$).

Genotipo	Formación brotes apicales	Hojas	Raíces
Bribri	0.24±0.04 b	0.29±0.03 bc	0.67±0.09 a
Brunca	0.57±0.06 a	0.42±0.05 b	0.80±0.09 a
Guaymí	0.06±0.01 c	0.34±0.04 bc	0.49±0.07 a
Huetar	0.02±0.01 c	0.21±0.03 c	0.80±0.12 a
Telire	0.38±0.04 b	0.96±0.08 a	0.81±0.09 a

Cuadro 5. Efecto de la concentración de BAP y A en la oxidación, formación de brotes apicales, raíces y hojas en cinco variedades costarricenses de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.).

Tratamientos		Formación brotes apicales	Hojas	Raíces	Oxidación fenólica
BAP (mg/L)	A (mg/L)				
0	0	0.00±0.00 d	0.89±0.05 a	3.53±0.18 a	0.00±0.00 e
0	20	0.00±0.00 d	0.34±0.04 d	1.85±0.16 b	0.19±0.03 cd
0	40	0.37±0.04 bc	0.81±0.07 ab	0.65±0.05 c	0.45±0.04 a
5	0	0.09±0.04 d	0.00±0.00 e	0.09±0.04 d	0.00±0.00 e
5	20	0.56±0.08 ab	0.70±0.13 abc	0.01±0.01 d	0.31±0.04 bc
5	40	0.66±0.09 a	0.49±0.09 cd	0.00±0.00 d	0.05±0.02 de
10	0	0.01±0.01 d	0.00±0.00 e	0.00±0.00 d	0.31±0.04 bc
10	20	0.20±0.06 cd	0.25±0.06 de	0.31±0.08 cd	0.43±0.04 ab
10	40	0.40±0.05 bc	0.51±0.08 bcd	0.00±0.00 d	0.15±0.02 d

Cuadro 6. Efecto de la concentración de BAP y A en la formación de brotes apicales en cinco variedades costarricenses de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Los datos se tomaron 30 días después de iniciado el experimento. Datos con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí, según la prueba Tukey Unequal N HSD test ($P < 0.05$).

Tratamientos		Formación de brotes apicales				
BAP mg/L	A mg/L	Bribri	Brunca	Guaymí	Huetar	Telire
0	0	0±0 c	0±0 c	0±0 a	0±0 a	0±0 c
0	20	0±0 c	0±0 c	0±0 a	0±0 a	0±0 c
0	40	0.03±0.03 c	0.93±0.05 b	0±0 a	0.10±0.06 a	0.80±0.07 ab
5	0	0±0 c	0.47±0.18 bc	0±0 a	0±0 a	0±0 c
5	20	1.20±0.22 a	0.53±0.20 b	0.13±0.06 a	0±0 a	0.93±0.15 a
5	40	0.17±0.07 bc	2.43±0.17 a	0.17±0.07 a	0.07±0.05a	0.45±0.11 abc
10	0	0.07±0.07 bc	0±0 c	0±0 a	0±0 a	0±0 c
10	20	0.50±0.17 b	0±0 c	0.13±0.06 a	0±0 a	0.37±0.25 bc
10	40	0.20±0.07 bc	0.77±0.14 b	0.13±0.06 a	0±0 a	0.90±0.13 a

VI. PRESUPUESTO

Recursos disponibles

Los recursos materiales y financieros con que se cuenta para el desarrollo de esta investigación son los siguientes:

- Escuela de Biología: cuenta con laboratorios para el cultivo *in vitro* con un valor de aproximadamente ¢ 18 834 000 (US \$ 43 000). Este valor comprende los costos de remodelación, equipo como cámaras de flujo laminar, potenciómetro, balanzas, refrigeradora, cámara de germinación, cuarto de crecimiento completamente climatizado y con condiciones de luminosidad y fotoperíodo controladas, estereoscopios etc.
- Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM) cuenta con invernaderos recién construidos en las nuevas instalaciones del Centro.
- Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas (CIEMic) cuenta con instalaciones para los estudios histológicos de Microscopía de Luz, de Microscopía Óptica de Alta Resolución (MOAR) y de Microscopía de Rastreo y Transmisión.

Recursos solicitados a la Vicerrectoría de Investigación

Año 2007

2-01-99-01 Reactivos y útiles de laboratorio	¢ 200 000.00
6-02-02-02 Horas asistente (10 h x 10.5 meses x 2 años)	¢ 355 670.00

Año: 2008

2-01-99-01 Reactivos y útiles de laboratorio	¢ 200 000.00
2-99-05 Útiles y materiales de limpieza	¢ 50 000.00
6-02-02-02 Horas asistente (10 h x 10.5 meses x 2 años)	¢ 306 915.00

Total solicitado **¢ 1 112 675. 00**

VII. LOGROS ADICIONALES Y PROPUESTAS RESULTANTES DEL PROYECTO

1- Durante la **pasantía de investigación** realizada por M. Valdez, del 24 octubre al 4 de noviembre 2005, en los laboratorios de la Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuarias (EMBRAPA) en Brasilia, dentro del marco del proyecto del Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA), se adquirieron nuevas metodologías de regeneración *in vitro* de frijol, que podrían contribuir a resolver los problemas encontrados con las variedades de frijol costarricense que aún no responden a la metodología establecida en la primera etapa del proyecto. Como producto de esa visita, se generó también, una nueva propuesta de investigación colaborativa interdisciplinaria, entre la Escuela de Biología, el Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas (CIEMic) y el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), intitulada: **“Optimización del proceso morfogénico y de la regeneración *in vitro* de variedades costarricenses del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), por medio de estudios anatómicos e histológicos”**, que resultó ganadora del Fondo Especial de Estímulo a la Investigación, de la Vicerrectoría de Investigación, de la Universidad de Costa Rica, en marzo 2006. Esa investigación busca complementar los resultados de las investigaciones realizadas por nuestro grupo dentro del marco de los proyectos vigentes en biotecnología del frijol. Se centrará en el estudio de dos aspectos básicos del cultivo *in vitro* de las variedades costarricenses de frijol: i) la morfología de los meristemos apicales, de manera a facilitar ulteriormente, la inducción de mutaciones por irradiación de esos tejidos, y ii) la evolución de los procesos de callogénesis, organogénesis y regeneración de plantas, a partir del cultivo de yemas apicales y de ejes embrionarios. Con tales conocimientos, será posible determinar con precisión los estadios anatómicos óptimos y las mejores condiciones de cultivo *in vitro*, que permitan eventualmente optimizar los procesos de obtención de mutantes promisorios, que sean resistentes a las enfermedades que afectan a ese cultivo. Además, busca obtener un conocimiento más profundo de los posibles cambios ultraestructurales y anatómicos, que puedan darse a nivel de tejidos, células y organelas, en los tejidos de frijol irradiados, que podrán compararse con tejidos control. Así se podrá llegar a comprender mejor estos procesos y así, contribuir a su adecuada utilización y optimización.

2- Se presentó el resumen y el poster “Optimización del proceso morfogénico y de la regeneración *in vitro* de variedades costarricenses del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) por medio de estudios anatómicos e histológicos” en el VI Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología Agropecuaria (REDBIO 2007) organizado por REDBIO/FAO, 22 al 26 de octubre del 2007, Viña del Mar y Valparaíso, Chile (ver anexo 5).

3- El 28 de agosto del presente año, se sometió el manuscrito titulado **“*In vitro* plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): effect of N⁶-benzylaminopurine and adenine sulfhate”** a la Revista internacional “Electronic Journal of Biotechnology” (ver anexo 6).

4- Desarrollo del Proyecto de Tesis de Maestría Ciencias Agrícolas y Recursos naturales con Énfasis en Biotecnología, de la Universidad de Costa Rica por la estudiante Jenny Muñoz Valverde

Título de tesis: Regeneración *in vitro* de variedades de frijol costarricense (*Phaseolus vulgaris* L.) a partir de tejidos morfogénicos

Objetivo general: Desarrollar la metodología y protocolos experimentales para la regeneración de plantas de frijol de variedades costarricenses de importancia comercial en condiciones de cultivo *in vitro*, a partir de tejidos morfogénicos.

Objetivos específicos:

- Desarrollar los procedimientos experimentales para la inducción de callos morfogénicos en variedades de frijol costarricense de importancia comercial.
- Desarrollar una metodología que permita la regeneración de plantas fértiles de frijol a partir de tejidos morfogénicos.

VIII. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

El mejor explante para la iniciación del proceso de callogénesis en frijol parece ser el eje embrionario sin raíz, proveniente de plántulas germinadas *in vitro* durante cuatro días. Las características morfogénicas de los callos generados son muy similares para las cuatro variedades de frijol examinadas en la investigación. De manera general, se observa que los mejores resultados se obtienen al utilizar TDZ como regulador de crecimiento durante el proceso de callogénesis, ya que ello favorece el surgimiento de brotes durante la etapa posterior de cultivo en medio de regeneración.

El problema que se presenta es un cierto grado de oxidación de los callos una vez que surgen los brotes. En ese sentido, la segunda etapa de esta investigación, incluyó tratamientos con varios agentes conocidos como antioxidantes, de manera a reducir la oxidación y necrosis de los explantes durante el cultivo *in vitro*.

De manera general, las cuatro variedades costarricenses de frijol respondieron favorablemente a varios de los tratamientos de las diversas metodologías examinadas, aunque la “Bribri” y la “Brunca” generaron un mayor número de brotes por explante, aunque se observa que los mejores resultados se obtienen al utilizar la metodología de Aragão *et al.* (1996), con modificaciones.

Por lo anterior, se escogieron las variedades “Bribri” y “Brunca”, con la metodología de Aragão *et al.* (1996), para los experimentos preliminares de mutagénesis por irradiación de los ejes embrionarios. Estos experimentos se llevan a cabo con la finalidad de generar mutantes con resistencia o tolerancia a la enfermedad fúngica conocida como “Mustia Hilachosa”, que es una de las principales limitaciones para la producción del frijol en Costa Rica.

En este proyecto se ha logrado el establecimiento de un sistema de cultivo *in vitro* para variedades de frijol costarricenses. Se requiere aún validar las mejores metodologías para un

mayor número de genotipos. Ello permitirá en el futuro, realizar aplicaciones biotecnológicas no convencionales para su mejoramiento genético.

Los resultados de esta investigación han generado metodologías que permiten la generación de un producto biotecnológico tales como las *vitroplantas* de frijol, y la aplicación de técnicas de avanzada para el mejoramiento genético de ese cultivo, de fundamental importancia para el país.

IX. SOLICITUD DE AMPLIACION DE VIGENCIA DEL PROYECTO

Del 01 de enero 2009 a diciembre del 2010

Es preciso realizar estudios histológicos en cada etapa del proceso morfogénico de frijol, obtenida en los mejores tratamientos evaluados. Esto con el objetivo de confirmar la naturaleza organogénica del tejido caloso. Sin embargo, el laboratorio requiere de la compra de reactivos para llevar acabo los análisis histológicos, empleando resina (JB-4 Embedding kit) y la tinción de los cortes (reactivos: azul de naftol y shiff)

Es de suma importancia aclimatar las *vitroplantas* obtenidas en los experimentos de organogénesis indirecta y evaluar su fertilidad.

Cabe mencionar que no se descarta la posibilidad de micropropagar plántulas de frijol en los RITA's ®. Para lo cual se establecerá la metodología para la multiplicación de callos organogénicos de las distintas variedades de frijol. Además posteriormente, se incrementaría la multiplicación de *vitroplantas* en los RITA's ®.

Para la siguiente ampliación solicitada se propone dar continuidad a los siguientes objetivos iniciales del proyecto, los cuales quedan pendientes por concluir.

Objetivos específicos planteados en la ampliación 2009-2010

1. Concluir los experimentos para evaluar la capacidad morfogénica de varios genotipos costarricenses de frijol, en relación con su capacidad para la callogénesis y la regeneración de plantas. Estos incluyen las finalizar las metodologías según Zambre *et al.* 1998 y el establecimiento de los experimentos según Albino *et al.* 2005.
2. Con respecto a la optimización de la metodología y los procedimientos experimentales para la inducción de callos morfogénicos y la regeneración de plantas fértiles de los cultivares de frijol costarricense: "Huetar", "Guaymí", "Brunca" y "Bribri". Está pendiente el establecimiento de algunos tratamientos como el 15 y 18 para la variedad Huetar, los tratamientos 7, 10, 11 y del 13 al 18 para la variedad Brunca, y del 10 al 18 para la variedad Guaymí. Así como los 18 tratamientos correspondientes a la variedad Bribri, además de evaluaciones de tratamientos ya montados para las otras variedades.
3. Optimizar el proceso de organogénesis y regeneración de plantas de frijol, mediante el conocimiento de los eventos histológicos y anatómicos que ocurren en las diversas etapas de desarrollo. Esta actividad no se ha realizado debido a la falta de reactivos para realizar los análisis y tinciones histológicas respectivas.

4. Evaluar de la fertilidad de las plantas así como la evaluación y confirmación para todos los genotipos examinados, de otros métodos de morfogénesis *in vitro* tales como el del cultivo de ápices y callos organogénicos según Zambre *et al.* 1998 y Albino *et al.* 2005.
5. Establecer una metodología para la multiplicación de los callos organogénicos de las distintas variedades costarricenses de frijol en Recipientes de Inmersión Temporal Automáticos (RITA's ®).
6. Establecer la metodología para la multiplicación a gran escala de las *vitroplantas* de las distintas variedades costarricenses de frijol en bioreactores RITA's ®.

X. PRESUPUESTO

Recursos disponibles

Los recursos materiales y financieros con que se cuenta para el desarrollo de esta investigación son los siguientes:

- Escuela de Biología: cuenta con laboratorios para el cultivo *in vitro* con un valor de aproximadamente ₡ 18 834 000 (US \$ 43 000). Este valor comprende los costos de remodelación, equipo como cámaras de flujo laminar, potenciómetro, balanzas, refrigeradora, cámara de germinación, cuarto de crecimiento completamente climatizado y con condiciones de luminosidad y fotoperíodo controladas, estereoscopios etc.
- Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM) cuenta con invernaderos recién construidos en las nuevas instalaciones del Centro.
- Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas (CIEMic) cuenta con instalaciones para los estudios histológicos de Microscopía de Luz, de Microscopía Óptica de Alta Resolución (MOAR) y de Microscopía de Rastreo y Transmisión.

Recursos solicitados a la Vicerrectoría de Investigación

Ampliación solicitada para el año: 2009

2-01-99-01 Reactivos y útiles de laboratorio	¢ 250 000.00
2-99-05 Útiles y materiales de limpieza	¢ 50 000.00
6-02-02-02 Horas asistente (10 h x 10.5 meses x año)	¢ 153457.50

Ampliación solicitada para el año: 2010

2-01-99-01 Reactivos y útiles de laboratorio	¢ 250 000.00
2-99-05 Útiles y materiales de limpieza	¢ 50 000.00
6-02-02-02 Horas asistente (10 h x 10.5 meses x año)	¢ 153457.50

TOTAL SOLICITADO PARA AMPLIACIÓN: ¢ 906 915.00

XI. REFERENCIAS

Albino M. M. C. (2005). Regeneração de feijao (*Phaseolus vulgaris* L.) via organogênese e transformação genética via biobalística. Universidade de Brasília, Instituto de ciencias biológicas, Departamentp de Botânica, Brasília, Brasil.

Aragão F. J. L., Barros L. M. G., Brasileiro A. C. M., Ribeiro S. G., Smith F. D., Sanford J. C., Faria J. C., Rech E. L. (1996). Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. Theor. Appl. Genet. 93: 142-150.

Murashige, T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.

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

Zambre M. A., De Clercq J., Vranová E., Van Montagu M., Angenon G., Dillen W. 1998. Plant regeneration from embryo-derived callus in *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) and *P. acutifolius* A. Gray (teparry bean). Plant Cell Reports. 17: 626-630.

Anexo 1

Metodología y procedimientos experimentales para el cultivo *in vitro* de variedades costarricenses del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).

Los procedimientos se llevarán a cabo en el laboratorio de transferencia en condiciones asépticas en cámara de flujo laminar.

Para la siembra de las semillas, se utilizó el siguiente protocolo de desinfección:

1. Inmersión en alcohol de 70° durante 4 minutos.
2. Lavado con agua destilada aséptica.
3. Inmersión en cloro al 20% de producto comercial (cloro al 5.25%) + 3 gotas del surfactante “Tween” por cada 100 ml de solución de cloro al 20%, durante 20 minutos.
4. Dos lavados con agua destilada aséptica.
5. Inmersión en benomil al 0.01 % (100 mg/ l) durante 4 minutos.
6. Tres (3) lavados con agua destilada aséptica.

Siembra de los explantes en medios de cultivo.

1. Los procedimientos se llevarán a cabo en el laboratorio de transferencia en condiciones asépticas en cámara de flujo laminar.
2. Se utilizaron semillas de frijol con 16 horas en remojo con agua destilada aséptica.
3. Con la ayuda de un bisturí y pinzas se extrajo con mucho cuidado el embrión.
4. Con la ayuda de un estereomicroscopio, se retiró la radícula y las hojas embrionarias.
5. Se introdujo 4 embriones en un frasco que contiene un medio de cultivo MS complementado con 10 mg/L de BAP.
6. Se transfirieron al cuarto de crecimiento a una temperatura de 26 °C y un fotoperiodo de 12 horas.
7. Una vez que se obtuvieron los brotes, se transfirieron a medio de cultivo sin reguladores de crecimiento para la regeneración y enraizamiento de las plantas.

Anexo 2

Protocolo de aclimatación de vitroplantas de frijol

1. Colocar las cajas Magenta o frascos Gerber con las vitroplantas de frijol a aclimatar en el invernadero con DOS días de anterioridad a la aclimatación. Las vitroplantas se deben de colocar en un lugar donde no les de directamente el sol ni la lluvia.
2. En macetas grandes, preparar la tierra- sustrato universal en una proporción 3:1. No autoclavar la tierra, porque se concentran algunos elementos nutricionales, que luego causan toxicidad en las plantas, además si logra caer una espora, micelio u cualquier otro contaminante del aire, en ese suelo, este logra colonizar rápidamente y causa serios problemas en las plántulas.
3. Con mucho cuidado y utilizando unas pinzas retirar la vitroplantas del frasco y lavar las raíces con agua del tubo. Se deben de pasar a tierra las plántulas que tengan raíz, los "chonquitos" casi no crecen, se mueren o florecen prematuramente. Colocar DOS o TRES vitroplantas por maceta.
4. Una vez sembradas en las macetas, las vitroplantas se deben de regar con agua. Evitar regar directamente en las hojas, mas bien se debe de hacer alrededor del tallo.
5. A los 28 o 30 días del transplante, fertilizar con abono granular (formula 10-30-10) y luego cada 22 días.
6. Se puede fertilizar con abono foliar (Folivet, gota milagrosa u otros) después de los 20 días del transplante.
7. La aplicación del azufre y el Decis, se puede iniciar a los 15 días de ser necesario, aunque es preferible estar revisando si hay mosquitas o mildiu.
8. Es preferible no reutilizar la tierra, por si habido algún contaminante, pero no la eliminan, pónganla en otro saco, y transcurrido algún tiempo la volvemos a utilizar.

Anexo 3. Experimentos de irradiación

Objetivo: Determinar el efecto de la dosis de irradiación (0 o control, 10, 20 y 30 Gy) en la supervivencia de los ejes embrionarios de frijol (*Phaseolus vulgaris*) de las variedades costarricenses “Bribri” y “Brunca”.

Período de ejecución: Agosto 2006 a Diciembre 2008. Comprendió las siguientes actividades:

- Determinación de la dosis letal media (LD₅₀) de irradiación para las variedades de frijol costarricenses Bribri y Brunca tomando en cuenta el porcentaje de formación de brotes y oxidación, así como el número de hojas y raíces. **(Se cumplió en un 100%. Ver informe 2006).**
- Optimización del medio de cultivo utilizado en la etapa previa a la irradiación y en la regeneración de los ejes embrionarios en plántulas completas. Los ejes embrionarios irradiados con 0, 10, 20 y 30 Gy se cultivaron en el medio de cultivo MS sin reguladores de crecimiento en lugar del medio MS complementado con 10 mg l⁻¹ de BAP. **(Se cumplió en un 100%. Ver informe 2006).**
- Irradiar los ejes embrionarios las variedades de frijol costarricenses Bribri y Brunca con una dosis de 10 Gy. **(Se cumplió en un 100%)**
- Desarrollar los procedimientos experimentales para la inducción de brotes a partir de meristemos apicales de frijol (*Phaseolus vulgaris* L. Cv. Bribri y Brunca) irradiados con una fuente de cobalto 60 **(Se cumplió en un 100%).**
- Desarrollar la metodología y los protocolos experimentales para la regeneración de plantas en condiciones de cultivo *in vitro*, a partir de meristemos apicales y yemas laterales en varios genotipos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) de Costa Rica **(Se cumplió en un 50%)**
- Desarrollar los procedimientos experimentales para la inducción de callos morfogénicos en varios cultivares de frijol común, de importancia agronómica en Costa Rica, a partir de embriones zigóticos inmaduros **(Pendiente 2009).**
- Establecer la metodología para la multiplicación a gran escala de las *vitroplantas* de las distintas variedades costarricenses de frijol en bioreactores RITA's ®. No podrá llevarse a acbo debio a la falta de bioreactores.
- Determinar el sustrato adecuado para la aclimatación de las *vitroplantas* de frijol obtenidas a partir de los ejes embrionarios irradiados **(Se cumplió en un 100%).**
- Climatizar las *vitroplantas* de frijol obtenidas a partir de los ejes embrionarios irradiados **(Se cumplió en un 100%).**
- Evaluar de las características fenotípicas de las plantas de frijol aclimatadas **(Se cumplió en un 75%).**

Los resultados completos de esta etapa, se presentaron en el informe del 10 de diciembre 2007.

Anexo 4

Resumen presentado en

VI Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología Agropecuaria (REDBIO 2007) organizado por REDBIO/FAO, 22 al 26 de octubre del 2007, Viña del Mar y Valparaíso, Chile.

Cultivos celulares morfogénicos para el mejoramiento genético del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en variedades de Costa Rica

Muñoz Jenny ¹, Valdez Marta ¹, Gatica Andrés ¹, Ramírez Pilar ^{1,2}

¹ Laboratorio de Biotecnología y Transformación Genética de Plantas. Escuela de Biología. Universidad de Costa Rica. Ciudad Universitaria Rodrigo Facio. San Pedro de Montes de Oca. San José, Costa Rica.

² Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular. Universidad de Costa Rica. Ciudad de la Investigación. San Pedro de Montes de Oca. San José, Costa Rica.

Palabras clave: frijol, *Phaseolus vulgaris*, cultivo *in vitro*, reguladores de crecimiento, biotecnología

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es uno de los alimentos básicos y una de las mayores fuentes de proteína en la dieta del costarricense. Sin embargo, esta especie es muy susceptible al ataque de plagas y enfermedades, por lo que disminuye considerablemente su producción. Para contribuir a la solución de esta problemática, es de suma importancia el desarrollar metodologías y protocolos experimentales para la regeneración de plantas a partir de tejidos somáticos en varios genotipos costarricenses de frijol, que permitan la aplicación ulterior de técnicas tales como la transformación genética o la inducción de mutaciones.

Se han examinado las variedades “Brunca y Guaymi” (negro) y “Huetar y Bribri” (rojo). Se seleccionaron como explantes, ejes embrionarios sin raíz de plántulas germinadas *in vitro*, los cuales fueron cultivados en varios tratamientos con combinaciones de los reguladores de crecimiento thidiazuron (TDZ) y ácido indolacético (AIA). Para el desarrollo y mantenimiento de los brotes, se utilizaron dos concentraciones de 6- bencilaminopurina (BAP) (1 mg l^{-1} y 0.1 mg l^{-1}). Se empleo un medio MS con 1 mg l^{-1} ácido indolacético y 0.7 mg l^{-1} de ácido giberélico (AG_3) para la formación de raíces y elongación de las plántulas. El crecimiento de las plántulas en condiciones *in vitro*, se llevó a cabo en un medio MS sin reguladores del crecimiento. Así, se ha logrado establecer un sistema de cultivo *in vitro* de variedades costarricenses de frijol, que permitirá realizar en el futuro, aplicaciones biotecnológicas para su mejoramiento genético.



Cultivos Celulares Morfogénicos para el Mejoramiento Genético del Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en variedades de Costa Rica.



Jenny Muñoz¹, Marta Valdez¹, Pilar Ramírez², Andrés Gatica¹

¹ Laboratorio de Biotecnología y Transformación Genética de Plantas. Escuela de Biología. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

² Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular. Universidad de Costa Rica. Ciudad de la Investigación. San José, Costa Rica.

Introducción

El frijol común *Phaseolus vulgaris* L. es una de las mayores fuentes de proteína en la dieta del costarricense. Sin embargo, el cultivo de esta especie es susceptible al ataque de diversas plagas y enfermedades, que disminuyen su producción. El desarrollo de metodologías como la regeneración *in vitro* de plantas a partir de tejidos somáticos en varios genotipos de Costa Rica, permite la aplicación ulterior de técnicas tales como la transgénesis o la inducción de mutaciones para contribuir a la solución de esta problemática.

Objetivo General:

Desarrollar la metodología y los protocolos experimentales para la regeneración de plantas en condiciones de cultivo *in vitro*, a partir de tejidos somáticos en cuatro variedades de frijol (Guaymí, Bribri, Huetar y Brunca) de Costa Rica.

Metodología



Resultados

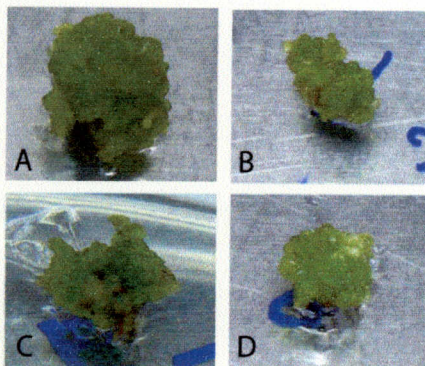


Figura 1. Callos organogénicos obtenidos en las variedades Brunca (A), Huetar (B), Bribri (C) y Guaymí (D).

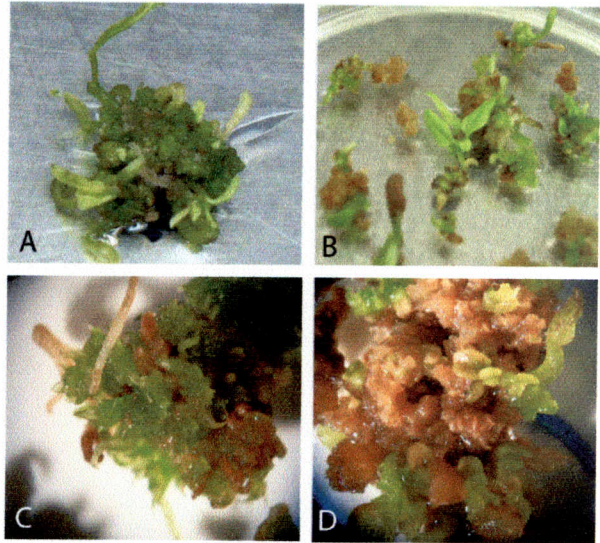


Figura 2. Inducción de brotes en las variedades Brunca (A), Huetar (B), Bribri (C) y Guaymí (D).

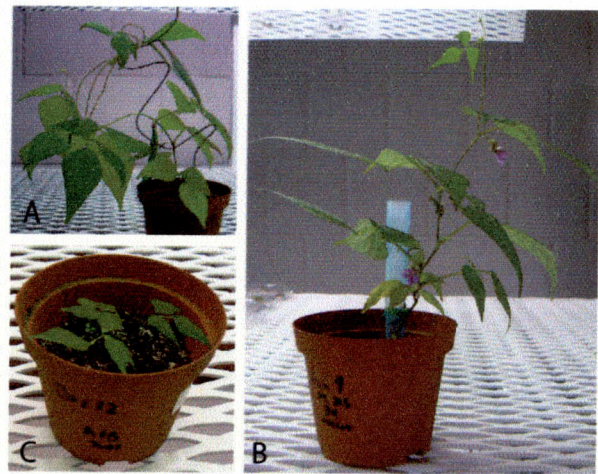


Figura 3. A. Plantas de *P. vulgaris* obtenidas mediante la regeneración de tejidos somáticos. Brunca (A), Bribri (B) y Guaymí (C).

Perspectivas

- Fijación de características de interés agronómico en las variedades de frijol.
- Desarrollo de técnicas no convencionales de mejoramiento genético (radiogénica o la transgénesis) para resistencia a enfermedades y plagas, o a condiciones ambientales desfavorables, o para mejorar las cualidades nutritivas.
- Estudio del proceso morfogénico mediante análisis histológicos y anatómicos.

Agradecimientos



Vicerrectoría de Investigación, UCR
 Estación Experimental Fabio Baudrit Montero, UCR
 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, CONICIT
 Comisión de Energía Atómica de Costa Rica
 Organización Internacional de Energía Atómica



Anexo 5

Resumen presentado en VI Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología Agropecuaria (REDBIO 2007) organizado por REDBIO/FAO, 22 al 26 de octubre del 2007, Viña del Mar y Valparaíso, Chile.

Optimización del proceso morfogénico y de la regeneración *in vitro* de variedades costarricenses del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) por medio de estudios anatómicos e histológicos

Valdez Marta ¹, Sánchez Ethel ³, Lizano Verónica ¹, Jiménez Marisol ¹, Gatica Andrés ¹, Ramírez Pilar ^{1,2}

¹ Laboratorio de Biotecnología y Transformación Genética de Plantas. Escuela de Biología. Universidad de Costa Rica. Ciudad Universitaria Rodrigo Facio. San Pedro de Montes de Oca. San José, Costa Rica.

² Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular. Universidad de Costa Rica. Ciudad de la Investigación. San Pedro de Montes de Oca. San José, Costa Rica.

³ Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas (CIEMic). Universidad de Costa Rica. Ciudad de la Investigación. San Pedro de Montes de Oca. San José, Costa Rica.

Palabras clave: *Phaseolus vulgaris* L., cultivo *in vitro*, histología, biotecnología.

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es uno de los productos agrícolas de mayor importancia económica, social y alimentaria en Costa Rica. Sin embargo, es susceptible al ataque de la enfermedad fungosa Mustia hilachosa (MH). La aplicación de técnicas biotecnológicas de mejoramiento genético que permitan conferir resistencia a MH, requiere de metodologías eficientes de cultivo *in vitro* para la regeneración de plantas a partir de células somáticas.

No obstante, esta especie es recalcitrante en su respuesta morfogénica a los diversos métodos de cultivo *in vitro*. Muy pocos grupos de investigación han logrado desarrollar procedimientos exitosos de regeneración de plantas para este cultivo. En Costa Rica, se desarrolló un método organogénico de regeneración para la variedad de frijol "Brunca". Es entonces, de fundamental importancia, realizar esfuerzos para el establecimiento de métodos de morfogénesis *in vitro* que puedan ser aplicados a la mayor parte de genotipos costarricenses.

La presente investigación busca optimizar el proceso de organogénesis y regeneración de plantas de frijol, mediante el conocimiento de los eventos histológicos y anatómicos que ocurren en las diversas etapas de desarrollo. De la misma manera, el estudio de la morfología de los meristemas apicales permitirá seleccionar las variedades de frijol a utilizar para la obtención de mutantes por medio de la irradiación de ejes embrionarios. Asimismo, se analizarán los cambios ultraestructurales y anatómicos que puedan darse a nivel de células, organelas y tejidos en los ejes embrionarios irradiados con una fuente de cobalto. Para ello se evaluarán cuatro genotipos de frijol costarricense: Guaymí, Bibrí, Huetar y Brunca. Se examinará la morfología de los ápices, callos organogénicos y de los brotes regenerados mediante la aplicación de técnicas de Microscopía de Luz, de Microscopía Óptica de Alta Resolución y de Microscopía Electrónica de Rastreo. Los resultados obtenidos a la fecha indican que el porcentaje de ápices donde el meristemo está completamente expuesto sigue el siguiente patrón: Brunca (37%) > Guaymí (26%) > Huetar (16%) > Bibrí (8%). Igualmente, la variedad Guaymí presenta el mayor porcentaje del área del meristemo expuesta (79%), seguida por la variedad Brunca (73%), Huetar (72%) y Bibrí (60%).



Optimización del proceso morfogénico y de la regeneración *in vitro* de variedades costarricenses de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) por medio de estudios anatómicos e histológicos



Valdez Marta ¹, Sánchez Ethel ³, Lizano Verónica ¹, Jiménez Marisol ¹, Gatica Andrés ¹, Ramírez Pilar ^{1,2}

¹ Laboratorio de Biotecnología y Transformación Genética de Plantas. Escuela de Biología. Universidad de Costa Rica. San Pedro de Montes de Oca. San José, Costa Rica.

² Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular. Universidad de Costa Rica. Ciudad de la Investigación. San Pedro de Montes de Oca. San José, Costa Rica.

³ Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas. Ciudad de la Investigación. San Pedro de Montes de Oca. San José, Costa Rica.

Introducción

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es uno de los productos agrícolas de mayor importancia económica, social y alimentaria en Costa Rica. La aplicación de técnicas biotecnológicas de mejoramiento genético que permitan conferir resistencia a plagas y enfermedades, requiere de metodologías eficientes de cultivo *in vitro* para la regeneración de plantas a partir de células somáticas.

No obstante, esta especie es recalcitrante en su respuesta morfogénica a los diversos métodos de cultivo *in vitro*. Muy pocos grupos de investigación han logrado desarrollar procedimientos exitosos de regeneración de plantas para este cultivo. En Costa Rica, se desarrolló un método organogénico de regeneración para la variedad de frijol "Brunca".

Objetivo general

Realizar estudios anatómicos e histológicos para la optimización del proceso morfogénico y la regeneración *in vitro* de variedades costarricenses del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).

Metodología

Ejes embrionarios irradiados y no irradiados, callos organogénicos y los brotes regenerados *in vitro* de las variedades costarricenses Guaymí, Bibrí, Huetar y Brunca.



Microscopia de Luz, de Microscopia Óptica de Alta Resolución y de Microscopia Electrónica de Rastreo



Morfología y anatomía de los meristemos apicales.

Estudio de las diferentes etapas del proceso de organogénesis.

Estudio de los cambios a nivel de células, organelas y tejidos en ejes embrionarios irradiados en comparación con ejes no irradiados

Resultados

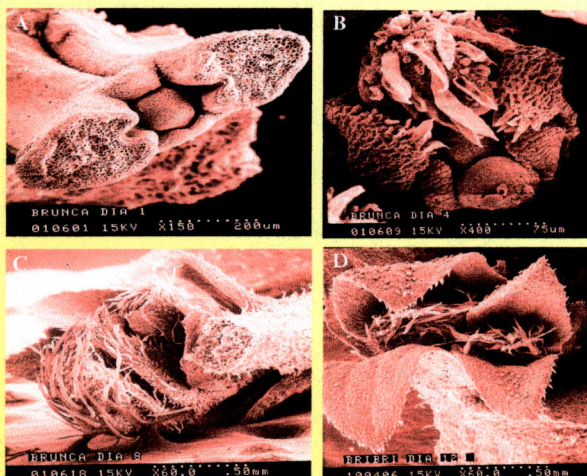


Figura 1. Desarrollo ontogénico del eje embrionario de frijol a los (A) 1 (B) 4 (C) 8 (D) 12 días de cultivo bajo condiciones *in vitro*.

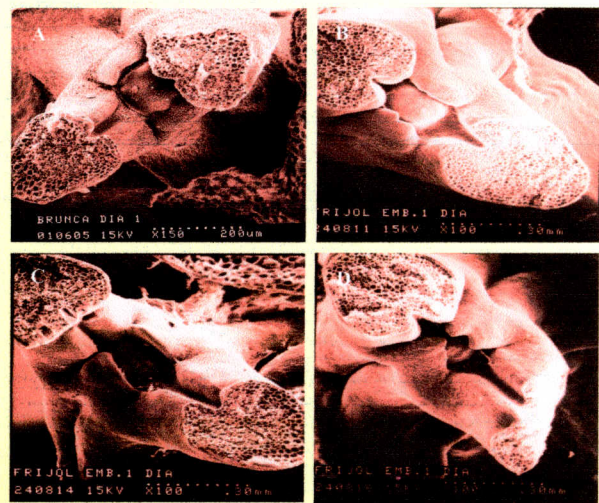


Figura 2. Microfotografías de barrido de los meristemos apicales de las variedades costarricenses de frijol. (A) Brunca. (B) Guaymí. (C) Huetar. (D) Bibrí.

Perspectivas

Los resultados esperados de esta propuesta serán de gran utilidad para el establecimiento de protocolos eficientes de regeneración *in vitro* de plantas de frijol, inducción de mutaciones por métodos físicos o químicos, transformación genética, los cuales podrán ser aplicados a otros cultivares de interés agronómico de Costa Rica y Latinoamérica.

Agradecimientos



Vicerrectoría de Investigación, Universidad de Costa Rica
Comisión de Energía Atómica de Costa Rica
Organismo Internacional de Energía Atómica



Anexo 6.

Manuscrito sometido a la Revista Electronic Journal of Biotechnology

In vitro plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): effect of N⁶-benzylaminopurine and adenine sulphate

Andrés M. Gatica Arias

Escuela de Biología
Universidad de Costa Rica
P.O. Box 2060, San Pedro, Costa Rica
Tel: (506) 2075091
Fax: (506) 2074216
E-mail: agatica@biologia.ucr.ac.cr

Jenny Muñoz Valverde

Escuela de Biología
Universidad de Costa Rica
P.O. Box 2060, San Pedro, Costa Rica

Pilar Ramírez Fonseca

Escuela de Biología
Universidad de Costa Rica
P.O. Box 2060, San Pedro, Costa Rica
Tel: (506) 2075091
Fax: (506) 2074216
E-mail: pramirez@biologia.ucr.ac.cr

Marta Valdez Melara

Escuela de Biología
Universidad de Costa Rica
P.O. Box 2060, San Pedro, Costa Rica
Tel: (506) 2075091
Fax: (506) 2074216
E-mail: mvaldez@biologia.ucr.ac.cr

Financial support: This research was supported by the University of Costa Rica (Grant No. 111-A4-013) and the National Commission of Scientific and Technological Investigation of Costa Rica (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, CONICIT) (Grant No. FV-025-03)

Keywords: *Phaseolus vulgaris* L., common bean, *in vitro* culture, plant growth regulators, morphogenesis

Abbreviations:

AS Adenine sulphate
BAP N⁶-Benzylaminopurine
MS Murashige and Skoog (1962) medium

A method for regeneration of commercially important common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using N⁶-benzylaminopurine and adenine sulphate was established. Embryogenic axes of the Costa Rican common bean cultivars Bribri, Brunca, Guaymí, Huetar and Telire were cultured on Murashige and Skoog medium supplemented with 100 mg l⁻¹ myo-inositol, 1 mg l⁻¹ thiamine, 30 g l⁻¹ sucrose, BAP (0, 5 and 10 mg l⁻¹), AS (0, 20 and 40 mg l⁻¹) and 8 g l⁻¹ agar. Regardless of the concentration of BAP and AS in the induction medium, the number of shoots and leaves differed significantly among the common bean cultivars evaluated. The higher average of shoots was obtained for Brunca > Telire > Bribri > Guaymí > Huetar. Moreover, independently of the cultivar, the induction medium supplemented with 5 mg l⁻¹ BAP and 20 or 40 mg l⁻¹ AS resulted in the higher average of shoots formation. Culture of Bribri, Brunca, Guaymí, Huetar and Telire embryogenic axes on induction medium supplemented with different BAP and AS resulted in a differential response. Successful acclimatization of common bean *in vitro* plants were achieved in the greenhouse and plants appeared morphologically normal. The regeneration system developed in this investigation for this important crop could be a useful tool for the genetic modification through mutagenesis or genetic transformation.

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is an economic important crop and one of the major grain legumes for human consumption in Latin America, Africa and Asia (Delgado-Sanchez et al. 2006; Varisai Mohamed et al. 2006). Despite its importance, production growth rates are limited by viral, fungal and bacterial pathogens, insects, lack of drought tolerances and nutritional deficiencies (Aragão et al. 1996). Therefore, there is considerable interest in the development of new bean cultivars with useful agronomical traits (Aragão et al. 1996). Nevertheless, conventional breeding improvement is limited due to the narrow genetic diversity, the low recombination potential, the low inheritance capacity and the embryo abortion in interspecific hybrids (Veltcheva et al. 2005).

Plant biotechnology represents an alternative to overcome these limitations and facilitate bean improvement since resistance or tolerance to biotic and abiotic stress could be increased and seed quality, plant architecture and reproduction modes could be altered (Veltcheva et al. 2005). Nevertheless, a reliable and efficient *in vitro* culture

system is essential for improvement of common bean through genetic transformation or mutagenesis (Svetleva et al. 2003; Varisai Mohamed et al. 2006). In addition to genetic improvement, *in vitro* culture is an important tool for the recovery and conservation of germplasm (Delgado-Sanchez et al. 2006).

In vitro plant regeneration of *Phaseolus* has been reported by organogenesis (Malik and Saxena 1991; Malik and Saxena 1992; Ahmed et al. 2002; Veltcheva and Svetleva 2005; Delgado-Sanchez et al. 2006; Varisai Mohamed et al. 2006) or through somatic embryogenesis (Zambre et al. 1998; Schryer et al. 2005). Although several protocols have been described in the literature for bean regeneration, development of an optimal *in vitro* culture system still remains a major challenge (Veltcheva et al. 2005). Therefore, the aim of this research was to optimize an *in vitro* plant regeneration system for five commercial Costa Rican *Phaseolus vulgaris* L. cultivars by studying the influence of N⁶-benzylaminopurine and adenine sulphate.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and explant preparation

Five Costa Rican common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars Bribri, Brunca, Guaymí, Huetar and Telire were obtained from Fabio Baudrit Moreno Experimental Station, University of Costa Rica. Seeds were washed with running tap water and soaked for 4 min in 70 % ethanol, disinfected with 20 % (v/v) sodium hypochlorite with two drops of Tween 20 solution for 20 min and rinsed three times with sterile distilled water. Then, the seeds were immersed in 0.01 % Benomyl (Piscis, Costa Rica) solution for 4 min and rinsed three times with sterile distilled water. The seeds were soaked in sterile distilled water overnight at 26 ± 2°C to soften the seed coat. The embryogenic axes were excised from the seeds and cotyledons and root meristems were removed.

Induction and plant regeneration medium

The embryogenic axes were cultured on Petri dishes containing 20 ml of induction medium which consisted of MS mineral salts (Murashige and Skoog 1962) supplemented with 100 mg l⁻¹ myo-inositol, 1 mg l⁻¹ thiamine, 30 g l⁻¹ sucrose and 8 g l⁻¹ agar. The induction medium was supplemented with a combination of BAP (0, 5 and 10 mg l⁻¹) and AS (0, 20 and 40 mg l⁻¹) to comprise 9 treatments. Experimental treatments consisted of three replicates of three Petri dishes with 10 explants each one. All medium pH was adjusted to 5.6 before autoclaving for 21 min at 121 °C and 1.07 kg cm⁻².

The shoots regenerated from bud clusters were excised from the original explant and transferred to baby food jars, closed with polyethylene food wrap (Glad, Costa Rica), containing 20 ml of induction medium to promote elongation and root formation. The *in vitro* cultures were maintained at $26 \pm 2^\circ\text{C}$ under a 16 h light photoperiod ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). The average number of shoots, leaves and roots per explant were estimated after 30 days of culture on each induction medium.

Acclimatization and field transfer

Regenerated shoots (approximately 3 cm long) with well developed leaves and roots were transferred to pots containing Floragard Blumenerde potting soil (Floragard products, Germany), covered with plastic bags and maintained in the greenhouse under 12 h light photoperiod at $26 \pm 2^\circ\text{C}$. After one week the plastic bags were removed. The plantlets were watered twice a week.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using one-way ANOVA and the significance of differences among treatment means were contrasted with Tukey's Honestly Significant Difference Test (HSD) at $P < 0.05$. The program STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK, USA) version 6.0 was used.

RESULTS

Multiple shoot formation began with the swollen of embryogenic axes (Figure 1a) and apical bud cluster formed after 30 days of culture (Figure 1b). The apical bud clusters were multiplied by culturing them in the induction medium (Figure 1c) until shoots were developed (Figure 1d).

Regardless of the concentration of BAP and AS on the induction medium, the average number of shoots and leaves differed significantly among the common bean cultivars evaluated. The higher multiple shoot formation was obtained using Brunca > Telire > Bribri > Guaymí > Huetar. Moreover, the higher average of leaves was obtained using Telire > Brunca > Guaymí > Bribri > Huetar. On the other hand, no significant differences were observed in the number of roots formed from embryogenic axes cultured on induction medium supplemented with different BAP and AS concentrations (Table 1). Independently of the cultivar, significant differences were observed in the number of roots formed among the treatments evaluated (Table 2). The higher number of roots per explant were obtained in the induction medium depleted of BAP and AS

(Figure 1e). It was observed that as the BAP and AS concentrations increased the number of roots per explant decreased (Table 2).

Moreover, regardless of the cultivar, the induction medium supplemented with 5 mg^l⁻¹ BAP and 20 and 40 mg^l⁻¹ AS resulted in the higher average of shoots (Table 2). On the other hand, the higher average of leaves per explant was obtained using 0 mg^l⁻¹ BAP combined with 0 and 40 mg^l⁻¹ AS or 5 mg^l⁻¹ BAP and 20 mg^l⁻¹ AS (Table 2).

Culture of Bribri, Brunca, Guaymí, Huetar and Telire embryogenic axes on induction medium supplemented with different BAP and AS, resulted in a differential response (Table 3). In all the cultivars evaluated, no organogenic bud clusters were induced using 0 mg^l⁻¹ BAP and 0 and 20 mg^l⁻¹ AS after 30 days of culture. Addition of 40 mg^l⁻¹ AS, combined with 0 mg^l⁻¹ BAP, improved multiple shoot bud formation in Bribri, Brunca, Huetar and Telire. In the Bribri and Brunca cultivars, the higher average of shoots were obtained using 5 mg^l⁻¹ BAP combined with 20 or 40 mg^l⁻¹ AS. For Guaymí and Huetar cultivars, no significant differences were observed among treatments, nevertheless, the best results were obtained using 0 mg^l⁻¹ BAP with 40 mg^l⁻¹ AS, 5 mg^l⁻¹ BAP with 20 and 40 mg^l⁻¹ AS or 10 mg^l⁻¹ BAP with 20 and 40 mg^l⁻¹ AS. In the Telire cultivar, the higher average of shoots were obtained using 5 mg^l⁻¹ BAP combined with 20 AS or 10 mg^l⁻¹ BAP with 40 mg^l⁻¹ AS (Table 3).

Common bean *in vitro* plant regeneration is limited by phenolic oxidation (Figure 1f). The higher average of phenolic oxidation was observed using Huetar (0.39±0.03), Brunca (0.25±0.03), Guaymí (0.17±0.02), Telire (0.13±0.02) and Bribri (0.11±0.02), regardless of the concentration of BAP and AS (Figure 3). On the other hand, independently of the cultivar, no phenolic oxidation was observed in the explants cultured on the induction medium depleted of BAP and AS. Whereas, the higher average of phenolic oxidation was obtained using the induction medium supplemented with 0 mg^l⁻¹ BAP and 40 mg^l⁻¹ AS, 5 mg^l⁻¹ BAP with 20 mg^l⁻¹ AS and 10 mg^l⁻¹ BAP and 0 and 20 mg^l⁻¹ AS (Table 2).

The shoots regenerated from the apical bud clusters (Figure 1d) developed into plants with leaves and roots (Figure 2a). The *in vitro* plants were successfully acclimated with 100% survival (Figure 2b). The entire procedure starting from apical bud cluster induction to establish a plant under greenhouse conditions took approximately 3 months.

DISCUSSION

In the present study an efficient and reproducible method for regeneration of commercial important Costa Rican common bean using BAP and AS was established. Many factors induce development of new structures via organogenesis but it has been demonstrated that regenerative capacity and response to growth conditions is species and genotype dependent as reported in *Helianthus annuus* (Deglene et al. 1997) and *Solanum melongena* L. (Sharma and Rajam 1997). Our results confirmed earlier observations that the genotype influences the regeneration process via organogenesis in bean (Santalla et al. 1998; Veltcheva et al. 2005; Delgado-Sanchez et al. 2006; Varisai Mohamed et al. 2006). The genotype effects suggest that genetic factors are important in the response to *in vitro* tissue culture (Santalla et al. 1998). In this sense, due to the reduced genetic variability in modern bean cultivars; the screening of a large number cultivars may be useful in the attempt to achieve plant regeneration (Svetleva et al. 2003; Veltcheva et al. 2005).

The composition of the shoot induction medium is important in the regeneration process through organogenesis since in this medium a higher number of buds and shoots are formed (Santalla et al. 1998). In this study, BAP and AS played an important role in the induction of organogenic structures in the Costa Rican bean cultivars evaluated. It is well known that cytokinins stimulate plant cell division and participate in the released of lateral bud dormancy, in the induction of adventitious bud formation, in the growth of lateral buds and in the cell cycle control (Gaspar et al. 1996; Gaspar et al 2003). Malik and Saxena (1991) reported that 5 μM BAP had a promotive effect on shoot formation from cultured leaf explants of *P. vulgaris* L. compare to the explants culture on MS medium depleted of BAP. Moreover, Varisai Mohamed et al. (2006) indicated that BAP and thidiazuron at 5 μM was the best concentration for shoot formation in *P. angularis* L. cvs. KS-6, KS-7 and KS-8. In the absence of BAP no shoot bud development was found in *P. angularis* L. (Varisai Mohamed et al. 2006). Delgado-Sanchez et al. (2006) observed that 22.2 or 44 μM BAP induced the formation of buds in two Mexican *P. vulgaris* cultivars. BAP has also been reported to be effective for shoot induction in *P. vulgaris* and *P. coccineus* (Malik and Saxena 1992; Santalla et al. 1998). The beneficial effects of BAP on adventitious shoot induction were also observed in other legumes such as *Vigna angularis* (Avenido and Hattori 2000) and *V. mungo* L. Hepper (Saini and Jaiwal 2002).

It has been demonstrated that adenine, adenosine and adelynic acid have cytokinin activity and they are added to the culture medium in order to improve growth or to reinforce response normally attributed to cytokinins action. In this sense, adenine stimulates somatic embryogenesis and caulogenesis, enhances the growth of isolated meristem tips, induces the proliferation of axillary shoots in shoot cultures and promotes adventitious shoot formation indirectly from calli or directly from explants (van Staden et al. 2008).

The benefits of adenine are often only noticed when it is administrated together with ammonium nitrate or with cytokinins such as BAP or kinetin (van Staden et al. 2008). Our results suggest that BAP in combination with AS benefit the process of organogenesis. Several explanations for this are possible. One possibility is that adenine acts as a precursor for the natural cytokinins synthesis or enhances natural cytokinins biosynthesis and that the compounds produced must be more effective in causing the physiological response than the cytokinins added to the culture medium. Another possibility is that adenine acts as a synergist of cytokinins such as kinetin and zeatin. The natural and synthetic purine cytokinins are degraded to adenine and related nucleotides; therefore, the addition of adenine to the medium may retard the degradation of cytokinins by feed-back inhibition or by competing for the enzyme systems involved in cytokinins metabolism (van Staden et al. 2008).

Adenine sulphate has been used for *in vitro* multiplication of *Carica papaya* L. (Rajeevan and Pandey 1983, Saha et al. 2004, Schmildt et al. 2007), *Musa* sp. (Menegucci et al. 1983 reviewed by Schmildt et al. 2007) and *Uraria picta* (Anand et al. 1998). Moreover, Nandagopal and Ranjitha Kumari (2006) used AS for shoot organogenesis induction in *Cychorium intybus* L. cv. Focus. Desphande et al. (1998) indicated that a low concentration of cytokinin in combination with AS favors multiple shoot induction in *Ficus religiosa* L. In black pepper (*Piper nigrum* L.), Philip et al. (1992) reported that AS increased the number of shoot buds per regenerating explant.

In contrast to our results, Delgado-Sanchez et al. (2006) reported that the application of AS at different concentrations did not produce a relevant increase bud cluster formation in two Mexican common bean cultivars. Probably differences in cultivars, physiological state of explant and month of explant collection may account for the results obtained in both studies.

On the other hand, higher concentration of cytokinin and AS generally inhibit or delay root formation (Doerschug and Miller 1967 review by van Staden et al. 2008; van Staden et al. 2008) as seen in the present study (Table 2). In this sense, Delgado-Sanchez et al. (2006) reported that low BAP concentration (0 and 0.1 mg l⁻¹) induced only root formation and stem elongation.

The browning of the explant and surrounding culture media limit the establishment of *in vitro* cultures in several species, especially woody plant species. Browning is caused by the oxidation of phenolic compounds, released from the cut ends of the explants, by polyphenoloxidases, peroxidases or air (Bhat and Chandel 1991; Laukkanen et al. 1999). In this sense, browning hampers the establishment of tissue culture in *Aloe* (Abrie and Staden 2001), *Dioscorea alata* L. (Bhat and Chandel 1991), *Musa* spp. (Titov et al. 2006) and *Pinus sylvestris* L. (Laukkanen et al. 1999). Moreover, some plant growth regulators such as BAP, kinetin, TDZ, IAA alone or in combination with 2,4-D were reported to increase browning in *Aloe* species (Natali et al. 1990; Mayer and van Staden 1991). Asahira and Nitsch (1969) reported that the addition of kinetin to the culture medium intensified the extend of browning in *D. batatas* and *D. japonica*. The application of BAP and kinetin enhanced biosynthesis of phenolic compounds in hairy roots of *Panax ginseng* C. A. Meyer. In contrast, the addition of auxins did not show an increase in the contents of total phenolic compounds in hairy roots of *P. ginseng* when no gibberellic acid or cytokinins were present (Jeong et al. 2007). Cytokinins are known to stimulate the synthesis of phenolic compounds (Bergmann et al. 1964 review by Asahira and Nitsch (1969). Schnablova et al. (2006) reported that transgenic tobacco overproducing endogenous cytokinins overaccumulates phenolic compounds during *in vitro* growth. Therefore, understanding the oxidation of phenols and how these can be minimized is critical for successful *in vitro* culture.

The *in vitro* protocol reported in this study could be used for clonal propagation of common bean and to obtain competent target tissue for genetic modification through biolistic, *Agrobacterium* or mutagenesis in order to generate plants resistant to diseases and pests or with improved nutritive quality.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to María Isabel Morales and Jorge Mora Urpí (School of Biology, UCR) for language correction of the manuscript. Moreover, thanks are given to Ivannia Chinchilla for technical assistance.

REFERENCES

- ABRIE, A.L.; van STRADEN, J. Micropropagation of the endangered *Aloe polyphylla*. *Plant Growth Regulation*, January 2001, vol 33, no. 1, p. 19-23.
- AHMED, E.; BISZTRAY, GY.D.; VELICH, I. Plant regeneration from seedling explants of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Acta Biologica Szegediensis*, 2002, vol. 46, no. 3-4, p. 27-28.
- ANAND A; SRINIVASA RAO C; LATHA R; JOSEKUTTY PC; BALAKRISHNA P: Micropropagation of *Uraria picta*, a medicinal plant, through axillary bud culture and callus regeneration. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, April 1998, vol. 34, no. 2, p. 136-140.
- ARAGÃO, E.J.L., BARRIS, L.M.G.; BRASILEIRO, A.C.M.; RIBEIRO, S.G.; SMITH, F.D.; SANFORD, J.C.; FARIA, J.C.; RECH, E.L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theoretical Applied Genetic*, January 1996, vol. 93, no. 1, p. 142-150.
- ASAHIRA, T.; NITSCH, J.P. Effect of polarity and kinetin on the browning reaction of *Dioscorea batatas* and *D. japonica*. *Planta*, September 1969, vol. 84, no. 3, p. 292-294.
- AVENIDO, RA; HATTORI, K. Benzyladenine-induced adventitious shoot regeneration from hypocotyls of adzukibean (*Vigna angularis*). *Plant Growth Regulation*, July 2000, vol. 31, no. 3, p. 147-153.
- BHAT, S.R.; CHANDEL, K.P.S. A novel technique to overcome browning in tissue culture. *Plant Cell Reports*, September 1991, vol. 10, no. 6-7, p. 358-361.
- DEGLENE, L.; LESIGNES, P.; ALIBERT G.; SARRAFI, A. Genetic control of organogenesis in cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, February 1997, vol. 48, no. 2, p. 127-130.

- DELGADO-SANCHEZ, P.; SAUCEDO-RUIZ, M.; GUZMÁN-MALDONADO, S.H.; VILLORDO-PINEDA, E.; GONZÁLEZ-CHAVIRA, M.; FRAIRE-VELÁZQUEZ, S.; ACOSTA-GALLEGOS, J.A.; MORA-AVILÉS, A. An organogenic plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science*, April 2006, vol. 170, no. 4, p. 822-827.
- DESHPANDE, SR; JOSEKUTTY, PC; PRATHAPASENAN, G. Plant regeneration from axillary buds of a mature tree of *Ficus religiosa*. *Plant Cell Reports*, April 1998, vol. 17, no. 6-7, p. 571-573.
- GASPAR, T.H.; KEVERS, C.; PENEL, C.; GREPPIN, H.; REID, D.M.; THORPE, TA. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, October 1996, vol. 32, no. 4, p. 272-289.
- GASPAR, T.H.; KEVERS, C.; FAIVRE-RAMPANT, O.; CREVECOEUR, M.; PENEL, CL; GREPPIN, H.; DOMMES, J. Changing concepts in plant hormone action. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, March 2003, vol. 39, no. 2, p. 85-106.
- JEONG, GT; WOO, JCH; PARK, DH. Effect of plant growth regulators on growth and biosynthesis of phenolic compounds in genetically transformed hairy roots of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2007, vol. 12, p. 86-91.
- LAUKKANEN, H.; HÄGGMAN, H.; KONTUNEN-SOPPELA, S.; HOHTOLA, A. Tissue browning of *in vitro* cultures of Scots pine: Role of peroxidase and polyphenol oxidase. *Physiologia Plantarum*, July 1999, vol. 106, no. 3, p. 337-343.
- MALIK, K.A.; SAXENA, P. Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L.: promotive role of N⁶-benzylaminopurine in cultures from juvenile leaves. *Planta*, April 1991, vol. 184, no. 1, p. 148-150.
- MALIK, K.A.; SAXENA, P. Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L.: high-frequency induction of direct shoot formation in intact seedlings by N⁶-benzylaminopurine and thidiazuron. *Planta*, February 1992, vol 186, no. 3, p. 384-389.

- MAYER H.J.; van STADEN J. Rapid *in vitro* propagation of *Aloe barbadensis* Mill. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, September 1991, vol. 26, no. 3, p. 167-171.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, July 1962, vol. 15, no. 3, p. 473-497.
- NANDAGOPAL, S; RANJITHA, KUMARI BD. Adenine sulphate induced high frequency shoot organogenesis and *in vitro* flowering of *Chichorium intybus* L. cv. Focus – a potent medicinal plant. *Acta Agriculturae Slovenica*, 2006, vol. 87, no. 2, p. 415-425.
- NATALI, L.; SANCHEZ, I.C.; CAVALLINI, A. *In vitro* culture of *Aloe bardadensis* Mill.; micropropagation from vegetative meristems. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, January 1990, vol. 20, no. 1, p. 71-74.
- PHILIP, VJ; JOSEPH, D; TRIGGS, GS; DICKINSON, NM. Micropropagation of black pepper (*Piper nigrum* Linn.) through shoot tip cultures. *Plant Cell Reports*, December 1992, vol. no. 12, p. 41-44.
- SAINI, R; JAIWAL PK. Age, position in mother seedling, orientation and polarity of the epicotyl segments of blackgram (*Vigno mungo* L. Hepper) determines its morphogenic response. *Plant Science*, July 2002, vol. 163, no. 1, p. 101-109.
- SAHA, M; PHATAK, A; CHANDRA, N. *In vitro* culture studies in four dioecious varieties of *Carica papaya* L. using axillary buds from field-grown plants. *Journal of Tissue Research*, 2004, vol. 4, p. 211-214.
- SANTALLA, M; POWER, JB; BAVEY, MR. Efficient *in vitro* shoot regeneration response of *Phaseolus vulgaris* and *P. coccineus*. *Euphytica*, July 1998, vol. 102, no. 1, p. 195-202.
- SCHMILDT, O; SCHMILDT, ER; AMARAL, JAT. Sulfato de adenina na multiplicação *in vitro* de mamoeiro “Tainung 01”. *Scientia Agraria*, 2007, vol. 8, no. 2, p. 141-147.

- SCHNABLOVÁ, R; SYNKOVÁB, H; VIČÁNKOVÁC, A; BURKETOVÁB, L; EDERC, J; CVIKROVÁ, M. Transgenic ipt tobacco overproducing cytokinins overaccumulates phenolic compounds during *in vitro* growth. *Plant Physiol. Biochemistry*, October 2006, vol. 44, no. 10, p. 526–534.
- SCHRYER, P.A.; LU, Q.; VANDERBERG, A.; BETT, K.E. Rapid regeneration of *Phaseolus angustissimus* and *P. vulgaris* from very young zygotic embryos. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, October 2005, vol. 83, no. 1, p. 67-74.
- SHARMA, P.; RAJAM, M.V. Genotype, explant and position effects on organogenesis and somatic embryogenesis in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Journal of Experimental Botany*, January 1995, vol. 46, no. 1, p. 135-141.
- SVETLEVA, D.; VELCHEVA, M.; BHOWMIK, G. Biotechnology as a useful tool in common bean (*Phaseolus vulgaris* L) improvement. *Euphytica*, May 2003, vol. 131, no. 2, p. 189-200.
- TITOV, S.; BHOWMIK, S.K.; MANDAL, A.; ALAM, MD. S., UDDIN, S.N. Control of phenolic compound secretion and effect of growth regulators for organ formation from *Musa* spp. cv. Kanthali floral bud explants. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 2006, vol. 2, no. 3, p. 97-104.
- VAN STADEN J; ZAZIMALOVA E; GEORGE E.F. Plant growth regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonist. In GEORGE EF, HALL M, DE KLECK GJ eds. *Plant Propagation by Tissue Culture. Vol 1. The Background*. 2008. Springer, The Netherlands, p. 205-226.
- VARISAI MOHAMED, S.; SUNG, J.M.; JENG, T.L.; WANG, CH.S. Organogenesis of *Phaseolus angularis* L.: high efficiency of adventitious shoot regeneration from etiolated seedlings in the presence of N6-benzylaminopurine and thidiazuron. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, August 2006, vol. 86, no.2, p. 187-199.
- VELTCHEVA, M.; SVETLEVA, D. *In vitro* regeneration of *Phaseolus vulgaris* L. via organogenesis from petiole explants. *Journal Central European Agriculture*, April 2005a, vol. 6, no. 1, p. 53-58.
- VELTCHEVA, M.; SVETLEVA, D.; PETKOVA, SP.; PERL, A. *In vitro* regeneration and genetic transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) - Problems and progress. *Scientia Horticulturae*, December 2005b, vol 107, no. 1, p. 2-10.

ZAMBRE, M.A.; DE CLERCQ, J.; VRANOVÁ, E.; VAN MONTAGU, M.;
ANGENON, G.; DILLEN, W. Plant regeneration from embryo-derived callus in
Phaseolus vulgaris L. (common bean) and *P. acutifolius* A. Gray (terapy bean).
Plant Cell Reports, May 1998, vol 17, no. 8, p. 626-630.

Table 1. Effect of genotype on the average number of shoots, leaves and roots induced from embryonic axes of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) regardless of the BAP and AS concentration.

Genotype	Shoots	Leaves	Roots
Bribri	0.24±0.04 b	0.29±0.03 b c	0.67±0.09 a
Brunca	0.57±0.06 a	0.42±0.05 b	0.80±0.09 a
Guaymí	0.06±0.01 c	0.34±0.04 b c	0.49±0.07 a
Huetar	0.02±0.01 c	0.21±0.03 c	0.80±0.12 a
Telire	0.38±0.04 b	0.96±0.08 a	0.81±0.09 a

Same letters within columns denote statistically equal means with the Tukey Unequal N HSD test ($P < 0.05$).

Table 2. Effect of BAP and AS concentration on phenolic oxidation and average number of shoots, roots and leaves induced from embryogenic axes of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) regardless of the genotype.

Treatments					
BAP (mg l ⁻¹)	AS (mg l ⁻¹)	Shoots	Leaves	Roots	Phenolic oxidation
0	0	0.00±0.00 d	0.89±0.05 a	3.53±0.18 a	0.00±0.00 e
0	20	0.00±0.00 d	0.34±0.04 d	1.85±0.16 b	0.19±0.03 c d
0	40	0.37±0.04 b c	0.81±0.07 a b	0.65±0.05 c	0.45±0.04 a
5	0	0.09±0.04 d	0.00±0.00 e	0.09±0.04 d	0.00±0.00 e
5	20	0.56±0.08 a b	0.70±0.13 a b c	0.01±0.01 d	0.31±0.04 b c
5	40	0.66±0.09 a	0.49±0.09 c d	0.00±0.00 d	0.05±0.02 d e
10	0	0.01±0.01 d	0.00±0.00 e	0.00±0.00 d	0.31±0.04 b c
10	20	0.20±0.06 c d	0.25±0.06 d e	0.31±0.08 c d	0.43±0.04 a b
10	40	0.40±0.05 b c	0.51±0.08 b c d	0.00±0.00 d	0.15±0.02 d

Same letters within columns denote statistically equal means with the Tukey Unequal N HSD test ($P < 0.05$).

Table 3. The effect of BAP and AS on the number of shoots induced from embryogenic axes of *Phaseolus vulgaris* L. after 30 days of culture on induction medium supplemented with different BAP and AS concentrations.

Treatments		Shoots ¹				
BAP (mg l ⁻¹)	AS (mg l ⁻¹)	Bribri	Brunca	Guaymí	Huetar	Telire
0	0	0±0 c	0±0 c	0±0 a	0±0 a	0±0 c
0	20	0±0 c	0±0 c	0±0 a	0±0 a	0±0 c
0	40	0.03±0.03 c	0.93±0.05 b	0±0 a	0.10±0.06 a	0.80±0.07 a b
5	0	0±0 c	0.47±0.18 b c	0±0 a	0±0 a	0±0 c
5	20	1.20±0.22 a	0.53±0.20 b	0.13±0.06 a	0±0 a	0.93±0.15 a
5	40	0.17±0.07 b c	2.43±0.17 a	0.17±0.07 a	0.07±0.05 a	0.45±0.11 a b c
10	0	0.07±0.07 b c	0±0 c	0±0 a	0±0 a	0±0 c
10	20	0.50±0.17 b	0±0 c	0.13±0.06 a	0±0 a	0.37±0.25 b c
10	40	0.20±0.07 b c	0.77±0.14 b	0.13±0.06 a	0±0 a	0.90±0.13 a

¹ Values represent the average shoot formation in three Petri dishes with 10 explants and three replicates.

Same letters within columns denote statistically equal means with the Tukey Unequal N HSD test ($P < 0.05$).

Legends to figures

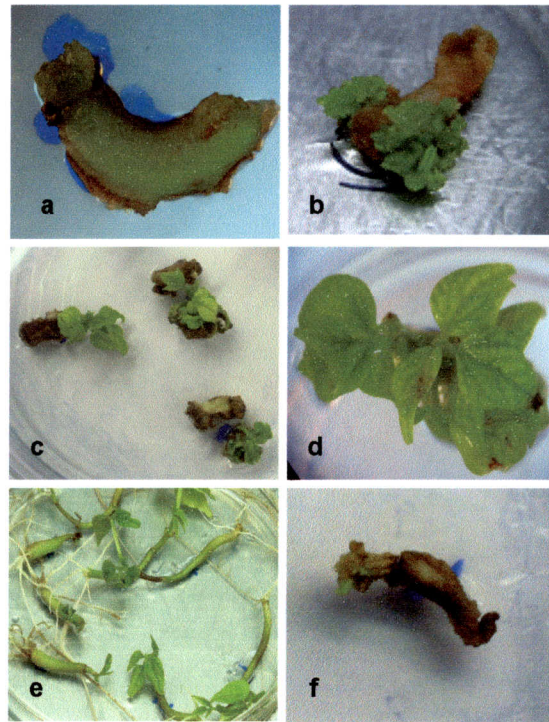


Figure 1. Apical bud cluster induction from embryogenic axes of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). (a) embryogenic axes cultured on induction medium supplemented with different concentrations of BAP and AS. (b) Bud clusters formed after 30 days in induction medium. (c) Bud cluster propagation. (d) Bean plant developed from bud clusters. (e) Roots. (f) Phenolic oxidation observed on embryogenic axes.

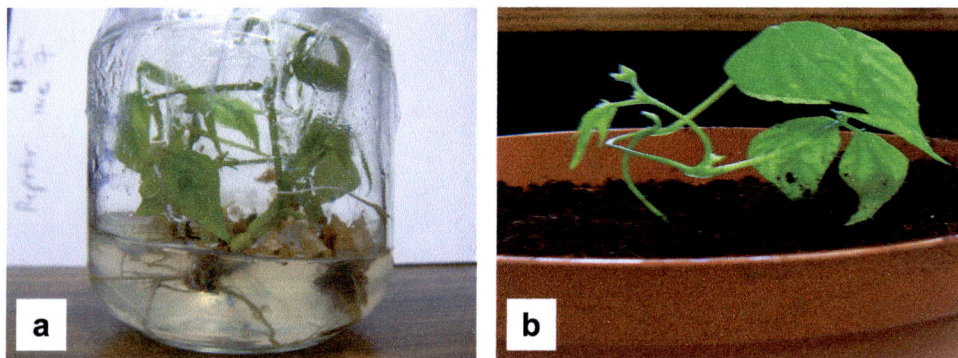


Figure. 2. (a) Bean plants regenerated from bud clusters after 60 days on induction medium. (b) Bean plants acclimated in the greenhouse.

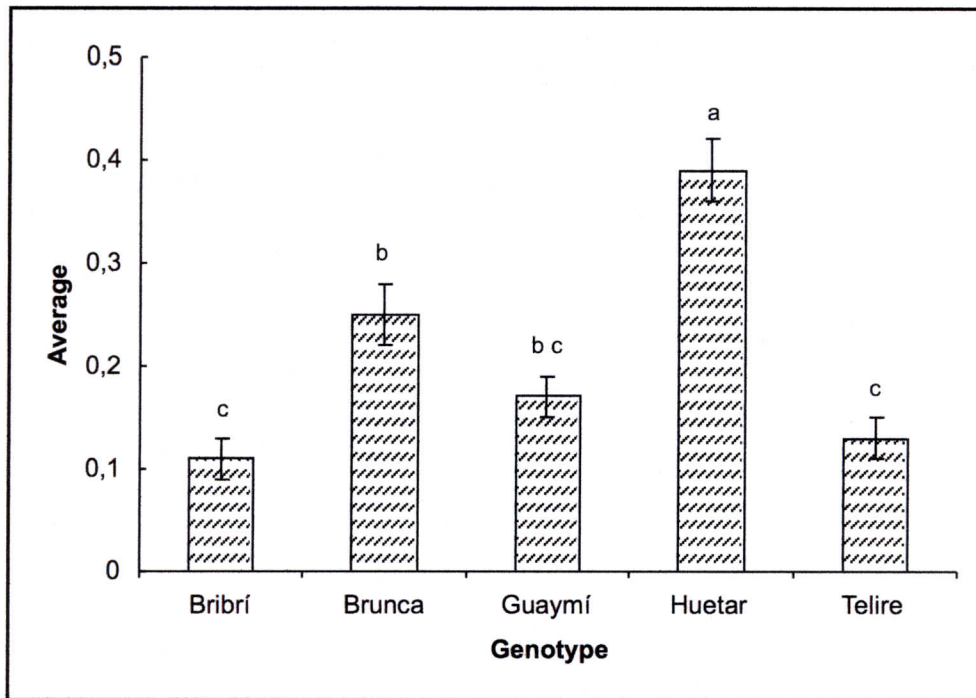


Figure 3. Effect of genotype on phenolic oxidation of embryogenic axes of common bean (*Phaseolus vulgaris* L. cvs. Bribri, Brunca, Guaymí, Huetar and Telire) regardless of the BAP and AS concentration. Mean±SE. Values within columns followed by the same letter are not significantly different with the Tukey Unequal N HSD test ($P < 0.05$).