



**UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
CARRERA DE AGROPECUARIA**

**COMPONENTE PRÁCTICO DEL EXAMEN DE CARÁCTER COMPLEXIVO**

**MODALIDAD: “REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA”**

**CULTIVO IN VITRO DE PLANTAS LEGUMINOSAS DE  
INTERÉS AGROPECUARIO: REVISIÓN DE LAS  
TÉCNICAS DE MICROPROPAGACIÓN**

Previo a la obtención del título de:

**INGENIERO AGROPECUARIO**

**Autor:** Valentín Josué Ávila Robinson

**LA LIBERTAD, 2025**



**UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
CARRERA DE AGROPECUARIA**

**COMPONENTE PRÁCTICO DEL EXAMEN DE CARÁCTER COMPLEXIVO**

**MODALIDAD: “REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA”**

**CULTIVO IN VITRO DE PLANTAS LEGUMINOSAS DE  
INTERÉS AGROPECUARIO: REVISIÓN DE LAS  
TÉCNICAS DE MICROPROPAGACIÓN**

Previo a la obtención del Título de:

**INGENIERO AGROPECUARIO**

**Autor:** Valentín Josué Ávila Robinson

**Tutor:** Blgo. Javier Soto Valenzuela, Ph.D.

## **TRIBUNAL DE GRADO**

Componente práctico de examen complejo presentado por **VALENTÍN JOSUÉ ÁVILA ROBINSON** como requisito parcial para la obtención del grado de Ingeniero Agropecuario de la Carrera de Agropecuaria.

Trabajo de Integración Curricular **APROBADO** el: 07/07/2025

---

Ing. Zoot. Verónica Andrade Yucailla,  
Ph.D.

**DIRECTORA DE CARRERA  
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

---

Ing. Agron. Nadia Quevedo Pinos, Ph.D.

**PROFESORA ESPECIALISTA  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

---

Blgo. Javier Soto Valenzuela, Ph.D.

**PROFESOR TUTOR  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

---

Ing. Agron. Nadia Quevedo Pinos, Ph.D.

**PROFESORA GUÍA DE LA UIC  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

---

Ing. Com. Washington Perero Vera,  
Mgtr.

**ASISTENTE ADMINISTRATIVO  
SECRETARIO**

## **DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD**

El presente Trabajo Práctico de Examen de Grado de carácter complejo Titulado “**CULTIVO IN VITRO DE PLANTAS LEGUMINOSAS DE INTERÉS AGROPECUARIO: REVISIÓN DE LAS TÉCNICAS DE MICROPROPAGACIÓN.**” y elaborado por **Valentín Josué Ávila Robinson**, declara que la concepción, análisis y resultados son originales y aportan a la actividad científica educativa agropecuaria.

### **Transferencia de derechos autorales.**

"El contenido del presente Trabajo de Graduación es de mi responsabilidad; el patrimonio intelectual del mismo pertenece a la Universidad Estatal Península de Santa Elena".

---

Firma del estudiante

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tesina a mis padres Valentín Ávila Villacís y Shirley Robinson Caballero, quienes, me dieron un apoyo incondicional, económico y sacrificios en cada paso de este camino académico, han sido mi pilar fundamental, me guiaron hasta aquí.

A mis hermanos Anthony Ávila, que me dio apoyo desde la parte económica y Valentina Ávila por acompañarme en este trayecto, esta tesina también es suya.

A mis amigos Steven Sojos, Richard Cobeña, Geancarlos Saltos y mi primo Juan Gavilanes, por su compañía y buen humor durante este largo recorrido.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres, Valentín Ávila Villacís y Shirley Robinson Caballero, por su amor incondicional, paciencia y aliento; sin su apoyo no habría sido posible completar esta tesina.

A mis hermanos Anthony Ávila Robinson y Valentina Ávila Robinson por brindarme su apoyo en todo momento.

A mis amigos Steven Sojos, Richard Cobeña, Geancarlos Saltos y mi primo Juan Gavilanes por estar siempre ahí con ánimo incondicional y comprensión.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi tutor de tesina, al Blgo. Javier Oswaldo Soto Valenzuela, por su orientación experta, paciencia y dedicación en cada fase de este proyecto.

## RESUMEN

El presente trabajo de revisión bibliográfica permitió describir los avances en la micropropagación de las leguminosas de interés agropecuario y el uso de técnicas de cultivo in vitro en su desarrollo vegetativo y de regeneración. Para lo cual se realizó una recopilación de la información científica de los últimos 30 años en bases indexadas como Web of Science (WOS), Scopus, Latindex, Scielo, Repositorios y Boletines. Se emplearon palabras claves de búsqueda, generando información científica condensada con los estudios encontrados. Aportando al estado actual las técnicas, condiciones, factores y variedades de cultivos in vitro de las leguminosas. No se encontraron gran variedad de leguminosas registradas en idiomas inglés, español u otro idioma. Cuyos medios de cultivo y técnicas con mayor preferencia son el MS, la embriogénesis y organogénesis, respectivamente.

**Palabras claves:** Embriogénesis, explante, medios de cultivo

## **ABSTRACT**

This literature review allowed us to describe the advances in the micropropagation of legumes of agricultural interest and the use of in vitro culture techniques in their vegetative and regenerative development. To this end, a compilation of scientific information from the last 30 years was carried out in indexed databases such as Web of Science (WOS), Scopus, Latindex, Scielo, Repositories and Bulletins. Search keywords were used, generating scientific information condensed with the studies found. Contributing to the current state the techniques, conditions, factors and varieties of in vitro cultures of legumes. No wide variety of legumes were found recorded in English, Spanish or any other language. Whose culture media and techniques with the greatest preference are MS, embryogenesis and organogenesis, respectively.

**Keywords:** Embryogenesis, Explant, Culture Medium

## ÍNDICE

<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>Problema:</b> .....	<b>3</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>3</b>
<b>Objetivo general:</b> .....	<b>3</b>
<b>Objetivos Específicos:</b> .....	<b>3</b>
<b>2 MÉTODOLÓGÍA</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1 Variables</b> .....	<b>4</b>
<b>2.2 Procedimiento</b> .....	<b>4</b>
<b>3 REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>5</b>
<b>3.1 Cultivo in vitro</b> .....	<b>5</b>
<b>3.2 Técnicas de cultivos in vitro</b> .....	<b>5</b>
3.2.1 Embriogénesis somática directa.....	6
3.2.2 Embriogénesis somática indirecta.....	6
3.2.3 Organogénesis directa.....	6
3.2.4 Organogénesis indirecta.....	6
3.2.5 Siembra de meristemos.....	7
<b>3.3 Condiciones de un cultivo in vitro</b> .....	<b>7</b>
3.3.1 Esterilización.....	7
3.3.2 Temperatura.....	8
3.3.3 Humedad Relativa.....	8
3.3.4 Ciclo De Luz.....	8
<b>3.4 Factores que afectan la propagación in vitro</b> .....	<b>8</b>
3.4.1 Medios.....	8
3.4.2 Tipo de explante.....	9
3.4.3 Genotipo.....	9
3.4.4 Fuente de explante .....	10
3.4.5 Orientación del explante .....	10
<b>3.5 Leguminosas</b> .....	<b>11</b>
3.5.1 Importancia .....	11
3.5.2 Características.....	12
<b>3.6 Micropropagación</b> .....	<b>12</b>
<b>3.7 Estudios de técnicas de micropropagación en leguminosas</b> .....	<b>13</b>
<b>4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>15</b>
<b>4.2 Bases de datos científicas sobre las técnicas de cultivo in vitro en leguminosas</b> .....	<b>16</b>
<b>4.3 Características técnicas del cultivo in vitro de plantas leguminosas</b> .....	<b>17</b>
<b>5 CONCLUSIONES</b> .....	<b>19</b>
<b>6 RECOMENDACIONES</b> .....	<b>20</b>
<b>7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>21</b>

## ÍNDICE DE TABLA

<b>Tabla 1.</b> Investigaciones en los últimos 30 años en micropropagación in vitro de leguminosas. ....	15
<b>Tabla 2.</b> Artículos científicos publicados acorde al cultivo, año y país. ....	17
<b>Tabla 3.</b> Descripción de las técnicas in vitro en leguminosas. ....	18

# 1 INTRODUCCIÓN

El uso de técnicas biotecnológicas como el cultivo *in vitro* de plantas puede revolucionar la agricultura al ofrecer una forma efectiva de mejorar la productividad, minimizar la incidencia de enfermedades y aumentar la existencia de plantas de alta calidad (Bhojwani y Dantu, 2013).

Aunque el cultivo *in vitro* ofrece privilegios representativos, su puesta en marcha es aún incipiente en la industria agrícola, lo que representa una pérdida para mejorar la efectividad y productividad (Torres y Santos-Ordóñez, 2020).

La micropropagación de plantas en la actualidad cuenta con un gran potencial productivo; siendo aprovechada en laboratorios comerciales y de investigación, principalmente para la propagación de plantas ornamentales, de importancia agroalimentaria y forestal. En las etapas de la micropropagación pueden acontecer enigmas asociados con la polución y dilemas vinculados con el apilamiento de etileno en los envases de cultivo (Aragón *et al.*, 2014; Bello-Bello *et al.*, 2021).

La regeneración *in vitro* en leguminosas es un paso precedente irremplazable para la alteración genética ya que implica la incitación y desarrollo de una planta completa. La regeneración de tejido cultivado a partir de frijoles ha tenido cierto éxito en los últimos años, al lograr regenerar plántulas completas. No obstante, los efectos del genotipo en las capacidades regenerativas, así como la efectividad y replicabilidad han sido principalmente los limitantes en la regeneración de leguminosas.

Por otra parte, las leguminosas para la nutrición animal se dividen en forrajeras y grano. Las forrajeras, como la alfalfa y los tréboles, se usan especialmente en rumiantes. Las leguminosas-grano, como haba, guisante y altramuza, son sustanciales para aves y cerdos, con 25-45% de proteína y alto contenido de carbohidratos; su importancia ha crecido en Europa tras la privación de harinas animales. Las leguminosas son clave para una agricultura sostenible, a pesar de que su uso en la alimentación animal está incrementando, aún no se aprovecha completamente su potencial nutricional. Por ello, un reto científico actual en el campo de la producción animal es distinguir los factores que limitan la eficiencia nutricional de las dietas que incorporan leguminosas-grano (Voisin *et al.*, 2013).

Las semillas de las leguminosas son empleadas tanto para alimentación animal como humana. Su bajo contenido en lípidos y fibra dietética los transforma en una gran fuente de proteínas. Su idoneidad para familiarizarse a condiciones climáticas y de suelo perjudicial y su relación simbiótica con diferentes bacterias de las raíces lo convierten en un activo valioso en la rotación de cultivos y la fijación de nitrógeno.

El valor nutricional de las legumbres ha sido muy empleado para grandes grupos de la población. En los países en desarrollo, singularmente entre los grupos de población más pobres, las legumbres son la principal fuente de proteínas y energía, mientras que su consumo ha aumentado en los países desarrollados en virtud a la aminoración del consumo de proteína animal (FAO, 2005).

Sin embargo, existen escasas revisiones publicadas que recopilen el conjunto de técnicas de cultivo in vitro empleadas para la propagación de especies de leguminosas de interés agropecuario. Por lo cual, este trabajo cobra importancia debido a que recopila las técnicas de cultivo in vitro empleadas para propagar material genético, técnicas aplicadas, en esterilización, los medios de cultivo empleados, las condiciones ambientales del cultivo, los reguladores de crecimiento agregados, entre otros aspectos de interés científico que permitan mejorar y elevar su producción.

**Problema:**

¿Existe información técnica actualizada sobre los avances de la micropropagación in vitro de plantas leguminosas de interés agropecuario en los últimos 30 años?

**Objetivos*****Objetivo general:***

Describir los avances en la micropropagación de las leguminosas de interés agropecuario y el uso de técnicas de cultivo in vitro en su desarrollo vegetativo y regeneración.

***Objetivos Específicos:***

1. Revisar la información publicada en las principales bases de datos científicas sobre las técnicas de cultivo in vitro empleadas en las leguminosas mencionadas y evaluar la distribución de las publicaciones en el tiempo, y por países.
2. Sintetizar los aspectos más importantes del cultivo in vitro (condiciones ambientales del cultivo, técnicas exploradas, medios de cultivo, reguladores del crecimiento, y suplementos empleados) en base a los resultados obtenidos en la búsqueda bibliográfica.

## **2 MÉTODOLÓGÍA**

Se realizó una revisión bibliográfica a partir de la búsqueda en bases indexadas como Web of Science (WOS), Scopus, Latindex, Scielo y también se incluirán artículos originales publicados en revistas científicas durante los últimos 30 años sobre investigaciones relacionadas con el cultivo in vitro y técnicas de micropropagación de alguna especie de leguminosas de interés agropecuario. Se incluirán artículos cuyo objetivo principal no sólo sea el cultivo in vitro de leguminosas, sino también en alguna de las fases o experimentos que el estudio incluya alguna de estas técnicas. Se implementó búsquedas de artículos en inglés, español y otros idiomas que puedan contribuir con este conocimiento.

También se incluyó el empleo de ecuaciones de búsqueda (como and y or, el primero para encontrar registros que incluyeran ambos términos conectados por este operador. “or” se empleó para encontrar publicaciones que contuvieran cualquier de los términos separados por este operador) y aplicando criterios de inclusión y exclusión.

### **2.1 Variables**

Se consideraron como variables al año de publicación, tipo de publicación, país, especies vegetales y autores para conocer el estado actual de las técnicas de micropropagación de plantas leguminosas.

### **2.2 Procedimiento**

Una vez localizados los documentos científicos disponibles en las bases de datos sobre el uso de técnicas de micropropagación de leguminosas, se elaboraron tablas y gráficos para inferir el estado actual de la aplicación de las técnicas de micropropagación en los últimos 30 años.

### **3 REVISIÓN DE LITERATURA**

#### **3.1 Cultivo in vitro**

La cultura in vitro, según Pierik, (1988) es un proceso de biotecnología que radica en el cultivo de células, órganos o tejidos de plantas en un medio acuoso ficticio conservados en perfectas condiciones en cuanto a constitución y condensación de sustancias químicas para proveer la mejor nutrición de las células.

A través de la propagación in vitro, es viable estimar múltiples propiedades biológicas de las plantas en desarrollo, propias de cada especie. El laboratorio promete un ambiente verificado donde se pueden memorizar factores como la aclimatación, la velocidad de crecimiento, la factibilidad celular y el poder regenerativo.

Un cultivo vegetal in vitro puede entenderse como la extracción de un tejido u órgano de la planta, el cual se ubica en un medio nutritivo adecuado y bajo condiciones controladas, aprovechando su consistencia fenotípica y la capacidad totipotencial de sus células para asistir su progresión y desarrollo (Edirisinghage, 2015).

En la provincia de Santa Elena es escaso el progreso del cultivo in vitro, no hay bases para la micropropagación vegetal de legumbres. Con la ayuda de la propagación in vitro se maneja el concepto de preservación de especies y la probabilidad de producir recientes materiales genéticos con resistencias a enfermedades y plagas (Santana, 2019).

#### **3.2 Técnicas de cultivos in vitro**

En el cultivo in vitro de plantas existen distintos métodos que favorecen la propagación de un explante, aunque el resultado final dependerá en gran medida de la especie vegetal y de su forma y disposición particular.

En el ámbito de la investigación, los cultivos vegetales son particularmente útiles porque autorizan mantener bajo control las condiciones necesarias para el desarrollo de las plantas. Esto se ha demostrado en estudios recientes con cultivos de células vegetales en interrupción de tipo fotoautotrófico (Gomez-Torres *et al.*, 2014). Además de graduar variables como la temperatura, es posible estimar el ritmo de crecimiento de las plantas, condicionado por ciertas hormonas específicas que amparan su desarrollo in vitro.

Es posible también determinar otras variables significativas, como la factibilidad de los explantes y el nivel de estrés al que pueden estar comprometidos, esto a través del manejo de la proporción de luz que admiten. Estas herramientas le proporcionan al investigador la probabilidad de acoplar directamente las condiciones imprescindibles según las necesidades peculiares del experimento o del estado que se requiere alcanzar en la planta. Actualmente se examina seis técnicas principales de cultivo vegetal, entre las que se incluyen:

### **3.2.1 Embriogénesis somática directa**

Fernández Da Silva y Montilla (2023) manifiestan que este método de propagación tiene como finalidad crear un nuevo organismo a partir de un embrión vegetal, el cual puede obtenerse de cualquier semilla dicotiledónea. La embriogénesis directa busca estimular la multiplicación de las células madre presentes en el embrión, favoreciendo así su desarrollo.

### **3.2.2 Embriogénesis somática indirecta**

En esta forma de propagación in vitro, lo usual es utilizar semillas aptas de dar origen a un nuevo individuo. El objetivo es asistir el desarrollo tanto del embrión como de la semilla mediante el uso de ciertos reguladores de crecimiento. Esta técnica ha revelado buenos resultados en algunos explantes correspondiente al género *Saccharum* spp. (Castañeda-Castro *et al.*, 2014).

### **3.2.3 Organogénesis directa**

Este método se basa en producir un nuevo individuo a partir de la siembra de un órgano vegetal, el cual puede predisponer de un brote, una hoja o incluso una raíz, siempre que presente consistencia en sus características fenotípicas. En investigaciones con la especie *Jatropha curcas* L., se ha constatado la eficiencia de esta técnica para la propagación (Pequeño-Granado *et al.*, 2015).

### **3.2.4 Organogénesis indirecta**

Hernández-Meneses *et al.* (2013) plantean que el procedimiento se basa en la siembra de un tejido vegetal capaz de impulsar la formación de células meristemáticas. El objetivo principal es aumentar el número de células vegetales en el medio, accediendo que estas generen un nuevo órgano vegetal que continúe con el desarrollo. Esta técnica ha sido utilizada con éxito para aumentar ciertos tejidos de *Heliconia collinsiana* GRIGGS.

### **3.2.5 Siembra de meristemos**

Esta es considerada la técnica más efectiva de propagación vegetal *in vitro*, ya que no requiere esterilización que ponga en peligro al explante. En este caso, se siembra directamente la célula meristemática en el medio de cultivo. La dificultad de este proceso depende del método empleado para extirpar el meristemo, ya que es la parte crucial para que el proceso sea exitoso.

Al ser una técnica que trabaja directamente con células vegetales altamente totipotenciales, no es necesario realizar ningún procedimiento de esterilización, ya que estas células están completamente aisladas y, por lo tanto, libres de agentes patógenos que podrían obstaculizar con la siembra.

El uso de esta técnica ha sido aceptado en cultivos de piña debido a su alta calidad y eficiencia, exclusivamente considerando la morfología de esta planta (Villalobos Olivera *et al.*, 2016). Este método ofrece diversas superioridades para la conservación y preservación de especies vegetales (Morales y Macgayver, 2015).

## **3.3 Condiciones de un cultivo *in vitro***

El explante (ya sea un tejido u órgano vegetal) requerirá una sucesión de condiciones específicas durante el curso de siembra para su adecuado desarrollo. Cada una de estas condiciones permitirá el crecimiento impecable de los cultivos, considerando que las plantas se cultivarán en un ambiente diferente al que habitualmente experimentarían (Gago *et al.*, 2014). Entre estas condiciones se incluyen:

### **3.3.1 Esterilización**

El cultivo *in vitro* de especies vegetales debe sostenerse en condiciones de máxima esterilización, afirmando que esté libre de agentes patógenos. Las condiciones deben ser ideales para evitar la contaminación de los cultivos, por lo que es fundamental realizar una limpieza absoluta en el laboratorio y un seguimiento constante del ambiente. Esto incluye medir la cantidad de UFCs (unidades formadoras de colonias) bacterianas y fúngicas concurrentes en las distintas áreas.

Estudios han desarrollado modelos que posibilitan una desinfección apropiada de las plantas antes de su propagación, como lo indica el proceso de estandarización de protocolos de desinfección para la especie *Aspidosperma polynerum* (García *et al.*, 2015).

### **3.3.2 Temperatura**

La temperatura inmejorable para el incremento de los cultivos vegetales suele estar entre los 25 y 30°C, un rango ideal para asistir el desarrollo de estos tejidos. Así lo han demostrado estudios en los que se cultivaron especies como *Populus tremula* y *Swietenia macrophylla*, debido a las exigencias específicas de estas plantas (Hermoso *et al.*, 2013; Arevalo, 2014).

### **3.3.3 Humedad Relativa**

Los cultivos vegetales in vitro necesitan una humedad relativa que oscile entre el 50% y el 80% en relación con el ambiente, para favorecer su desarrollo. Dependiendo de las características específicas de cada planta, esta humedad puede variar. Por ejemplo, algunos estudios indican que la albahaca necesita una humedad relativa entre el 70% y el 80% (Osorio y Villafuerte, 2017), mientras que, para otros cultivos, como el café, se recomienda una humedad entre el 50% y el 60% (Acosta, 2015).

### **3.3.4 Ciclo De Luz**

Por lo general, las plántulas cultivadas in vitro deben nutrirse durante 18 horas bajo un ciclo de luz insistente, seguidas de 6 horas de oscuridad, para que puedan realizar la permutación de luz necesario para su crecimiento. En el caso del cultivo de albahaca, se pH utiliza un fotoperíodo semejante al mencionado anteriormente, que también es el beneficiado por la Organización de las Naciones Unidas (Osorio y Villafuerte, 2017).

## **3.4 Factores que afectan la propagación in vitro**

### **3.4.1 Medios**

El tipo de medio empleado en el cultivo in vitro ha presentado un efecto considerable en la capacidad regenerativa de distintos órganos vegetales. Se han determinado diversos medios básicos como los formulados por White, Nitsch y Nitsch, B5 y Gamborg en procedimientos de micropropagación (Khan *et al.*, 1988). El medio más considerablemente adoptado es el Murashige and Skoog, (1962), ya que su conceptualización compensa los

nutrientes fundamentales necesarios para un crecimiento eficiente in vitro. La oportuna selección del tipo y concentración del medio, así como su planteamiento, conforma un aspecto crítico para la mejora de protocolos de regeneración vegetal (Khan *et al.*, 1988; Zuker *et al.*, 1997).

#### **3.4.2 Tipo de explante**

El tipo de explante constituye un factor decisivo en la mejora de protocolos para el cultivo de tejidos. Variadas estructuras vegetales como hojas, pecíolos, hojas cotiledonares, hipocótilos, epicótilos, embriones, entrenudos y raíces han declarado tener un impacto representativo en los resultados del cultivo in vitro vegetal (Khan *et al.*, 1988; Sujatha y Mukta, 1996; Tyagi *et al.*, 2001; Gubiš *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2011). Esta variabilidad puede expresarse por las distintas concentraciones de fitohormonas endógenas que existen en cada tejido.

Entre diferentes tipos de explantes, la hoja ha sido uno de los más empleados en procesos de regeneración, principalmente por su extensa superficie (Sujatha y Mukta, 1996; Tyagi *et al.*, 2001). En *Cajanus cajan*, Tyagi *et al.* (2001) trabajaron con explantes de raíz, brote y hoja; y obtuvieron la mayor tasa de regeneración en los explantes foliares. De manera similar, Sujatha y Mukta, (1996) calcularon hojas, pecíolos e hipocótilos en *Jatropha curcas*, resaltando también a la hoja como el explante más eficiente.

Se ha contemplado que el mejor tipo de explante varía según la especie (Shilpha *et al.*, 2014), al desempeñarse con *Solanum trilobatum*, identificaron al tallo como el tejido con mayor capacidad regenerativa. Gubiš *et al.* (2003) comprobaron distintos tejidos como hipocótilos, epicótilos, cotiledones, hojas, pecíolos y entrenudos en tomate, analizando que el hipocótilo generó la mejor respuesta.

Estos ejemplos reflejan cómo el tipo de explante influye determinadamente en la efectividad del cultivo de tejidos, dependiendo de la especie y de las condiciones hormonales internas de cada órgano vegetal.

#### **3.4.3 Genotipo**

El genotipo representa un elemento clave en la capacidad regenerativa de las plantas, influyendo de manera elocuente en los resultados de los procesos de regeneración in vitro

(Tyagi et al., 2001; Gubiš et al., 2003; Feyissa et al., 2005; Chitra y Padmaja, 2005; Landi y Mezzetti, 2006). Diferentes estudios han acreditado cómo la respuesta regenerativa y la elongación de los brotes pueden variar notablemente entre genotipos, posiblemente como resultado de diferencias en la acumulación de fitohormonas internas, especialmente las citoquininas, durante las fases iniciales del cultivo.

Aunque el proceso exacto de esta versatilidad aún no se comprende plenamente, se ha recomendado que las disimilitudes en la regeneración podrían estar asociadas con características genéticas tanto cuantitativas como cualitativas (Pellegrineschi, 1997; Schween y Schwenkel, 2003; Henry *et al.*, 1994).

#### **3.4.4 Fuente de explante**

Esta alteración en la capacidad regenerativa ha sido reportada en la literatura (Feyissa *et al.*, 2005), puede estar relacionada con los niveles de fitohormonas endógenas que posponen según el origen del tejido vegetal.

Los explantes tomados de plántulas jóvenes suelen tener un aspecto fisiológico más beneficiosos para la regeneración, dado su mayor grado de meristemática y receptividad hormonal, en comparación con los tejidos de plantas adultas (Teng, 1999; Feyissa *et al.*, 2005). Un ejemplo de esta distinción en la suficiencia regenerativa según la fuente del explante se ha documentado en *Jatropha curcas*.

#### **3.4.5 Orientación del explante**

La forma que se sitúa el explante sobre el medio de cultivo puede actuar notablemente en la eficacia de la regeneración (Arockiasamy et al., 2002). La mayoría de los acontecimientos, los explantes dispuestos de forma horizontal exponen mejores resultados en equiparación con aquellos situados verticalmente, lo cual podría aplicarse a una mayor fricción con el medio nutritivo en la posición horizontal. La orientación no solo afecta el punto de inicio del crecimiento, sino también la polaridad del tejido y la aptitud para formar brotes, como ha sido demostrado en *Dionaea muscipula* (Teng, 1999).

En estudios realizados con cotiledones, se contempló que aquellos situados con la cara abaxial (inferior) en contacto con el medio exhibieron una mayor tasa de regeneración y un número superior de brotes, además de un desarrollo más vigoroso, en comparación con

los resolutivos con la superficie adaxial (superior) hacia abajo (Bhatia *et al.*, 2004, Bhatia *et al.*, 2005).

### **3.5 Leguminosas**

De acuerdo con García *et al.* (2009), las leguminosas plasman una fuente crucial de nutrientes en las dietas, especialmente en regiones donde la entrada de proteínas animales es limitado. Pocas las poblaciones humanas que no añaden leguminosas en su alimentación.

Las legumbres producen uno a doce granos o semillas, varían en forma, color y tamaño, dentro de una vaina. Se refieren a cultivos destinados a la cosecha de grano seco, a diferencia de cultivos verdes como las hortalizas. Los cultivos más consumidos se incluyen lentejas, porotos, arvejas y garbanzos, son fundamentales para una alimentación saludable y mesurada.

#### **3.5.1 Importancia**

Importante resaltar que las legumbres están libres de gluten Guerrero y Durán-Agüero (2020), que permite su incorporación en dietas predestinadas a individuos con enfermedad celíaca. Su costo es más bajo en semejanza con otras fuentes de proteína, lo cual permite su presencia en la alimentación diaria de la población.

La paulatina demanda de forrajes leguminosos de alta calidad, para producción de semillas y alimentación en sistemas ganaderos intensivos, ha incitado la urgencia de métodos efectivos de propagación. Estas especies manifiestan reproducción cruzada, los perfeccionistas requieren tácticas que permitan resguardar características codiciables sin perder uniformidad. Como una alternativa efectiva surge el cultivo de tejidos, ya que permite la multiplicación activa de plantas selectas en condiciones controladas, evitando variabilidad genética y utilizando espacios reducidos (Loberant y Altman, 2010).

Las leguminosas tienen la característica de fijar el nitrógeno, ya que pueden alentar la fertilidad del suelo y tener efectos beneficiosos sobre el medio ambiente.

Según Murillo (2023) las leguminosas simbolizan un recurso importante hacia los campesinos, que accede minimizar el empleo de fertilizantes compuestos, ya que son propensos a tener un alto costo.

### **3.5.2 Características**

Las legumbres son alimentos de origen vegetal que, desde el punto de contemplación nutricional, una fuente importante de proteínas, carbohidratos, fibra dietética y minerales.

Aunque la calidad proteica de las legumbres es buena, no es apto debido a la existencia de un aminoácido limitante: la metionina. Se recomienda aprovecharlas junto con un cereal, el cual, aunque menos aún tiene una alta calidad proteica, es rico en metionina y bajo en lisina. Esta composición incrementa el perfil aminoacídico, la calidad proteica, alcanzando niveles similares a la proteína animal. Esta táctica se conoce como complementación aminoacídica (FAO, 2016).

Una superioridad nutricional adicional de las legumbres es su bajo indicio glicémico, por debajo de 49, aunque abarcan una cantidad notable de carbohidratos, su absorbencia es lenta, lo que la transforma en un alimento beneficiado para personas con variaciones en el metabolismo de los carbohidratos como oposición a la insulina, intolerancia a la glucosa o diabetes tipo 2.

Las leguminosas también se califican por su alto mesurado de minerales, insertando hierro, zinc, cobre y magnesio, así su contribución de vitaminas del complejo (B, B1, B2, B3 y B6), ácido fólico y vitamina C.

### **3.6 Micropropagación**

Es un procedimiento asexual o clonación de vegetales que se apoya en técnicas in vitro, denominadas cultivo de tejidos vegetales (CTV). Estas estrategias propias de biotecnología vegetal simplifican la preservación, manipulación, minuciosidad y aumento de especies vegetales en ámbitos ficticios, vigilados y libres de agentes contaminantes (Ramírez-Mosqueda *et al.*, 2020).

También destacada como propagación clonal, colabora a conseguir plantas genéticamente similares por medio del uso de sus hipocótilos, cotiledones, hojas, yemas, ápices, segmento de tallo o meristemos, preservando las particularidades de la planta madre, sembradas en entornos controlados (estériles) con la ocupación de medios de cultivo que engloba carbono, nitrógeno, sales inorgánicas, reguladores de crecimiento, vitaminas y aminoácidos, desarrollando elementos libres de hongos y bacterias (Montoya, 2021).

### 3.7 Estudios de técnicas de micropropagación en leguminosas

Según Markin *et al.* (2023) diseñaron un protocolo eficiente para reproducir explantes de punta de brote y nodo cotiledonario de seis accesiones de caupí y emplearon medios base Murashige & Skoog (MS) complementando con extracto de plátano, agua de coco, jugo de naranja o tomate. Descubrieron que (AGRAC 216, TA y Asontem) es la mejor solución, siendo las más satisfactoriamente propagadas a partir de extractos de plantas.

Haliloğlu *et al.* (2023) en su investigación de caupí, calcularon el impacto de las hormonas sexuales provenientes de mamíferos, así como centralización de estas, el tipo de explante y sus relaciones fueron estadísticamente significativos ( $p \leq 0.01$ ) en cada uno de los parámetros analizados.

En la investigación de Barreto *et al.* (2019) tuvieron como objetivo identificar y analizar el perfil de expresión de los genes de la subfamilia AFL durante la inducción in vitro de la embriogénesis somática en la leguminosa modelo *Medicago*, utilizando genotipos casi isogénicos contrastando por su capacidad de regeneración in vitro y manifestaron la conservación evolutiva de esta vía de desarrollo entre los linajes *Arabidopsis* y *Medicago* y abre vías para mejorar la eficiencia de la embriogénesis in vitro en cultivos de leguminosas.

Según Morales-Domínguez *et al.* (2019) en su estudio realizado recolectaron semillas de árboles de *A. farnesiana* y *P. laevigata*, utilizaron ganglios cotiledoniosos como explantes y se cultivaron en medio MS suplementado con diferentes concentraciones y combinaciones de PGR y resaltó que el mejor tratamiento fue la MS con 17,12  $\mu\text{M}$  de IAA en ambos casos.

Szyp-Borowska *et al.* (2016) en su trabajo planteó la posibilidad de un rápido aumento de la progenie vegetativa mediante organogénesis y mencionó que pueden ocurrir variaciones en la cadena de ADN en plantas micropropagadas.

Singh *et al.* (2019) mencionan que los estudios moleculares realizados sobre *Cicer microphyllum* confirman que este CWR es un repositorio natural de genes relacionados a la resistencia al estrés abiótico. La existencia de germoplasma es una incitación para satisfacer la exigencia de utilización sostenible de esta especie para la investigación rutinaria. Por lo tanto, informamos sobre la conservación in vitro del germoplasma de este CWR y las

respuestas fisiológicas a las condiciones de estrés por frío y sequía para garantizar la disponibilidad a largo plazo del germoplasma para que los investigadores lo exploren y utilicen para el desarrollo de cultivos transgénicos.

Tan *et al.* (2018) recalcan que su objetivo es establecer un sistema de regeneración y manipulación genética y complementó que se utilizaron explantes de nodales in vitro y el medio de planta leñosa donde manifiesta que se logró un protocolo exitoso de regeneración vegetal de *P. pinnata* para su potencial aplicación.

Dolce *et al.* (2018) en su estudio realizado explicaron que mediante organogénesis de brotes y la embriogénesis somática con la ayuda de explantes criopreservados en MS hubo éxito recuperación de la planta entera y comprobaron que las plantas renovadas a partir de hojas reducidas a criopreservación sostenían una consistencia genética.

La investigación de D’Cunha y Sridhar. (2011) se observó que el incremento en la concentración hormonal amplió la incitación de gemas en los brotes, elevando entre el 7% y el 27%. Se ubicaron hipocótilos cambiados en un medio que incluía BAP de 2iP, surgieron brotes densos en un intervalo de cuatro semanas.

En esta investigación hay la intención de implantar un protocolo eficiente para la regeneración vegetal, se emplearon tres acciones de *Arachis villosa* Benth; S2866, S2867 y L97, instruido en medio de MS, solo la L97 fue la que manifestó suficiencia para distinguir yemas por medio de organogénesis indirecta (Fontana *et al.*, 2009).

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Estado de las investigaciones en los últimos 30 años

En las bases de datos investigadas se obtuvieron 33 documentos científicos pertenecientes a Scopus, siendo la base más utilizada, seguida de Latindex con 6, en WOS 5, en Scielo 4, boletines pertenecientes a la FAO 2; y, 4 trabajos de titulación obtenidos de bases de repositorios universitarios, 3 de la Universidad Estatal Península de Santa Elena (UPSE) y 1 de la Universidad Estatal de Guayaquil (UG), mostrados en la Tabla 1.

Varios investigadores como Loberant y Altman (2010) mencionan que, la multiplicación *in vitro* es una estrategia efectiva, que evita la variabilidad genética en espacios reducidos de cultivos vegetales de importancia agrícola. Estas estrategias permitirían simplificar la preservación, manipulación y producción masiva de especies vegetales generadas por la biotecnología vegetal (Ramírez-Mosqueda *et al.*, 2020).

**Tabla 1.** Investigaciones en los últimos 30 años en micropropagación *in vitro* de leguminosas.

Scopus	Latindex	WOS	Scielo	Boletines	Repositorios
Ali y Mirza <i>s.f.</i>	Arevalo (2014)	Guerrero <i>et al.</i> (2020)	García <i>et al.</i> (2015)	FAO (2005)	Acosta (2015)
Aragón <i>et al.</i> (2014)	Castañeda-Castro <i>et al.</i> (2014)	Hermoso <i>et al.</i> (2013)	García <i>et al.</i> (2009)	FAO (2016)	Montoya (2021)
Arockiasamy <i>et al.</i> (2002)	Edirisinghage (2015)	Loberant y Altman (2010)	Pequeño-Granado <i>et al.</i> (2015)		Murillo (2023)
Barreto <i>et al.</i> (2019)	Fernández Da Silva y Montilla (2023)	Morales-Domínguez <i>et al.</i> (2019)	Villalobos <i>et al.</i> (2016)		Santana (2019)
Bello-Bello. <i>et al.</i> (2021)	Morales y Macgayver (2015)	Voisin <i>et al.</i> (2013)			
Bhatia <i>et al.</i> (2004)	Osorio y Villafuerte (2017)				
Bhatia <i>et al.</i> (2005)					
Bhojwani y Dantu (2013)					
Chitra y Padmaja (2005)					
D’Cunha y Sridhar (2011)					
Dolce <i>et al.</i> (2018)					
Feyissa <i>et al.</i> (2005)					

Gago, J. *et al.*  
(2014)  
Gomez-Torres *et al.*  
(2014)  
Gubiš *et al.* (2003)  
  
Haliloğlu *et al.*  
(2023)  
Hernández-  
Meneses *et al.*  
(2013)  
Kumar *et al.* (2011)  
  
Landi y Mezzetti  
(2006)  
Fontana *et al.*  
(2009)  
Markin *et al.* (2023)  
  
Pellegrineschi  
(1997)  
Ramírez-Mosqueda  
*et al.* (2020)  
Schween y  
Schwenkel (2003)  
Shilpha *et al.*  
(2014)  
Singh *et al.* (2019)  
  
Sujatha y Mukta  
(1996)  
Szyp-Borowska *et*  
*al.* (2016)  
Tan *et al.* (2018)  
  
Teng (1999)  
  
Torres y Santos-  
Ordóñez (2020)  
  
Tyagi *et al.* (2001)  
  
Zuker *et al.* (1997)

---

#### **4.2 Bases de datos científicas sobre las técnicas de cultivo in vitro en leguminosas**

En cuanto a la propagación in vitro de las leguminosas, este trabajo encontró que, 3 tipos son consideradas comestibles, 4 establecidas como forrajeras y 4 forestales (Tabla 2).

El valor nutricional de las legumbres ha sido muy empleado para grandes grupos de la población, en los países en vías de desarrollo, con poblaciones más pobres, las legumbres son la principal fuente de proteínas y energía (FAO, 2005).

Loberant y Altman (2010) indican que la demanda de forrajes leguminosos de alta calidad ha incitado la urgencia de métodos y técnicas efectivas de propagación.

Según Murillo (2023), las leguminosas simbolizan un recurso importante para minimizar el empleo de fertilizantes compuestos, pero son propensos a tener un alto costo.

**Tabla 2.** Artículos científicos publicados acorde al cultivo, año y país.

Cultivo	Referencia	Autores	Año	País
<i>Arachis villosa</i> Benth	<a href="https://doi.org/10.32604/biocell.2009.33.179">https://doi.org/10.32604/biocell.2009.33.179</a>	Fontana <i>et al.</i>	2009	Argentina
<i>Canavalia rosea</i> (Sw.)	<a href="https://doi.org/10.2478/v10120-011-0007-7">https://doi.org/10.2478/v10120-011-0007-7</a>	D’Cunha y Sridhar	2011	India
<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	<a href="https://doi.org/10.1515/ffp-2016-0002">https://doi.org/10.1515/ffp-2016-0002</a>	Szyp-Borowska <i>et al.</i>	2016	Polonia
<i>Arachis glabrata</i>	<a href="https://doi.org/10.1007/s11627-017-9865-y">https://doi.org/10.1007/s11627-017-9865-y</a>	Dolce <i>et al.</i>	2018	Argentina
<i>Pongamia pinnata</i>	<a href="https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.18.0711a">https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.18.0711a</a>	Tan <i>et al.</i>	2018	Malasia
<i>Cicer microphyllum</i>	<a href="https://doi.org/10.1007/978-981-13-9624-3_12">https://doi.org/10.1007/978-981-13-9624-3_12</a>	Singh <i>et al.</i>	2019	India
<i>Medicago truncatula</i>	<a href="https://doi.org/10.1007/s11240-019-01687-3">https://doi.org/10.1007/s11240-019-01687-3</a>	Barreto <i>et al.</i>	2019	Brasil
<i>Acacia farnesiana</i> y <i>Prosopis laevigata</i>	<a href="https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.05.034">https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.05.034</a>	Morales-Domínguez <i>et al.</i>	2019	México
<i>Vigna unguiculata</i>	<a href="https://doi.org/10.1007/s11240-023-02554-y">https://doi.org/10.1007/s11240-023-02554-y</a>	Markin <i>et al.</i>	2023	Ghana
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	<a href="https://doi.org/10.1038/s41598-023-30090-4">https://doi.org/10.1038/s41598-023-30090-4</a>	Haliloğlu <i>et al.</i>	2023	Turquía

#### 4.3 Características técnicas del cultivo in vitro de plantas leguminosas

Los datos obtenidos de los artículos sobre técnicas de micropropagación mostraron que, el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS), fue el único empleado. Sin embargo, se identificaron variaciones en su formulación que incluyen suplementos, fitohormonas, minerales y ácidos orgánicos (Tabla 3). Khan *et al.* (1988) mencionan que, el medio tiene

un efecto cuantioso en la capacidad regenerativa, mencionando que el medio más considerablemente es el MS (1962), ya que concede nutrientes esenciales para un crecimiento eficiente a nivel in vitro. Mientas que, el tipo de explante más recurrente son los brotes o yemas, debido a su mejor desarrollo (Haliloğlu *et al.*, 2023).

**Tabla 3.** Descripción de las técnicas in vitro en leguminosas.

Cultivo	Explante	Medios de cultivo	Técnicas	Autor
<i>Vigna unguiculata</i>	Brote y nodo cotiledoniario	Murashige & Skoog y extractos de plátanos, agua de coco, jugo de naranja y tomate, vitamina B5		Markin <i>et al.</i> 2023
<i>Phaseolus vulgaris L.</i>	Embrión, hipocótilo, plúmula y radícula	Murashige & Skoog y hormonas como progesterona, 17 $\beta$ -estradiol, estrona y testosterona		Haliloğlu <i>et al.</i> 2023
<i>Medicago truncatula</i>	Foliolos	Murashige & Skoog	Embriogénesis somática y cigótica	Barreto <i>et al.</i> 2019
<i>Acacia farnesiana y Prosopis laevigata</i>	Ganglios cotiledoniosos	Murashige & Skoog		Morales-Domínguez <i>et al.</i> 2019
<i>Robinia pseudoacacia L.</i>		Murashige & Skoog medio suplementado con 0,6 mg · l <sup>-1</sup> 6-BA (6-bencilaminopurina), 0,1 mg · l <sup>-1</sup> NAA (ácido naftaleno acético)	Organogénesis	Szyp-Borowska <i>et al.</i> 2016
<i>Cicer microphyllum</i>			Germoplasma (CWR)	Singh <i>et al.</i> 2019
<i>Pongamia pinnata</i>	Nodal	30 $\mu$ M de 6-bencilaminopurina (BAP) y 1 mM de floriglucinol (PG)		Tan <i>et al.</i> 2018
<i>Arachis glabrata</i>	Foliolos, yemas, hojas inmaduras	Murashige & Skoog	Embriogénesis somática	Dolce <i>et al.</i> 2018
<i>Canavalia rosea (Sw.)</i>	Vainas tiernas, cotiledones de judías maduras, cotiledones de semillas secas germinadas, hipocótilos, brotes jóvenes, nudos, entrenudos y raíces	Murashige & Skoog	Embriogénesis somática	D’Cunha y Sridhar. 2011
<i>Arachis villosa Benth</i>	Yemas	Murashige & Skoog, ácido $\alpha$ -naftalenacético, ácido indol-3-butírico, 6-bencilaminopurina, cinetina y Thidiazuron	Organogénesis directa e indirecta	Fontana <i>et al.</i> , 2009

## **5 CONCLUSIONES**

Esta investigación obtenida de las principales bases de datos permitió confirmar que, existe información técnica del cultivo in vitro de plantas leguminosas en los últimos 30 años, con poca variedad de cultivos de leguminosas asociados a estas técnicas de micropropagación, quizás por el costo operativo de un laboratorio.

Se concluye que, entre los aspectos más importantes del cultivo in vitro de las leguminosas son el medio de cultivo muy empleado, el Murashige & Skoog (MS); y de las variaciones que se agregan como los reguladores de crecimiento, compuestos orgánicos, hormonas y suplementos; así como también con el empleo de la organogénesis y embriogénesis como técnicas biotecnológicas específicas a cada especie vegetal. Así como, del uso de brotes como el material genético de preferencia para obtener resultados positivos en el cultivo masivo de leguminosas comestibles, forrajeras y forestales.

## **6 RECOMENDACIONES**

Para futuros trabajos de revisión bibliográfica se recomienda el uso de softwares estadísticos que permitan realizar revisiones sistemáticas como un medio efectivo para la identificación y evaluación de la literatura e investigaciones existentes en este tema.

## 7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta Andrade, J.A. (2015) *Embriogénesis somática en Café (Coffea canephora y Coffea arabica) para su aplicación y adopción de sistemas de micropropagación masal*. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de Guayaquil. Available at: <https://catalogo.ug.edu.ec/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=131503>
- Ali, S. and Mirza, B. (no date) ‘Micropropagation of rough lemon (Citrus jambhiri Lush.): Effect of explant type and hormone concentration’.
- Aragón, C.E., Sánchez, C., Gonzalez-Olmedo, J., Escalona, M., Carvalho, L., Amâncio, S. (2014) ‘Comparison of plantain plantlets propagated in temporary immersion bioreactors and gelled medium during in vitro growth and acclimatization’, *Biologia plantarum*, 58(1), pp. 29–38. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10535-013-0381-6>.
- Arevalo, M.C. (2014) ‘PROPAGACIÓN CLONAL in vitro DE Swietenia macrophylla King (CAOBA)’, *Ciencia y Tecnología* [Preprint]. Available at: [https://www.academia.edu/90444079/PROPAGACION%20CLONAL\\_in\\_vitro\\_DE\\_Swietenia\\_macrophylla\\_King\\_CAOBA\\_](https://www.academia.edu/90444079/PROPAGACION%20CLONAL_in_vitro_DE_Swietenia_macrophylla_King_CAOBA_) (Accessed: 7 June 2025).
- Arockiasamy, S., Prakash, S. and Ignacimuthu, S. (2002) ‘Direct Organogenesis from Mature Leaf and Petiole Explants of Eryngium Foetidum L.’, *Biologia Plantarum*, 45(1), pp. 129–132. Available at: <https://doi.org/10.1023/A:1015177330589>.
- Barreto, H.G., Ságio, S.A., Chalfun-Júnior, A., Fevereiro, P., Benedito, V.A. (2019) ‘Transcriptional profiling of the AFL subfamily of B3-type transcription factors during the in vitro induction of somatic embryogenesis in the model legume *Medicago truncatula*’, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 139(2), pp. 327–337. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01687-3>.
- Bello-Bello, J.J. Schettino-Salomón, S., Ortega-Espinoza, J., Spinoso-Castillo, J.L. (2021) ‘A temporary immersion system for mass micropropagation of pitahaya (*Hylocereus undatus*)’, *3 Biotech*, 11(10), p. 437. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02984-5>.
- Bhatia, P., Ashwath, N., Senaratna, T. and Midmore, D. (2004) ‘Tissue Culture Studies of Tomato (*Lycopersicon esculentum*)’, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 78(1),

- pp. 1–21. Available at: <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000020430.08558.6e>.
- Bhatia, P., Ashwath, N. and Midmore, D.J. (2005) ‘Effects of genotype, explant orientation, and wounding on shoot regeneration in tomato’, *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 41(4), pp. 457–464. Available at: <https://doi.org/10.1079/IVP2005649>.
- Bhojwani, S.S. and Dantu, P.K. (2013) ‘Tissue and Cell Culture’, in S.S. Bhojwani and P.K. Dantu (eds) *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. India: Springer, pp. 39–50. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9\\_4](https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9_4).
- Castañeda-Castro, O., Gómez-Merino, F.C., Trejo-Téllez, L.I., Morales-Ramos, V., González-Arno, M.T., Martínez-Ocampo, Y.M., Gámez-Pastrana, R., Pastelín-Solano, M.C. (2014) ‘Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales en caña de azúcar (*saccharum* spp.)’, *Agro Productividad* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.22004/ag.econ.352299>.
- Chitra, D.S.V. and Padmaja, G. (2005) ‘Shoot regeneration via direct organogenesis from in vitro derived leaves of mulberry using thidiazuron and 6-benzylaminopurine’, *Scientia Horticulturae*, 106(4), pp. 593–602. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2005.05.008>.
- D’Cunha, M. and Sridhar, K. (2011) ‘Micropropagation of the wild legume *Canavalia rosea* (Sw.) DC. from coastal sand dunes’, *Biological Letters*, 48(1), pp. 85–96. Available at: <https://doi.org/10.2478/v10120-011-0007-7>.
- Dolce, N.R., Faloci, M.M. and Gonzalez, A.M. (2018) ‘In vitro plant regeneration and cryopreservation of *Arachis glabrata* (Fabaceae) using leaflet explants’, *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 54(2), pp. 133–144. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11627-017-9865-y>.
- Edirisinghage Jayawardana, K.D. (2015) *Respuesta in vitro y en casa de cultivo de variedades cubanas durante la obtención de semilla original de papa (Solanum tuberosum L.)*. Universidad Central ‘Marta Abreu’ de Las Villas. Available at: <https://dspace.uclv.edu.cu/handle/123456789/2076> (Accessed: 7 June 2025).
- FAO (2005) *The State of Food and Agriculture, 2005: Agricultural Trade and Poverty: Can Trade Work for the Poor?* Food & Agriculture Org.

- FAO (2016) *Propiedades nutricionales de las legumbres*; Available at: <https://www.fao.org/pulses-2016/news/news-detail/es/c/404283/> (Accessed: 8 June 2025).
- Fernández Da Silva, R. and Montilla, V. (2023) ‘Establecimiento del sistema de embriogénesis somática en *Azadirachta indica* A. Juss a partir de suspensiones celulares, acoplado a la producción de azadiractina in vitro’, *Revista Ingeniería UC*, 29(2), pp. 156–167. Available at: <https://doi.org/10.54139/revinguc.v29i2.169>.
- Feyissa, T., Welander, M. and Negash, L. (2005) ‘In vitro regeneration of *Hagenia abyssinica* (Bruce) J.F. Gmel. (Rosaceae) from leaf explants’, *Plant Cell Reports*, 24(7), pp. 392–400. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0949-5>.
- Gago, J., Martínez-Núñez, L., Landín, M., Flexas, J., Gallego, P.P. (2014) ‘Modeling the Effects of Light and Sucrose on In Vitro Propagated Plants: A Multiscale System Analysis Using Artificial Intelligence Technology’, *PLoS ONE. Edited by R.M.H. Merks*, 9(1), p. e85989. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085989>.
- García Lozano, D.L., Ocampo Guerrero, M.L. and Mesa López, N. (2015) ‘Estandarización del protocolo de desinfección para la micropropagación de *Aspidosperma polyneuron*’, *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(2), pp. 76–84. Available at: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54277>.
- García O, O.E., Infante R, R.B. and Rivera, C.J. (2009) ‘Las leguminosas, una fuente importante de fibra alimentaria: Una visión en Venezuela’, *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 40(1), pp. 57–63.
- Gomez-Torres, L.M., Moreno-Gómez, B., Velásquez-Lozano, M.E., Aguirre-Mancilla, C., Aguado-Santacruz, G.A. (2014) ‘Plant cell photoautotrophic suspension cultures: Establishment and application perspectives’, *Revista fitotecnica mexicana*, 37(2), pp. 165–179.
- Gubiš, J., Lajchová, Z., Faragó, J., Jureková, Z. (2003) ‘Effect of Genotype and Explant Type on Shoot Regeneration in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in vitro’, *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 39(1), pp. 9–14. Available at: <https://doi.org/10.17221/3715-CJGPB>.
- Guerrero Wyss, L., Durán-Agüero, S. (2020) ‘Consumo de legumbres y su relación con enfermedades crónicas no transmisibles’, *Revista chilena de nutrición*, 47(5), pp.

865–869. Available at: <https://doi.org/10.4067/s0717-75182020000500865>.

- Haliloğlu, K., Türkoğlu, A., Balpınar, O., Öztürk, H.I., Özkan, G. and Poczai, P. (2023) ‘Effects of mammalian sex hormones on in vitro organogenesis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)’, *Scientific Reports*, 13(1), p. 3337. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30090-4>.
- Henry, Y., Vain, P. and De Buyser, J. (1994) ‘Genetic analysis of in vitro plant tissue culture responses and regeneration capacities’, *Euphytica*, 79(1), pp. 45–58. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00023575>.
- Hermoso Blanco, J., Otaño, A., Pando, V., Sierra de Grado, R. (2013) ‘Estudio de la influencia de IBA (ácido indolbutírico) en la fase de enraizamiento en el cultivo in vitro de *Populus tremula* L.’, *Congreso Forestal Español* [Preprint]. Available at: [https://secforestales.org/publicaciones/index.php/congresos\\_forestales/article/view/14614](https://secforestales.org/publicaciones/index.php/congresos_forestales/article/view/14614) (Accessed: 7 June 2025).
- Hernández-Meneses, E., López-Peralta, M.C.G. and Estrada-Luna, A.A. (2013) ‘Callogenesis de *Heliconia collinsiana* GRIGGS in vitro: establecimiento, inducción y proliferación’, *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 4(8), pp. 1175–1186.
- Khan, M.R.I., Heyes, J.K. and Cohen, D. (1988) ‘Plant regeneration from oca (*Oxalis tuberosa* M.): the effect of explant type and culture media’, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 14(1), pp. 41–50. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00029574>.
- Kumar, N., Vijay Anand, K.G. and Reddy, M.P. (2011) ‘Plant regeneration of non-toxic *Jatropha curcas*—impacts of plant growth regulators, source and type of explants’, *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 20(1), pp. 125–133. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13562-011-0037-6>.
- Landi, L. and Mezzetti, B. (2006) ‘TDZ, auxin and genotype effects on leaf organogenesis in *Fragaria*’, *Plant Cell Reports*, 25(4), pp. 281–288. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0066-5>.
- Fontana, L.M., Mroginski L.A., Rey, H.Y. (2009) ‘Organogenesis and plant regeneration of *Arachis villosa* Benth. (Leguminosae) through leaf culture’, *BIOCELL*, 33(3), pp. 179–186. Available at: <https://doi.org/10.32604/biocell.2009.33.179>.
- Loberant, B. and Altman, A. (2010) ‘Micropropagation of Plants’, in Flickinger, M. C.,

- Encyclopedia of Industrial Biotechnology. 1st edn. Wiley, pp. 1–17. Available at: <https://doi.org/10.1002/9780470054581.eib442>.
- Markin, G., Eleblu, J.S.Y., Amissah, J.N., Reynolds, S., Soraru, C., Craze, M.S., Wallington, E.J., Bentley, A.R. and Danquah, E.Y. (2023) ‘Plant fruit extracts enhance the in vitro propagation of cowpea (*Vigna unguiculata*) on Murashige and Skoog media’, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 155(1), pp. 81–90. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02554-y>.
- Montoya Bonilla, K.V. (2021) *Producción de brotes de genotipos de tomate Solanum lycopersicum a partir de la micropropagación de meristemas apicales*. masterThesis. La Libertad: Universidad Estatal Península de Santa Elena, 2021. Available at: <https://repositorio.upse.edu.ec/handle/46000/5820> (Accessed: 10 June 2025).
- Morales, B. and Macgayver, M. (2015) ‘Conservación in vitro: una perspectiva para el manejo de los recursos fitogenéticos’, *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*; Vol. 6 No. 1 (2015); 67 - 82 [Preprint]. Available at: <http://repository.unad.edu.co/handle/10596/32069> (Accessed: 7 June 2025).
- Morales-Domínguez, J.F., Sabás-Díaz de León, D.C., Garcidueñas-Piña, C. and Pérez-Molphe-Balch, E. (2019) ‘Germinación, propagación in vitro y aclimatación al suelo de *Acacia farnesiana* y *Prosopis laevigata*’, *South African Journal of Botany*, 124, pp. 345–349. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.05.034>.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) ‘A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures’, *Physiologia Plantarum*, 15(3), pp. 473–497. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- Murillo Mejillón, R.F. (2023) *Evaluación del ciclo productivo de Phaseolus vulgaris L., inoculado con biofertilizantes*. bachelorThesis. La Libertad: Universidad Estatal Península de Santa Elena. 2023. Available at: <https://repositorio.upse.edu.ec/handle/46000/9747> (Accessed: 10 June 2025).
- Pellegrineschi, A. (1997) ‘In vitro plant regeneration via organogenesis of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]’, *Plant Cell Reports*, 17(2), pp. 89–95. Available at: <https://doi.org/10.1007/s002990050358>.
- Pequeño-Granado, I.L., Vázquez-Alvarado, R.E., Santos-Haliscak, J.A., Luna-Maldonado, A.I., Moreno-Degollado, G., Iracheta-Donjuan, L., López-Gómez, P., Castellanos-

- Juárez, M. y Ojeda-Zacarías, M.C. (2015) 'Inducción organogénica de *Jatropha curcas* L. a partir de hojas jóvenes', *Polibotánica*, (39), pp. 79–89. Available at: [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-27682015000100004](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682015000100004)
- Pierik, R.L.M. (1988) 'IN VITRO CULTURE OF HIGHER PLANTS AS A TOOL IN THE PROPAGATION OF HORTICULTURAL CROPS', *Acta Horticulturae*, (226), pp. 25–40. Available at: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1988.226.1>.
- Ramírez-Mosqueda, M.A., Sánchez-Segura, L., Hernández-Valladolid, S.L., Bello-Bello, E. and Bello-Bello, J.J. (2020) 'Influence of silver nanoparticles on a common contaminant isolated during the establishment of *Stevia rebaudiana* Bertoni culture', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 143(3), pp. 609–618. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01945-9>.
- Rangel Osorio, J. and Orozco Villafuerte, J. (2017) '*Establecimiento de cultivos in vitro de Albahaca (Ocimum Basilicum) para la producción de Aceite Esencial*'. Available at: <http://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/977946> (Accessed: 7 June 2025).
- Santana Pincay, J.A. (2019) *Evaluación de cambios morfológicos en explantes in vitro de tomate Lycopersicon esculentum Mill., regulados por la edad fisiológica*. bachelorThesis. La Libertad: Universidad Estatal Península de Santa Elena, 2019. Available at: <https://repositorio.upse.edu.ec/handle/46000/4979> (Accessed: 10 June 2025).
- Schween, G. and Schwenkel, H.-G. (2003) 'Effect of genotype on callus induction, shoot regeneration, and phenotypic stability of regenerated plants in the greenhouse of *Primula* ssp.', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72(1), pp. 53–61. Available at: <https://doi.org/10.1023/A:1021227414880>.
- Shilpha, J., Silambarasan, T., Virgin, M.J. and Ramesh, M. (2014) 'Improved in vitro propagation, solasodine accumulation and assessment of clonal fidelity in regenerants of *Solanum trilobatum* L. by flow cytometry and SPAR methods', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 117(1), pp. 125–129. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11240-013-0420-1>.
- Singh, R.K., Bohra, N., Sharma, L., Anandhan, S., Ruiz-May, E. and Quiroz-Figueroa, F.R.

- (2019) ‘Inspection of Crop Wild Relative (*Cicer microphyllum*) as Potential Genetic Resource in Transgenic Development’, in R. Sathishkumar et al. (eds) *Advances in Plant Transgenics: Methods and Applications*. Singapore: Springer, pp. 253–272. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-981-13-9624-3\\_12](https://doi.org/10.1007/978-981-13-9624-3_12).
- Sujatha, M. and Mukta, N. (1996) ‘Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Jatropha curcas*’, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 44(2), pp. 135–141. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00048191>.
- Szyp-Borowska, I., Banha, C., Wojda, T. and Szczygieł, K. (2016) ‘Micropropagation of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) and genetic stability of long term cultivated plants’, *Folia Forestalia Polonica*, 58(1), pp. 13–19. Available at: <https://doi.org/10.1515/ffp-2016-0002>.
- Tan, S.N., Tee, C.S. and Wong, H.L. (2018) ‘Multiple shoot bud induction and plant regeneration studies of *Pongamia pinnata*’, *Plant Biotechnology*, 35(4), pp. 325–334. Available at: <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.18.0711a>.
- Teng, W.-L. (1999) ‘Source, etiolation and orientation of explants affect in vitro regeneration of Venus fly-trap (*Dionaea muscipula*)’, *Plant Cell Reports*, 18(5), pp. 363–368. Available at: <https://doi.org/10.1007/s002990050587>.
- Torres, M. and Santos-Ordóñez, E. (2020) ‘Ecuador—Modern Biotechnology in Ecuador—Development and Legal Framework’, in A. Chaurasia, D.L. Hawksworth, and M. Pessoa de Miranda (eds) *GMOs: Implications for Biodiversity Conservation and Ecological Processes*. Cham: *Springer International Publishing*, pp. 533–540. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-53183-6\\_29](https://doi.org/10.1007/978-3-030-53183-6_29).
- Tyagi, A.P., Comai, L. and Byers, B. (2001) ‘Comparison of plant regeneration from root, shoot, and leaf explants in pigeonpea (*Cajanus cajan*) cultivars’, *SABRAO Journal of Breeding and Genetics*, 33(2), pp. 59–71.
- Villalobos Olivera, A., Méndez, R., González, J., Iglesias, A., Martínez, J., Rodríguez, R., Llorente, G., Quintana, N., Rodríguez, R., Vidigal, F., Martínez, M. (2016) ‘Estrategia criogénica para el establecimiento de un banco de germoplasma de piña (*Ananas comosus* var. *Comosus*)’, *Cultivos Tropicales*, 37, pp. 81–90.
- Voisin, A.-S., Guéguen, J., Huyghe, C., Jeuffroy, M.-H., Magrini, M.-B., Meynard, J.-M., Mougel, C., Pellerin, S. and Pelzer, E. (2013) ‘Legumes for feed, food, biomaterials

and bioenergy in Europe: a review’, *Agronomy for Sustainable Development*, décembre (Online), pp. 1–20. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0189-y>.

Zuker, A., Ahroni, A. and Shejtman, H. (1997) ‘Adventitious shoot regeneration from leaf explants of *Gypsophila paniculata* L’, *Plant Cell Reports*, 16(11), pp. 775–778. Available at: <https://doi.org/10.1007/s002990050318>.