

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
PASANTÍA DE INVESTIGACIÓN.**



Efecto de nitrato de plata (AgNO_3) en la organogénesis directa de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad CENTA EAC.

POR

FRANCISCO RIVAS NIETO

CIUDAD UNIVERSITARIA AGOSTO DE 2023

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
PASANTÍA DE INVESTIGACIÓN.**



Efecto de nitrato de plata (AgNO_3) en la organogénesis directa de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad CENTA EAC.

POR

FRANCISCO RIVAS NIETO

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE:

INGENIERO AGRÓNOMO

CIUDAD UNIVERSITARIA AGOSTO DE 2023

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

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

DOCENTE ASESOR

ING. AGR. M.Sc. JULIO CESAR ORTIZ PAVÓN

TRIBUNAL EVALUADOR

ING. AGR. OSCAR ALONSO RODRÍGUEZ GRACIAS

ING.AGR. RAUL IRAHETA VILLATORO

**COORDINADOR GENERAL DE PROCESOS DE GRADUACION DEL DEPARTAMENTO DE
FITOTECNIA**

ING. AGR. MARIO ALFREDO PEREZ ASCENCIO

RESUMEN

La investigación fue desarrollada dentro del área de cultivo de tejidos del Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador en el periodo de enero de 2022 a febrero de 2023.

Se estableció un protocolo eficiente de regeneración *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* L. variedad EAC, mediante organogénesis directa con nitrato de plata (AgNO_3) como antioxidante. Este protocolo se elaboró mediante la eficiencia porcentual de regeneración de dos diferentes tipos de explantes (Nudos cotiledonales y epicotilos) de la variedad de frijol común CENTA EAC en condiciones *in vitro* en medio de cultivo semisólido, con sales minerales MS, BAP (2.5mgL^{-1}), carbón activado (3g mL^{-1}) y AgNO_3 (0, 0.42, 1.69, 4.23 mgL^{-1}). Se encontró evidencia estadísticamente significativa $p(5.19^{-9*}) < 0.01$ en el promedio de brotes por explante. Los nudos cotiledonales mostraron una tendencia destacable en la dosis de 1.69 mgL^{-1} y presentó mayor número de brotes por regenerante (62.31%). Este informe describe un sistema eficiente de regeneración de frijol común a través de organogénesis directa y puede servir como referencia para su posterior aplicación en un sistema de mejoramiento de la variedad CENTA EAC.

Palabras clave: *Phaseolus vulgaris* L., cultivo *in vitro*, nitrato de plata, eficiencia de regeneración, organogénesis directa.

Agradecimientos

A la vida por darme la oportunidad de llegar a buen término un tramo más de mi formación profesional.

A mis padres Ing. Francisco Rivas Méndez y Blanca María Rosalía Nieto de Rivas por darme la oportunidad como hijo de recibir todo su esfuerzo, compromiso, dedicación y amor.

A mi asesor Ing. M.Sc. Julio Ortiz Pavón en ayuda y guía profesional desde el inicio y hasta el final de este aprendizaje técnico-científico.

A la familia Chicas Romero que a través de su afecto y cariño me motivo siempre a superarme profesionalmente.

A mi pareja Iris Vanesa Ramírez Martínez por su apoyo incondicional durante este proceso de formación.

A Josué Maximiliano Arévalo y la familia Cedillos Arévalo, por enseñarme los resultados del perfeccionismo en cualquier ámbito de la vida mediante la perseverancia constante.

A mi grupo de compañeros y amigos que durante el recorrido de estudiante nos apoyamos en la búsqueda del conocimiento con vista al grado universitario.

Al doctor Joaquín Miguel Castro Montoya por brindar su guía científica como docente e investigador del departamento de postgrado de la Facultad de Ciencias Agronómicas.

A todas aquellas personas que de un modo u otro nos han acompañado y ayudado en este largo viaje de nuestras vidas que permanecen y no permanecen en este plano de la existencia.

A cada uno de ustedes Gracias.

INDICE	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1.1 Generalidades del frijol común.....	3
2.1.2 Origen y domesticación.....	3
2.1.3 Descripción botánica y Taxonomía de la especie	3
2.1.4 Clasificación Taxonómica del frijol común	4
2.1.5 Descripción botánica	4
2.1.5.1 Raíz	4
2.1.5.2 Tallo.....	4
2.1.5.3 Hojas.....	4
2.1.5.4 Flor.....	5
2.1.5.5 Semilla	5
2.1.6 Morfología de la planta	5
2.1.7 Fenología y hábitos de crecimiento del cultivo de frijol	6
2.1.7.1 La fase vegetativa.....	6
2.1.7.2 La fase reproductiva	6
2.1.7.3 Hábitos de crecimiento	6
2.1.8 Genética del frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	7
2.1.9 Variedad “CENTA EAC”	7
2.1.10 Regeneración <i>in vitro</i> de frijol.....	9
3. DESARROLLO DE LA PASANTIA.....	9
3.1 Descripción del lugar de estudio	9
3.2 Material vegetal.....	10
3.3 Desinfección de semillas y germinación	11
3.4 Disección de explantes	11
3.5 Inducción y regeneración <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de AgNO ₃	12
3.6 Subcultivo de regenerantes	13
3.7 Evaluación de la respuesta morfogénica	14
3.8 Análisis estadístico.....	14

4. RESULTADOS	17
5. DISCUSIÓN	21
6. CONCLUSIONES.....	24
7. RECOMENDACIONES	25
8. BIBLIOGRAFÍA	26
9. ANEXOS	30

Índice de cuadros

Cuadro 1. Características de la variedad de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	8
Cuadro 2. Concentraciones de Nitrato de plata (AgNO_3) para la regeneración de nudos cotiledonales y epicótilos de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) Var. CENTA EAC.	13
Cuadro 3. Análisis de varianza (ANVA) con arreglo factorial 2X4, considerando la interacción del nitrato de plata (AgNO_3) en la regeneración <i>in vitro</i> de nudos cotiledonales y epicótilos de frijol común de <i>phaseolus vulgaris</i> L. var EAC.	15
Cuadro 4. Efecto de los explantes (epicótilo y nudo cotiledonal) y el Nitrato de plata (AgNO_3) en la eficiencia de la regeneración <i>in vitro</i> de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) Var. CENTA EAC bajo un análisis de varianza (ANOVA) y un arreglo factorial 2x4.....	18

Índice de figuras

Figura 1. Ubicación de laboratorio de Biotecnología Agrícola, de la Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador.....	9
Figura 2. Flujograma de las actividades de la investigación donde se presentan los pasos más importantes planteados en los objetivos de la investigación.	10
Figura 3. Representación de nudo cotiledonal y epicótilos segmentados.	11

Figura 4. Respuesta a la regeneración <i>in vitro</i> de nudos cotiledonales (NC) y epicótilos € de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) Var.CENTA EAC en diferentes dosis de AgNO ₃ mgL ⁻¹ : Nudo cotiledonal NC-0, 0.42, 1.69, 4.23 mgL ⁻¹ y Epicótilo E-0, 0.42, 1.69, 4.23 mgL ⁻¹	17
Figura 5. Eficiencia de regeneración promedio <i>in vitro</i> de nudos cotiledonales y epicótilos de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) Var. CENTA EAC, independientemente de las dosis de AgNO ₃	18
Figura 6 Curva de regresión lineal para nudos cotiledonales en la eficiencia de respuesta génica <i>in vitro</i> de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) Var. CENTA EAC para las concentraciones de nitrato de plata (AgNO ₃).	19
Figura 7 Curva de regresión lineal para epicótilos en la eficiencia de respuesta génica <i>in vitro</i> de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) Var. CENTA EAC para las concentraciones de nitrato de plata (AgNO ₃).....	20

Índice de anexos

Cuadros

Cuadro A-1. Análisis de Varianza (ANVA) en frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedad CENTA EAC, determinando únicamente la significancia del tratamiento en los tejidos en estudio.	30
Cuadro A-2. Análisis de Varianza (ANVA) en frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedad CENTA EAC, determinando únicamente la significancia del tratamiento en los tejidos en estudio.	30
Cuadro A-3: Análisis de Varianza (ANVA) en frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedad CENTA EAC, determinando la significancia del tratamiento y su interacción en los tejidos en estudio.	31
Cuadro A-4. Resumen de resultados de eficiencia en regeneración <i>in vitro</i> de la variedad de frijol común CENTA EAC.....	31

Figuras

- Figura A-1. Sales minerales utilizadas en medio de cultivo en orden de izquierda a derecha; Medio MS (murashige y skoog), 6-bencilaminopurina, nitrato de plata AgNO₃, Azúcar y H₂O desmineralizada..... 32
- Figura A-2. Laboratorio de tejidos vegetales orden de izquierda a derecha; (a) Cámaras de flujo laminar y sala de preparación de medios de cultivo, (b) mechero de alcohol 90°, (c) bisturí y esterilizador de perlas para pinzas. 32
- Figura A-3. Laboratorio de tejidos vegetales orden de izquierda a derecha; (a) área de preparación de medios de cultivo, (b) balanza analítica, (c) Phmetro y (d) Hotplate. 32
- Figura A-4. Formulación de los medios de cultivo en orden de izquierda a derecha; (a) calculo y pesaje de cada elemento a ser disuelto en el medio de cultivo Medios de cultivo y (b) (T1, T2, T3, T4) con diferentes dosis de reguladores de crecimiento, en etapa previa a la adición de agar y carbón activado. 32
- Figura A-5. Disección en cámara de flujo laminar en orden de izquierda a derecha; (a) evaluación de la esterilidad del frasco, (b) selección de la plántula germinada y (c) etapa de disección de tejidos vegetales. 32
- Figura A-6. Etapa previa de formulación de medio en placas Petri, en orden de izquierda a derecha; (a) distribución espacial de las cajas petri dentro de la cámara de flujo laminar y (b) dosificación volumétrica de medio de cultivo en placas petri en estado líquido para su posterior uso en la siembra de los explantes..... 32
- Figura A-7. Sala de Crecimiento de cultivos vegetales 32
- Figura A-8. Caja Petri con medio de cultivo y explantes de *Phaseolus Vulgaris* L. Var CENTA EAC. 32

1. INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa alimenticia más importante para el consumo humano directo, ya que representa el 50% del grano de leguminosas consumidas en el mundo (FAO 2021). Adicionalmente, su producción ha alcanzado un carácter universal y constituye un valioso componente de la dieta humana por ser una fuente importante de proteínas, vitaminas y minerales con especial relevancia en la dieta de las poblaciones en América, sobre todo en los países en vías de desarrollo (Ulloa *et al.* 2011).

En El Salvador el consumo de proteínas alcanza 52.4 gramos por persona por día, de las cuales se estima que 4.2 gramos son provenientes del frijol, por lo que este grano suministra el 8% de la disponibilidad total de proteínas para los salvadoreños (CENTA 2008). Esto demuestra la importancia nutricional de este grano en la dieta salvadoreña.

Sin embargo, el rendimiento mundial del cultivo es bajo e inestable debido principalmente a la poca tolerancia a factores abióticos estresantes tales como alta temperatura y la susceptibilidad a factores bióticos como el ataque de plagas y patógenos virales, fúngicos y bacterianos (Terán y Singh 2002; Lizana *et al.* 2006; Grajales *et al.* 2008). Ante esta situación, es de gran interés la mejora genética de este cultivo para producir variedades con características agronómicas mejoradas, (como resistencia a la sequía y virus). Hoy en día, la biotecnología ofrece la oportunidad de facilitar el mejoramiento genético del frijol para la resistencia o tolerancia a factores bióticos y abióticos, y así contribuir al mejoramiento convencional para incrementar los rendimientos y la calidad de las semillas (Veltcheva *et al.* 2005).

Se ha estudiado ampliamente la generación de brotes mediante diversos protocolos en la regeneración *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) para la búsqueda del desarrollo de un sistema óptimo de cultivo *in vitro*. En este sentido, se han realizado diversas investigaciones para el cultivo *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* L. (Sourour *et al.* 2011; Alam y Anís 2019; Alfaro y Hernández 2022), sin que se haya

logrado hasta la fecha establecer un protocolo eficiente y reproducible para la exitosa regeneración *in vitro* de esta leguminosa.

Sin embargo, existen avances relevantes actualmente como Gatica *et al.* (2010) que reportaron avances significativos al utilizar diferentes concentraciones de BAP y sulfato de adenina en ejes embrionarios de cuatro variedades costarricenses de frijol común, logrando una eficiencia del 56% utilizando 5 mgL⁻¹ de BAP y 20 y 40 mgL⁻¹ de sulfato de adenina. Por otra parte, Hnatuszko-Konka *et al.* (2019) utilizó epicótilos e hipocótilos en la regeneración *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* L. mediante la inducción de regeneración con medio MS, adicionado con nitrato de plata (AgNO₃) como antioxidante y reportando promedios máximos del 70%. Esto demuestra que deben promoverse iniciativas de investigación para profundizar el estudio *Phaseolus vulgaris* L. en condiciones *in vitro* y generar una alternativa eficiente de regeneración en el posterior establecimiento de un protocolo de mejoramiento de plantas.

Uno de los objetivos que persiguió esta investigación fue en estudiar la respuesta a la regeneración *in vitro* de la variedad salvadoreña de frijol común CENTA EAC mediante la utilización de nitrato de plata (AgNO₃) y dos tipos de explantes para establecer un sistema eficiente de regeneración que permita posteriormente la introducción de características deseables mediante técnicas biotecnológicas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1.1 Generalidades del frijol común

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es uno de los cultivos más antiguos de América, se dice que México es su centro de origen. El frijol se cultiva extensamente en diferentes partes del mundo. En El Salvador es la fuente de proteínas más importante en la dieta humana, ya que el país cuenta con condiciones ecológicas aptas para producir frijol (Tapia y Camacho 1988).

El frijol común taxonómicamente pertenece a la familia Fabaceae, tribu Phaseoleae, subfamilia Papilionoideae y al orden Rosales. La tribu Phaseoleae es por mucho, el grupo más importante económicamente debido que contiene el 75% de las leguminosas comercializadas en todo el mundo (Broughton *et al.*, 2003).

2.1.2 Origen y domesticación

Poblaciones silvestres del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) se encuentran desde el centro de México hasta el Norte de Argentina, particularmente en las regiones de niveles mesotérmicos, vegetación baja y estación alterna. Difieren de las formas cultivadas en la ramificación más largas y profundas; en el tamaño menor de las hojas, vainas y semillas, estas últimas de testa más dura e impermeable, la latencia es más larga e irregular y en ciertos tipos de raíces carnosas y profundas; indican que su ciclo de vida puede exceder del año. En varios sitios del área de dispersión de las poblaciones naturales (León 2000).

2.1.3 Descripción botánica y Taxonomía de la especie

La planta de frijol es anual, herbácea, se cultiva esencialmente para obtener las semillas y granos, los cuales tienen un alto grado de proteínas, siendo alrededor del 22% de su peso seco total (CENTA 2019).

2.1.4 Clasificación Taxonómica del frijol común

Según CIAT (1984) la clasificación taxonómica del frijol común es la siguiente:

Orden: Rosales

Familia: Leguminosae

Subfamilia: Papilionoidae

Tribu: Phaseolae

Subtribu: Phaseolinae

Género: *Phaseolus*

Especie: *vulgaris*

2.1.5 Descripción botánica

2.1.5.1 Raíz

presenta nódulos distribuidos en las raíces laterales de la parte superior y media del sistema radical. Estos nódulos tienen forma poliédrica y un diámetro aproximado de 2 a 5 milímetros. Son colonizados por bacteria del género *Rhizobium*, las cuales fijan nitrógeno atmosférico, que contribuye a satisfacer los requerimientos de este elemento en la planta. Aunque generalmente se distingue la raíz, el sistema radical tiende a ser fasciculado, fibroso en algunos casos, pero con una amplia variación, incluso dentro de una misma variedad (Elías *et al.* 2018)

2.1.5.2 Tallo

El tallo puede ser identificado como el eje central de la planta, está formado por una sucesión de nudos y entrenudos; es herbáceo y con sección cilíndrica o levemente angular; puede ser erecto, semipostrado o postrado, según el hábito de crecimiento de la variedad (Cabrera y Castillo 2019).

2.1.5.3 Hojas

Son de dos tipos: simples y compuestas. Los cotiledones constituyen el primer par de hojas, proveen de sustancias de reserva a la planta durante la germinación y emergencia, y elaboran los primeros carbohidratos a través de la fotosíntesis en sus cloroplastos. Son de poca duración, el segundo par y primeras hojas verdaderas, se desarrollan en el segundo nudo; son simples, opuestas y cortadas. A partir del tercer nudo se desarrollan las hojas compuestas, las cuales son alternas, de tres

foliolos, un peciolo y un raquis. Presentan variación en cuanto tamaño, color y pilosidad, esta variación está relacionada, con la variedad y las condiciones ambientales de luz y humedad (CENTA 2019).

2.1.5.4 Flor

Cuando está abierta la primera flor en el 50% de las plantas del cultivo, se ha iniciado la etapa R6. La primera flor abierta corresponde al primer botón formado; por lo tanto, en las variedades de Tipo I (determinadas) la floración empieza en el último nudo (nudo apical) del tallo principal y continúa en forma descendente, mientras que en las variedades (indeterminadas) empieza en la parte baja de la planta y continúa en forma ascendente (CIAT1986).

2.1.5.5 Semilla

La semilla es la unidad reproductora de las plantas. Es el producto que se obtiene después de la floración y de otros fenómenos que se dan dentro de la flor. La semilla es de varios colores, dependiendo de la variedad: rojas, negras, blancas, amarillas, entre otras (CENTA 2019).

2.1.6 Morfología de la planta

Morfológicamente su raíz principal puede alcanzar una profundidad de uno a dos metros. Las raíces laterales desarrollan una radícula cónica. Estas estructuras poseen nódulos, encontrándose en su interior bacterias simbióticas que fijan el nitrógeno del aire (CIAT 1984). El tallo puede ser identificado como el eje central de la planta, está formado por una sucesión de nudos y entrenudos; es herbáceo y con sección cilíndrica o levemente angular; puede ser erecto, semiprostrado o prostrado, según el hábito de crecimiento de la variedad (CENTA 2018).

Las hojas según Parsons (1999) son de dos tipos. Hojas cotiledonales, las cuales son las dos primeras hojas que surgen luego de la emergencia epigea, de forma acorazonada, sencilla y opuesta. Hojas verdaderas, que son pinnadas, trifoliadas y pubescentes e insertadas en los nudos del tallo y las ramas. Las flores tienen formas y colores variados, conformándose de cinco sépalos, cinco pétalos, diez estambres y un pistilo. El estandarte es el pétalo más grande y se sitúa en la parte superior de

la corola. Las alas son los dos pétalos laterales y la quilla son los dos pétalos inferiores, unidos por los bordes laterales (Parsons 1999).

2.1.7 Fenología y hábitos de crecimiento del cultivo de frijol

2.1.7.1 La fase vegetativa

Se inicia en el momento en que la semilla dispone de condiciones favorables para germinar, y termina cuando aparecen los primeros botones florales; en esta fase se forma la mayor parte de la estructura vegetativa que la planta necesita para iniciar su reproducción (CIAT 1986).

2.1.7.2 La fase reproductiva

Se inicia con la aparición de los primeros botones o racimos florales y termina cuando el grano alcanza el grado de madurez necesario para la cosecha; a pesar de ser esta fase eminentemente reproductiva, durante ella las variedades indeterminadas continúan, aunque con menor intensidad, producen estructuras vegetativas (CIAT 1986).

Según la FAO (2018) la fenología del desarrollo de las plantas de *Phaseolus vulgaris* L. incluye varias etapas desde la siembra hasta la cosecha. Cada etapa de desarrollo está asociada con cambios fisiológicos, como el tamaño, la morfología, la composición química y la composición hormonal. Presenta diez fases fenológicas durante su desarrollo, divididas en 5 etapas vegetativas y 5 reproductivas: germinación (V0), emergencia (V1), hojas primarias (V2), primera hoja trifoliada (V3), tercera hoja trifoliada (V4); botón floral o prefloración (R5), floración (R6), formación de vainas (R7), llenado de vainas (R8) y maduración (R9). En las variedades determinadas, el desarrollo vegetativo del tallo principal termina antes de la floración, mientras que en las indeterminadas generalmente acaba en la etapa R8, que es cuando inicia también la defoliación.

2.1.7.3 Hábitos de crecimiento

Según CENTA (2018) el frijol común presenta los siguientes hábitos de crecimiento denominados como tipos y que van del uno al cuatro:

Tipo I: Habito de crecimiento determinado arbustivo. El tallo y las ramas terminan en una inflorescencia desarrollada. Cuando esta inflorescencia está formada, el crecimiento del tallo y las ramas se detiene.

Tipo II A: Habito de crecimiento indeterminado arbustivo: tallo erecto sin aptitud para trepar, aunque termina en una guía corta. Las ramas no producen guías.

Tipo II B: Habito de crecimiento indeterminado arbustivo: tallo erecto, con aptitud para trepar, termina en una guía larga.

Tipo III: Habito de crecimiento indeterminado postrado: plantas postradas o semi-postradas con ramificación bien desarrolladas.

Tipo IV: Habito de crecimiento indeterminado trepador.

2.1.8 Genética del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

El frijol es una especie diploide ($2n = 2x = 22$), anual y predominantemente autógena. El tamaño del genoma de frijol es pequeño (635 Mpb / genoma haploide) y similar en su naturaleza como diploide al tamaño en comparación al genoma verdadero de arroz (340 hasta 560 Mpb / genoma haploide) (Herrera 2011).

En cuanto a estudios de genómica en frijol común se han reconocido familias pequeñas de genes, como los genes de la actina donde se describieron seis miembros. También se han descrito familias grandes, como los genes análogos de resistencia y genes que codifican para las kinasas. Además, se han identificado muchos genes involucrados en resistencia, producción de isoflavonas y color de la testa (Broughton *et al.* 2003).

2.1.9 Variedad “CENTA EAC”

Proviene de la cruce simple negro vaina blanca/BCN20-02-94 realizada por el programa de investigaciones en frijol (PIF) en Zamorano, Honduras durante las fases de selección en campo experimental y validaciones en fincas de agricultores manejados con la codificación SJC 730 -79 (CENTA 2018).

Esta variedad fue seleccionada en debido a su comportamiento superior frente a factores bióticos y abióticos e identificada por el equipo de mejoramiento y del programa de granos básicos del CENTA en donde se comprobó su valor como línea promisoría por sus características de arquitectura erecta, adaptación a ambientes con estrés de humedad limitada y alta temperaturas, así como tolerancia a enfermedades como los virus del mosaico común, dorado y amarillo, potencial de rendimiento excelente y de calidad de grano (Parada et al .2015).

Esta variedad es una alternativa sostenible para reducir los efectos ocasionados por el cambio climático en el cultivo de frijol (CENTA 2018).

Cuadro 1. Características de la variedad de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

Características	Valoración
Habito de crecimiento	II B (guía indeterminada)
Días a floración	33-35
Días a madurez fisiológica	67
Color de grano	Rojo claro
Forma del grano	Ovoide
Número de granos por vaina	6-8
Numero de vainas por planta	20
Color de vaina	Crema
Reacción al virus del mosaico dorado A.	Resistente
Reacción al virus del mosaico Dorado	Resistente
Reacción a mancha angular	Ligeramente tolerante
Reacción a mustia hilachosa	Tolerante
Reacción a bacteriosis comun	Susceptible
Altas temperaturas	Tolerante
Humedad limitada	Tolerante
Peso de 100 granos (g)	26-27g
Rendimiento potencial (qq/mz)	36
Adaptación (msnm)	50-800

Fuente: CENTA 2015

2.1.10 Regeneración *in vitro* de frijol

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

Sin embargo, este balance hormonal es sensible y cambiante, cuando el tejido está expuesto a diversas combinaciones, presencia o ausencia de estos reguladores naturales de crecimiento, el comportamiento de los tejidos puede ser modificado y ser llevados a entornos controlados que estimulen una forma eficiente la regeneración, para asegurar porcentualmente el éxito de la micropropagación en cuestión (Rivas 2016).

3. DESARROLLO DE LA PASANTIA

3.1 Descripción del lugar de estudio

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología Agrícola, de la Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador, ubicado en la ciudad de San Salvador, El Salvador, con las coordenadas geográficas: latitud 13°43'6" N, longitud: 89°12'11" O.



Figura 1. Ubicación de laboratorio de Biotecnología Agrícola, de la Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador

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

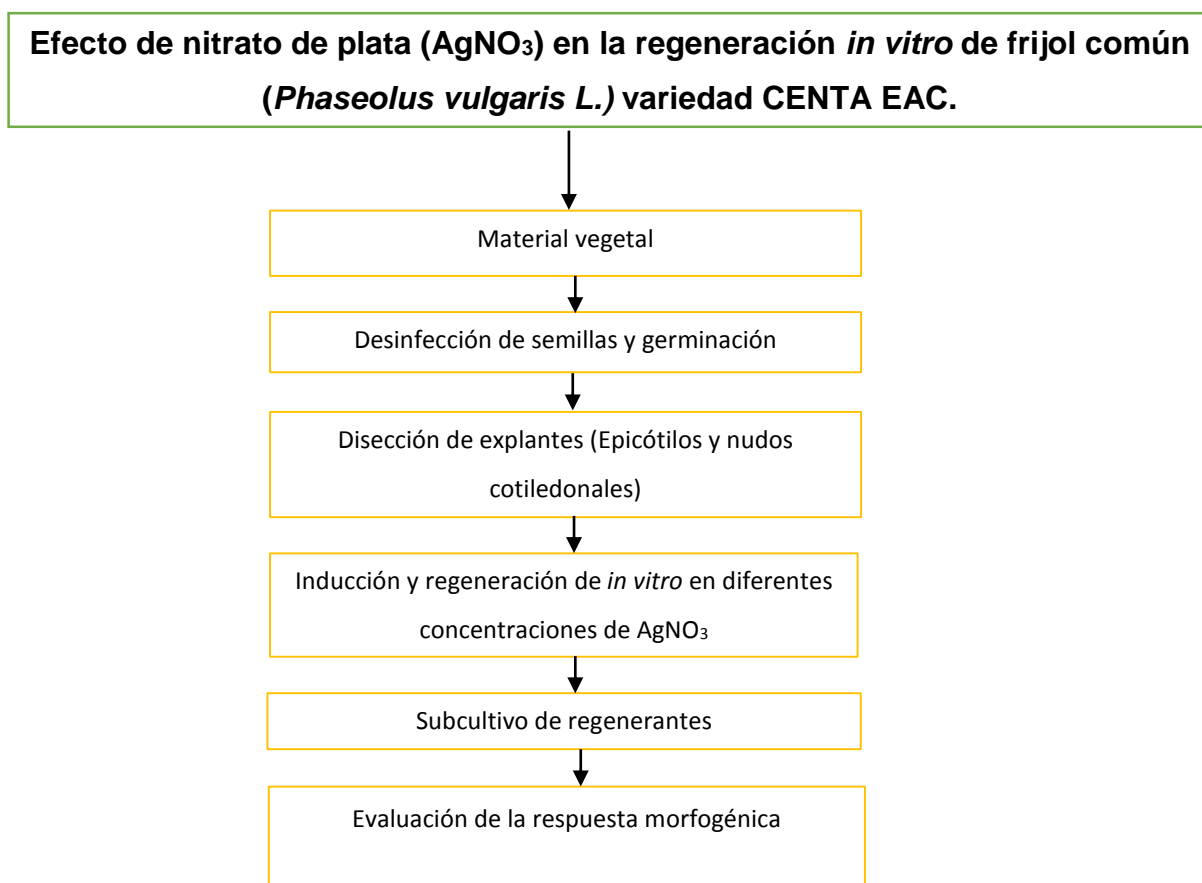


Figura 2. Flujograma de las actividades de la investigación donde se presentan los pasos más importantes planteados en los objetivos de la investigación.

3.2 Material vegetal

Se utilizaron semillas maduras de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) de la variedad CENTA EAC de no más de un año de postcosecha. Las semillas fueron donadas por el Centro Nacional De Tecnología Agropecuaria y Forestal "Enrique Álvarez Córdova" (CENTA), bajo una colaboración con el proyecto de investigación 18.21 "Desarrollo de aplicaciones biotecnológicas para el mejoramiento genético del frijol común" el cual es financiado por la Secretaría de Investigaciones Científicas de la Universidad de El Salvador (SIC-UES). La variedad CENTA EAC forma parte de cuatro variedades que han sido contempladas y aprobadas dentro del proyecto de investigación antes mencionado.

3.3 Desinfección de semillas y germinación

En una cámara de flujo laminar (Figura A-2), se ejecutó un protocolo de desinfección donde las semillas fueron sumergidas en una solución de alcohol etílico al 70% durante un minuto y posteriormente con hipoclorito de sodio (NaClO) al 1% y Tween 3 gotas por cada 100 mililitros en agitación constante durante 15 minutos, finalizando con 3 lavados con agua destilada estéril. Luego fueron colocadas 15 semillas por frasco en un medio nutritivo Murashige y Skoog (1962) a mitad de fuerza (1/2 MS) + 15g^L⁻¹ de Azúcar + 3 g^L⁻¹ de Carbón activado + 1 mg^L⁻¹ BAP (6-Bencilaminopurina).

Finalmente se colocaron los frascos de siembra a oscuridad total en un periodo de 7 a 14 días.

3.4 Disección de explantes

Posteriormente a la germinación, se disectaron los nudos cotiledonales y epicotilos para la obtención de los explantes con ayuda de pinzas y bisturí estériles en cámara de flujo laminar (Figura A-6).



Figura 3. Representación de nudo cotiledonal y epicotilos segmentados.

3.5 Inducción y regeneración *in vitro* en diferentes concentraciones de AgNO₃

En la búsqueda de las dosis ideales de nitrato de plata, se realizó la recopilación extensa sobre la información reportada por autores recientes en la utilización de este antioxidante en la regeneración *in vitro* en torno al cultivo en estudio, preliminarmente fue evidente la utilización de 1.69 mgL⁻¹ de AgNO₃ en *Phaseolus vulgaris* L. utilizada en diversos estudios (Cruz de Carvalho et al.2010; Hnatuszko-Konka et al.2019) por lo que fue establecido como punto de partida al ser evidentemente eficiente en la regeneración *in vitro* de esta especie.

Partiendo de estos estudios, fue muy difícil encontrar otras dosis equidistantes relacionadas a *Phaseolus vulgaris* L, por lo que se decidió, ampliar la búsqueda, partiendo de la dosis reportada anteriormente.

Finalmente establecieron dos dosis de nitrato de plata AgNO₃ muy relacionadas a 1.69 mgL⁻¹, por una parte se estableció una dosis inferior al utilizar 0.42 mgL⁻¹ (Drisya, Siril y Nair 2019), utilizado en la investigación de regeneración *in vitro* de *Moringa oleífera* y una dosis superior con 4.23 mgL⁻¹ (Alam y Anis 2019) utilizado en *Mucuna puriens* .

Una vez disectados los explantes (epicotilos y nudos cotiledonales) fueron colocados en cajas Petri que contenían 25 ml de medio de cultivo semi-sólido con los tratamientos a evaluar en condiciones controladas de cámara de flujo laminar (Cuadro 2).

En el ensayo se utilizaron medios de cultivo semisólidos compuestos por las sales minerales de Murashige y Skoog (1962) (MS), adicionados con 30 gL⁻¹ de sacarosa, 6 gL⁻¹ de agar, 2.5 mgL⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP) y diferentes concentraciones de nitrato de plata (AgNO₃):0, 0.42, 1.69 y 4.25 mgL⁻¹ (Cuadro 2) (Figura A-1, A-4 y A-5).

El pH de todos los medios de cultivo se ajustó con HCl o NaOH a 5.7 previo a ser esterilizado durante 20 minutos a 1.5 kg/cm² y 121°C.

Cuadro 2. Concentraciones de Nitrato de plata (AgNO_3) para la regeneración de nudos cotiledonales y epicotilos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) Var. CENTA EAC.

Tratamiento	Explante	Dosis de $\text{AgNO}_3(\text{mgL}^{-1})$	Referencia
1	Nudo cotiledonal	0.00	Drisyá, Siril y Nair (2019) Cruz de Carvalho <i>et al.</i> (2010); Hnatuszko-Konka <i>et al.</i> (2019). Alam y Anis (2019).
2		0.42	
3		1.69	
4		4.23	
1	Epicotilo	0.00	Drisyá, Siril y Nair (2019) Cruz de Carvalho <i>et al.</i> (2010); Hnatuszko-Konka <i>et al.</i> (2019). Alam y Anis (2019).
2		0.42	
3		1.69	
4		4.23	

3.6 Subcultivo de regenerantes

Se realizó la inducción a los 10 días de iniciado el ensayo y posteriormente un subcultivo a los 30 días después de iniciado el ensayo, con el objetivo de mantener de forma constante la intensidad y fuerza de cada elemento del medio seimsolido, donde se colocó los regenerantes (explantes en etapa de regeneración) en cajas Petri que contenían medio de cultivo, utilizando cmaras de flujo laminar que aseguraron un porcentaje bastante alto de esterilidad para evitar la contaminación de los explantes(Figura A-6).

Los explantes se cultivaron en cajas Petri con 25 ml de medio de cultivo por tratamiento, cinco explantes por caja Petri con tres cajas por repetición y cinco repeticiones por tratamiento (Figura A-8).

En condiciones de $25\pm 1^\circ\text{C}$ y un fotoperíodo 16 horas luz/8 horas oscuridad (2000 Lux) y 100% de humedad relativa dentro del 100% en microclima del regenerante(Figura A-7).

3.7 Evaluación de la respuesta morfogénica

A los 42 días de iniciado el ensayo, se evaluó la respuesta morfogénica de los regenerantes. Se contabilizó el número de regenerantes que respondieron positivamente a la regeneración mediante la formación algún tipo de respuesta de los regenerantes.

Además, se calculó la eficiencia de regeneración *in vitro* mediante la fórmula siguiente: [(número de explantes con algún tipo de regeneración *in vitro* / total de número de explantes probados) x 100] (Hnatuszko Konka, K; *et al.* 2019).

3.8 Análisis estadístico

En términos de registro, análisis y determinación relacional de los datos sobre la eficiencia de la respuesta génica *in vitro* vía organogénesis directa de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad CENTA CENTA EAC, se utilizó la rama de la estadística inferencial, además de estadísticos como, representaciones gráficas, utilizando parámetros como medidas de tendencia central junto a sus respectivas medidas de dispersión, para enriquecer el análisis de las variables y determinar el comportamiento verdadero de los tratamientos.

Se utilizó el Análisis de Varianza (ANOVA), en arreglo factorial de 2x4 bajo un Diseño Completamente al Azar (DCA) determinado por las condiciones controladas en laboratorio (luz, temperatura y humedad) y características del material experimental (genéticamente homogéneo). Previo al análisis de variables, se procedió a la comprobación los supuestos del análisis de varianza de distribución normal, homogeneidad de varianzas y aditividad del modelo, por medio de los test estadísticos de Kolmogórov-Smirnov y Levene. El comportamiento del efecto de las concentraciones de AgNO₃ se evaluó mediante la técnica de polinomios ortogonales para determinar la respuesta lineal o cuadrática. El análisis de tendencia por el método polinomial es una técnica que se utiliza para determinar la preferencia cuando la variable independiente (x) se encuentra espaciada a intervalos simétricos o no de manera creciente. Todo el análisis se realizó con un nivel de significancia

estadística (alfa) α del 1% = 0.01 y mediante la utilización de hojas de cálculo de Microsoft Excel, así como el software libre R y su interfaz RStudio versión 3.3.0.

Las variables independientes fueron los medios de cultivo y los diferentes regenerantes de frijol y la variable dependiente fue el porcentaje de eficiencia de regeneración *in vitro*. Cada tratamiento tuvo cinco repeticiones y cada repetición consistió en tres cajas Petri con cinco explantes cada uno. Fueron 75 explantes por tratamientos, 300 explantes en total.

De acuerdo a Mejía, J; Mejía, M (1990) define que la variación dentro del modelo completamente al azar (DCA) integrando un arreglo factorial, describe el comportamiento estadístico.

Cuadro 3. Análisis de varianza (ANVA) con arreglo factorial 2X4, considerando la interacción del nitrato de plata (AgNO_3) en la regeneración *in vitro* de nudos cotiledonales y epicótilos de frijol común de *phaseolus vulgaris* L.) var EAC.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculado
Tratamientos	$Ab-1 = 8-1=7$	$\frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b Y^2_{ij}}{n} - FC$	S.C Trat/ab-1	S.C Trat/CME
Factor A	$a-1 = 2-1=1$	$\frac{\sum_{i=1}^a Y^2_{ij}}{bn} - FC$	S.C.A/a-1	S.C.A/CME
Factor B	$b-1 = 4-1=3$	$\frac{\sum_{i=1}^b Y^2_{ij}}{an} - FC$	S.C.B/b-1	S.C.B /CME
Interacción A x B	$(a-1)(b-1) = 3$	S.C subtotal-(s.c A+S.C.B)+ s.c Rep.	S.C.AxB/(a-1)(b-1)	S.C.AB/CME
Error Experimental	$(Ab)(n-1)=8 \times 3 = 24$	Diferencia	s.c.Error /((AB-1)(n-1)	
Total	$abn-1 = 31$	$\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b Y^2_{ijk} - FC$		

Fórmulas de estimación de los efectos de cada factor de modelo en estudio

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}.$$

μ = Medias del experimento sobre el cual giran las observaciones.

τ_i = Efecto del i-esimo nivel del factor A

β_j = Efecto del j-esimo nivel del factor B

$(\tau\beta)_{ij}$ = Efecto de la interacción $\tau_i \times \beta_j$

ε_{ijk} = Efecto de los errores aleatorios sin correlacion entre si

4. RESULTADOS

La estimulación a la regeneración *in vitro* de nudos cotiledonales y epicótilos de (*Phaseolus vulgaris* L.) Var CENTA EAC mediante diferentes concentraciones de nitrato de plata (AgNO_3) fue observada por el desarrollo y crecimiento de brotes, callos, raíces u hojas (Figura 3).

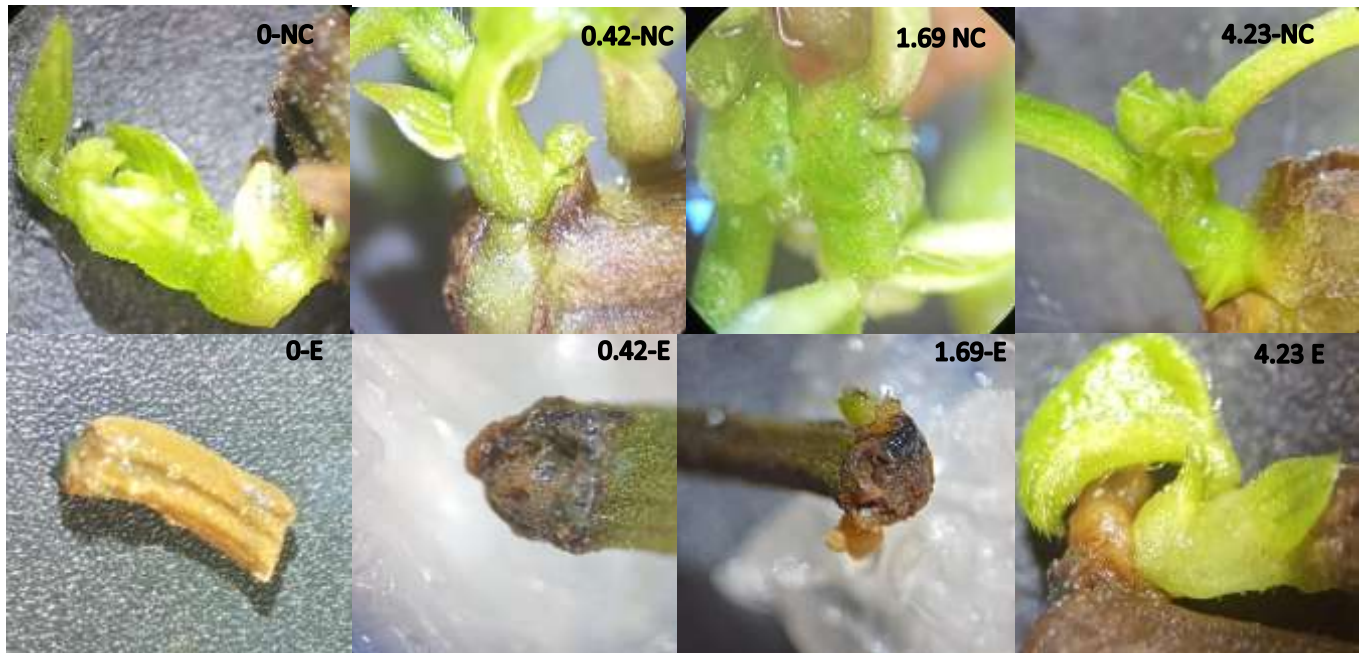


Figura 4. Respuesta a la regeneración *in vitro* de nudos cotiledonales (NC) y epicótilos (E) de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) Var. CENTA EAC en diferentes dosis de AgNO_3 mgL^{-1} : Nudo cotiledonal NC-0, 0.42, 1.69, 4.23 mgL^{-1} y Epicótilo E-0, 0.42, 1.69, 4.23 mgL^{-1} .

Se observó que la vía de regeneración que predominó fue la organogénesis directa, es decir la presencia de callos se manifestó en muy pocos regenerantes correspondientes únicamente a la dosis de 1.69mgL^{-1} de nitrato de plata (AgNO_3) (Figura 4). La eficiencia de la regeneración *in vitro* de ambos explantes, la cual considera el número de explantes con regeneración morfológica entre el número total de explantes, se calculó para nudos cotiledonales en un promedio de 62.31%, mientras que para epicótilos en 26.63% (Figura 5).

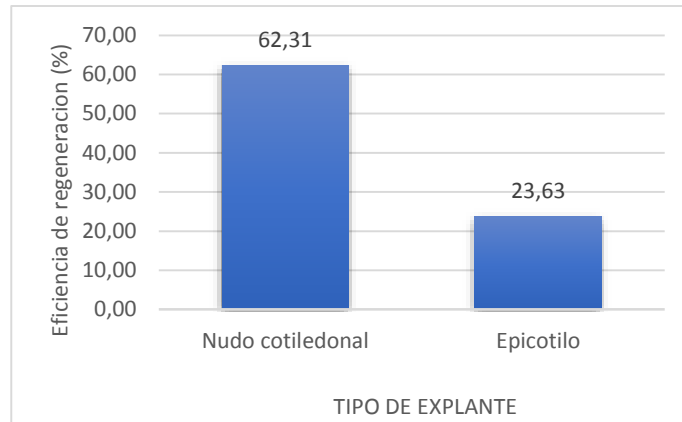


Figura 5. Eficiencia de regeneración promedio *in vitro* de nudos cotiledonales y epicotilos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) Var. CENTA EAC, independientemente de las dosis de AgNO_3 .

La dosis de nitrato de plata con mayor eficiencia de regeneración resulto ser para nudos cotiledonales y epicotilos de 1.69 mgL^{-1} con 70.66% y 54.58%, respectivamente. En contraste, la menor eficiencia en los nudos cotiledonales fue de 45.33% presentado en la dosis de 4.23 mgL^{-1} y para epicotilos 7.98% en la dosis de 0 mgL^{-1} de AgNO_3 (cuadro 4).

Cuadro 4. Efecto de los explantes (epicótilo y nudo cotiledonal) y el Nitrato de plata (AgNO_3) en la eficiencia de la regeneración *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) Var. CENTA EAC bajo un análisis de varianza (ANOVA) y un arreglo factorial 2x4.

Variable	Tipo de Explante/Dosis	Dosis de AgNO_3 (mgL^{-1})				P-valor				
		0	0.42	1.69	4.23	EEM ⁻¹	Explante	Dosis	Interacción explante x dosis	Tendencia polinomial cuadratica
Eficiencia de regeneración (%)	Nudos	64.9	68.36	70.66	45.33	4.45	0.00000000519*	0.00118*	0.00768*	0.000468**
	Epicotílos	7.96	14.67	54.58	17.32					

⁻¹ Error estándar de la media. * Nivel de significancia de 0.01.

Estadísticamente, se encontró mediante el análisis de (ANOVA), con un valor de $p(5.19^{-9}) < 0.01$ en cuanto al tipo de explante de *Phaseolus vulgaris* L. Var. CENTA EAC, es decir, que la regeneración *in vitro* de esta variedad está fuertemente

determinada por el tipo de explante, siendo el nudo cotiledonal superior en regeneración al epicotilo.

Por otro lado, las dosis de AgNO_3 también presentaron diferencias estadísticamente significativas con un valor de $p(0.00118^*) < 0.01$. Además, existen diferencias significativas en la interacción del explante con la dosis de nitrato de plata con un valor de $p(0.000468^*) < 0.01$. Esto quiere decir que, el efecto de las dosis de AgNO_3 en la eficiencia de regeneración depende del tipo de explante.

Este análisis plantea una ecuación de regresión lineal ajustada al comportamiento de los datos (nudos cotiledonales y epicotilos). En este sentido, al resolver la segunda derivada de la ecuación de las curvas para los tejidos, se obtuvo un comportamiento teórico máximo creciente antes de descender por lo que nudos cotiledonales con su ecuación $y = -6.5875x^2 + 27.188x + 34.341$ (Figura 6) obtuvo la dosis óptima teórica corresponde a 2.10 mgL^{-1} de AgNO_3 y para epicotilos, la ecuación de la curva obtenida $y = -10.011x^2 + 45.655x + 3.6397$ (Figura 7) determinó que la concentración óptima fue de 2.3 mgL^{-1} de AgNO_3 .

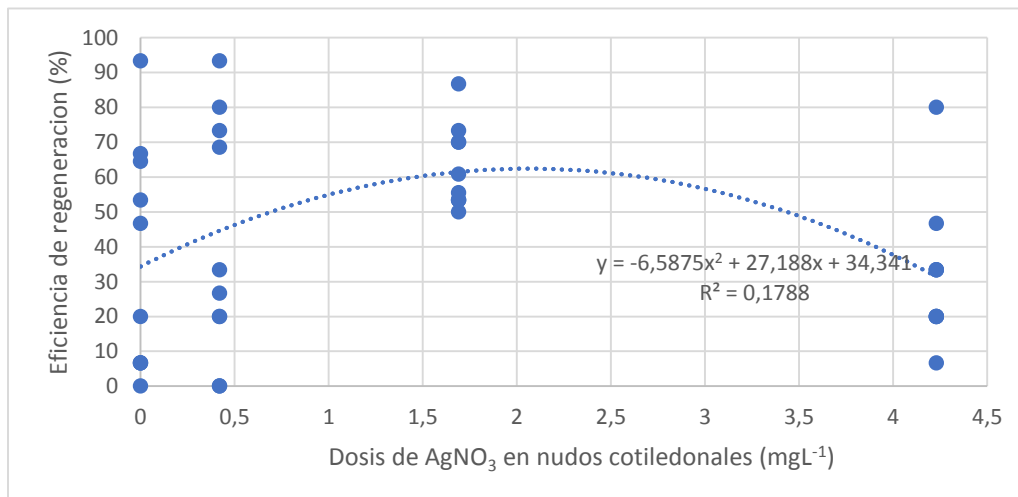


Figura 6 Curva de regresión lineal para nudos cotiledonales en la eficiencia de respuesta génica *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) Var. CENTA EAC para las concentraciones de nitrato de plata (AgNO_3).

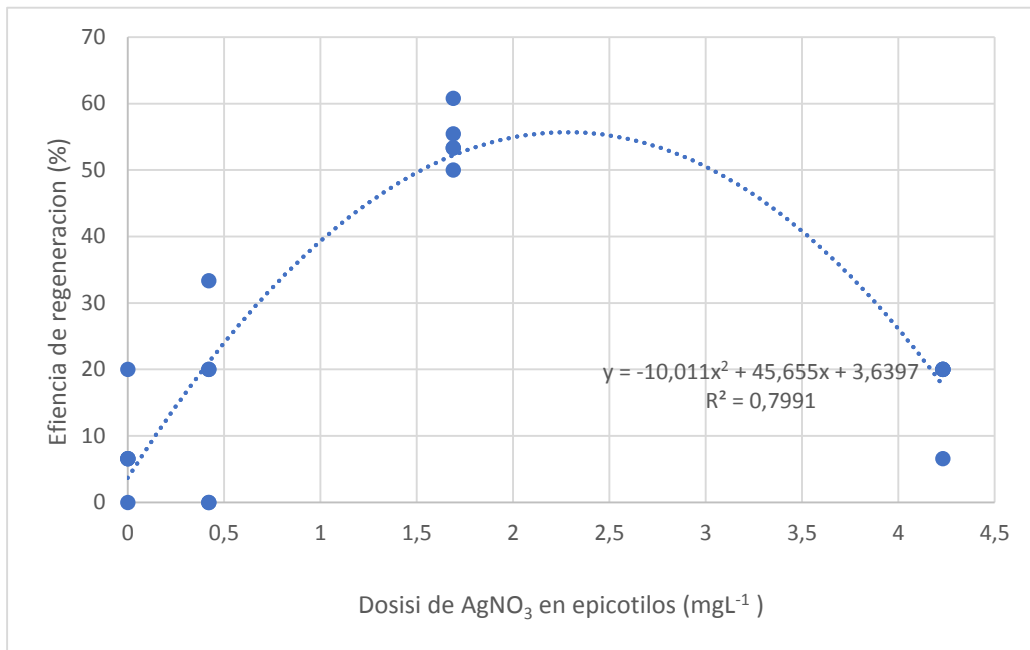


Figura 7 Curva de regresión lineal para epicotilos en la eficiencia de respuesta génica *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) Var. CENTA EAC para las concentraciones de nitrato de plata (AgNO_3)

5. DISCUSIÓN

Actualmente, el desarrollo de protocolos para la regeneración *in vitro* del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) son objeto de relevancia científica debido a la creciente importancia de esta especie para el consumo humano y por la condición que posee esta especie denominada “recalcitrancia” que consiste en la baja tasa de multiplicación celular de los explantes que únicamente poseen tejidos meristematicos (Veltcheva 2005). Ante esta situación, existen esfuerzos para evaluar diferentes agentes promotores de la regeneración tales como: reguladores de crecimiento (Quintero-Jiménez *et al.* 2010; Sourour *et al.* 2011; Alam y Anís 2019; Alfaro y Hernández 2022), sales minerales (Quintero-Jiménez *et al.* 2010 Drisya-Ravi *et al.* 2019;) y antioxidantes (Cruz de Carvahlo *et al.* 2000; Kawapata 2010; Hnatuszko-Konka *et al.* 2019). Adicionalmente, se conoce que la regeneración *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* L. está fuertemente influenciada por el tipo de tejido o explante que se utiliza para su organogénesis (Mohamed *et al.* 1993; Cruz de Carvahlo *et al.* 2000; Delgado-Sánchez *et al.* 2006; Quintero-Jiménez *et al.* 2010; Hnatuszko-Konka *et al.* 2019).

Sobre este último punto, los explantes más frecuentemente utilizados en la regeneración *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* L. han sido los ejes embrionarios (Mohamed *et al.* 1992; Cruz de Carvahlo *et al.* 2000; Hernández *et al.* 2002). Sin embargo, este explante no ha sido el único tejido evaluado para la regeneración *in vitro* de frijol. Existen reportes sobre la utilización de otros tipos de tejidos tales como cortes delgados (0.3–0.5mm) de epicótilo, hipocótilo, cotiledones y raíces (Cruz de Carvahlo *et al.* 2000), epicótilo (Hnatuszko-Konka *et al.* 2019), hipocótilo (Cruz de Carvahlo *et al.* 2000; Hnatuszko-Konka *et al.* (2019), Nudos cotiledonales (Collado *et al.* 2013).

Sin embargo, Hnatuszko-Konka *et al.* (2019) recientemente reportaron el uso de tejido proveniente de epicotilos e hipocotilos de diferentes genotipos de frijol y encontraron una indiscutible superioridad de hasta 70% de eficiencia de regeneración de los epicotilos. En contraste, la variedad CENTA EAC utilizada en la presente investigación demostró una mejor respuesta organogénica en nudos

cotiledonales con 62.31% de eficiencia sobre el 23.63% de los epicotilos. Esto sugiere una mejor aptitud en los tejidos relacionados a nudos cotiledonales sobre epicotilos.

Por otro lado, el incremento de eficiencia organogénica al utilizar nitrato de plata (AgNO_3) como antioxidante ha sido estudiado en diversos ensayos (Sourour *et al.* 2011; Drisya-Ravi *et al.* 2019; Alam y Anis 2019). Sourour *et al.* (2011) evaluaron AgNO_3 en dosis de 75mgL^{-1} y reportaron un aumento de la eficiencia de regeneración *in vitro* en la producción de individuos haploides en cruces de trigo y maíz, donde la acción del AgNO_3 mostro resultados favorables en la disminución de la oxidación natural de los tejidos vegetales obteniendo el 26.66% de eficiencia *in vitro*. Similarmente, la utilización del AgNO_3 mostró ser significativamente útil al mejorar (68.39%) la regeneración *in vitro* de la variedad CENTA EAC comparado con el medio control que no contenía este antioxidante (40.35%).

En el mismo sentido, Drisya-Ravi *et al.* (2019) reportaron el uso de 0.42 mgL^{-1} de AgNO_3 en la reproducción *in vitro* de *Moringa oleífera*, donde se obtuvo un aumento en la producción de brotes y la disminución de la caída de las hojas *in vitro*. Igualmente, Alam y Anís (2019) quienes estudiaron la adición de 4.23 mgL^{-1} de AgNO_3 en la regeneración *in vitro* de *Mucuna pruriens* y observaron una mejora en la calidad de los brotes y formación de raíces. Las dosis de AgNO_3 mencionadas anteriormente también fueron evaluadas en la variedad CENTA EAC y la concentración de 0.42 mgL^{-1} junto con la de 1.69 mgL^{-1} mostraron una notable mejoría en la regeneración *in vitro* de esta variedad. Sin embargo, la concentración de 4.23 mgL^{-1} de AgNO_3 disminuyó la respuesta organogénica *in vitro*. Esto quiere decir que, al menos para la variedad CENTA EAC de frijol común existe una dosis de nitrato de plata optima (2.12 mgL^{-1}) y que concentraciones cerca de 4.23 mgL^{-1} en vez de mejorar la regeneración *in vitro* disminuyen la respuesta organogénica en esta variedad.

Adicionalmente, el carbón activado adicionado al medio de cultivo también ha sido reportado como antioxidante con el fin de promover la regeneración *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* L. (Cruz de Carvahlo *et al.* 2000; Kawapata 2010). Hnatuszko-Konka *et al.* (2019) evaluaron la combinación de AgNO₃(10 µM) y de carbón activado (0.4%) y encontraron una mejoría en la eficiencia en la regeneración de diferentes genotipos de *Phaseolus vulgaris* L. Esta misma mejoría se vio reflejada en la presente investigación donde se utilizó una concentración de carbón activado 3 gl⁻¹. Al respecto, se sabe que el carbón activado aísla del efecto de las sustancias fenólicas producidas por los explantes y de esta forma permite una mejor regeneración *in vitro* (Linington 1991).

Linington (1991) estudio el carbón activado para evaluar propagación *in vitro* de *Dipterocarpus alatus* y *Dipterocarpus intricatus* y encontraron una mejoría estadísticamente significativa representada en una supervivencia superior de las plántulas en la transición de medio liquido hacia medio solido después de tres días de transición con una supervivencia de 71% utilizando una concentración de carbon activado de 0.25% en medio MS. En la presente investigación al utilizar el carbón activado en el medio de cultivo no se encontró evidencia de oxidación o compuestos fenólicos producidos por la variedad EAC. Esto sugiere que el carbón activado junto con el nitrato de plata son elementos importantes esenciales para el protocolo de regeneración *in vitro* de esta variedad.

6. CONCLUSIONES

- Los tejidos originados de nudos cotiledonales demostraron mejor potencial de regeneración organogénica que los tejidos originados de epicotilos.
- El nitrato de plata (AgNO_3), mejora la regeneración *in vitro* de la variedad de *Phaseolus vulgaris* L. CENTA EAC.
- Matemáticamente, la dosis ideal de nitrato de plata (AgNO_3) para la variedad de *Phaseolus vulgaris* L. var. CENTA EAC es de 2.10 mgL^{-1} utilizando nudos cotiledonales y 2.3 mgL^{-1} para epicotilos.
- La recalcitrancia de la variedad de *Phaseolus vulgaris* L. CENTA EAC. fue identificada en el presente ensayo mediante la baja respuesta organogénica de nudos cotiledonales y epicotilos.

7. RECOMENDACIONES

- El uso del nitrato de plata (AgNO_3) junto con BAP (2.5 mgL^{-1}) y carbón activado (3 mgL^{-1}) para la regeneración *in vitro* de la variedad de *Phaseolus vulgaris* L. CENTA EAC.
- Evaluar la dosis de nitrato de plata (AgNO_3) que resulto ser matemáticamente optima, la cual fue de 2.10 mgL^{-1} combinado con carbón activado y bencilaminoputina (BAP) en medios de cultivo de Murashige y Skoog.
- Utilizar nudos cotiledonales como regenerantes para futuros protocolos de regeneración *in vitro* mediante organogénesis directa de la variedad CENTA EAC.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Alam, N. y Anis, M. 2019. Influencia del nitrato de plata en la mejora de la regeneración in vitro de brotes en mucuna pruriens (L.) Dc.- Una leguminosa medicinal multipropósito. Res. J. Ciencias de la vida. Bioinformar. Farmacia química ciencia.
- Alfaro, A; y Hernández, A. 2022 Evaluación de la regeneración in vitro de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedades CENTA Costeño II y CENTA Chaparrastique mediante la técnica de organogénesis directa e indirecta. (En Línea) San Salvador. El Salvador. Consultado el 22 de febrero de 2023. Disponible en <https://ri.ues.edu.sv/id/eprint/28739/1/13101779.pdf>
- Broughton. W. J. Hernández. G. Blair. M. Beebe. S. Gepts. P. & Vanderleyden. J. 2003. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant Soil*, 252(1), 55-128. doi:10.1023/A:1024146710611
- CENTA (Centro Nacional de Tecnología Agropecuario y Forestal Enríquez Álvarez Córdova, SV). 2008. Guía Técnica para el Manejo de Variedades de Frijol: Programa de granos básicos. En línea. Consultado 6 feb. 2023. Disponible en <http://www.centa.gob.sv/docs/guias/granos%20basicos/Guia%20Tecnica%20Frijol.pdf>
- Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA). 2018. CULTIVO DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.). Programa de granos básicos. 37.
- CENTA. 2019. CULTIVO DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.). En línea. Consultado 11 de enero de 2023. Disponible en: [http://centa.gob.sv/docs/guias/granos%20basicos/Guia%20Cent_a_Frijol %202019.pdf](http://centa.gob.sv/docs/guias/granos%20basicos/Guia%20Cent_a_Frijol%202019.pdf)
- Cabrera y Castillo 2019. Guía técnica para el manejo de variedades de frijol: Programa de granos básicos. En línea. Consultado el 10 de abril de 2023. Disponible en: [https://webquery.ujmd.edu.sv/siab/bvirtual/BIBLIOTECA%20VIRTUAL/DOCUMENTOS %20WEB/0002531-ADDOCCG.pdf](https://webquery.ujmd.edu.sv/siab/bvirtual/BIBLIOTECA%20VIRTUAL/DOCUMENTOS%20WEB/0002531-ADDOCCG.pdf)
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1984. Morfología de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Cali. Colombia. En línea. Consultado 10 feb. 2023. Disponible en <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/81884>

- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1986. Etapas de desarrollo de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). En línea. Consultado 08 feb. 2023. Disponible en http://ciat-library.ciat.cgiar.org/ciat_digital/ciat/28093.pdf
- Collado, R; Veitía, N; Bermúdez-Carabaloso, I; García, L; Torres, D; Romero, C; Lorenzo, J; Angenon, G. 2013. Efficient in vitro plant regeneration via indirect organogenesis for different common bean cultivars. *Scientia Horticulturae* 153:109-116
- Cruz de Carvalho, MH, Van Le B, Zuily-Fodil Y, Pham Thi AT, Tran Thanh Van K (2000) Efficient whole plant regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using thin-cell-layer culture and silver nitrate. *Plant Sci* 159: 223–232
- Delgado Sánchez, P, Saucedo Ruiz M, Guzmán Maldonado SH, Villordo Pineda E, González Chavira M, Fraire Velázquez S, Acosta Gallegos JA, Mora Aviles A. 2006. An organogenic plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris* L). *Plant Science* 170:822_827
- Drisya Ravi, RS; Siril, EA; Nair, BR. 2019. The effect of silver nitrate on micropropagation of *Moringa oleifera* Lam. an important vegetable crop of tropics with substantial nutritional value (en línea). *Physiology and Molecular Biology of Plants* 25(5):1311-1322. DOI: <https://doi.org/10.1007/S12298-019-00689-X/METRICS>.
- Elías et al. 2018. CULTIVO DE FRIJOL. (*Phaseolus vulgaris* L.). En línea. Consultado el 10 de abril de 2023. Disponible en <https://www.centa.gob.sv/download/boletin-tecnico-cultivo-de-frijol-centa-eac/>
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). 2005. Efectos de los desastres en la agricultura (diapositivas). En línea. Consultado 6 feb. 2021. Disponible en <http://www.acqweather.com/FAO%20EFECTOS%20DE%20LOS%20DESASTRES.pdf>
- Gatica, Arias AM, Muños Valverde J, Ramírez Fonseca P, Valdez Melara M (2010) *In vitro* plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris*): effect of N6-benzylaminopurine and adenine sulphate. *Electronic Journal of Biotechnology* 13:1-8.
- Grajales, M; Beebe, SE; Rao, IM; Cajiao, C. 2008. Selection for drought resistance in common bean also improves yield in phosphorus limited and favorable environments. *Crop science* 48(2):582-592.

- Hnatuszko Konka, K.; Tomasz Kowalczyk, T.; Gerszberg, A.; Sława Glińska S.; Grzegorzczak Karolak, I. 2019. Regeneration of *Phaseolus vulgaris* from epicotyls and hypocotyls via direct organogenesis. (9): 6248.
- Herrera, N. 2011. Saturación del mapa genético de una población intra-acervo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) empleando marcadores moleculares tipo SSR y SSCP: Genoma de *Phaseolus vulgaris* L. Armenia, CO, CIAT. 122
- Jiménez, M. 2008. Descripción morfológica e histológica del desarrollo ontogénico del eje embrionario cigótico de cuatro variedades costarricenses de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) bajo condiciones del cultivo in vitro. Tesis Lic. San José, Costa Rica. UCR. 3, 33p.
- Kwapata, K., Sabzikar, R., Sticklen, M.B., Kelly, J.D., 2010. In vitro regeneration and morphogenesis studies in common bean. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 100, 97–105.
- Mejía J; Mejía M. 1990. Manual de diseños experimentales con aplicación en la agricultura y ganadería. San Salvador. El Salvador. 187p.
- Mohamed, M, Read P, Coyne D. 1992. El preacondicionamiento oscuro, CPPU y tiazurón promueven la organogénesis de los brotes en explantes de nodos de plántulas de habas y habas. *Sociedad Estadounidense de Ciencias Hortícolas* 117 (4): 668 – 672
- León, J. 2000. Botánica de los cultivos tropicales. En línea. Consultado 6 feb. 2021. Disponible en https://books.google.com/sv/books?id=NBtu79LJ4h4C&pg=PA191&lpg=PA191&dq=ramificacion+del+frijol&source=bl&ots=_ebAMpYrSE&sig=JRMI1BgiqYI7GNmDb7NvNI0hAgA&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwju6laOzPLLAhUCHB4KHxfOBSUQ6AEIGjAA#v=onepage&q=amificacion%20del%20frijol&f=false
- Linnington IM. 1991. In vitro propagation of *Dipterocarpus alatus* and *Dipterocarpus intricatus*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*; 27:81–8
- Lizana, C; Wentworth, M; Martinez, JP; Villegas, D; Meneses, R; Murchie, EH; Pastenes, C; Lercari, B; Vernieri, P; Horton, P. 2006. Differential adaptation of two varieties of common bean to abiotic stress I. Effects of drought on yield and photosynthesis. *Journal of experimental botany* 57(3):685-697.
- Parsons, DB. 1999. Fríjol y chícharo. 2° edición. México.

- Quintero Jiménez, A; Espinosa Huerta, E; Acosta Gallegos, J; Guzmán Maldonado, H; Mora Avilés, M. 2010. Enhanced shoot organogenesis and regeneration in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 102(3):381-386.
- Rivas, C. G. ,2016. Cultivo In Vitro de Células y Tejido Vegetal. Serie Nutrición Vegetal. Núm. 59. Artículos Técnicos de INTAGRI. México. En línea. Consultado el 15 de marzo de 2023. Disponible en: <https://www.intagri.com/articulos/nutricion-vegetal/cultivo-in-vitro-de-celulas-y-tejidos-vegetal>
- Sourour *et al.* 2011. Effect of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and nitrate silver on the efficiency of haploid production in durum wheat x maize crosses.Tunis.Tunez.En linea.Consultado el 20 de enero de 2023. Disponible en : https://www.researchgate.net/publication/331261826_Effect_of_24-Dichlorophenoxyacetic_acid_and_nitrate_silver_on_the_efficiency_of_haploid_productio_n_in_durum_wheat_x_maize_crosses
- Tapia, H.; Camacho, A 1988. Manejo integrado de la producción de frijol basado en labranza cero. Editorial GTZ. Managua, Nicaragua. p. 181.
- Terán, H; Singh, SP. 2002. Comparison of sources and lines selected for drought resistance in common bean. *Crop science* 42(1):64-70.
- Ulloa, JA; Ulloa, PR; Ramírez, JC; Ulloa, BE. 2011. El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. En línea. Consultado 6 feb. 2021. Disponible en <http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-08/1.pdf>
- Varisai-Mohamed, S, Sung JM, Jeng TL, Wang CS. 2006. 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* 86 (2): 187-199
- Veltcheva, M, Svetleva, D. Regeneración in vitro de *Phaseolus vulgaris* L. mediante organogénesis a partir de explantes de pecíolos. *Journal Central European Agriculture*, abril de 2005, vol. 6, no. 1, pág. 53-58.

9. ANEXOS

Cuadro A-1. Análisis de Varianza (ANVA) en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad CENTA EAC, determinando únicamente la significancia del tratamiento en los tejidos en estudio.

	<i>Df</i>	<i>SumSq</i>	<i>Mean</i>	<i>F value</i>	<i>Pr(>F)</i>
<i>np</i>	3	6043	2014.5	5.027	0.00517 *
<i>Residuals</i>	36	14426	400.7		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Cuadro A-2. Análisis de Varianza (ANVA) en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad CENTA EAC, determinando únicamente la significancia del tratamiento en los tejidos en estudio.

	<i>Df</i>	<i>Sum Sq</i>	<i>Mean Sq</i>	<i>F value</i>	<i>Pr(>F)</i>
<i>np</i>	3	6043	2014.5	6.195	0.00173 *
<i>Exp</i>	1	3044	3043.8	9.360	0.00424 *
<i>Residuals</i>	35	11382	325.2		
<i>Signif. codes:</i>	0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1				

Cuadro A-3: Análisis de Varianza (ANVA) en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad CENTA EAC, determinando la significancia del tratamiento y su interacción en los tejidos en estudio.

	<i>Df</i>	<i>Sum Sq</i>	<i>Mean Sq</i>	<i>F value</i>	<i>Pr(>F)</i>	
<i>np</i>	3	6043	2014.5	5.680	0.00118*	
<i>Exp</i>	1	3044	3043.8	8.582	0.000000005 19*	
<i>np:Exp</i>	3	32	10.7	0.030	0.00768*	
<i>Residuals</i>	32	11350	354.7			
<i>Signif. codes:</i>		0 '***'	0.001 '**'	0.01 '*'	0.05 '.'	0.1 ' ' 1

Cuadro A-4. Resumen de resultados de eficiencia en regeneración *in vitro* de la variedad de frijol común CENTA EAC.

id	Explante	AgNO₃	Repetición	% Eficiencia
1	1	0	1	93.33
2	1	0.42	1	13.33
3	1	1.69	1	80
4	1	4.23	1	33.33
5	1	0	2	80
6	1	0.42	2	80
7	1	1.69	2	73.33
8	1	4.23	2	53.33
9	1	0	3	7.33
10	1	0.42	3	93.33
11	1	1.69	3	86.66
12	1	4.23	3	86.66

13	1	0	4	40
14	1	0.42	4	68.33
15	1	1.69	4	80
16	1	4.23	4	20
17	1	0	5	71.67
18	1	0.42	5	63.33
19	1	1.69	5	80
20	1	4.23	5	30
21	2	0	1	10
22	2	0.42	1	20
23	2	1.69	1	20
24	2	4.23	1	0
25	2	0	2	6.66
26	2	0.42	2	5
27	2	1.69	2	5
28	2	4.23	2	5
29	2	0	3	13.33
30	2	0.42	3	46.66
31	2	1.69	3	5
32	2	4.23	3	5
33	2	0	4	13.3
34	2	0.42	4	3.33
35	2	1.69	4	5
36	2	4.23	4	5
37	2	0	5	1.66
38	2	0.42	5	3.33
39	2	1.69	5	5
40	2	4.23	5	5



Figura A-1. Sales minerales utilizadas en medio de cultivo en orden de izquierda a derecha; **(a)** Medio MS (murashige y skoog), **(b)** 6-bencilaminopurina, **(c)** nitrato de plata AgNO_3 , **(d)** Azúcar y **(e)** H_2O desmineralizada.



Figura A-2. Laboratorio de tejidos vegetales orden de izquierda a derecha; **(a)** Cámaras de flujo laminar y sala de preparación de medios de cultivo, **(b)** mechero de alcohol 90° , **(c)** bisturí y esterilizador de perlas para pinzas.



Figura A-3. Laboratorio de tejidos vegetales orden de izquierda a derecha; (a) área de preparación de medios de cultivo, (b) balanza analítica, (c) Ph-metro y (d) Hotplate.



Figura A-4. Formulación de los medios de cultivo en orden de izquierda a derecha; (a) calculo y pesaje de cada elemento a ser disuelto en el medio de cultivo Medios de cultivo y (b) (T1, T2, T3, T4) con diferentes dosis de reguladores de crecimiento, en etapa previa a la adición de agar y carbón activado.

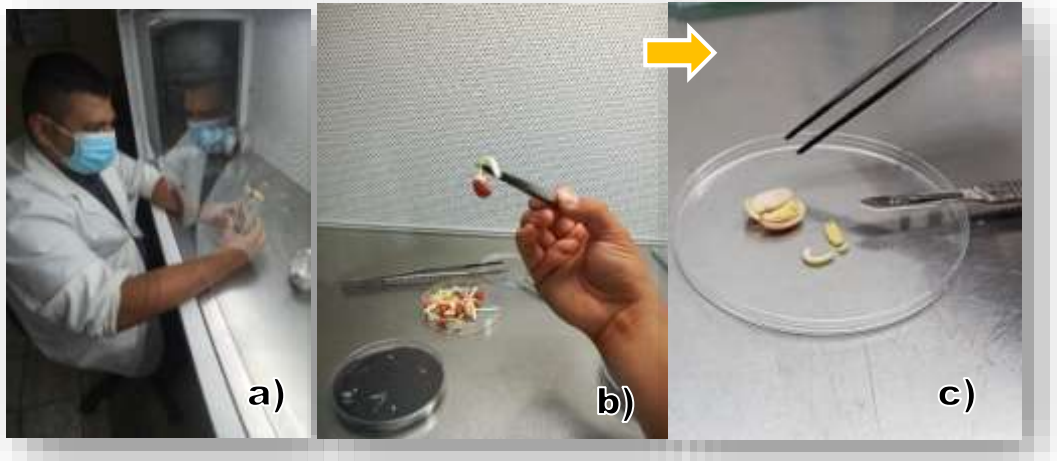


Figura A-5. Disección en cámara de flujo laminar en orden de izquierda a derecha; (a) evaluación de la esterilidad del frasco, (b) selección de la plántula germinada y (c) etapa de disección de tejidos vegetales.

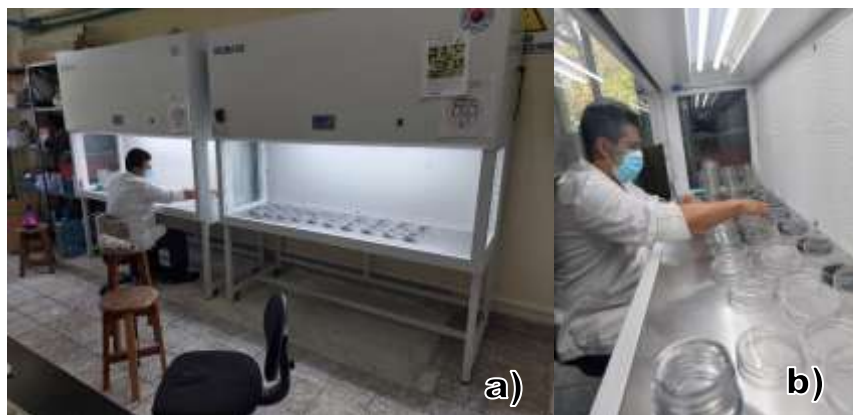


Figura A-6. Etapa previa de formulación de medio en placas Petri, en orden de izquierda a derecha; (a) distribución espacial de las cajas petri dentro de la cámara de flujo laminar y (b) dosificación volumétrica de medio de cultivo en placas petri en estado líquido para su posterior uso en la siembra de los explantes.



Figura A-7. Sala de Crecimiento de cultivos vegetales



Figura A-8. Caja Petri con medio de cultivo y explantes de *Phaseolus*