

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS



“Efecto del nitrato de plata (AgNO_3) en la regeneración *in vitro* de nudos cotiledonales y epicótilos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) Var. CENTA San Andrés”.

POR:

JULIA DANIELA NUÑEZ FIGUEROA

SAN SALVADOR, SEPTIEMBRE DE 2023.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA



“Efecto del nitrato de plata (AgNO_3) en la regeneración *in vitro* de nudos cotiledonales y epicótilos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) Var. CENTA San Andrés”.

POR:

JULIA DANIELA NUÑEZ FIGUEROA

RESUMEN DE PASANTIA DE INVESTIGACION
PRESENTADO COMO REQUISITO PARA OPTAR
AL TITULO DE INGENIERA AGRONOMO

CIUDAD UNIVERSITARIA, SEPTIEMBRE DE 2023

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MSc. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL

MSc. FRANCISCO ANTONIO ALARCÓN SANDOVAL

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS

DECANO

DR. FRANCISCO LARA ASCENCIO

SECRETARIO

ING. AGR. BALMORE MARTINEZ SIERRA

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA:

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

DOCENTE ASESOR:

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

TRIBUNAL CALIFICADOR

ING. AGR. JENNY XIOMARA ÁNGEL MOLINA

ING. AGR. BALMORE MARTÍNEZ SIERRA

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

COORDINADOR GENERAL DE PROCESOS DE GRADUACION DEL
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

ING. AGR. MARIO ALFREDO PÉREZ ASCENCIO

1.	1	
2.	3	
2.1.	Generalidades del frijol común	3
2.1.1.	Origen y domesticación	3
2.1.2.	Descripción botánica y Taxonomía del cultivo	3
2.1.2.1.	Clasificación Taxonómica del frijol común	3
2.1.2.2.	Descripción botánica	4
2.1.2.2.1.	Raíz	4
2.1.2.2.2.	Tallo	4
2.1.2.2.3.	Hojas	4
2.1.2.2.4.	Flor	4
2.1.2.2.5.	Semilla	5
2.1.3.	Morfología de la planta	5
2.1.4.	Fenología y hábitos de crecimiento del cultivo de frijol	6
2.1.4.1.	La fase vegetativa	6
2.1.4.2.	La fase reproductiva	6
2.1.4.3.	Hábitos de crecimiento	6
2.1.5.	Genética del frijol (¡Error! Marcador no definido.	
2.1.6.	Variedad "CENTA San Andrés"	7
2.1.7.	Regeneración ¡Error! Marcador no definido.	
2.1.8.	Importancia del establecimiento de un protocolo de desinfección para cultivo	8
2.1.8.1.	Ventajas de la técnica del cultivo ¡Error! Marcador no definido.	
2.1.9.	Selección del explante	9
2.1.10.	Protocolos de desinfección	9
2.1.11.	Medios de cultivo	9
2.1.12.	Carbón activado	10
3.	11	
3.1.	Descripción del estudio	11
3.1.1.	Material vegetal	12
3.1.2.	Desinfección de semillas y germinación	12
3.1.3.	Disección de explantes	12
3.1.4.	Inducción y regeneración	12
3.1.6.	Evaluación de la respuesta morfogénica	13
3.2.	Análisis estadístico	14

4.	15
5.	18
6.	20
7.	20
8.	21
9.	29

Índice de cuadros

Cuadro 1. Características agronómicas de la variedad CENTA San Andrés.	7
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 San Andrés.	13
Cuadro 3. 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 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) Var. CENTA San Andrés bajo un análisis de varianza (ANOVA) y un arreglo factorial 2x4.	17

Índice de figuras

Figura 1. Flujograma de las actividades de la investigación donde se presentan los pasos más importantes planteados en los objetivos de la investigación.	11
Figura 2. Respuesta a la regeneración <i>in vitro</i> de nudos cotiledonales y epicótilos de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) Variedad CENTA San Andrés en diferentes dosis de AgNO_3 : 0-NC: Nudo cotiledonal en ausencia de AgNO_3 , 0.42-NC: Nudo cotiledonal en 0.42mg.L^{-1} de AgNO_3 , 1.69-NC: Nudo cotiledonal en 1.69 mg.L^{-1} de AgNO_3 , 4.23-NC: Nudo cotiledonal en 4.23 mg.L^{-1} de AgNO_3 , 0-E: Epicótilo en ausencia de AgNO_3 , 0.42-E: Epicótilo en 0.42 mg.L^{-1} de AgNO_3 , 1.69-E: Epicótilo en 1.69 mg.L^{-1} de AgNO_3 , 4.23-E: Epicótilo en 4.23 mg.L^{-1} de AgNO_3 .	15
Figura 3. Eficiencia de regeneración in vitro de nudos cotiledonales y epicótilos de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) Var. CENTA San Andrés en diferentes dosis de AgNO_3 .	16

Índice de anexos

Figura A – 1. Realización de subcultivo de los diferentes explantes en la Cámara de Flujo Laminar.	29
--	----

Figura A – 2. Diferentes dosis de AgNO_3 y tipo de explante para la evaluación de la respuesta morfogénica a la regeneración in vitro de *Phaseolus vulgaris* L. var. CENTA San Andrés. 29

Cuadro A - 1. Efecto del nitrato de plata (AgNO_3) en la regeneración in vitro de nudos cotiledoneales y epicótilos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) Var. CENTA San Andrés. _____

RESUMEN

La pasantía de investigación se realizó en el Área de Cultivo de Tejidos Vegetales del Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador.

En el estudio se utilizaron dos tipos de explantes (nudos cotiledonales y epicótilos) y 4 diferentes dosis de AgNO_3 suplementados en el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) (MS) para evaluar su influencia en la respuesta regenerativa de la variedad de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) CENTA San Andrés. Para ello, se estableció un ensayo en la cual se utilizaron semillas maduras; en el cual los medios MS fueron adicionados con 30 g.L^{-1} de sacarosa, 3 g.L^{-1} de Carbón activado, 6 g.L^{-1} de agar, 2.5 mg.L^{-1} de 6-benzilaminopurina (BAP) y diferentes concentraciones de AgNO_3 : 0, 0.42, 1.69 y 4.25 mg.L^{-1} . A los 28 días de iniciado el ensayo, se realizó un subcultivo y a los 42 se evaluó la respuesta morfogénica de los explantes. Los datos se analizaron mediante el Análisis de Varianza (ANOVA), en arreglo factorial de 2×4 bajo un Diseño Completamente al Azar (DCA).

Se encontró que la presencia de AgNO_3 no mejora la organogénesis *in vitro* de ninguno de los explantes utilizados de la variedad en estudio y que este efecto pudo haber sido enmascarado por la adición de carbón activado al medio de cultivo. Además, se observó una respuesta positiva al comparar los diferentes explantes y se encontró que el nudo cotiledonal tiene una mayor eficiencia regenerativa que el epicótilo.

Estos resultados son preliminares, pero servirán de base para futuras investigaciones con herramientas biotecnológicas en el mejoramiento genético de la var. CENTA San Andrés la cual es una de las variedades utilizadas por los agricultores salvadoreños.

Palabras claves:

Frijol común, nitrato de plata, regeneración *in vitro*, nudos cotiledonales y epicótilos.

1. INTRODUCCION

La pasantía de investigación, como un requisito parcial para optar al grado de Ingeniera Agrónomo de la Universidad de El Salvador, fue exitosamente realizado en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agronómicas, específicamente en el Área de Cultivos de Tejidos Vegetales. Las actividades fueron realizadas de acuerdo con el proyecto de investigación titulado como: “Efecto del nitrato de plata (AgNO_3) en la regeneración *in vitro* de nudos cotiledoneales y epicótilos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) Var. CENTA San Andrés”.

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). 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).

Es indispensable la creación de nuevas variedades de frijol que tengan un alto grado de tolerancia a diversos factores bióticos y abióticos (Lizana *et al.* 2006; Grajales *et al.* 2008; Blair *et al.* 2012). La biotecnología vegetal, junto con los métodos de mejoramiento convencionales, podrían facilitar el mejoramiento del frijol, al proporcionarle una mayor resistencia o tolerancia a factores que producen estrés tanto biótico como abiótico (Veltcheva *et al.* 2005).

Se dice que el cultivo de tejidos y la regeneración de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) ha presentado dificultades desde las primeras investigaciones (García *et al.* 2010). Una desventaja que existe en el cultivo es la recalcitrancia ya descrita en la literatura (Ramazini *et al.* 1997). En este sentido Eissa *et al.* (2002) manifiesta que varios tipos de explantes han sido utilizados para la regeneración directa de plantas bajo el seguimiento de la vía de organogénesis, por ejemplo, cultivo de meristemos, brotes caulinares, explantes cotiledonales o cultivo de ejes embrionarios, regeneración de brotes de peciolo de hojas y embriones cigóticos (Popelka *et al.* 2004). El problema de la utilización de explantes multicelulares como los mencionados anteriormente trae consigo la aparición de quimeras en las plantas regeneradas después de un evento de transformación genética.

Por otro lado, se han utilizado agentes antioxidantes para mejorar la respuesta de los explantes de frijol. Tal es el caso de Nitrato de Plata, Cruz de Carvalho *et al.* (2000)

realizaron una investigación utilizando la combinación de BAP y AgNO_3 en concentraciones equimolares ($10 \mu\text{M}$) y manifestaron que obtuvieron datos elevados significativamente el número de brotes desarrollados, de igual manera Hnatuszko-Konka *et al.*, (2018), propusieron que a pesar de la complejidad de la capacidad de regeneración de los cultivares de frijol común, en su investigación se pudo notar que para cinco de todos los cultivares probados, independientemente del tipo de medio basal, la variante que tenía $10 \mu\text{M}$ AgNO_3 +2,5 mg/L BPA resultó ser la más efectiva.

Uno de los objetivos que persiguió esta investigación fue evaluar el efecto del nitrato de plata en la regeneración *in vitro* de nudos cotiledonales y epicótilos de frijol común. A su vez, se busca establecer un protocolo eficiente de regeneración *in vitro* de la variedad CENTA San Andrés. El trabajo de investigación estuvo encaminado a la búsqueda de nuevas metodologías biotecnológicas que sirvan de instrumentos en investigaciones futuras para mejorar genéticamente las variedades salvadoreñas de frijol común.

2. MARCO TEORICO

2.1. Generalidades del frijol común

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) 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).

2.1.1. Origen y domesticación

Poblaciones silvestres del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) 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).

2.1.2. Descripción botánica y Taxonomía del cultivo

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% (CENTA 2019).

2.1.2.1. Clasificación Taxonómica del frijol común

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

Orden: Rosales

Familia: Leguminosae

Subfamilia: Papilionoideae

Tribu: Phaseolae

Subtribu: Phaseolinae

Género: *Phaseolus*

Especie: *vulgaris*

2.1.2.2. Descripción botánica

2.1.2.2.1. Raíz

En las primeras etapas de desarrollo el sistema radical está formado por la radícula del embrión, la cual se convierte posteriormente en la raíz principal o primaria. Pocos días después se observan las raíces secundarias que se desarrollan en la parte superior o cuello de la raíz principal. Sobre las raíces secundarias se desarrollan las raíces terciarias y otras subdivisiones como los pelos absorbentes, los cuales se encuentran en todos los puntos de crecimiento de la raíz. 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 (CENTA 2019).

2.1.2.2.2. 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, semiprostrado o prostrado, según el hábito de crecimiento de la variedad. (CENTA 2019)

2.1.2.2.3. 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 folíolos, 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).

2.1.2.2.4. Flor

La flor contiene los órganos sexuales de la planta. Las flores masculinas llamados estambres y las femeninas llamadas pistilos. La flor de frijol no se abre mientras esta no ha sido polinizada, por lo que se clasifica como una planta autógama. Básicamente existen dos tipos de color en las de frijol, blanco para variedades de grano rojo y moradas para variedades de grano negro (CENTA 2019).

2.1.2.2.5. 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)

2.1.3. 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).

El fruto es una vaina con dos valvas, las cuales provienen del ovario comprimido. Debido que el fruto es una vaina, esta especie se clasifica como leguminosa. Las vainas son generalmente glabras o subglabras con pelos muy pequeños; a veces la epidermis es cerosa (CIAT 1984). Las semillas no poseen albumen, por lo tanto, las reservas nutritivas se concentran en los cotiledones. Además, las semillas pueden tener varias formas tales como cilíndricas, de riñón y esféricas. Internamente la semilla está constituida solamente por el embrión el cual está formado por la plúmula, las dos hojas primarias, el hipocótilo, los dos cotiledones y la radícula. La semilla tiene una amplia variación de color (blanco, rojo, crema, negro, café entre otras), de forma y de brillo (CIAT 1984).

2.1.4. Fenología y hábitos de crecimiento del cultivo de frijol

2.1.4.1. 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)

2.1.4.2. 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 *P. vulgaris* 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.

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

Tipo II B: Hábito 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 semipostradas con ramificación bien desarrolladas.

Tipo IV: Habito de crecimiento indeterminado trepador.

2.1.5. Genética del frijol (*Phaseolus vulgaris*)

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

El tamaño de los cromosomas mitóticos y meióticos es de aproximadamente 1-3 μ m de longitud, la mayoría de los cromosomas son metacéntricos o submetacéntricos, y presentan una media de 1.9 quiasmas por cromosomas bivalentes en la meiosis por un entrecruzamiento por brazo del cromosoma (Maréchal 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 quinazoles. Además, se han identificado muchos genes involucrados en resistencia, producción de isoflavonas y color de la testa (Broughton *et al.* 2003).

2.1.6. Variedad “CENTA San Andrés”

Cuadro 1. Características agronómicas de la variedad CENTA San Andrés.

Características	CENTA San Andrés
Color del grano	Rojo semi oscuro
Hábito de crecimiento	II A
Días a flor	32
Días a madurez	68
Vainas por planta	23
Granos por vaina	6
Peso 100 semillas (g)	28
Rendimiento /mz	35
Adaptación (msnm)	100 – 1500
Épocas de siembra	Mayo – agosto - Nov.
Virus del mosaico común	Resistente

Virus del mosaico dorado	Resistente
Roya	Susceptible
Mustia hilachosa	Susceptible
Antracnosis	Susceptible
Bacteriosis común	Tolerante
Altas temperaturas	Tolerante
Humedad limitada	Tolerante

Fuente: (CENTA 2008).

2.1.7. Regeneración *in vitro* de frijol

La regeneración *in vitro* de células y tejidos vegetales en los cultivos se realiza por diversos factores: la producción de plantas de sanidad controlada; la independencia del clima, suelo, distribución geográfica; la capacidad de establecer un sistema de producción definido; el cultivo de especies no domesticadas o difícil de cultivar; la conservación de germoplasma; programas de mejoramiento genético; la producción de plantas transgénicas que resistan a patógenos (Llorente 2002).

El frijol común es el género de *Phaseolus* más cultivada a nivel mundial, sin embargo, con frecuencia se considera que la regeneración *in vitro* del frijol común es difícil debido a su recalcitrancia. Además, su capacidad regenerativa y su respuesta a las condiciones de cultivo dependen en gran medida del genotipo y dificultan la aplicación de la ingeniería genética (Hnatuszko *et al.* 2019).

2.1.8. Importancia del establecimiento de un protocolo de desinfección para cultivo *in vitro*

Una de las mayores dificultades para el establecimiento de cultivos *in vitro*, es la presencia de microorganismos contaminantes que afectan el material vegetal tanto endógenos como exógenos, estos afectan el desarrollo y la viabilidad de los explantes una vez que se han establecido *in vitro*, por lo que se requiere establecer protocolos que conlleven a mejorar, minimizar o erradicar dichos microorganismos sin afectar la viabilidad de los explantes (García *et al.* 2015).

Por lo que se necesita trabajar en lugares adecuados en los cuales se reproduce las condiciones de temperatura y fotoperiodo, además de factores que se puedan mantener controlados, ya que esta es una técnica que exige un control absoluto del ambiente, tanto físico (temperatura, luz, y fotoperiodo) como químico (composición del medio y pH), en el

que se sitúa el explante. Para asegurar un ambiente aséptico la siembra de explantes se realiza dentro de una cámara de flujo laminar, que permite trabajar estérilmente ya que filtra el aire del ambiente dentro del área de la cámara. Se debe esterilizar los medios de cultivo y desinfectar superficialmente el material vegetal con agentes químicos como el etanol, hipoclorito de sodio o el hipoclorito de calcio que son los más utilizados (Navarro 2005).

2.1.8.1. Ventajas de la técnica del cultivo *in vitro*

Una de las grandes ventajas del cultivo *in vitro* es la enorme capacidad de multiplicación a escala industrial, permitiendo obtener en un solo proceso estructuras completas con ápice y raíz, que pueden ser almacenadas y encapsuladas perfectamente con las condiciones ambientales requeridas (Narváez 2009).

2.1.9. Selección del explante

La selección del explante es un aspecto clave para tener éxito en el Cultivo de Tejidos, ya que dependiendo de su ubicación en la planta, del tipo de tejido que contiene, de su edad cronológica y fisiológica, de su contenido endógeno de hormonas, entre otros, se comportará de una manera o de otra (Albarracín 2012).

2.1.10. Protocolos de desinfección

Los procesos de desinfección son seleccionados a partir del explante que se desea trabajar, existen productos asépticos que sus mecanismos de acción pueden comprometer algunos tejidos del explante; como la oxidación (Villamizar 2005).

Existen varios compuestos químicos que son utilizados en tejidos vegetales en protocolos de desinfección, los más utilizados son Etanol al 70%, Hipoclorito de sodio y soluciones jabonosas. Entre los menos utilizados se encuentran Cloruro de mercurio al 1-1.5% o hipoclorito de calcio al 6-12%, el nitrato de plata, peróxido de hidrogeno y el uso de tenso activo como el Tween 80 o soluciones yodadas. Como complementos en el protocolo de desinfección se adicionan diferentes antibióticos y antifúngicos para garantizar la asepsia de los explantes durante el proceso de propagación (Mroginski y Roca 1991).

2.1.11. Medios de cultivo

La composición de los medios de cultivo dependerá exclusivamente del objetivo trazado y el tipo de planta a propagar. Entre los componentes que se debe tener un medio de cultivo se encuentran los Macronutrientes (C, H, O, P, K, O, S, Ca y Mg); los micronutrientes (Zn, Cu, Mo, etc.); las vitaminas y los reguladores de crecimiento. El medio de cultivo más

utilizado es el medio basal MS (Murashige & Skoog), en el cual se puede trabajar con la mayoría de explantes, modificándose según la necesidad (Villamizar 2005).

Los reguladores de crecimiento vegetal son compuestos sintetizados químicamente u obtenidos de otros organismos, son similares a las fitohormonas y cumplen un papel importante en la regulación de diferentes procesos bioquímicos a nivel celular en los organismos vegetales (Alcántara *et al.* 2019).

Auxinas son un tipo de fitohormonas especializadas en diferentes procesos a nivel vegetal. Los principales puntos de acción se encuentran a nivel celular, donde tienen la capacidad de dirigir e intervenir en los procesos de división, elongación y diferenciación celular (George *et al.* 2008).

Dentro de las auxinas más conocidas a nivel vegetal se encuentra el ácido 3-indolacético (AIA) que es la principal auxina producida de manera natural, aunque también se conocen otro tipo de auxinas que son producidas de manera sintética como el ácido indol-butírico (IBA), el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el ácido α -naftalenacético (NAA) (George *et al.* 2008).

Existen varias vitaminas utilizadas en procesos de micropropagación, entre las cuales la más utilizada es la vitamina C o ácido cítrico por su acción antioxidante en los explantes (Benítez 2006).

2.1.12. Carbón activado

La adición de carbón activado en el cultivo de tejidos posee un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas, debido a la capacidad de captar diversos tipos de moléculas, sustancias en exceso, y en algunos casos inhibidores de crecimiento. La capacidad de adsorción se debe a su delicada red de poros y su amplia área interna, lo cual propone la posibilidad que este pueda liberar lentamente alguno de los reactivos adsorbidos, por lo que favorece la respuesta en el cultivo de tejidos de importancia (Thomas 2008).

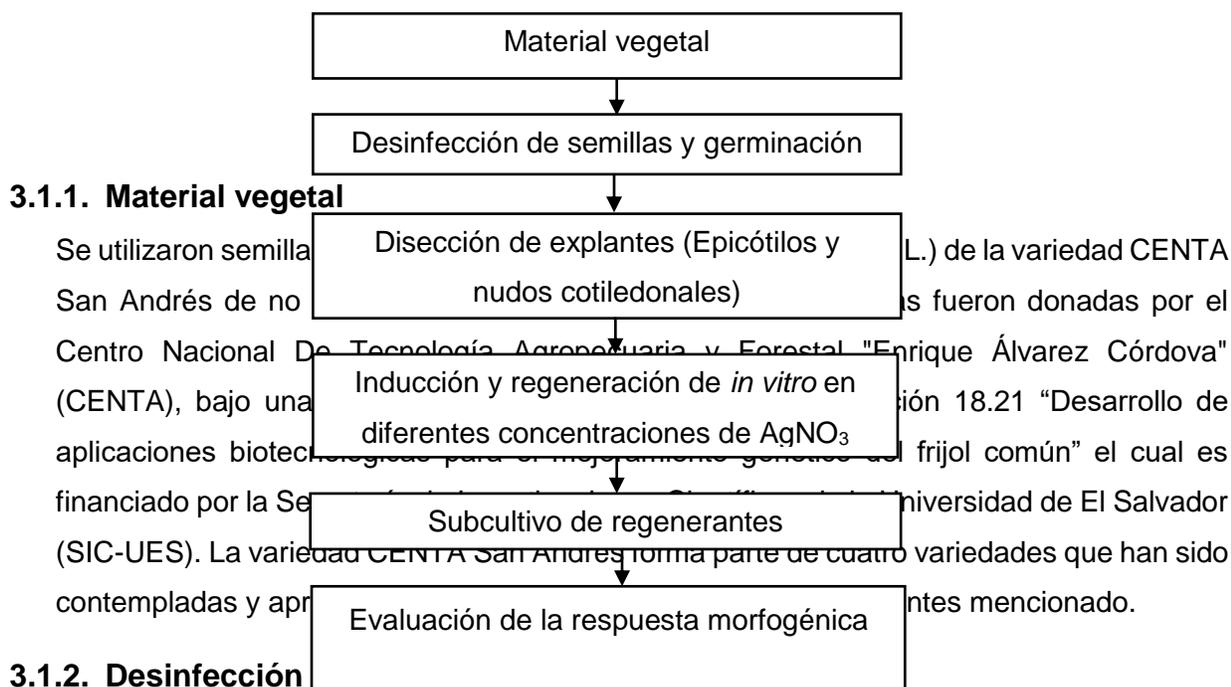
En algunos cultivos la adición de carbón activado al medio de cultivo permite reducir los días a la germinación e incrementar el número de brotes obtenidos por planta. Además, de un mayor incremento de longitud de tallo, número de brotes por planta, número de hojas por planta y longitud de la hoja se da durante las primeras semanas de cultivo (Vaca *et al.* 2018).

3. DESARROLLO DE LA PASANTIA

3.1. Descripción del estudio

La investigación se llevó a cabo a partir del 27 de mayo del 2022 hasta el 30 de noviembre del 2022, y se realizaron actividades como se describe en la (Figura 1) en el Área de Cultivo de Tejidos del Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador. La ubicación geográfica del laboratorio es 13°43'06" Norte y 89°12'11" Oeste.

Figura 1. Eluiograma de las actividades de la investigación donde se presentan los pasos **Efecto de nitrato de plata (AgNO_3) en la regeneración *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad CENTA San Andrés.**



3.1.2. Desinfección

En una cámara de flujo laminar, 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 10 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 + 3g.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 a temperatura ambiente.

3.1.3. Disección de explantes

Posteriormente a la germinación, se disectaron los nudos cotiledonales y epicótilos para la obtención de los explantes con ayuda de pinzas y bisturí estériles en cámara de flujo laminar.

3.1.4. Inducción y regeneración *in vitro* en diferentes concentraciones de AgNO₃

Una vez disectados los explantes (epicótilos y nudos cotiledonales) fueron colocados en cajas Petri cinco explantes por caja con tres cajas por repetición y cinco repeticiones por tratamiento que contenían diferentes concentraciones de nitrato de plata a evaluar (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 g/L⁻¹ de sacarosa, 3 g.L⁻¹ de Carbón activado, 6 g.L⁻¹ de agar, 2.5 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP) y diferentes concentraciones de AgNO₃: 0.42, 1.69 y 4.25 mg.L⁻¹ (Cuadro 2). 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 (AgNO₃) para la regeneración de nudos cotiledonales y epicótilos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) Var. CENTA San Andrés.

Explante	Dosis de AgNO ₃ (mg. L ⁻¹)	Referencia
	0.00	
Nudo cotiledonal	0.42	Drisyá, Siril y Nair (2019)
	1.69	Cruz de Carvalho <i>et al.</i> (2010); Hnatuszko-Konka <i>et al.</i> (2019).
	4.23	Alan y Anis (2019).
	0.00	
Epicótilo	0.42	Drisyá, Siril y Nair (2019)

	1.69	Cruz de Carvalho <i>et al.</i> (2010); Hnatuszko-Konka <i>et al.</i> (2019).
	4.23	Alan y Anis (2019).

Fuente: Elaboración propia.

3.1.5. Subcultivo de regenerantes

El subcultivo se realizó a los 28 días de haber montado el ensayo, para lo cual los explantes se cultivaron en cajas Petri con 25mL de medio de cultivo por tratamiento.

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.

3.1.6. Evaluación de la respuesta morfogénica

A los 42 días de iniciado el ensayo, se evaluó la respuesta morfogénica de los explantes. Se contabilizó el número de explantes que respondieron positivamente a la regeneración mediante la formación mediante alguno de los siguientes indicadores: presencia de brotes, hojas, raíces o callos.

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 *et al.* 2019).

3.2. Análisis estadístico

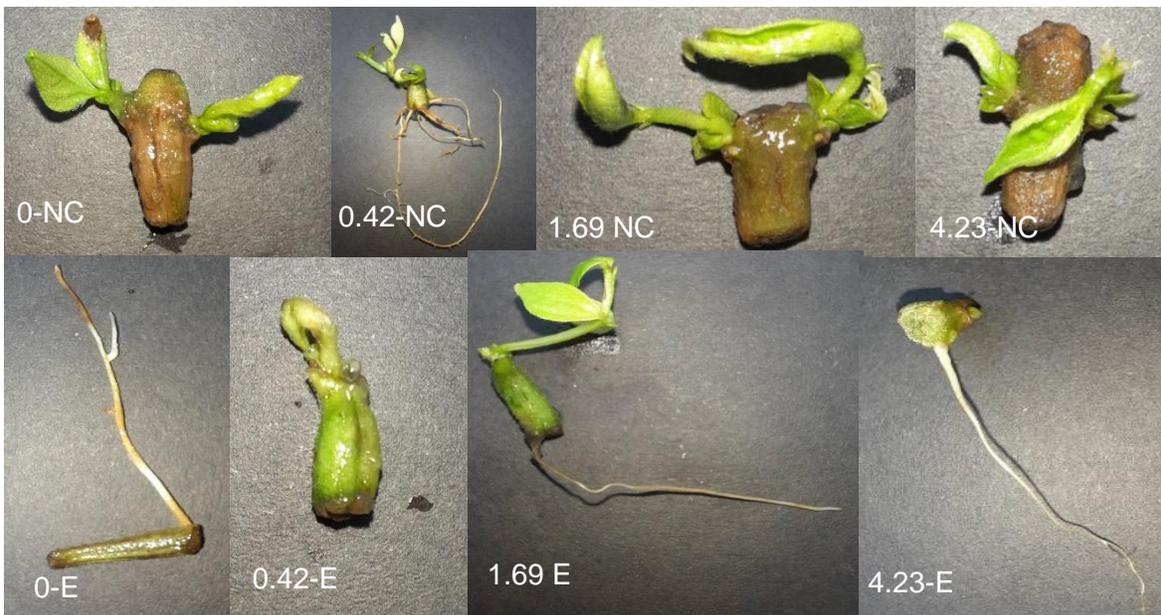
En términos de registro, análisis y determinación relacional de los datos sobre la eficiencia de regeneración *in vitro* vía organogénesis directa de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad CENTA San Andrés, se utilizó la estadística inferencial, además; estadísticos como, representaciones gráficas, 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 las pruebas estadísticas de Kolmogórov-Smirnov y Levene.

Cada tratamiento tuvo cinco repeticiones y cada repetición consistió en tres placas Petri con cinco explantes cada uno. Fueron 75 explantes por tratamientos y 750 en total.

4. RESULTADOS

La respuesta a la regeneración *in vitro* de los tejidos de *Phaseolus vulgaris* L. var. CENTA San Andrés mediante el uso de nitrato de plata (AgNO_3) fue observada mediante la estimulación del desarrollo de diferentes estructuras organogénicas en los nudos cotiledonales y epicótilos (Figura 2). Se observaron brotes principalmente hojas pequeñas y raíces para ambos explantes (Figura 2, 0.42 NC y 1.69 E). Cabe destacar que no se observaron callos. Al momento de la evaluación (42 días) el tejido original de la mayoría de los explantes se tornó color marrón o necrótico (Figura 2, 0-NC, 1.69-NC, 4.23-NC, 0-E, 0.42-E). Interesantemente, en los epicótilos se generaron principalmente raíces pequeñas tal y como se observa en la Figura 2.



En la regeneración presentada de los diferentes explantes

de la var. CENTA San Andrés se encontró que la mayoría de las dosis (0, 0.42 y 1.69 mg.L^{-1} de AgNO_3) tuvieron un comportamiento similar en nudos cotiledonales, los cuales se mantuvieron en un rango de 85 – 88% de eficiencia de regeneración, a excepción de la dosis con 4.23 mg.L^{-1} de AgNO_3 , la cual presentó una marcada disminución de la eficiencia de regeneración del 48%. Esto quiere decir que la ausencia de Nitrato de plata, así como la adición de 0.42 y 1.69 mg.L^{-1} de AgNO_3 producen los mismos efectos en la regeneración organogénica de los explantes nudos cotiledonales de la var. CENTA San Andrés. Por otro lado, en el caso de los epicótilos se mantiene un porcentaje entre 8 – 10% independientemente de la concentración de nitrato de plata utilizada en el medio de cultivo

(Figura 3). Esto, nuevamente indica que el nitrato de plata no produce ninguna mejora en la regeneración *in vitro* de epicótilos de dicha variedad.

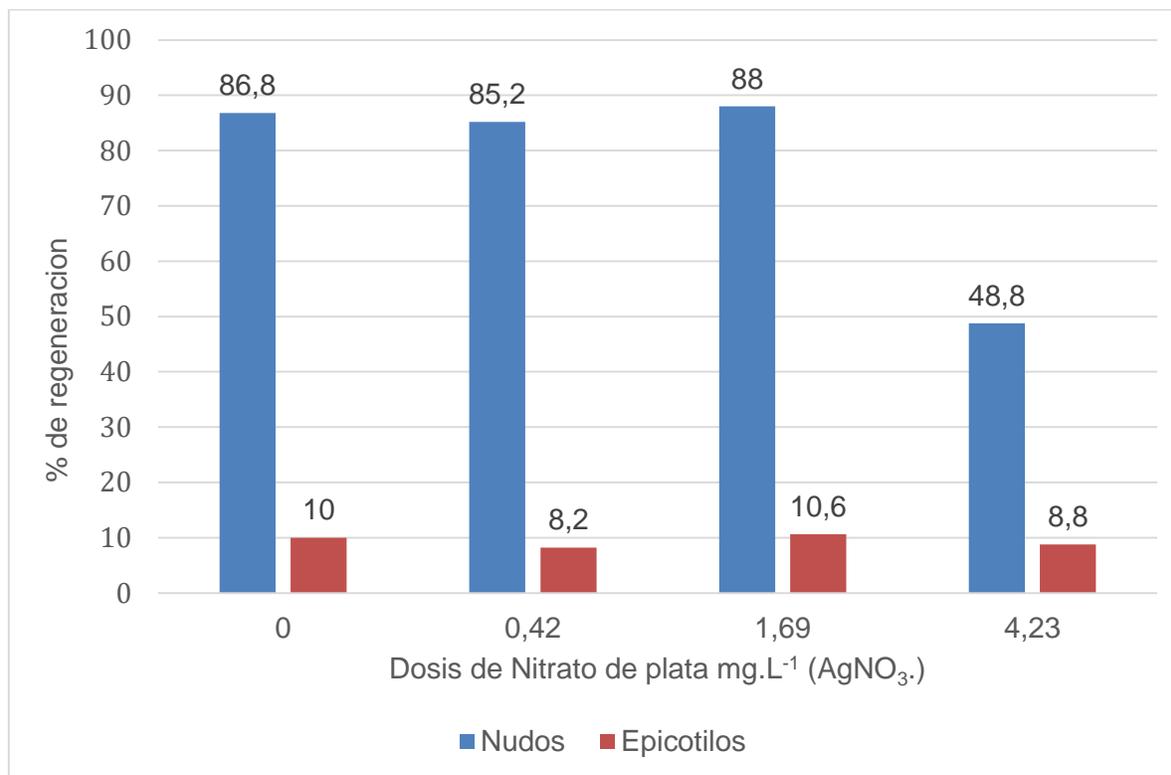


Figura 3. Eficiencia de regeneración *in vitro* de nudos cotiledonales y epicótilos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) Var. CENTA San Andrés en diferentes dosis de AgNO₃.

Estadísticamente, mediante el análisis de ANOVA (p-valor de 2.43e-15) se observaron diferencias significativas en cuanto al tipo de explante (Cuadro 3). Esto indica que la regeneración de la Variedad de frijol CENTA San Andrés está fuertemente influenciada por el tipo de explante y que los nudos cotiledonales son superiores en regeneración con respecto a los epicótilos.

Adicionalmente, mediante el análisis de ANOVA (p-valor de 0.0138) no se observaron diferencias significativas en cuanto a las diferentes concentraciones de nitrato de Plata (Cuadro 3). Esto indica que la regeneración de la Variedad de frijol CENTA San Andrés no mejora con la adición de AgNO₃ al medio de cultivo.

Con respecto a la Interacción explante – nitrato de plata, se utilizó el análisis de ANOVA (p-valor de 0.0204) y no se encontró diferencias significativas. Esto indica que no hay relación o dependencia de la adición de nitrato de Plata con el tipo de explante en cuanto a la regeneración (Cuadro 3).

Cuadro 3. 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 San Andrés bajo un análisis de varianza (ANOVA) y un arreglo factorial 2x4.

¹ Error estándar de la media. *** Significativo al 0.01

Variable	Tipo de Explante	Dosis de AgNO_3 (mg.L ⁻¹)				P-valor			
		0	0.42	1.69	4.23	EEM ¹	Explante	Dosis	Interacción explante x dosis
Eficiencia de regeneración (%)	Nudos	86.8	85.2	88	48.8	6.13	2.43e-15 ***	0.0138	0.0204
	Epicótilos	10	8.2	10.6	8.8				

5. DISCUSION

A pesar del progreso en el desarrollo de protocolos de cultivo de tejidos en numerosas especies vegetales, *Phaseolus vulgaris* L. ha permanecido recalcitrante para la regeneración *in vitro*. En este sentido existen múltiples reportes de la recalcitrancia de frijol y sus intentos por encontrar un sistema eficiente de regeneración para esta especie y sus múltiples cultivares (Cruz de Carvalho *et al.* 2010; Hernández y González 2010; García *et al.* 2016).

En frijol común, la vía de regeneración es evaluada principalmente mediante la utilización de ejes embrionarios (Gatica *et al.* 2010), yemas múltiples (García *et al.* 2016), epicótilos (Hnatuszko-Konka *et al.* 2019), hipocótilos (Hnatuszko-Konka *et al.* 2019, Cruz de Carvalho *et al.* 2010), nudos cotiledonales (García *et al.* 2016). Sin embargo, se ha identificado que no todos los explantes regeneran de forma positiva o eficiente al cultivo *in vitro* (Quinteros-Jiménez *et al.* 2010; Gatica *et al.* 2010; García *et al.* 2016; Hnatuszko-Konka *et al.* 2019, Cruz de Carvalho *et al.* 2010; García *et al.* 2016; Yu *et al.* 2021).

En este sentido, en la presente investigación se encontró una marcada diferencia en la eficiencia de regeneración *in vitro* del nudo cotiledonal (48% - 88%) con respecto a los epicótilos (8% - 10%). Estos resultados son comparables a los reportados por Gatica *et al.* (2010) quienes reportaron para variedades costarricenses de frijol, con eficiencias en el rango del 7% hasta un máximo de 96% mediante la utilización de ejes embrionarios como explantes. De igual forma Quinteros-Jiménez *et al.* (2010) obtuvieron un amplio rango de eficiencias en el medio Murashige y Skoog (15-73 %). Sin duda, en la presente investigación el explante nudo cotiledonal resultó mejor en la regeneración que el epicótilo para la variedad CENTA San Andrés, lo cual está en sintonía con las demás fuentes que mencionan que la regeneración es dependiente del tipo de explante (Hnatuszko-Konka *et al.* 2019; Dang y Wei 2019).

Adicionalmente, uno de los propósitos de esta investigación fue determinar si la aplicación de nitrato de plata al medio de cultivo mejora la respuesta organogénica de la variedad en estudio. Kwapata *et al.* (2010) demostraron la importancia del nitrato de plata y el carbón activado con el fin de superar la sintetización del compuesto fenólico probando los reactivos por separado y demostró su efecto beneficioso siendo el primero más eficiente. Al respecto, García *et al.* (2016) obtuvieron un porcentaje de eficiencia de 100% cuando utilizaron 2.12 mg.L⁻¹ de AgNO₃ en nudos cotiledonales de *Phaseolus vulgaris* L. En este mismo sentido, Dang y Wei (2019) mejoraron la formación de brotes de nudos cotiledonales en *Phaseolus*

vulgaris L. y lograron superar de 61.3% a 87.6% al ocupar 2 mg.L⁻¹ de AgNO₃. Además, Cruz de Carvahlo *et al.* (2010) mediante la disección de cortes milimétricos de diferentes secciones de embriones germinados (epicotilos, hipocótilos, nudos cotiledonales) obtuvieron un porcentaje de eficiencia de 100% al utilizar 1.69mg. L⁻¹ de AgNO₃. En el presente estudio con la variedad CENTA San Andrés no se encontró evidencia que la adición de alguna dosis de nitrato de plata al medio de cultivo mejore la eficiencia de regeneración a esta variedad como ha sido el caso de los reportes anteriormente mencionados.

Adicionalmente, Cruz de Carvahlo *et al.* (2010) evaluaron la utilización del nitrato de plata (1.69mg.L⁻¹) junto con el carbón activado (3g.L⁻¹) adicionados al medio de cultivo y encontraron que para frijol común la adición de estos antioxidantes combinados o por separado mejora significativamente la regeneración organogénica. En el presente estudio se encontró evidencia que la adición de nitrato de plata no resulto ser significativa sobre la regeneración *in vitro* debido probablemente a la adición combinada del carbón activado el cual estuvo presente en todos los tratamientos incluyendo el testigo (0mg.L⁻¹ de AgNO₃). Esto reafirma lo encontrado por Hnatuszko-Konka *et al.* (2019) quienes lograron mejorar la organogénesis *in vitro* al combinar estos dos antioxidantes (a las mismas concentraciones) en diferentes genotipos del frijol común.

Interesantemente, al agregar 4.23 mg.L⁻¹ de AgNO₃ al medio de cultivo la regeneración *in vitro* de la var. CENTA San Andrés disminuye hasta un 48%. Esto quiere decir que concentraciones iguales o superiores de 4.23 mg.L⁻¹ de AgNO₃ tienen un efecto negativo sobre la regeneración *in vitro* de esta variedad y que por lo tanto no deberían de ser utilizados como antioxidantes en el medio de cultivo.

Esta es la primera investigación sobre regeneración *in vitro* de la var. CENTA San Andrés y cabe mencionar que los datos son preliminares y deben ser corroborados con diferentes ensayos para observar el verdadero comportamiento de la variedad en presencia en nitrato de plata, así como la evaluación del carbón activado de forma aislada como antioxidante en el medio del cultivo.

6. CONCLUSIONES

- Para la variedad de frijol CENTA San Andrés, los nudos cotiledonales (48% - 88%) regeneran más eficientemente en condiciones *in vitro* en comparación con los epicotilos (8% - 10%).
- La adición de nitrato de plata en el medio de cultivo MS no mejora la organogénesis *in vitro* de la variedad CENTA San Andrés
- Concentraciones iguales y probablemente superiores de 4.23 mg.L⁻¹ de AgNO₃ tienen un efecto negativo sobre la regeneración *in vitro* de esta variedad.
- El carbón activado suplementado en el medio de cultivo a razón de 3 g.L⁻¹ parece contribuir a la mejora de la regeneración *in vitro* del frijol común, por lo que en esta investigación no se pudo determinar el efecto aislado del AgNO₃ en la var. CENTA San Andrés .

7. RECOMENDACIONES

- Utilizar nudos cotiledonales como explantes para la morfogénesis y regeneración de la variedad de frijol CENTA San Andrés.
- Evaluar otros tipos de explantes con el objetivo de tener una base de datos más sólida que permitan establecer el protocolo más eficiente de regeneración de esta variedad.
- Evaluar los efectos del carbón activado por separado de nitrato de plata para determinar el mejor antioxidante a utilizar en la variedad CENTA San Andrés.
- Al ser una evaluación preliminar se sugiere repetir el ensayo tomando como base los resultados obtenidos.

8. BIBLIOGRAFIA

- 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
- Albarracín Acosta, CP. 2012. Evaluación de la eficiencia de un sistema de inmersión temporal frente al método de propagación convencional en la multiplicación *in vitro* de cilantro cimarrón (*Eryngium foetidum*) a partir de hojas, yemas y segmentos nodales. Tesis Ing. Bi Albarracín Acosta, CP. 2012. Evaluación de la eficiencia de un sistema de inmersión temporal frente al método de propagación convencional en la multiplicación *in vitro* de cilantro cimarrón (*Eryngium foetidum*) a partir de hojas, yemas y segmentos nodales. Tesis Ing. Biotecnología. Sangolquí, EC, 203 p.
- Alcántara Cortes JS; Acero Godoy J; Alcántara Cortés JD; Sánchez Mora RM. 2019. Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. En línea. Consultado 11 de mar. 2022. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v17n32/1794-2470-nova-17-32-109.pdf>
- Apezzato, B. y Machado, S.R. Ultraestructural analysis of *in vitro* direct and indirect organogenesis. Revista Brasil. Bot., 2004, vol. 27, no. 3, p. 429-437.
- Aragão, FJL; Ribeiro, SG; Barros, LMG; Brasileiro, ACM; Maxwell, DP; Rech, EL; Faria, JC. 1998. Transgenic beans (*Phaseolus vulgaris* L.) engineered to express viral antisense RNAs show delayed and attenuated symptoms to bean golden mosaic geminivirus. Molecular Breeding 4(6):491-499.
- Arellano, J; Fuentes, S; Castillo España, P; Hernández, G. 2009. Regeneration of different cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) via indirect organogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 96(1):11-18.
- Babot, M; Oliszewski, N; Grau, A. 2007. Análisis de caracteres macroscópicos y microscópicos de *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae, Faboideae) silvestres y cultivados del noroeste argentino: una aplicación en arqueología botánica. En línea. Consultado 6 mar. 2022. Disponible en: http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:42EylrWg7TMJ:www.scielo.org.ar/scielo.php%3Fpid%3DS0011-67932007000200001%26script%3Dsci_arttext+%&cd=2&hl=es&ct=clnk&gl=sv

- Beebe. S. E. Rao. I. M. Blair. M. W. & Acosta Gallegos JA. (2013). Phenotyping common beans for adaptation to drought. *Font Physiol*, 4, 1-20. doi:10.3389/fphys.2013.00035.
- Blair, MW; Galeano, CH; Tovar, E; Torres, MCM; Castrillón, AV; Beebe, SE; Rao, IM. 2012. Development of a Mesoamerican intra-gene pool genetic map for quantitative trait loci detection in a drought tolerant susceptible common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cross. *Molecular Breeding*. 29(1):71-88.
- 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 Agropecuaria y Forestal). 2008. Guía Técnica para el Manejo de Variedades de Frijol. Programa de Granos Básicos. San Andrés, La Libertad, El Salvador, C.A.
- 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 mar. 2022. Disponible en: <http://www.centa.gob.sv/docs/guias/granos%20basicos/Guia%20Tecnica%20Frijol.pdf>
- 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 mar. 2022. Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/3607/2/TESIS%20DE%20FRIJOL.pdf>
- CENTA. 2018. Variedad de frijol negro brillante “CENTA Tacuba”. En línea. Consultado 08 mar. 2022. Disponible en: <http://centa.gob.sv/docs/guias/granos%20basicos/DOCUMENTO%20T%3%89CNICO%20CENTA%20TACUBA.pdf>
- CENTA. 2019. CULTIVO DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.). En línea. Consultado mar. 2022. Disponible en: http://centa.gob.sv/docs/guias/granos%20basicos/Guia%20Centa_Frijol%202019.pdf
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1983. Variedades de frijol en América Latina y su origen. (en línea). Consultado el 06 mar. 2022. PDF. Disponible en: http://ciat-library.ciat.cgiar.org/articulos_ciat/digital/SB327.V67_Variedades_de_fr%C3%ADjol_en_Am%C3%A9rica_Latina_y_su_origen.pdf

- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1986. Etapas de desarrollo de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). En línea. Consultado 08 mar. 2022. Disponible en: http://ciat-library.ciat.cgiar.org/ciat_digital/ciat/28093.pdf
- Collado, R; Veitía, N; Bermúdez-Caraballosa, 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, M, Van Le, B, Zuily Fodil, Y, T. Pham Thi, A, Tran Thanh Van, K. 2000. Regeneración eficiente de toda la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) usando cultivo de capa celular delgada y nitrato de plata. *Plant Sci* 159 (2000) 223–232
- 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
- 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 Science* 159(2):223-232. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00346-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00346-0).
- 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
- Dang, W. & Wei, ZM. 2009. Regeneración de plantas de alta frecuencia a partir del nudo cotiledóneo del frijol común. *Biol. Planta*.53, 312–6.
- Díaz Gálvez, MG. 2001. Caracterización genética de la resistencia del frijol común a la mancha angular. En línea. Consultado 6 mar. 2022. Disponible en: <http://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/1438/1/T1296.pdf>
- 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>.

- Eissa, E, Bisztray G, Velich I. 2002. Regeneración vegetal a partir de plántula de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Actas del VII Congreso Húngaro de Fisiología Vegetal. Acta Biologica Szegediensis 46 (3-4): 27 - 28.
- Estrada, G; Guillén, G; Olivares, JE; Díaz, C; Alvarado, X; Sánchez, F. 2007. La transformación genética y genómica del frijol. Biotecnología. 14:281-290.
- 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 mar. 2022. Disponible en: <http://www.acqweather.com/FAO%20EFECTOS%20DE%20LOS%20DESASTRES.pdf>
- Gamborg, OL; Miller, RA; Ojima, K. 1968. Requerimientos de nutrientes de cultivos en suspensión de células de raíz de soja. Exp. Cell Res.50:151-158.
- García, EH; Peña, CB; Aguirre, JR; Muruaga, JR. 1997. Morphological and Agronomic Traits of a Wild Population and an Improved Cultivar of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) (en línea). Annals of Botany 79: 207-213. En línea. Consultado 6 mar. 2022. Disponible en: <http://aob.oxfordjournals.org/content/79/2/207.full.pdf>
- García, LR; Pérez, J; Kosky, RG; Bermúdez-Carabaloso, I; Veitía, N; Collado, R; Padrón, Y; Torres, D; Romero, C; Reyes, M. 2010. Regeneración de plantas vía embriogénesis somática en *Phaseolus acutifolius* A. Gray. Biotecnología Vegetal. 10(3):143-149.
- García, LR; Collado, LR; Bermúdez-Carabaloso, I; Veitía, N; Torres, D; Romero, C; Rojas, L. 2026. Sistemas de regeneración de *Phaseolus vulgaris* L. y su aplicación en la transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens*. Biotecnología Vegetal. 06: 1-3.
- Gatica Arias, AM; Muñoz Valverde, J; Ramírez Fonseca, P; Valdez Melara, M. 2010. *In vitro* plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): effect of N6-benzylaminopurine and adenine sulphate. Electronic Journal of Biotechnology 13(1):6-7.
- George EF, Hall MA, Klerk GJ De. Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors. In: Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition. 2008. p. 1–501.
- Gepts, P. 2001. Origins of plant agriculture and major crop plants. In: Our Fragile World, forerunner volumes to the Encyclopedia of Life-Supporting Systems, MK Tolba (ed.), EOLSS Publishers, Oxford, UK. Vol. 1, pp. 629-637

- Gómez Posada, S. 2007. Fitomejoramiento. Pereira, CO. En línea. Consultado 1 mar. 2022. Disponible en: http://datateca.unad.edu.co/contenidos/30162/Curso_de_Fitomejoramiento/protocolo.html
- 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.
- Hernández, G, Lara M, Elia D, Avendaño O. 2002. Avances recientes hacia la transformación de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) mediada por *Agrobacterium*. Primera conferencia internacional sobre genómica y genética de leguminosas: traducción al mejoramiento de cultivos, EE. UU. En línea. Consultado 6 mar. 2022. Disponible en: http://www.agro.agri.umn.edu/iclgg/All_Abstracts.htm
- Hernández, Y, González, M. 2010. Effect of oxidation microbial contamination and phenol in vitro establishment of perennial fruit. En línea. Consultado 6 jul. 2023. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000400015
- Hnatuszko-Konka, K, Kowalczyk, T, Gerszberg, A, Glinska, S, Grzegorzczak-Karolak, I. 2019. Regeneración de *Phaseolus vulgaris* de epicótilos e hipocótilos vía organogénesis directa. *Scientific reports*. Pág. 8 - 10
- IICA. 2014. Cadenas de valor de maíz blanco y frijol en Centroamérica: actores, problemas y acciones para su competitividad. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Cooperación Suiza en América Central. En línea. Consultado 12 mar. 2022. Disponible en: <http://repiica.iica.int/docs/b3540e/b3540e.pdf>
- Jiménez Chavarría, M. 2008. Descripción morfológica e histológica del desarrollo ontogénico del eje embrionario cigótico de cuatro variedades costarricenses de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) bajo condiciones de cultivo *in vitro*. En línea. Consultado 11 mar. 2022. Disponible en: www.biologia.ucr.ac.cr/TesisLic/MarisolJimenez.pdf
- Kwapata, K, Sabzikar R, Sticklen MB, Kelly JD. 2010. *In vitro* regeneration and morphogenesis studies in common bean. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 100: 97_105
- León, J. 2000. Botánica de los cultivos tropicales. En línea. Consultado 6 mar. 2022. Disponible en: https://books.google.com.sv/books?id=NBtu79LJ4h4C&pg=PA191&lpg=PA191&dq=ramificacion+del+frijol&source=bl&ots=_ebAMpYrSE&sig=JRM11BgiqYI7GNmDb7NvNI0hAgA&

hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwju6laOzPLLAhUCHB4KHxfOBSUQ6AEIGjAA#v=onepage&q=amifacion%20del%20frijol&f=false

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.

Llorente. 2002. Cultivo *in vitro*: cultivo de células y tejidos vegetales. En línea. Consultado 04 mar. 2022. Disponible en: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/4_Cultivo_in_vitr0.pdf

MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería). 2012. En línea. Consultado 04 mar. 2022. Disponible en:

http://old.mag.gob.sv/index.php?option=com_phocadownload&view=category&download=345:informe-de-encuesta-de-intenciones-de-siembra-de-granos-basicos-2012&id=19:informes-de-primera-encuesta-agropecuaria-de-propositos-multiples&Itemid=227

MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería, SV); ENAPM (Encuesta Nacional Agropecuaria de Propósitos Múltiples, SV). 2014. Anuario de estadísticas agropecuarias (DEA): precios de mercado. En línea. Consultado 6 mar. 2022. Disponible en: http://www.mag.gob.sv/index.php?option=com_phocadownload&view=category&id=14:anuarios-agropecuarios&Itemid=224

MAG. 2013. Informe de Encuestas de Intenciones de Siembra. San Salvador: Ministerio de Agricultura y Ganadería de El Salvador. En línea. Consultado 08 mar. 2022. Disponible en: <http://www.mag.gob.sv/>

Mohamed, M, Read P, Coyne D. 1992. El reacondicionamiento oscuro, CPPU y tidiazurón 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

Mroginski, L; Roca, WM. 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. En línea. Consultado 24 de mar. 2022. Disponible en: <https://cgspace.cgiar.org/handle/10569/54686>

Narváez, GS. 2009. Regeneración de brotes a partir de hojas provenientes de plantas *in vitro* de rosa variedad Akito (Rosa sp. Var Akito). Sangolquí.

- Navarro, M. 2005. determinación de una metodología de desinfección y un medio de cultivo para la introducción y micropropagación *in vitro* de 12 eco tipos de Ají (*Capsicum sp.*) y cuatro de tomate (*Solanum betaceum*). Tesis ing agro. Latacunga, Ecuador. Universidad Técnica de Cotopaxi. 20p
- Popelka, J, Terry N, Higgins TJV. 2004. Tecnología genética para leguminosas de grano: ¿puede contribuir al desafío alimentario en los países en desarrollo? *Ciencia de las plantas* 167: 195 – 206
- Radeva, M, Lilota D. 2005. Regeneración *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* L. mediante organogénesis a partir de explantes de pecíolos. *Revista de Agricultura de Europa Central*. 6 (1): 53 – 58
- Ramazini, H; Fuentes, R; Arévalo, A; Figueroa, I. 1997. Respuesta del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a la regeneración de planta in vitro. San Carlos, Guatemala. 23p.
- Rosales-Serna. R. Ramírez-Vallejo. P. Acosta Gallegos JA. Castillo-González. F. & Kelly. J. D. 2000. Grain yield and drought tolerance of common bean under field conditions. *Agrociencia*, 34(2), 153-165.
- Sharma, KK; Lavanya, M. 2002. Recent developments in transgenics for abiotic stress in legumes of the semi-arid tropics. *JIRCAS Working Report No. 23* 23:61-73.
- Solís-Ramos, L; González-Estrada, T; Nahuath-Dzib, S; Zapata-Rodriguez, L; Castaño, E. 2009. Overexpression of WUSCHEL in *C. chinense* causes ectopic morphogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 96(3):279-287.
- Superintendencia de Competencia. 2015. Caracterización de la agroindustria del frijol rojo y sus condiciones de competencia en El Salvador (2007-2014). En línea. Consultado 08 mar. 2022. Disponible en: https://www.sc.gob.sv/wp-content/uploads/estudios_IE/estudios_PDF/Estudio_Frijol.pdf
- 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.
- Thomas D. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances*. 2008 (26):618–31.

- 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 mar. 2022. Disponible en: <http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-08/1.pdf>.
- Vaca, I; Marulanda, M; Verdesoto, J; Nuñez, A; Acurio, R; Chiluisa-Utreras, V. Efecto del carbón activado en la germinación y brotación *in vitro* de *Citrus limón* (L.) y su dinámica de crecimiento. Consultado 17 sep. 2023. Disponible en: <https://www.revistabionatura.com/files/2018.03.03.5.pdf>
- Varisai-Mohamed, S, Sung JM, Jeng TL, Wang CS. 2006. Organogénesis 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.
- Villamizar, EA. 2005. Estandarización del protocolo *in vitro* para el establecimiento de encenillo (*Weinmannia tomentosa*) y el rodante (*Escallonia mytilloides*) en el laboratorio de cultivos del jardín botánico José Celestino Mutis. Colombia.
- Vuylsteke, D, Ortiz R, Ferris S, Crouch J. 1997. Mejoramiento del plátano. *Revista de fitomejoramiento*. 14: 267-320.
- White. J. W. Ochoa. R. M. Ibarra. F. P. & Singh. S. P. 2009. Inheritance of seed yield, maturity and seed weight of common bean (*Phaseolus vulgaris*) under semi-arid rainfed conditions. *J Agr Sci*, 122(02), 265. doi:10.1017/S0021859600087451.
- Zambre, M; Goossens, A; Cardona, C; Van Montagu, M; Terryn, N; Angenon, G. 2005. A reproducible genetic transformation system for cultivated *Phaseolus acutifolius* (teparý bean) and its use to assess the role of arcelins in resistance to the Mexican bean weevil. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 110(5):914-924.
- Zelada, LI. 2014. La producción y comercialización del frijol en El Salvador (en línea). Consultado 05 feb. 2021. Disponible en: <http://revistas.ues.edu.sv/index.php/coyunec/article/view/416>

9. ANEXOS



Figura A - 1. Realización de subcultivo de los diferentes explantes en la Cámara de Flujo Laminar.

Tratamientos	Nitrato de Plata (AgNO ₃) mg/L	Tipo de explante	Repeticón 1	Repeticón 2	Repeticón 3	Repeticón 4	Repeticón 5
1	0	Nudo cotiledonal	*				
2	0.42						
3	1.69						
4	4.23						
1	0	Epicotilio					
2	0.42						
3	1.69						
4	4.23						

Figura A - 2. Diferentes dosis de AgNO₃ y tipo de explante para la evaluación de la respuesta morfológica a la regeneración in vitro de *Phaseolus vulgaris* L. var. CENTA San Andrés.

Cuadro A - 1. Efecto del nitrato de plata (AgNO₃) en la regeneración in vitro de nudos cotiledoneales y epicótilos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) Var. CENTA San Andrés.

Explante	Concentración de AgNO ₃ (mg.L ⁻¹)	Repeticiones	Porcentaje de regeneración (%)
Nudo Cotiledonal	0	1	100
	0.42	1	93
	1.69	1	80
	4.23	1	67
	0	2	87
	0.42	2	73
	1.69	2	80
	4.23	2	87
	0	3	100
	0.42	3	87
	1.69	3	87
	4.23	3	73
	0	4	87
	0.42	4	93
	1.69	4	93
	4.23	4	7
	0	5	60
	0.42	5	80
	1.69	5	100
	4.23	5	10
Epicótilo	0	1	10
	0.42	1	10
	1.69	1	13
	4.23	1	10
	0	2	10
	0.42	2	7
	1.69	2	10
	4.23	2	7
	0	3	10
	0.42	3	10
	1.69	3	10
	4.23	3	7
	0	4	10
	0.42	4	7
	1.69	4	10
	4.23	4	10
	0	5	10
	0.42	5	7
	1.69	5	10
	4.23	5	10