

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 Costeño II”

POR

MARDOQUEO JOEL MONGE RIVERA

RESUMEN DE PASANTÍA DE INVESTIGACIÓN
PRESENTADO COMO REQUISITO PARA OPTAR
AL TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO

CIUDAD UNIVERSITARIA, JUNIO DE 2023

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MSc. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL

MSc. FRANCISCO ANTONIO ALARCÓN SANDOVAL

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

DECANO

DR. FRANCISCO LARA ASCENCIO

SECRETARIO

ING. AGR. BALMORE MARTÍNEZ SIERRA

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

ING. AGRO. MSc. FIDEL ÁNGEL PARADA BERRÍOS

DOCENTES ASESORES

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

ING. AGR. OSCAR ALONSO RODRÍGUEZ GRACIAS

TRIBUNAL EVALUADOR

ING. AGR. BALMORE MARTÍNEZ SIERRA

ING. AGR. JENNY XIOMARA ÁNGEL MOLINA

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

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

ING. AGR. MARIO ALFREDO PÉREZ ASCENCIO

1. RESUMEN

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador, ubicada en la Ciudad Universitaria, Departamento de San Salvador, en el periodo de julio a diciembre de 2022.

El cultivo de tejidos vegetales de *Phaseolus vulgaris* L. siempre se ha considerado difícil. Su capacidad regenerativa y la respuesta a las condiciones de cultivo *in vitro* dependen en gran medida del genotipo, grado de especialización y tipo de explante, medio de cultivo, entre otros.

La baja respuesta a la regeneración *in vitro* se estudió mediante la inducción de estructuras organogénicas a partir de epicotilos y nudos cotiledonales de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L. Var. CENTA Costeño II) en 4 diferentes concentraciones de nitrato de plata (AgNO_3) en medio basal MS (Murashige-Skoog) adicionado con 3 g l^{-1} de carbón activado y 2.5 mg l^{-1} de BAP

Se aplicó el Análisis de Varianza (ANOVA), para un arreglo factorial de 2×4 bajo un Diseño Completamente al Azar (DCA). El efecto significativo de las concentraciones de AgNO_3 se evaluó mediante polinomios ortogonales para determinar la probabilidad de una respuesta lineal o cuadrática.

Como resultado, los nudos cotiledonales de frijol común mostraron una superioridad indiscutible de regeneración sobre los epicotilos. Además, se demostró que la adición de AgNO_3 al medio de cultivo mejora la formación de estructuras organogénicas en frijol común. Por otro lado, se observó la influencia sinérgica positiva del carbón activado y el nitrato de plata en la formación de estructuras organogénicas.

2. AGRADECIMIENTOS

A mis padres por darme la vida y haberme apoyado en todos los aspectos para formarme profesionalmente.

A mi hermana Elizabeth Rivera por apoyarme y estar a mi lado siempre.

Al Ing. Agr. M.Sc Julio Cesar Pavón asesor principal, por su calidad profesional, orientación y enseñanza durante el desarrollo de este proyecto de investigación.

Al Dr. Joaquín Miguel Castro Montoya, docente e investigador de Posgrado de la Facultad de Ciencias Agronómicas por su valioso aporte en el análisis e interpretación de los resultados desde la parte estadística.

A todas aquellas personas que de un modo u otro me han acompañado y ayudado en mis años académicos en la Universidad.

ÍNDICE

1.	RESUMEN	4
2.	AGRADECIMIENTOS.....	5
3.	INTRODUCCIÓN	7
4.	MARCO TEORICO.....	8
4.1	Generalidades del frijol común	8
4.2	Origen del frijol.....	8
4.3	Taxonomía	8
4.4	Morfología de la planta	9
4.5	Fenología y hábitos de crecimiento	9
4.6	CENTA Costeño II.....	10
4.7	Cultivo <i>in vitro</i>	12
4.8	Micropropagación	12
4.8.1	Ventajas de la técnica de micropropagación.....	12
4.9	Organogénesis.....	13
4.10	Recalcitrancia del frijol común	13
4.11	Uso de nitrato de plata en cultivo <i>in vitro</i>	14
5.	DESARROLLO DE LA PASANTÍA.....	16
5.1	Ubicación del laboratorio.....	16
5.2	Material vegetal	17
5.3	Desinfección de semilla y disección de explante	17
5.4	Medios de cultivo	17
5.5	Inducción y regeneración de estructuras morfogénicas.....	18
5.6	Evaluación de la respuesta morfogénica.....	19
6.	RESULTADOS	21
7.	DISCUSIÓN.....	25
8.	CONCLUSIONES	28
9.	RECOMENDACIONES	29
10.	BIBLIOGRAFÍA	30
11.	ANEXOS	36

3. INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una especie de leguminosa la cual está distribuida por todo el mundo y es una de las de mayor importancia (Aragão y Campos 2007). Con el 22% de proteínas, el frijol representa una fuente relevante de nutrientes esenciales para la humanidad y constituye un componente esencial en la dieta de países en desarrollo de Latinoamérica, África y Asia (Gepts *et al.* 2008). 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 (FAO 1989).

El Salvador, aún con su tradición agrícola en la producción de frijol común, no supe completamente la demanda interna de este grano (MAG 2012; Zelada 2014; Superintendencia de Competencia 2015). Esto se ve agravado con el panorama de que en los últimos años a causa del cambio climático (sequías, altas temperaturas e intensas lluvias) se ha incrementado el déficit en la demanda interna. Por tanto, actualmente es indispensable la creación de nuevas variedades de frijol que tengan un alto grado de tolerancia a diversos factores (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).

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) muestra una variación extremadamente alta con respecto a la respuesta a las condiciones de cultivo de tejidos (Hnatuszko-Konka *et al.* 2014). Esta respuesta es dependiente tanto del genotipo, así como del tipo o estado de especialización del explante, célula o tejido y de las condiciones de cultivo (Svetleva *et al.* 2003). Por esto, la regeneración *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* L. plantea el mayor obstáculo y desafío, lo que limita el potencial para un sistema eficiente de transformación genética del frijol común (Kwapata *et al.* 2010).

Uno de los objetivos que se persiguió con esta investigación es evaluar el efecto del nitrato de plata (AgNO_3) en la regeneración *in vitro* de nudos cotiledonales y epicotilos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) Var. CENTA Costeño II. Además, se buscó establecer un protocolo eficiente de regeneración *in vitro* de la variedad CENTA Costeño II, por lo que esta investigación estuvo encaminada a la búsqueda de nuevas metodologías biotecnológicas que sirvan de instrumentos en investigaciones futuras para mejorar genéticamente las variedades de interés nacional como el CENTA Costeño II.

4. MARCO TEORICO

4.1 Generalidades del frijol común

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) perteneciente a la familia de las leguminosas es una especie diploide con 22 cromosomas y un genoma de tamaño mediano (Gepts *et al.* 2008; McClean *et al.* 2008). El género *Phaseolus* incluye cinco especies domesticadas: *P. vulgaris*, *P. lunatus*, *P. acutifolius*, *P. coccineus ssp. coccineus* y *P. dumosus* (Freytag 2002).

4.2 Origen del frijol

Los primeros trabajos sobre el origen y evolución del frijol se remontan a Miranda-Colín (1967) y Gentry (1969), quienes afirmaron que la forma silvestre de frijol se encuentra en Mesoamérica. Posteriormente, se han propuesto centros de origen y domesticación alternativos que trabajos sucesivos han ratificado (Kwak *et al.* 2009). El frijol común comprende dos grupos genéticos, el Mesoamericano y el Andino, que difieren en sus estructuras y niveles de diversidad genética, tanto en poblaciones silvestres como en las domesticadas (Beebe *et al.* 2000, 2001; Papa y Gepts 2003).

4.3 Taxonomía

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*

4.4 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, semipostrado o postrado, 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 (SAG 2004). 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 (CENTA 2015). 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).

4.5 Fenología y hábitos de crecimiento

El desarrollo de la planta de frijol comprende dos fases sucesivas que son: vegetativa y reproductiva (CENTA 2008). 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 (Miranda-Colín 1967). La fase reproductiva termina cuando el grano alcanza el grado de madurez necesario para la recolecta; a pesar

de ser esta fase predominantemente reproductiva, durante ella las variedades indeterminadas continúan, aunque con menor intensidad, la producción de estructuras vegetativas (CIAT 1984).

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.

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: Hábito de crecimiento indeterminado postrado: plantas postradas o semi-postradas con ramificación bien desarrolladas.

Tipo IV: Hábito de crecimiento indeterminado trepador.

4.6 CENTA Costeño II

En el 2007 fueron introducidos en El Salvador los ensayos para sequía y baja fertilidad, PASEBAF-2007, procedentes de la Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano, Honduras. Su origen proviene de las cruces /S/B166/ PRF 9653-16B-1/S/B136/MC-1P-MQ, que experimentalmente fue denominada MDSX 14797-6-1. Con esta denominación fue

validada durante los años 2010/2011 en fincas de agricultores, ubicadas en zonas tradicionales y no tradicionales (altas temperaturas) para el cultivo, donde demostró buenas características agronómicas, adaptabilidad a estas condiciones, tolerancia a plagas y enfermedades, y alto potencial de rendimiento. Por estas características demostradas, la línea MDSX 14797-6-1 se liberó con el nombre de CENTA Costeño II (CENTA 2014).

Entre las características agronómicas más sobresalientes de esta variedad están (CENTA 2014):

Habito de crecimiento:	II-B Indeterminado arbustivo
Días a floración:	35-35
Días a madurez fisiológica:	70-72
Reacción a virus del mosaico dorado:	Resistente
Reacción a virus del mosaico común:	Resistente
Reacción a mancha angular:	Tolerante
Reacción a bacteriosis:	Tolerante
Reacción a mustia hilachosa:	Susceptible
Altas temperaturas:	Tolerante
Humedad limitada:	Tolerante
Color del grano:	Rojo claro
Número de granos por vaina:	6-7
Número de vainas por planta:	16-18
Color de la vaina:	Crema
Peso seco de 100 granos:	26 gramos
Rendimiento potencial:	2,272 kg/ha (35 qq/mz)
Adaptación:	30-1200 msnm

En los años 2007-2008 en ensayos conducidos en siembras de agosto y noviembre en diferentes localidades, la nueva variedad mostró los mayores rendimientos promedio, en

comparación con otras líneas promisorias y variedades locales. Durante los años 2010-2011, fue validada en campos de agricultores donde se obtuvo rendimientos superiores a los testigos locales que fueron utilizados como comparadores.

En las parcelas de validación establecidas, al final de cada ciclo de cultivo, se realizaron evaluaciones participativas con agricultores, donde los resultados de las pruebas de degustación indican que MDSX 14797-6-1 fue preferido por sus características tales como: color del grano, sabor del caldo y mejor rendimiento (CENTA 2014).

4.7 Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* es una técnica biotecnológica que utiliza la totipotencia celular (Sirvent y Belén 2016). El fundamento de este término describe que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece, independientemente de su función (Hnatuszko-Konka et al. 2014). La respuesta de totipotencia celular de regeneración de plantas ocurre en presencia de niveles de citoquininas y auxinas apropiados para el cultivo que se vaya a utilizar (Criollo et al. 2016).

El término genérico “cultivo de tejidos vegetales” involucra a diferentes técnicas de cultivo de material vegetal diverso, lo que incluye a los protoplastos (células desprovistas de su pared celular), células, tejidos, órganos y plantas completas (Cañal et al. 2001). También se lo conoce como “cultivo *in vitro* de plantas” por realizarse en recipientes de vidrio (hoy también de otros materiales) (Domenech 2011)

4.8 Micropropagación

La micropropagación es una de las aplicaciones del cultivo *in vitro* de plantas, con la que se pretende la obtención de clones, es decir de plantas genotípicamente idénticas a la planta de partida (Sirvent y Belén 2016). Se inicia con el cultivo de tejidos *in vitro*, en el cual el material vegetal que se utiliza es una célula, tejido u órgano de una planta. Estos materiales pueden provenir de tejidos como tallos, raíz, meristemos, embriones, entre otros. (Narváez 2009).

4.8.1 Ventajas de la técnica de micropropagación

Una de las grandes ventajas de la micropropagación es la enorme capacidad de multiplicación a escala industrial, lo que permite 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). Además, se puede obtener

una mayor tasa de multiplicación para un mismo periodo de tiempo, permite el cultivo de gran cantidad de plantas en un espacio reducido y el control del estado sanitario de los clones y facilita una mejor planificación y distribución de los materiales propagados (Sirvent y Belén 2016). Ahora bien, este tipo de propagación requiere de instalaciones adecuadas, mano de obra calificada para llevar a cabo estos procesos y del desarrollo de protocolos de micropropagación específicos para cada especie con el fin que proporcionen las ventajas anteriormente mencionadas.

4.9 Organogénesis

La organogénesis es una ruta de regeneración de plantas completas mediante la técnica de cultivo *in vitro*, la cual permite la formación de tallos, yemas y raíces a partir de diferentes explantes (García *et al.* 2008). La organogénesis puede clasificarse en indirecta y directa (George y Debergh 2008). La organogénesis indirecta tiene lugar a partir de la siembra de un explante en donde se observa el crecimiento de una aglomeración de células en forma desordenada y sin ningún funcionamiento. seguidamente ocurre una fase intermedia de formación de callos. Por otro lado la organogénesis directa consiste en que a partir de una siembra de diferentes explantes y con las condiciones respectivamente adecuadas, se puede inducir la regeneración de brotes, raíces o flores de una parte de la planta sin necesidad de fases intermedias de callo (Perianez-Rodriguez *et al.* 2014). Generalmente la organogénesis se induce artificialmente por medio de reguladores de crecimiento (García *et al.* 2008)

4.10 Recalcitrancia del frijol común

La regeneración del frijol común se considera frecuentemente difícil, lo que dificulta significativamente el avance en la transformación genética de *Phaseolus vulgaris* L (Gatica-Arias *et al.* 2010). Esta especie muestra una variación extremadamente alta con respecto a la respuesta a las condiciones de cultivo de tejidos (Hnatuszko-Konka *et al.* 2014) . Esta respuesta es dependiente tanto del genotipo, así como del tipo o estado de especialización del explante, célula o tejido y de las condiciones de cultivo (Svetleva *et al.* 2003). Por esto, la regeneración *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* L. plantea el mayor obstáculo y desafío, lo que limita el potencial para un sistema eficiente de transformación genética del frijol común (Kwapata *et al.* 2010).

Sin embargo, el frijol común se ha regenerado vía organogénica (Arellano *et al.* 2009) y vía embriogénica (Cabrera-Ponce *et al.* 2015) a partir de diferentes explantes de plantas:

plántulas intactas, ejes embrionarios, cotiledones, nudos cotiledonales, pecíolos de hojas, entrenudos, brotes auxiliares, hipocótilos y hojas (Hnatuszko-Konka *et al.* 2014). Sin embargo, la regeneración de plantas completas que emplea los protocolos publicados presentan dificultades para ser reproducidos (Veltcheva y Lilova Svetleva 2005).

Al parecer, la falta de un sistema relativamente eficiente para la producción de brotes es uno de los obstáculos más importantes en la etapa de regeneración *in vitro* (Hnatuszko-Konka *et al.* 2019). Según muchos autores, el fenómeno de la recalcitrancia parece resultar de la presencia de compuestos fenólicos secretados por los sitios lesionados (Dang y Wei 2009; Kwapata *et al.* 2010; Collado *et al.* 2016; Hnatuszko-Konka *et al.* 2019). Su oxidación por polifenoloxidasas, peroxidasas o aire provoca un pardeamiento característico del explante y del medio de cultivo circundante (Gatica-Arias *et al.* 2010).

La formación de callos marrones en la base de un explante de plantas dificulta la regeneración de los brotes (Kwapata *et al.* 2010; Barikissou y Baudoin, 2011; Thảo *et al.* 2013). Tales limitantes en el establecimiento de cultivos de tejidos fueron reportadas para muchas especies como *Pinus silvestre* (Laukkanen *et al.* 1999), *musa spp.* (Titov *et al.* 2006) o en papa (*Solanum tuberosum*) (Alva Ticona y Oropeza 2013). De acuerdo a Gatica-Arias *et al.* (2010), la suplementación con citoquinina debería superar este obstáculo, sin embargo, también se determinó que la presencia de algunos reguladores del crecimiento vegetal como BAP, kinetina, TDZ (tidiazuron) o IAA (ácido indol-3-acético) intensificaron la extensión del pardeamiento (Gatica-Arias *et al.* 2010)

4.11 Uso de nitrato de plata en cultivo *in vitro*

Según Beyer, (1976) los iones de plata (Ag^+) aplicados foliarmente como $AgNO_3$ bloqueaba de manera efectiva la capacidad del etileno para provocar la clásica respuesta triple del etileno (elongación, el incremento del desarrollo lateral y el cambio en la orientación del desarrollo) en guisantes; además de estimular la abscisión de hojas, flores y frutos en algodón; e inducir la senescencia de las orquídeas.

Actualmente, la regeneración de plantas *in vitro* suele mejorarse al agregar a los medios de cultivo iones de plata como $AgNO_3$ o tiosulfato de plata (Steinitz *et al.* 2010). Dado que los iones Ag^+ pueden prevenir una amplia variedad de respuestas de plantas inducidas por etileno, incluida la inhibición del crecimiento y la senescencia, Alva Ticona y Oropeza (2013) sugieren que el efecto está mediado por la inhibición de la acción fisiológica del etileno.

La mejora de la regeneración *in vitro* al utilizar AgNO_3 ha sido reportada en diferentes especies vegetales (Fuentes *et al.* 2000; Gutiérrez-Miceli *et al.* 2010; Alva Ticona y Oropeza 2013). Fuentes *et al.* (2000) estudiaron la respuesta de cinco genotipos de *Coffea canephora*, y concluyeron que el AgNO_3 actúa como un inhibidor directo de la acción del etileno, que a su vez regula la disponibilidad de etileno en el recipiente de cultivo durante etapas específicas de la embriogénesis del café. Alva Ticona y Oropeza (2013) reportaron su aplicación en la micropropagación de papa, al eliminar con su uso los síntomas de epinastia o hiperhidricidad por etileno. Por su parte, Gutiérrez-Miceli *et al.* (2010) reportaron su uso para estimular el crecimiento de callos en *Dianthus caryophyllus* L. Los resultados mostraron que las concentraciones altas de AgNO_3 junto con ácido naftaleneacético (ANA) aumentaron la inducción de brotes y raíces.

En frijol común, la mejora de la eficiencia en la formación de brotes al exponer los explantes al nitrato de plata ha sido descrita por diferentes autores (Cruz de Carvahlo *et al.* 2000, Dang y Wei 2009, Kwapata *et al.* 2010, Hnatuszko-Konka *et al.* 2019). Según Kwapata *et al.* (2010) el efecto beneficioso podría deberse a que el AgNO_3 reduce eficazmente los efectos oxidativos de los compuestos fenólicos. Lo cual fue descrito previamente por Cruz de Carvalho *et al.* (2000) quienes plantearon que su efecto beneficioso se debe a que actúa como inhibidor de la acción del etileno, aunque aclaran que su efecto beneficioso no es significativo si no se utiliza reguladores de crecimiento como BAP.

Según Dang y Wei 2009 el nitrato de plata en concentraciones mayores a 3 mg l^{-1} inhibe el desarrollo de los brotes, ellos lo atribuyen al efecto negativo del ion de plata (Ag^+). Por el contrario, Hnatuszko-Konka *et al.* (2019) describieron que 1.69 mg l^{-1} en combinación con 3 gl^{-1} de carbón activado y 2.5 mg l^{-1} BAP promueve la mayor cantidad de brotes en diferentes genotipos de frijol común.

5. DESARROLLO DE LA PASANTÍA

5.1 Ubicación del laboratorio

La pasantía se llevó a cabo en el Área de Cultivo de Tejidos Vegetales del Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador, ubicado en la ciudad de San Salvador, con las coordenadas geográficas: latitud 13°43'6" N, longitud: 89°12'11" O. Las actividades se realizaron en un periodo de 6 meses a partir de julio del 2022.

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

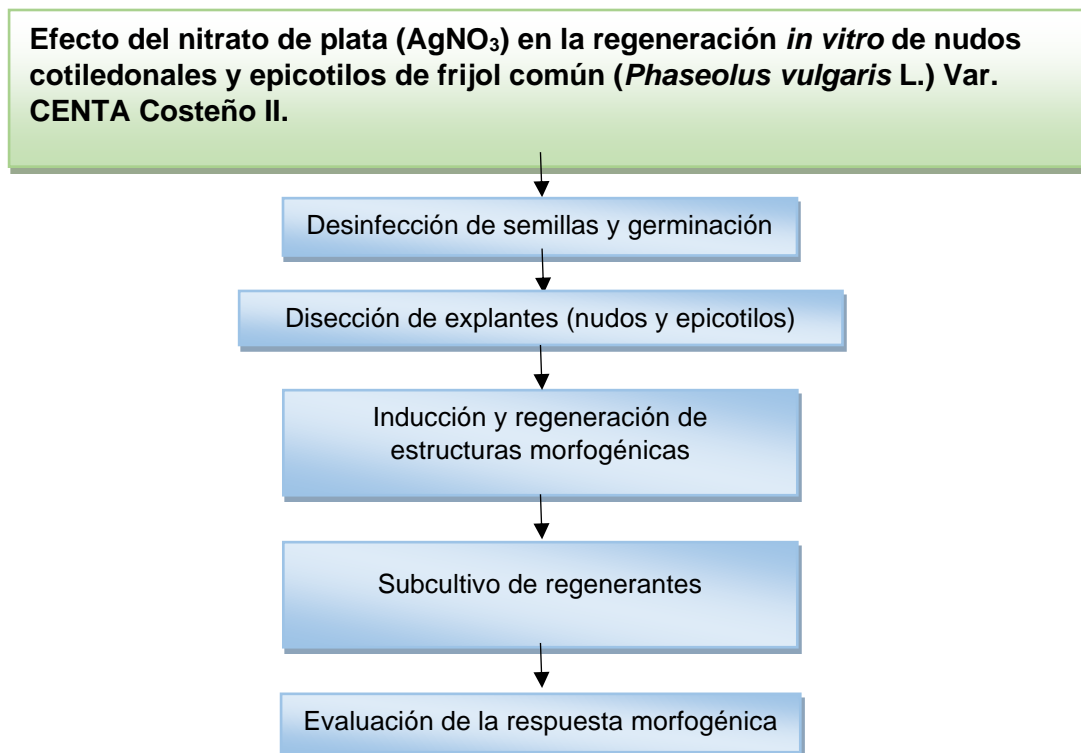


Figura 1. Estrategia experimental de la investigación. El diagrama incluye los pasos críticos planteados en los objetivos, así como la evaluación de los resultados de ambos tipos de explantes en la regeneración *in vitro* de frijol común.

5.2 Material vegetal

Se utilizó semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de la variedad CENTA Costeño II, de no más de 2 años de postcosecha. Inicialmente se realizó una prueba de germinación en papel húmedo, a $25\pm 1^\circ\text{C}$ y en completa oscuridad. Los resultados a los 3 días fueron de 83% de eficiencia y a los 5 días de 90%. se realizó debido a que para este tipo de investigación se requiere un alto índice de germinación y viabilidad de la semilla. Las semillas de frijol fueron donadas por el Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA) bajo una colaboración con el proyecto de investigación 18.21 “Desarrollo de aplicaciones biotecnológicas para el mejoramiento genético de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)” el cual es financiado por la secretaria de Investigaciones Científicas (SIC-UES) de la Universidad de El Salvador. La variedad CENTA costeño II forma parte de las 4 variedades que han sido contempladas y aprobadas en el proyecto de investigación antes mencionado.

5.3 Desinfección de semilla y disección de explante

En una cámara de flujo laminar se desinfectaron las semillas superficialmente con alcohol etílico al 70% durante 90 segundos y posteriormente con hipoclorito de sodio (NaClO) al 3% en agitación manual durante 10 minutos. Posteriormente se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril. Una vez desinfectadas, las semillas se sembraron en frascos de vidrio tipo Gerber (15 semillas por frasco) con un medio nutritivo compuesto por las sales minerales de Murashige y Skoog (MS) a mitad de fuerza ($\frac{1}{2}$ MS) + 30 gl^{-1} de sacarosa + 1 mg l^{-1} de BAP (Bencilaminopurina) + 3 gl^{-1} de carbón activado + 8 gl^{-1} agar. Las semillas germinaron en completa oscuridad a $25\pm 1^\circ\text{C}$ por un periodo de 7 días.

Transcurrido el tiempo de germinación de las semillas, se extrajeron las plántulas con la ayuda de pinzas y bisturí estériles en cámara de flujo laminar. Se utilizaron dos tipos de explantes: nudos cotiledonales y epicótilo. Para ello, a las plántulas se les cortó el meristemo apical y se realizó un corte arriba del nudo cotiledonal para seccionar el epicótilo, posteriormente se realizó un corte por debajo del nudo cotiledonal para dejarlo completamente separado del resto de la plántula.

5.4 Medios de cultivo

Se utilizaron medios de cultivo semisólidos compuestos por las sales minerales de Murashige y Skoog (1962) (MS), adicionados con 30 gl^{-1} de sacarosa, 8 gl^{-1} de agar, 2.5 mg l^{-1} de bencilaminopurina (BAP) y diferentes concentraciones de nitrato de plata (AgNO_3). El pH de todos los medios de cultivo se ajustó con HCl o NaOH a 5.7 antes de ser

esterilizado en autoclave durante 20 minutos a 0.125 MPa y 121°C. Una vez esterilizado se introdujo en una cámara de flujo laminar para ser distribuido en placa Petri estéril, 25ml de medio de cultivo por cada una. Una vez frío y gelificado se selló con papel film para evitar la contaminación.

Los tratamientos consistieron en medios de cultivos con 2.5 mg^l⁻¹ de Bencilaminopurina (BAP) y diferentes combinaciones de nitrato de plata (AgNO₃) con las especificaciones descritas en el Cuadro 1

Cuadro 1. Concentraciones de nitrato de plata (AgNO₃) para la regeneración de nudos cotiledonales y epicotilos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) Var. CENTA Costeño II.

Tratamiento	Explante	AgNO ₃ (mg ^l ⁻¹)	Referencia
1		0	
2	Epicotilo	0.42	Drisy, Siril y Nair. (2019)
3		1.69	Cruz de Carvalho et al. (2000); Hnatuszko-Konka et al. (2019)
4		4.23	Alan y Anis (2019)
1		0	
2		0.42	Drisy, Siril y Nair. (2019)
3	Nudo cotiledonal	1.69	Cruz de Carvalho et al. (2000); Hnatuszko-Konka et al. (2019)
4		4.23	Alan y Anis (2019)

5.5 Inducción y regeneración de estructuras morfogénicas

Los explantes (nudos cotiledonales y epicotilos) se sembraron en las cajas Petri con los diferentes tratamientos, se colocaron cinco explantes por caja de Petri y se realizaron 9 cajas Petri por cada concentración de nitrato de plata, una vez sembrados se sellaron con papel film para evitar la contaminación. Los explantes se cultivaron en los tratamientos durante 35 días en condiciones de fotoperiodo 16 horas luz/ 8 horas oscuridad a 25±1°C y 58 μmol/m²/s. Se realizó un subcultivo a los 21 días después de iniciado el ensayo, se

colocó los regenerantes (anteriormente explantes) en cajas Petri que contenían medio de cultivo con la misma concentración de nitrato de plata.

5.6 Evaluación de la respuesta morfogénica

Para la evaluación de la respuesta a la regeneración *in vitro* se tomó en consideración lo descrito por Hnatuszko-Konka *et al.* (2019) quienes recomiendan evaluar cualquier formación de estructuras organogénicas regeneradas por los explantes, esto incluyó callos, yemas, raíces y brotes. Adicionalmente se calculó la eficiencia de la regeneración a través de siguiente fórmula descrita también por Hnatuszko-Konka *et al.* (2019):

$$\% \text{regeneracion} = [(\text{número de explantes con yemas inducidas} / \text{el total de explantes probados}) \times 100].$$

Las evaluaciones se realizaron después de 35 días de iniciado el ensayo. Además, se realizó un registro fotográfico.

Análisis estadístico

Para la organización, procesamiento y análisis de los datos sobre la regeneración *in vitro* vía organogénesis directa de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad CENTA Costeño II, se utilizó estadística simple como tablas de frecuencias, representaciones gráficas, medidas de tendencia central y medidas de dispersión, e intervalos de confianza.

Se aplicó el Análisis de Varianza (ANOVA), específicamente un arreglo factorial combinatorio de 2x4 bajo un Diseño Completamente al Azar (DCA) debido a las condiciones controladas del laboratorio (luz, temperatura y humedad) y características del material experimental (homogéneo). Previo a la aplicación de la técnica del Análisis de Varianza (ANOVA) se verificaron los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianzas mediante las pruebas de Kolmogórov-Smirnov y Levene. El efecto significativo de las concentraciones de AgNO_3 se evaluó utilizando polinomios ortogonales para determinar la probabilidad de una respuesta lineal o cuadrática. El análisis por el método de las tendencias polinomiales es una técnica que se utiliza para determinar la regresión cuando la variable independiente (x) se encuentra espaciada a intervalos iguales 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 explantes de frijol y la variable dependiente fue la respuesta a la morfogénesis *in vitro*. Cada tratamiento tuvo tres repeticiones y cada repetición consistió en tres placas Petri con cinco explantes cada uno. Fueron 45 explantes por tratamientos y 450 en total.

Según Argüellas y Carvajal (2013), el modelo matemático lineal aditivo que define a un arreglo factorial combinatorio bajo el Diseño Completamente al Azar (DCA) es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + [FA_j + FB_k + (FA \times FB)] + \xi_{ijk}$$

Donde: $i = 1, 2, \dots, r$ Con r , como el número de repeticiones.

$j = 1, 2, \dots, a$ Con a , (como el número de niveles del factor A. 2 niveles).

$k = 1, 2, \dots, b$ Con b , (como el número de niveles del factor B. 4 niveles).

Y_{ijk} = Variable aleatoria observada de la i -ésima repetición del j -ésimo tratamiento del k -ésimo factor B

μ = Media general.

FA_j = Efecto de los explantes (epicotilos y nudos cotiledonales).

FB_k = Efecto de las dosis de $AgNO_3$.

$(FA \times FB)_{jk}$ = Efecto de la interacción de los explantes por las dosis de $AgNO_3$.

E_{ijk} = Efecto del error experimental independiente.

6. RESULTADOS

La regeneración *in vitro* de diferentes explantes (nudos cotiledonales y epicótilos) se evaluó en diferentes concentraciones de nitrato de plata mediante la observación de formación de estructuras organogénicas. Los explantes mostraron diferentes respuestas morfogénicas en presencia del nitrato de plata tales como brotes, raíces, hojas y callos (Figura 2). Además, se determinó la eficiencia de regeneración que se calculó como el número de regenerantes inducidos entre el total de explantes probados.

El primer síntoma de regeneración apareció después de 10 a 12 días de iniciado el tratamiento en diferentes concentraciones de AgNO_3 , y la capacidad de respuesta a la regeneración *in vitro* estuvo fuertemente relacionado con el tipo de explante. Las diferentes estructuras organogénicas formadas por los nudos cotiledonales se presentan en la Figura 2.

La organogénesis directa es la vía de regeneración dominante y el callo apareció en algunos casos solamente en los extremos de los explantes (Figura 2 E 4.23). Para ambos explantes con la suplementación de 1.69 mg l^{-1} de AgNO_3 se obtuvieron mayormente brotes, 90% en nudos cotiledonales y 59% en los epicótilos (Cuadro A.1). Por otro lado, el mayor número de raíces se obtuvo con 4.23 mg l^{-1} de AgNO_3 , distribuido en 6% para los nudos cotiledonales y 35% para los epicótilos (Figura A.1). El mayor número de callos se obtuvieron en ausencia de AgNO_3 únicamente para los epicótilo (28%), mientras que en los nudos cotiledonales no se obtuvo formación de callos en ninguna dosis de AgNO_3 .

En esta investigación, se logró una eficiencia de regeneración de 0 a 62%, según el tipo de explante (Cuadro 2). Para el epicótilo, se logró una eficiencia máxima de 46.66% ($1.69 \text{ mg l}^{-1} \text{ AgNO}_3$) y una mínima de 4.44% ($4.23 \text{ mg l}^{-1} \text{ AgNO}_3$), mientras que para el nudo cotiledonal se alcanzó una eficiencia máxima de 62.22% ($1.69 \text{ mg l}^{-1} \text{ AgNO}_3$) y una mínima de 35.55 ($0 \text{ mg l}^{-1} \text{ AgNO}_3$) (Figura 3).



Figura 2. Respuesta a la regeneración *in vitro* de epicótilos y nudos cotiledonales de frijol común (*Phaseolus Vulgaris* L.) Var. CENTA Costeño II en diferentes concentraciones de nitrato de plata (AgNO_3). E 0- epicótilo, 0 mg l^{-1} de nitrato de plata. E 0.42 - epicótilo, 0.42 mg l^{-1} de nitrato de plata. E 1.63- epicótilo, 1.63 mg l^{-1} de nitrato de plata. E 4.23- epicótilo, 4.23 mg l^{-1} de nitrato de plata. N 0- nudo cotiledonal, 0 mg l^{-1} de nitrato de plata. N 0.42- nudo cotiledonal, 0.42 mg l^{-1} de nitrato de plata. N 1.63- nudo cotiledonal, 1.63 mg l^{-1} de nitrato de plata. N 4.23- nudo cotiledonal, 4.23 mg l^{-1} de nitrato de plata.

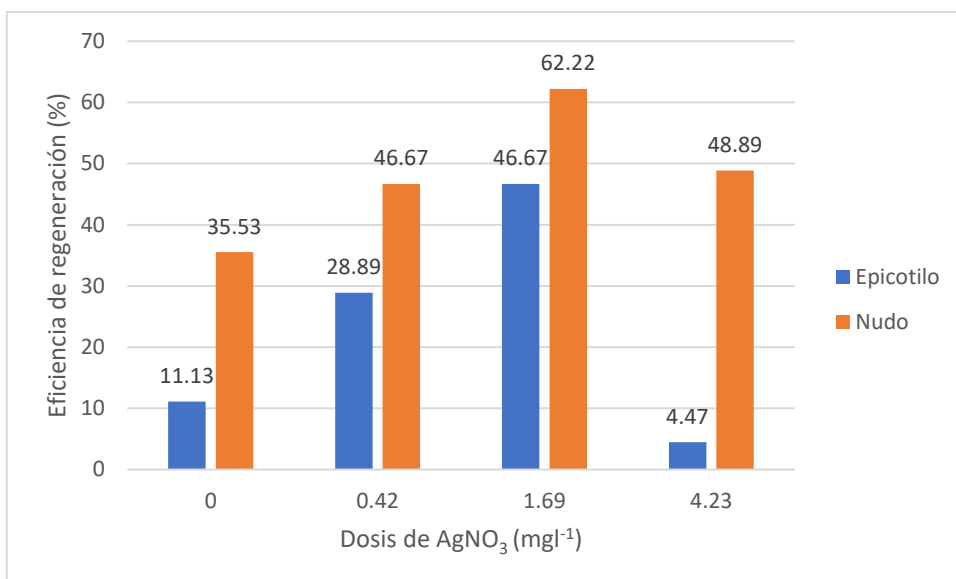


Figura 3. Eficiencia a la regeneración *in vitro* de nudos cotiledonales y epicotilos en diferentes dosis de AgNO₃ en la variedad de frijol común *Phaseolus vulgaris* L. Var. CENTA costeño II.

Cuadro 2: Efecto de los explantes (epicótilo y nudo cotiledonal) y nitrato de plata (AgNO₃) en la eficiencia de la regeneración *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L. Var. CENTA Costeño II) bajo un análisis de varianza (ANOVA) y un arreglo factorial 2x4

Variable	Tipo de explante	Dosis de AgNO ₃ (mg l ⁻¹)				EEM	Valores de p		
		0	0.42	1.69	4.23		Explante	Dosis	Interacción Exp. x Dosis
Eficiencia de regeneración (%)	Epicótilo	11.11	28.89	46.66	4.44	4.53	0.0058*	0.0003**	0.2984
	Nudo	35.55	46.66	62.22	48.89				

Al comparar la eficiencia de regeneración (%) en cada uno de los explantes se observa una superioridad del nudo cotiledonal en todas las concentraciones probadas (Figura 4). Estadísticamente mediante el análisis de ANOVA (P-valor <0.01) existen diferencias significativas en los explantes, lo que indica que la regeneración *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) está fuertemente influenciada por el tipo de explante.

De igual forma, las diferentes concentraciones de nitrato de planta (AgNO₃) probadas presentaron diferencias estadísticamente significativas (P-valor<0.01) los mejores resultados se presentaron en la concentración 1.69 mg l⁻¹ (Cuadro 2).

La interacción de los explantes y las diferentes concentraciones de nitrato de plata (AgNO_3) no presentan diferencias estadísticamente significativas (P -valor= 0.29) lo que hace indicar que el efecto de las concentraciones es igual independientemente del explante.

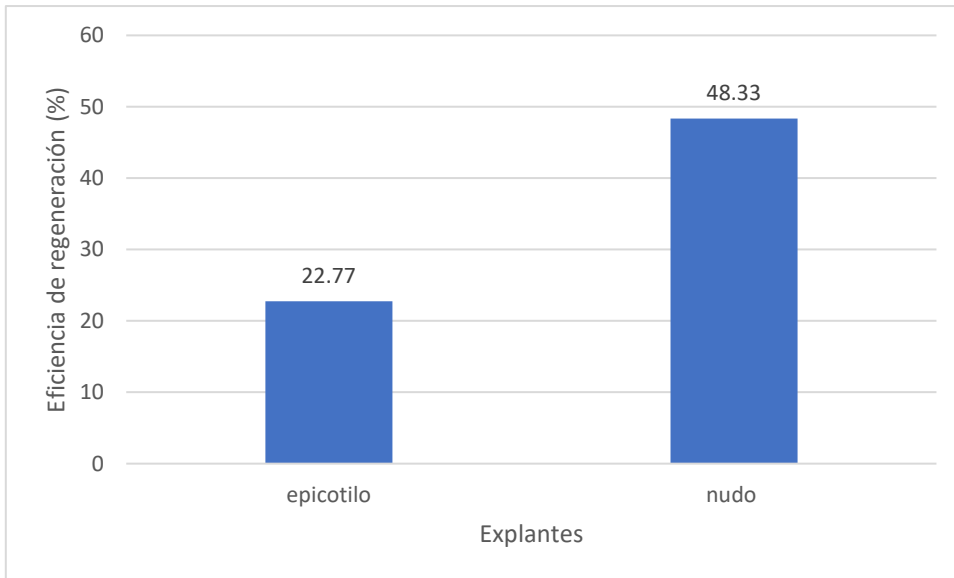


Figura 4. Eficiencia a la regeneración *in vitro* en nudos cotiledonales y epicotilos de la variedad de frijol común *phaseolus vulgaris* L. Var. CENTA costeño II.

El uso de los polinomios ortogonales permitió evaluar la relación cuadrática y de esta manera encontrar la concentración óptima. Al resolver la segunda derivada de la ecuación de la curva $y = -6.9309x^2 + 29.783x + 24.608$ (planteada en la Figura 5), se obtuvo que el valor óptimo de concentración de AgNO_3 es de 2.14 mg l^{-1} . Además, la eficiencia de regeneración *in vitro* independientemente del explante aumenta a medida que aumenta la concentración de AgNO_3 para llegar a un punto máximo (2.14 mg l^{-1}) y luego descender.

Debido que los valores de eficiencia a la regeneración *in vitro* más altos se obtuvieron en los nudos cotiledonales (independientemente del análisis estadístico y de las concentraciones de nitrato de plata), la eficiencia de regeneración podría presentarse de la siguiente manera: nudo cotiledonal con 1.69 mg l^{-1} > nudo cotiledonal con 4.23 mg l^{-1} > nudo cotiledonal con 0.42 mg l^{-1} > epicótilo con 0.42 mg l^{-1} > nudo cotiledonal con 0 mg l^{-1} . Se podría afirmar que tanto para los nudos cotiledonales como para los epicotilos la concentración de nitrato de plata evaluada que presentó mejor respuesta a la regeneración fue 1.69 mg l^{-1} .

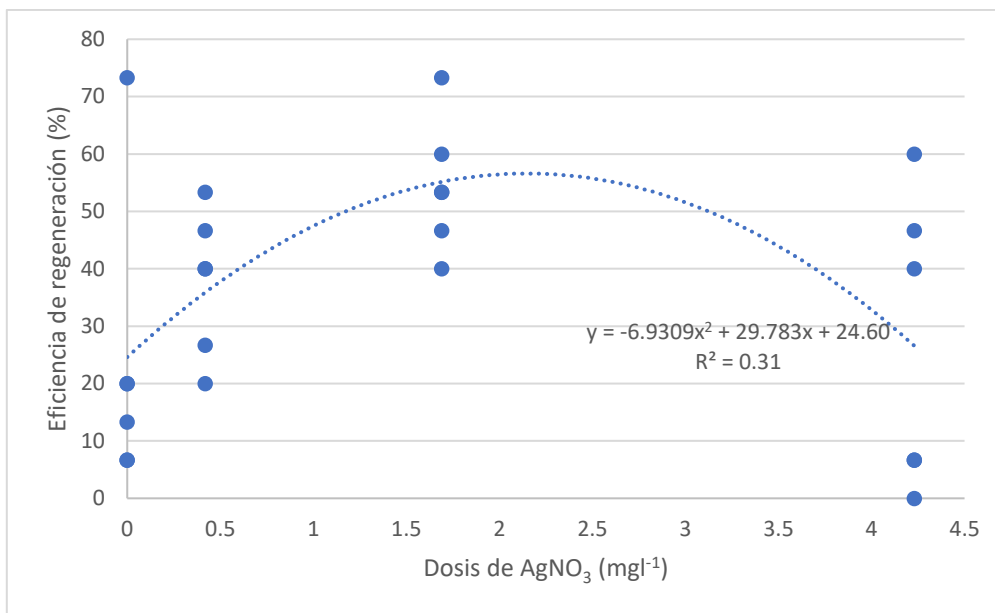


Figura 5: Grafica de la tendencia polinomial cuadrática de la regeneración *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) Var. CENTA Costeño II para diferentes concentraciones de nitrato de plata (AgNO₃) independientemente del tipo de explante. R² es el cuadrado del coeficiente de correlación que es la relación de correspondencia entre la variable dependiente y la variable independiente. P-valor de contraste con una significancia del 1%, P-valor de contraste lineal=0.46, P-valor de contraste cuadrático=0.01*

Producto del ensayo mediante dos diferentes explantes y diferentes concentraciones de AgNO₃ se pudo establecer un protocolo de regeneración *in vitro* de la variedad de frijol común CENTA Costeño II (cuadro A-2)

7. DISCUSIÓN

El cultivo de tejidos de *Phaseolus vulgaris* L. ha sido considerado difícil desde los primeros intentos de regeneración *in vitro* (Solís-Ramos *et al.* 2019). De acuerdo con Svetleva *et al.* (2003) su capacidad regenerativa y la respuesta a las condiciones de cultivo dependen en gran medida del genotipo, también está determinada por el tipo o estado de especialización del explante, célula o tejido y por las condiciones de cultivo. Esto hace que se dificulte la aplicación de la mejora genética en este cultivo. Por ello que existe la necesidad de un enfoque que brinde una formación eficiente de brotes y que logre una regeneración de toda

la planta, puesto que es un requisito crucial para la modificación genética de esta leguminosa (Díaz *et al.* 2012; Hnatuszko-Konka *et al.* 2019).

Debido que los explantes o estado de especialización de los tejidos influyen en la regeneración *in vitro* de frijol, se ha evaluado la efectividad de diferentes tipos tales como ejes embrionarios (Delgado-Sánchez *et al.* 2006, Gatica-Arias *et al.* 2010), eje embrionario partido (Kwapata *et al.* 2010; Quintero-Jiménez *et al.* 2010; Collado *et al.* 2013), nudos cotiledonales (Dang y Wei 2009; Hnatuszko-Konka *et al.* 2019), hipocótilos (Mohamed *et al.* 1993), epicótilos (Arellano *et al.* 2009; Hnatuszko-Konka *et al.* 2019) y meristemas apicales (García *et al.* 2008). En esta investigación, los dos explantes elegidos (epicótilos y nudos cotiledonales) mostraron un variado potencial de regeneración, especialmente el nudo cotiledonal que mostró una superioridad indiscutible sobre el epicótilo; contrario a lo reportado por Cruz de Carvalho *et al.* (2000) quienes reportaron una mejor capacidad de los epicótilos para convertirse en brotes. Los resultados obtenidos son comparables con los obtenidos por Hnatuszko-Konka *et al.* (2019) y Dang y Wei (2009) quienes indican la marcada superioridad de los nudos cotiledonales para regenerar brotes, independientemente de las concentraciones de reguladores y las concentraciones de AgNO_3 utilizadas.

La mejora de la regeneración *in vitro* al utilizar AgNO_3 ha sido reportada también en diferentes especies vegetales (Fuentes *et al.* 2000; Drisya Ravi *et al.* 2019); Alam y Anis 2019). Fuentes *et al.* (2000) estudiaron la respuesta de cinco genotipos de *Coffea canephora*, concluyeron que el AgNO_3 actúa como un inhibidor directo de la acción del etileno y que a su vez regula la disponibilidad de etileno en el recipiente de cultivo durante etapas específicas de la embriogénesis del café. Drisya Ravi *et al.* (2019) reportaron el uso de 0.42 mg l^{-1} de AgNO_3 en la reproducción *in vitro* de *Moringa oleífera*, la cual aumentó la producción de brotes, así como disminuyó la caída de las hojas en los brotes *in vitro*. Alam y Anis (2019) estudiaron la adición de 4.23 mg l^{-1} de AgNO_3 en la regeneración *in vitro* de *Mucuna pruriens*, lo que mejoro la calidad de los brotes, así como la futura formación de raíces.

En frijol común, también se ha demostrado el efecto beneficioso del AgNO_3 en la regeneración *in vitro* (Cruz de Carvahlo *et al.* 2000, Dang y Wei 2009, Kwapata *et al.* 2010, Hnatuszko-Konka *et al.* 2019). Por esto a pesar de la complejidad de la regeneración de frijol común, se pudo notar en esta investigación la mejora de la eficiencia en la formación

de estructuras organogénicas al exponer los explantes al nitrato de plata. Según Kwapata *et al.* (2010) el efecto beneficioso podría deberse a que el AgNO_3 reduce eficazmente los efectos oxidativos de los compuestos fenólicos, los cuales ya han sido previamente descritos por (Gatica-Arias *et al.* 2010) como una de las razones de la baja respuesta a la morfogénesis *in vitro* de esta especie.

Por otro lado, Hoyós (1995) y Zhang *et al.* (2006) consideran que la síntesis de etileno es la responsable de la mala regeneración *in vitro* del frijol común, así como de otras especies. Por esto, Kumar *et al.* (2009) mencionan que el AgNO_3 actúa como un potente inhibidor de los efectos del etileno y dada su falta de fitotoxicidad a las concentraciones de trabajo y su solubilidad en agua, parece justificada la aplicación de nitrato de plata para modular la acción del etileno en cultivos de tejidos. En este sentido, se encontró que 2.14mg l^{-1} de AgNO_3 es el nivel óptimo para el desarrollo de brotes; lo cual es consistente con los resultados obtenidos por Dang y Wei (2009), quienes encontraron que para nudos cotiledonales una concentración de 2.0 mg l^{-1} de nitrato de plata fue la dosis óptima para una alta eficiencia de regeneración *in vitro* de frijol común y que en concentraciones superiores a 3.0 mg l^{-1} se inhibe el desarrollo de brotes.

Por otra parte, Cruz de Carvalho *et al.* (2000) probaron 1.69 mg l^{-1} de AgNO_3 en la regeneración de cortes celulares delgados de frijol común y obtuvieron resultados favorables a la regeneración con el uso de esa dosis. En ese sentido Hnatuszko-Konka *et al.* (2019) probaron 1.69 mg l^{-1} de AgNO_3 en 6 variedades y dos tipos de explantes de frijol común, lo cual aumento la regeneración *in vitro* de todos los genotipos. Esto es consistente con nuestros resultados, los cuales independientemente del explante, la concentración que mejor eficiencia a la regeneración presento fue 1.69 mg l^{-1} .

Por otro lado, el nitrato de plata no ha sido el único suplemento utilizado para inhibir los efectos adversos de la producción de compuestos fenólicos. El carbón activado suplementado a concentraciones de 15 mg l^{-1} en el medio de cultivo parece reducir la oxidación de componentes fenólicos al obtener mejores resultados que al utilizar solamente AgNO_3 de acuerdo con Kwapata *et al.* (2010). En este sentido, Hnatuszko-Konka *et al.* (2019) utilizaron 4 g l^{-1} de carbón activado para la regeneración de diferentes genotipos de frijol común y obtuvieron resultados positivos. Estos investigadores mostraron que la regeneración de frijol fue mejor al combinarlo con AgNO_3 . En especies como *Eucalyptus grandis*, concentraciones de 3 g l^{-1} también parecen disminuir la oxidación de los explantes.

Los reguladores de crecimiento son esenciales en todos los programas de regeneración *in vitro* y para el frijol común no es diferente (Quintero-Jiménez *et al.* 2010). En esta investigación se utilizó BAP (bencilaminopurina) en una concentración de 2.5 mg^l⁻¹ basado en los resultados obtenidos por Hnatuszko-Konka *et al.* (2019) quienes reportaron una mejora en la producción de brotes al combinarlo con AgNO₃ y 4 gl⁻¹ de carbón activado. En esta investigación se encontró regeneración en los explantes (tanto en epicótilo como en nudo cotiledonal) con ausencia del AgNO₃, lo cual podría ser explicado por la presencia de 2.5 mg^l⁻¹ de BAP en todos los tratamientos, así como 3 gl⁻¹ de carbón activado. Este resultado es comparable con Quintero-Jiménez *et al.* (2010), quienes reportaron eficiencias mayores al 80% en cuatro variedades de frijol al agregarle al medio de cultivo 10 mg^l⁻¹ de BAP. Además, Dang y Wei (2009) probaron la adición de diferentes concentraciones de BAP al medio de cultivo para regenerar nudos cotiledonales en frijol común y reportaron una mejora en producción de brotes al utilizar 5 mg^l⁻¹.

8. CONCLUSIONES

- La recalcitrancia de *Phaseolus vulgaris* L. quedó evidenciada en esta investigación mediante la baja respuesta a la morfogénesis y regeneración *in vitro* a partir de nudos cotiledonales y especialmente en epicótilos.
- Los explantes de nudos cotiledonales presentaron una mayor respuesta a la regeneración *in vitro* que los epicótilos.
- La adición de nitrato de plata al medio de cultivo mejora la eficiencia a la regeneración *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* L. Var. CENTA Costeño II independientemente si los explantes son epicótilos o nudos cotiledonales.
- La concentración de 1.69 mg^l⁻¹ de nitrato de plata (AgNO₃) en medios de cultivo Murashige y Skoog mejora la eficiencia de la regeneración *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* L. Var. CENTA Costeño II hasta un 62% en nudos cotiledonales.
- Matemáticamente, en la concentración de 2.14 mg^l⁻¹ de nitrato de plata (AgNO₃) en medios de cultivo Murashige y Skoog presentó la mejor respuesta a la regeneración *in vitro* de la variedad CENTA Costeño II

9. RECOMENDACIONES

- Utilizar nitrato de plata (AgNO_3) combinado con carbón activado y bencilaminoputina (BAP) en medios de cultivo de Murashige y Skoog para protocolos de regeneración de la variedad CENTA Costeño II.
- Evaluar la concentración de 2.14 mg l^{-1} de AgNO_3 en la morfogénesis *in vitro* de la variedad CENTA Costeño II para el desarrollo de un protocolo más eficiente de regeneración *in vitro* para esta variedad.
- Utilizar nudos cotiledonales como explantes para la regeneración *in vitro* mediante organogénesis directa de la variedad CENTA Costeño II.

10. 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
- Alva Ticona, S; Oropeza, M. 2013. Efecto de la consistencia del medio de cultivo y del nitrato de plata en la micropropagación de dos cultivares de papa (*Solanum tuberosum*). Revista Colombiana de Biotecnología 15(2):55. DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v15n2.41265>.
- Aragão, FJL; Campos, FAP. 2007. Common Bean and Cowpea. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Springer Berlin Heidelberg. 263-276.
- Arellano, J; Fuentes, SI; Castillo-España, P; Hernández, G. 2009. Regeneration of different cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) via indirect organogenesis (en línea). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 96(1):11-18. DOI: <https://doi.org/10.1007/S11240-008-9454-1/METRICS>.
- Beebe, SD; Skroch, PW; Tohme, J; Duque, MC; Pedraza, F; Nienhuis, J. 2000. Structure of genetic diversity between common bean land races of Middle America origin based on correspondence analysis of RAPD. Crop Science. 49:264-273.
- Beebe, SD; Rengifo, J; Gaitan, E; Duque, MC; Tohme, J. 2001. Diversity and origin of Andean landraces of common bean. Crop Science. 41:854-862.
- Blair, MW; Galeano, CH; Tovar, E; Torres, MCM; Castrillón, AV; Beebe, SE; Rao, IM. 2012. Development of a Mesoamerican intra-genepool genetic map for quantitative trait loci detection in a drought tolerant susceptible common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cross. Molecular Breeding. 29(1):71-88.
- Cabrera-Ponce, JL; López, L; León-Ramírez, CG; Jofre-Garfias, AE; Verver-y-Vargas, A. 2015. Stress induced acquisition of somatic embryogenesis in common bean *Phaseolus vulgaris* L. (en línea). Protoplasma 252(2):559-570. DOI: <https://doi.org/10.1007/S00709-014-0702-4/METRICS>.
- Cañal, M; Cañal, MJ; Rodríguez, R; Fernández, B; Sánchez-Tames, R; Majada, JP. 2001. Fisiología del cultivo in vitro (en línea). Biotecnología Vegetal 1(1). Consultado 25 feb. 2023. Disponible en <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/59>.

- CENTA (Centro Nacional De Tecnología Agropecuaria y Forestal). 1996 Guía técnica, Programa de granos básicos cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*). San Andrés, La Libertad, El Salvador, C.A.
- CENTA (Centro Nacional De Tecnología Agropecuaria y Forestal). 2008 Guía Técnica para el Manejo de Variedades de Frijol. Programa de Granos Básicos. 24.
- CENTA (Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal). 2014. CENTA Costeño II. Variedad de frijol grano rojo para condiciones de humedad limitada y altas temperaturas. Programa de Granos Básicos.
- CENTA (Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal). 2015. El cultivo de frijol en El Salvador.
- CENTA (Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal). 2018. CULTIVO DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.). Programa de granos básicos. 37.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1984. Morfología de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Cali. Colombia.
- Collado, R; Bermúdez-Carabaloso, I; García, LR; Veitía, N; Torres, D; Romero, C; Angenon, G. 2016. Epicotyl sections as targets for plant regeneration and transient transformation of common bean using *Agrobacterium tumefaciens* (en línea). In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant 52(5):500-511. DOI: <https://doi.org/10.1007/S11627-016-9769-2/METRICS>.
- Criollo, H., Insuasti, K., & DELGADO, W. (2016). Regeneración in vitro de plántulas de tomate de árbol (*Solanum betaceum* (Cav.) Sendt.). Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas, 10(2), 252-261.
- 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).
- Dang, W; Wei, ZM. 2009. High frequency plant regeneration from the cotyledonary node of common bean. BIOLOGIA PLANTARUM 53(2):312-316.

- Domenech, MCG. 2011. Establecimiento de cultivos in vitro a partir de semillas o de material de campo (en línea, sitio web). Consultado 21 feb. 2023. Disponible en <https://riunet.upv.es/handle/10251/9798>.
- Drisy 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>.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 1989. Food balance sheets, 1975-77 Average. Roma, Italia.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2018. Legumbres. Pequeñas semillas, grandes soluciones. ISBN 978-92-5-131129-5. 292.
- Freytag, GF; Debouck DG. 2002. Taxonomy, distribution, and ecology of the genus *Phaseolus* (Leguminosae-Papilionideae) in North America, Mexico and Central America. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 36(2). 95-104.
- García, LR; Collado, R; Bermúdez Caraballos, I; Veitía, N; Torres, D; Romero, C. 2008. Regeneración de plantas vía organogénesis directa en *Phaseolus vulgaris* L. *Plants regeneration via direct organogenesis in Phaseolus vulgaris L. Biotecnología vegetal* 8(2):109-114.
- Gatica Arias, AM; Muñoz 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 (en línea). *Electronic Journal of Biotechnology* 13(1):6-7. DOI: <https://doi.org/10.4067/S0717-34582010000100006>.
- Gentry, HS. 1969. Origin of the common bean, *Phaseolus vulgaris*. *Econ. Bot.* 23:55-69.
- Gepts, P; Aragão, FJL; Barros, E; Blair, MW; Brondani, R; Broughton, W; Galasso, I; Hernández, G; Kami, J; Lariguet, P. 2008. Genomics of *Phaseolus* beans, a major source of dietary protein and micronutrients in the tropics. *Genomics of Tropical Crop Plants*. 113-143.
- 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; Kowalczyk, T; Gerszberg, A; Glińska, S; Grzegorzczak-Karolak, I. 2019. Regeneration of *Phaseolus vulgaris* from epicotyls and hypocotyls via direct organogenesis. Scientific Reports 9(1):1-12. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42723-8>.
- Hnatuszko-Konka, K; Kowalczyk, T; Gerszberg, A; Wiktorek-Smagur, A; Kononowicz, AK. 2014. *Phaseolus vulgaris* — Recalcitrant potential. Biotechnology Advances 32(7):1205-1215. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2014.06.001>.
- Kwak, M; Kami, JA; Gepts, P. 2009). The putative Mesoamerican domestication center of *Phaseolus vulgaris* is located in the Lerma-Santiago Basin of Mexico. Crop Science. 49:554-563.
- Kwapata, K; Sabzikar, R; Sticklen, MB; Kelly, JD. 2010. In vitro regeneration and morphogenesis studies in common bean (en línea). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 100(1):97-105. DOI: <https://doi.org/10.1007/S11240-009-9624-9/FIGURES/6>.
- Laukkanen, H; Häggman, H; Kontunen-Soppela, S; Hohtola, A. 1999. Tissue browning of in vitro cultures of Scots pine: Role of peroxidase and polyphenol oxidase (en línea). Physiologia Plantarum 106(3):337-343. DOI: <https://doi.org/10.1034/J.1399-3054.1999.106312.X>.
- 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.
- MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería). 2012. Consultado 04 feb. 2021. 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
- McClellan, P; Lavin, M; Gepts, P; Jackson, SA. 2008. *Phaseolus vulgaris*: a diploid model for soybean. Springer Science & Business. 55-76.
- Miranda-Colín, S. 1967. Origen de *Phaseolus vulgaris* L. (frijol común). Agrociencia 1:99-104.
- Papa, R; Gepts, PL. 2003. Asymmetry of gene flow and differential geographical structure of molecular diversity in wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from

Mesoamerica. Theoretical and Applied Genetics. 106:239-250.

Parsons, DB. 1999. Frijol y chícharo. 2° edición. México.

Perianez-Rodriguez, J; Manzano, C; Moreno-Risueno, MA. 2014. Post-embryonic organogenesis and plant regeneration from tissues: Two sides of the same coin? *Frontiers in Plant Science* 5(MAY). DOI: <https://doi.org/10.3389/FPLS.2014.00219>.

Quintero-Jiménez, A; Espinosa-Huerta, E; Acosta-Gallegos, JA; Guzmán-Maldonado, HS; Mora-Avilés, MA. 2010. Enhanced shoot organogenesis and regeneration in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) (en línea). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 102(3):381-386. DOI: <https://doi.org/10.1007/S11240-010-9744-2/METRICS>.

SAG (Secretaría De agricultura y ganadería, d. d. c. y. t. a. (2004). *el cultivo de frijol: manual técnico para uso de empresas privadas, consultores individuales y productores*. 1, 2–10.

Sirvent, P; Belén, M. 2016. Micropropagación . universidad politécnica de valencia .

Solís-Ramos, LY; Ortiz-Pavón, JC; Andrade-Torres, A; Porrás-Murillo, R; Angulo, AB; Serna, EC de la; Solís-Ramos, LY; Ortiz-Pavón, JC; Andrade-Torres, A; Porrás-Murillo, R; Angulo, AB; Serna, EC de la. 2019. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris*) var. Brunca (en línea). *Revista de Biología Tropical* 67(2):83-94. DOI: <https://doi.org/10.15517/RBT.V67I2SUPL.37208>.

Steinitz, B; Barr, N; Tabib, Y; Vaknin, Y; Bernstein, N. 2010. Control of in vitro rooting and plant development in *Corymbia maculata* by silver nitrate, silver thiosulfate and thiosulfate ion (en línea). *Plant Cell Reports* 29(11):1315-1323. DOI: <https://doi.org/10.1007/S00299-010-0918-5/METRICS>.

Superintendencia de Competencia. 2015. Caracterización de la agroindustria del frijol rojo y sus condiciones de competencia en El Salvador (2007-2014) (en línea). Consultado 07 feb. 2021. Disponible en https://www.sc.gob.sv/wp-content/uploads/estudios_IE/estudios_PDF/Estudio_Frijol.pdf

Svetleva, D; Velcheva, M; Bhowmik, G. 2003. Biotechnology as a useful tool in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) improvement (en línea). *Euphytica* 131(2):189-200. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1023983831582/METRICS>.

VELTCHEVA, MR; Lilova SVETLEVA, D. 2005. IN VITRO REGENERATION OF *PHASEOLUS VULGARIS* L. VIA ORGANOGENESIS FROM PETIOLE EXPLANTS. *Journal of Central*

European Agriculture 6(1):53-58.

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>

11. ANEXOS

Cuadro A-1. Porcentaje de las estructuras formadas por explante en las dosis de AgNO₃.

Concentraciones de AgNO ₃ (mg l ⁻¹)	Porcentaje de regeneración (%)					
	Epicótilo			Nudo cotiledonal		
	Brote	Callo	Raíz	Brote	Callo	Raíz
0	44	28	28	96	0	4
0.42	58	16	26	96	0	4
1.69	59	14	27	90	5	5
4.23	50	15	35	92	2	6

Cuadro A-2. Protocolo específico de regeneración *in vitro* para nudos cotiledonales de la variedad de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) CENTA Costeño II.

PROTOCOLO ESPECÍFICO DE REGENERACIÓN *IN VITRO* VIA ORGANOGÉNESIS DIRECTA PARA NUDOS COTILEDONALES DE LA VARIEDAD DE FRIJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris* L.) CENTA COSTEÑO II.

1. Desinfección de semillas

Desinfecte las semillas con alcohol etílico al 70% durante 1 minuto en agitación constante.

Deseche el alcohol y continúe la desinfección con una solución de NACIO al 3%.

Agite por 10 minutos.

Haga tres lavados con agua destilada estéril o hasta eliminar la solución desinfectante.

2. Siembra de las semillas

Coloque 15 semillas por frascos con medio de germinación.

Sellar los frascos con plastic grap

Dejar germinar las semillas en completa oscuridad por un periodo de 7 días, a 25 ± 1°C.

3. Disección y siembra de los explantes

Retire la cubierta del frasco y disecte los explantes con la ayuda de pinzas y bisturí estériles en cámaras de flujo laminar.

Corte por debajo de los cotiledones, luego con ayuda de las pinzas retire ambos cotiledones, haga un corte por la parte superior de la inserción de los cotiledones para obtener el nudo cotiledonal.

4. Cultivo de explantes en condiciones de fotoperíodo

Coloque los explantes en forma horizontal en placas petri con 25 ml de medio semisólido MS (Murashige y Skoog 1962) con PH 5.7 suplementado con 30 g^l⁻¹ de sacarosa, 8 g^l⁻¹ de agar, 2.5 mg^l⁻¹ de BAP y 1.69 mg^l⁻¹ de AgNO₃.

Mantenga durante 15 días en condiciones de 16 horas luz / 8 horas oscuridad a 25±1°C y 58 μmol/m²/s.

5. Subcultivo de nudos cotiledonales y epicotilos

Al cabo 15 días transfiera los explantes al mismo medio de cultivo y manténgalo en las condiciones descritas anteriormente.

6. Evaluación de la regeneración

Transcurridos 30 días de iniciado el ensayo evalúe la respuesta a la regeneración *in vitro* mediante la formación de cualquier estructura organogénica

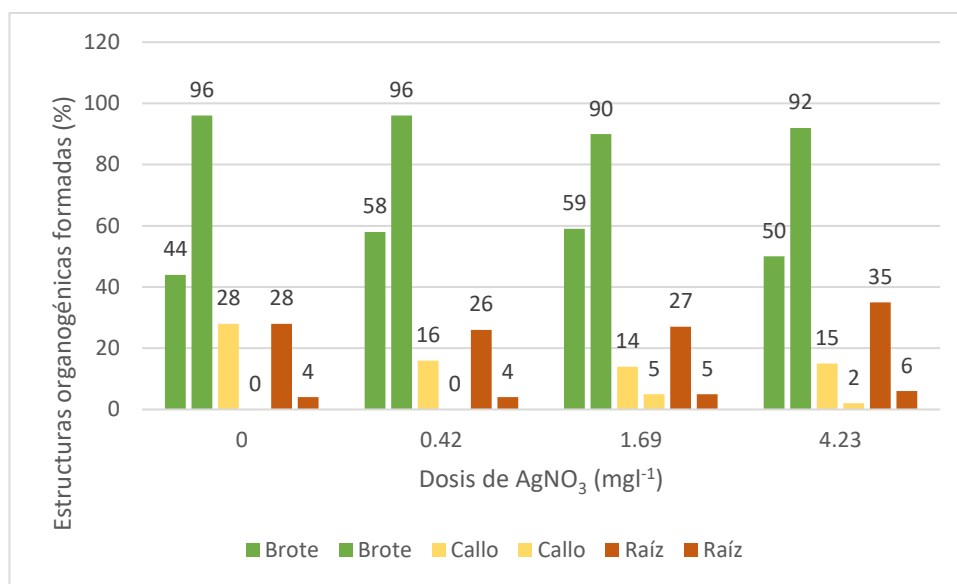


Figura A-1. Porcentaje de estructuras organogénicas formadas en cada dosis de AgNO₃