

## Diferenciación de la respuesta *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* cv. 'ICA Pijao' y cv. 'Tío Canela- 75' a altas temperaturas

Damaris Torres<sup>1\*</sup>, <https://orcid.org/0000-0001-8443-4209>

Lourdes R. García<sup>1</sup>, <https://orcid.org/0000-0003-1016-6939>

Sinesio Torres<sup>2</sup>, <https://orcid.org/0000-0003-2382-112X>

Novisel Veitia<sup>1</sup>, <https://orcid.org/0000-0001-6357-4843>

Amanda Martirena-Ramírez<sup>1</sup>, <https://orcid.org/0000-0002-1152-7735>

Raúl Collado<sup>1</sup>, <https://orcid.org/0000-0003-1416-528X>

Leonardo Rivero<sup>1</sup>, <https://orcid.org/0000-0003-3627-9421>

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

<sup>2</sup>Departamento de Agronomía, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

\*Autor para correspondencia e-mail: [damaris@ibp.co.cu](mailto:damaris@ibp.co.cu)

### RESUMEN

Para desarrollar un protocolo de selección *in vitro* se hace necesario lograr la diferenciación entre cultivares tolerantes y susceptibles al factor estudiado. El presente trabajo se realizó con el objetivo de seleccionar la temperatura que permita diferenciar *in vitro* la respuesta de los cultivares de *Phaseolus vulgaris* 'ICA Pijao' (susceptible) y 'Tío Canela- 75' (tolerante) a altas temperaturas. Se aplicaron diferentes temperatura (30, 35, 40, 45 y 50 °C) a semillas de los dos cultivares. Se evaluó *in vitro*, el porcentaje de germinación de las semillas, longitud de la radícula y la plúmula, número de explantes que formaron callos y número de brotes por callo. Se logró diferenciar entre el cv. 'ICA Pijao' (susceptible) y 'Tío Canela- 75' (Tolerante) con las variables longitud de la radícula, longitud de la plúmula, porcentaje de callos formados y número de brotes regenerados. Se seleccionó 35 °C como agente selectivo.

Palabras clave: frijol común, selección *in vitro*, tolerancia a altas temperaturas

### *In vitro* response differentiation of *Phaseolus vulgaris* cv. 'ICA Pijao' and cv. 'Tío Canela- 75' to high temperatures

### ABSTRACT

To develop an *in vitro* selection protocol, it is necessary to differentiate between tolerant and susceptible cultivars to the studied factor. The present work was carried out with the objective of selecting the temperature that allows to *in vitro* differentiating the response of the *Phaseolus vulgaris* cultivars 'ICA Pijao' (susceptible) and 'Tío Canela-75' (tolerant) to high temperatures. Different temperatures (30, 35, 40, 45 and 50 °C) were applied to seeds of the two cultivars. *In vitro* seed germination percentage, radicle and plumule length, number of explants that formed callus and number of shoots per callus were evaluated. It was possible to differentiate between cv. 'ICA Pijao' (susceptible) and 'Tío Canela- 75' (tolerant) with the variables radicle length, plumule length, percentage of calli formed and number of regenerated shoots. It was selected 35 °C as the selective agent.

Keywords: common bean, *in vitro* selection, tolerance to high temperatures

### INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es la especie más cultivada en el mundo dentro

del género *Phaseolus* (Hnatuszko-Konka *et al.*, 2019). Esta especie, por cultivarse en hábitats muy diversos, se encuentra expuesta a numerosos factores bióticos y abióticos que

afectan su rendimiento. Dentro de estos últimos el estrés originado por altas temperaturas es considerado la mayor limitante para la producción agrícola en el mundo (Salman *et al.*, 2019). Es por ello, que el desarrollo de investigaciones encaminadas a la obtención de nuevos cultivares tolerantes a estas condiciones adversas, son esenciales para contribuir a la seguridad alimentaria de una población creciente que requiere incrementos significativos en la producción de alimentos (Srivastava, 2019).

El cv. 'ICA Pijao' está incluido en los programas de mejoramiento genético que se desarrollan en Cuba, debido a que presenta un rendimiento elevado y es uno de los más atractivos para los pequeños productores. Este cultivar presenta grano negro y se cultiva principalmente en la región occidental del país. Además, posee hábito de crecimiento erecto lo que permite la cosecha mecanizada. Sin embargo, presenta como limitante que es susceptible a la sequía y las altas temperaturas (Bastidas, 1989).

Las técnicas de mejoramiento genético convencionales en *Phaseolus* resultan difíciles debido a numerosas causas como una base genética estrecha y muy estable (Mc Clean *et al.*, 2008). Cuando se emplea la biotecnología para estos propósitos se requieren de métodos rápidos y eficientes para la selección temprana de los materiales vegetales de interés (Hadrami *et al.*, 2011). La posibilidad de realizar la selección *in vitro* depende de poder contar con un agente selectivo que permita la diferenciación de cultivares resistentes y susceptibles a un factor determinado.

Diversas son las ventajas del empleo de la selección *in vitro* relacionadas con las posibilidades de selección desde etapas tempranas. Trabajar en estas condiciones significa controlar todos los parámetros ambientales en los cuales las plantas, tejidos o células están creciendo (Rai *et al.*, 2011). En la selección a altas temperaturas los métodos convencionales se hacen inefectivos debido al efecto simultáneo de otros factores como las enfermedades, ataques de insectos, sequía y nutrición (Fernández y Sánchez, 2017). Contar con técnicas *in vitro* que permitan seleccionar desde etapas tempranas individuos promisorios, representaría un paso inicial que

evitaría la evaluación en campo de un elevado número de individuos y se mejoraría la eficiencia de la selección (Gosal y Wani, 2018).

A pesar de las ventajas de la selección *in vitro* y que el estrés por altas temperaturas ya es considerado la mayor limitante para la agricultura en el mundo, pocos trabajos que abordan esta temática han sido referidos en la literatura científica. Ello se relaciona con el conocimiento limitado de los mecanismos moleculares y los genes relacionados con la tolerancia al calor (Salman *et al.*, 2019).

La mayoría de las investigaciones relacionadas con la tolerancia al estrés por calor en el frijol común se han realizado en condiciones *ex vitro* (Omae *et al.*, 2012; Collado *et al.*, 2016). Torres *et al.* (2019) evaluaron el efecto del tratamiento térmico a altas temperaturas sobre la germinación *in vitro* de semillas de *P. vulgaris* cv. 'ICA Pijao' y propusieron utilizar el tratamiento térmico en una incubadora a  $35 \pm 2$  °C durante 2 h para inducir estrés por altas temperaturas en dicho cultivar. No obstante, para desarrollar un protocolo de selección *in vitro* se hace necesario lograr la diferenciación entre cultivares tolerantes y susceptibles al factor estudiado. El presente trabajo se realizó con el objetivo de seleccionar la temperatura que permita diferenciar *in vitro* la respuesta de los cultivares de *P. vulgaris* 'ICA Pijao' (susceptible) y 'Tío Canela- 75' (tolerante) a altas temperaturas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Material vegetal*

Se emplearon semillas maduras de 1-4 meses de cosechadas de *Phaseolus vulgaris* L. de los cultivares 'ICA Pijao' y 'Tío Canela- 75' obtenidas en casa de cultivo bajo condiciones semicontroladas. Estos cultivares presentan diferentes respuestas al estrés por calor. Se considera el cultivar 'ICA Pijao' como susceptible y 'Tío Canela- 75' como tolerante, según describen Bastidas (1989) y Rosas *et al.* (1997), respectivamente.

### *Tratamiento térmico*

Se estudiaron diferentes temperaturas (30, 35, 40, 45 y 50 °C) aplicados sobre semillas de los dos cultivares. Este procedimiento se

realizó antes del proceso de desinfección de las semillas. Se emplearon 100 semillas por tratamiento, las cuales fueron expuestas al tratamiento térmico en una incubadora IF-3B (SAKURA) durante dos horas (Torres *et al.*, 2019).

Para la realización del experimento las semillas se colocaron en placas de Petri de 9.0 cm de diámetro, se sellaron con Parafilm y se expusieron al tratamiento térmico. Como control las semillas fueron expuestas a temperatura ambiente ( $28 \pm 2$  °C).

#### Germinación de semillas

Posterior al tratamiento térmico las semillas se desinfectaron y para ello se siguió el protocolo descrito por García *et al.* (2008). Una vez desinfectadas, se colocaron 10 semillas por frasco en un medio de cultivo de germinación compuesto por Sales MS (Murashige y Skoog, 1962),  $1.0 \text{ mg l}^{-1}$  de tiamina,  $1.13 \text{ mg l}^{-1}$  de 6- bencilaminopurina (6-BAP),  $30 \text{ g l}^{-1}$  de sacarosa,  $7.0 \text{ g l}^{-1}$  de agar (BioCen). Los medios de cultivo en estado semisólido se distribuyeron en frascos de vidrio con capacidad total de 250 ml, a los que se les adicionaron 30 ml de medio de cultivo. Los frascos fueron colocados en cámara de crecimiento a oscuridad constante a  $28 \pm 2$  °C.

A los tres días de cultivo, se cuantificó el número de semillas germinadas por frasco de cultivo y se calculó el porcentaje de germinación por frasco (PG) de acuerdo con la siguiente ecuación:  $PG = (SG/NTS) \times 100$ . Siendo SG es el número de semillas que emitió radícula a las 72 horas y NTS es el número total de semillas. Además, en 60 semillas por tratamiento seleccionadas al azar, se

evaluaron las variables asociadas a la germinación de las semillas: longitud de la radícula (cm) y longitud de la plúmula (cm) según lo recomendado por Torres *et al.* (2019). Para ello, se empleó una regla graduada (cm) y un pie de rey.

#### Formación de callos

A los tres días de encontrarse las semillas en el medio de cultivo de germinación se procedió a la obtención del explante a utilizar para la formación de callos. A las semillas germinadas, en ambos cultivares (Figura 1 A) se le eliminó la testa adherida a los cotiledones, la radícula y la plúmula (Figura 1 B) y como explante se utilizó un cotiledón con el nudo cotiledonal (Figura 1 C) para la formación de callo.

Los explantes obtenidos fueron transferidos a un medio de cultivo de formación de callos propuesto por Collado *et al.* (2013). Este medio de cultivo estaba compuesto por Sales MS, vitaminas B5 (Gamborg *et al.*, 1968),  $0.2 \text{ mg l}^{-1}$  de tidiazuron (TDZ),  $0.05 \text{ mg l}^{-1}$  de ácido indolacético (AIA),  $30 \text{ g l}^{-1}$  de sacarosa y  $8.0 \text{ g l}^{-1}$  de agar (BioCen).

Se utilizaron 10 explantes por frasco y se colocaron en condiciones de oscuridad total a  $28 \pm 2$  °C durante 7 días. Una vez transcurrido este tiempo, los explantes fueron llevados a la cabina de flujo laminar, se eliminaron los brotes emitidos y se colocaron nuevamente en un medio de cultivo fresco de formación de callos por 14 días para completar los 21 días de cultivo en esta fase. Luego, los frascos se colocaron en cámara de crecimiento a una intensidad luminosa de  $45 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  proveída por lámparas fluorescentes a  $25 \pm 2$  °C.

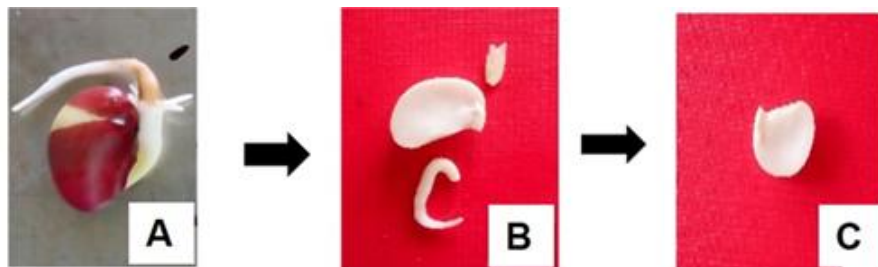


Figura 1. Obtención del explante para la formación de callos de *P. vulgaris* cvs 'ICA Pijao' y 'Tío Canela- 75'. A- Semilla germinada, B- Eliminación de la testa, radícula y plúmula, C- Cotiledón con nudo cotiledonal.

A los 21 días de cultivo se cuantificó el número de explantes que formaron callos. A partir de estos valores se calculó el porcentaje de explantes que formaron callos según la ecuación:  $PFC = (NCFC/NTNC) \times 100$ . Donde NCFC es el número de nudos cotiledonales que formaron callos y NTNC es el número total de nudos cotiledonales por frascos de cultivo.

#### Regeneración de brotes

A los 21 días de cultivo, los callos formados fueron colocados en un medio de cultivo para la regeneración de brotes propuesto por Collado *et al.* (2013). Este medio de cultivo estaba compuesto por Sales MS (Murashige y Skoog, 1962), vitaminas B5 (Gamborg *et al.*, 1968), 2.25 mg l<sup>-1</sup> de 6-bencilaminopurina (6-BAP), 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa, 7.0 g l<sup>-1</sup> de agar (BioCen). Se colocaron 10 explantes por frascos de cultivo.

Los frascos se ubicaron en cámara de crecimiento a una intensidad luminosa de 45  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  proveída por lámparas fluorescentes frías a 25±2 °C. A los 21 de cultivo se cuantificó el número de brotes regenerados por callo.

#### Análisis estadístico

Para el análisis de los valores de porcentaje de germinación, longitud de la radícula y la plúmula, número de explantes que formaron callos y número de brotes por callo se emplearon las pruebas H de Kruskal Wallis y U de Mann Whitney ( $p < 0.05$ ) previa comprobación del no cumplimiento de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza. El paquete estadístico empleado fue *Statistic Packaged for Social Science* (SPSS) versión 21.0 sobre Windows.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Germinación de semillas

El tratamiento térmico al que se sometieron las semillas de los dos cultivares estudiados no influyó en su germinación. Se obtuvo 100% de germinación en ambos cultivares hasta 35 °C. Cuando se utilizó 40 °C y 45 °C se alcanzó 98% de germinación en el cultivar 'ICA Pijao' (susceptible) y 99% en 'Tío Canela- 75' (tolerante). Asimismo, en 50 °C se obtuvo 97% de germinación de las semillas en ambos

cultivares. Esta respuesta podría estar relacionada con las condiciones ambientales a las que, posterior al tratamiento térmico, se encontraban expuestas las semillas cultivadas *in vitro* donde tenían la humedad y nutrientes necesarios para la germinación. Según INIFAT (2016), semillas con un ligero aumento en su contenido de humedad pudieran tener una tendencia a soportar el estrés térmico. En esta misma especie, Vasques *et al.* (1990), informaron que en granos de polen de *P. vulgaris* el porcentaje de germinación *in vitro* estuvo inversamente relacionado con el nivel de estrés por temperaturas altas y el tiempo de exposición al estrés. En ese estudio, 50 °C resultó ser la temperatura a la cual el polen que se había sometido a estrés durante una hora presentó disminución considerable en su germinación.

Contrario a lo obtenido en el presente trabajo en el cultivo de maní (*Arachis hypogaea* L.), sí se afectó la germinación de semillas cuando se utilizaron temperaturas hasta 38 °C (Caroca *et al.*, 2016).

Sin embargo, la temperatura sí influyó en la longitud de la radícula de *P. vulgaris* en los cultivares estudiados. En todos los tratamientos se encontraron diferencias significativas entre los cultivares para los valores medios de longitud de la radícula (Tabla 1), excepto para los controles (28 °C). Los mayores valores para cada tratamiento correspondieron al cultivar 'Tío Canela- 75' (tolerante).

En el cultivar susceptible la temperatura afectó considerablemente el crecimiento de la radícula. A medida que aumentó la temperatura esta variable fue disminuyendo a partir de 35 °C, y llegó a valores de 2.14 cm de disminución respecto al control en semillas tratadas con 50 °C. Estos resultados concuerdan con lo referido por Salman *et al.* (2019) quienes plantean que el estrés por calor puede reducir el crecimiento radical en los primeros estadios de desarrollo. En este cultivar la longitud de la radícula se afectó a partir de 40 °C lo que pudiera estar relacionado con la deshidratación de los tejidos del embrión provocada por el tratamiento térmico a la semilla (Chaves-Barrantes y Gutiérrez-Soto, 2017) que se debe entre otros fenómenos a que las altas temperaturas afectan considerablemente la permeabilidad de las membranas celulares en

Tabla 1. Longitud de la radícula de semillas de *Phaseolus vulgaris* L. sometidas a tratamiento térmico previo a la germinación *in vitro*, a los tres días de cultivo.

Temperatura (°C)	'ICA Pijao' (Susceptible)		'Tío Canela- 75' (Tolerante)	
	Longitud radícula (cm)	Rangos medios	Longitud radícula (cm)	Rangos medios
	28 (control)	5.97	22.68a	5.48
30	5.20	13.92b	6.12	24.53a
35	5.22	15.94b	7.59	18.03a
40	4.61	12.79b	6.41	30.06a
45	4.27	13.42b	5.49	32.07a
50	3.83	14.42b	5.50	26.12a

Rangos medios con letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas según la prueba de U. Mann Whitney para  $p < 0.05$  ( $n = 60$ )

las radículas (Kurepin *et al.*, 2015). Así mismo, Nava (2013) informó que el aumento de la temperatura a más de 40 °C provocó un incremento en el daño de la membrana celular en cultivares de maíz (*Zea mays* L.) y frijol. Además, se ha descrito que en el frijol común una de las etapas más sensibles a modificarse bajo la acción del estrés abiótico es el crecimiento (Cabrera-Ponce *et al.*, 2014).

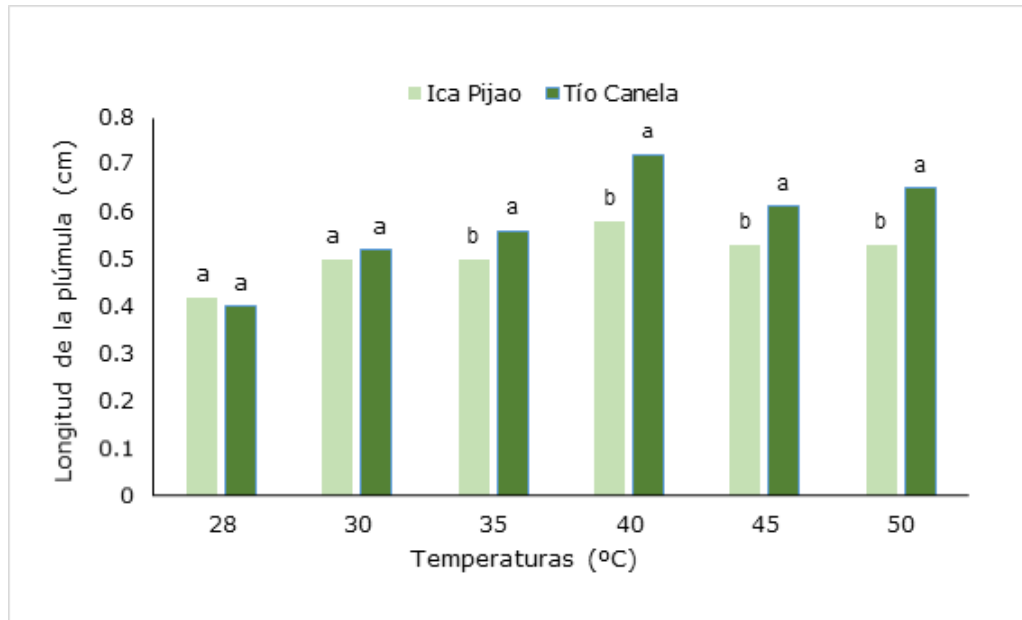
Por el contrario, en el cultivar tolerante se observó menor afectación en la longitud de la radícula. Cuando se utilizaron 30, 35 y 40 °C, se observó un incremento en la longitud de la radícula, respecto al control, de 0.64 cm, 2.11 cm y 0.93 cm respectivamente, mientras que en 45 y 50 °C solo se observó una disminución de 0.01 cm y 0.02 cm. En plantas sometidas a estrés térmico, se ha observado una mayor elongación radical (Martínez *et al.*, 2017). La longitud de la radícula, es un indicador que refleja la capacidad de la planta para poder realizar una mayor absorción de agua y nutrientes, indispensables para las etapas fenológicas posteriores a la germinación (INIFAT, 2016) y esto pudiera ser parte de la respuesta de este cultivar en estas condiciones experimentales. De manera general, se puede señalar, que la longitud del sistema radical es una de las características fundamentales de las especies tolerantes a la sequía y a altas temperaturas por lo que podría ser un indicador a tener en cuenta para la selección de cultivares con adaptabilidad a estas condiciones (Barrios *et al.*, 2014). En el presente trabajo a partir de

30 °C, se logró diferenciar entre el cultivar tolerante y el susceptible cuando fue evaluada la longitud de la radícula.

La longitud de la plúmula mostró diferencias significativas entre los cultivares de *P. vulgaris* estudiados a partir de 35 °C (Figura 2). Los mayores valores en esta variable se observaron en el cultivar tolerante ('Tío Canela- 75'). Similares resultados fueron referidos por Collado *et al.* (2016) quienes encontraron que 35 y 40 °C fueron las temperaturas apropiadas para diferenciar la respuesta de cultivares de *P. vulgaris* en la variable pérdida de electrolito. La longitud de la plúmula es otro indicador que refleja la capacidad de la planta para poder realizar una mayor absorción de agua y nutrientes (INIFAT, 2016).

En el cultivar susceptible esta variable varió de 0.5 a 0.58 cm, mientras que en el cultivar tolerante se incrementó en todos los tratamientos cuando se compararon con el control y llegó a su máximo valor cuando se utilizó 40 °C. En esta temperatura la longitud media de la plúmula se incrementó en 0.32 cm con respecto al control.

Los resultados de la evaluación de la longitud de la radícula y de la longitud de la plúmula en semillas germinadas *in vitro* permitieron diferenciar la respuesta a altas temperaturas entre el cultivar susceptible y el tolerante. Ello posibilita utilizar estas variables para la selección de la temperatura a utilizar en la selección *in vitro* a diferencia del porcentaje



Letras diferentes sobre barras en cada temperatura indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), según las pruebas de H de Kruskal Wallis y U de Mann-Whitney

Figura 2. Longitud de la plúmula en semillas de dos cultivares de *Phaseolus vulgaris* ('ICA Pijao' y 'Tío Canela- 75') sometidas a tratamiento térmico previo a la germinación *in vitro*, a los tres días de cultivo.

Tabla 2. Formación de callos a los 21 días de cultivo en *Phaseolus vulgaris* cv. 'ICA Pijao' y cv. 'Tío Canela-75' a partir de explantes tomados de semillas sometidas a tratamiento térmico con diferentes temperaturas previo a la germinación.

Temperatura (°C)	'ICA Pijao'		'Tío Canela-75'	
	Formación de callos (%)	Rangos medios	Formación de callos (%)	Rangos medios
28	71.66	8.83b	90.90	15.45a
30	96.66	NS	96.66	NS
35	97.07	34.66b	100.00	40.00a
40	100.00	NS	100.00	NS
45	88.00	8.50b	96.00	12.50a
50	0.00	--	0.00	--

Rangos medios con letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas según la prueba de U. Mann Whitney para  $p < 0.05$ , ( $n=60$ ). NS, no significativo

de germinación de las semillas donde no se observaron diferencias.

#### Formación de callos

A medida que se incrementó la temperatura a la que se sometieron las semillas previo a la germinación, hasta 40 °C, se estimuló la formación de callos en los dos cultivares de

*P. vulgaris* incluidos en el estudio (Tabla 2). Este resultado pudiera deberse a la aceleración del metabolismo celular que ocurre cuando se realizan tratamientos térmicos por tiempos definidos al material vegetal, lo que pudo provocar la estimulación de la división celular y la elongación de las células, así como la alteración de los procesos metabólicos como son la síntesis de fitohormonas y ácidos

nucleicos (Chaves-Barrantes y Gutiérrez-Soto, 2017).

En esta respuesta pudiera haber influido, además, que dentro de los componentes del medio de cultivo de formación de callos para *P. vulgaris* se encuentra el thidiazuron (TDZ) del cual se utiliza 0.2 mg l<sup>-1</sup>. Este compuesto (C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>) es uno de los sustitutos más efectivos de las fenilureas con actividad de citoquinina pero además puede modular los niveles de auxina endógena (Govindaraj, 2018). Según Veerasamy *et al.* (2007) las citoquininas atenúan los daños causados por el estrés por calor. Estudios llevados a cabo en *Agrostis stolonifera* L. indicaron que la aplicación exógena de citoquininas aminora los daños debidos al estrés por calor, ya que inhiben la acción de las proteasas sobre la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa, e inducen o sobrerregulan la producción de proteínas de choque térmico.

Al comparar la formación de callos entre los cultivares evaluados se observaron diferencias significativas cuando se utilizaron temperaturas de 35 y 45 °C (Tabla 2). En 45 °C la formación de callos disminuyó en ambos cultivares, no obstante, la disminución fue más acentuada en el cultivar susceptible.

Los explantes de semillas tratadas con 50 °C no formaron callos en los dos cultivares. Esto podría explicarse porque temperaturas muy altas pueden afectar los procesos metabólicos de las células e incluso dañarlas irreparablemente, y por lo tanto no puede evidenciarse un crecimiento celular sucesivo (Butler *et al.*, 2014). De modo similar, estos

resultados pudieran deberse a que en la mayoría de estos explantes se produjo la caída del cotiledón, que se ha descrito como la principal fuente de almacenamiento de reguladores del crecimiento que promueven el desarrollo del callo (Collado *et al.*, 2013; Martirena-Ramírez *et al.*, 2018).

Resultados contrarios fueron obtenidos por Kairuz (2013) al aplicar diferentes temperaturas (37-45 °C) sobre discos de hojas de *Digitalis purpurea* L. No se observó diferencias significativas en el grado de formación de callos por explante para el control, 37 °C y 40 °C, mientras que no se apreció la formación de callos cuando los discos de hojas fueron tratados con 45 °C. En el presente trabajo se comenzó a observar afectaciones en los explantes de semillas tratadas con 45 °C y ya a 50 °C fue nula la formación de callos en ambos cultivares.

En los explantes de semillas tratadas con 35 y 45 °C se observaron diferencias en la formación de callos entre los cultivares estudiados, aunque desde el control se observó diferencia entre ellos por la condición genotipo dependiente de esta especie.

#### Regeneración de brotes

El tratamiento térmico realizado a las semillas en los cultivares estudiados también influyó en la regeneración de brotes (Tabla 3). A medida que se incrementó la temperatura a partir de 35 °C hubo una tendencia a la disminución de la regeneración de brotes en ambos cultivares.

Tabla 3. Regeneración de brotes a partir de callos de *Phaseolus vulgaris* L. en los cultivares 'ICA Pijao' y 'Tío Canela-75' a los 21 días de cultivo.

Temperatura (°C)	'ICA Pijao'		'Tío Canela- 75'	
	Brotes regenerados/callos	Rangos medios	Brotes regenerados/callos	Rangos medios
28	1.50	123.19 a	0.94	99.86 b
30	1.02	118.76 a	0.75	103.18 b
35	1.34	81.63 b	1.58	96.70 a
40	0.62	NS	0.40	NS
45	0.51	NS	0.34	NS

Rangos medios con letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas según la prueba de U. Mann Whitney para  $p < 0.05$ , ( $n = 60$ ). NS, no significativo

En el control y cuando se utilizó 30 °C se observaron mayores valores de regeneración de brotes en el cultivar 'ICA Pijao' en comparación con el cultivar 'Tío Canela -75'. Esta respuesta pudiera estar relacionada con la condición genotipo dependiente de *P. vulgaris* cuando es cultivado *in vitro*. Similares resultados fueron obtenidos por Collado *et al.* (2013) en cinco cultivares de *P. vulgaris* en condiciones *in vitro* y encontraron diferencias en la regeneración de brotes entre ellos.

Sólo cuando se empleó 35 °C el número de brotes regenerados fue mayor en el cultivar tolerante. La aplicación de este estrés, podría haber inducido la activación de los factores de golpe térmico (HSFs) y la expresión de proteínas de estrés por calor (HSPs) que podrían modificar la relación entre auxinas y citoquininas, y activar la acción de la segunda (Salman *et al.*, 2019). Posteriormente, la síntesis de proteínas de estrés por calor de bajo peso molecular (sHSPs) de cloroplastos, permitiría proteger el fotosistema II y los tilacoides de la labilidad por estrés (Wang *et al.*, 2016). Ambos procesos justificarían el enverdecimiento notable de los callos al ser transferidos a la luz, en medio de cultivo de regeneración de brotes con 6-BAP.

#### CONCLUSIONES

Las variables longitud de la radícula, longitud de la plúmula, porcentaje de callos formados y número de brotes regenerados permiten diferenciar la respuesta *in vitro* a altas temperaturas de los cultivares 'ICA Pijao' (susceptible a altas temperaturas) y 'Tío Canela - 75' (tolerante). Se puede emplear 35 °C, como agente selectivo, para conducir la selección *in vitro* a estrés térmico con estos cultivares de *P. vulgaris* L.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado a través del proyecto: Mejoramiento genético de *Phaseolus vulgaris* L. para la búsqueda de resistencia a estrés biótico y abiótico (código P131LH001084) financiado por el Programa Nacional de Alimento Humano del CITMA. Los financistas no tuvieron participación en el diseño del estudio, la colecta y análisis de los datos. La decisión de publicar o la preparación del manuscrito es de la institución y el colectivo de autores del proyecto.

#### Conflicto de interés

Los autores no declaran conflictos de intereses.

#### Contribución de los autores

Conceptualización LGR y ST, Análisis formal LGR y DT, Investigación DT, LGR, NV, LR y AMR, Metodología DT y LGR, Escritura-Primera redacción LGR, DT, RC, Escritura-Revisión y Edición LGR, DT y ST.

#### REFERENCIAS

Barrios EJ, López C, Kohashi J, Acosta J, Miranda S, Mayek P, Canul J (2014) Morfología del embrión en frijol y su comparación entre razas Durango y Jalisco. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 5(6): 965-978

Bastidas G (1989) Producción e investigación de frijol en Colombia. ASIAVA 31: 27-31

Butler TJ, Celen AE, Webb SL, Krstic D, Interrante SM (2014) Temperature affects the germination of forage legume seeds. Crop Science 54: 2846-2853

Cabrera-Ponce JL, López L, León-Ramírez CG, Jofre-Garfás AE, Verver-Y-Vargas A (2014) Stress induced acquisition of somatic embryogenesis in common bean *Phaseolus vulgaris* L. Protoplasma 252(2): 559-570; doi: 10.1007/s00709-014-0702-4

Caroca R, Zapata N, Vargas M (2016) Efecto de la temperatura sobre la germinación de cuatro genotipos de maní (*Arachis hypogaea* L.). Chilean J Agric Anim Sci 32(2): 94-101

Chaves-Barrantes NF, Gutiérrez-Soto MV (2017) Respuestas al estrés por calor en los cultivos. I Aspectos moleculares, bioquímicos y fisiológicos. Agronomía Mesoamericana 28(1): 237-253; doi: 10.15517/am.v28i1.21903

Collado R, Carabeo A, Poveda MI, Rojas L, Leiva-Mora M, García LR, Veitía N, Martirena A, Torres D, Rivero L (2016) Respuesta de cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. en condiciones inducidas de estrés térmico. Biotecnología Vegetal 16(1): 45-51

Collado R, Veitía N, Bermúdez-Carabaloso I, García LR, Torres D, Romero C, Rodríguez-Lorenzo JL, Angenon G (2013) Efficient *in vitro* plant regeneration via indirect



- organogenesis for different common bean cultivars. *Sci Hortic* 153: 109-116
- Fernández AF, Sánchez AC (2017) Estudio de las propiedades fisicoquímicas y calidad nutricional en distintas variedades de frijol consumidas en México. *Nova Scientia* 9(1): 133-148
- García LR, Collado R, Bermúdez-Caraballosa I, Veitía N, Torres D, Romero C (2008) Regeneración de plantas vía organogénesis directa en *Phaseolus vulgaris* L. *Biotecnología Vegetal* 8(2): 109-114
- Gamborg OL, Millar RA, Djma A (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50: 151-158
- Gosal SS, Wani SH (2018) Cell and tissue culture approaches in relation to Crop Improvement. En: Gosal S, Wani S (eds). *Biotechnologies of Crop Improvement Volume 1*, pp. 1-55. Springer, Cham; ISBN: 978-3-319-78283-6
- Govindaraj S (2018) Thidiazuron: A potent Phytohormone for *in vitro* regeneration. En: Ahmad N, Faisal M (eds). *Thidiazuron: From Urea Derivative to Plant Growth Regulator*, pp. 393-418. Springer, Dordrecht; ISBN: 978-981-10-8004-3
- Hadrami AE, Daayf F, Hadrami IE (2011) *In vitro* Selection for Abiotic Stress in Date Palm. En: Jain S, Al-Khayri J, Johnson D (eds). *Date Palm Biotechnology*, pp.237-252. Springer, Dordrecht; ISBN: 9789400713178
- 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: 6248; doi: 10.1038/s41598-019-42723-8
- INIFAT (2016) Estudio de los efectos de las altas temperaturas sobre el crecimiento y desarrollo de cultivares de granos de interés agrícola, Informe Científico-Técnico, Programa de cambio climático en Cuba: Impactos, Mitigación y Adaptación. Disponible en: <http://repositorio.geotech.cu/jspui/handle. Consultado 07/02/2019>
- Kairuz EH-D (2013) Metodología para la escisión de genes marcadores de selección en plantas de *Digitalis purpurea* L. mediante el sistema Cre/lox. Tesis en opción al Título Académico de Máster en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Santa Clara, Cuba
- Kurepin LV, Ivanov AG, Zaman M, Pharis RP, Allakhverdiev SI, Suleyman RP, Hurry V, Hüner N (2015) Stress-related hormones and glycinebetaine interplay in protection of photosynthesis under abiotic stress conditions. *Photosynth Res* 126: 221-235; doi: 10.1007/s11120-015-0125-x
- Martínez LA, Payán JG, Armendáriz MO, Yépez EG, Arredondo TM, González JA (2017) Estrés térmico en cultivo del trigo. Implicaciones fisiológicas, bioquímicas y agronómicas. *Cultivos Tropicales* 38(1): 57-67
- Martirena-Ramírez A, Veitía N, García LR, Collado R, Torres D, Rivero L, Ramírez-López M (2018) Dosis óptima de radiaciones Gamma para la regeneración de plantas *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* L. cultivar 'BAT-93'. *Biotecnología Vegetal* 18(1): 21-29
- Mc Clean PE, Lavin M, Gepts P, Jackson SA (2008) *Phaseolus vulgaris*: a diploid model for soybean. En: Stacey G (ed). *Genetics and Genomics of Soybean*, pp.55-76. Springer, Dordrech; ISBN: 978-0-387-72299-3
- Murashige T, Skoog FA (1962) Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Nava SC (2013) Temperatura óptima y etapa fenológica para determinar la termoestabilidad de la membrana celular en maíz y frijol. *Revista Internacional de Botánica Experimental* 82: 249-254
- Omae H, Kumar A, Shono M (2012) Adaptation to high temperature and water deficit in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during the reproductive period. *Journal of Botany* 2012: 1-6; doi: 10.1155/2012/803413
- Rai MK, Rajwant K, Kalia AB, Rohtas Singh A, Manu P, Gangola AC, Dhawana AK (2011) Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection—An overview of the recent progress. *Environmental and Experimental Botany* 71: 89-98

- Rosas JC, Varla OI, Beaver JS (1997) Registration of Tio Canela 75 small red bean. *Crop Sci* 37: 1391
- Salman M, Majeed S, Rana IA, Atif RM, Azhar MT (2019) Novel breeding and biotechnological approaches to mitigate the effects of heat stress on cotton. En: Wan, S (ed). *Recent Approaches in Omics for Plant Resilience to Climate Change*, pp. 251-277. Springer, Cham; ISBN: 978-3-030-21687-0
- Srivastava N (2019) Molecular and Biotechnological Tools in developing abiotic stress tolerance in wheat. En: Hasanuzzaman, M, Nahar K, Hossain M (eds). *Wheat Production in Changing Environments*, pp. 283-341. Springer, Singapore; ISBN: ISBN 978-981-13-6882-0
- Torres D, García LR, Veitia N, Martirena-Ramírez A, Collado R, Rivero L, Torres S, Acosta-Suárez M (2019) Efecto del tratamiento térmico a altas temperaturas sobre la germinación *in vitro* de semillas de *Phaseolus vulgaris* cv. 'ICA Pijao'. *Biotecnología Vegetal* 19(3): 215-223
- Vásquez LM, Montes CR, White JW, Roca W (1990) Metodología para la selección de líneas de frijol *Phaseolus vulgaris* L. por estrés de temperatura a nivel microgametofítico. *Acta Agron* 40(12): 7-14
- Veerasamy MY, He Y, Huang B (2007) Leaf senescence and protein metabolism in creeping bentgrass exposed to heat stress and treated with cytokinins. *J Am Soc Hort Sci* 132: 467-472
- Wang K, Zhang X, Ervin EH (2016) Small Heat Shock Proteins, a Key Player in Grass Plant Thermotolerance. En: Asea A, Kaur P, Calderwood S (eds). *Heat Shock Proteins and Plants*. *Heat Shock Proteins* 10, pp. 41-64. Springer, Cham; ISBN: 978-3-319-46340-7

Recibido: 06-10-2020

Aceptado: 02-12-2020

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/> Está permitido su uso, distribución o reproducción citando la fuente original y los autores.