

**Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Instituto de Biotecnología de las Plantas
Departamento de Biología**



TESIS DE DIPLOMA

**Respuesta de genotipos de *Phaseolus vulgaris* L. en
condiciones inducidas de estrés térmico, hídrico y salino**

Autor: Annerys Carabeo Pérez

**Santa Clara
2015**

**Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Instituto de Biotecnología de las Plantas
Departamento de Biología**



TESIS DE DIPLOMA

**Respuesta de genotipos de *Phaseolus vulgaris* L. en
condiciones inducidas de estrés térmico, hídrico y salino**

Autor: Annerys Carabeo Pérez

Tutores: Dr C. Michel Leiva-Mora

MSc. Ivian Poveda Martínez

Consultante: Dr C. Raúl Collado López

Santa Clara

2015

“Es preciso fomentar el estudio de las ciencias como vía única para el conocimiento de las verdades.”

José Martí

A todos los que quiero y han estado junto a mí durante estos cinco años.....

Muchas gracias:

A mis padres quienes me han dado todo lo que está a su alcance, incluso mucho antes de que yo naciera.

A mi mamá, sin la cual muchas de las cosas que he hecho hasta ahora no hubieran sido posibles, porque en este recorrido no solo se ha desempeñado como mamá, sino también como amiga, consejera, guía y hermana. Gracias por siempre darme ese apoyo incondicional, el consejo en el momento más oportuno y estar siempre a mi lado en los instantes felices y en los que no lo son también. Gracias por enseñarme que la base de las buenas relaciones está en la confianza y el respeto mutuo. En fin sabes que parte de este sueño es gracias a ti.

A mi hermano por demostrarme cada día que somos muy diferentes, sin embargo, ser auténticos, es lo que nos hace ser especiales y únicos. A mi papá gracias por apoyarme sobre todo en esta última etapa tan fuerte.

A mi abuelita Nery, por también siempre dar su apoyo sobre todo cuando mi mamá no podía estar presente, a tía Elena por enseñarme que se puede ser pequeña pero muy grande de espíritu, a Timo por demostrarme cada día que uno puede hacer lo que se proponga en la vida, solo necesita un poco de esfuerzo, dedicación y perseverancia. Gracias a mi tío Víctor que desde lejos siempre estuvo al tanto de todo y también al resto de la familia que estuvieron pendientes de mí.

A mis tutores gracias por tener tanta paciencia y dedicación, por rectificarme siempre los errores de una manera constructiva, por enseñarme detalles que no solo me sirvieron para la tesis sino para toda la vida. A Ivian muchas gracias también por el apoyo incondicional durante la etapa experimental y por dedicarme tiempo incluso cuando no lo tenías.

A Raúl Collado mil veces gracias por estar ahí cuando pensé que no tenía a nadie y por hacer una revisión tan detallada del documento (gracias también por enseñarme a ser mejor ser humano). A Janet muchísimas gracias por cada minuto que dedicaste en la revisión de la tesis y por todos los consejos que no solo quedaron para este momento sino para la vida futura.

A todas las personas del laboratorio de Biología Molecular y del laboratorio de Fitopatología, en especial a Luis o “el niño” como cariñosamente todos le llaman por estar conmigo en todos los experimentos y aclararme siempre que tuve una duda. Al profe

Silvio muchas gracias por facilitarme parte de las semillas de los genotipos evaluados. De la fase de aclimatización un especial agradecimiento a Leo y Amado. A Novisel y Amanda muchas gracias por darme siempre apoyo y buenos consejos para la presentación, sobre todo Novi muchas gracias por ayudarme con la estadística.

A mis compañeras de cuarto Anaimy, Wendy, Lucía y Aimee, con las cuales he convivido durante 5 años. Años que serán inolvidables para mi pues juntas hemos experimentado momentos de insomnio, risa, burla, de crítica, de diversión, de preocupación, de consuelo; pero pienso que a pesar de todo siempre hemos estado allí para ayudarnos en lo que fuera. Especialmente debo darle un eterno agradecimiento a Anaimy y Wendy quienes me ayudaron incondicionalmente para que los experimentos de esta tesis salieran en tiempo, me dieron aliento cuando ya no lo tenía y buenos consejos siempre que me hizo falta.

Gracias a Randel porque además de ser un excelente compañero y amigo nos deleitó en varias ocasiones con sus recetas de cocina; a Doby que me sacó varias veces de apuros y siempre tuvo un buen consejo para mí, a Jennifer pues aunque estuviera de mal humor siempre tuvo una sonrisa que regalarme. Al resto de mis compañeros de aula, muchas gracias también, porque juntos compartimos muchos momentos de alegría, baile, largas noches de estudio, momentos de nerviosismo minutos antes de entrar a un examen o algún seminario. También gracias a Daylin, Divaldo, Milde, Yoandry, Leudi, Dairon y René que aunque no terminaron con nosotros siempre formarán parte del grupo y nunca los olvidamos, en fin a todos ellos gracias por ser parte de mi vida.

A todos mis profesores, gracias por no rendirse con esta juventud y darlo todo para que siempre saliéramos bien, por estar disponibles para aclarar una duda y brindar incluso su apoyo y comprensión con algún problema personal que tuviera cualquiera de nosotros. Gracias por darnos ese voto de confianza de que podíamos ser buenos alumnos y mejores profesionales algún día.

Gracias a Héctor Valero, a Daisy, al Guille, los cuales me brindaron su ayuda siempre que me hizo falta, a cualquier hora y sin importar que fuese sábado o domingo.

En fin gracias a todas aquellas personas que de una forma u otra, me ayudaron cuando me hacía falta y a las que me pusieron trabas en el camino también pues gracias a ellos aprendí a ser más fuerte y a valorar más a los verdaderos amigos.

La producción de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) tiene gran importancia en Cuba, sin embargo, diversos factores afectan el rendimiento de este cultivo y no todas las variedades de frijol responden de la misma forma a las condiciones estresantes. El objetivo de este trabajo fue: determinar la respuesta de genotipos de *P. vulgaris*, en condiciones inducidas de estrés térmico, hídrico y salino. Para ello, se analizó el efecto del estrés hídrico inducido con PEG-6 000 sobre la germinación de semillas *in vitro* de *P. vulgaris* var. ICA Pijao; se determinó el efecto de la temperatura sobre la pérdida de electrólitos y sobre la liberación de fosfato inorgánico del tejido foliar en 10 genotipos de *P. vulgaris* a los cuales también se le determinó la respuesta del tejido foliar a condiciones de estrés hídrico y salino inducido con PEG-6 000 y NaCl. Los resultados mostraron que el incremento de las concentraciones de PEG-6 000, redujo el porcentaje de la germinación *in vitro* de semillas de *P. vulgaris* var. ICA Pijao, lo cual confirmó que el agente estresante puede ser utilizado para determinar la respuesta fisiológica en genotipos de *P. vulgaris*. La temperatura influyó sobre la pérdida de electrólitos y la liberación de fosfato inorgánico en el tejido foliar, y permitió diferenciar la respuesta de varios genotipos en condiciones inducidas de estrés térmico. El estrés hídrico y salino afectó notablemente el tejido foliar de los genotipos estudiados, donde la formación de áreas necróticas permitió discernir entre genotipos con respuesta diferente.

Palabras clave: áreas necróticas, fosfato inorgánico, germinación, pérdida de electrólitos.

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) production has been very important in Cuba, however, several factors affect the yield of this crop and not all varieties of beans respond the same way to the stressful conditions. The aim of this study was to determine the response of different *P. vulgaris* genotypes under thermal and salt induced stress and water deficit. For this, the effect of water deficit induced by PEG-6 000 on the *P. vulgaris* var. ICA Pijao seeds *in vitro* germination was analyzed; the effect of temperature on electrolyte leakage and the release of inorganic phosphate from leaf tissue in 10 genotypes of *P. vulgaris* was determined. Also the leaf tissue response to water deficit conditions and salt stress induced by PEG-6 000 and NaCl were assayed. The results showed that increasing concentrations of PEG-6 000, reduced the percentage of *P. vulgaris* var. ICA Pijao *in vitro* germination, which confirmed that this stressor agent could be useful to elucidate the physiological response of *P. vulgaris* genotypes. The temperature influenced the electrolytes leakage and the release of inorganic phosphate in the leaf tissue, and distinguished the response of various genotypes in a thermally induced stress. The water deficit and salt stress significantly affected the leaf tissue of the genotypes studied, where the formation of necrotic areas allowed differentiate between genotypes with different response.

Key words: electrolyte leakage, germination, inorganic phosphate, necrotic areas.

Introducción	1
1. Revisión Bibliográfica	4
1.1. Origen y distribución del frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	4
1.1.1. Ubicación taxonómica	4
1.1.2. Principales productores	4
1.1.3. Importancia del cultivo de frijol	5
1.2. Descripción morfológica y ciclo fenológico	6
1.2.1. Fases del ciclo fenológico	8
1.2.2. Evaluación del cultivo a partir de variables morfológicas y fisiológicas	8
1.3. Factores que afectan el cultivo del frijol	11
1.3.1. Generalidades del estrés abiótico	12
1.3.2. Estrés hídrico	12
1.3.3. Estrés salino	13
1.3.4. Respuestas de las plantas al estrés abiótico	15
1.3.5. Bioensayos para evaluar la respuesta de la planta al estrés	16
2. Materiales y Métodos	20
2.1. Procedimientos generales	20
2.2. Efecto del estrés hídrico inducido con Polietilenglicol-6 000 sobre la germinación de semillas	20
2.3. Efecto de la temperatura sobre la pérdida de electrólitos y la liberación de fosfato inorgánico en tejido foliar	21
2.3.1. Material vegetal, condiciones de cultivo y colecta de muestras	21
2.3.2. Pérdida de electrólitos	22
2.3.3. Concentración de fosfato inorgánico	22
2.4. Respuesta del tejido foliar expuesto a condiciones de estrés hídrico y salino	23
2.5. Análisis estadístico	24
3. Resultados	25
3.1. Efecto del estrés hídrico inducido con Polietilenglicol-6 000 sobre la germinación de semillas	25
3.2. Efecto de la temperatura sobre la pérdida de electrólitos y la liberación de fosfato inorgánico en tejido foliar	27
3.2.1. Pérdida de electrólitos	27
3.2.2. Concentración de fosfato inorgánico	28
3.3. Respuesta del tejido foliar expuesto a condiciones de estrés hídrico y salino	29
4. Discusión	35
4.1. Efecto del estrés hídrico inducido con Polietilenglicol-6 000 sobre la germinación de semillas	35
4.2. Efecto de la temperatura sobre la pérdida de electrólitos y la liberación de fosfato inorgánico en tejido foliar	37
4.2.1. Pérdida de electrólitos	37
4.2.2. Concentración de fosfato inorgánico	39
4.3. Respuesta del tejido foliar expuesto a condiciones de estrés hídrico y salino	40
Conclusiones	42
Recomendaciones	43

En varios países del mundo las leguminosas constituyen un elemento básico en la dieta debido a su alto contenido de proteínas, vitaminas, calorías y otros minerales. Dentro de este grupo, el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una especie valiosa. Este cultivo es oriundo de América Latina, aunque actualmente se encuentra distribuido en los cinco continentes (Ramírez y Rangel, 2011).

En regiones como África oriental, meridional y América Latina el frijol es cultivado por pequeños agricultores, con frecuencia en condiciones no favorables y de mínimo uso de insumos (Beebe *et al.*, 2008), donde constituye una fuente económica de proteína y calorías para la población (Rao, 2001). En países desarrollados es cultivado con altas tecnologías y principalmente para la exportación, representando el 23% de la producción mundial. En Cuba, la obtención de este grano está a cargo fundamentalmente del sector agrícola no estatal, constituido en su mayoría por fincas y pequeñas parcelas, con condiciones muy diversas y baja disponibilidad de insumos agroquímicos y energéticos (ONEI, 2014).

A pesar de su alto valor alimenticio la producción de frijol es limitada, pues frecuentemente este cultivo es afectado tanto por factores bióticos como abióticos (Placencio y Núñez, 2002). El primer caso resulta de la interacción con otros organismos, por ejemplo daños mecánicos por insectos herbívoros, competencia por el hábitat o infección por microorganismos fitopatógenos y virus. Por su parte, los factores abióticos como la sequía, la salinidad, la temperatura, la humedad, la intensidad luminosa y la acidez de los suelos, también influyen en el desarrollo del cultivo (Schulze *et al.*, 2002). De hecho, todos estos factores pueden provocar estrés en la planta (Mahajan y Tuteja, 2005), lo cual afecta su rendimiento biológico y agrícola.

El estrés abiótico surge como resultado de un exceso o un déficit en el ambiente químico-físico que interactúa con una planta, y reduce en ella su productividad entre un 60-80% en dependencia del tipo de estrés y del cultivo (Mahajan y Tuteja, 2005). El estrés causado por los factores hídrico y salino afecta en gran medida el rendimiento del cultivo. Sin embargo, no todas las variedades de frijol responden de la misma forma a condiciones estresantes pues el nivel de susceptibilidad o tolerancia varía de una a otra (Cabrera, 2011). El grado de tolerancia depende además de la intensidad y la etapa de desarrollo del cultivo sobre la que el factor actúe (Boicet, 2010).

Existen diversas variables morfofisiológicas que permiten observar en qué medida se producen los daños en una especie y como se afecta el porcentaje de germinación y crecimiento ante condiciones edafoclimáticas adversas. Además permiten comparar los niveles de tolerancia o

susceptibilidad entre diferentes cultivares. Dentro de ellas se encuentran la longitud de la raíz principal, longitud del tallo, número total de raíces, número de hojas, área foliar, materia seca, contenido hídrico relativo, discriminación de isótopos de carbono, porcentaje de pérdida de electrolitos, liberación de fosfato inorgánico, formación de áreas necróticas en el tejido foliar, entre otros.

Las membranas celulares son los primeros blancos en muchos tipos de estrés en plantas. El mantenimiento de su estabilidad e integridad bajo condiciones de estrés producido por déficit de agua, salinidad o temperatura es un componente importante de la tolerancia a estos factores. El grado de ruptura de la membrana celular, causado por estrés provocado por sequía, salinidad y temperatura puede ser estimado a través de mediciones de pérdida de electrolitos (Bajji *et al.*, 2002) y/o liberación de fosfato inorgánico (Torres y Rodríguez, 2002). Estos métodos son poco costosos, no requieren de equipamiento sofisticado, no son destructivos para las plantas, son aplicables para diferentes sistemas de cultivos y permiten analizar un gran número de muestras en un corto período de tiempo. Sin embargo, a pesar de las ventajas que ofrecen estos métodos, su empleo para identificar o diferenciar niveles de tolerancia a estrés producido por salinidad, sequía o temperatura en frijol común no ha sido descrito en la literatura científica consultada.

Otro indicador fisiológico de relevancia para determinar el nivel de tolerancia a la sequía y la salinidad es la formación de áreas necróticas en el tejido foliar expuesto a condiciones de estrés (Schulze *et al.*, 2002). Al igual que la pérdida de electrolitos y la liberación de fosfato inorgánico, la formación de áreas necróticas en el tejido ha sido poco explorado en la búsqueda de tolerancia a estrés abiótico en frijol común. Por tanto, es necesario evaluar variables morfológicas y fisiológicas para determinar la respuesta de genotipos de *P. vulgaris*, en condiciones inducidas de estrés térmico, hídrico y salino.

Teniendo en cuenta la problemática anterior, en este trabajo se plantea la siguiente hipótesis: “La evaluación de variables morfológicas y fisiológicas permitiría determinar la respuesta de genotipos de *Phaseolus vulgaris*, en condiciones inducidas de estrés térmico, hídrico y salino”.

Objetivo general:

Determinar la respuesta de genotipos de *Phaseolus vulgaris*, en condiciones inducidas de estrés térmico, hídrico y salino.

Objetivos Específicos:

1. Determinar el efecto del estrés hídrico inducido con Polietilenglicol-6 000 sobre la germinación de semillas *in vitro* de *P. vulgaris* var. ICA Pijao.
2. Determinar el efecto de la temperatura sobre la pérdida de electrólitos y sobre la liberación de fosfato inorgánico del tejido foliar de *P. vulgaris*.
3. Determinar la respuesta del tejido foliar de *P. vulgaris* expuesto a condiciones de estrés hídrico y salino inducido con Polietilenglicol-6 000 y cloruro de sodio.

1.1. Origen y distribución del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

El cultivo del frijol se considera uno de los más antiguos. Estas plantas leguminosas que se caracterizan por tener las semillas dentro de vainas, aparecieron en tierras americanas hace miles de años. Los restos más antiguos (9 000 años) se encontraron en un lugar llamado Huachichocana en el norte de Argentina; asimismo, en Perú hay rastros arqueológicos de los frijoles, de hace 8 000 años (Solorzano-Vega, 1994).

Los primeros colonizadores europeos en el Caribe observaron que el frijol era ampliamente cultivado por los nativos americanos (Gepts y Debouck, 1991). México se ha reconocido como el más probable centro de origen, o al menos, como el centro primario de diversificación. Algunos de los hallazgos arqueológicos en México y Sudamérica indican que se conocía hace algunos 5 000 años antes de Cristo (Ramírez y Rangel, 2011).

1.1.1. Ubicación taxonómica

Según la clasificación asignada por Carlos Linneo en 1753, en el sistema de nomenclatura binomial, el nombre completo del frijol común es *Phaseolus vulgaris* L. Taxonómicamente su clasificación es la siguiente (Valladares, 2010):

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Género: *Phaseolus*

Especie: *Phaseolus vulgaris*

1.1.2. Principales productores

Según Singh (1996) los principales productores y consumidores de frijol en forma de grano seco son América Latina (45%) y África (25%) y con una menor producción América del Norte (13%), Europa (8%) y Asia (9%). En América Latina, los principales países productores y consumidores son Brasil (>5,3 millones ha) y México (1,8 millones ha), mientras que en Colombia, Argentina y Nicaragua se siembran entre 150 y 250 000 ha.

Como aspectos limitantes de la producción se identifican, entre otros, a nivel empresarial, la falta de áreas destinadas al cultivo, bajo nivel de adopción y transferencia tecnológica, poca disponibilidad de semillas de calidad para el área total sembrada, manejo ineficiente de la cosecha y postcosecha (Chailloux *et al.*, 1996).

En Cuba, el frijol forma parte de la dieta básica de la población y constituye la fuente de la quinta parte de las proteínas totales consumidas. Según la Oficina Nacional de Estadística e Información (ONEI, 2014), en el año 2013 se alcanzó una producción de 5 207 t. La producción nacional abarca las áreas que siembra el Ministerio de la Agricultura cuya proyección estratégica para el 2015 es que alcanzarán las 135 964 ha y una producción de 190 350 t con un rendimiento de 1,4 t ha⁻¹, en esta cifra se incluye la producción de semilla lo que significa un gran reto para la economía del país (Benítez, 2011).

En general el rendimiento del frijol en Cuba y el resto del mundo, es limitado debido a la susceptibilidad de esta leguminosa ante parásitos y enfermedades. Se estima que aproximadamente 20 patógenos pueden afectar este cultivo (Placencio y Núñez, 2002). En estas condiciones, el cultivo de frijol presenta problemas de bajos rendimientos relacionados fundamentalmente con la baja fertilidad de los suelos, la sequía y las incidencias de plagas y enfermedades (Lorigados *et al.*, 2006).

1.1.3. Importancia del cultivo de frijol

El fríjol tiene un papel muy diverso e importante en los sistemas de producción agrícola y en la dieta de una gran parte de la población en muchas regiones del mundo. Esta leguminosa es considerada una de las fuentes principales de proteína vegetal (24%), aunque su contenido puede variar de acuerdo a la variedad. Su grano posee un alto valor nutricional, concentrando en sus cotiledones la mayoría de sus componentes químicos incluyendo carbohidratos, proteínas y grasas (Tabla I) (Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991). También es una fuente considerable de calcio, hierro, fósforo, magnesio y zinc y de las vitaminas tiamina, niacina y ácido fólico (Ramírez y Rangel, 2011). Adicionalmente, es rica en fibras naturales y otros elementos, por lo que es un buen complemento a la alimentación con cereales y otras fuentes de carbohidratos (Singh, 1996).

A nivel mundial, la producción y consumo del fríjol común son mayores que los de otras leguminosas con excepción de la soya (*Glycine max* L.) y el maní (*Arachis hypogaea* L.) (Singh, 1996). De acuerdo con información de la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO), a nivel global se destinan alrededor de 27,4 millones de ha al cultivo de frijol en sus

diferentes variedades, con lo que se alcanza aproximadamente una producción de 22 806 139 t (FAOSTAT, 2015).

Tabla I. Valor nutritivo del frijol comparado con otros alimentos

Alimento	Componente				
	Agua (%)	Calorías (p/100g)	Proteínas (%)	Grasas (%)	Carbohidratos (%)
Frijol	11.0	341	22.1	1.7	61.4
Soya	8.0	654	38.0	18.0	31.3
Arroz	13.0	360	6.7	0.7	78.9
Maíz	12.0	360	9.3	4.0	73.5
Trigo	13.0	360	6.7	0.0	78.9
Harina de yuca	11.0	338	3.8	0.6	81.5
Huevos	74.0	158	13.0	11.0	0.7
Leche entera en polvo	2.5	498	27.5	2.6	28.0
Carne de res	67.0	198	19.0	13.0	0.0
Pescado	65.0	75	16.4	0.5	0.0

Fuente: (Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991) Tomado de (Aranda, 2000)

Estudios clínicos realizados en los Estados Unidos indican que el frijol es muy efectivo en la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus, obesidad, hipertensión, cáncer y enfermedades del tracto digestivo (Singh, 1996).

A partir de los recientes avances en la filogenia del género *Phaseolus*, este se ha usado en técnicas moleculares y diversos proyectos de investigación, particularmente en genética molecular (Broughton *et al.*, 2003).

1.2. Descripción morfológica y ciclo fenológico

Es una planta anual, herbácea y termófila, es decir no soporta heladas; se cultiva esencialmente para obtener la semilla, las cuales tienen un alto grado de proteínas con más del 22% (Beaver *et al.*, 2002).

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

P. vulgaris presenta nódulos distribuidos en las raíces laterales de la parte superior y media del sistema radicular, con un diámetro aproximado de 2 a 5 mm y son colonizados por las bacterias del género *Rhizobium*, las cuales fijan nitrógeno atmosférico, que contribuye a satisfacer los requerimientos de este elemento en la planta (Beaver *et al.*, 2002). En general el sistema radicular es superficial ya que el mayor volumen de la raíz se encuentra en los primeros 20 cm de profundidad del suelo (Debouck y Hidalgo, 1984).

Tallo: El tallo joven es herbáceo y semi-leñoso al final del ciclo; es una sucesión de nudos y entrenudos donde se insertan las hojas y los diversos complejos axilares, el tallo o eje principal es de mayor diámetro que las ramas laterales. Se inicia en la inserción de las raíces y el primer nudo corresponde al de los cotiledones, esta primera parte del tallo se denomina hipocótilo, en el segundo nudo se presenta el primer par de hojas verdaderas, las cuales son simples y opuestas y reciben el nombre de epicótilo, en el tercer nudo emerge la primer hoja compuesta las cuales son trifoliadas y alternas (Vivanco *et al.*, 2011).

El tallo tiene generalmente un diámetro mayor que las ramas. Puede ser erecto, semipostrado o postrado, según el hábito de crecimiento de la variedad; pero en general, el tallo tiende a ser vertical ya sea que el frijol crezca solo o con algún soporte (Brauer, 1980). La altura de la planta puede variar en dependencia de su hábito de crecimiento. Generalmente alcanzan hasta 30 y 50 cm, sin embargo hay casos de plantas enanas (15 – 25 cm). Las de hábito de crecimiento indeterminado siguen creciendo durante la etapa de floración, aunque a un ritmo bien lento y las de crecimiento postrado indeterminado pueden alcanzar alturas superiores de 80 cm (Debouck y Hidalgo, 1984).

Hojas: Son de dos tipos: simples y compuestas. Los cotiledones constituyen el primer par de hojas, son de poca duración, proveen sustancias de reserva a la planta durante la germinación y emergencia y elaboran los primeros carbohidratos a través de la fotosíntesis en sus cloroplastos. Las primeras hojas verdaderas se desarrollan en el segundo nudo, son simples, opuestas y cortadas. A partir del tercer nudo se desarrollan las hojas compuestas, las cuales son alternas, de tres folíolos, un peciolo y un raquis. Presentan variación en cuanto a tamaño, color y vellosoidad, en dependencia de la variedad y las condiciones de luz y humedad (Beaver *et al.*, 2002).

Los colores varían de claro a verde oscuro (según la variedad). Con frecuencia suelen haber plantas albinas pero como no pueden realizar la fotosíntesis ni sintetizar sus propios alimentos mueren en las primeras fases del crecimiento (Brauer, 1980).

1.2.1. Fases del ciclo fenológico

Se refiere a la sucesión de las diferentes etapas de la planta o de uno de sus órganos, durante su desarrollo o ciclo biológico. La sucesión y duración de las diferentes etapas están determinadas genéticamente en cada variedad y pueden ser afectadas en cierto grado por factores ambientales como temperatura, humedad, duración e intensidad de luz, entre otros (Vivanco *et al.*, 2011).

Durante el desarrollo fenológico del frijol se observan dos fases, la vegetativa y la reproductiva. La primera se inicia cuando se le brinda a la semilla las condiciones para la germinación y termina cuando aparecen los primeros botones florales. En esta etapa se desarrolla la estructura vegetativa que permite la actividad reproductiva de la planta. Las etapas que la conforman son: germinación, emergencia, hojas primarias, primera hoja trifoliada y tercera hoja trifoliada (Fernández de Córdova *et al.*, 1986, Beaver *et al.*, 2002).

Posteriormente durante la segunda fase la planta desarrolla los órganos reproductivos y por consiguiente los frutos, llamados vaina en el frijol, es importante destacar que en las variedades con crecimientos indeterminados, durante la fase reproductiva las plantas continúan generando nuevos nudos, ramas y hojas, que comprende las siguientes etapas: prefloración, floración, formación de vainas, llenado de vainas y maduración (Fernández de Córdova *et al.*, 1986).

1.2.2. Evaluación del cultivo a partir de variables morfológicas y fisiológicas

El frijol es un cultivo que no requiere grandes volúmenes de agua durante su ciclo vegetativo, la demanda dependerá de su fase de desarrollo, siendo las etapas de germinación, diferenciación floral, fructificación y llenado del grano las más exigentes pero a su vez las más sensibles al déficit hídrico (Alfonso *et al.*, 2000). Existen diversas variables tanto morfológicas como fisiológicas que permiten observar en qué medida se producen los daños en una especie ante condiciones edafoclimáticas adversas.

Variables morfológicas: La superficie foliar proporciona una interfase importante entre la planta y su medio contribuyendo significativamente al balance energético. La sobrevivencia de las plantas en ambientes estresantes puede depender de las características de su superficie y del espacio vital incluido entre ambas epidermis (Grammatikopoulos y Manetas, 1994).

Ante condiciones de estrés una de las manifestaciones visibles es el marchitamiento característico de las hojas, como consecuencia disminuye el área foliar con lo que se evita una

mayor pérdida de agua por transpiración y aumenta la eficiencia en el uso de la misma (Granados-Sánchez y López, 1998). En especies donde los estomas son escasos o están ausentes, la conductancia al intercambio gaseoso en la epidermis superior disminuye al igual que la fotosíntesis y transpiración (El-Sharkawy y Hesketh, 1965). En general la mayor o menor capacidad fotosintética bajo condiciones de estrés hídrico, pueden ser explicadas en función de los cambios anatómicos foliares (Martinez *et al.*, 1999).

Con altos niveles de estrés hídrico disminuye la altura, el número de hojas y el número de flores por planta. Además, se incrementan la senescencia y la abscisión de las hojas (Abayome y Abidoye, 2009, Ichi *et al.*, 2013), también se reduce el peso seco de la parte aérea, incluyendo las vainas (Okon, 2013).

La raíz como órgano relativamente plástico, suele sufrir bajo la influencia del medio, modificaciones importantes. La penetración de las raíces en profundidad permite una mejor absorción de agua y aumenta la resistencia a la sequía (Benites, 2008). Las raíces buscan siempre agua y cuando falta este elemento descienden a capas profundas del suelo, siempre que la planta haya adquirido un desarrollo suficiente, para alimentar la multiplicación celular resultante de este alargamiento. Por tal motivo la longitud de la raíz constituye una variable importante para conocer si la planta estuvo en condiciones de estrés hídrico.

En este mismo sentido, Polania *et al.* (2012) demostraron que en *P. vulgaris* la longitud de la raíz está correlacionada positivamente con la producción de biomasa aérea, de tal manera que los genotipos que presentan mayor profundidad radical están mejor adaptados a períodos de sequía prolongada, puesto que pueden explorar un mayor volumen de suelo y extraer agua de perfiles inferiores.

Variables fisiológicas: La asimilación de materia seca y su distribución dentro de la planta, son procesos importantes que determinan la productividad del cultivo. El estudio de los patrones de asignación de materia seca hacia las diferentes partes de la planta, la variabilidad de estos patrones entre cultivares y el efecto de las condiciones ambientales en el proceso, pueden ayudar a incrementar la productividad y a seleccionar cultivares para un propósito particular (Tekalign y Hammes, 2005).

La distribución de materia seca puede cambiar durante el desarrollo de un cultivo, debido a cambios en la potencia de sumidero de un órgano individual y a alteraciones del número de sumideros creciendo en la planta (Patrick, 1988, Marcelis, 1994, Tekalign y Hammes, 2005). Además, los factores que estimulan la actividad específica de la parte aérea, como el

incremento de la concentración de CO₂, la intensidad de luz o de la longitud del fotoperíodo, aumentan la distribución de materia seca a las raíces (Marcelis y De Koning, 1995). Por tanto si se afectan los factores que garantizan el correcto funcionamiento de las raíces o si se incrementan los factores que estimulan la actividad fotosintética, se puede observar un aumento de la distribución de materia seca hacia las raíces.

La eficiencia del uso del agua también es un indicador importante para la evaluación de la tolerancia a la sequía. Tradicionalmente se define como la razón existente entre la materia seca acumulada en los órganos sumideros y la tasa de fotosíntesis según la conductancia de los estomas (Yin *et al.*, 2005). El uso eficiente de agua, es considerado como un factor determinante en el rendimiento de grano bajo condiciones de sequía y por lo tanto un componente importante de la tolerancia de los cultivos a la sequía (Polanía y Palmira, 2011).

En fisiología vegetal es utilizada la discriminación de isótopo de carbono como un indicador indirecto del uso eficiente del agua y del cierre de los estomas. La mayoría del carbono natural es C¹² y representa el 98,9% en la naturaleza, una pequeña parte es C¹³ (1.1%) y una porción aún más pequeña es C¹⁴, que es radiactivo e inestable. Durante la fotosíntesis, las plantas realizan una discriminación prefiriendo la molécula de CO₂ con el carbono más liviano C¹², por tanto la mayor proporción de carbono contenido en la biomasa vegetal es de este tipo (Farquhar *et al.*, 1989). Sin embargo durante períodos de estrés hídrico algunas plantas tienden a cerrar sus estomas para perder menos agua y en consecuencia a menor CO₂ entrante, las plantas discriminan menos el C¹³ y su concentración en los azúcares aumenta (Uriarte, 2003).

La selección por baja discriminación de C¹³ ha sido propuesta como un método para mejorar el uso eficiente de agua en programas de mejoramiento de cultivos C₃ (Link *et al.*, 2007). En el caso de frijol común (cultivo C₃), varios genotipos evaluados en condiciones de estrés hídrico mostraron una mayor discriminación de C¹³, igualmente se encontró una relación positiva entre este tipo de discriminación y la densidad de longitud de raíces (White *et al.*, 1990).

1.3. Factores que afectan el cultivo del frijol

En general el cultivo de frijol como cualquier otra planta puede ser afectada tanto por factores bióticos como abióticos. El primer caso resulta de la interacción con otros organismos, por ejemplo daños mecánicos por herbívoros, competencia por el hábitat o infección por parásitos. Por otra parte entre los factores abióticos se encuentran la sequía, salinidad, temperatura, humedad y acidez de los suelos e intensidad luminosa (Schulze *et al.*, 2002). Todos los factores

anteriores pueden de una u otra forma provocar estrés en la planta, lo cual afecta su rendimiento biológico y con ello su integridad.

Según García *et al.* (2009), los rendimientos que se obtienen son generalmente bajos, motivados fundamentalmente por deficiente suministro de agua, uso de genotipos con poca adaptación a las condiciones de cultivo, variedades locales de bajo rendimiento, inadecuado manejo agronómico, insuficiencia de fósforo y problemas asociados a la acidez de los suelos.

En la mayoría de las zonas productoras de frijol en el mundo los rendimientos potenciales nunca son alcanzados, esto se debe a que esta leguminosa se cultiva principalmente en condiciones ambientales poco favorables, como son la escasa y errática precipitación durante la estación de crecimiento (Rodríguez *et al.*, 2009).

Como ejemplos de las afectaciones en el cultivo del frijol provocadas por factores bióticos se encuentran las pudriciones radicales inducidas por un conjunto de patógenos, dentro de ellos se destacan un grupo de hongos presentes en el suelo cuyo comportamiento no es individual sino sinérgico. Según Rodríguez *et al.* (2009), los más comunes que forman parte de este complejo son: *Rhizoctonia solani* Kühn y *Fusarium oxysporum* Schl. La bacteriosis común del frijol causada por la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* Xcp (Smith), es considerada como una de las enfermedades más recurrentes del frijol a nivel mundial, que ocasiona pérdidas de rendimiento entre un 22-60% (Pastor-Corrales, 1985, Muñoz Perea y Singh, 1996, Samayoa López, 2010). En Cuba constituye la segunda enfermedad de mayor importancia económica de este cultivo, siendo la primera conocida como mosaico dorado (Rodríguez *et al.*, 1999). Esta enfermedad bacteriana afecta las hojas, las vainas y se transmite por semilla, lo cual hace que su control sea más difícil (Zapata, 1996); además ocasiona grandes pérdidas al reducir la calidad de las semillas (Rodríguez-Miranda, 2011).

1.3.1. Generalidades del estrés abiótico

El estrés abiótico surge como resultado de un exceso o un déficit en el ambiente químico-físico que interactúa con una planta, reduciendo en ella su productividad entre un 60-80% en dependencia del tipo de estrés y del cultivo (Mahajan y Tuteja, 2005). Este tipo de estrés mundialmente ha causado grandes pérdidas en la producción agrícola (Mittler, 2006).

Entre los factores abióticos que ponen en riesgo el crecimiento y desarrollo de la planta se encuentran: humedad del aire, contenido hídrico del suelo, intensidad luminosa, altas y bajas temperaturas, salinidad, baja concentración de minerales en el suelo, contaminación

atmosférica por metales pesados, toxinas, entre otros (Schulze *et al.*, 2002). El efecto de cada uno de estos factores depende de su intensidad y de la etapa de desarrollo sobre la que actúen (Boicet, 2010).

1.3.2. Estrés hídrico

El estrés hídrico puede originarse como resultado de dos condiciones, o bien por exceso de agua como por déficit de la misma. Sin embargo el que comúnmente se encuentra en las plantas surge por la escasez de agua, denominado estrés por sequía (Mahajan y Tuteja, 2005).

Ante condiciones de estrés hídrico, es limitado el movimiento normal del agua tanto hacia dentro como hacia fuera de la célula. Según Mahajan y Tuteja (2005), pueden producirse daños estructurales en la membrana lipídica como resultado de la destrucción de algunas proteínas de membrana, perdiéndose de esta forma la integridad de la misma, disminuye la selectividad y la actividad enzimática, así como la compartimentación celular. En adición a los daños en la membrana, las proteínas que se encuentran en el citoplasma y formando algunos orgánulos pueden disminuir también su actividad o en el peor de los casos desnaturalizarse debido a la deshidratación. Además hay un aumento en la pérdida de electrolitos y un desequilibrio osmótico. En general se afectan la mayoría de los procesos metabólicos de la célula.

El estrés hídrico, incluyendo la sequía terminal, es la principal restricción de la producción agrícola observada en áreas de baja pluviometría, donde *P. vulgaris* constituye un cultivo de importancia; cuando esto ocurre durante el crecimiento reproductivo tiene los más adversos efectos sobre el rendimiento de los cultivos (Boicet, 2010).

Los resultados obtenidos por diferentes autores coinciden en que el frijol es un cultivo susceptible tanto al exceso de humedad como a su déficit durante su ciclo de desarrollo. Al respecto Boicet (2010), observó que los indicadores de producción de vainas, semillas y rendimientos son superiores estadísticamente cuando el cultivo no padece de déficit hídrico durante su ciclo vegetativo; igual sucede con la altura de la planta, diámetro del tallo, número de ramificaciones y trifoliolos, y la biomasa seca.

Existen posibilidades a nivel de laboratorio, con el empleo de agentes estresantes, simular condiciones de estrés hídrico. Con relación a esto, se encuentran diversos compuestos, entre los que se recomiendan: manitol, sorbitol, cloruro de sodio (NaCl) (Zeng y Shannon, 2000, Ashraf y Harris, 2004, Zeid, 2004, Shereen *et al.*, 2005) y el polietilenglicol (PEG) (Lu y Neumann, 1999, Basra *et al.*, 2005). Este último es el más utilizado porque permite mantener el

medio experimental a valores predeterminados de potencial hídrico y es capaz de competir con las células por el agua debido a su alto peso molecular. Esto facilita la retención de líquido y provoca descensos en el potencial osmótico de manera similar a lo que ocurre cuando se seca el sustrato en el que se cultivan las plantas (Guía, 1998, Rai *et al.*, 2011).

El PEG es un poliéter ampliamente empleado en la industria (Chen *et al.*, 2005). Su nombre generalmente aparece asociado a un número que hace referencia a la masa molecular del polímero u oligómero; por ejemplo, PEG-6 000 tiene una masa molecular media de 6 000 Da. Su estructura química puede representarse como: HO-(CH₂-CH₂-O)_n-H (Kumar *et al.*, 2006). En comparación con otros disolventes alternativos, PEG es biodegradable, biocompatible y no tóxico además puede ser recuperado y reciclado de la disolución por extracción o destilación directa (Kerton y Marriott, 2013).

1.3.3. Estrés salino

El estrés salino es uno de los factores ambientales más importantes que limita el crecimiento y productividad de un cultivo. La salinidad del suelo es una medida de la cantidad total de las sales solubles en el suelo. Según los niveles de salinidad incrementan, las plantas extraen menos fácilmente el agua del suelo, agravando las condiciones de estrés hídrico (Tatar *et al.*, 2010).

El exceso de salinidad en el suelo, durante el proceso de crecimiento de las plantas, puede causar desbalances de nutrientes, lo cual provoca la acumulación de elementos tóxicos (Na⁺ y Cl⁻) (Mahajan y Tuteja, 2005). La acumulación de estos elementos afectan diversos procesos bioquímicos y fisiológicos, lo cual induce además un estrés oxidativo y osmótico (Chartzoulakis y Klapaki, 2000, Kaya *et al.*, 2001, Martínez-Ballesta *et al.*, 2004). Estos efectos interactúan con varios componentes celulares incluyendo ADN, proteínas, lípidos y pigmentos de la planta, impidiendo el adecuado crecimiento y desarrollo de la mayoría de los cultivos (Zhu, 2002).

El estrés salino trae como resultado una elevación de los niveles de aminoácidos en las plantas (Fougère *et al.*, 1991). La acumulación de prolina está asociado con la tolerancia osmótica y el estrés salino (Mansour, 2000). Los niveles de poliamina y aminoácidos bajo estas condiciones están directamente relacionados con alteraciones en la actividad enzimática (El-Bassiouny y Bekheta, 2005).

Las plantas afectadas por sales tienen hojas verdes opacas, en otros casos, son delgadas y más suculentas que lo normal. En general el crecimiento de la planta es reducido como consecuencia de las condiciones de salinidad (Betancourt *et al.*, 2008).

P. vulgaris se considera una de las especies más sensibles a la salinidad, con un valor umbral de conductividad eléctrica cercano a 1 dS m^{-1} (Grattan *et al.*, 2006), lo que equivale a 10 mol m^{-3} de NaCl, aproximadamente. Asimismo, se ha informado que bajo condiciones de estrés salino se afecta la germinación de las semillas, su emergencia o el posterior establecimiento de las plántulas (Dantas *et al.*, 2007, Campos *et al.*, 2009, Kaymakanova, 2009), se reduce la formación de nódulos (Ashraf y Harris, 2004) y se retarda el crecimiento vegetativo (Bray y Reid, 2002, García *et al.*, 2010), todo lo cual repercute negativamente sobre la productividad de este cultivo.

Con el objetivo de crear un escenario de estrés salino en condiciones *in vitro* se utiliza NaCl en diferentes concentraciones como un agente selectivo (Sosa *et al.*, 2005). Con el empleo de este compuesto la planta queda expuesta a un ambiente similar a cuando está en condiciones de estrés hídrico pues debido al fenómeno de ósmosis a través de la membrana difunde el agua de la célula al exterior donde hay una mayor concentración de solutos (Schulze *et al.*, 2002).

Altas concentraciones de NaCl incrementan la absorción de iones como Na^+ y K^+ con lo cual aumentan los niveles de toxicidad en la planta lo que puede incluso provocar su muerte. Paralelamente el Cl^- crea una clorosis en las hojas lo cual es síntoma de la degradación de la clorofila (Thiam *et al.*, 2013).

1.3.4. Respuestas de las plantas al estrés abiótico

Normalmente las plantas reaccionan al estrés con modificaciones en su estructura y función que finalmente alteran su metabolismo. Si estas condiciones estresantes son toleradas por la planta, se plantea que ha ocurrido el fenómeno de adaptación, sin embargo si se excede el rango de tolerancia se producen daños irreversibles, frenando de esta forma la capacidad de reparar los tejidos dañados, y finalmente puede que la planta no sobreviva (Schulze *et al.*, 2002).

Según estudios realizados por Cabrera (2011), se demuestra que muchas variedades de frijol bajo condiciones edafoclimáticas adversas, presentan un índice de estrés que varía en correspondencia con el grado de tolerancia o susceptibilidad que ellas presentan, provocando un aumento del % de daños de las membranas y el contenido de prolina libre, en todas las variedades.

La biosíntesis y acumulación de solutos compatibles es una respuesta adaptativa bajo estrés hídrico o salino (Munns, 2002). Los solutos compatibles son pequeñas moléculas no tóxicas que no interfieren en el metabolismo celular normal. Entre estas sustancias se encuentran algunos azúcares (manitol), alcoholes, aminoácidos (prolina) y aminos (glicina betaína). Un incremento en la síntesis de estos solutos ha sido una estrategia aplicada para aumentar la tolerancia en condiciones de estrés abiótico (Betancourt *et al.*, 2008, Peleg *et al.*, 2011, González, 2013). Altos niveles de síntesis de la hormona vegetal ácido abscísico (ABA) son respuesta al estrés hídrico para proteger a la planta de la desecación (Hubbard *et al.*, 2010). Así mismo puede disminuir la conductancia estomática reduciendo la fotosíntesis (Pattanagul y Madore, 1999) y la transpiración (Vieira *et al.*, 1992).

El conocimiento sobre los procesos y mecanismos de tolerancia a factores de estrés de tipo abiótico y los efectos perjudiciales en especies cultivadas, particularmente en aquellas sometidas a condiciones secas, ayudará a mejorar su comportamiento agronómico mediante la incorporación de características relacionadas con tolerancia a sequía en los nuevos cultivares (Singh y Reddy, 2011, Beebe *et al.*, 2013).

Rai *et al.* (2011), definen la tolerancia a la sequía como la habilidad de las plantas cultivadas para crecer y rendir satisfactoriamente en áreas sujetas a períodos de déficit hídrico. Además este fenómeno está muy vinculado al ajuste osmótico, incremento en la elasticidad celular, disminución del tamaño de las células y resistencia del protoplasma a la desecación (Beebe *et al.*, 2013).

Por otra parte la tolerancia de una planta a la sal puede ser definida como la capacidad de algunas plantas de sobrepasar un contenido alto de sales en su medio radicular de crecimiento, sin daño aparente y manteniendo un funcionamiento normal. Las plantas son más sensibles a la alta salinidad durante los estadios de plántulas, inmediatamente después del trasplante y cuando son sujetos a otros estreses (por ejemplo enfermedades, insectos, nutrientes) (Betancourt *et al.*, 2008).

El clima y el riego también influyen en la tolerancia a la salinidad. En consecuencia, los problemas salinos son más severos bajo calor y condiciones de sequía, que bajo frío y humedad. Incrementando la frecuencia de riego y aplicando agua en exceso, en comparación con la demanda de la planta, se puede minimizar el estrés salino durante períodos de calor y sequía (González, 2013).

Para protegerse de los efectos perjudiciales del estrés salino, muchas plantas han desarrollado mecanismos bioquímicos. Entre las principales estrategias se encuentran: la inducción de enzimas antioxidativas, homeostasis de iones (resultado de las variaciones en la relación Na^+/K^+) y la síntesis de solutos orgánicos compatibles (Rai *et al.*, 2011). Además, evitan las lesiones por sales mediante exclusión de iones (Na^+ y Cl^-) en las hojas o mediante su compartimentación en las vacuolas. En el caso de plantas sensibles, la resistencia a niveles moderados de salinidad en el suelo depende de la capacidad de las raíces para impedir la absorción de iones potencialmente dañinos (Betancourt *et al.*, 2008).

1.3.5. Bioensayos para evaluar la respuesta de la planta al estrés

Existen diferentes métodos para cuantificar los daños que se producen en las plantas después de ser sometidas a un determinado estrés. A través de estos se pueden evaluar variables fisiológicas que permiten comparar los niveles de tolerancia o susceptibilidad entre variedades de una especie. Entre ellos se encuentran:

- Medición de la pérdida de electrólitos por conductividad eléctrica

Uno de los principales efectos del estrés en las plantas es la destrucción de las membranas celulares por lo que se dificulta la habilidad para retener los solutos y con ello se pierde una gran cantidad de electrólitos hacia el exterior celular (generalmente los electrólitos son iones: K^+ , Cl^- , Na^+) (Schulze *et al.*, 2002).

La conductividad eléctrica por pérdida de electrólitos es una técnica, que da la medida de la capacidad que puede tener una solución para conducir la electricidad a partir de los iones que se encuentren disueltos en ella (Bastías *et al.*, 2010). Por tanto, puede resultar muy útil si se desea medir la estabilidad de las membranas de un tejido previamente estresado.

- Toma selectiva de cationes por las raíces

Diversas especies de plantas tolerantes a la salinidad (particularmente monocotiledóneas) pueden discriminar el Na^+ y mantener la toma de K^+ . Esta selectividad del K^+ sobre el Na^+ incrementa la proporción K^+/Na^+ en el citosol comparada con la del medio de enraizamiento (Munns y Tester, 2008, Rai *et al.*, 2010), con el objetivo de evitar que las concentraciones de sales resulten tóxicas para la planta que provoquen su muerte. Precisamente una de las formas para determinar tolerancia es midiendo las concentraciones de K^+/Na^+ en diferentes órganos de la planta.

- Absorción y acumulación del rojo neutral en células cuyas vacuolas no tienen daños

Las vacuolas que se encuentran en las células vegetales son regiones rodeadas de una membrana (tonoplasto o membrana vacuolar) y llenas de un líquido muy particular llamado jugo celular. En las células vegetales maduras, la vacuola es importante en el almacenamiento temporal de grandes cantidades de metabolitos y nutrientes y juega un papel principal en el mantenimiento de la homeostasia citosólica (Naab, 2006, Alberts *et al.*, 2010).

Para medir cuán dañada se encuentra la vacuola de una célula se han realizado experimentos de laboratorio donde son utilizadas soluciones químicas (colorantes) que tiñen la mayoría de los orgánulos de la célula (Kabała *et al.*, 2003). Como las vacuolas ocupan un volumen grande dentro de la célula vegetal, se puede demostrar la cantidad de células intactas mediante la acumulación del colorante en ellas, sin embargo si las vacuolas no se tiñen quiere decir que las células tienen daños (Schulze *et al.*, 2002).

Uno de los colorantes utilizados es el rojo neutral o también conocido como rojo neutro. Este es un colorante vital pues tiñe sin alterar la célula. Es muy permeable a la membrana celular, ello permite que la atraviese y se acumule en el interior de la gran vacuola vegetal. Por lo tanto, al mirar por el microscopio la preparación, lo que se observa es el interior de la célula con su vacuola totalmente hinchada y teñida de rojo neutral. Es utilizado como un indicador ácido-base que cambia de color de acuerdo a las condiciones de pH en que se encuentre la solución. El cambio de color se debe a un cambio estructural inducido por la protonación o desprotonación de la molécula (Gómez, 2010).

- Conteo de áreas necróticas en discos de hojas

Ante un escenario de estrés hídrico o salino, la planta se va marchitando y sobre las zonas afectadas es característica la aparición de pequeñas manchas necróticas. Una técnica utilizada es el conteo de estas áreas necróticas en discos de hojas, después de ser incubadas durante dos días con diferentes concentraciones de PEG-6 000 y NaCl respectivamente (Schulze *et al.*, 2002). Este ensayo posibilita a través de un análisis cualitativo, comparar las variedades entre sí y con respecto a un genotipo tolerante y por otra parte da una idea de cuáles son las concentraciones de NaCl o de PEG que puede tolerar una especie.

- Plasmólisis en células sin daños

En los vegetales, la semipermeabilidad de la membrana citoplasmática y la permeabilidad de la pared celular propician, entre otros procesos, el fenómeno de plasmólisis. Se produce ya que las condiciones del medio extracelular son hipertónicas; debido a esto, el agua que hay dentro de la vacuola sale al medio hipertónico (ósmosis) y la célula se deshidrata ya que pierde el agua que la llenaba. Finalmente se puede observar cómo la membrana celular se separa de la pared (la célula se plasmoliza) (Alberts *et al.*, 2010). Si este fenómeno ocurre, la planta corre el riesgo de una muerte segura; al menos hasta que consiga agua que llene la vacuola, volviéndose la célula turgente nuevamente y se recupere. Este principio sólo lo podemos observar en las células vegetales que presenten la pared celular y la membrana plasmática intactas; pues las células que ya han estado expuestas a cambios drásticos en el ambiente como determinadas condiciones de estrés hídrico y salino, pueden presentar estas membranas con daños y encontrarse la célula entonces plasmolizada o muerta (Schulze *et al.*, 2002).

- Método para la cuantificación de fosfato inorgánico.

En diferentes escenarios de estrés la integridad de las membranas celulares de muchas plantas puede estar comprometida. La rotura de las membranas incrementa la permeabilidad de estas y se produce la salida de iones, ácidos orgánicos, proteínas enzimáticas y otras sustancias presentes en el interior celular (vacuolas, organelos etc.) y en las propias membranas. También se liberan enzimas ligadas a estas como las fosfatasas ácidas, abundantes en cloroplastos y mitocondrias, y que hidroliza compuestos orgánicos fosforados, como el ATP (del inglés Adenosine TriPhosphate), fosfolípidos, azúcares fosfato etc., con la consiguiente liberación de fosfato inorgánico (Pi) (Torres y Rodríguez, 2002).

Un alto nivel de Pi en el tejido de las plantas que sufren estrés hídrico indica un daño a las membranas plasmáticas producto de la deshidratación y que por tanto dicha planta no tolera ese efecto adverso (Torres y Rodríguez, 2002). Según De Sousa *et al.* (1984), las variedades más susceptibles a la sequía tienen por lo general mayores proporciones de fosfatos en formas inorgánicas que las tolerantes, cuando están sometidas a condiciones adversas de calentamiento foliar y estrés hídrico. Las especies más tolerantes poseen membranas más estables a la deshidratación y al calor por lo que soportan un estrés más fuerte sin que dañe su morfología de forma considerable (De Sousa *et al.*, 1984, Torres *et al.*, 1993).

Para el estudio cuantitativo del fósforo, uno de los métodos colorimétricos más utilizados es el de su determinación por la reacción del azul de molibdeno. Para ello, se parte desde el estado de fósforo inorgánico y luego este compuesto es transformado en un complejo fosfomolibdico que por ulterior reducción da un complejo coloreado estimable colorimétricamente (Kitson y Mellon, 1944, Ospina, 2008). Recurriendo a este método se podría determinar las concentraciones de fosfato que ha perdido la planta y de esta forma comprobar el grado de tolerancia a la sequía.

2.1. Procedimientos generales

Los recipientes utilizados (tubos de vidrios, placas Petri plásticas) se lavaron con agua corriente y detergente comercial, posteriormente se enjuagaron dos veces con agua desionizada. La mezcla de sustratos se realizó en el área de preparación de la fase de aclimatización del Instituto de Biotecnología de las Plantas. Para ello se utilizaron palas, vagones y zaranda cernidora. Todo el instrumental de laboratorio empleado para la preparación de las soluciones fue esterilizado en autoclave a 121 °C de temperatura y 1,2 kg cm⁻² de presión por 40 min y secado en la estufa a 80 °C durante 2 h.

2.2. Efecto del estrés hídrico inducido con Polietilenglicol-6 000 sobre la germinación de semillas

Las semillas maduras de *P. vulgaris* var. ICA Pijao se colocaron en una solución de etanol al 70% (v/v) por 2 min y se agitaron de forma manual. A continuación las semillas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 3% (v/v), por 10 min con agitación constante en un agitador orbital a 110 rpm. Posteriormente, las semillas se enjuagaron tres veces con agua destilada. Las semillas desinfectadas se colocaron 24 h en agua estéril a razón de 100 semillas / 100 ml de agua para su total imbibición.

El Polietilenglicol-6 000 (PEG-6 000) se utilizó como agente estresante para simular condiciones de sequía *in vitro*. Para ello se prepararon soluciones de PEG-6 000 con agua destilada a diferentes concentraciones 6, 8, 10, 12, 14, 16, y 18% (p/v). Como control se empleó agua destilada. El cálculo del potencial osmótico equivalente para cada una de las soluciones, se realizó mediante la ecuación descrita por Michel y Kaufmann (1973): 6% (-0,066 MPa), 8% (-0,103 MPa), 10% (-0,148 MPa), 12% (-0,201 MPa), 14% (-0,262 MPa), 16% (-0,330 MPa) y 18% (-0,407 MPa). Cada semilla embebida se colocó sobre un papel de filtro (Whatman filter paper No. 42) en forma de M dentro de un tubo (150 mm largo x 20 mm diámetro) con 10 ml de la solución de PEG-6 000. Se colocaron 20 semillas por tratamiento y el experimento se repitió una vez en el tiempo.

El material vegetal se mantuvo en una cámara de cultivo a una temperatura de 25 ± 2 °C bajo un fotoperíodo de 16 h luz / 8 h oscuridad y a una densidad de flujo de fotones fotosintéticos de 45 μmol m⁻² s⁻¹.

A las 48 h se calculó el porcentaje de germinación (PG) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$PG = (SG / NTS) \times 100$$

Donde *SG* es el número de semillas que emitieron radícula a las 48 h y *NTS* es el número total de semillas.

Entre los tres y seis días se evaluaron otras variables asociadas a la germinación tales como: longitud del tallo (longitud del hipocótilo + longitud del epicótilo (mm)), longitud de la raíz (mm) y área foliar de las primeras hojas (cm²). El área de la hoja se determinó a través de la ecuación $Ah = 0,603 + 0,581 (L \times A)$, propuesta por Barrios *et al.* (1998), donde *Ah* (área de la hoja), 0,603 y 0,581 (coeficientes establecidos para cálculo de área foliar en la especie *P. vulgaris*), *L* (Largo de la hoja) y *A* (ancho de la hoja).

2.3. Efecto de la temperatura sobre la pérdida de electrolitos y la liberación de fosfato inorgánico en tejido foliar

2.3.1. Material vegetal, condiciones de cultivo y colecta de muestras

El estudio se realizó con 10 genotipos de *P. vulgaris* (ICA Pijao, I45R, L68.3, L84.9, L84.6, L84.4, Tomeguín-93, BAT-93, Cuba Cueto 25-9 Negro y Guamá-23). La siembra se realizó en una casa de cultivos protegidos con condiciones semicontroladas (temperatura ambiente de 27 ± 5 °C, humedad relativa de $84 \pm 5\%$ y una densidad de flujo de fotones fotosintéticos en el rango de 280–400 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Para la siembra se emplearon bolsas de polietileno rellenas con 1004,8 cm³ de mezcla de sustrato (materia orgánica + zeolita en proporción 4:1). Se sembraron tres semillas por bolsa y se utilizaron 25 bolsas por cada genotipo. Se realizaron tres siembras a intervalos de 15 días entre cada una de ellas. Las plantas se regaron diario con un sistema automático de aspersores.

Se colectaron folíolos de la segunda y tercera hoja trifoliada en plantas con 30-35 días después de la germinación. Las hojas se colocaron en agua para evitar la deshidratación del tejido. Los folíolos se colocaron sobre una superficie lisa con el envés hacia arriba y se cortaron discos de 1,1 cm de diámetro con el empleo de un horador. Para garantizar la homogeneidad de las muestras, se desecharon las nervaduras principales y los extremos terminales de los folíolos. Los discos de hojas obtenidos se utilizaron como muestras para las determinaciones de pérdida de electrolitos y liberación de fosfato inorgánico.

2.3.2. Pérdida de electrolitos

En cada tubo (150 mm largo x 20 diámetro mm), se colocaron cinco discos de hojas, los que se enjuagaron con agua desionizada para eliminar los electrolitos adheridos a la superficie del tejido, así como los liberados por las heridas producidas por el horador. A cada tubo con los discos de hojas enjuagados, se le añadió 25 ml agua desionizada. Se realizaron 20 réplicas para cada variedad. La apertura de los tubos se selló con parafilm y se agitaron de forma manual para homogeneizar la solución. A continuación se midió la conductividad inicial del contenido en cada tubo con un conductímetro (DDS-307 A).

Los tubos con las muestras se colocaron en una gradilla y se introdujeron en un baño térmico (LAUDA E100) por 2 h a diferentes temperaturas (35, 40, 45, 50, 55 y 60 °C). Transcurridas las 2 h en la primera temperatura, las muestras se enfriaron a 25 ± 2 °C y se midió la conductividad a cada tubo mediante el procedimiento descrito anteriormente. Este proceso se realizó sucesivamente para cada temperatura hasta 60 °C. Finalmente se colocaron los tubos que contenían las muestras, tapados con papel de aluminio, en una autoclave a 121 °C de temperatura y $1,2 \text{ kg cm}^{-2}$ de presión durante 30 min para lograr la pérdida total de electrolitos. Después de este proceso de esterilización también se midió la conductividad de la solución. Los datos de las mediciones realizadas se utilizaron para calcular el porcentaje de pérdida de electrolitos (PE), para ello se aplicó la fórmula siguiente:

$$PE = [(PET - PEi) / (PEA - PEi)] \times 100$$

Donde *PET* (pérdida de electrolitos de las muestras tratadas con una temperatura), *PEi* (pérdida de electrolitos inicial de las muestras sin tratar) y *PEA* (pérdida total de electrolitos de las muestras tratadas en autoclave).

2.3.3. Concentración de fosfato inorgánico

Para determinar el efecto del estrés térmico en la liberación de fosfato inorgánico, se colocaron cinco discos de tejido foliar en cada tubo con 25 ml de agua desionizada. Para cada genotipo se emplearon 10 tubos, las muestras se colocaron en una gradilla en un baño térmico (LAUDA E100) durante 2 h a 50 °C. Se utilizaron como control muestras que permanecieron a 25 ± 2 °C.

El contenido de fosfato inorgánico liberado por las muestras, se determinó a través de la metodología descrita por Torres y Rodríguez (2002). Se tomaron 5 ml del contenido de cada tubo a los cuales se les añadió 2 ml de solución de sulfomolibdato de amonio y 1 ml de solución de hidroquinona ($0,09 \text{ mol l}^{-1}$), se agitó manualmente cada tubo y se dejaron transcurrir 3 min.

Durante este período de tiempo, en las muestras tratadas con 50 °C de temperatura, apareció un color verde-azul con diferentes tonalidades, típico de la primera fase de la reducción del ion fosfato. Posteriormente, se le añadieron tres gotas de la solución de cloruro de estaño ($0,13 \text{ mol l}^{-1}$) utilizado como agente reductor. Transcurridos 5 min, se realizó la lectura de la absorbancia a 650 nm con la utilización de un espectrofotómetro lector de placas ELISA (ThermoLabSystems). De cada muestra se realizaron tres réplicas, para un total de 30 lecturas.

Con el valor de densidad óptica obtenido para cada muestra, se calculó la concentración de fosfato inorgánico mediante una ecuación de regresión, derivada de la curva estándar de fosfato realizada con anterioridad (Fig. 2.1). Para la obtención de la curva estándar de fosfato se pesaron 0,115 g de dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4), se disolvió en 100 ml de agua desionizada y se enrasó hasta 1l de volumen total, cuya concentración final fue de 80 mg l^{-1} de fosfato y a partir de ella se realizaron diluciones a 30, 25, 22, 19, 16, 13, 10, 7, 4 y 1 mg l^{-1} .

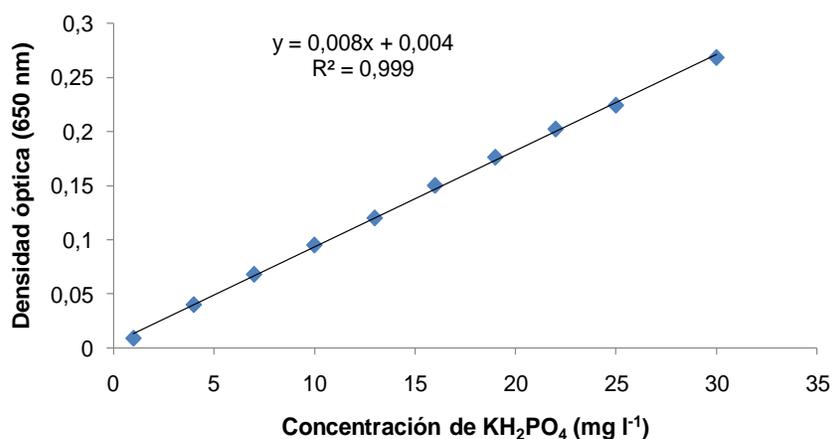


Figura 2.1. Curva estándar de concentraciones de KH_2PO_4 contra densidades ópticas a 650 nm de longitud de onda

2.4. Respuesta del tejido foliar expuesto a condiciones de estrés hídrico y salino

Con el objetivo de evaluar la respuesta del tejido foliar bajo estrés hídrico y salino, se utilizaron placas Petri plásticas (8,5 cm diámetro) dentro de las cuales se colocó un papel de filtro (Whatman filter paper No. 42) que cubrió el área de la base de la placa. Se colocaron ocho discos en cada placa. Cada disco representó una unidad experimental, por lo que se establecieron ocho réplicas por genotipo. A cada placa se le añadió 2 ml de solución de PEG-6

000 o NaCl para inducir estrés hídrico o salino respectivamente. Como control se empleó agua desionizada.

La solución de PEG-6 000 y agua desionizada se preparó a diferentes concentraciones (6, 8, 10, 12, 14, 16 y 18% (p/v)) que equivalen a los potenciales osmóticos descritos en el acápite 2.2. En el caso del NaCl, se estudiaron seis concentraciones (50, 100, 150, 200, 250 y 300 mM), su equivalencia con los potenciales osmóticos es la siguiente: 50 mM (-0,2 MPa), 100 mM (-0,4 MPa), 150 mM (-0,6 MPa), 200 mM (-0,8 MPa), 250 mM (-1,0 MPa) y 300 mM (-1,2 MPa) según lo descrito por Sosa *et al.* (2005).

Las placas con las muestras expuestas a estrés hídrico y salino, así como el control, fueron mantenidas durante 48 h a 25 ± 2 °C. Luego de este período se evaluó el grado de afectación en el tejido a partir de la construcción de escalas cualitativas que permitieron diferenciar la formación de necrosis en el tejido.

2.5. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos experimentales se utilizó el Paquete estadístico SPSS versión 21,0. Se comprobó la normalidad y la homogeneidad de varianza, mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la prueba de Levene, respectivamente. Como los datos no cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza, se aplicó un análisis no paramétrico mediante las pruebas de Kruskal Wallis y Mann-Whitney para un nivel de confianza del 95%.

3.1. Efecto del estrés hídrico inducido con Polietilenglicol-6 000 sobre la germinación de semillas

Las semillas embebidas de *Phaseolus vulgaris* var. ICA Pijao germinaron en todas las concentraciones de PEG-6 000 estudiadas (Fig. 3.1). Sin embargo, con el aumento de las concentraciones de PEG-6 000 disminuyó el porcentaje de germinación de las semillas (Fig. 3.1). En la concentración menor (6%) de PEG-6 000 no se afectó la germinación, en este tratamiento al igual que en el control germinaron todas las semillas. En las soluciones con concentraciones en el rango de 8 a 14% el porcentaje de germinación decreció más de un 20% sin diferencias entre estos tratamientos, pero significativamente inferior al valor presentado en el control. La germinación fue drásticamente reducida con 16 y 18% de PEG-6 000, las semillas sembradas en estas concentraciones mostraron los porcentajes más bajos de esta variable (Fig. 3.1).

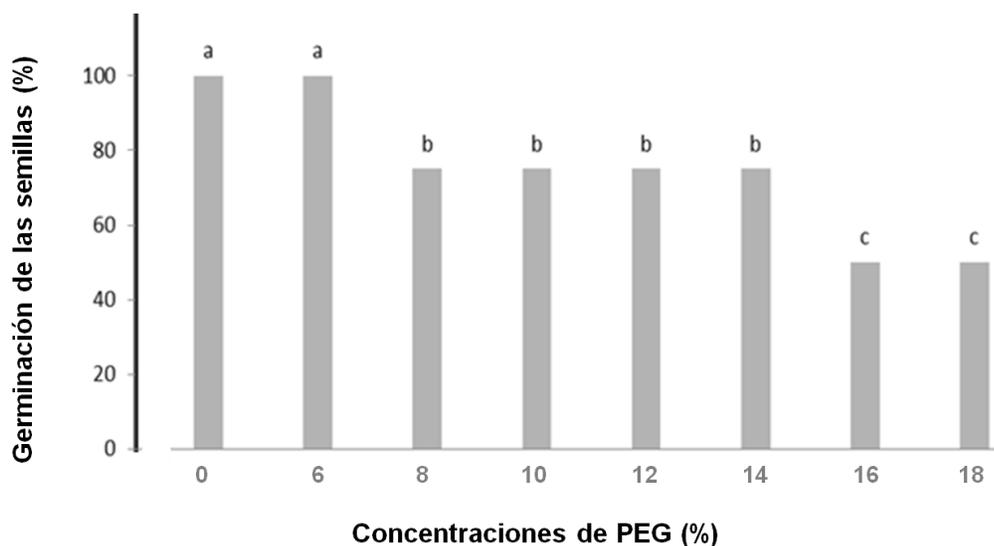


Figura 3.1. Efecto de diferentes concentraciones de PEG-6 000 sobre la germinación de *Phaseolus vulgaris* var. ICA Pijao a las 48 h

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$), según las pruebas de Kruskal Wallis y Mann-Whitney

El PEG-6 000 también afectó el crecimiento de otros órganos como la raíz y el tallo. Con el incremento de las concentraciones de este agente estresante se observó una reducción de la longitud del tallo y la raíz en comparación con el control (Fig. 3.2). Las diferencias en el crecimiento de ambos órganos (tallo y raíz) en dependencia de la concentración de PEG-6 000 empleada, se apreciaron al inicio de la germinación, a los tres días y en la culminación de esta

etapa, a los seis días (Fig. 3.2). El crecimiento del tallo y la raíz fue inversamente proporcional al aumento de las concentraciones de PEG-6 000, las diferencias más contrastantes se observaron entre el control y los tratamientos con las mayores concentraciones (16 y 18%) de este agente estresante (Fig. 3.3).

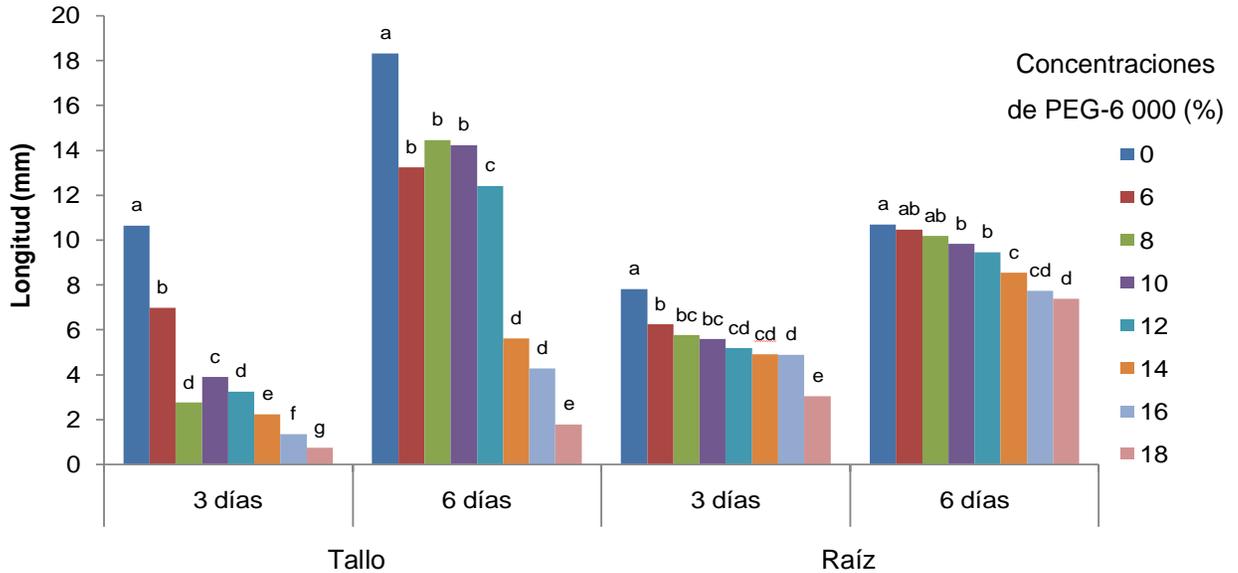


Figura 3.2. Crecimiento de tallo y raíz en plántulas de *Phaseolus vulgaris* var. ICA Pijao germinadas en diferentes concentraciones de PEG-6 000 a los tres y seis días
Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$), según las pruebas de Kruskal Wallis y Mann-Whitney

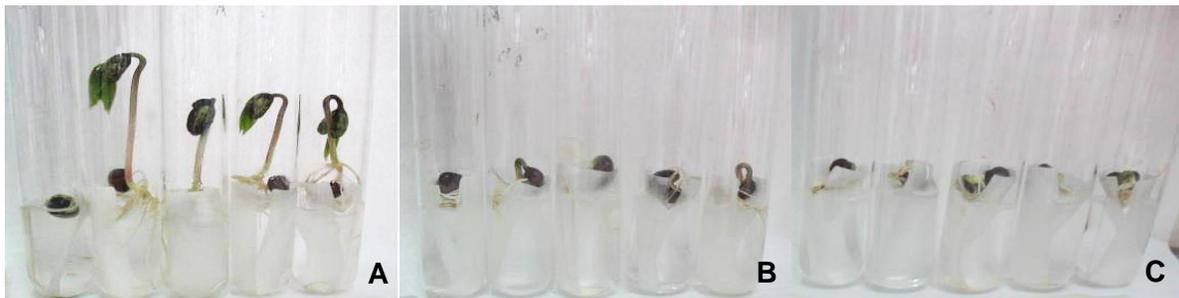


Figura 3.3. Efecto de PEG-6 000 sobre la longitud del tallo y la raíz de *Phaseolus vulgaris* var. ICA Pijao a los seis días A) Control, B) 16 % de PEG-6 000 y C) 18 % de PEG-6 000

El PEG-6 000 afectó el desarrollo del área foliar de *P. vulgaris* var. ICA Pijao. En las plántulas germinadas en las soluciones con las menores concentraciones 6, 8 y 10% de este agente estresante, la expansión de las hojas primarias fue significativamente inferior comparada con las plántulas cultivadas en el tratamiento control (Fig. 3.4). El incremento de las concentraciones de PEG-6 000 a partir del 12% redujo considerablemente el área de las hojas primarias. La mayor

afectación en el área foliar, se observó en las soluciones de PEG-6 000 al 16 y 18%, en estos tratamientos las plántulas germinadas no presentaron hojas expandidas (Fig. 3.4).

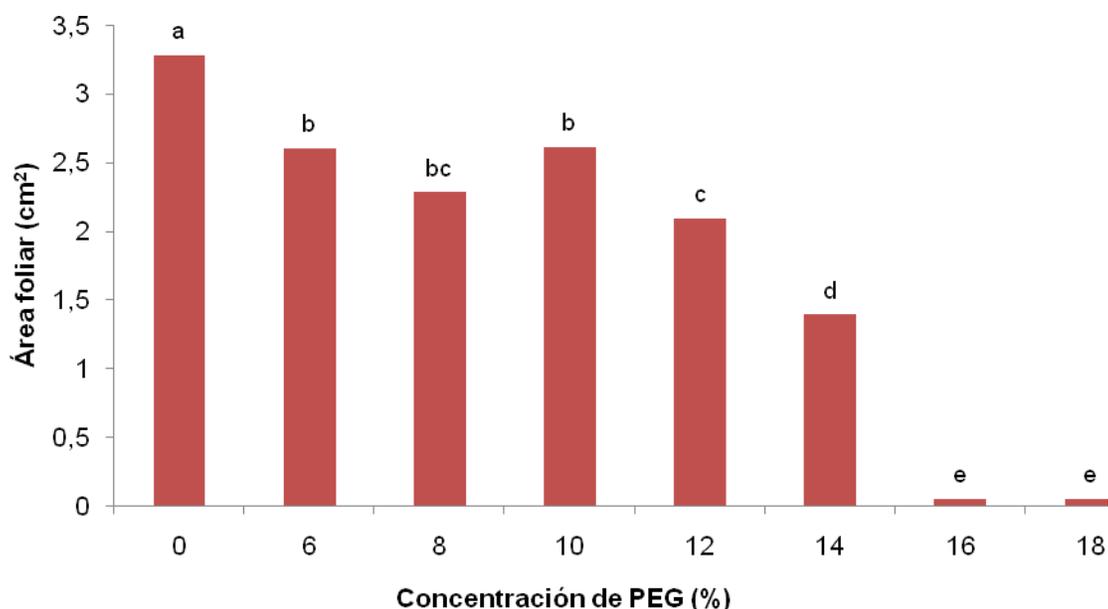


Figura 3.4. Efecto de diferentes concentraciones de PEG-6 000 sobre el área foliar de *Phaseolus vulgaris* var. ICA Pijao a los seis días

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$), según las pruebas de Kruskal Wallis y Mann-Whitney

3.2. Efecto de la temperatura sobre la pérdida de electrolitos y la liberación de fosfato inorgánico en tejido foliar

3.2.1. Pérdida de electrolitos

En todas las temperaturas analizadas (35–60 °C), se observó un incremento de forma general en la pérdida de electrolitos, con respecto al valor de esta variable a 25 °C para los 10 genotipos objeto de estudio. A partir de 45 °C, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de pérdida de electrolitos, pues en los 10 genotipos esta variable presentó valores superiores al 80%. Las diferencias significativas entre los genotipos, en cuanto a la pérdida de electrolitos, se presentaron en los tratamientos donde el tejido foliar estuvo expuesto a 35 y 40 °C de temperatura (Fig. 3.5). A los 35 °C, los genotipos que tuvieron menor pérdida de electrolitos fueron ICA Pijao y Tomeguín-93, seguidos por L84.4 y BAT-93; en cambio los genotipos I45R y L84.9 alcanzaron los mayores valores (50%) de este indicador (Fig. 3.5). Cuando la temperatura aumentó a 40 °C, el porcentaje de pérdida de electrolitos incrementó

para todos los genotipos (Fig. 3.5). Sin embargo, esta respuesta fisiológica correspondió con los valores de pérdida de electrolitos obtenidos a 35 °C, donde los genotipos ICA Pijao, Tomeguín-93, L84.4 y BAT-93, fueron los menos afectados y los genotipos L84.9 e I45R se mantuvieron dentro de los que mayor pérdida de electrolitos alcanzaron (Fig. 3.5).

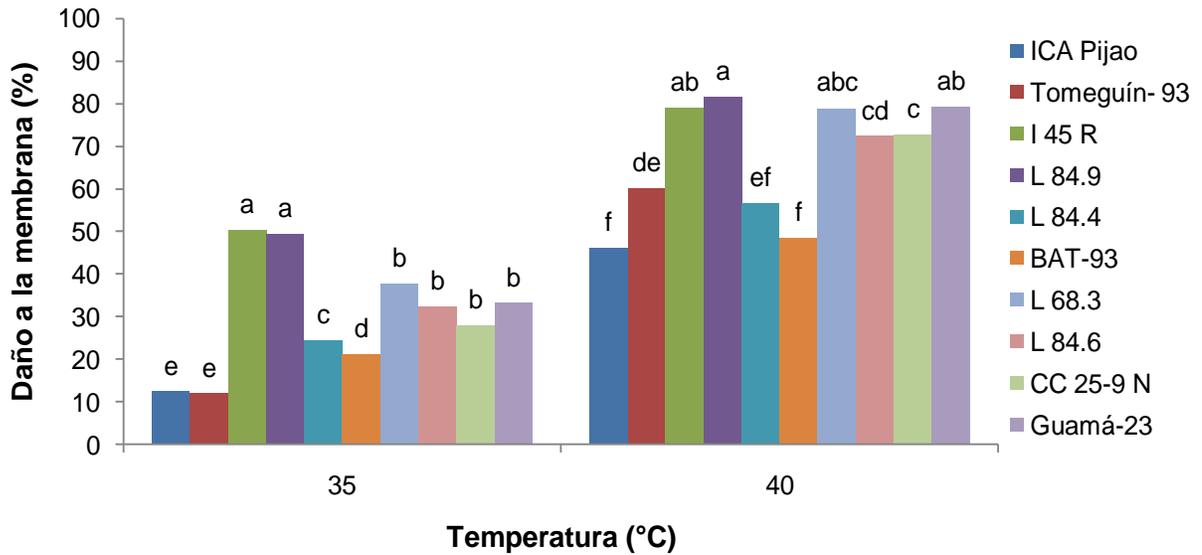


Figura 3.5. Efecto de las temperaturas de 35 y 40 °C sobre la pérdida de electrolitos en el tejido foliar de 10 genotipos de *Phaseolus vulgaris*
 Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$), según las pruebas de Kruskal Wallis y Mann-Whitney

3.2.2. Concentración de fosfato inorgánico

Se observaron respuestas diferentes de liberación de fosfato inorgánico en dependencia del genotipo (Fig. 3.6). Los genotipos ICA Pijao y Cuba Cueto 25-9 Negro, liberaron mayor cantidad de fosfato inorgánico sin diferencias entre ellos (Fig. 3.6). La concentración de fosfato determinada en ICA Pijao y Cuba Cueto 25-9 Negro fue significativamente superior que en el resto de los genotipos, con excepción de L68.3 que presentó una respuesta similar a Cuba Cueto 25-9 Negro (Fig. 3.6). Basados en los resultados de la pérdida de electrolitos, la liberación de fosfato inorgánico para los genotipos ICA Pijao y Guamá-23 reveló una respuesta contrastante.

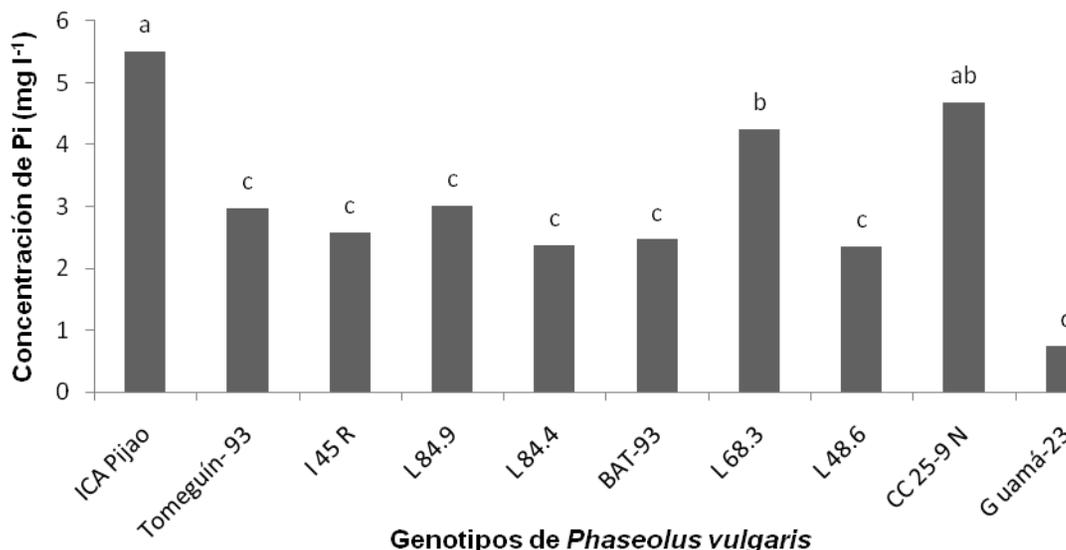


Figura 3.6. Efecto de la temperatura sobre la liberación de fosfato inorgánico en el tejido foliar de 10 genotipos de *Phaseolus vulgaris*

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$), según las pruebas de Kruskal Wallis y Mann-Whitney

3.3. Respuesta del tejido foliar expuesto a condiciones de estrés hídrico y salino

El tejido foliar expuesto a condiciones de estrés inducido con PEG-6 000 y NaCl, a las 48 h presentó áreas necróticas, lo que está relacionado con la muerte de las células que forman ese tejido. Debido a que la formación de áreas necróticas mostró variación tanto para las muestras estresadas con PEG-6 000, como para aquellas expuestas a NaCl, fue necesario la elaboración de escalas cualitativas para su evaluación (Tabla II y III). Estas escalas permitieron diferenciar la afectación en el tejido por necrosis. Las dos escalas se estructuraron con 7 grados, donde el grado 1 se corresponde al tejido no afectado y el 7 al tejido totalmente necrosado (Tabla II y III). Para la construcción de las escalas cualitativas se realizó un estudio de frecuencia de aparición de cada uno de estos grados de afectación en el tejido foliar. De manera general todos los grados aparecieron en las muestras estudiadas. Para las concentraciones de PEG-6 000 los grados 2, 3 y 4 tuvieron una mayor frecuencia (Fig. 3.7) y para las concentraciones de NaCl fueron los grados 3, 4 y 5 (Fig. 3.8).

Tabla II. Escala cualitativa para la evaluación de la formación de áreas necróticas en tejido foliar de *Phaseolus vulgaris* expuesto a estrés hídrico inducido con PEG-6 000

Grado de necrosis	Descripción	
1	Tejido no afectado	
2	Tejido con < 10% de necrosis	
3	Tejido con 10–25% de necrosis	
4	Tejido con 25–50% de necrosis	
5	Tejido con 50–75% de necrosis	
6	Tejido con 75–90% de necrosis	
7	Tejido con necrosis total	

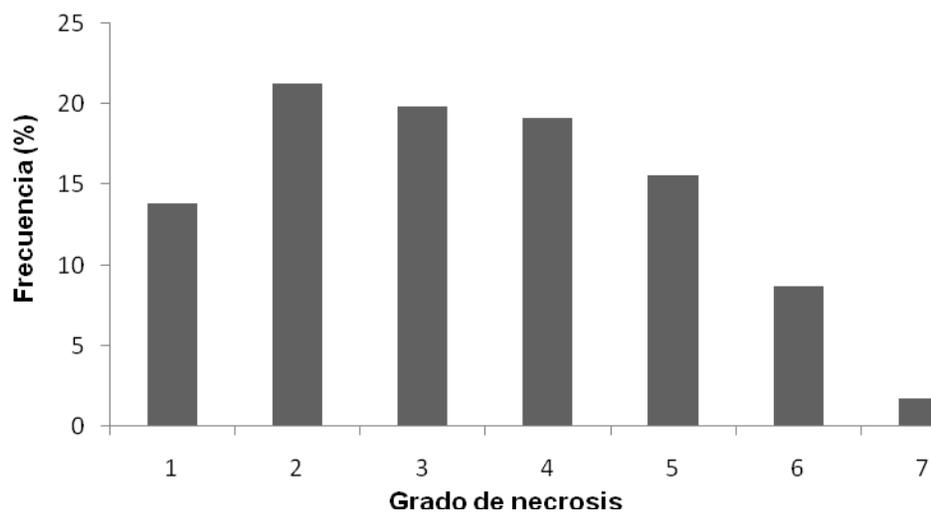


Figura 3.7. Frecuencia de aparición de cada uno de los grados de afectación del tejido foliar expuesto a diferentes concentraciones de PEG-6 000

Tabla III. Escala cualitativa para la evaluación de la formación de áreas necróticas en tejido foliar de *Phaseolus vulgaris* expuesto a estrés salino inducido con NaCl

Grado de necrosis	Descripción	
1	Tejido no afectado	
2	Tejido con < 10% de necrosis	
3	Tejido con 10–25% de necrosis	
4	Tejido con 25–50% de necrosis	
5	Tejido con 50–75% de necrosis	
6	Tejido con 75–90% de necrosis	
7	Tejido con necrosis total	

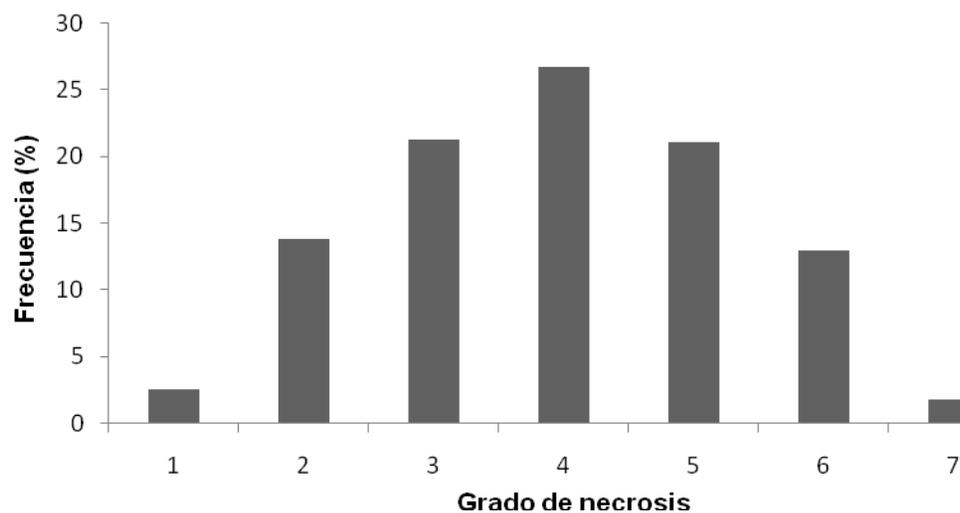


Figura 3.8. Frecuencia de aparición de cada uno de los grados de afectación del tejido foliar expuesto a diferentes concentraciones de NaCl

Con el empleo de las escalas elaboradas se diferenció la respuesta de los genotipos por su grado de afectación. En todos los genotipos estudiados, el tratamiento control no presentó afectación.

En las muestras estresadas con PEG-6 000 se observó que a medida que aumentó la concentración, se incrementó la formación de áreas necróticas en el tejido de los 10 genotipos estudiados (Fig. 3.9). Aunque en todas las concentraciones de PEG-6 000 analizadas, se observó una respuesta variada en dependencia del genotipo, esta diferencia fue mejor evidenciada con la concentración más baja. En este caso los genotipos que tuvieron menor grado de afectación fueron ICA Pijao e I45R. Por otra parte los genotipos L84.4 y BAT-93 presentaron mayor grado de afectación (Fig. 3.10).

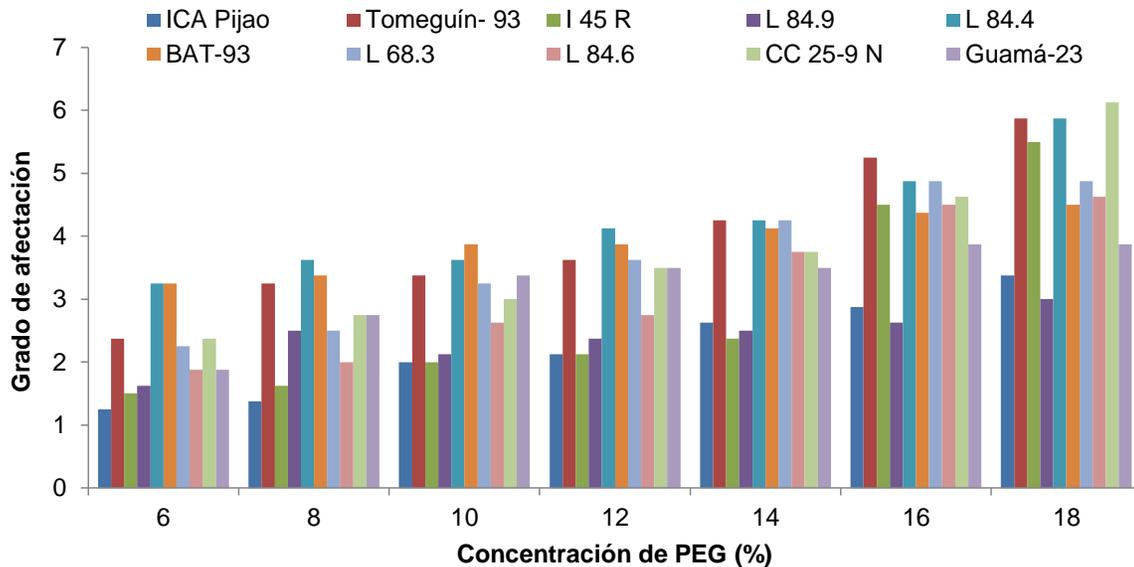


Figura 3.9. Efecto del estrés hídrico inducido con PEG-6 000 sobre la formación de áreas necróticas en tejido foliar de 10 genotipos de *Phaseolus vulgaris*

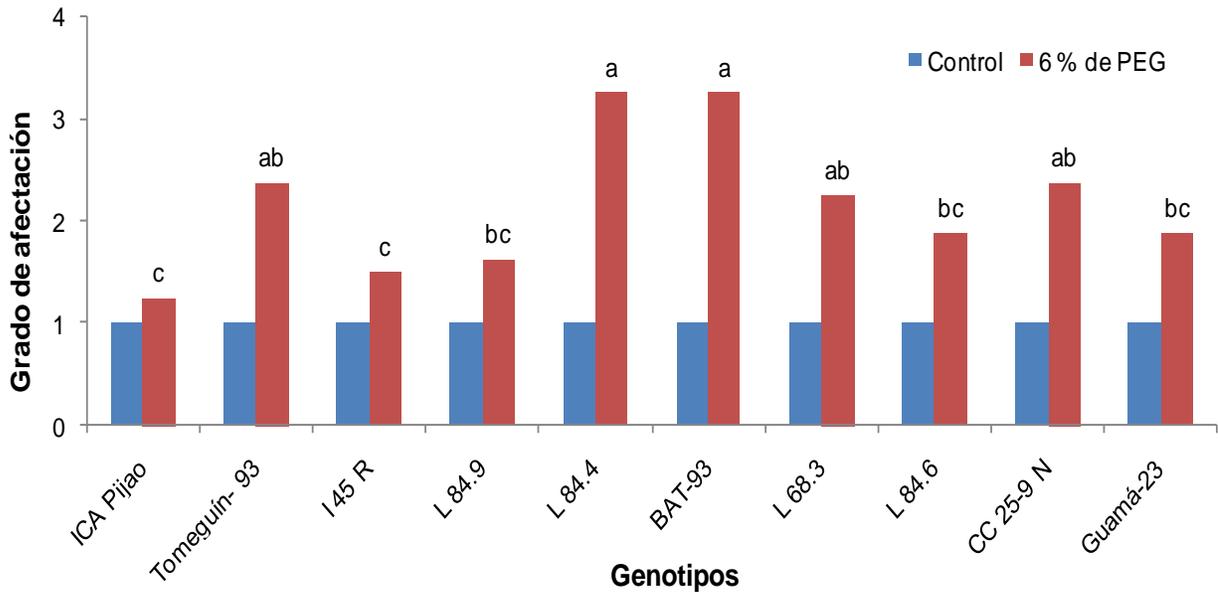


Figura 3.10. Afectación del tejido foliar de 10 genotipos de *Phaseolus vulgaris* a 6% de PEG-6 000. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según las pruebas de Kruskal Wallis y Mann-Whitney.

El tejido foliar de los genotipos presentó afectaciones en todas las concentraciones de NaCl estudiadas. A medida que aumentó la concentración de este agente estresante incrementó la formación de áreas necróticas (Fig. 3.11). Las mayores diferencias entre el tejido afectado de todos los genotipos se observaron en la concentración de 200 mM, donde ICA Pijao tuvo menor grado de afectación. En el caso de L68.3 y Cuba Cueto 25-9 Negro presentaron en la mayoría de los casos grado 6 pues el tejido resultó afectado en un 75-90% (Fig. 3.12).

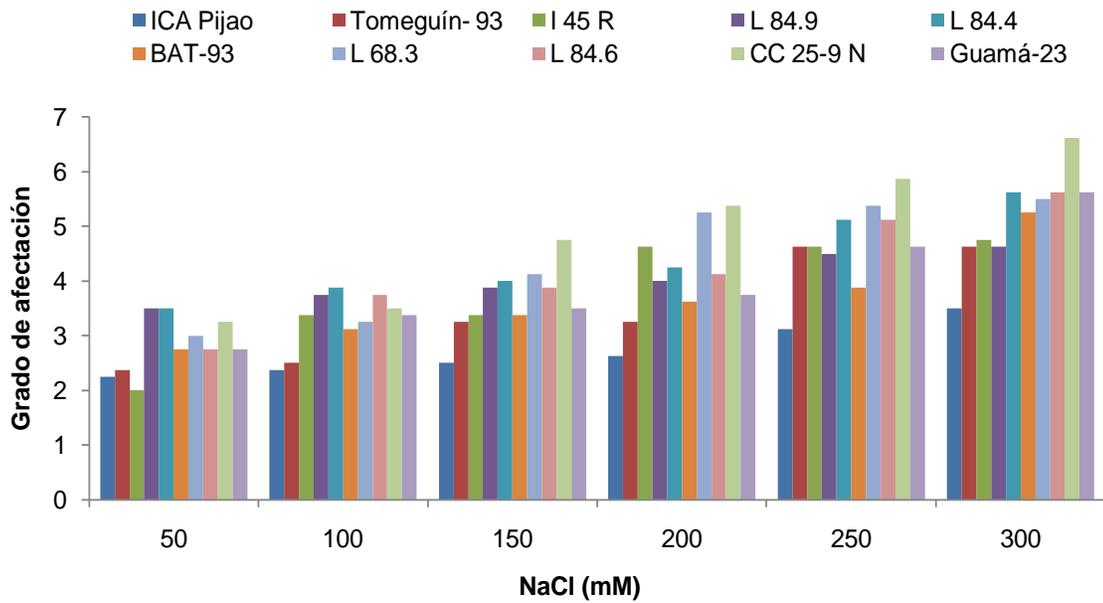


Figura 3.11. Efecto del estrés salino inducido con NaCl sobre la formación de áreas necróticas en tejido foliar de 10 genotipos de *Phaseolus vulgaris*

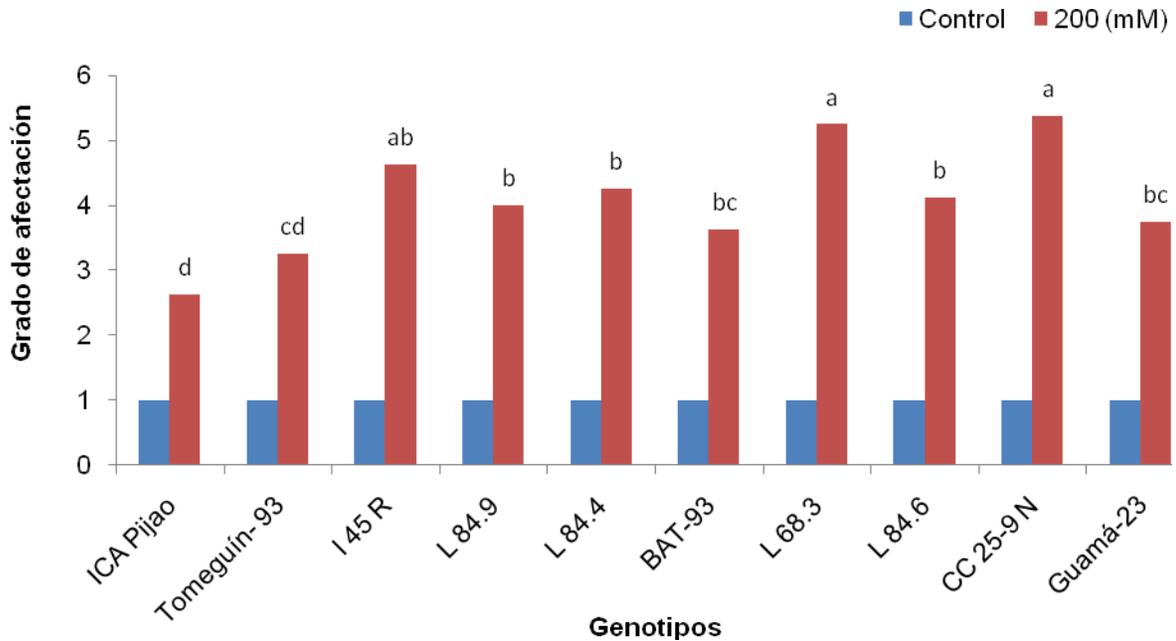


Figura 3.12. Efecto del estrés salino inducido con NaCl sobre la formación de áreas necróticas en tejido foliar de 10 genotipos de *Phaseolus vulgaris* a 200 mM
 Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según las pruebas de Kruskal Wallis y Mann-Whitney

4.1. Efecto del estrés hídrico inducido con Polietilenglicol-6 000 sobre la germinación de semillas

La germinación de la semilla y el crecimiento prematuro del plantón son consideradas fases críticas para la colonización y el establecimiento de cualquier especie de planta. La inducción *in vitro* del estrés hídrico, utilizando PEG-6 000 en semillas de *P. vulgaris*, facilitaría la evaluación de parámetros fisiológicos asociados con la germinación que podrían ser usados como fuente para discriminar líneas de *P. vulgaris* tolerantes a la sequía (Zhu *et al.*, 2011).

En este trabajo, altas concentraciones de PEG-6 000 (16 y 18%) redujeron la absorción de agua por las semillas lo que trajo como consecuencia la disminución en un 50% del porcentaje de germinación (Fig. 3.1). Estos resultados son similares a los obtenidos por Moraes *et al.* (2005), quienes observaron una significativa reducción de la germinación y el vigor de las plántulas de *P. vulgaris* cuando las concentraciones de PEG-6 000 estaban por encima del 14%. De igual forma los resultados obtenidos en esta investigación concuerdan con los informados por Penichet *et al.* (2006) sobre la germinación de diferentes cultivares de *P. vulgaris* en condiciones de sequía, donde observaron que algunas variedades evaluadas a un 18% de concentración de PEG, presentaron 48 y 50% de inhibición de la germinación. Resultados análogos informaron Mohammadkhani y Heidari (2008) al estudiar la respuesta de la germinación al estrés inducido por PEG-6 000 en dos cultivares de maíz, donde demostraron que la germinación fue inversamente proporcional al aumento de las concentraciones de PEG.

Asimismo con la aplicación de este agente estresante, Hamidi y Safarnejad (2010) detectaron una disminución del porcentaje de germinación en semillas de alfalfa (*Medicago sativa* L.). Por lo contrario, Erice *et al.* (2010) no encontraron diferencias entre cuatro genotipos de alfalfa respecto a la longitud y la masa seca de las semillas bajo condiciones de sequía. En investigaciones realizadas por Suárez *et al.* (2014) evaluaron el efecto del PEG-8 000 sobre la germinación de las semillas de *P. vulgaris* y obtuvieron como resultado una disminución marcada del porcentaje de germinación en los diferentes cultivares al 10 y 15% de PEG-8 000 al compararlos con el control (0% de PEG-8 000) no estresado.

En este estudio la adición de PEG-6 000 también afectó el desarrollo de órganos en la etapa de germinación de las semillas de *P. vulgaris* var. ICA Pijao. Con el aumento de las concentraciones de PEG-6 000 se observó una reducción de la longitud del tallo y la raíz principal y un aumento del número de raíces secundarias (Fig. 3.2). Esto se corresponde con lo planteado por Barrios *et al.* (1998) quienes demostraron que el frijol común duplica el número de

raíces secundarias y terciarias en respuesta a la sequía. Una respuesta común de las plantas a la sequía es la disminución del crecimiento de las semillas y favorecer el crecimiento de la raíz para aumentar la absorción de agua (Wu *et al.*, 2008). Rashidi (2011) observó una reducción del crecimiento de las semillas de diferentes genotipos de *P. vulgaris* sometidos a los efectos de la sequía. De igual forma Suárez *et al.* (2014) al analizar la longitud del tallo y la raíz comprobaron que estos parámetros de crecimiento se afectaron en los genotipos estudiados de *P. vulgaris*, en las condiciones de sequía experimental, siendo la afectación más severa en las semillas sembradas a concentración de 20% de PEG.

Según lo planteado por Bhatt y Srinivasa (2005), la reducción del crecimiento en las plantas está asociada con la disminución del ancho de la célula y una mayor senescencia bajo el estrés hídrico. Por esto, se puede decir que las deformaciones observadas en la arquitectura de la planta después del proceso de germinación de las semillas (la reducción del tallo y la raíz principal y el aumento de ramificaciones de raíces secundarias), puede estar relacionado con la tolerancia a la sequía, pues esta adaptación le facilita a la planta extraer más agua del suelo y el transporte de esta hacia otros tejidos para la realización de procesos tan importantes como la fotosíntesis (Jaleel *et al.*, 2009).

Un profundo y extenso sistema radicular respalda el incremento de la productividad de las leguminosas bajo condiciones de sequía. La longitud de la raíz podría ser una característica importante en la selección *in vitro* de variedades de frijol tolerantes a la sequía con una mejor capacidad para obtener agua.

Respecto al área foliar de las plantas de *P. vulgaris* var. ICA Pijao analizadas, se observó una significativa reducción de esta, con el aumento de las concentraciones de PEG-6 000 (Fig. 3.4). Resultados similares fueron informados por Gunton y Evenson (1980) y Barrios *et al.* (1998), quienes mostraron una reducción del área foliar de las plantas de frijol cuando estas fueron expuestas a estrés hídrico durante la fase de crecimiento vegetativo. Estos resultados concuerdan con lo planteado por Passioura (2002), quien refiere que la variación del área foliar es una de las respuestas macroscópicas más tempranas en plantas que sufren déficit hídrico.

Igualmente Sánchez-Blanco *et al.* (2009) indujeron la disminución del área foliar en plantas expuestas a diferentes regímenes de agua. Del mismo modo Emam *et al.* (2010) observaron reducción del área foliar en dos cultivares de frijol común con diferentes hábitat de crecimiento bajo los efectos de la sequía. Todo esto se debe a que el desarrollo óptimo del área foliar es determinante para la fotosíntesis y la productividad de materia orgánica. El déficit hídrico

principalmente reduce el crecimiento de la hoja y como consecuencia el área foliar en muchas especies de leguminosas como el frijol (Zhang *et al.*, 2004), lo que trae como consecuencia una disminución de los procesos fotosintéticos.

La disminución del área foliar por planta constituye una respuesta adaptativa que se produce una vez que aumenta la concentración de la solución de PEG-6 000, lo cual contribuye a controlar la pérdida de agua bajo condiciones de sequía inducida. Por tanto la disminución del área foliar constituye una variable morfofisiológica que puede servir como criterio de selección para encontrar genotipos de frijol tolerantes al estrés hídrico en programas de mejoramiento genético.

4.2. Efecto de la temperatura sobre la pérdida de electrólitos y la liberación de fosfato inorgánico en tejido foliar

4.2.1. Pérdida de electrólitos

La conductividad eléctrica por pérdida de electrólitos es una técnica muy utilizada, que indica la capacidad de una solución para conducir la energía eléctrica a partir de los iones que se encuentren disueltos en ella. Por tanto puede resultar muy útil si se desea determinar la estabilidad de las membranas de un tejido previamente estresado (Schulze *et al.*, 2002).

La determinación del porcentaje de pérdida de electrólitos ha demostrado tener una estrecha relación con la termoestabilidad de las membranas pues el primer efecto de la temperatura es la destrucción de las mismas, disminuyendo la capacidad de las células para retener tanto solutos como iones en su interior (Schulze *et al.*, 2002). Diversos resultados indican que determinar la pérdida de electrólitos en hojas, podría ser utilizado con éxito como indicador de la termotolerancia en varias especies (Liu y Huang, 2000, Blum *et al.*, 2001, Rahman *et al.*, 2004, Thiaw y Hall, 2004).

En el caso del frijol común, estas determinaciones de pérdida de electrólitos se realizan con frecuencia después de haber sometido las plantas a condiciones de estrés hídrico o salino (Kaya *et al.*, 2001, Bajji *et al.*, 2002, Kumar *et al.*, 2009, Houimli *et al.*, 2010, Li *et al.*, 2013). Sin embargo, en este trabajo los genotipos solamente fueron sometidos a diferentes tratamientos de temperatura con el objetivo de determinar el efecto de esta, directamente sobre las membranas celulares del tejido foliar.

De esta manera a la temperatura de 35 °C los genotipos que tuvieron menor pérdida de electrolitos fueron ICA Pijao y Tomeguín-93 seguidos por L84.4 y BAT-93, lo cual indica una mayor tolerancia al estrés térmico y una mayor termoestabilidad de sus membranas; en cambio los genotipos I45R y L84.9 alcanzaron un 50% de pérdida de electrolitos por lo que son menos tolerantes a esta temperatura (Fig. 3.5). En la temperatura de 40 °C, los genotipos ICA Pijao, Tomeguín-93, L84.4 y BAT-93, fueron los más tolerantes, en cambio los genotipos L84.9, I45R, L68.3 y Guamá-23 fueron los más sensibles (Fig. 3.5). Bajo las condiciones establecidas en este experimento, se determinó que 35 y 40 °C dentro del rango estudiado, son las temperaturas apropiadas para diferenciar respuestas entre genotipos de *P. vulgaris* basados en la variable fisiológica de pérdida de electrolitos. En la literatura consultada no se encontraron informes relacionados con la respuesta fisiológica de los genotipos evaluados, aunque se conoce que en condiciones de casas de cultivos los genotipos ICA Pijao y BAT-93 no tienen un buen rendimiento cuando se encuentran expuestos a temperaturas elevadas (comunicación personal: Dr. C. Novisel Veitía). Esto se considera por tanto, un aporte de este trabajo para la continuidad de estudios de genotipos genéticamente modificados.

Del mismo modo Celik y Turhan (2013) analizaron la pérdida de electrolitos en cinco genotipos de frijol común donde observaron que el porcentaje de daño varía en dependencia del genotipo y que este aumenta a medida que va incrementándose la temperatura. En otros cultivos como las poaceas, para determinar la estabilidad de la membrana celular, se han colocado fragmentos del tejido foliar a altas temperaturas y se ha medido la cantidad de solutos disueltos en la solución por medio de cambios en la conductividad (Blum *et al.*, 2001).

La utilización del daño a la membrana celular como un indicador de la tolerancia al calor, ha sido un criterio fisiológico adecuado en la selección inicial de una gran cantidad de genotipos de maíz, en las primeras etapas de un programa de mejoramiento genético, aunque se plantea que no debe ser un criterio de selección exclusivo, sino más bien complementario en este proceso (Nava *et al.*, 2012).

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 genotipos de maíz y frijol común. Independientemente de la especie y variedad, a la temperatura de 60 °C se observó el mayor efecto sobre la membrana celular, con un daño promedio de 84% y una diferencia de 75% con respecto al tratamiento de 40 °C. De acuerdo a lo informado por Rahman *et al.* (2004), esto se debe a modificaciones en la composición y estructura de la membrana celular. Esta explicación se basa en que desde el punto de vista fisiológico la temperatura modifica la fluidez de la membrana, lo cual provoca una

liberación de biomoléculas e iones que genera un desbalance del potencial osmótico y del potencial de membrana e incluso provoca la lisis celular.

Los resultados de esta investigación confirman que el uso de la prueba de la termoestabilidad de la membrana celular es un procedimiento conveniente para identificar genotipos tolerantes al estrés térmico en programas de mejoramiento genético.

4.2.2. Concentración de fosfato inorgánico

El fósforo, en forma de fosfato inorgánico (Pi), es uno de los macronutrientes más importantes para todos los organismos (Watanabe *et al.*, 2008, Yang y Finnegan, 2010, Ghillebert *et al.*, 2011). No sólo se utiliza en la biosíntesis de los componentes celulares, tales como ATP, ácidos nucleicos, fosfolípidos, y proteínas, sino que también participa en muchas rutas metabólicas, incluyendo la transferencia de energía, activación de proteínas, y los procesos metabólicos de carbohidratos y aminoácidos (Wu *et al.*, 2003). En general se requieren grandes cantidades de fosfato inorgánico para el crecimiento y el desarrollo celular, el cual constituye para las plantas un macronutriente esencial (Lei *et al.*, 2011).

La liberación de fosfato inorgánico está estrechamente relacionada con la termoestabilidad de la membrana, (Torres y Rodríguez, 2002) por tanto, las altas concentraciones de este compuesto en el tejido indican que la membrana se encuentra más vulnerable a daños producidos bajo condiciones inducidas de estrés.

De Sousa *et al.* (1984) plantearon que las variedades más susceptibles a la sequía tienen por lo general mayores proporciones de fosfatos en formas inorgánicas que las tolerantes, cuando están sometidas a condiciones adversas de calentamiento foliar y estrés hídrico. Por otro lado, las especies más resistentes a la sequía poseen membranas más estables a la deshidratación y al calor por lo que soportan un estrés más fuerte sin que dañe su morfología de forma considerable (De Sousa *et al.*, 1984, Torres *et al.*, 1993).

El rango de concentraciones de fosfato inorgánico detectado en este trabajo, después de someter los discos de hojas a temperatura de 50 °C, está en el mismo orden de magnitud que las concentraciones de fosfato inorgánico determinadas en tejidos de la raíz de frijol (1,35-4,75 mg l⁻¹) por Tawaraya *et al.* (2014). Esto indica que en este orden se encuentran las concentraciones de ese mineral en las células vegetales de ese cultivo.

En este estudio en la temperatura de 50 °C no se pudo diferenciar cual genotipo liberó más o menos fosfato (Fig. 3.6) esto puede deberse a que como a esta temperatura prácticamente se alcanza una ruptura total de la membrana, todos los genotipos hayan liberado todo su contenido de fosfato inorgánico. Se ha demostrado que la concentración endógena de fosfato en las especies vegetales, varía en dependencia del genotipo, (Denbow *et al.*, 1995) lo que pudo haber influido en la evaluación de esta variable. Por tanto, para emplear este indicador con el objetivo de diferenciar tolerancia a estrés abiótico en *P. vulgaris*, es necesario realizar previamente determinaciones de cantidades de fosfato en cada uno de los genotipos evaluados.

4.3. Respuesta del tejido foliar expuesto a condiciones de estrés hídrico y salino

Ante un escenario de estrés hídrico o salino, la planta se va marchitando y sobre las zonas afectadas es característica la aparición de pequeñas áreas necróticas de forma similar a los síntomas producidos por la deficiencia de nutrientes. Bajo estas condiciones a menudo se produce una pérdida de clorofilas acompañada del amarillamiento característico y posteriormente necrosis del tejido (Wong y Nadeson, 1993). Una de las técnicas utilizadas es el conteo de estas áreas necróticas en discos de hojas, después de ser incubadas durante dos días con diferentes concentraciones de PEG-6 000 y NaCl respectivamente (Schulze *et al.*, 2002). Este ensayo posibilita a través de un análisis cualitativo, comparar los genotipos entre sí y por otra parte brinda un conocimiento previo de cuáles son las concentraciones de NaCl o de PEG-6 000 que puede tolerar una especie.

En este trabajo se observó que a medida que aumentó la concentración del PEG-6 000, se incrementó la formación de áreas necróticas en el tejido foliar de los 10 genotipos evaluados (Fig. 3.9). Los genotipos que tuvieron menor grado de afectación fueron ICA Pijao e I45R por lo que son más tolerantes en estas condiciones y los genotipos L84.4 y BAT-93 presentaron mayor grado de afectación, por tanto resultan ser más sensibles en estas condiciones de estrés hídrico (Fig. 3.10).

Estos resultados coinciden con los estudios realizados por Wong y Nadeson (1993) en árboles de rambután (*Nephelium lappaceum* L.), donde observaron que con el incremento gradual de las condiciones de sequía una de las primeras respuestas de la planta fue el desarrollo de necrosis en el tejido foliar, de forma inicial comenzó en el margen de las hojas y posteriormente cubrió toda el área. Estudios realizados por Jaleel *et al.* (2009), demostraron además que la formación de áreas necróticas es una consecuencia de la senescencia del tejido foliar pues bajo estrés hídrico también se afectan diferentes procesos metabólicos y bioquímicos como la

reducción del contenido de clorofila y la síntesis de otros pigmentos que afectan el proceso de la fotosíntesis.

Por otro lado, las concentraciones de NaCl estudiadas también afectaron el tejido foliar de los genotipos. A medida que aumentó la concentración se incrementó la formación de áreas necróticas (Fig. 3.11), siendo en la mayoría de los casos ICA Pijao, el genotipo menos afectado difiriendo de los genotipos L68.3 y Cuba Cueto 25-9 Negro, los cuales presentaron entre un 75-90% de afectación en el tejido foliar (Fig. 3.12).

Hasta la fecha no se encontraron informes acerca de la respuesta fisiológica al estrés hídrico y salino de la mayoría de los genotipos de *P. vulgaris* evaluados en este estudio, de ahí la importancia del mismo. Solamente el genotipo Cuba Cueto 25-9 Negro ha sido demostrado que es sensible en condiciones de estrés hídrico (Domínguez *et al.*, 2014), resultados que coinciden con los obtenidos en esta investigación. En ambos casos (estrés hídrico y salino) es de notar que los gráficos de frecuencia que se obtuvieron mantienen un comportamiento gaussiano debido a la normalidad con la que están distribuidos los datos.

Respecto a la respuesta fisiológica de las leguminosas al estrés salino se han encontrado diferentes planteamientos contrastantes; por ejemplo Garzón y García (2011) en el estudio del efecto del NaCl (100 mM) sobre la anatomía radicular y foliar en dos genotipos de frijol de la especie *Vigna unguiculata* (L.) Walp., revelaron una inducción de tricomas glandulares en las hojas primarias de las plantas estresadas, así como invaginaciones en las células del parénquima en empalizada y arreglo menos compacto del mesófilo. En unos de los genotipos también encontraron una reducción significativa del grosor de la hoja y de la epidermis adaxial del parénquima clorofiliano en empalizada y esponjoso. Estos autores concluyen que los mecanismos anatómicos de adaptación de esta especie al estrés por NaCl están relacionados con el mantenimiento de la integridad del tejido foliar.

Sin embargo, en especies de *P. vulgaris* otros autores han informado un incremento en el espesor de la hoja en respuesta a la salinidad, ya sea debido a un aumento del grosor del parénquima esponjoso de la primera hoja trifoliada en plantas estresadas con 40 mM de NaCl (Wignarajah *et al.*, 1975), o a un incremento en el espesor del parénquima en empalizada de la segunda hoja trifoliada en plantas estresadas con 90 mM de NaCl (Bray y Reid, 2002).

Las respuestas fisiológicas obtenidas en este trabajo en los diferentes genotipos evaluados y su contraste con la literatura evidencian que la respuesta a la salinidad tanto dentro de una misma

especie como de un mismo género, puede variar en dependencia de la concentración salina utilizada y de la edad foliar considerada.

1. El incremento de las concentraciones de PEG-6 000, redujo el porcentaje de germinación *in vitro* de semillas de *P. vulgaris* var. ICA Pijao. Esto confirma que el agente estresante PEG-6 000 puede ser utilizado para determinar la respuesta fisiológica en genotipos de *P. vulgaris*.
2. La temperatura influyó sobre la pérdida de electrólitos y la liberación de fosfato inorgánico en el tejido foliar de *P. vulgaris*. Este hecho permitió diferenciar la respuesta de varios genotipos en condiciones inducidas de estrés térmico.
3. El estrés hídrico y salino afectó notablemente el tejido foliar de los genotipos de *P. vulgaris* estudiados. La formación de áreas necróticas permitió mediante escalas cualitativas elaboradas, identificar genotipos con respuesta diferente a estos tipos de estrés.
4. Las variables morfológicas y fisiológicas evaluadas, pueden servir como criterios de selección para diferenciar la respuesta de genotipos de frijol, en diversas condiciones inducidas de estrés abiótico.

- ✓ Se recomienda colocar patrones de comparación sensibles, parcialmente tolerantes y tolerantes como referencia para caracterizar los diferentes niveles de tolerancia a estrés abiótico en genotipos de frijol común.
- ✓ Para las determinaciones de fósforo inorgánico se recomienda cuantificar previamente el contenido endógeno de fósforo para cada genotipo y además se debe elegir un rango de temperaturas por debajo de 50 °C.
- ✓ Es recomendable correlacionar los resultados derivados de estas técnicas con las respuestas fenotípicas de las plantas estresadas en condiciones de campo para verificar su correspondencia.

- Abayome, Y. A. y Abidoye, T. O. (2009) Evaluation of cowpea genotypes for soil moisture stress tolerance under screen house conditions. *African J. Plant Science*. 3: 229-237.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. (2010) *Biología molecular da célula*: Artmed.
- Alfonso, C. A., Monedero, M., Hernández, S., Somoza, V. y Sánchez, L. (2000) Efecto de la compactación del suelo en la producción de frijol. *Agronomía Mesoamericana*. 11: 53-57.
- Aranda, L. (2000) Uso de marcadores moleculares SCAR para el mejoramiento de la resistencia al virus del mosaico dorado amarillo en frijol común.
- Ashraf, M. y Harris, P. (2004) Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science*. 166: 3-16.
- Bajji, M., Kinet, J.-M. y Lutts, S. (2002) The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regulation*. 36: 61-70.
- Barrios, A. N., Ritchie, J. y Smucker, A. J. (1998) El efecto de la sequia en el crecimiento, la fotosíntesis y la intercepción de luz en el frijol común. *Agronomía Mesoamericana*. 9: 01-08.
- Basra, S., Farooq, M., Tabassam, R. y Ahmad, N. (2005) Physiological and biochemical aspects of pre-sowing seed treatments in fine rice (*Oryza sativa* L.). *Seed Science and Technology*. 33: 623-628.
- Bastías, E., Alcaraz-López, C., Bonilla, I., Martínez-Ballesta, M. C., Bolaños, L. y Carvajal, M. (2010) Interactions between salinity and boron toxicity in tomato plants involve apoplastic calcium. *Journal of plant physiology*. 167: 54-60.
- Beaver, J. S., Godoy, G., Rosas, J. C. y Steadman, J. (2002) Estrategias para seleccionar frijol común con mayor resistencia a mustia hilachosa. *Agronomía Mesoamericana*. 13: 67-72.
- Beebe, S. E., Rao, I. M., Cajiao, C. y Grajales, M. (2008) Selection for drought resistance in common bean also improves yield in phosphorus limited and favorable environments. *Crop Science*. 48: 582-592.
- Beebe, S. E., Rao, I. M., Blair, M. W. y Acosta-Gallegos, J. A. (2013) Phenotyping common beans for adaptation to drought. *Frontiers in physiology*. 4.
- Benites, M. L. (2008) Características fenotípicas de líneas de frijol común tolerantes a la sequía ya la baja fertilidad.
- Benítez, R. (2011) Nuevas variedades de frijol común para la producción comercial en Cuba. Libro Resumen. 5to Encuentro Internacional de Arroz. In: *I er Simposio de Granos, Palacio de Convenciones de la Habana, del*. pp. 109-110.
- Betancourt, L. B., Rodríguez, L. M., Gómez, R. L. y Jiménez, J. S. B. (2008) Crecimiento y respuestas fisiológicas de *Phaseolus* spp. en condiciones de salinidad. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 31: 213-223.
- Bhatt, R. y Srinivasa, N. (2005) Influence of pod load on response of okra to water stress. *Indian journal of plant physiology*. 10: 54-59.
- Blum, A., Klueva, N. y Nguyen, H. (2001) Wheat cellular thermotolerance is related to yield under heat stress. *Euphytica*. 117: 117-123.
- Boicet, T. (2010) Estrés hídrico y la distribución de características vegetativas y reproductivas en el genotipos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L). In: *II Simposio de Ecofisiología Vegetal. Libro Resumen XVII Congreso Científico Internacional del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas*. pp. 145.
- Brauer, H. O. (1980) Genética aplicada: los conocimientos de la herencia vegetal al servicio de la humanidad.
- Bray, S. y Reid, D. M. (2002) The effect of salinity and CO₂ enrichment on the growth and anatomy of the second trifoliolate leaf of *Phaseolus vulgaris*. *Canadian Journal of Botany*. 80: 349-359.
- Broughton, W. J., Hernandez, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P. y Vanderleyden, J. (2003) Beans (*Phaseolus* spp.)—model food legumes. *Plant and soil*. 252: 55-128.
- Cabrera, M. (2011) Comportamiento de algunas variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L) bajo condiciones edafoclimáticas adversas. *Libro Resumen*. 5: 112.
- Campos, G., García, M. y Pérez, D. (2009) Efecto de la salinidad sobre el crecimiento en dos genotipos de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.), durante la fase plantular. In: *Memorias XVIII*

- Congreso Venezolano de Botánica. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. Barquisimeto. Venezuela.[Links].
- Celik, G. y Turhan, E. (2013) Genotypic variation in growth and physiological responses of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings to flooding. *African Journal of Biotechnology*. 10: 7372-7380.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical, P. d. F. p. I. z. A. (1991) Manual de recetas culinarias de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.).
- Chailloux, M., Hernández, G., Faure, B. y Caballero, R. (1996) Análisis y comentarios. Producción de frijol en Cuba: Situación actual y perspectiva inmediata *Agronomía Mesoamericana*. 7: 98-107.
- Chartzoulakis, K. y Klapaki, G. (2000) Response of two greenhouse pepper hybrids to NaCl salinity during different growth stages. *Scientia Horticulturae*. 86: 247-260.
- Chen, J., Spear, S. K., Huddleston, J. G. y Rogers, R. D. (2005) Polyethylene glycol and solutions of polyethylene glycol as green reaction media. *Green Chemistry*. 7: 64-82.
- Dantas, B. F., Ribeiro, L. d. S. y Aragão, C. A. (2007) Germinação, crescimento inicial e teor de proteína nos cotilédones de feijão em estresse salino. *Revista Brasileira de Sementes*. 29: 106-110.
- De Sousa, J. G., Giles, J. A. y Neto, M. B. (1984) Selection for water stress tolerance in upland cotton in the northeast of Brasil. *Tropical Agriculture*. 61: 2-4.
- Debouck, D. y Hidalgo, R. (1984) Morfología de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical
- Denbow, D. M., Ravindran, V., Kornegay, E. T., Yi, Z. y Hulet, R. M. (1995) Improving phosphorus availability in soybean meal for broilers by supplemental phytase. *Poultry Science*. 74: 1831-1842.
- Domínguez, A., Pérez, Y., Alemán, S., Sosa, M., Fuentes, L., Darías, R., Demey, J., Rea, R. y Sosa, D. (2014) Respuesta de cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. al estrés por sequía. *Bioteología Vegetal* 14: 29 - 36.
- El-Bassiouny, H. M. y Bekheta, M. (2005) Effect of salt stress on relative water content, lipid peroxidation, polyamines, amino acids and ethylene of two wheat cultivars. *Int. J. Agric. Biol.* 7: 363-368.
- El-Sharkawy, M. y Hesketh, J. (1965) Photosynthesis among species in relation to characteristics of leaf anatomy and CO₂ diffusion resistances. *Crop Sci.* 5: 517-552l.
- Emam, Y., Shekoofa, A., Salehi, F. y Jalali, A. (2010) Water stress effects on two common bean cultivars with contrasting growth habits. *Am-Eur J Agric Environ Sci*. 9: 495-499.
- Erice, G., Louahlia, S., Irigoyen, J. J., Sanchez-Diaz, M. y Avice, J.-C. (2010) Biomass partitioning, morphology and water status of four alfalfa genotypes submitted to progressive drought and subsequent recovery. *Journal of plant physiology*. 167: 114-120.
- FAOSTAT (2015) *Producción Mundial de Frijol*. [En línea] Disponible desde. [Consultado: 13/1/2015].
- Farquhar, G. D., Ehleringer, J. R. y Hubick, K. T. (1989) Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual review of plant biology*. 40: 503-537.
- Fernández de Córdova, F., Gepts, P. L. y López Genes, M. (1986) Etapas de desarrollo de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).
- Fougère, F., Le Rudulier, D. y Streeter, J. G. (1991) Effects of salt stress on amino acid, organic acid, and carbohydrate composition of roots, bacteroids, and cytosol of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant physiology*. 96: 1228-1236.
- García, A., Hernández, G. y Curbelo, S. (2009) Prácticas de manejo del frijol común en suelos forestales. *Agricultura orgánica*. 3.
- García, M., García, G. y Sanabria, M. (2010) Efecto de la salinidad sobre el crecimiento, daño oxidativo y concentración foliar de metabolitos secundarios en dos variedades de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.). *Interciencia*. 35: 840-846.
- Garzón, P. y García, M. (2011) Efecto del estrés por NaCl sobre la anatomía radical y foliar en dos genotipos de Frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Bioagro*. 23: 153-160.
- Gepts, P. y Debouck, D. (1991) Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Common beans: research for crop improvement*. 7-53.

- Ghillebert, R., Swinnen, E., De Snijder, P., Smets, B. y Winderickx, J. (2011) Differential roles for the low-affinity phosphate transporters Pho87 and Pho90 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 434: 243-251.
- Gómez, G. (2010) Indicadores de pH. (UNAM, F. d. Q., ed.).
- González, L. (2013) Aspectos generales sobre la tolerancia a la salinidad en las plantas cultivadas. *Cultivos tropicales.* 23: 27-37.
- Grammatikopoulos, G. y Manetas, Y. (1994) Direct absorption of water by hairy leaves of *Phlomis fruticosa* and its contribution to drought avoidance. *Canadian Journal of Botany.* 72: 1805-1811.
- Granados-Sánchez, D. y López, R. (1998) Adaptaciones y estrategias de las plantas de zonas áridas. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del ambiente.* 4: 169-178.
- Grattan, S., Hanson, B. y Salinity, S. (2006) Crop salt tolerance. *Agricultural salinity and drainage. Univ. of California Irrigation Program, Davis.* http://hos.ufl.edu/sites/default/files/faculty/gdliu/HansonGrattan2006_0.pdf (accessed 23 Nov. 2013). 15-22.
- Guía, Y. (1998) Evaluación y selección in vitro para la tolerancia a la sequía de la caña de azúcar. Tesis. CNIC. 45p.
- Gunton, J. y Evenson, J. (1980) Moisture stress in navy beans. I. Effect of withholding irrigation at different phenological stages on growth and yield. *Irrigation Science.* 2: 49-58.
- Hamidi, H. y Safarnejad, A. (2010) Effect of drought stress on alfalfa cultivars (*Medicago sativa* L.) in germination stage. *Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 8: 705-709.
- Houimli, S. I. M., Denden, M. y Mouhanded, B. D. (2010) Effects of 24-epibrassinolide on growth, chlorophyll, electrolyte leakage and proline by pepper plants under NaCl-stress. *EurAsia J BioSci.* 4: 96-104.
- Hubbard, K. E., Nishimura, N., Hitomi, K., Getzoff, E. D. y Schroeder, J. I. (2010) Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. *Genes & Development.* 24: 1695-1708.
- Ichi, J., Igbadun, H., Miko, S. y Samndi, A. (2013) Growth and Yield Response of Selected Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) Varieties to Irrigation Interval and Sowing Date.
- Jaleel, C. A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Al-Juburi, H. J., Somasundaram, R. y Panneerselvam, R. (2009) Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *Int. J. Agric. Biol.* 11: 100-105.
- Kabała, K., Kłobus, G. y Janicka-Russak, M. (2003) Nitrate transport across the tonoplast of *Cucumis sativus* L. root cells. *Journal of plant physiology.* 160: 523-530.
- Kaya, C., Higgs, D. y Kirnak, H. (2001) The effects of high salinity (NaCl) and supplementary phosphorus and potassium on physiology and nutrition development of spinach. *Bulg. J. plant physiol.* 27: 47-59.
- Kaymakanova, M. (2009) Effect of salinity on germination and seed physiology in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Biotechnology & Biotechnological Equipment.* 23: 326-329.
- Kerton, F. M. y Marriott, R. (2013) *Alternative solvents for green chemistry*: Royal Society of chemistry.
- Kitson, R. E. y Mellon, M. G. (1944) Colorimetric determination of phosphorus as molybdivanadophosphoric acid. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition.* 16: 379-383.
- Kumar, G., Purty, R. S., Sharma, M. P., Singla-Pareek, S. L. y Pareek, A. (2009) Physiological responses among Brassica species under salinity stress show strong correlation with transcript abundance for SOS pathway-related genes. *Journal of plant physiology.* 166: 507-520.
- Kumar, R., Chaudhary, P., Nimesh, S. y Chandra, R. (2006) Polyethylene glycol as a non-ionic liquid solvent for Michael addition reaction of amines to conjugated alkenes. *Green Chem.* 8: 356-358.
- Lei, M., Zhu, C., Liu, Y., Karthikeyan, A. S., Bressan, R. A., Raghothama, K. G. y Liu, D. (2011) Ethylene signalling is involved in regulation of phosphate starvation-induced gene expression and production of acid phosphatases and anthocyanin in *Arabidopsis*. *New Phytologist.* 189: 1084-1095.

- Li, Z., Bian, M., Wu, Z., Zhang, X., Yang, Q. y Huang, C. (2013) Isolation and drought-tolerant function analysis of ZmPti1-1, a homologue to Pti1, from maize (*Zea mays* L.). *African Journal of Biotechnology*. 10: 5327-5336.
- Link, W., Hocking, T. y Stoddard, F. (2007) Evaluation of physiological traits for improving drought tolerance in faba bean (*Vicia faba* L.). *Plant and Soil*. 292: 205-217.
- Liu, X. y Huang, B. (2000) Heat stress injury in relation to membrane lipid peroxidation in creeping bentgrass. *Crop Science*. 40: 503-510.
- Lorigados, S. M., Rosas-Sotomayor, J. C., Rocha, L. L. A., Pérez, R. O., Brito, M. P. y Labrada, H. R. (2006) Análisis molecular de la diversidad genética de frijol común manejada por campesinos en Cuba. *Agronomía Mesoamericana*. 17: 369-382.
- Lu, Z. y Neumann, P. M. (1999) Water stress inhibits hydraulic conductance and leaf growth in rice seedlings but not the transport of water via mercury-sensitive water channels in the root. *Plant Physiology*. 120: 143-152.
- Mahajan, S. y Tuteja, N. (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of biochemistry and biophysics*. 444: 139-158.
- Mansour, M. (2000) Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. *Biologia Plantarum*. 43: 491-500.
- Marcelis, L. y De Koning, A. (1995) Biomass partitioning in plants.
- Marcelis, L. F. M. (1994) Fruit growth and dry matter partitioning in cucumber. Landbouwniversiteit te Wageningen.
- Martínez-Ballesta, M., Martínez, V. y Carvajal, M. (2004) Osmotic adjustment, water relations and gas exchange in pepper plants grown under NaCl or KCl. *Environmental and Experimental Botany*. 52: 161-174.
- Martínez, J. P., BAGINSKY, C. y PINTO, M. (1999) Efecto del déficit hídrico en la anatomía foliar de seis cultivares de poroto *Phaseolus vulgaris*. *Revista Chilena de Historia Natural*. 72: 219-235.
- Michel, B. E. y Kaufmann, M. R. (1973) The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant physiology*. 51: 914-916.
- Mittler, R. (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in plant science*. 11: 15-19.
- Mohammadkhani, N. y Heidari, R. (2008) Water stress induced by polyethylene glycol 6000 and sodium chloride in two maize cultivars. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 92-97.
- Moraes, G. A. F. d., Menezes, N. L. d. y Pasqualli, L. L. (2005) Bean seed performance under different osmotic potentials. *Ciência Rural*. 35: 776-780.
- Munns, R. (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, cell & environment*. 25: 239-250.
- Munns, R. y Tester, M. (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 651-681.
- Muñoz Perea, C. G. y Singh, S. P. (1996) Estudio comparativo de fuentes de resistencia para la bacteriosis común disponibles en diferentes especies de *Phaseolus* y progreso genético a través de cruzamientos interespecíficos y piramidación de genes. Singh, Shree P; Voyses V., Oswaldo (eds.). *Taller de Mejoramiento de Frijol para el Siglo XXI: Bases para una Estrategia para América Latina (1996, Cali, Colombia)*. [Trabajos presentados].
- Naab, O. A. (2006) Apunte Teórico: Vacuolas y sustancias ergásticas. Cátedra de Biología.
- Nava, S. C., Ortiz, V. H. R. y Huerta, A. J. (2012) Uso de la termoestabilidad de la membrana celular para la estimación de la tolerancia al calor en maíz. *Interciencia*. 37: 921-926.
- Nava, S. C. (2013) Temperatura óptima y etapa fenológica para determinar la termoestabilidad de la membrana celular en maíz y frijol. *Phyton (Buenos Aires)*. 82: 249-254.
- Okon, J. (2013) Effect of Water Stress on Some Growth Aspects of Two Varieties of Cowpea, *Vigna unguiculata* (L.) Walp Fabaceae. *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci.* 2: 69-74.
- ONEI (2014) Producción agrícola por cultivos seleccionados de la agricultura no cañera. Sector estatal. www.one.cu: Anuario Estadístico de Cuba 2013. Edición 2014.
- Ospina, M. C. (2008) Montaje de curvas de calibración para análisis de gomas, fosfatos, sílice, azúcar y sulfitos por espectrofotometría UV-Visible en el Laboratorio de Aseguramiento de Calidad del Ingenio Pichichi SA.
- Passioura, J. (2002) Soil conditions and plant growth. *Plant, Cell & Environment*. 25: 311-318.

- Pastor-Corrales, M. (1985) Enfermedades del frijol causadas por hongos. *Frijol: Investigación y Producción. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia.* 169-196.
- Patrick, J. (1988) Assimilate partitioning in relation to crop productivity. *HortScience (USA)*.
- Pattanagul, W. y Madore, M. A. (1999) Water deficit effects on raffinose family oligosaccharide metabolism in *Coleus*. *Plant physiology.* 121: 987-993.
- Peleg, Z., Apse, M. P. y Blumwald, E. (2011) Engineering salinity and water-stress tolerance in crop plants: getting closer to the field. *Adv. Bot. Res.* 57: 405-443.
- Penichet, H., Cabrera, M., Pérez, C., Lago, E., Pérez, M. y Mendoza, M. (2006) Germinación de diferentes cultivares de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) bajo condiciones de sequía. www.actaf.co.cu/revistas/agrotecnia_05_2008/...1/DSEM57.pdf. Revista Agrotecnia de Cuba.
- Placencio, D. M. y Núñez, O. M. (2002) Búsqueda de genotipos de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) con resistencia al Quail pea mosaic virus. *Revista de la Facultad de Agronomía.* 19.
- Polania, J., Rao, I., Mejia, S., Beebe, S. y Cajiao, C. (2012) Características morfo-fisiológicas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) relacionadas con la adaptación a sequía= Morpho-physiological characteristics of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) related to drought adaptation.
- Polanía, J. A. y Palmira, S. (2011) Identificación de características morfofisiológicas asociadas a la adaptación a sequía para ser usadas como criterios de selección en mejoramiento de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).
- Rahman, H., Malik, S. A. y Saleem, M. (2004) Heat tolerance of upland cotton during the fruiting stage evaluated using cellular membrane thermostability. *Field Crops Research.* 85: 149-158.
- Rai, M. K., Kalia, R. K., Singha, R., Gangolaa, M. P. y Dhawana, A. K. (2010) Developing stress tolerant plants through in vitro selection. An overview of the recent progress.
- Rai, M. K., Kalia, R. K., Singh, R., Gangola, M. P. y Dhawan, A. (2011) Developing stress tolerant plants through in vitro selection—an overview of the recent progress. *Environmental and Experimental Botany.* 71: 89-98.
- Ramírez, J. C. R. y Rangel, I. B. E. U. (2011) El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. *Revista Fuente Año.* 3.
- Rao, I. M. (2001) Role of physiology in improving crop adaptation to abiotic stresses in the tropics: The case of common bean and tropical forages. *Handbook of plant and crop physiology.* 583-613.
- Rashidi, V. (2011) Drought effects on morphological traits of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes. *Annals of Biological Research.* 2.
- Rodríguez-Miranda, O. (2011) Evaluación de la reacción de cultivares y líneas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a bacteriosis común (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) e identificación de marcadores de interés para este carácter. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.
- Rodríguez, O., Faure, B., Benitez, R., Carballo, R. M. y Capote, J. (1999) Avances en el estudio de la resistencia a bacteriosis común del frijol en Cuba. *Agronomía Mesoamericana.* 10: 55-58.
- Rodríguez, O., Chaveco, O., Ortiz, R., Ponce, M., Ríos, H., Miranda, S., Días, O., Portelles, Y., Torres, R. y Cedeño, L. (2009) Evaluación del comportamiento de líneas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) resistentes a la sequía; en condiciones de riego y sin riego e incidencia de enfermedades. *Temas de Ciencia y Tecnología.* 13: 19-30.
- Samayoa López, L. F. (2010) Explotación de la nueva variación genética y mejora genética del complejo de *Phaseolus vulgaris* L.
- Sánchez-Blanco, M. J., Álvarez, S., Navarro, A. y Bañón, S. (2009) Changes in leaf water relations, gas exchange, growth and flowering quality in potted geranium plants irrigated with different water regimes. *Journal of plant physiology.* 166: 467-476.
- Schulze, E.-D., Beck, E. y Muller-Hohenstein, K. (2002) Stress Physiology. *Plant Ecology.* pp. 7-19. Germany.
- Shereen, A., Mumtaz, S., Raza, S., Khan, M. y Solangi, S. (2005) Salinity effects on seedling growth and yield components of different inbred rice lines. *Pak. J. Bot.* 37: 131-139.

- Singh, S. K. y Reddy, K. R. (2011) Regulation of photosynthesis, fluorescence, stomatal conductance and water-use efficiency of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) under drought. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 105: 40-50.
- Singh, S. P. (1996) Progreso, problemas y el futuro del mejoramiento de frijoles mesoamericanos y la mejora genética integrada. Singh, Shree P; Voysest V., Oswaldo (eds.). *Taller de Mejoramiento de Frijol para el Siglo XXI: Bases para una Estrategia para América Latina (1996, Cali, Colombia).[Trabajos presentados]*.
- Solorzano-Vega, E. (1994) El cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Univ. De Chapingo (Ed.), México*. 498pp.
- Sosa, L., Llanes, A., Reinoso, H., Reginato, M. y Luna, V. (2005) Osmotic and specific ion effects on the germination of *Prosopis strombulifera*. *Annals of botany*. 96: 261-267.
- Suárez, A. D., Hernández, Y. P., del Castillo, M. S., del Castillo, D. S. y Suárez, R. R. (2014) Efecto del estrés hídrico sobre la germinación de genotipos de frijol común en condiciones experimentales de sequía. *Avanzada Científica*. 17: 53-67.
- Tatar, Ö., Brueck, H., Gevrek, M. N. y Asch, F. (2010) Physiological responses of two Turkish rice (*Oryza sativa* L.) varieties to salinity. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 34: 451-459.
- Tawarayama, K., Horie, R., Saito, S., Wagatsuma, T., Saito, K. y Oikawa, A. (2014) Metabolite Profiling of Root Exudates of Common Bean under Phosphorus Deficiency. *Metabolites*. 4: 599-611.
- Tekalign, T. y Hammes, P. (2005) Growth and productivity of potato as influenced by cultivar and reproductive growth: I. Stomatal conductance, rate of transpiration, net photosynthesis, and dry matter production and allocation. *Scientia Horticulturae*. 105: 13-27.
- Thiam, M., Champion, A., Diouf, D. y Ourèye SY, M. (2013) NaCl effects on in vitro germination and growth of some senegalese cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cultivars. *ISRN Biotechnology*. 2013.
- Thiaw, S. y Hall, A. E. (2004) Comparison of selection for either leaf-electrolyte-leakage or pod set in enhancing heat tolerance and grain yield of cowpea. *Field crops research*. 86: 239-253.
- Torres, S., Vázquez, E., Hernández, B. y Morales, A. M. (1993) Determinación del grado de tolerancia a la sequía en sorgo. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.
- Torres, S. y Rodríguez, M. (2002) Manual de Prácticas de Fisiología Vegetal Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Cuba, pp. 19-22.
- Uriarte, A. (2003) Historia del clima de la Tierra. *Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco*.
- Valladares, C. A. (2010) Taxonomía y Botánica de los Cultivos de Grano. In: *Serie Lecturas Obligatorias: Taxonomía, Botánica y Fisiología de los cultivos de grano*. Universidad Nacional Autónoma de Honduras. Centro Universitario Regional del Litoral Atlántico. Departamento de producción vegetal
- Vieira, R. D., Tekrony, D. y Egli, D. (1992) Effect of drought and defoliation stress in the field on soybean seed germination and vigor. *Crop Science*. 32: 471-475.
- Vivanco, M., Zamar, M. y Sosa, M. (2011) Clave ilustrada para la identificación de larvas y adultos de trips (Insecta: Thysanoptera) presentes en el cultivo de poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) en Jujuy y Salta (Argentina).
- Watanabe, T., Ozaki, N., Iwashita, K., Fujii, T. y Iefuji, H. (2008) Breeding of wastewater treatment yeasts that accumulate high concentrations of phosphorus. *Applied microbiology and biotechnology*. 80: 331-338.
- White, J., Castillo, J. y Ehleringer, J. (1990) Associations between productivity, root growth and carbon isotope discrimination in *Phaseolus vulgaris* under water deficit. *Functional Plant Biology*. 17: 189-198.
- Wignarajah, K., Jennings, D. H. y Handley, J. F. (1975) The effect of salinity on growth of *Phaseolus vulgaris* L. II. Effect on internal solute concentration. *Annals of Botany*. 39: 1039-1055.
- Wong, N. y Nadeson, R. (1993) Water stress and leaf necrosis symptom of rambutan seedlings (*Nephelium lappaceum* Linn.). *MARDI Res. J.* . 21: 51-58.

- Wu, F., Bao, W., Li, F. y Wu, N. (2008) Effects of drought stress and N supply on the growth, biomass partitioning and water-use efficiency of *Sophora davidii* seedlings. *Environmental and Experimental Botany*. 63: 248-255.
- Wu, P., Ma, L., Hou, X., Wang, M., Wu, Y., Liu, F. y Deng, X. W. (2003) Phosphate starvation triggers distinct alterations of genome expression in *Arabidopsis* roots and leaves. *Plant Physiology*. 132: 1260-1271.
- Yang, X. J. y Finnegan, P. M. (2010) Regulation of phosphate starvation responses in higher plants. *Annals of botany*. 105: 513-526.
- Yin, C., Peng, Y., Zang, R., Zhu, Y. y Li, C. (2005) Adaptive responses of *Populus kangdingensis* to drought stress. *Physiologia Plantarum*. 123: 445-451.
- Zapata, M. (1996) Pathogenic variability of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Annual report*.
- Zeid, I. M. (2004) Response of bean (*Phaseolus vulgaris*) to exogenous putrescine treatment under salinity stress. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 7: 219-225.
- Zeng, L. y Shannon, M. C. (2000) Salinity effects on seedling growth and yield components of rice.
- Zhang, M., Duan, L., Zhai, Z., Li, J., Tian, X., Wang, B., He, Z. y Li, Z. (2004) Effects of plant growth regulators on water deficit-induced yield loss in soybean. In: *Proceedings of the 4th International Crop Science Congress, Brisbane, Australia*. pp. 252-256.
- Zhu, J.-K. (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual review of plant biology*. 53: 247.
- Zhu, J., Ingram, P. A., Benfey, P. N. y Elich, T. (2011) From lab to field, new approaches to phenotyping root system architecture. *Current opinion in plant biology*. 14: 310-317.