

UNIVERSIDAD DE MATANZAS

“CAMILO CIENFUEGOS”

FACULTAD DE AGRONOMÍA



MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

Mención Sistemas Agroecológicos y Sostenibles de producción

Tesis presentada en opción al título de Máster en Ciencias Agrícolas



*Estudio Morfofisiológico y Bioquímico de cinco variedades cubanas de *Phaseolus vulgaris*, L., bajo condiciones de estrés hídrico*

Autora: Ing. Nelly Marlene Mita Poma

Tutora: Dr. C. Amalia Domínguez Suárez

Año 2012
Matanzas - Cuba

NOTA DE ACEPTACIÓN



Miembro tribunal

Miembro tribunal

Miembro tribunal

Miembro tribunal

Evaluación

PENSAMIENTO

“El mal manejo de los recursos naturales y en especial el agua por parte de las diferentes sociedades impedirá el posible desarrollo de los países”.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo investigativo a quienes son mi fuente de inspiración, que con amor, dedicación y apoyo han sabido guiarme en la vida, por ser mi luz y guía donde quiera que estén espero se sientan orgullosos de mí.

- A mis padres Natalio y Catalina que con su ejemplo y exigencias lograron inculcarme a la superación, por su plena confianza en todos los pasos y decisiones importantes que he tomado en la vida.
- A mis hermanos Raúl, Eliana, Vilma, Winston y Eloy por el apoyo que me dieron durante estos años.
- A mis sobrinas Nadia, Liz, Fanny, Mariela y Natalia.
- A Tariq Muhammad, por su afecto constante, apoyo incondicional, quien estuvo en los momentos de alegría, tristeza y por ser una gran persona.
- A mi familia en general por brindarme su apoyo y ayudarme a encontrar mi camino.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no habría sido posible sin la generosa contribución de muchas personas. Quisiera expresar mis más sinceros agradecimientos.

- A Dios, mi proveedor, por ser fiel compañero, y por todo lo que me ha dado en la vida.
- A la Revolución cubana que ha hecho posible mi formación académica.
- A mi tutora Dr. C. Amalia Domínguez Suárez, por su conocimiento categórico, por su asesoría, atención, por su especial dedicación, ejecución, ayuda incondicional durante la preparación, organización y orientación en la realización de este trabajo de tesis. Por ello la estaré eternamente agradecida.
- A la Empresa Provincial de Semillas de Matanzas, Cuba, por habernos suministrado las semillas para este trabajo y al Instituto de Estudios Avanzados (IDEA) de Venezuela, por su valiosa colaboración.
- A Dr. C. Penélope García de la universidad de León, España por la colaboración en los estudios Inmunohistoquímicas.
- A la Ing. Yordany Martínez Dávalos por su ayuda, dedicación desde el primer momento del montaje del experimento, gracias por su paciencia, todo lo cual quiero darle mis sinceros agradecimientos.
- Al colectivo de profesores de la facultad de Agronomía que durante años contribuyeron a mi formación profesional y a todos los profesores del Centro de Estudios Biotecnológicos de la UMCC., y en particular a los profesores: Roberto Domech, Silvia Alemán y a Yunel Pérez, por su ayuda incondicional en la realización de este trabajo investigativo.
- A todos mis compañeros de la Maestría que durante el transcurso de estos años me han brindado su amistad.
- A mi amiga Silvia Villalobos por el apoyo y ayuda que me ha brindado, en algunos momentos.
- También quiero agradecer la inestimable ayuda de mi compañero de aula Osvaldo el cual me ha brindado su colaboración para el montaje del experimento.
- Agradecer la valiosa ayuda a los compañeros del orgapónico de la Universidad de Matanzas, los cuales me ofrecieron su apoyo en el montaje del experimento.
- A todas aquellas amistades y personas que he conocido en Cuba, que me brindaron su cariño y apoyo durante estos años.

“A todos muchas Gracias”.

RESUMEN

RESUMEN

En este trabajo se estudia la respuesta a estrés hídrico de cinco variedades de *Phaseolus vulgaris*, L., comercializadas en Cuba provenientes de la Empresa Provincial de Semillas de Matanzas. Se utilizó un diseño de Bloque al Azar con tres réplicas. Se realizaron dos experimentos en condiciones de sequía: en el primero las semillas de frijol fueron puestas a germinar en concentraciones de 0, 10, 15 y 20% de polietilenglicol (PEG) 8000. Se evaluó porcentaje de germinación, longitud y masa fresca del tallo y la raíz, presencia de hojas verdaderas y estudios histoquímicos de la raíz a los 7 y 15 días de sembradas. En el segundo experimento se sembró en vasos con diferentes niveles de humedad (70%, 40% y 20% de la capacidad de campo). Se evaluaron indicadores morfofisiológicos y bioquímicos como: índice estomático, anatomía del mesófilo y epidermis, área foliar, potencial osmótico, CRA, contenido total de clorofila, fenoles, prolina y la actividad catalasas y peroxidasas. Se obtuvo como resultado que: las semillas germinadas al 15 y 20% de PEG presentaron menor porcentaje de germinación en todas las variedades excepto en Bolita 42. La mayor afectación se apreció en el desarrollo del epicótilo y de hojas verdaderas. La relación longitud de la raíz / tallo aumentó con el estrés. A partir de los 15 días de aplicar los riegos mencionados, se pudo constatar algunos cambios morfofisiológicos y bioquímicos. En las variedades tolerantes no se observaron cambios en la estructura del mesófilo, no así en aquella variedad susceptible (CC 25-9 negro). Además, en esta cambió la anatomía de las células estomáticas y típicas. Los valores de CRA en la variedad susceptible a estrés hídrico se redujeron significativamente a 20% CC, así como en el contenido de clorofila total y el contenido total de fenoles, mientras que el contenido de la prolina libre fue significativamente más elevado en las hojas estresadas. La actividad catalasas disminuyó en las hojas de las plantas con déficit hídrico, a diferencia de la actividad peroxidasas que se incrementó, excepto en la variedad CC 25-9 colorado que es una de las tolerantes. Se concluye que las variedades cubanas que tuvieron un comportamiento más tolerante al estrés hídrico en las condiciones experimentales fueron la Bolita 42, CC 25-9 colorado y BAT 58 y la más susceptible la CC 25-9 negro.

ÍNDICE

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. Novedad científica y originalidad	3
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1. Importancia del frijol.....	4
3.2. Situación del frijol en el Mundo y Cuba.....	6
3.3. Estrés hídrico.....	8
3.4. Conceptos de estrés hídrico, déficit hídrico y sequía.....	8
3.5. Respuestas de las plantas al estrés hídrico.....	12
3.6. El efecto del estrés hídrico en la germinación, crecimiento y desarrollo de las plantas	18
3.7. El efecto del estrés hídrico en frijol (<i>Phaseolus Vulgaris</i> , L.).....	22
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
5.1. Experimento 1. Estudios de la etapa de germinación en condiciones de sequía con PEG.....	33
5.2. Experimento 2. Estudios de la etapa de crecimiento.....	41
6. CONCLUSIONES	58
7. RECOMENDACIONES.....	59
8. BIBLIOGRAFÍA.....	60

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*, L.) constituye una de las principales fuentes de alimentación por su contenido en proteínas y calorías. En países del primer mundo los beneficios nutricionales de los frijoles son reconocidos por diversas organizaciones como alimentos saludables que ayudan a contrarrestar enfermedades del corazón, el cáncer y la diabetes (Hangen y Bennink, 2003). Las leguminosas tienen un importante papel en la alimentación tanto del hombre como de los animales, pero son varios los factores que influyen negativamente sobre su cultivo, entre ellos la sequía (Phillip y col., 2006; Moussa y col., 2008), debido a que influye sobre un grupo numeroso de procesos morfofisiológicos y bioquímicos importantes, tales como: la fotosíntesis, la respiración, el metabolismo de los carbohidratos y de los nutrientes, la entrada de iones a la planta y la síntesis de promotores del crecimiento (Jaleel y col., 2008a; Farooq y col., 2008).

Recientemente se estimó que la sequía es la causante del 60% de las hambrunas y subnutrición a nivel mundial, especialmente en las zonas rurales donde la población depende de la agricultura local para obtener tanto alimentos como ingresos (FAO, 2003 y EROSKI CONSUMER, 2011). Mejorar la productividad agrícola, con políticas adecuadas de apoyo a la producción y preservación del medio ambiente e incrementar la producción de semilla, utilizando herramientas biotecnológicas para la obtención de cultivares tolerantes, suelos ácidos, a estrés hídrico, y otros factores medioambientales que afectan la productividad de dichos cultivos, ayudaría a solucionar este problema mundial (Quecini y col., 2002), que cada vez se hace más crítico, ya que como consecuencia de los cambios climáticos disminuirán la disponibilidad de agua y por tanto la posibilidad de riego.

La respuesta fisiológica de las plantas al estrés abiótico es multigénica, ya que varios procesos vinculados a los mecanismos de tolerancia se ven afectados, por ejemplo: la producción de compuestos osmóticamente activos, como la prolina, la producción de especies reactivas del oxígeno y los mecanismos de defensa antioxidante (Sairam y Tyagi, 2004), así como mecanismos que implican las modificaciones morfológicas (García, 2005). Si se acepta, que la interacción genotipo-ambiente produce un fenotipo que tendrá una función determinada, por lo tanto, cualquier variación de las condiciones ambientales puede afectar tanto a la estructura como a la función (González, 2007,

2008). Es por ello que resulta de gran interés abordar tanto los aspectos morfofisiológicos como bioquímicos en los estudios de respuesta a estrés hídrico.

Teniendo en cuenta que en el mundo gran parte del cultivo de leguminosas se desarrolla en zonas de secano, es necesario, sino imprescindible, contar con materiales tolerantes o resistentes a estrés hídrico así como también adecuar el manejo del cultivo para ofrecer condiciones de crecimiento y desarrollo que reduzcan al mínimo la incidencia de la falta de humedad de los suelos. Mayores niveles de tolerancia al calor podrían permitir el cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris*, L.) durante el verano, cuando los patrones de precipitación son más favorables. En este sentido, el desarrollo de nuevos cultivares con mejores rendimientos bajo condiciones de estrés es todo un desafío. La disponibilidad de semillas de buena calidad, provenientes de variedades mejoradas, permitirá elevar la producción agrícola, tanto en las mejores tierras agrícolas como en aquellas áreas menos favorecidas.

Por lo antes expuesto el **Problema Científico** de la investigación lo constituye la necesidad de identificar y obtener variedades más adaptadas y tolerantes al estrés abiótico (sequía), ya que en América Latina el frijol común (*Phaseolus vulgaris*, L.), ha sido plantado tradicionalmente, encontrándose entre los cultivares más importantes no sólo por su alto valor nutricional sino también por su elevado consumo en la población, pero son varios los factores que influyen negativamente sobre su cultivo, dentro de ellos la sequía, la cual se incrementa cada vez más como consecuencia del cambio climático.

Tomando en consideración el problema planteado el presente trabajo se apoyó en la siguiente **Hipótesis Científica**:

La evaluación de indicadores morfológicos, fisiológicos y bioquímicos, en variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*, L.), bajo condiciones experimentales de sequía, permitirá identificar variedades tolerantes a estrés hídrico (ausencia de sistema de riego y lluvias insuficientes).

Para dar cumplimiento al problema planteado nos proponemos cumplir los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del estrés hídrico sobre las propiedades morfológicas, fisiológicas y bioquímicas en cinco variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*, L.).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar indicadores morfofisiológicos y bioquímicos del estrés hídrico en variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*, L.) durante la etapa de germinación y de crecimiento.
- Clasificar las variedades en estudio de acuerdo a su respuesta al estrés hídrico en condiciones experimentales.

2. Novedad Científica y originalidad

Este trabajo constituye un aporte científico valioso para futuros trabajos en condiciones controlada y de campo, por lo que resultará de interés para investigadores, productores y estudiantes del sector agrícola, en el estudio de la respuesta del frijol al déficit de agua, teniendo en cuenta que las afectaciones por el cambio climático han repercutido negativamente sobre este recurso, y si las previsiones sobre las afectaciones del clima se cumplen, el problema será aún más grave en los próximos años, por lo que este es un tema de extraordinaria importancia y vigencia en todos los tiempos.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3. 1. Importancia del cultivo del frijol

La especie *Phaseolus vulgaris*, (L.) o frijol común, es originaria del área México-Guatemala ya que en estos países se encuentra una gran diversidad de variedades tanto en forma silvestre como en forma de cultivo (EcuRed, 2011). Esta es la especie más conocida del género *Phaseolus* de la familia *Fabaceae*, con unas cincuenta especies de plantas, todas nativas de América. Se cultiva en todo el mundo. El frijol común (*Phaseolus vulgaris*, L.) constituye la leguminosa que ha sido objeto de más estudios en América Latina, por ser la fuente principal de proteína, así como por formar parte importante de los hábitos alimentarios de la población (Expósito y García, 2011). Existen numerosas variedades y de ellas se consumen tanto las vainas verdes como los granos secos (Chazan, 2008).

El frijol común *Phaseolus vulgaris*, (L.) conocido también como alubia frijol, alubia de riñón, judía, poroto y caraota, es un cultivo de gran importancia para la alimentación humana por el elevado contenido de nutrientes que posee. En América Latina es un componente esencial de la dieta, ya que es una fuente importante de proteínas, sobre todo para las familias pobres que tienen limitaciones para adquirir o producir proteína animal, especialmente en países en vías de desarrollo (Broughton y col., 2003; Phillip y col., 2006; Rao, 2002), por lo que constituye la leguminosa que ha sido objeto de más estudios en esta región (Beebe y col., 2008).

Se consumen las vainas frescas o tiernas y también sus granos secos. Las semillas de este cultivo poseen propiedades como la de perder rápidamente la humedad una vez maduras, pudiéndose almacenar sin mayores dificultades ya que sus tegumentos son bastante impermeables. Además, presentan un elevado contenido de vitaminas (Tiamina y Rivo flavina) y minerales (Socorro y Martín, 1998).

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*, L.) es la leguminosa más importante para la alimentación humana en el mundo. En Centro América, África Oriental y África Occidental, la mayor parte del frijol es producido por pequeños agricultores, bajo condiciones limitantes como la sequía, la baja fertilidad de los suelos (Román, 2009) y con mínimos insumos (Beebe y col., 2008).

Se conoce que el frijol pertenece a la clase *Dicotyledoneae*, familia *Fabaceae*, género *Phaseolus* y especie *Phaseolus vulgaris*, Lin. siendo de muy amplia utilización en todos los hogares cubanos, sin distinción de color, forma o tamaño del grano (Mederos y Reynaldo, 2007).

Según (Wikipedia, 2012), los frijoles poseen un alto contenido en proteína y en fibra, siendo así mismo una fuente excelente de minerales. Su contenido nutricional promedio por cada 100 gramos de alimento crudo en peso neto es el siguiente:

Componente nutricional	por cada 100 g
Carbohidratos	61,5 g
• Fibra alimentaria	4,3 g
Grasas	1,8 g
• Saturadas	0,12 g
• Monoinsaturadas	0,06 g
• Poliinsaturadas	0,18 g
Proteínas	19,2 g
Agua	7,9 g
Vitaminas	
Vitamina A	1,0 µg (0%)
Tiamina (Vit. B1)	0,62 mg (48%)
Riboflavina (Vit. B2)	0,14 mg (9%)
Niacina (Vit. B3)	1,7 mg (11%)
Vitamina B6	0,4 mg (31%)
Ácido fólico (Vit. B9)	394 µg (99%)
Minerales	
Calcio	228 mg (23%)
Magnesio	140 mg (38%)
Fósforo	407 mg (58%)
Potasio	1406 mg (30%)
Sodio	24 mg (2%)
Zinc	2,79 mg (28%)

Las semillas de frijol además de tener un valor energético elevado, sus proteínas presentan aminoácidos esenciales, de ahí su interés nutricional, ya que en *P. vulgaris* se puede encontrar la isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, metionina, triptófano, entre otras en cantidades moderadas. Aunque la utilidad primordial de las *fabaceas* de grano reside en el empleo de sus semillas en la alimentación, estas plantas tienen también múltiples empleos en la agricultura, por ejemplo, como abono verde, forraje y ensilado.

También tienen la propiedad de enriquecer el nitrógeno del suelo donde se cultivan, merced a la simbiosis con bacterias fijadoras de ese elemento, lo que aumenta considerablemente la utilidad de este cultivo (Socorro y Martín, 1998).

Según Castañeda (2000), este cultivo presenta propiedades comestibles que avalan su importancia económica, ecológica y médica. A continuación presentamos algunas de ellas:

- Se cultiva en la costa, sierra y selva.
- Presencia importante en la canasta básica familiar por su alto contenido de proteínas, carbohidratos y minerales.
- Mejora los suelos incorporando el nitrógeno atmosférico fijado por simbiosis con bacterias del género *Rhizobium*.
- Sus granos contienen proteínas (22% - 28%), vitaminas, minerales y fibras solubles (pectinas); los cuales poseen efectos en la prevención de enfermedades del corazón, obesidad y tubo digestivo. Es por ello que importantes instituciones médicas a nivel mundial vienen promoviendo su consumo, convirtiéndolo en un producto comercialmente atractivo.
- La amplia adaptabilidad de algunas variedades facilita la producción durante todo el año, con lo cual es posible aprovechar las ventanas comerciales de mejores precios. En el mercado externo se negocia en base a clases comerciales, sujetas a estándares de calidad.

3. 2. Situación del frijol en el Mundo y en Cuba.

Se tienen 180 especies del género *Phaseolus*, de los cuales aproximadamente 126 provienen del continente Americano, 54 del Sur de Asia y Oriente de África, 2 de Australia y tan solo 1 de Europa. En Latinoamérica constituye uno de los alimentos básicos y son apreciados por todos los grupos sociales, formando parte de numerosos platos típicos de gran consumo (EcuRed, 2011).

Su producción abarca áreas agroecológicas diversas. Esta leguminosa se cultiva prácticamente en todo el mundo, siendo América Latina la zona de mayor producción y consumo, se estima que más del 45 % de la producción mundial total proviene de esta región (Voysest, 2000).

Es un alimento básico en la dieta en países del Caribe, como Cuba, Haití, y la República Dominicana. En esta región se cultivan unas 212 mil hectáreas anuales (Beaver y Molina, 1996; Morales, 1997), pero a pesar de ello el área mundial ocupada por este cultivo no es muy elevada. Se destaca, que la mayor área y la mayor producción están concentradas en los países subdesarrollados o en vías de desarrollo, como es el caso del continente asiático y de latinoamérica. En esta última área se concentra aproximadamente el 35% de la producción mundial. Entre América Latina, África y Asia se genera el 77% de la producción mundial (Socorro y Martín, 1998).

En países desarrollados, este grano básico constituye un cultivo de alta tecnología y un producto de exportación, que representa el 23% de la producción mundial (Rosas, 1998).

A pesar de que el frijol es un alimento de primera necesidad en Centro América y en otras regiones en el mundo, el potencial productivo del cultivo no es explotado porque la mayor parte de la producción se lleva a cabo en terrenos de laderas con pendientes extremas, suelos pobres en nutrientes y limitaciones causadas por factores bióticos y abióticos. Bajo estas condiciones, la sequía y la baja fertilidad son los factores abióticos más importantes, ya que la falta de riego para corregir la insuficiencia de las lluvias y la escasa disponibilidad de fertilizantes afectan la productividad del cultivo, debido a que la mayoría son manejados por pequeños productores de escasos recursos (Rosas y col., 2004).

Los rendimientos mundiales se comportan en 1.4 t.ha^{-1} , logrando buenos rendimientos Puerto Rico, Alemania, Libia y Grecia, siendo los mayores productores Brasil y EE.UU, mientras que en nuestro país solo se alcanza menos de 1 t.ha^{-1} como promedio, y se invierten anualmente más de 32 800 000 dólares en la compra de alrededor de 140 000 t/m de granos (Expósito y García, 2011).

El cultivo del frijol en Cuba ha sido durante muchos años una práctica común del campesinado, cuya producción estaba encaminada a satisfacer las necesidades del país. Actualmente la producción es insuficiente como resultado de la elevación del nivel de vida de la población. Durante varios años la producción de frijoles ha estado limitada a la pequeña producción del agricultor privado, por lo que el estado ha tenido

que invertir grandes cantidades de divisas en la importación de este popular alimento para el consumo de la población (Expósito y García, 2011).

Las provincias de Matanzas, Pinar del Río, Holguín, Camagüey y Sancti Spíritus ocupan los primeros lugares en el país en cuanto a áreas cultivadas. La zona de Velasco, en Holguín, es la mayor perspectiva en su cultivo, debido a la tradición y a las condiciones naturales. El consumo de los diferentes tipos de frijol en el país son: Frijoles negros 85,34%, Frijoles colorados 6,52% y Otros tipos 8,14% (Loforte, 2007).

La isla gasta más de 1.500 millones de dólares anuales en importar el 80% de lo que consume. Fuentes del sector agrícola justifican el bajo rendimiento de este región como resultado de la falta de fertilizantes, los efectos de la sequía y problemas de organización y productividad (González, 2010).

En la actualidad, en Cuba se trabaja con el objetivo de mejorar la calidad en el cultivo de frijol, generalmente se pretende lograr un desarrollo de la tecnología, de forma tal que permita aumentar los rendimientos y la producción de un germoplasma mejorado con alta resistencia a las plagas que afectan de manera particular a estos cultivos y las condiciones adversas del medio. Todo ello va unido al uso racional de la tierra, del agua y de los recursos asignados, así como de los suelos más apropiados para este cultivo, estableciendo sobre todo, un método eficaz de rotación de cultivos (Mederos y Reynaldo, 2007).

3.3. Estrés hídrico

3. 4. Conceptos de estrés hídrico, déficit hídrico y sequía

El estrés hídrico incluye en realidad dos tipos de estrés contrapuestos: por déficit o por exceso de agua en el suelo.

El término “**sequía**” denota en muchos casos baja disponibilidad hídrica, alta temperatura y alta irradiación (Tambussi, 2004).

Según algunos autores, sequía es un concepto de tipo meteorológico más que fisiológico, ya que se refiere a un período en el cual las precipitaciones no compensan el agua perdida por evapotranspiración (Passioura, 1996).

Sin embargo, a pesar de las consideraciones anteriores, sequía y estrés hídrico son términos usados a menudo indistintamente en numerosos trabajos. Algunos autores utilizan el término “**déficit hídrico**” (es decir, transpiración superando la absorción de agua) como un componente de otro tipo de estrés, ya que la falta de agua puede observarse tanto en situaciones de sequía, como frente a salinidad y bajas temperaturas (Bray, 1997).

Entre los factores abióticos, el estrés por déficit hídrico es considerado uno de los más relevantes, tanto desde una perspectiva ecológica como agronómica, respecto a los cultivos, aunque ha sido señalado que no siempre es el factor central. Está claro que el déficit hídrico es el principal factor abiótico que limita el rendimiento de la mayoría de los cultivos (Terán y Singh, 2002).

El estrés hídrico se produce, según el Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA, 2000) cuando la demanda de agua excede la cantidad disponible durante un periodo determinado de tiempo o cuando su uso se ve restringido por su baja calidad o porque se produce un deterioro de los recursos de agua destinada al consumo tanto en cantidad (sobreexplotación de los acuíferos, ríos secos, entre otras) como en calidad (eutrofización, contaminación de la materia orgánica, intrusión salina, entre otras). Además, la falta de agua puede interactuar con otros factores como altas temperaturas y altas irradiaciones.

Según EROSKI CONSUMER (2011), gran parte del mundo registra un elevado riesgo de sufrir un deterioro de la cantidad y calidad del agua. El agua está cada vez más escasa, su consumo aumenta y su cantidad y calidad disminuye. La Unión Europea alerta de esta peligrosa conjunción que afecta a gran parte de los europeos, y especialmente en España. Y si las previsiones del cambio climático se cumplen, el problema será aún más grave en los próximos años limitando cada vez más el agua disponible para los cultivos. Por ello, los expertos recomiendan un uso más responsable y eficiente de este recurso (Fernández, 2008).

En el año 2025 más de 3.000 millones de personas podrían estar viviendo en países que sufren estrés de agua, y alrededor de 14 países sufrirán escasez de agua (Rey y col., 2006).

La agricultura utiliza alrededor del 76% del agua total colectada, incrementándose en los últimos años el déficit de los recursos hídricos como consecuencia del cambio climático, y se pronostica un empeoramiento de este problema. El informe de la Agencia Europea de Medio Ambiente (AEMA) asegura que el calentamiento global producirá menos lluvias, más intermitentes y un aumento de las temperaturas, lo que acentuará la evaporación. La demanda para la agricultura crecerá cada vez más, y se desarrollará una competencia por este recurso entre los distintos sectores: turismo, producción de energía, usos de la población, ganadería, entre otras (EROSKI CONSUMER, 2011).

Además de los problemas de escasez de agua, el cambio climático provocará también lluvias más violentas, y por tanto, más inundaciones y crecidas de los ríos, lo que complicará aún más su aprovechamiento. En este sentido, en 2030 un 65% de la población española padecerá estrés hídrico, según el presidente del Comité Internacional de Grandes Presas (ICOLD), Luis Berga. Este experto asegura que en la actualidad un 36% de la población ya lo padece, y que por lo tanto, en dicha fecha casi se duplicará. En definitiva, los expertos subrayan que la escasez de agua va a ser uno de los grandes problemas del siglo XXI que repercutirá en la producción agrícola. Por ello, cada vez más voces reclaman una nueva cultura del agua que permita entre todos la gestión sostenible de este valioso recurso (EROSKI CONSUMER, 2011).

Las proyecciones actuales indican que la demanda se incrementará un 20% más en el año 2030, por lo que se incrementará el estrés hídrico afectando la calidad de los productos agrícolas, teniendo como consecuencia que la producción proveniente de la agricultura de secano, medio de sustento de la mayoría de las personas más pobres del mundo, enfrentará riesgos muy graves en muchas regiones del mundo (Watkins, 2006). También habrá un aumento del índice de eventos extremos que se manifestarán como sequías e inundaciones, los cuales agravarán los riesgos que enfrentan las personas en países que cuentan con infraestructura limitada para proporcionar apoyo a la adaptación (Afrol News, 2006).

A pesar de que la demanda de agua en los diferentes sectores en el mundo ha crecido de forma espectacular en el siglo XX, la agricultura todavía utiliza la mayor parte. En los países en desarrollo, la agricultura aún representa más del 80% del consumo de agua. (Abderrahman, 2002; Watkins, 2006).

En un futuro se debe producir una redistribución del agua desde la agricultura hacia la industria y otros sectores. Las proyecciones señalan que la proporción en que los cultivos de regadío utilizan el agua mundial sufrirá una caída constante hasta alcanzar aproximadamente el 75% del total en el año 2025. En algunas partes de Asia Meridional la participación de usuarios no agrícolas en el uso de agua aumentará, de menos del 5% actual, a más del 25% en el año 2050 (Watkins, 2006), por lo que cabe preguntarse ¿de qué manera alimentará el mundo a otros 2.400 millones de personas en el año 2050?, si tenemos en cuenta que los recursos hídricos ya presentan un marcado déficit. Un peligro evidente es que salgan perdiendo aquellas personas cuyo medio de sustento depende de la agricultura, pero que no cuentan con derechos establecidos, poder económico ni voz política (Araral, 2005). La productividad de los cultivos de granos aumentará en los países desarrollados mientras que disminuirá en muchos países en desarrollo. Aquí también el impacto de una dependencia cada vez mayor por importaciones de alimentos tiene implicaciones potencialmente adversas para la seguridad de los alimentos en muchos países (Watkins, 2006).

Si bien algunas ciudades se enfrentan con los problemas del déficit de agua, es la agricultura el sector que deberá hacer frente al verdadero desafío. Las personas tienen una necesidad básica mínima de agua de entre 20 y 50 litros por día. Comparemos esta cifra con los 3.500 litros necesarios para producir los alimentos que permitan obtener el mínimo diario de 3.000 calorías (producir alimento suficiente para una familia de cuatro integrantes requiere una cantidad de agua tal que llenaría una piscina de natación olímpica). En otras palabras, para producir alimentos se requiere una cantidad de agua que es aproximadamente 70 veces superior que la que las personas usan para fines domésticos. El cultivo de un solo kilo de arroz requiere entre 2.000 y 5.000 litros de agua. Pero algunos alimentos necesitan para ser producidos más agua que otros. Por ejemplo, se necesita una cantidad de agua ocho veces mayor para cultivar una tonelada de azúcar que una tonelada de trigo. La producción de una sola hamburguesa demanda alrededor de 11.000 litros, aproximadamente la cantidad diaria disponible para 500 personas que viven en un barrio pobre urbano con viviendas sin conexión a la red de abastecimiento de agua. A la vez, el crecimiento demográfico y del nivel de ingresos dará mayor impulso a la demanda de agua de riego para satisfacer los requerimientos de producción de alimento (Ballabh, 2005).

El cambio climático incrementará con implicancias significativas para la producción agropecuaria. La susceptibilidad a las sequías y a las inundaciones aumentará con el tiempo. El aumento del nivel del mar reducirá la disponibilidad de agua dulce, y ello afectará a millones de personas que se encuentran en países a baja altura y en los deltas de los ríos. Para una gran parte de las personas del mundo que se encuentran en países en desarrollo, las proyecciones relativas al cambio climático indican medios de sustento menos seguros, mayor vulnerabilidad al hambre y la pobreza, acentuación de las desigualdades sociales y mayor degradación medioambiental (Watkins, 2006).

El cambio climático, traerá consigo implicaciones negativas para la producción agropecuaria, no será una catástrofe aislada, sino de un desastre que se revela lentamente. El peligroso cambio climático ya es inevitable, se ha sobrepasado el límite, disminuyendo la posibilidad de retorno. La forma en que responda la comunidad internacional determinará las perspectivas de desarrollo humano para las generaciones presentes y futuras. Una prioridad inmediata es trazar estrategias para mitigar el cambio climático y lograr cultivos adaptados a las transformaciones inevitables (Watkins, 2006; Banco Mundial, 2006).

3. 5. Respuestas de las plantas al estrés hídrico

El estrés de sequía ocurre cuando se reduce el agua disponible del suelo, y las condiciones atmosféricas ocasionan una pérdida continua de agua por transpiración y evaporación. Este ejerce efectos profundos sobre el crecimiento, el rendimiento y la calidad de la planta. El primer efecto es la pérdida de turgencia, la que afecta la elongación del tallo, la expansión foliar, la apertura estomática y finalmente un decremento en la tasa de crecimiento. Ocurren algunos cambios fisiológicos en la planta como respuesta a la sequía, por ejemplo: un incremento en los niveles de ácido abscísico, el cierre de estomas y cambios en la osmolaridad celular (Rodríguez y col., 2003).

La pared celular primaria y la lámina media tienen gran importancia en el proceso de extensión o expansión celular, ya que constituyen la única estructura extracitoplasmática de las células que conservan la capacidad de dividirse y/o elongarse. Generalmente, las células que han perdido la capacidad de elongarse y/o

dividirse depositan en la cara interna de la pared nuevas capas de material, cuya composición depende del tipo concreto de elemento celular, y en las que como norma general, aparecen nuevos materiales como lignina o suberina y se modifica la proporción de los componentes de la pared celular primaria y la lámina media (Singh y col., 2009). Estas modificaciones originan una estructura multicapa de mayor espesor y ordenación más orientada de las microfibrillas de celulosa denominada pared celular secundaria. Se pueden diferenciar dos tipos principales de pared celular primaria: la pared celular tipo I, que es la existente en las dicotiledóneas y algunas monocotiledóneas, contiene proporciones semejantes de celulosa y xiloglucanos (XG), siendo estos últimos los polisacáridos que se unen a las microfibrillas de celulosa y que fijan la posición de éstas, determinando la distancia entre ellas. En cambio, en la pared celular tipo II, presente en algunas monocotiledóneas, los glucuronoarabinosilanos (GAX) son los principales polímeros que se unen a las microfibrillas de celulosa. La pared tipo I, es la que está presente en la especie (*Phaseolus vulgaris*) (García, 2005).

En general la pared celular de tipo I está formada por entramados diferentes: una red de celulosa-hemicelulosas embebida en una matriz de polisacáridos pécticos, y una red de proteínas que se entrelaza con las otras dos para reforzar la estructura. Dentro de esta configuración el agua representa aproximadamente el 65% y está localizada preferentemente en la matriz péctica, donde tiene gran importancia en la formación de geles (Willats y col., 2002). Otros polisacáridos que forman parte de la pared, están compuestos en su mayor parte por azúcares neutros como arabinanos, galactanos y arabinogalactanos (AG) altamente ramificados, de varios tamaños y configuraciones, se unen a los restos de L-ramnosa del ramnogalacturano (RGI). Los AG se encuentra asociado con proteínas específicas, denominadas arabinogalactano proteínas (AGPs) (Arora y col., 2000; 2002; Singh y col., 2009).

La lignina, principal compuesto fenólico de las paredes celulares secundarias, aparece ocasionalmente en la pared primaria de ciertos tipos celulares, como traqueidas, vasos del xilema y algunas células cultivadas en suspensión, o en respuesta a diferentes tipos de estrés. Esta composición varía dependiendo de la especie que consideremos, del tipo de tejido e incluso del grado de diferenciación del tipo celular en cuestión (Arora y col., 2000).

La pared celular posee una elevada capacidad para acomodarse a nuevas condiciones mediante variaciones de su estructura. En los últimos años se han caracterizado paredes celulares con composición alterada debido a modificaciones genéticas (mutaciones), adaptaciones o habituaciones a diferentes tipos de estrés y al uso de inhibidores de la biosíntesis de la pared celular (Degenhardt y Gimmler, 2000; Willats y col., 2006).

Las células habituadas presentan una disminución del volumen celular, en una clara tendencia a restringir la necesidad de agua, y tienen paredes celulares más débiles que contienen menos celulosa y proteína rica en hidroxiprolina. Estas células mantienen el contenido total en pectinas pero varían la organización y composición de los polímeros pécticos, formándose una red laxa de homogalacturonano y ramnogalacturonano que sustituye parcialmente a la red celulosa-xiloglucano (McCartney y col., 2003). Un estudio posterior mostró que además presentaron cambios en la estructura de las pectinas, que principalmente consisten en variaciones en el grado de esterificación y en la localización de las pectinas metilesterificadas y desesterificadas en las células tolerantes (Willats y col., 2000; Sorensen y col., 2009).

La pared de la raíz es una de la más susceptible a sufrir cambios como consecuencia del estrés hídrico ya que están en contacto directo con el agua y los solutos disueltos (Huang y Gao, 2000).

El uso de anticuerpos es una potente herramienta que permite la identificación *in situ* de cambios producidos en los distintos componentes de la pared celular como consecuencia del estrés, ya que el proceso de extracción no provoca modificaciones de los componentes como sucede con los métodos fisicoquímicos que a menudo incluyen la homogenización de estructuras celulares, o la utilización de disolventes, que conllevan a una gran pérdida de información (Willats y col., 2002, Bernal y Willats, 2004).

En la Tabla I se presentan algunos de los anticuerpos más utilizados en el estudio de las membranas. En el caso de LM5 y LM6, reconocen un conjunto amplio de epítopos de polisacáridos y proteínas de la pared (Willats y Knox, 1999; Willats y col., 2000), ver Figura 1.

Tabla I. Algunos de los anticuerpos más utilizados en el estudio de la pared celular, así como el antígeno y el epítipo que reconocen. Algunos epítipos pueden estar presentes en más de un antígeno. Todos los antígenos son monoclonales.

Anticuerpo	Antígeno/Epítipo	Referencia
JIM5	HG/poco metil-esterificado	Hnox y col. (1990): Willats y col. (2000)
JIM7	HG/muy metil- esterificado	Hnox y col. (1990): Willats y col. (2000)
PAM 1*	HG/30 restos de GalU no esterificados	Willats y col. (1990 y 2000)
LM7	HG/metil- esterificación alterna	Willats y col. (2001)
LM5	RGI/ β -1,4-D galactano	Jones y col. (1997): Willats y col. (1999)
LM6	RGI o AGP/ α -1,5-L-arabinano	Willats y col. (1998 y 1999)
LM10	Xilanos/ β -1,4-xilano	McCartney y col. (2005)
LM11	Xilanos y arabinoxilanos	McCartney y col. (2005)
CCRC-M1	XG o RGI/t- α -Fuc-1,2-D-Gal	Puhimann y col. (1994)
LM1	Extensina/desconocido	Smallwood y col.(1995)
LM2	AGP/ β -D-GlepA	Smallwood y col.(1996)
MAC208	AGP/ β -D-GleU-1,3- α -D-GalU-1,2-L-Rha	Pennell y col.(1991)
JIM8	AGP/parte glicídica de la AGP	Pennell y col.(1991)
Anti-calosa	Calosa/ β -1,3-glucano	Meikle y col. (1991)

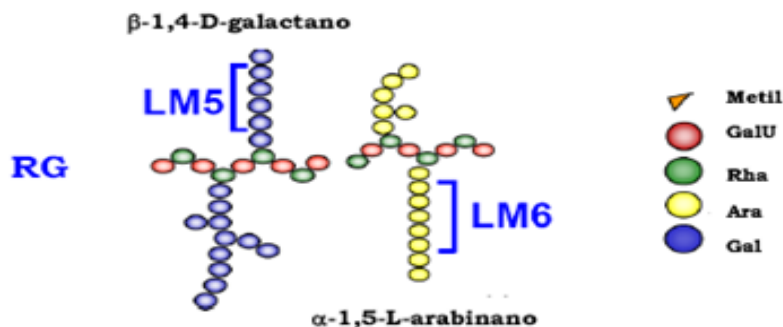


Figura 1.- Etipos de homogalacturano (HG) y del ramnogalacturano (RGI) reconocidos por algunos de los anticuerpos más comunes presentados en la tabla I.

La sequía puede tener importantes impactos sobre el crecimiento y el desarrollo de la planta, causando disminución de los rendimientos de las cosechas. Los efectos del estrés hídrico en la planta varían entre especies de plantas. El reconocimiento temprano de los síntomas de estrés hídrico puede ser fundamental para mantener el crecimiento de un cultivo. El síntoma más común de estrés de la planta es la marchitez. A medida que la planta sufre estrés hídrico, la presión del agua dentro de las hojas disminuye y la planta se marchita (Bauder, 2003). Uno de los indicadores más sensibles del estado fisiológico de una planta es su comportamiento estomático. Los estomas responden rápidamente a los cambios ambientales, y de esta manera permiten que la planta pueda regular la pérdida de agua y la toma de carbono durante los periodos de escasez de humedad en el suelo. La planta regula la abertura del poro estomático con relación a los factores internos de la planta, tales como su estado hídrico y también en respuesta a factores climáticos (Jaleel y *col.*, 2008b).

También, como respuesta al estrés hídrico, se observa la acumulación de solutos compatibles, como la prolina, betaínas, los polioles (manitol, sorbitol y pinitol); las cuales actúan como osmolitos citoplasmáticos en el ajuste osmótico. No obstante, pueden desempeñar otras funciones como el mantenimiento de la estabilidad de las macromoléculas y las membranas (Kavi y *col.*, 2005). Bajo esta condición de déficit hídrico, la síntesis de proteínas en los tejidos vegetales también sufre efectos profundos. En algunos casos hay reducción en la síntesis de proteínas totales y una disociación de ribosomas, y en otros la síntesis de proteínas se incrementan y se acumulan como respuesta a estas condiciones de deshidratación celular, considerándose como moléculas que proveen a la planta de mecanismos osmoprotectores (Rodríguez y *col.*, 2003).

Los efectos del estrés hídrico en la planta se perciben usualmente como un decrecimiento de la fotosíntesis y del crecimiento, asociados a su vez al metabolismo del carbono y el nitrógeno. Sin embargo, la respuesta de las plantas al estrés es compleja y tiene como consecuencia una serie de modificaciones metabólicas, morfológicas y fisiológicas en todos los órganos de la planta, constituyendo en muchas ocasiones mecanismos de adaptación. Dentro de las respuestas al déficit hídrico se reporta el cierre estomático, disminución de la conductancia estomática y reducción de

la transpiración, el decrecimiento del potencial hídrico, de la fotosíntesis y del crecimiento de la planta en general, la acumulación de ácido abscísico (ABA), prolina, manitol, sorbitol, síntesis de nuevas proteínas y RNA mensajeros, entre otras; implicando la acción concertada de muchos genes. Por lo tanto, los estudios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares de la tolerancia a la sequía en el frijol (*Phaseolus vulgaris*, L.) y otras leguminosas de interés agrícola, son necesarios para caracterizar los distintos rangos de tolerancia observados en la naturaleza (Chaves y col., 2003), ya que nos permitirá identificar las variedades de frijol más tolerantes al estrés hídrico, disponibles en los bancos de semillas para ser cultivadas en el país.

Diversos y numerosos procesos de la planta pueden ser alterados por el estrés hídrico. Las respuestas pueden ser respuestas transitorias o bien involucrar cambios en la expresión génica (Bray, 2002).

Uno de los primeros efectos del déficit hídrico sobre los vegetales es la inhibición de la elongación celular y por ende, del crecimiento. Es bastante conocido que el crecimiento de la raíz es menos sensible que el crecimiento de la parte aérea, lo que conduce a un aumento de la relación raíz / parte aérea (Tambussi, 2004).

En la literatura se definen tres grados de estrés hídrico (Tambussi, 2004):

Estrés leve: disminución de algunos bares del potencial hídrico (décimas de MPa) o del contenido relativo de agua (CRA) en un 8-10 % respecto a plantas bien regadas.

Estrés moderado: disminución del potencial hídrico más agudizada (aunque menor a 1.2-1.5 MPa) o una disminución del CRA entre un 10 y un 20%.

Estrés severo: disminución del potencial hídrico mayor a 15 bares (1.5 MPa) o disminución del CRA mayor a un 20%.

Es un hecho conocido que el cierre estomático puede inducirse aún antes de cualquier cambio detectable en el Potencial hídrico (Ψ_w) y el CRA, que expresa la relación porcentual entre el contenido de agua de la hoja y el contenido a máxima turgencia de la misma. Actualmente se relaciona esto con la existencia de una señal proveniente de las raíces. El resultado del cierre estomático conlleva a la disminución de la tasa transpiración y una caída de la asimilación de CO_2 y diversos efectos asociados, tales

como acumulación de poder reductor, susceptibilidad a la fotoinhibición y/o fotooxidación, entre otras (Flexas y Medrano, 2002).

La preservación del status hídrico de la planta de frijol es importante para la producción de vainas y rendimiento de semilla, al mantener la actividad fotosintética y la extensión de los órganos y tejidos en condiciones de sequía y calor (Kumar y *col.*, 2006).

La acumulación de osmolitos en las células vegetales trae como consecuencia un aumento del potencial osmótico estimulando la absorción de agua e incrementando la presión de turgencia. En condiciones de estrés hídrico esto puede contribuir al mantenimiento de diversos procesos fisiológicos tales como la apertura estomática, la fotosíntesis y la expansión celular (Ashraf y Iram, 2005). Debe señalarse que el verdadero ajuste osmótico ocurre cuando hay un aumento en el número total de moléculas osmóticamente activas, no considerándose como tal al aumento pasivo de solutos que se produce en la deshidratación de los tejidos (Tambussi, 2004). Por lo tanto, para la correcta evaluación del ajuste osmótico (OA) u osmoregulación debe medirse el potencial osmótico a turgencia máxima, evitando así el artefacto producido por la disminución del volumen celular.

3. 6. El efecto del estrés hídrico en la germinación, crecimiento y desarrollo de las plantas

Las características que contribuyen a la adaptación de las especies vegetales a regiones con deficiencias de humedad deben estudiarse en tres niveles: semilla, plántula y planta adulta. A nivel de semilla, una de las mejores pruebas para identificar variedades tolerantes a sequía es determinar el porcentaje de germinación a diferentes potenciales osmóticos con manitol, ya que esta sustancia química, al igual que otras, como sacarosa y polietilenglicol, han mostrado simular satisfactoriamente un efecto de sequía durante la germinación y emergencia de la semilla. También se ha demostrado que existe una correlación alta y positiva entre la tasa de germinación en soluciones osmóticas y la tasa de emergencia en el campo, indicando que estas pruebas tienen valor predictivo. Por ejemplo, la emergencia de la semilla en una solución de manitol puede revelar tolerancia al estrés osmótico en semillas y plántulas; aún así una correlación con el rendimiento podría ser una coincidencia, a menos que se coloque éste como factor en ensayos de rendimiento (Madueño y *col.*, 2006).

Las plantas absorben agua a través de sus raíces. La cantidad de fuerza necesaria de una planta para extraer agua del suelo se conoce como el potencial mátrico. Cuando la humedad del suelo es baja, las plantas tienen que utilizar más energía para extraer agua del suelo, por lo tanto el potencial matricial es mayor. Cuando el suelo está seco y el potencial matricial es fuerte, las plantas muestran síntomas de estrés. Esto se conoce como el efecto matricial (Bauder, 2003).

La raíz es el órgano encargado de tomar el agua del suelo y el primer órgano que se ve afectado por el estrés hídrico. Los enfoques de mejoramiento y selección para el desarrollo de variedades de frijol tolerantes a condiciones abióticas limitantes, responden a las limitaciones que confrontan los agricultores que producen la mayor proporción de los granos básicos en Centroamérica, incluyendo el frijol. La tolerancia a la sequía y a la baja fertilidad de los suelos están asociadas a la mayor eficiencia de ciertos genotipos de frijol con características de raíces que les permite una mayor absorción de agua y nutrimentos y/o una mayor tasa de producción de biomasa y desarrollo de granos bajo estas condiciones limitantes (Red SICTA, 2007).

Las plantas también pueden tener dificultades para extraer agua del suelo si las sales están presentes en la zona de la raíz. Generalmente, cuando la solución del suelo es más salina que la de la planta, se necesita más energía para la absorción de agua que si la solución del suelo no es salina. El estrés hídrico de las plantas causado por condiciones de salinidad, se conoce como el efecto osmótico (Bartels y Sunkar, 2005).

El estrés por el efecto osmótico causa los mismos síntomas que el estrés por el efecto matricial. La principal consecuencia de la falta de humedad es la reducción del crecimiento y el desarrollo causados por la reducción de la fotosíntesis. La fotosíntesis es el proceso mediante el cual las plantas combinan el agua, el dióxido de carbono y la luz para producir hidratos de carbono para obtener energía. Cambios químicos debido a la reducción de los componentes críticos de fotosíntesis, como el agua, puede afectar negativamente al crecimiento de las plantas (Lei y col., 2006).

La baja disponibilidad de agua también puede causar limitaciones físicas en las plantas. Los estomas son células de las plantas que controlan el movimiento de agua, dióxido de carbono y el oxígeno dentro y fuera de la planta. Durante la falta de humedad, los

estomas se cierran para conservar el agua, esto también cierra la vía para el intercambio de agua, dióxido de carbono y oxígeno que resulta en la disminución de la fotosíntesis. El crecimiento de las hojas se verá afectado por la falta de humedad más que el crecimiento de las raíces porque las raíces son más capaces de compensar la falta de humedad (Bauder, 2003).

Las plantas han desarrollado diversas estrategias y mecanismos para responder a cambios en el ambiente donde se desarrollan, las adaptaciones anatómicas y fisiológicas les permiten un mejor crecimiento bajo condiciones desfavorables (Degenhardt y Gimmler, 2000).

En muchas plantas cultivadas, se ha observado que los primeros estadios de su vida son más sensibles a los estreses medioambientales (Sivritepe y col., 2003). Como causa del estrés hídrico se provoca la marchitez de las hojas, se secan y se caen. Sin embargo la falta de agua es el factor más limitante en la regulación de fotosíntesis. La fotosíntesis es el proceso mediante el cual las plantas convierten la energía luminosa, dióxido de carbono y agua en azúcares de las plantas. Ante la falta de agua, ni la cantidad de luz o del dióxido de carbono serán de utilidad para la planta. Las hojas se marchitan, los mecanismos de la fotosíntesis cesan y el crecimiento se desacelera hasta detenerse (Gore, 2010).

Si se acepta que la interacción genotipo-ambiente produce un fenotipo con una función determinada, encontramos que cualquier variación de las condiciones ambientales puede afectar tanto a la estructura como a la función, por lo tanto cualquier estrés tendrá una consecuencia estructural, morfológica y/o funcional (González, 2007).

Las hojas, por su gran plasticidad morfológica y por la diversidad de funciones que desempeñan (termorregulación, fotosíntesis, transpiración) son los órganos que presentan el mayor número de estructuras especializadas. En la anatomía del mesófilo de la hoja encontramos con una estructura dorsiventral que en el caso del género *Phaseolus* presenta básicamente dos epidermis, la inferior y la superior, con cutículas, estomas, un tejido fotosintético, parénquima en empalizada de células alargadas dispuestas en capas, un parénquima esponjoso de almacenamiento y numerosos espacios aéreos entre las células. Esta estructura cambia drásticamente ante factores como: el estrés hídrico, salino, lumínico, térmico o contaminante (Alemán y col., 2007).

Sin embargo el índice estomático es conocido como un carácter estable (Stenglein y col., 2003), ya que el número de estomas queda definido en el momento del desarrollo del tejido epidérmico.

Diversos factores están vinculados a los mecanismos de tolerancia al estrés hídrico, tales como la producción de compuestos osmóticamente activos, la producción de especies reactivas del oxígeno y otros mecanismos de defensa antioxidante (Sairam y Tyagi, 2004), Estos últimos mecanismos son variados e incluyen la síntesis de metabolitos tales como aminoácidos como la prolina, aminos cuaternarios, azúcares solubles, polioles, poliaminas, compuestos de sulfonio, fructanos y pigmentos (carotenoides, antocianinas, betalaínas).

La prolina es un aminoácido que se encuentra en pequeñas cantidades en las plantas, cuando éstas crecen en condiciones óptimas. En condiciones de estrés, se ha encontrado que el contenido de prolina aumenta para actuar como un agente osmótico, protegiendo a la planta de la deshidratación. Muchas especies de plantas acumulan prolina libre en respuesta a la salinidad (Jiménez y col., 2006; Tajdoost y col., 2007), sequía (Avendaño y col., 2005) y frío (Konstantinova y col., 2002).

Se ha sugerido que la prolina participa en múltiples roles en la tolerancia de las plantas al estrés; actuando como un mediador del ajuste osmótico (Chaman, 2007), estabilizador de proteínas y membranas, inductor de genes relacionados a estrés osmótico (Kumar y col., 2006), fuente de carbono y nitrógeno fácilmente disponible en la rehidratación celular (Gore, 2010), fuente de equivalentes de reducción (del catabolismo de prolina) para sostener la fosforilación oxidativa y la generación de ATP durante la recuperación del estrés (Aguilar y col., 2003). Además, ayuda al control de la acidosis del citosol y puede mantener la relación NADH/NAD⁺ a valores compatibles con el metabolismo; en la detoxificación del exceso de NH₄⁺ y ayuda a las células a superar la tensión oxidativa (cosechador de especies reactivas de oxígeno). (Harsh, 2003; Ramanjulu y Sudhakar, 2000).

La fotosíntesis en estrés hídrico también declina debido a la reducción en la fijación de C total (Bredan y Egli, 2003), al daño en la maquinaria biosintética requerida para la asimilación de C y para su conversión a productos metabólicamente utilizables (Pattanagual y Madore, 1999). El déficit hídrico provoca además pérdida de reservas de

almidón (Zinselmeier y col., 1999) y de azúcares no estructurales que soportan el crecimiento y desarrollo, por la disminución en la actividad de la enzima fotosintética galactinol sintetasa (Pattanagul y Madore, 1999).

Entre las respuestas fisiológicas de las plantas al estrés hídrico está la disminución de la conductancia estomática (Pattanagul y Madore, 1999) que causa reducción de la transpiración y de la fotosíntesis (Lei y col., 2006). La fotosíntesis en estrés hídrico también declina debido a la reducción en la fijación de C total, al daño en la maquinaria biosintética requerida para la asimilación de C y para su conversión a productos metabólicamente utilizables (Brevedan y Egli, 2003).

La magnitud del daño causado por el déficit hídrico sobre el rendimiento depende de la etapa del desarrollo, intensidad del estrés y la duración del mismo (Castañeda y col., 2006), así como del genotipo (Molina, 2008).

3. 7. El efecto del estrés hídrico en frijol (*Phaseolus vulgaris*, L.)

El 60% de la producción mundial de frijol (*Phaseolus vulgaris*, L.) se obtiene en condiciones de déficit hídrico, por lo que este factor es el que más contribuye en la reducción del rendimiento después de las enfermedades (Singh, 1995).

Cerca de 60% de las regiones productoras de frijol sufre condiciones de sequía, que es el segundo factor más importante de reducción en rendimiento después de las enfermedades. Sus rendimientos se ven afectados por varias causas, entre las cuales la sequía puede generar pérdidas entre 10 y 100% (Rao, 2002).

Las sequías recurrentes afectan la producción de frijol no solo en regiones semiáridas y en el trópico seco, sino también en regiones de clima templado con veranos relativamente cálidos. Sin embargo la magnitud del efecto de la sequía depende de la intensidad y la duración de ésta, así como de la etapa fenológica en que se encuentre el cultivo. El déficit hídrico en etapas tempranas generalmente afectan el alargamiento y el tamaño final de las hojas, en cambio en estadios más avanzados se incrementa la senescencia foliar y la pérdida de follaje (Galván y col., 2003). Esta disminución del área foliar, conjuntamente con una reducción en la conductancia estomática, pueden limitar tanto la intercepción de la energía solar como la tasa de fotosíntesis y finalmente la producción de materia seca en la planta (Rodés y col., 2006).

Estudios posteriores han demostrado, que aún bajo sequías relativamente severas, la capacidad fotosintética del mesófilo de la lámina foliar no es fácilmente reducida y las tasas de fotosíntesis sólo disminuyen radicalmente cuando por sequía se pierde más del 40% del contenido de clorofila en la hoja (Alemán y col., 2007).

Según Nielsen y Nelson (1998), en la etapa vegetativa el estrés hídrico provoca reducción en altura de planta y área foliar del frijol, pero no en su rendimiento.

El estrés por sequía, causado por la baja disponibilidad de agua en el suelo, modifica negativamente la productividad del frijol. Esta puede ser más o menos afectada dependiendo de la intensidad y duración de la escasez de agua, de la rapidez con la cual se alcance dicha intensidad y además de la etapa fenológica en que el efecto ocurra, así como el pre acondicionamiento de la planta (Aguirre y col., 1999).

Otros estudios han revelado pérdidas en el rendimiento de grano del frijol debido al déficit hídrico durante la etapa reproductiva (Castañeda y col., 2006). Estos autores encontraron que un estrés hídrico de $-1,5\text{MPa}$ aplicado al inicio durante 15 días redujo en 42 y 50% el rendimiento, lo que se atribuyó a reducciones en el número de vainas por planta y en el índice de área foliar.

Nielsen y Nelson (1998) reportaron un rendimiento de $1975\text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ de frijol negro en el testigo bajo riego y 1280 y $1035\text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ en tratamientos bajo estrés durante el llenado de grano y la floración, respectivamente; las reducciones fueron causadas por disminución en el número de vainas por planta, número de semillas por vaina y peso de semilla.

En *Glycine max*, L. Sasovsky, (2008) reportó reducciones en el rendimiento por estrés hídrico durante el llenado de semilla, de 38y 58% en dos años sucesivos, asociados con disminuciones del periodo de llenado de grano y de los componentes del rendimiento de semilla.

Al respecto, Pautasso y col. (2012) encontraron que con tres días de estrés hídrico en prefloración, la soya aborta más flores a causa de daño en el pistilo (óvulo) y no en el polen, lo que reduce el número de vainas.

La mayor sensibilidad al estrés hídrico en leguminosas ocurre durante la etapa reproductiva, ya sea antes del inicio de la floración, en plena floración, de floración a

llenado de grano (Rosales y *col.*, 2001), en desarrollo de vainas y en llenado de grano (Esquivel y *col.*, 2002).

Respecto a la calidad física y fisiológica de la semilla, el estrés hídrico severo incidente en la etapa de acumulación de reservas en soya, reduce la germinación y el vigor (Ferraris y Couretot, 2011), así como el tamaño de semillas (Esquivel y *col.*, 2002).

Al triplicarla intensidad de estrés hídrico en la etapa de llenado de grano en soya, Sasovsky, (2008) encontró que la germinación se redujo en 12%, el masa seca de la plántula en 5% y la conductividad eléctrica en semillas individuales se incrementó en 19%. La germinación de la soya fue inferior a 80% con estrés hídrico durante la etapa reproductiva (Pautasso y *col.*, 2012), pero la magnitud del efecto dependió del genotipo (Ferraris y Couretot, 2011).

En contraste, Vieira y *col.* (1992), al aplicar estrés hídrico en soya durante el desarrollo de la semilla, no detectaron efectos en la germinación y vigor, aunque hubo más semillas inmaduras, arrugadas y sin brillo.

Los enfoques de mejoramiento y selección para el desarrollo de variedades de frijol tolerantes a condiciones abióticas limitantes, responden a las limitaciones que confrontan los agricultores que producen la mayor proporción de los granos básicos en Centroamérica, incluyendo el frijol. La tolerancia a la sequía y a la baja fertilidad de los suelos están asociadas a la mayor eficiencia de ciertos genotipos de frijol con características de raíces que les permite una mayor absorción de agua y nutrimentos y/o una mayor tasa de producción de biomasa y desarrollo de granos bajo estas condiciones limitantes (Red SICTA, 2006).

La identificación de genotipos que presentan estas características asociadas a mayor tolerancia a la sequía y la baja fertilidad es importante para fines de mejoramiento, a través de la incorporación de estas características en genotipos superiores y/o su utilización en enfoques de variedades multilíneas para ambientes variables que presentan estrés causado por la sequía y la baja fertilidad individualmente, o ambos simultáneamente (Henry y *col.*, 2008).

Los aspectos botánicos ayudan a precisar datos, por lo que una descripción varietal puede determinar la diferencia, la uniformidad y la estabilidad para cada especie: la variedad se puede identificar por una o más características morfológicas y físicas,

uniforme y estable, por cuanto la variedad permanecerá sin cambios y ofrecerá un grado razonable de confiabilidad en sus características esenciales y típicas (González, 2007).

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 relaciones del sistema radicular y el agua son, sin discusión, el punto capital de su fisiología. Las raíces buscan siempre agua y cuando falta este elemento descienden a capas profundas del suelo, a condición de que la planta haya adquirido un desarrollo suficiente, para alimentar la multiplicación celular resultante de este alargamiento.

El sistema radicular pivotante consta de una raíz principal que profundiza en el suelo en busca de agua, y de raíces secundarias con pelos absorbentes más superficiales, cuya función es capturar los nutrientes que se alojan, mayoritariamente, en los primeros 20 cm del suelo (IICA, 2008).

MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

La presente investigación se realizó en el Centro de Estudios Biotecnológicos de la Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”. Se utilizaron 5 variedades de frijol comercializadas en Cuba, provenientes de la Empresa Provincial de Semillas de Matanzas (ver Figura 2).



Figura 2. Variedades de frijol comercializadas en Cuba

Técnicas y procedimientos generales:

Las semillas se esterilizaron por inmersión secuencial en etanol al 70% durante un minuto, en seguida fueron lavadas y ligeramente desinfectadas con hipoclorito de sodio (0.5%), durante 10 minutos, seguidos por enjuagues sucesivos con agua destilada estéril, tres veces. Posteriormente se realizaron los experimentos en condiciones experimentales de sequía.

Diseño experimental

Experimento 1. Estudios de la etapa de germinación.

Las semillas se pusieron a germinar en frascos, de 5 cm de diámetro por 10 de alto, sobre papel de filtro humedecido en cámara oscura, a 25 °C. Para simular condiciones de sequía se utilizaron concentraciones de 0, 10, 15 y 20% de polietilenglicol (PEG)

8000 en solución de Hoagland. Se utilizó un diseño totalmente al azar. Se sembraron 12 semillas para cada concentración de PEG. Se realizaron 3 réplicas del experimento, para un total de 36 semillas por tratamiento por cada variedad. Se determinó el porcentaje de germinación de las semillas y la presencia de hipocótilo, epicótilo y hojas verdaderas, a los 4, 6, 8, 10 y 15 días. Además, se midió la longitud de la raíz principal, del tallo, y la cantidad de raíces laterales a los 10 y 15 días. También se determinó masa fresco del tallo y de la raíz al final del experimento y se realizaron estudios histoquímicos de la raíz.

Para determinar el efecto del estrés sobre los parámetros estudiados se utilizó la siguiente fórmula (Penichet y col., 2006):

Índice de estrés (IE)

$$IE = \frac{\text{Valor muestra estresada}}{\text{Valor muestra control}} \times 100$$

$$\% \text{ de Inhibición} = 100 - IE$$

Longitud del tallo y de la raíz. Se midieron las plantas desde la base del hipocótilo hasta la yema apical y al extremo de la raíz para calcular las longitudes del tallo y la raíz respectivamente.

Masa fresca (MF) del tallo y de la raíz. Las pesadas se realizaron en una balanza digital Sartorius.

Estudios Inmunohistoquímicos de las raíces (Willats y col., 2001).

Se realizaron cortes histológicos de raíces procedentes de las variedades estudiadas, sometidas a las condiciones experimentales de estrés hídrico con PEG8000. Para la detección de los distintos epítomos en la superficie de la raíz se fijaron segmentos de 1 cm desde la caliptra con paraformaldehído 2,5% (p/v) en fosfato sódico 0,1 M; pH 7,4 durante un período de 48-72 h a 4°C. A continuación, las raíces fueron incubadas con los anticuerpos primarios LM5 (RGI/β -1,4-D-galactano) y LM6 (RGI o AGP/α-1,5-L-arabinano) en diluciones 1/10 en PBS (NaCl 0,14 M, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 2 H₂O 7,8 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM a pH 7,2) que contenía un 4% de leche en polvo (MPBS) y se mantuvieron durante 2 h a temperatura ambiente en oscuridad. Transcurridas las dos

horas, las raíces se lavaron con PBS en abundancia y se incubaron con el anticuerpo secundario (IgG anti-rata conjugada con isotiocianato de fluoresceína –FITC-) en dilución 1/100 en MPBS durante 2 h a temperatura ambiente en oscuridad. Nuevamente se lavaron con PBS y se incubaron con calcoflúor 0,2% (p/v) en dilución 1/50 en MPBS durante 5 min. El último paso tras lavar con PBS fue el montaje en una solución de glicerol/PBS (Citiflúor AF1) para ser observadas en un microscopio Nikon Eclipse E600 con unidad de epifluorescencia usando un filtro LP470 (395-460) propio para el calcoflúor y un filtro LP520 (450-490) para FITC (Willats y Knox, 1999)

Experimento 2. Estudios de la etapa de crecimiento.

Las semillas esterilizadas se sembraron en flujo, en condiciones estériles, en placas Petri y se mantuvieron en oscuridad por 24 horas. Una vez germinadas se sembraron en vasos de 400 mL de volumen que contenían como sustrato 25% de suelo ferralítico rojo y 75% de humus de lombriz. Posteriormente se trasladaron caso de cultivo con un fotoperiodo de 13 horas de luz y a temperatura ambiente. El riego se mantuvo a plena capacidad de campo (CC), cada dos días, hasta que los primordios foliares estaban completamente desarrollados y se formó el primer trifolio. Transcurrido ese tiempo, las plantas se distribuyeron de forma aleatoria en dos grupos con diferentes niveles de humedad: 70 % CC (control), 40% CC, 20% CC (estrés severo). Se emplearon tres réplicas por cada CC, para un total de 30 plantas para cada tratamiento por variedad.

Las plantas se clasificaron en tolerantes, medianamente tolerantes y susceptibles según marchitez (Alemán y col., 2010), y se evaluaron los diferentes indicadores anatómicos, fisiológicos y bioquímicos a los 15, 21 y 28 días después de aplicar los diferentes riegos.

Estudios anatómicos

Para el estudio anatómico de la epidermis se realizaron improntas en las hojas del primordio utilizando la técnica descrita por Rodés y Collazo, (2006), para lo cual seleccionaron porciones de aproximadamente 1,5 cm² tanto de la cara adaxial como abaxial y se evaluaron 5 campos por muestra de cada tratamiento utilizándose para la

observación un microscopio de contraste de fase marca Olympus B a un aumento de 400X y se tomaron microfotografías de las muestras.

El índice estomático (IE) se determinó utilizando la fórmula de Salisbury sugerida por Wilkinson (1979):

$$IE = \frac{NE}{NCE + NE} \times 100$$

Donde, NE es el número de estomas por campo de observación y NCE es el número de células epidérmicas típicas en el campo de observación.

Para la observación del mesófilo se fijaron las muestras en solución de formol al 10%, a las cuales previo lavado se les realizaron cortes transversales de la parte media de la lámina foliar de 18 Rm con un micrótopo de congelación (marca Leica CM 1850) y se montaron en agua: glicerina (V: V), para la obtención de láminas semipermanentes. Por cada variante experimental se observaron 5 muestras en un microscopio óptico Leica a 10X y 40X de lente objetivo y las imágenes se capturaron y procesaron con el programa Micrometrics SE Premium.

La medición del área foliar se hizo al finalizar el ensayo y se expresó en cm^2 , utilizado por Milthorpe (1969), Cabrera (1972).

Una vez que se detectaron los primeros síntomas de marchitez, las hojas de las variedades estresadas (20% CC) y no estresadas (70% CC) fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C . Posteriormente se evaluó la respuesta metabólica de las plantas en las condiciones experimentales.

Estudio Fisiológico

Determinación del Potencial Osmótico (Ψ_s)

Se determinó mediante el Método Refractométrico usando el refractómetro de mano CARL ZEISS 114332 West Germany.

Contenido Relativo de Agua (CRA).

Se utilizaron discos foliares de 1 cm. de diámetro los cuales fueron pesados en una balanza digital Sartorius para la determinación de la masa fresco (5 discos por tratamiento de plantas diferentes).

La fórmula para la determinación del CRA fue la siguiente (Ascón y Taylón, 2000):

$$\text{CRA (\%)} = [(P_f - P_s) / (P_T - P_s)] * 100$$

Donde: P_T es el peso del tejido a su máxima turgencia.

P_f es el peso fresco de la muestra.

P_s es el peso seco de la muestra.

Estudio Bioquímico

Determinación de la concentración de clorofila total

La clorofila se determinó mediante espectrofotometría. Se emplearon las ecuaciones propuestas por Wintermans y de Mots (1965).

$$C_a \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 13.95 (A_{665}) - 6.68 (A_{649})$$

$$C_b \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 24.96 (A_{649}) - 7.32 (A_{665})$$

$$\text{Clorofila total: } C_a + b \text{ (mg/g)} = (20.2 A_{649}) + (8.02 A_{665}).$$

C_a = concentración de clorofila a

C_b = concentración de clorofila b

Determinación de los fenoles

Las hojas de las plantas estresadas y no estresadas fueron maceradas en nitrógeno líquido. Posteriormente se midió la concentración de fenoles totales (solubles y ligados a la pared celular). La extracción de los fenoles solubles se realizó en 10 volúmenes de metanol. Las muestras fueron homogenizadas y centrifugadas a 27200 g. El precipitado se resuspendió en NaOH 2mol/L, para la extracción de los fenoles ligados a las paredes celulares, neutralizándose en igual volumen de HCl 2mol/L. La concentración de fenoles fue determinada utilizando ácido clorogénico (0,05 mol.L-1) como patrón y los valores de absorbancia fueron determinados a 760 nm. A partir de los valores obtenidos de concentración de fenoles solubles y ligados a pared se calcularon las concentraciones de fenoles totales.

Determinación de Prolina libre

La determinación de Prolina se realizó según Bates (1973). Los resultados fueron interpolados en una curva para determinar la cantidad de Prolina (mg/mL) y expresados finalmente como μ moles prolina/g masa fresco de hojas.

Determinación de la actividad enzimática

a) Actividad catalasas

Los ensayos de actividad enzimática de catalasas se realizó en hojas por determinación espectrofotométrica a 240 nm, de la descomposición de H_2O_2 en 20 mmol/L de tampón fosfato de sodio a pH= 7 (Chance y Machley, 1955), en un volumen final de 3 mL. Se realizaron tres mediciones por muestra en un Espectrofotómetro (Ultrospect 2000).

b) Actividad Peroxidasas

La actividad peroxidasas se realizó en un volumen final de 3 mL. (Bergmeyer, 1974) Para la reacción se adicionó en una cubeta de cuarzo 2,80 mL de solución fosfato de sodio 0.1 mol/L, pH 7.0; 50 μ L de solución guajacol 0.018 mol/L; 50 μ L solución de peróxido de hidrógeno ajustado a una absorbancia a 240 nm (0.040-0.045) utilizando agua como blanco. A la mezcla reaccionante se adicionaron 100 μ L del extracto vegetal. La actividad enzimática se realizó a 25 °C y a una longitud de onda de 436 nm. Se tomaron tres mediciones por muestra en un Espectrofotómetro (Ultrospect 2000).

Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó a través del paquete estadístico InfoStat/ profesional versión 1.1 (Di Rienzo y col., 2011), Los datos experimentales se analizaron para conocer si existió normalidad y homogeneidad de varianzas, utilizando el método de Shapiro-wilk. Tras cumplir los requisitos de normalidad y homogeneidad se empleo el análisis de varianza de clasificación doble (ANOVA). Para las comparaciones múltiples se utilizo la prueba de Test de Duncan, a fin de comprobar el nivel de significación para $p < 0,05$ y $0,01$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. 1. Experimento 1. Estudios de la etapa de germinación en condiciones de sequía con PEG.

Al determinar el porcentaje de germinación de las semillas pudimos constatar que, desde los 4 días de sembradas, existía una disminución marcada en los diferentes cultivares sembrados al 15 y 20 % de PEG al compararlos con el control (0% PEG). Los resultados de la Figura 3 muestran que no en todas las variedades se afecta por igual el proceso de germinación en las condiciones de estrés hídrico, presentando la mayor afectación la CC 25-9 negra a diferencia de la Bolita 42 que tuvo un comportamiento tolerante al estrés provocado por las condiciones experimentales utilizadas.

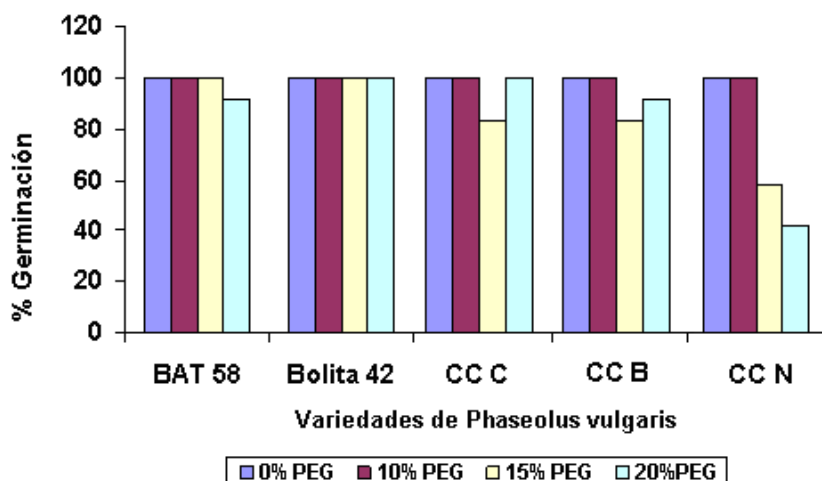


Figura 3. Porcentaje de germinación en variedades de *Phaseolus vulgaris* sometidas a diferentes concentraciones de PEG a los 7 días de sembradas.

La Figura 4, muestra la cinética de la germinación que de forma general, las semillas mantuvieron un elevado porcentaje de inhibición de la germinación al 20%, a los 15 días de sembradas, excepto la variedad Bolita 42. La variedad Cuba Cueto 25-9 negro (CC N), mantuvo un porcentaje alto de inhibición de la germinación, tanto al 15% como al 20% de PEG. La variedad CC 25-9 blanca también presentó disminución del proceso de germinación en condiciones de estrés (15% y 20% de PEG) pero en menor cuantía. Las restantes variedades presentaron bajos porcentajes de inhibición por lo que tuvieron un comportamiento tolerante a las condiciones de sequía experimental.

Estos resultados eran de esperar ya que al aumentar la concentración de PEG disminuye la disponibilidad de agua por lo que se inhiben los procesos de ablandamiento de la pared celular primaria, los cuales requieren una presión de turgencia celular concreta.

En estudio a nivel de semilla, se ha demostrado que una de las mejores pruebas para identificar variedades tolerantes a sequía es determinar el porcentaje de germinación a diferentes potenciales osmóticos con manitol, ya que esta sustancia química, al igual que otras, como sacarosa y polietilenglicol, han mostrado simular satisfactoriamente un efecto de sequía durante la germinación y emergencia de la semilla. También se ha probado que existe una correlación alta y positiva entre la tasa de germinación en soluciones osmóticas y la tasa de emergencia en el campo, indicando que estas pruebas tienen valor predictivo (Madueño y col., 2006).

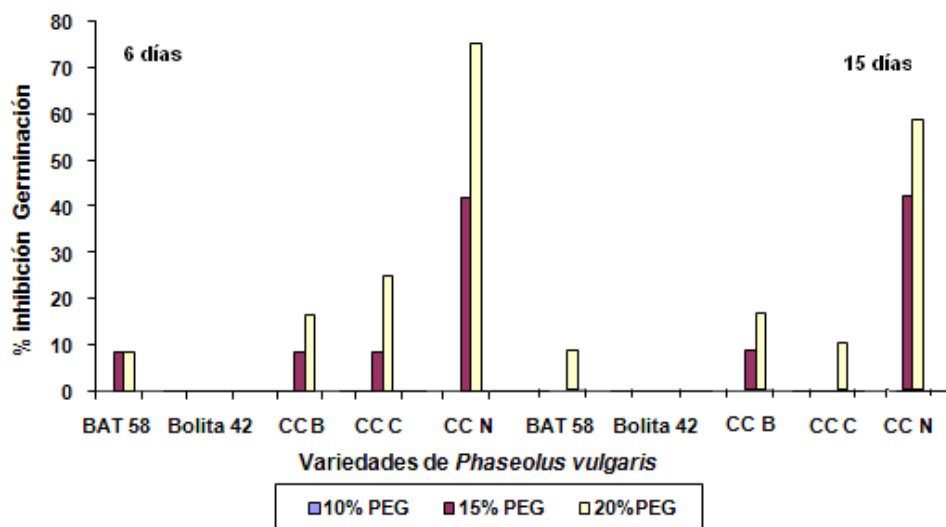


Figura 4. Porcentaje de inhibición de la germinación, de las semillas de las variedades comercializadas, a los 6 y 15 días de sembradas en pomos, a diferentes concentraciones de PEG.

Los resultados obtenidos concuerdan con los reportado por Penichet y col. (2006) en su estudio sobre la germinación de diferentes cultivares de *Phaseolus vulgaris*, L., en condiciones de sequía experimental con PEG, donde observaron que algunas de las variedades estudiadas, cultivadas en un 18% de concentración de PEG, presentaron 48 y 50% de inhibición de la germinación, incrementándose la cantidad de variedades afectadas a un 21% de concentración de PEG, llegando a alcanzar algunas hasta un 87% de inhibición.

Al analizar la cinética del desarrollo del hipocótilo, epicótilo y las hojas verdaderas se pudo constatar, que todas las variedades presentaron hipocótilo a partir del cuarto día. El epicótilo aparece el sexto día, así como algunas hojas verdaderas en diferentes cultivares del grupo control y en las sembradas al 10 % de PEG, esto pudiera explicarse por una tendencia de la expansión foliar como consecuencia del bajo grado de hidratación de los tejidos, a lo que se puede agregar una baja estimulación del crecimiento vegetativo producto de la disminución de la síntesis de ácido giberélico e incremento la de ácido abscísico.

La Tabla II muestra que a los 15 días de sembradas, en las condiciones de sequía experimental, los mayores porcentajes de inhibición los presentan el desarrollo de las hojas verdaderas en todos los cultivares estudiados, esto pudiera deberse a que en condiciones de estrés severo de sequía se induce numerosas irregularidades metabólicas en las plantas, siendo el primer efecto la pérdida de turgencia la que afecta la elongación del tallo y la expansión foliar. Estos resultados concuerdan con lo planteado por Passioura, quien refiere que la variación del área foliar es una de las respuestas macroscópicas más tempranas en plantas que experimentan déficit hídrico (Passioura, 1996, 2002).

Tabla II. Porcentaje de inhibición del desarrollo del hipocótilo, epicótilo, hojas verdaderas de las diferentes variedades de *Phaseolus vulgaris*, a los 15 días de sembradas, en condiciones de sequía.

% Inhibición desarrollo Hipocótilo				% inhibición desarrollo Epicótilo			% Inhibición desarrollo Hojas Verdaderas		
TRATAMIENTOS				TRATAMIENTOS			TRATAMIENTOS		
Variedades Cubanas	10% PEG	15% PEG	20% PEG	10% PEG	15% PEG	20% PEG	10% PEG	15% PEG	20% PEG
BAT 58	8,33	8,33	16,66	22,22	40	66,67	40	66,67	80
Bolita 42	0	8,33	16,66	40	60	90	36,36	72,72	78,18
CC B	0	16,66	16,67	40	50	90	40	50	100
CC C	0	8,33	25	25	50	90	36,36	50	78,18
CC N	0	50	66,67	58,33	83,33	100	58,33	83,33	100

Resultados similares fueron encontrados por Boutra y Sanders (2001), quienes plantean que la limitación de la humedad del suelo, influye en el cultivo del frijol,

reduciendo el tamaño de la planta entre otros índices de crecimiento, como es la presencia de la hoja verdadera. Un estrés severo de sequía induce numerosas irregularidades metabólicas en las plantas, tales como, disminución de la tasa de crecimiento, reducción en la capacidad de intercambio gaseoso, pérdida de turgencia y síntesis de algunos metabolitos secundarios. Estas alteraciones y su impacto en la morfología y fisiología de las plantas, van a depender del grado de tolerancia de los tejidos a la deshidratación, principalmente en las hojas (Lei y col., 2006).

Al analizar la longitud del tallo y la raíz se pudo constatar que estos parámetros de crecimiento se afectaron en todos los cultivares estudiados, en las condiciones de sequía experimental, siendo la reducción más severa en las sembradas a concentración de 20% PEG (ver Figura 5).

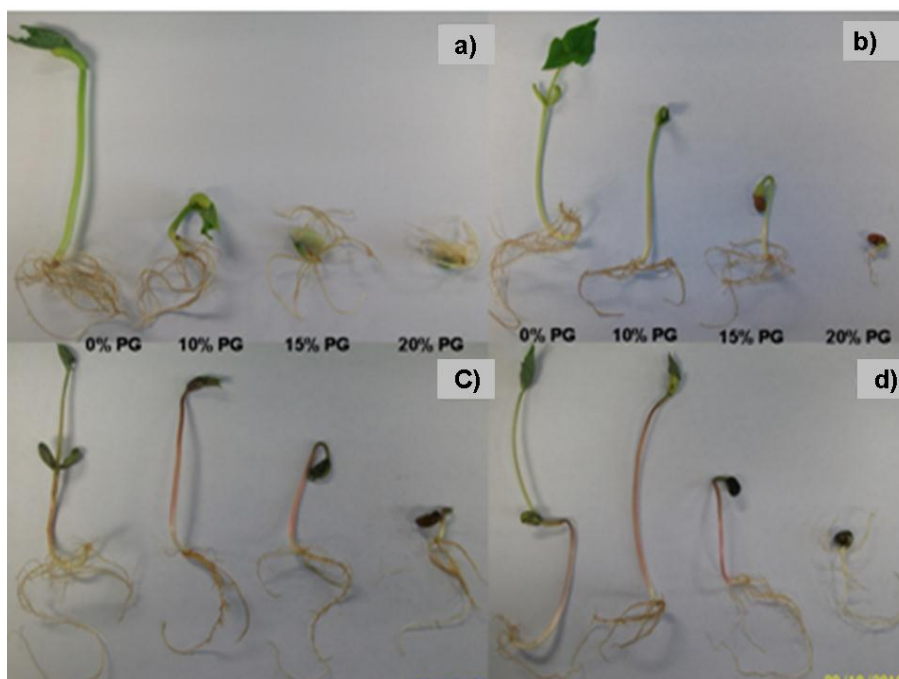


Figura 5. Comparación de la longitud de la raíz y el tallo de las variedades de *Phaseolus vulgaris* [a) CC 25-9 B; b) CC 25-9 C; c) BAT 58; d) CC25-9 N], a los 10 días de sembrados, en condiciones experimentales.

Por otra parte, el número de raíces laterales también disminuyó al aumentar la concentración de PEG en todas los cultivares como se puede apreciar en la Figura 6.

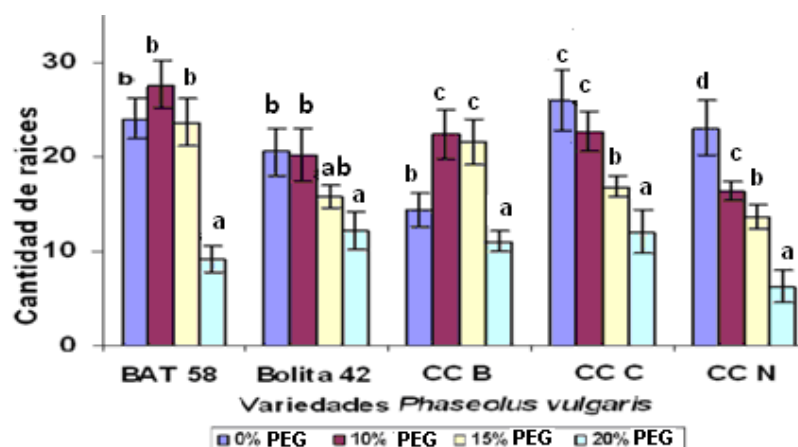


Figura 6. Cantidad de raíces laterales de las plantas de las variedades de *Phaseolus vulgaris*, a los 15 días de sembrados, en condiciones experimentales. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos para $p \leq 0,05$, según Test de Duncan.

Las variedades Bolita 42 y BAT 58 mostraron la menor afectación en el número de raíces a diferencia de la CC negro que incluso, en condiciones moderadas de estrés (10% PEG) disminuyeron. El mantenimiento de la producción de raíces lateral en condiciones de estrés pudiera interpretarse como respuesta de adaptación a la sequia de dichas variedades, ya que las raíces son importantes para garantizar la absorción de agua en suelos secos. Raíces profundas y ramificación de estas en la profundidad del suelo son fundamentales para el comportamiento de los cultivos en limitaciones de suministro de de agua.

Resultados similares fueron obtenidos por Cachorro y col. (1993) quienes encontraron que tanto el tallo de plántulas, como las raíces de frijol común disminuyeron significativamente su crecimiento, después de 13 días bajo tratamiento salino con cloruro de sodio. Similares resultados fueron reportados por Preciado y col. (2003), quienes obtuvieron un menor crecimiento de la raíz de plántulas de melón y la correspondiente disminución en la absorción de agua y nutrientes.

Al relacionar estos dos parámetros se aprecia que el crecimiento del tallo fue el más afectado, provocando un aumento de la relación longitud de la raíz/tallo con el estrés al compararla con las que se sembraron en 0% de PEG (ver Figura7).

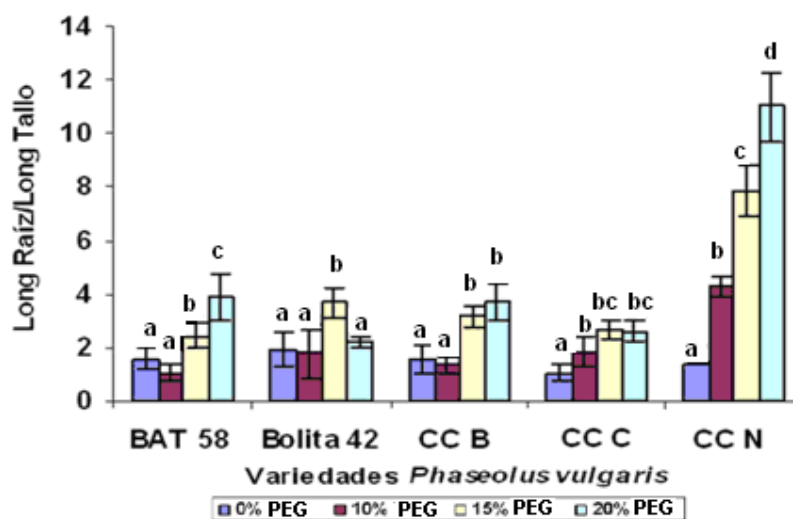


Figura 7. Relación longitud de la raíz/tallo de las variedades de *Phaseolus vulgaris*, a los 15 días de sembrados, en condiciones experimentales. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos para $p \leq 0,05$, según Test de Duncan.

Se pudo constatar que en todas las variedades la relación aumenta significativamente al incrementarse el déficit hídrico, presentando los mayores valores la CC 25-9 negro. Es conocido que el crecimiento de la raíz es menos sensible al déficit hídrico que el de la parte aérea, esto pudiera ser una respuesta adaptativa a la escasez de agua, que le permitirá crecer a una mayor profundidad donde existir agua. Por lo tanto, una mayor afectación del crecimiento de la parte aérea que de la raíz, como consecuencia del déficit de agua, conduce a un aumento de la relación raíz/parte aérea (Mollet y Whitssit, 1996).

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. Las relaciones del sistema radicular y el agua son, sin discusión, el punto capital de su fisiología. Las raíces absorben el agua y cuando falta este elemento descienden a capas profundas del suelo, lo que permite que la planta adquiera un desarrollo adecuado (Molina, 2008).

Aún se desconocen los procesos que generan esa diferencia en la raíz. Sin embargo, su significado desde el punto de vista de la supervivencia de las plantas es de importancia, ya que la mayor tolerancia de la raíz a condiciones de poca agua en el suelo asegura su crecimiento en etapas tempranas de desarrollo, y el uso eficiente de la humedad del suelo antes de la incidencia regular de las lluvias. Esto ha sido probado en cereales como cebada (López y col., 1996; Sánchez y col., 2003) y parece

igualmente importante para el frijol, que se cultiva en vastas zonas de secano de todo el mundo (Madueño y col., 2006).

La masa fresca del tallo y de la raíz disminuyeron significativamente al aumentar el estrés hídrico en todos los cultivares estudiados, presentando los pesos menores los tallos de las plantas que germinaron y crecieron al 20% de PEG, mostrando la mayor afectación en la Variedad CC 25-9 negro (ver Figuras 8 y 9 respectivamente). Esto puede deberse a la disminución del crecimiento y a procesos de deshidratación que se ponen de manifiesto como consecuencia del estrés, lo cual ha sido probado por otros autores como Galvan y col. (2003).

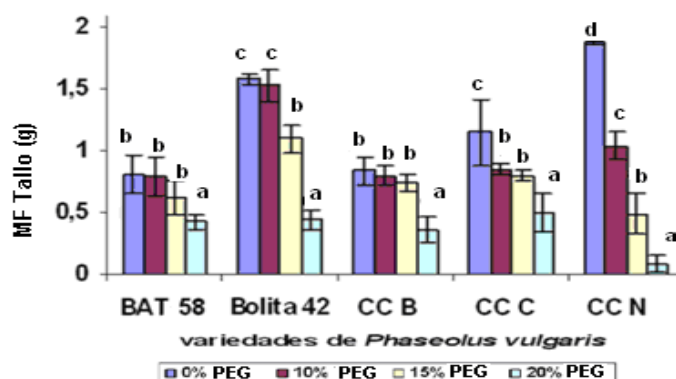


Figura 8. Masa fresca (MF) del tallo, expresado en g, de las variedades de *Phaseolus vulgaris*, a los 15 días de sembrados, en condiciones experimentales. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos para $p \leq 0,05$, según Test de Duncan.

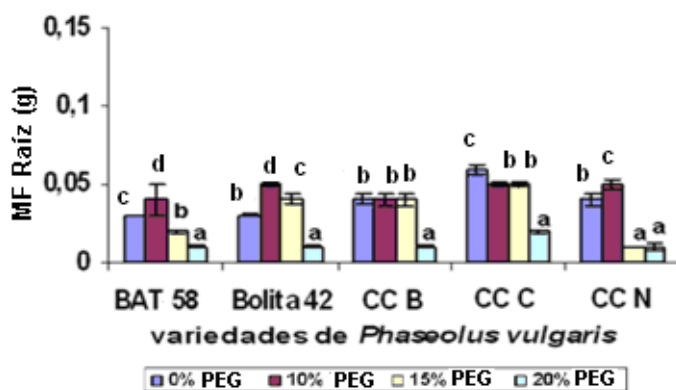


Figura 9. Masa fresca (MF) de la raíz, expresado en g, de las variedades de *Phaseolus vulgaris*, a los 15 días de sembrados, en condiciones experimentales. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos para $p \leq 0,05$, según Test de Duncan.

Los resultados obtenidos muestran que existe una respuesta varietal, ya que todas las variedades no responden igual al efecto del estrés hídrico en esta etapa de desarrollo de la planta. Los mecanismos o características de la raíz que hacen esto posible se

desconocen, pero podrían estar relacionados con la composición de los tejidos o la capacidad para mantener su integridad en condiciones de estrés. Se ha planteado que para germinar las semillas de frijol silvestre y domesticado embeben proporciones de agua estadísticamente diferentes; así, algunos frijoles embeben agua equivalente al 60% de su peso y otros requieren el 100% para germinar (Peña y col., 2002). Podría pensarse que la semilla aporta humedad a la raíz, con la que se asegura su crecimiento inicial hacia zonas más profundas donde podría haber más agua.

Estudios histoquímicos

Los cortes histológicos fueron incubados con dos anticuerpos (LM5 y LM6) con especificidad frente a dos epítomos distintos de ramnogalacturonano I (RGI). Se ha observado con anterioridad que estos epítomos están implicados en cambios en el desarrollo en distintas especies (Willats, 1999 y McCartney y col., 2003).

La expansión o crecimiento celular requiere de la toma de agua por parte de la célula y es uno de los primeros procesos que se ven afectados por la falta de agua.

LM5 [RGI/ β (1,4)-D -galactano)] se ha propuesto como marcador de la zona rápida de elongación en raíces de *Arabidopsis* (McCartney y col., 2003) y de alubia (Willats, 2000). De igual modo se ha observado que LM5 es muy abundante en la superficie de células de zanahoria en elongación (Orfila, 2000), motivo por el cual se ha elegido como indicador de este proceso, porque permite identificar aquellas variedades cuyos procesos de elongación y crecimiento radicular se ven menos afectados por el déficit hídrico.

En la Figura 10, las raíces control (0% PEG) de todas las variedades ensayadas mostraron un intenso inmunomarcaje para LM5 en la zona de elongación, comprendida entre la zona meristemática (zona de división celular) y el inicio de la zona de diferenciación (en la que aparecen pelos radiculares). Las raíces tratadas con 15% de PEG 8000 no sufrieron reducción en el marcaje para LM5 que incluso aumento en las variedades BAT 58 y Bolita 42. Estas variedades fueron también la que presentaron una menor diferencia entre las raíces estresadas y las no estresadas en cuanto a la longitud de la raíz, masa fresca y a la cantidad de raíces secundaria; también fueron las que presentaron los menores porcentajes de inhibición de la germinación por lo que en las condiciones experimentales mostraron un comportamiento tolerante al estrés

hídrico, así como la variedad CC 25-9 negro fue la que mostró la mayor afectación por el déficit hídrico y a su vez es la que presentó un menor marcaje en las raíces estresadas.

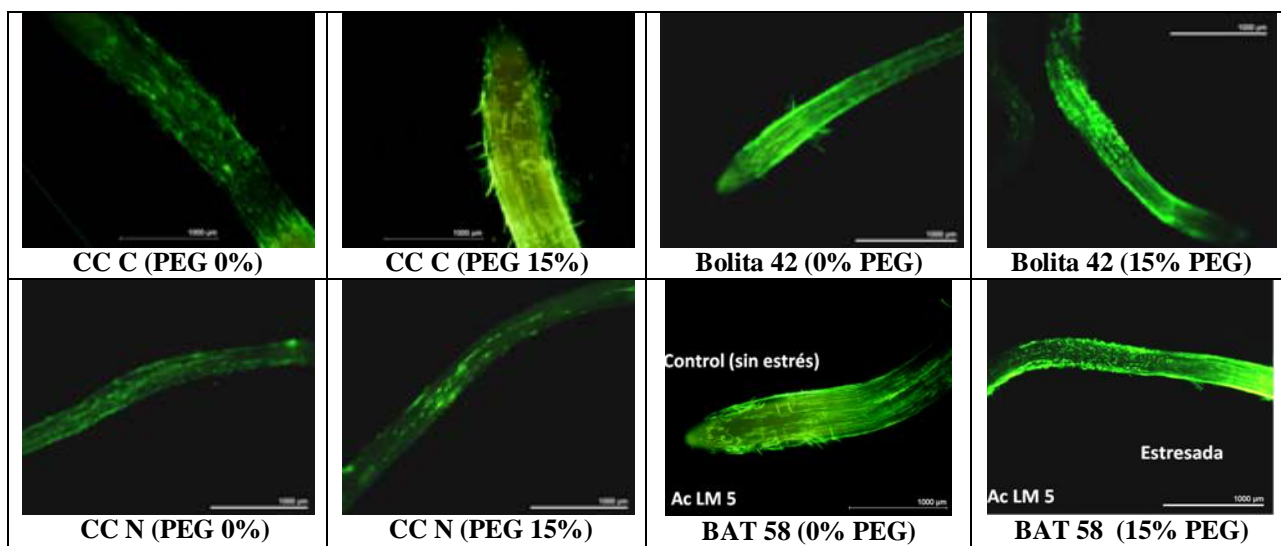


Figura 10. Inmunomarcaje de las raíces estresadas (15% PEG) y no estresadas (0% PEG), de las variedades de *Phaseolus vulgaris*, con el anticuerpo LM5 con especificidad por la zona de elongación.

Otro anticuerpo que se ha empleado para estudiar procesos de crecimiento celular es LM6 [RGI/ α (1,5)-L-arabinano], ya que es especialmente abundante en la zona meristemática y se encuentra ausente en la superficie de células en elongación (McCartney y col., 2003).

El inmunomarcaje con LM6 se distribuyó por toda la raíz en todas las raíces tanto en las plantas del grupo control como en las sembradas con PEG 8000 al 15%, excepto en la zona de elongación rápida. Este resultado parece indicar que en todas las variedades ensayadas, el proceso de elongación es más sensible al estrés hídrico que el proceso de división celular.

5. 2. Experimento 2. Estudios de la etapa de crecimiento

Las variedades en estudio fueron clasificadas inicialmente como tolerantes, medianamente tolerantes y susceptibles, según su respuesta al estrés hídrico al que fueron sometidas. Se tuvo en consideración el estado de marchitez aparente del primordio foliar de las plantas bajo condiciones experimentales de estrés hídrico, sin que llegara a alcanzar el punto de marchitez permanente.

Tabla III. Variedades estudiadas y su clasificación según grado de marchitez bajo condiciones de estrés hídrico

Nº	Variedades y Accesiones	Respuesta estado hídrico
1.	CC 25-9 Colorado	Tolerante (T)
2.	CC 25-9 Negro	Susceptible (S)
3.	CC 25-9 Blanco	Medianamente Tolerante (1/2 T)
4.	BAT 58 Negro	Medianamente Tolerante (1/2 T)
5.	Bolita 42 Negro	Tolerante (T)

Como se puede apreciar en la Tabla III, dos variedades se clasificaron en tolerantes, otras dos en medianamente tolerantes y una en susceptible. A través de la observación macroscópica se pudo constatar que, tanto en estrés moderado como en severo, todas las plantas mantuvieron un desarrollo de sus primordios muy similar o con ligeras diferencias en relación con el control, luego de una semana de tratamientos. La susceptible mostro síntomas de marchitez en el tratamiento de estrés severo, como se puede apreciar en la Figura 11.

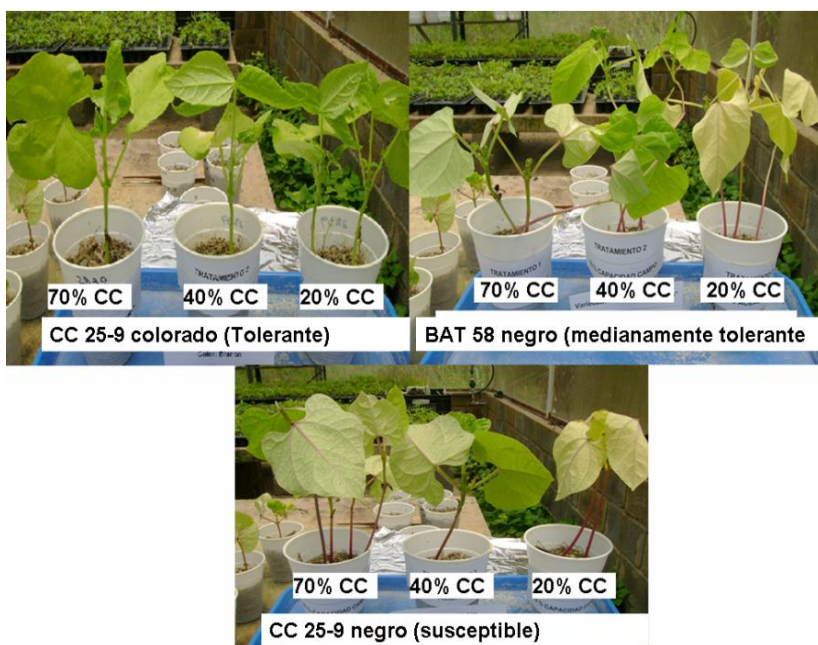


Figura 11. Síntomas de marchitez de los primordios foliares de *P. vulgaris*, L., transcurrida 15 días de tratamientos con los diferentes riegos.

Observaciones generales de la anatomía de las hojas de frijol común.

En la figura 12 se muestra las características anatómicas de las hojas de frijol de las diferentes variedades tanto por la cara adaxial como por la abaxial en condiciones óptimas de riego. La epidermis para todas las variedades estudiadas resultaron ser anfiestomáticas, con aparatos estomáticos del tipo Parasítico, según la secuencia de aparición de los estomas en la lámina foliar tanto en la cara adaxial como abaxial (González, 2008), donde cada célula se encuentra acompañada por una o más células subsidiarias, cuyos ejes longitudinales son paralelos a los de la célula estomática y a la apertura del estoma.

El arreglo y forma de las células epidérmicas es semejante en todas las variedades tanto por la cara adaxial como abaxial de paredes onduladas mucho más marcadas en la cara abaxial, rasgo característico del género *Phaseolus*. Estas características han sido reportadas por Flores y col., (1977); Silva y col., (1999); Stenglein y col., (2003) y Herrera y col. (2005).

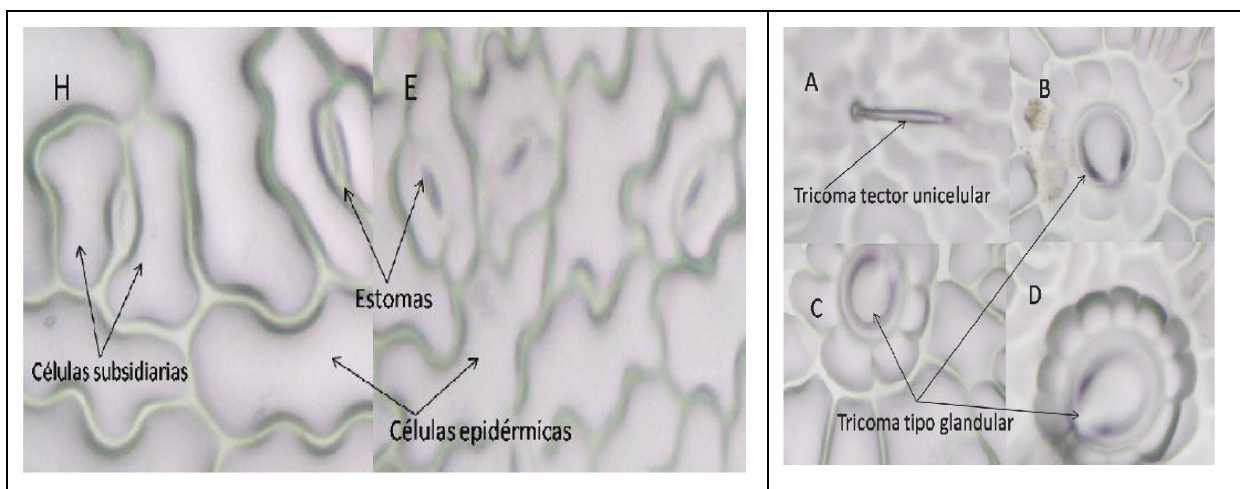


Figura 12. Epidermis adaxial (H) y abaxial (E) con estomas Parasítico. Variedad BAT 58. Aumento 400X (a la izquierda). Pelos o Tricomas: D var: CC- 259 colorado. Aumento 400X (a la derecha)

Los pelos o tricomas observados en la epidermis de todas las variedades estudiadas (Figura 12) son de los dos tipos reportados para la especie *P. vulgaris*, estos son del tipo vector unicelular con más o menos diez células poligonales en la base y del tipo glandular de pedicelo corto formado por tres células y cabeza globosa. Ambos tipos se observaron indistintamente tanto por la cara adaxial como por la abaxial. Por lo que no tienen valor de diagnóstico para las variedades. Estos tipos de tricomas fueron

descritos por Dahlin (1992) para tres cultivares de *P. Vulgaris* y por García y Madriz (2000) para cinco cultivares de frijol Mungo (*Vigna radiata*, L.).

La anatomía del mesófilo de la hoja resultó similar también para todas las variedades analizadas, con estructura dorsiventral constituida por una epidermis superior y una inferior con las características ya descritas, un parénquima en empalizada con dos o tres estratos de células hacia la cara adaxial y un parénquima lagunar hacia la cara abaxial.

Se pudo constatar que los haces conductores aparecieron con la misma estructura para todas las variedades estudiadas, quedando ubicados en el mesófilo de la hoja entre el límite del parénquima clorofílico en empalizada y el parénquima clorofílico lagunar o inmerso en este último, con el xilema ubicado hacia la cara adaxial (epidermis superior) característico de estructuras dorsiventrales, constituyéndose un haz colateral abierto, no se observaron fibras ni esclereidas.

Efecto del estrés hídrico sobre la estructura del mesófilo de la hoja

Al comparar la anatomía del mesófilo de las plantas sometidas a los tres niveles de capacidad de campo (CC), se pudo constatar que en las variedades tolerantes o medianamente tolerantes no se observaron cambios en la estructura del mesófilo, donde el parénquima clorofílico en empalizada, conservó su organización no variando la disposición de las células (Figura 13, A y B), no así en la variedad susceptible donde en el riego al 20% de CC se evidenció la separación de las células del parénquima clorofílico en empalizada, aumentando los espacios intercelulares como aparecen en C y D de la Fig. 13. Esto supondría una disminución en la actividad fotosintética para aquella variedad susceptible debido a que el parénquima clorofílico en empalizada representa dos tercios del grosor del mesófilo de la hoja (Nobel y Walker 1985) y por consiguiente la disminución de cloroplastos y el amarillamiento de las hojas en la variedad susceptible (ver Figura 11). La Rosa y col. (2008) en su estudio del mesófilo de la hoja de *Ipomoea batata*, L., en condiciones de estrés hídrico, encontraron diferencias en la anatomía foliar, observando que las hojas en sequía desarrollan más parénquima lagunar.

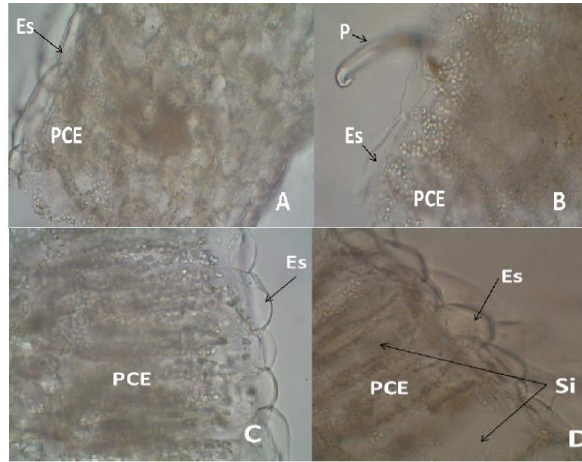


Figura 13. Sección transversal de la hoja de *P. vulgaris* de la variedad CC 25-9 colorado (Tolerante) y CC 25-9 negro (susceptible). A y C: riego al 70% CC, B y D: riego al 20% CC. Es: epidermis superior, PCE: parénquima clorofílico empalizada, Si: espacio intercelular. Aumento 400X.

La epidermis tuvo un comportamiento similar en las tolerantes, en los tres niveles de capacidad de campos estudiados, no así en la susceptible donde se observó un cambio en la anatomía de las células estomáticas y típicas (ver Figura 14).

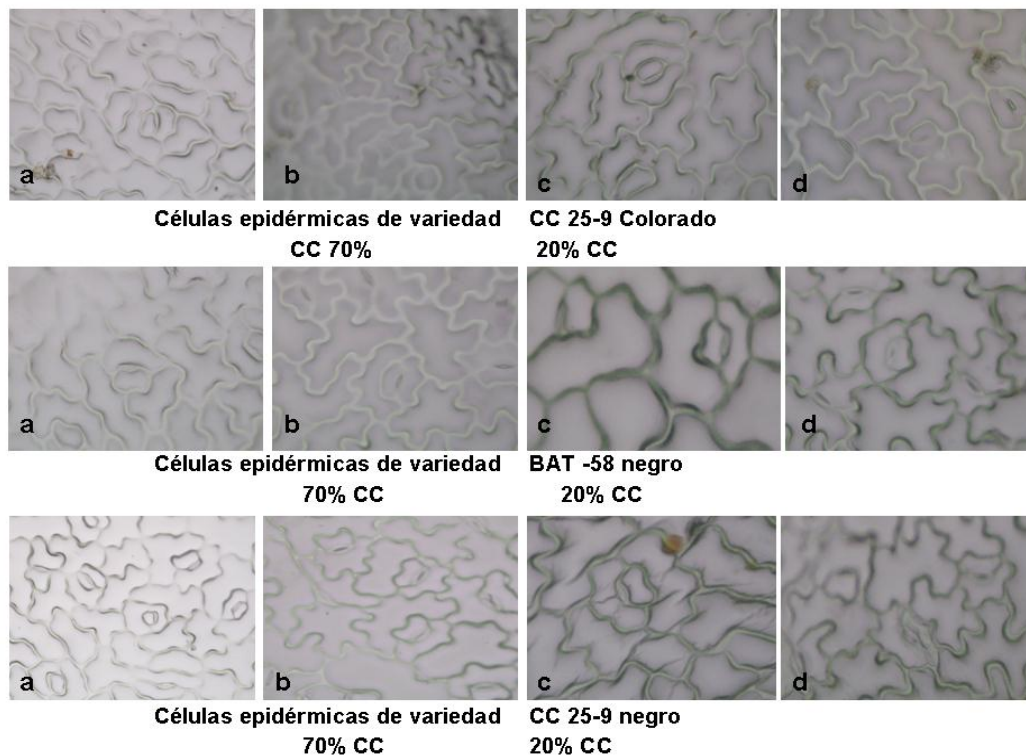


Figura 14. Morfología de células epidérmicas de hojas de *Phaseolus vulgaris* no estresadas (riego 70% CC) y estresadas (20% CC). Aumento 40x, cara adaxial (a y c) y cara abaxial (b y d).

Índice estomático (IE)

El índice estomático indica el número de estomas por superficie foliar independientemente del tamaño de las células epidérmicas. Cuando se comparó esta variable entre las variedades bajo condiciones no estresantes (70 % CC), se observó como generalidad que el IE en el envés de la hoja supera en promedio a la cara adaxial (haz), ver tabla IV. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Silva y col. (1999), donde en los seis cultivares de *P. vulgaris* estudiados, siempre fue mayor el número de estomas por la cara abaxial (envés) que por la adaxial (haz).

Kaymakanova y col. (2008), refieren un mayor número de estomas por la cara adaxial que por la abaxial (tanto para el control como para los tratamientos), en plantas de *P. vulgaris*, pero sometidas a estrés salino. Por otra parte, en la variedad susceptible el IE fue en promedio mayor que el de las tolerantes tanto por la cara adaxial (haz) como por el envés (Tabla IV).

En nuestro trabajo, los valores obtenidos de IE de las variedades estudiadas están en correspondencia con la clasificación realizada como tolerantes y susceptible, teniendo en cuenta los síntomas de marchitez, ya que valores superiores de esta variable implican una mayor pérdida de agua por transpiración y un mayor índice de marchitez.

Tabla IV Comparación de los valores promedio de apertura estomática, índice estomático (IE) del haz y el envés, de las hojas estresadas y no estresadas de las plantas clasificadas en medianamente tolerante (MT), susceptible (S) y tolerante al estrés hídrico.

TIPO	Variable	n	Media	Ds
MT	Apertura estomática	8	2,84	0,14
MT	IE envés estresada	8	36,33	3,77
MT	IE envés no	8	33,99	4,69
MT	IE haz estresada	8	26,19	2,78
MT	IE haz no estresada	8	27,36	3,55
S	Apertura estomática	4	2,50	0,00
S	IE envés estresada	4	53,25	4,93
S	IE envés no	4	49,09	3,48
S	IE haz estresada	4	37,31	3,14
S	IE haz no estresada	4	37,99	2,79
T	Apertura estomática	10	3,83	0,27
T	IE envés estresada	10	20,96	2,63
T	IE envés no	10	22,42	3,52
T	IE haz estresada	10	15,22	1,52
T	IE haz no estresada	10	16,10	1,97

Cuando se analizó el efecto sobre el IE de los tres niveles de capacidad de campo, en cada variedad, por el haz y el envés de la hoja, no se encontraron diferencias significativas entre los resultados obtenidos en ambas caras, por lo que el estrés en nuestras condiciones experimentales no modificó este indicador. El aumento o la disminución del IE pueden estar relacionados con el aumento o disminución en el crecimiento de las células afectadas por condiciones de estrés. La presencia de mayor IE en la variedad CC negro en ambas caras conlleva a una mayor pérdida de agua por transpiración, lo que la hace susceptible. En la literatura existen discrepancias con relación a la variación del IE por factores ambientales. Por una parte, Metcalfe y Chalk (1979) mencionaron que el IE es una característica de valor diagnóstico muy utilizada en la sistemática de plantas, por mantenerse sin alteraciones. Por el contrario, Stenglein y col. (2003) han señalado que es una variable afectada por condiciones estresantes tanto ambientales como nutricionales.

Determinación Área Foliar.

Al determinar el área foliar, pudimos observar que en todas las variedades disminuyó significativamente en condiciones de estrés (20% CC). La variedad CC 25-9 negro presento el mayor porcentaje de inhibición del área foliar con respecto a las hojas no estresadas. El área foliar relativa de las restantes variedades fue semejante sin observarse diferencia significativas entre ellas (ver Figura 15).

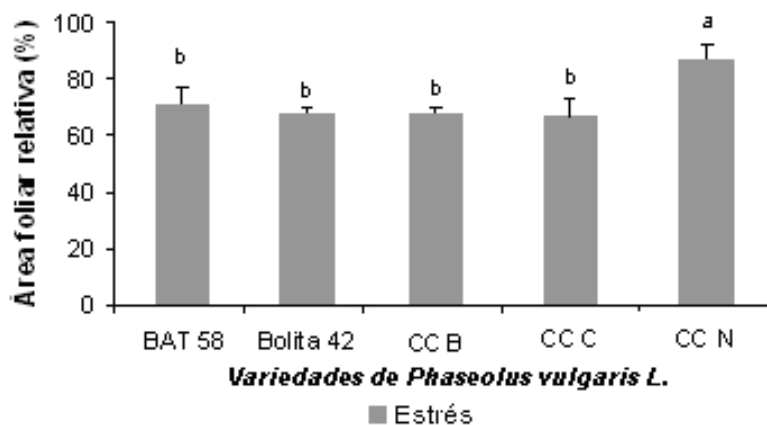


Figura 15. Porcentaje de inhibición del Área Foliar en variedades de *Phaseolus vulgaris*, L., sometidas a condiciones severas de estrés hídrico (20 % CC). Las letras diferentes indican diferencias estadísticas entre las medias del tratamiento con estrés entre las diferentes variedades, $p < 0,05$ según Test de Duncan.

Estos resultados pueden relacionarse con el IE, que puede ser una característica varietal, que está directamente relacionada con la pérdida de agua por transpiración que hace que la planta sea o no susceptible al déficit hídrico. Por otra parte, el estrés acelera la formación de especies reactivas del oxígeno que conducen a un envejecimiento prematuro de la hoja y finalmente la muerte. También incrementa la síntesis de ácido abscísico como consecuencia de cambios de volumen o la turgencia celular. La presencia de condiciones adversas para la raíz induce una respuesta en la parte aérea, como la ralentización del crecimiento de las hojas, el cierre estomático, y la senescencia. Varios autores reportan las afectaciones del área foliar como uno de los primeros cambios que se pueden observar a simple vista en las plantas que sufren déficit hídrico, por lo que se puede considerar un indicador de estrés hídrico (Passioura, 2002 y Mederos y col., 2007). Además, uno de los primeros síntomas que aparecen en condiciones de estrés hídrico es el cierre de los estomas (Alejandrino, 2010), lo que trae como consecuencia una menor captación de CO₂, y por tanto una menor producción fotosintética. Por otra parte en estas condiciones de déficit hídrico se puede acelerar la formación de especies reactivas del oxígeno que conducen a un envejecimiento prematuro de la hoja y finalmente la muerte. Esta respuesta diferente de las distintas variedades al estrés hídrico puede estar relacionada con la capacidad de absorción de agua desde el suelo y/o su emisión en forma de vapor a través de los estomas (Türkan y col., 2005; Bayoumi y col., 2008). Igualmente Atteya, (2003) y Medici y col. (2007) refieren que la respuesta estomática a los cambios en el potencial de agua de las hojas y el ambiente, constituye un mecanismo de regulación importante para la transpiración, así como para la adquisición de CO₂ necesario para la fotosíntesis.

Estudio Fisiológico.

Determinación del Potencial Osmótico (Ψ_s)

En la Figura 16 se muestran los resultados de Potencial Osmótico (Ψ_s) en hojas de *Phaseolus vulgaris*, L., donde se observa que existe una disminución del Ψ_s , en condiciones de estrés severo (20 % CC), en la variedad CC 25-9 negro. Al comparar la relación entre los diferentes grupos clasificados según el comportamiento frente al estrés hídrico (tolerantes y susceptible). En el caso de las variedades CC25-9 colorada

y Bolita 42, no hubo diferencia significativa de este indicador en las hojas estresadas, al compararlas con las no estresadas, a diferencia de las variedades BAT 58 y CC25-9 Blanca donde se observó una disminución de Ψ_s en condiciones de estrés.

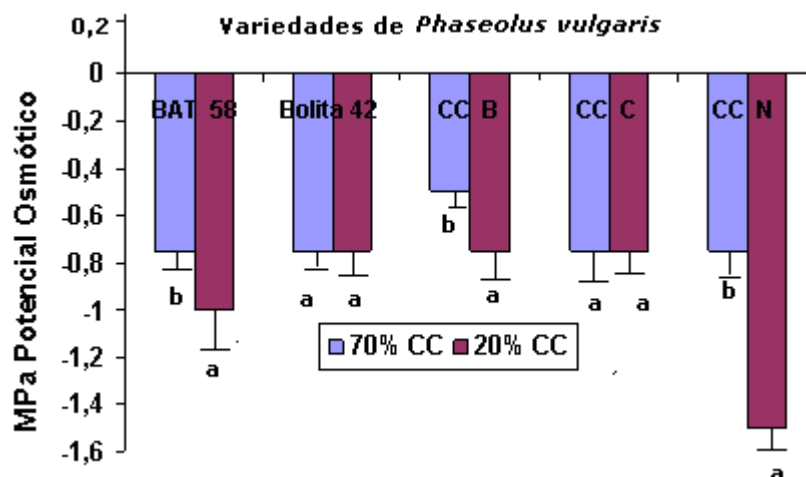


Figura 16. Potencial Osmótico (Ψ_s) en hojas de variedades de *Phaseolus vulgaris*, L., no estresadas (70% CC) y estresadas (20% CC). Las letras diferentes indican diferencias estadísticas entre las medias, para $P \leq 0.05$ según Test de Duncan.

Se pudo constatar que la variedad susceptible presento el valor más negativo del Potencial Osmótico (Ψ_s) en condiciones de estrés (20% de CC).

Al disminuir el contenido de agua se hace más negativo (disminuye) el Ψ_s , en consecuencia disminuirá también el potencial hídrico Ψ_w y la planta en estas condiciones, tenderá a absorber mayor cantidad de agua desde el suelo; pero como el contenido de agua en el suelo es bajo, las plantas pueden sufrir marchitez temporal y si se prolongara la situación por varios días, marchitez permanente, de la cual es muy difícil lograr la recuperación y de lograrse, ya se habrán producido daños en la fisiología de las plantas que conspiran contra el rendimiento. Estos decrecimientos del potencial osmótico pudieran estar influenciados también por el aumento de solutos osmóticamente activos procedentes de nueva síntesis o de la disminución de su catabolismo o transformación.

Resultados similares fueron obtenidos por Barrios y col. (2011) en 8 variedades de frijol del tipo “Flor de Mayo” donde el Ψ_s disminuyó considerablemente más en las plantas que se cultivaron en condiciones de secano (-1,38 Mpa y -1,83 Mpa) que en riego (-1,13 Mpa), quien concluyó que un ambiente con deficiencia de agua en el suelo puede causar disminuciones más acentuadas en el Ψ_w . Igualmente, Martínez y col.

(2007) observaron que el Ψ_s decreció en las plantas de frijol en condiciones de sequía moderada (-1,4 Mpa) con respecto a las plantas con riego (-0,9 Mpa), lo que concuerda con nuestros resultados. Solo los Ψ_s obtenidos por Martínez y col. fueron menores tanto en las plantas sin riego y con suministro de agua. Esto pudo deberse a que las plantas en el primer caso, estuvieron sometidas a mayores temperaturas ambientales, que causaron altas tasas de transpiración y una mayor disminución en el Ψ_s . Por otra parte, Parsons y Howe (1984) observaron que el frijol tepari (*Phaseolus acutifolius*) en condiciones de estrés hídrico, disminuyó sus potenciales Ψ_w y Ψ_s en mayor grado que el frijol común (*Phaseolus vulgaris*, L.), y esto le permitió mantener un mayor potencial de acumulación activa de solutos, turgencia, con un bajo contenido relativo de agua, debido a alguno de los siguientes factores; mayor elasticidad de sus tejidos, mayor acumulación activa de solutos o mayor concentración de solutos.

Determinación del Contenido Relativo de Agua (CRA).

En la Figura 17 se observan los valores correspondientes al CRA en las variedades estudiadas. La mayoría de las variedades estudiadas mostraron una reducción significativa en condiciones drásticas de sequía, excepto las variedades BAT 58 y CC25-9 coloradas.

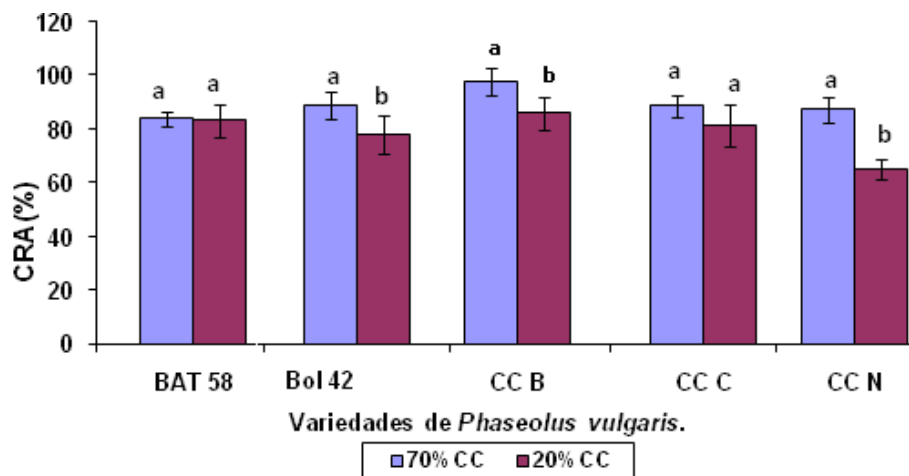


Figura 17. Contenido Relativo de Agua en variedades de *Phaseolus vulgaris*, L., sometidas a condiciones severas de estrés hídrico (20 % CC). Las letras diferentes indican diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos en un mismo genotipo, $p < 0,05$ según Test de Duncan.

Las diferencias observadas entre las distintas variedades pueden ser atribuida a la capacidad de variar la absorción de agua del suelo y/o la capacidad de controlar la pérdida de agua a través de los estomas. A nivel celular operan mecanismos moleculares como la producción de compuestos osmóticamente activos, por ejemplo la prolina que realizan un ajuste osmótico para mantener la turgencia en los tejidos y una actividad fisiológica adecuada.

Similares resultados fueron obtenidos por El-Tayeb (2006) en *Vicia faba*, L. Estudios realizados por varios autores reportan que los genotipos, variedades o especies tolerantes a estrés hídrico muestran mayores porcentajes en el contenido relativo de agua, en comparación con las contrapartes susceptibles bajo condiciones estresantes (Türkan y col., 2005).

Indicadores Bioquímicos

Contenido de Clorofila

Al evaluar el efecto del estrés sobre el contenido de clorofila total en *Phaseolus vulgaris*, se pudo constatar un decrecimiento en las concentraciones de clorofila total en las hojas estresadas de la variedad que fue clasificada como susceptible (CC 25-9 negro), a diferencias de las variedades tolerantes que tuvieron un comportamiento homogéneo en cuanto a niveles de clorofila total, no observándose diferencia significativa con el aumento de las condiciones de estrés hídrico (Figura 18).

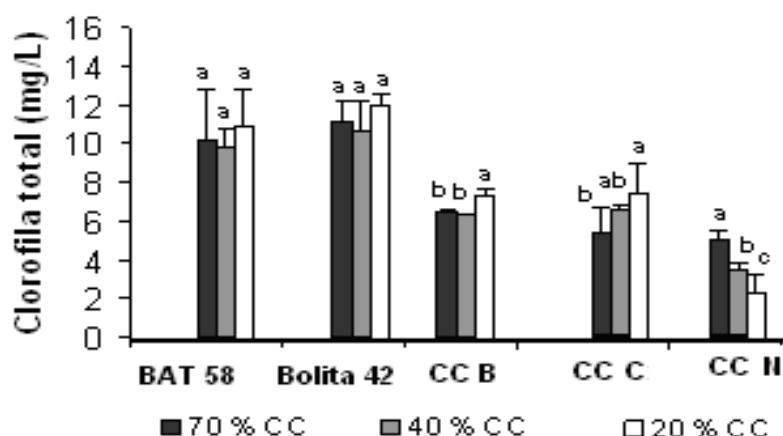


Figura 18. Concentración de clorofila total en variedades de *Phaseolus vulgaris* sometidas a diferentes condiciones de riego. Letras diferentes indican diferencias significativas para $P \leq 0.05$ según Test de Duncan.

Resultados similares fueron obtenidos en experimentos de estrés hídrico realizados con 7 variedades diferentes de *Vicia faba* (Khalafallah y col., 2008) y en numerosas variedades de *Phaseolus vulgaris*, L., comercializadas en Cuba y Venezuela (Alemán y col., 2010).

Contenido de fenoles totales en hojas de *Phaseolus vulgaris*, L.

En la Figura 19 se observan las concentraciones de fenoles totales para las distintas variedades estudiadas. En general se pudo observar una respuesta heterogénea. No hubo diferencia significativa entre las hojas estresadas y no estresadas de las variedades CC 25-9 negro (susceptible) y la CC 25-9 blanco (medianamente tolerante). Sin embargo en la BAT 58 (medianamente tolerante) hubo una disminución significativa en las hojas estresadas. A diferencia en las variedades tolerantes que hubo un incremento significativo en las hojas estresadas.

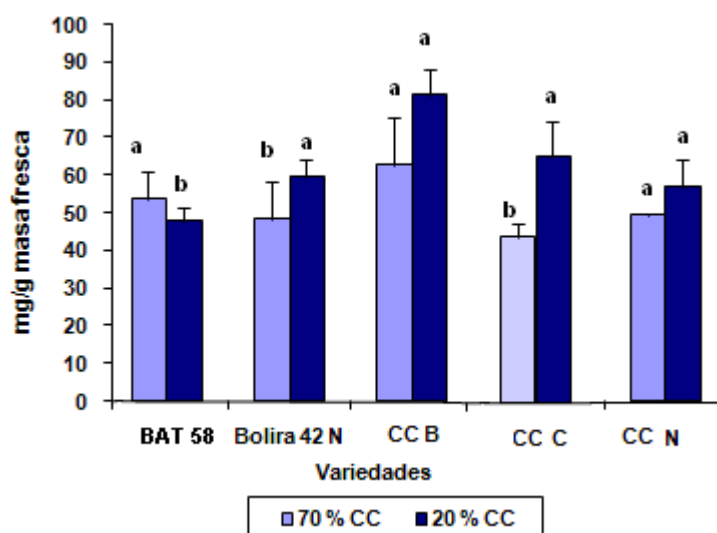


Figura 19. Contenido de fenoles totales en hojas de variedades de *Phaseolus vulgaris*, L., no estresadas (70% CC) y estresadas (20% CC). Las letras diferentes indican diferencias estadísticas entre las medias de los grupos estresados y no estresados de cada variedad, para $P \leq 0.05$ según Test de Duncan.

Resultados similares fueron obtenidos por Tomasz y col., (2007) en estudios con genotipos del género *Triticosecale* resistentes y tolerantes al estrés hídrico. Dichos autores encontraron genotipos clasificados como tolerantes, en estudios de campo, con una mayor concentración de fenoles totales en las plantas estresadas, aunque otros reportaron un decremento de los genotipos estresados respecto al control. De manera similar, se encontraron genotipos sensibles que respondieron indistintamente al estrés

hídrico con un aumento, disminución o sin cambios en los niveles (Telesinski y col., 2008).

Contenido de prolina en hojas de *Phaseolus vulgaris*, L.

En la Figura 20 se muestran los resultados de la concentración de prolina en hojas de *Phaseolus vulgaris*, L., donde se observa que no existió diferencia significativa en el contenido de prolina en las hojas no estresadas (70 % CC). Sin embargo, en las diferentes variedades existió un incremento significativo en la concentración de prolina en condiciones de estrés severo (20 % CC), presentando los mayores contenidos las variedades Bolita 42 y la CC 25-9 blanco, a diferencia de la variedad CC 25-9 negro que presentó el menor valor, esto puede relacionarse con una respuesta común a todas las plantas ante el déficit hídrico que conlleva a un incremento en la síntesis y/o acumulación de prolina libre y que pudiera tener un significado adaptativo.

Comportamiento similar fue reportado por Aguirre y col. (1999) en estudio realizado en el contenido de prolina en las hojas de frijol bajo sistema de raíz dividida donde fue mayor en el tratamiento sometido a la suspensión del riego en comparación con el tratamiento con riego.

Aguilar y col. (2003) encontraron resultados semejantes en diferentes variedades de quinua, atribuyendo este comportamiento a la diversidad de procedencia de las variedades, lo que las hace presentar más o menos desarrollada esta característica de adaptación. Al igual Alemán y col. (2010) reportaron que el contenido de Prolina libre fue mayor en las hojas estresadas de variedades de *Phaseolus vulgaris*, comercializadas en Cuba y Venezuela, siendo los valores más altos los de las variedades tolerantes. El contenido de Prolina presentó también variación entre las variedades.

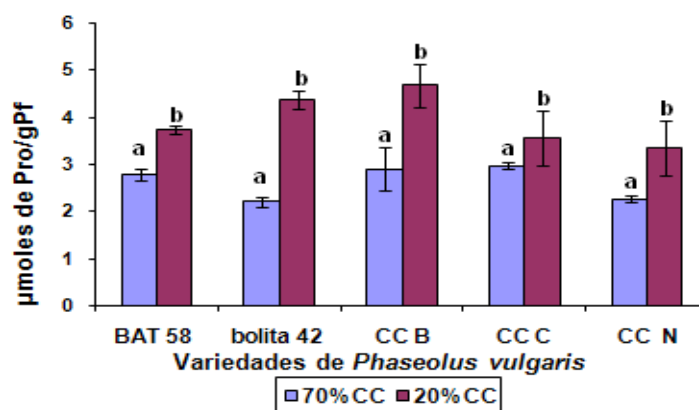


Figura 20. Concentración de prolina en hojas de 5 variedades de *Phaseolus vulgaris*, L., no estresadas (70% CC) y estresadas (20% CC). Las letras diferentes indican diferencias estadísticas entre las medias de los grupos estresados y no estresados de cada variedad, $p < 0,01$ según Test de Duncan.

Resultados similares reportados por numerosos autores, evidencian el papel protector de este aminoácido. Muchas especies de plantas acumulan prolina como respuesta rápida a la sequía evitando el desbalance osmótico y la deshidratación sin alterar su metabolismo (Avendaño y col., 2005; Celikkol, 2010), lo que permite mantener la turgencia de los tejidos y por ende la función celular. Los bajos niveles de este compuesto en tejidos vegetales ha sido considerado por Andrade y col. (1995) como un síntoma de un estrés severo. Por otra parte, la acumulación de prolina ha sido atribuida a un aumento de su biosíntesis y disminución en su degradación (Kavi y col., 2005). Sin embargo, otros autores consideran que la acumulación de prolina puede ser un indicador del estado hídrico, pero no de la tolerancia o la sensibilidad al déficit hídrico (Lazcano y Lovatt, 1999). De hecho, algunos investigadores han obtenido un incremento en el contenido de prolina en las plantas cultivadas con déficit hídrico, en comparación con plantas bajo riego (Avendaño y col., 2005, y Celikkol, 2010). Esta acumulación, según Chaman (2007), se inicia por un ajuste osmótico en los tejidos de las células, como respuesta a la adaptación de las plantas cuando son sometidas a estrés hídrico.

Diversos autores han señalado que en algunas especies la acumulación de solutos favorece la absorción de agua, y que de esta manera la turgencia de los tejidos, y por ende el crecimiento, son mantenidos dentro de ciertos límites (Avendaño y col., 2005). Al respecto, Cruz (2001) demostró que el ápice de la raíz de maíz acumula más prolina en condiciones de déficit de agua. También el efecto de las diferencias de la composición química de la testa (taninos y polisacáridos estructurales) así como

electrolitos, contenido de almidón y proteínas en otras parte de las semillas, de frijoles silvestres y domesticados, han sido estudiados (Peña y col., 2002; Flores, 2002).

Actividad catalasas y peroxidasas

En la figura 21 y 22 se muestran los resultados de la determinación de la actividad enzimática de las catalasas y peroxidasas, respectivamente, en las hojas estresadas (20% CC) y las no estresadas (70% CC) de las diferentes variedades estudiadas.

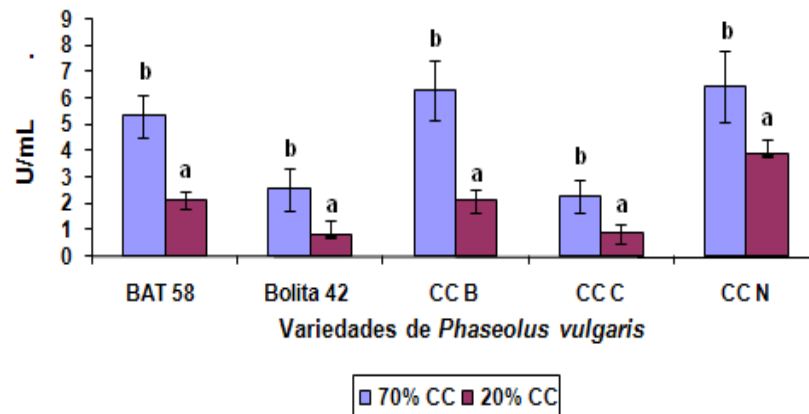


Figura 21. Actividad catalasas en hojas de *Phaseolus vulgaris*, L., no estresadas (70% CC) y estresadas (20% CC). Las letras diferentes indican diferencias estadísticas entre las medias de los grupos estresados y no estresados de cada variedad, $p < 0,01$ según Test de Duncan.

El resultado de la determinación de la actividad enzimática mostró una disminución significativa en la actividad catalasas en las hojas estresadas (20% CC), al compararlas con las no estresadas (70% CC) (Figura 21). La disminución de la actividad catalasas en las condiciones severas de estrés hídrico pudiera ser el resultado del incremento en la producción de radicales libres y su interacción con grupos específicos de la enzima, su posible oxidación e inactivación. En este sentido Hung y col. (2005) plantearon que el H_2O_2 puede interactuar con residuos de cisteína dentro de la proteína. La modulación redox de dicha proteína podría potencialmente alterar la conformación proteica, afectando la actividad de la misma y por tanto iniciar subsecuentes respuestas celulares. Se pudo constatar que las variedades tolerantes (CC 25-9 colorado y Bolita 42) presentaron la menor declinación de la actividad en condiciones de estrés severa (20% CC), así como los menores niveles de actividad en condiciones normales, esto puede deberse que estas variedades constan con otros mecanismos protectores del estrés, lo que no permite una gran elevación de los niveles de H_2O_2 , a diferencia de la

variedad CC25-9 negro (susceptible), que presentó los mayores niveles de actividad enzimática, siendo significativamente diferente a las restantes, esto pudiera deberse a que esta variedad presenta cambios morfológicos como la separación de las células del parénquima clorofílico en empalizada, aumentando los espacios intercelulares, un mayor índice estomático que la hacen más susceptible al estrés por lo que puede presentar niveles elevados de H₂O₂ provocando un mayor incremento de la actividad catalasas, constituyendo este un mecanismo de defensa primordial para esta variedad .

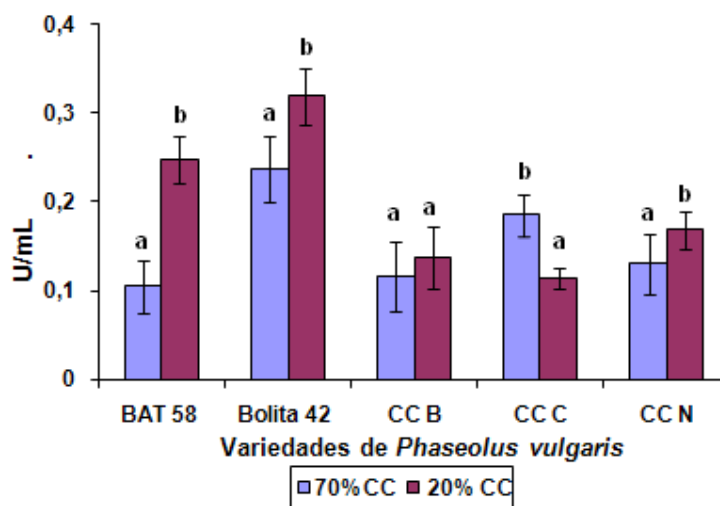


Figura 22. Actividad peroxidasas en hojas de 5 variedades de *Phaseolus vulgaris*, L., no estresadas (70% CC) y estresadas (20% CC). Las letras diferentes indican diferencias estadísticas entre las medias de los grupos estresados y no estresados de cada variedad, $p < 0,01$ según Test de Duncan.

Con relación a la actividad peroxidasas (Figura 22) no hubo un comportamiento homogéneo. En la variedad CC 25-9 blanco, el déficit hídrico no afectó la actividad peroxidasas. En el caso de las variedades CC25-9 negro, BAT 58 y Bolita 42 hubo un incremento significativo de dicha actividad en las hojas estresadas, al compararla con las no estresadas, a diferencia de la variedad CC25-9 colorada donde se observó una disminución en condiciones de estrés. Al comparar la respuesta varietal en las diferentes condiciones de humedad, se pudo constatar que las variedades medianamente tolerantes y susceptible presentaron los valores más bajo de actividad peroxidasas a un 70% de CC. En idénticas condiciones los valores más altos lo presentaron las variedades tolerantes (Bolita 42 y CC 25-9 colorado). Sin embargo, en

condiciones de estrés la respuesta fue heterogénea. El incremento en las peroxidasas a diferencia de las catalasas puede deberse a que las peroxidasas y las catalasas juegan un papel diferente en la eliminación del H_2O_2 . Donde las peroxidasas es la responsable de una modulación fina y las catalasas remueve los excesos de radicales libres durante el estrés. El H_2O_2 en los cloroplastos es eliminado por acción de peroxidasas, por lo que si la actividad de las peroxidasas es eficiente es poco probable que ocurra la difusión del H_2O_2 de los cloroplastos hasta los peroxisomas para su posterior eliminación por las catalasas (Arora y col., 2002).

Los efectos del estrés hídrico sobre la actividad enzimática, reportado en la literatura, son controvertidos, porque es reconocido que estos sistemas enzimáticos juegan un papel importante en la eliminación de las especies reactivas del oxígeno (ERO), lo que permite a la planta crecer en condiciones adversas del medio ambiente, provocando un incremento de dichos radicales (Jebara y col., 2005; Bai y col., 2009). Altos niveles de actividad de peroxidasas han sido reportados en diferentes estudios en frijol bajo condiciones de estrés (Türkan y col., 2005; Yang y col., 2008 y Ozkur y col., 2009). Sin embargo Celikkol y col. (2010) no encontraron un incremento significativo en la actividad peroxidasas en 8 cultivares de maní bajo condiciones de estrés hídrico mediado por PEG.

Se ha podido constatar en diversos estudios que esta respuesta depende del tipo de cultivo, del grado de estrés, del desarrollo de la planta y del grado de tolerancia al déficit hídrico (Contour y col., 2006), por lo que el rol que juegan los diferentes sistemas antioxidantes puede variar con la familia, y las variedades (Celikkol y col., 2010).

VALORACIÓN ECONÓMICA

Es preciso destacar que las variedades tolerantes CC 25-9 colorado y la Bolita 42 una vez llevadas a condiciones de producción influirán en los resultados económicos, ya que permitirá una disminución de los gastos por concepto de riego, debido al ahorro en el consumo del agua y combustible para el cultivo de estas variedades tolerantes al déficit hídrico.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

- Se demuestra la influencia negativa del estrés hídrico sobre el porcentaje de germinación de las plantas y los parámetros morfofisiológicos longitud del tallo, masa fresca del tallo y la raíz, aparición del epicótilo y las hojas verdaderas y elongación de la raíz en las variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*, L.) estudiadas.
- Se clasifican las cinco variedades en estudio en las categorías de tolerantes (CC 25-9 colorado y Bolita 42), medianamente tolerantes (BAT 58 y CC 25-9 blanca) y susceptibles (CC 25-9 negro), de acuerdo con su respuesta al estrés hídrico en condiciones experimentales.
- Se comprueba que en la variedad CC 25-9 negro, clasificada como susceptible por su respuesta al estrés hídrico, se presenta el mayor índice estomático y se observan cambios morfofisiológicos y bioquímicos como los siguientes: alteraciones en la estructura del mesófilo, potencial osmótico significativamente más negativo, mayor disminución del contenido relativo de agua (CRA) con respecto al control, disminución notable del contenido de clorofila y menor contenido de prolina que en las variedades restantes.
- Se demuestra que en el comportamiento de las variedades CC 25-9 colorado y Bolita 42 como tolerantes al estrés hídrico, han incidido particularmente la anatomía de las hojas, la no afectación del contenido de clorofila, del contenido relativo de agua (CRA), ni del potencial osmótico con el incremento del déficit hídrico; a diferencia del contenido de prolina que aumenta significativamente. Además, la actividad enzimática no parece ejercer un remarcado efecto protector del estrés hídrico en estas variedades.

RECOMENDACIONES

7. RECOMENDACIONES

Realizar experimentos de campo donde se pueda corroborar los resultados obtenidos y correlacionarlos con el rendimiento, profundizando en el conocimiento de las variedades clasificadas como tolerantes (Bolita 42 y CC 25-9 C) ya que la mejor variedad será la que tenga una buena respuesta al déficit hídrico pero con un rendimiento adecuado.

Aplicar estos resultados en futuros trabajos de mejora genética.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

Abderrahman, W. 2002. "Policy Analysis of Water, Food Security and Agriculture in Saudi Arabia." Compendio bibliográfico preparado para el Banco Mundial con ocasión del Tercer Foro Mundial del Agua, 16 al 23 de marzo de 2003, Kyoto. King Fahd University of Petroleum and Minerals, Dhahran, Arabia Saudita.

Afrol News. 2006. "Ghana Goes Ahead with Controversial Water Privatisation." 13 de enero. [www.afrol.com/articles/15312]. Julio de 2006.

Aguilar, P. C.; Cutipa, Z.; Machaca, E.; Lopez, M. and Jacobsen, S. E. 2003. Variation of proline content of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) in high beds (waru-waru). Food Reviews Internacional, 19, 121-127.

Aguirre, J. F.; Kohashi, J.; Trejo, C. L.; Acosta, J. 1999. Respuesta Fisiológica del frijol (*Phaseolus vulgaris*, L.) a la sequía, en un sistema de raíz dividida. Agronomía Mesoamericana 10(1): 31-36.

Alemán, S.; Fuentes, L.; Domínguez, A. y Pérez, Y. 2007. Los estudios histológicos como base para la interpretación de las respuestas fisiológicas en las plantas. CD-ROM. ISBN: 978-959-16-0632-7.

Alemán, S.; Domínguez, A.; Domínguez, D.; Fuentes, L.; Pérez, Y. Pernía, B.; Sosa, D.; Sosa, M. Infante D. 2010. Estudio anatómico y bioquímico en materiales cubanos y venezolanos de *Phaseolus vulgaris*, L. bajo condiciones de estrés hídrico. RET, Vol 1 N0:1, Pp: 89-99.

Andrade, J. L. ; Larqué, A. and Trejo, C. 1995. Proline accumulation in leaves of four cultivars of *Phaseolus vulgaris*, L. with different drought resistance. Fyton, 57(2), 149-157.

Araral, E. 2005. "Water User Associations and Irrigation Management Transfer: Understanding Impacts and Challenges." En Priya Shyamsundar, Eduardo Araral y Suranjan Weeraratne, eds., *Devolution of Resource Rights, Poverty and Natural Resource Management: A Review*. Environmental Economics Series Paper 104. Washington, D. C: Banco Mundial.

Arora, A.; Byrem, T. M.; Nair, M.G. and Strasburg, G. M. 2000. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 373: 102–109.

Arora, A.; Sairam, R. K. and Srisvastava, G. C. 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. Review article. *Current Science*, 82, 1227-1238.

Ascón, J. y Taylón, M. 2000. Fundamentos de fisiología vegetal. Mc Graw - Hill/ Interamericana de España. Primera Edición. ISBN: 84 - 486 - 0258-7. Cap 2, p18.

Ashraf, M. and Iram, A. 2005. Drought stress induced changes in some organic substances in nodules and other plant parts of two potential legumes differing in salt tolerance. *Flora*, 200: 535-546.

Atteya, A. M. 2003. Alteration of water relations and yield of corn genotypes in response to drought stress. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* 29:63-76.

Avendaño, C. H.; Trejo, C.; López, C.; Molina, D. J; Santacruz, A. y Castillo, F. 2005. Comparación de la tolerancia a la sequía de cuatro variedades de maíz (*Zea mays*, L.) y su relación con la acumulación de prolina. *INCI* 9, 560-564.

Bai, J.; Gong, C. M.; Chen, K.; Kang, H. M. And Wang, G. 2009. Examination of antioxidative system's responses in the different phases of drought stress and during recovery in desert plant *Reaumuria soongorica* (Pall.) Maxim. *J Plant Biol* 52:417–425.

Ballabh, V. 2005. "Emerging Water Crisis and Political Economy of Irrigation Reform in India." En Ganesh P. Shivakoti, Douglas L. Vermillion, Wai-Fung Lam, Elinor Ostrom, Ujjwal Pradhan y Robert Yoder, eds., *Asian Irrigation in Transition: Responding To Challenges*. Nueva Delhi y Londres: Sage.

Banco Mundial. 2006. *Hazards of Nature, Risks to Development*. An IEG Evaluation of World Bank Assistance for Natural Disasters. Grupo de Evaluación Independiente, Washington, D.C.

Barrios, J.; López, C. y Kohashi, J. 2011. Relaciones hídricas y temperaturas altas en frijol del tipo "flor de mayo". Trabajo para obtener el grado de Doctor en Ciencias. Agron. Costarricense vol.35 no.1 San Pedro de Montes de Oca. Versión ISSN 0377-9424.

Bates, L. S.; Waldren, R. P. and Teare, I. D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Short communication. *Plant and Soil*. V. 39: 205-207.

Bartels, D. and Sunkar, R. 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 24: 23–58.

Bauder, J. 2003. Impacto, crecimiento y el desarrollo de las plantas. Presentación realizada en la Sociedad Americana de Agronomía, CropScienceSociety of America, y la Ciencia del Suelo Society of America. Reuniones Anuales de 2003.

Bayoumi, T. Y.; Manal, H. E. and Metwali, E. M. 2008. Application of physiological and biochemical indices as a screening technique for drought tolerance in wheat genotypes. *African Journal of Biotechnology*, 7 (14), 2341-2352.

Beebe, S.; Rao, I. M.; Cajiao, C. and Grajales, M. 2008. Selection for drought resistance in common bean also improves yield in phosphorus limited and favorable environments. *Crop Sci.* 48, 582-592.

Bergmeyer, H. U. 1974. *Methods of Enzymatic Analysis 1*, Academic Press, New York. 2nd Edition, page 495.

Benites, M. 2008. Características fenotípicas de líneas de frijol común tolerantes a la sequía y a la baja fertilidad. Proyecto especial de Ingeniero Agrónomo en Ciencia y Producción Agropecuaria, Zamorano, Honduras. p18.

Bernal, J. and Willats, G. T. 2004. Plant science in the age of phage. *Trends in plant science*, 9(10):465-8.

Boutra, T. and Sanders, F. E. 2001. Influence of water stress on grain yield and vegetative growth of two cultivars of bean (*Phaseolus vulgaris*, L.) *J. Agron. Crop Sci.* 187: 251-257.

Bray, E. 1997. Plant responses to water deficit. *Trends in plant science*, 2 (2), 4854.

Bray, E. 2002. Abscisic regulation of gene expression during water deficit stress in the era of the *Arabidopsis* genome *Plant. Cell and Environment*, 25, 153-161.

Brevedan, R. E. and Egli, D. B. 2003. Short periods of water stress during seed filling, leaf senescence, and yield of soybean. *Crop Sci.* 43: 2083-2088.

Cabrera, G. 1972. Un estudio de la recuperación después de un período de sequía en *Nicotina tabacum*, L. Maracay, Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía. 166 p. (Trabajo de ascenso-UCV, Fac. Agron.).

Cachorro, P. A.; Ortiz, A. and Cerda, A. 1993. Growth, water relations and solute composition of *Phaseolus vulgaris*, L. under saline conditions. *Plant Sci.* 95: 23-29.

Castañeda, W. C. 2000. El Frijol, importancia a nivel nacional y mundial. Alumno de la Facultad de Agronomía. (Cod. 960371-B). UNPRG – Lambayeque. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos4/elfrijol/elfrijol.shtml> [Consulta: Diciembre, 06, 2011].

Castañeda, C.; Córdova, L.; González, V. A.; Delgado, A.; Santacruz, A. y García, G. 2006. Respuestas fisiológicas, rendimiento y calidad de semilla en frijol sometido a estrés hídrico. Jun. 2006, VOL. 31 N° 6.

Celikkol, U.; Ercan, O., Kavas, M.; Yildiz, C.; Yilmaz, H.; Oktem, A. and Yucel, M. 2010. Drought-induced oxidative damage and antioxidant responses in peanut (*Arachis hypogaea*, L.) seedlings. *Plant Growth Regul* (2010) 61:21–28.

Contour, D.; Torres, M. L.; Cruz, H.; Darcy, A. and Zuily, Y. 2006. Glutathione reductase in leaves of cowpea: cloning of two DNAs, Expression and enzymatic activity under progressive drought stress, desiccation and abscisic acid treatment. *Ann Bot* 98:1279–1287.

Cruz, C. S. 2001. Características fisiológicas y biofísicas de la raíz de maíz (*Zea mays*, L.) involucradas en la tolerancia a la sequía. Tesis. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. p 69.

Chance, B. and Machley, A. 1955. Assays of catalasses and peroxidases. *Methods Enzymol.* 2, 764-775.

Chaman, M. E. 2007. Variaciones en el contenido relativo de agua y la concentración de prolina en *Capsicum annuum*, L. inducido por NaCl. *Arnaldoa* 14(2):251- 258. ISSN: 1815-8242.

Chaves, M. M.; Maroco, J. P. and Pereira, J. S. 2003. Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30: 239–264.

Chazan, M. 2008. *World Prehistory and Archaeology: Pathways through Time*. Pearson Education, Inc. ISBN 0-205-40621-1.

Degenhardt, B. and Gimmler, H. 2000. Cell wall adaptations to multiple environmental stresses in maize roots. *Journal of Experimental Botany*, 51 (344): 595-603.

Di Rienzo, J. A.; Balzarini, M.; Casanoves, F.; González, L.; Tablada M. y Robledo, C. W. 2011. InfoStat/ profesional versión 1.1. Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba.

Ecured Portable. 2011. Planta de frijol. Disponible en:
<http://www.ecured.cu/index.php/Frijol> [Consulta: Diciembre, 05, 2011].

Dahlin, R.; Brick, M. and Oog, J. 1992. Characterization and density of trichomes on three common bean cultivars. *Economic Botany* 46; 299-304.

El-Tayeb, M. A. 2006. Differential Responses of Pigments, Lipid Per-oxidation, Organic Solutes, Catalase and Per-oxidase Activity in the Leaves of Two *Vicia faba* L. Cultivars to Drought. *Int. J. Agri. Biol.*, Vol. 8, No. 1.

EROSKI CONSUMER. 2011, Medio Ambiente Urbano. Disponible en:
<http://Estrés hídrico EROSKI CONSUMER.mht> [Consulta Junio, 23, 2011]

Esquivel, F.; Padilla, J. S.; Ochoa, R. y Reyes, L. 2002. Efecto de la fecha de siembra y el régimen de humedad en el desarrollo de pudriciones de raíz y el rendimiento de frijol común (*Phaseolus vulgaris*, L.). *Revista mexicana de Fitopatología*, 2 (2) 161-167.

Expósito, R. y García, N. 2011. Comportamiento productivo de cultivares de frijol negro (*Phaseolus vulgaris*, L.) En la Cooperativa de Créditos y Servicios "José Manuel Rodríguez" del Municipio Jesús Menéndez. *Revista académica de economía*. ISSN 1696-8352.

Farooq, M.; Basra, S. M.; Wahid, A.; Cheema, Z. A.; Cheema, M.A. and Khaliq, A. 2008. Physiological role of exogenously applied glycinebetaine in improving drought tolerance of fine grain aromatic rice (*Oryza sativa*, L.). J. Agron. Crop Sci., 194: 325–333.

FAO. 2003. Estadística anual 2003. Disponible en: http://www.fao.org/waicent/portal/statistics_es.asp [Consulta 12 de febrero de 2011].

Fernández, A. 2008. Gran parte del país registra un elevado riesgo de sufrir un deterioro de la cantidad y calidad del agua. Disponible en: <http://Estrés hídrico Agua en peligro.mht> [Consulta Junio, 30, 2011].

Ferraris, G. y Couretot, L. 2011. Fertilización Con Micronutrientes En Soja. Experiencias En La Región Centro - Norte De Buenos Aires Y Sur De Santa Fe. En: Actas del Congreso Mercosoja 2011. Foro Fertilizantes e Inoculantes. Rosario, Argentina.

Flexas, J. and Medrano, H. 2002. Drought – Inhibition of photosynthesis in C3 plants: Stomatal and non – stomatal limitations. *Annals of Botany* 89: 183-189.

Flores, D. A. 2002. Potencial agroindustrial del frijol silvestre (*Phaseolus vulgaris*, L.): Composición química. Tesis. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. pp 75.

Galván, M.; Kohashi, J.; Garcia, A.; Yáñez, P.; Martínez, E. y Ruiz, L. 2003. Déficit hídrico en planta. Acumulación de biomasa y área foliar en tres etapas vegetativas en frijol común. *Agricultura Técnica en México*. 29 (2): 101-111.

García, P. 2005. Plasticidad estructural de la pared celular durante la habituación-deshabituación de cultivos celulares de alubia a diclobenil. Tesis en opción del grado de Doctor en Ciencias Biológicas, Universidad de León, España.

García, M. y Madriz, P. 2000. Anatomía foliar comparada de cinco genotipos de frijol mungo, *Vigna radiata*, (L.) Wilczek *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 16, 610-620.

González, A. 2007. Ecofisiología y morfología del estrés debido a factores adversos. Disponible en: <http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro07/Cap3>. [Consulta: Marzo, 06, 2012].

González, L. 2010. En Cuba Frijoles. Disponible en: <http://cubaout.wordpress.com/2010/08/11/en-cuba-%C2%A1-ni-frijoles/> [Consulta: Diciembre, 03, 2011].

González, A. M. 2008. Morfología de Plantas Vasculares. Tema 13. Disponible en: <http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema13/13-6clasifist.htm> [Consulta: Diciembre, 03, 2011].

Gore, J. 2010. El efecto del estrés hídrico de las plantas. Disponible en: http://translate.googleusercontent.com/translate_c?hl=es&langpair=en%7Ces&u=http://www.ehow.com/about_6597905_effect-water-stress-plants.html&rurl=translate.google.com.cu&usg=ALkJrhjhkHtRFNUvP_piaXFoPNmFaNY12A#ixzz14qjJixIT [Consulta julio, 15, 2011].

Hangen, L. A. And Bennink, M. R. 2003. Consumption of black beans and navy beans (*Phaseolus vulgaris*) reduced azoxymethaneinduced colon cancer in rats. *Nutr Cancer* 44: 60–65.

Herrera, T. S.; Cárdenas, E.; Ortiz, J.; Acosta, J. and Mendoza, M. C. 2005. Anatomy of the pod of three species of the genus *Phaseolus*, *Agrociencia*, 39, 595-602.

Harsh, N. 2003. Accumulation of osmolytes and osmotic adjustment in water-stressed wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) as affected by calcium and its antagonists. *Environmental and Experimental Botany* 50: 253-264.

Henry, A.; Rosas, J. C.; Beaver, J. S. and Lynch, J. P. 2008. Multilines of contrasting root architecture: Multiple stress response and belowground competition. *Crop Science* (sometido para publicación).

Huang, B. and Gao, H. 2000. Root physiological characteristics associated with drought resistance in tall fescue cultivars. *Crop Sci.* 40, 196-203.

Hung, S.H.; Yu, C.W. and Lin, C.H. 2005. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 46: 1-10.

IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura). 2008. Raíces del frijol rojo para resistir sequía y baja fertilidad de los suelos (en línea). 28 de septiembre de 2008. Disponible en: <http://webiica.iica.ac.cr/prensa/boletines/nicaragua/default.asp?boletin=Boletin195&num=195> [Consulta enero, 23, 2012].

Jaleel, C. A.; Gopi, R.; Sankar, B.; Gomathinayagam, M. and Panneerselvam, R. 2008a. Differential responses in water use efficiency in two varieties of *Catharanthus roseus* under drought stress. *Comp. Rend. Biol.* 331: 42–47.

Jaleel, C. A.; Manivannan, P.; Lakshmanan, G. M.; Gomathinayagam, M. and Panneerselvam, R. 2008b. Alterations in morphological parameters and photosynthetic pigment responses of *Catharanthus roseus* under soil water deficits. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 61: 298–303.

Jebara, S.; Jebara, M.; Limam, F. and Aouani, M. E. 2005. Changes in ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. *J Plant Physiol* 162:929–936.

Jiménez, F. A.; Becerra, F. E.; Hernández, L. M.; Rodríguez, J. A.; Acosta, J. G. and Ramírez, P. 2006. Proline accumulation in two bean cultivars under salt stress and the effect of polyamines and ornithine. *Biologia Plantarum* 50: 763-766.

Kavi, P. B.; Sangam, S.; Amrutha, R. N.; SriLaxmi, P.; Naidu, K. R.; Rao, K. R.; Sreenath S. S.; Reddy, K. J.; Theriappan, P. and Screenivasulu, N. 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science*, 88 (3), 424-438.

Kaymakanova, M.; Stoeva, N. and Mincheva, T. 2008. Salinity and its effects on the physiological response of bean (*Phaseolus vulgaris*, L.) *Rev. Central European Agriculture*, 9 (4), 749-756.

Khalafallah, A. A.; Tawfik, K. M.; Zinab, A. and El-Gawad. 2008. Tolerance of Seven Faba Bean Varieties to Drought and Salt Stresses. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 4 (2), 175-186.

Konstantinova, T.; Parvanova, D.; Atanassov, A. and Djilianov, D. 2002. Freezing tolerant tobacco, transformed to accumulate osmoprotectants. *Plant Science*. 163: 157-164.

Kumar, A.; Omae, H.; Egawa, Y.; Kashiwaba, K. and Shono, M. 2006. Adaptation to heat and drought stresses in snap bean (*Phaseolus vulgaris*) during the reproductive stage of development. *Japan Agricultural Research Quarterly* 40(3):213-216.

La Rosa, R.; Contreras, J.; Mendoza, A.; Macabilca, Y. y Gutiérrez, A. 2008. Cambios morfofisiológicos de *Ipomoea batata*, (L.) Lam. Durante el estrés por sequía. *Biologist (Lima)*. 6(1) (8-12).

Lazcano, I. and Lovatt, C. J. 1999. Relationship between Relative Water Content, Nitrogen Pools, and Growth of *Phaseolus vulgaris*, L. and *P. acutifolius* A. Gray during Water Déficit. *Crop Sci* 39:467-47.

Lei, Y. B.; Yin, C. Y. and Li, C. Y. 2006. Differences in some morphological, physiological, and biochemical responses to drought stress in two contrasting populations of *Populus przewalskii*. *Physiologia Plantarum* 127: 182–191.

Loforte, R. 2007. Evaluación agronómica de líneas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*, L.) fortificadas en los sistemas locales de producción en el municipio de Mayarí, provincia de Holguín. (En opción al título de ingeniero agrónomo). Centro Universitario de Las Tunas.

López, C.; Richards, R. A.; Farquhar, G. D. and Williamson, R. E. 1996. Seed and seedling characteristics contributing to variation in early vigor among temperate cereals. *Crop Sci*. 36: 1257-1266.

- Madueño, A.; García, J. D.; Martínez, J. y Rubio, C. 2006. Germinación y crecimiento de frijolillo *rhynchosia minima*, (L.) dc con diferentes potenciales osmóticos. *TERRA Latinoamericana*, 24 (2), 187-192.
- Martínez, J. P.; Silva H.; Ledent, J. F. and Pinto, M. 2007. Effect of drought stress on the osmotic adjustment, cell wall elasticity and cell volume of six cultivars of common beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). *European Journal of Agronomy* 26:30-38.
- McCartney, L.; Steele-King, C. G.; Jordan, E. and Knox, J. P. 2003. Cell wall pectic (1→4)-β-D-galactan marks the acceleration of cell elongation in the *Arabidopsis* seedling root meristem. *Plant J.* 33: 447-454.
- Mederos, Y. y Reynaldo, I. M. 2007. Determinación de indicadores de calidad en 11 genotipos de la especie *Phaseolus vulgaris*, L. *Cultivos Tropicales*, 2007, vol. 28, no. 4, p. 51-56.
- Medici, L. O.; Azevedo, R. A.; Canellas, L. P.; Machado, A. T. and Pimentel, C. 2007. Stomatal conductance of maize under water and nitrogen deficits. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42:599-601.
- Metcalfe, C. y Chalk. L. 1979. *Anatomy of the dicotyledons*. Vol. 1, Pp 128-54. Oxford Clarendon.
- Milthorpe, F. L. 1969. Studies on the expansion of the leaf surface. I. The influence of temperature. *J. Exp. Bot.* 10 (29) :233-249.
- Madueño, A.; García, J. D.; Martínez, J. y Rubio, C. 2006. Germinación y crecimiento de frijolillo *rhynchosia minima*, (L.) dc con diferentes potenciales osmóticos. *TERRA Latinoamericana*, 24 (2), 187-192.
- Molina, J. 2008. Evaluación de poblaciones de frijol rojo bajo condiciones de sequía (en línea). Consultado 1 de Jun. 2009. Disponible en <http://www.inta.gob.ni/biblioteca/protocolos/granos-basicos.html> [Consulta marzo, 13, 2012].
- Mollet, J. E. And Whitsitt, M. S. 1996. Plant cellular responses to water deficit. *Plant Growth Regul.* 20, 119-124.
- Moussa, I. and Abdel, S. M. 2008. Comparative response of drought tolerant and drought sensitive maize genotypes to water stress.[Online]. *Australian Journal of Crop Science* 1:31-36.
- Nielsen, D. C. and Nelson, N. O. 1998. Black bean sensitivity to water stress at various growth stages. *Crop Sc.* 38: 422-427.
- Nobel, P. and Walker, D. 1985. Structure of leaf photosynthetic tissue. Pp.512. En: J Barber NR Baker (eds). *Photosynthetic Mecanismos and the Environment*. Chapter 12.

- Orfila, C. and Knox, J. P. 2000. Spatial regulation of pectic polysaccharides in relation to pit fields in cell walls of tomato fruit pericarp. *Plant Physiol* 122: 775-781.
- Ozkur, O.; Ozdemir, F.; Bor, M. and Turkan, I. 2009. Physiochemical and antioxidant responses of the perennial xerophyte *Capparis ovate* Desf. to drought. *Environ Exp Bot* 66:487-492.
- Parsons, L. R. and Howe, T. K. 1984. Effects of water stress on the water relations of *Phaseolus vulgaris* and the drought resistant *Phaseolus acutifolius*. *Physiologia Plantarum* 60(2):197-202.
- Passioura, J. B. 1996. Drought and drought tolerance. *Plant Growth Regulation*, 20, 79-83.
- Passioura, J. B. 2002. Soil conditions and plant growth. *Plant Cell and Environment*, 25, 311-318.
- Pattanagual, P. and Madore, M. A. 1999. Water deficit effects on raffinose family oligosaccharide metabolism in *Coleus*. *Plant Physiol*. 121: 987-993.
- Pautasso, J. M.; Melchiori, R. y Anibal, P. 2012. Respuesta de la Soja a la Fertilización Foliar Post-Estrés Hídrico. Disponible en:
<http://www.engormix.com/MAagricultura/soja/articulos/respuesta-soja-fertilizacion-foliar-t4095/415-p0.htm> [Consulta abril, 20, 2012].
- Penichet, H.; Cabrera, M.; Pérez, C.; Lago, E.; Pérez, M. y Mendoza, M. J. 2006. Germinación de diferentes cultivares de frijol común (*Phaseolus Vulgaris*, L.) bajo condiciones de sequía. *Revista Agrotecnia de Cuba*.
- Peña, C. B.; Garcia, N. R.; Aguirre, J. R. and Trejo, C. 2002. The effects of high temperature on dormancy and hypocotyl-root growth of wild bean (*Phaseolus vulgaris*, L.). *Seed Sci. Technol.* 30: 231-248.
- Preciado, P. G.; Baca, A.; Tirado, J. L.; Kohashi, J.; Tijerina, L. y Martínez, A. 2003. Presión osmótica de la solución nutritiva y la producción de plántulas de melón. *Terra* 21: 461-470.
- Phillip, N.; James, D. K.; Steve E. B. and Matthew, W. B. 2006. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses. *Euphytica* 147: 105-131.
- PNUMA. 2000. *Perspectivas del Medio Ambiente Mundial 2000*. PNUMA. Ed. Mundi-Prensa. Vivendi Environment. Anual Report.
- Quecini, V. M.; Oliveira, C. A.; Alves, A. C. and Vieira, M. L. 2002. Factors influencing electroporation-mediated gene transfer to *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. protoplasts. *Genetics and Molecular Biology*. 25 (1): 73-80.

Ramanjulu, S. and Sudharkar, C. 2000. Proline metabolism during dehydration in two mulberry genotypes with contrasting drought tolerance. *Journal of Plant Physiology* 157: 81-85.

Rao, I. M. 2002. Role of physiology in improving crop adaptation to abiotic stresses in the tropics: The case of common bean and tropical forages. pp. 583-613. En: Pessaraki, M. (ed.). *Handbook of plant and crop physiology*. Marcel Dekker, New York, NY.

Red SICTA (Sistema de Integración Centroamericana de Tecnología Agrícola). 2006. Variedades de frijol tolerantes al estrés abiótico de la baja fertilidad y la sequía, y la sostenibilidad productiva y alimentaria de Centroamérica. Convocatoria a concurso de Proyectos de Innovación Estratégica Regional. Ficha del proyecto. 28 p.

Red SICTA (Proyectos Red de Innovación Agrícola). 2007. Resultados experimentales 2007. Pruebas de agricultores de líneas de frijol tolerantes a la sequía y a la baja fertilidad, Programa de Investigaciones en Frijol, EAP, Zamorano, Honduras. 8 p.

Rey, G. y Simone, M. 2006. "Agua, Nuevo Recurso Estratégico". Proyecto del Sistema Acuífero Guaraní Disponible en: <http://www.sg-guarani.org> [Consulta marzo, 22, 2012].

Rodés, G. R. y Collazo, O. M. 2006. *Manual de Prácticas de Fotosíntesis*, p.7.1era ed. Universidad Autónoma de México ISBN: 970-32-3313-9.

Rodríguez, A.; García, T. y Muñoz, J. 2003. Análisis bioquímico y fisiológico de *fouquieria splendens* ssp. Breviflora bajo la acción de agentes de estrés hídrico, 49-62 pp.

Román, F. 2009. Phenotypic evaluation of common bean inbred lines under drought and low fertility stress conditions. Special Project Graduation for the Program in Science in Agricultural Engineering and Agricultural Production, Zamorano, Honduras. 22 p.

Rosales, R.; Ochoa, R. y Acosta, J. A. 2001. Fisiología y rendimiento del frijol en el Altiplano de México y su respuesta al fotoperiodo. *Agrociencia*, 35: 513-523.

Rosas, J. C.; Beaver, J. S.; Beebe, S. y Viana, A. 2004. Nomenclatura de variedades de frijol común liberadas en Centro América y el Caribe. *Agronomía Mesoamericana* 15(2):221-224.

Sairam, R. K. y Tyagi, A. 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science*, 86(3), 125-34.

Sánchez A. B.; Peña C. B.; Trejo, C.; Rogelio, J.; Cárdenas, E. y Galicia, A. B. 2003. Permeabilidad de las membranas radicales de plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris*, L.) silvestre y domesticado bajo déficit de humedad. *Interciencia*, 28(10), 596-603.

- Sasovsky, C. A. 2008. Estrés hídrico en el cultivo de soja. Disponible en: <http://www.planetasoja.com.ar/index.php?sec=30&tra=19622> [Consulta abril, 19, 2012].
- Singh, S. P. 1995. Selection for water stress tolerance in interracial populations of common bean. *Crop Sci.* 35: 118-124.
- Singh, B.; Avci, U.; Eichler, S. E.; Grimson, J.; Landgraf, J.; Mohnen, D.; Sorensen, I.; Wilkerson, G.; Willats, G. T. and Haigler, H. 2009. A specialized outer layer of the primary cell wall joins elongating cotton fibers into tissue-like bundles. *Plant physiology*, 150(2):684-99.
- Silva, H.; Martínez, J. P.; Baginsky, C. y Pinto, M. 1999. Efecto del déficit hídrico en la anatomía foliar de seis variedades de poroto *Phaseolus vulgaris*. *Revista Chilena de Historia Natural*, 72, 219 – 235.
- Sivritepe, N. H.; Sivritepe, O. and Eris, A. 2003. The effects of NaCl priming on SALT tolerante in melon seedling grown under saline conditions. *Scientia Horticulturae* 97: 229-237.
- Socorro, M. A. y Martín, D. S. 1998. Granos. El cultivo del frijol en el mundo y cuba. Tomo 1, p 1- 4.
- Sorensen, I.; Pedersen, H. L. and Willats, W. 2009. An array of possibilities for pectin. *Carbohydrate research*, 344(14):1872-8.
- Stenglein, S. A.; Arambarri, A. M.; Menéndez, M. C. y Balatti, P. A. 2003. Variabilidad del índice estomático en *Phaseolus vulgaris* Var. Aborigineus. XXIX Jornadas Argentinas de Botánica & 2003, XV Reunión Anual de la Sociedad Botánica de Chile. Pag. 11. Disponible en: <http://www.botanicargentina.com.ar/boletin/38/075-dicot.pdf> [Consulta enero, 09, 2012].
- Tajdoost, S.; Farboodnia, T. and Heidari, R. 2007. Salt pretreatment enhance salt tolerance in *Zea mays* L. seedlings. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 10 (12): 2086-2090.
- Tambussi, E. A. 2004. Fotosíntesis, fotoprotección, productividad y estrés abiótico: algunos casos de estudio. Tesis de Doctorado. Universidad de Barcelona. Barcelona, España. 203 p.
- Telesinski, A.; Nowak, J.; Smolik, B.; Dubowska, A. and Skrzypiec, N. 2008. Effect of soil salinity on activity of antioxidant enzymes and content of ascorbic acid and phenols in bean (*Phaseolus vulgaris*, L.) plants. *J. Elementol*, 13 (3): 401-409.
- Terán, H. and Singh, S. P. 2002. Comparison of sources and lines selected for drought resistance in common bean. *Crop Sci.* 42:64-70.

Tomasz, H.; Grzesiak, S.; Hura, K.; Thiemt, E.; Tokarz, K. and Wedzony, M. 2007. Physiological and Biochemical Tools Useful in Drought-Tolerance Detection in Genotypes of Winter Triticale: Accumulation of Ferulic Acid Correlates with Drought Tolerance. *Annals of Botany*, 1–9.

Türkan, I.; Bor, M.; Özdemir, F. and Koca, H. 2005. Differential response of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. Acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris*, L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Pl. Sci.*, 168: 223–31.

Vieira, R. D.; TeKrony, D. M. and Egli, D. B. 1992. Effect of drought and defoliation stress in the field on soybean seed germination and vigor. *Crop Sci.* 32: 471-475.

Voysest, O. 2000. Mejoramiento Genético del Frijol (*Phaseolus vulgaris*, L.): Legado de Variedades de América Latina 1930- (1999)/ Osvlado Voysest. Cali, Valle, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.

Watkins, K. 2006. INFORME SOBRE DESARROLLO HUMANO 2006. Más allá de la escasez: Poder, pobreza y la crisis mundial del agua. ISBN 10: 84-8476-301-3, ISBN 13: 978-84-8476-301-7. Disponible en: http://hdr.undp.org/en/media/HDR_2006_ES_Complete.pdf [Consulta Marzo, 30, 2012].

Wikipedia. 2012. La enciclopedia libre, *Phaseolus vulgaris*. Disponible en: http://es.wikipedia.org/wiki/Phaseolus_vulgaris [Consulta: Enero, 05, 2012].

Wilkinson, H. 1979. The plant surface (mainly leaf) In: *Anatomy of dicotyledons* (Metcalf, C.R. & L. Chalk, eds.). Second edition. Vol. 1. Oxford Clarendon Press. London.

Willats, W. G. and Knox, J. P. 1999. Immunoprofiling of pectic polysaccharides. *Anal. Biochem.* 268: 143-146.

Willats, W. G.; Limberg, G.; Buchholt, H. C.; Van, G. J.; Benen, J.; Christensen, T. M.; Visser, J.; Voragen, A.; Mikkelsen, J. D. and Knox, J. P. 2000. Analysis of pectic epitopes recognised by hybridoma and phage display monoclonal antibodies using defined oligosaccharides, polysaccharides, and enzymatic degradation. *Carbohydrate research*, 327(3):309-20.

Willats, W. T.; McCartney, L. and Knox J. P. 2001. In-situ analysis of pectic polysaccharides in seed mucilage and at the root surface *Arabidopsis thaliana*. *Plant*, 213: 37-44.

Willats, W.; Rasmussen, S.; Kristensen, T.; Mikkelsen, J. and Knox, J. P. 2002. Sugar-coated microarrays: a novel slide surface for the high-throughput analysis of glycans. *Proteomics*, 2(12):1666-71.

Willats, G. T.; Gilmartin, M. and Westhead, R. 2006. The Arabidopsis co-expression tool (ACT): a WWW-based tool and database for microarray-based gene expression analysis. *The Plant journal: for cell and molecular biology*; 46(2):336-48.

Wintermans, J. and De Mots. 1965. Spectrophotometric of chlorophylla and b and their pheophytins in ethanol. *Biochem. Biophys Acta*, 109, 448 - 454.

Yang, Y.; Han, C.; Liu, Q.; Lin, B. and Wang, J. 2008. Effect of drought and low light on growth and enzymatic antioxidant system of *Picea asperata* seedlings. *Acta Physiol Plant* 30:433–440

Zinselmeier, C.; Byeong, J. and Boyer, J. S. 1999. Starch and the control of kernel number in maize at low water potentials. *Plant Physiol.* 121: 25- 36.