

Algunos indicadores morfológicos y bioquímicos de cinco variedades de *Phaseolus vulgaris* L. bajo condiciones de sequía.

Some morphologic and biochemical markers of five varieties of *Phaseolus vulgaris* L. under drought stress.

Dr.C. Amalia Domínguez Suárez (PhD)

Profesor Titular. Dr. en Ciencias de la Salud. Licenciada en Bioquímica.

Investigador del Centro de Estudios Biotecnológicos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Matanzas Camilo Cienfuegos. Cuba.

amalia.dominguez@umcc.cu

Ing. Nelly Marlene Mita Poma

Ingeniera Agrónomo de la Facultad de Agronomía, Universidad Mayor de San Andrés (UMSA). La Paz, Bolivia.

nelly_poma@yahoo.es

MSc. Ing, Silvia Alemán García

Profesor Auxiliar, Máster en Ciencias Agrícolas.

Investigador del Centro de Estudios Biotecnológicos de la facultad de Agronomía de la Universidad de Matanzas Camilo Cienfuegos. Cuba.

silvia.aleman@umcc.cu

Lic. Yunel Pérez Hernández.

Profesor Asistente, Licenciado en Biología.

Investigador del Centro de Estudios Biotecnológicos de la facultad de Agronomía de la Universidad de Matanzas Camilo Cienfuegos. Cuba.

yunel.perez@umcc.cu

MSc. Rodolfo Darías Rodríguez.

Profesor Auxiliar, Máster en Ciencias del Medio Ambiente.

Investigador del Centro de Estudios Biotecnológicos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Matanzas Camilo Cienfuegos. Cuba.

rodolfo.darias@umcc.cu

MSc. Maryla Sosa del Castillo

Profesor Instructor, Ingeniera Agrónoma, Máster en Ciencias Agrícolas.

Investigador del Centro de Estudios Biotecnológicos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Matanzas Camilo Cienfuegos. Cuba.

maryla.sosa@umcc.cu

MSc. Leticia Fuentes Alfonso

Profesor Auxiliar, Máster en Ciencias Biológicas.

Decana de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Matanzas Camilo Cienfuegos. Cuba.

leticia.fuentes@umcc.cu

Resumen

El frijol común constituye una de las principales fuentes de alimentación. La sequía es uno de los factores que incide negativamente sobre este cultivo. El objetivo de este trabajo es estudiar la respuesta a estrés hídrico de 5 variedades de *Phaseolus vulgaris* L. comercializadas en Cuba, las cuales fueron sometidas a diferentes riegos: 70%, 40% y 20% capacidad de campo (CC). A los 15 días, de aplicar los riegos mencionados, se pudo constatar algunos cambios morfológicos y bioquímicos. En las variedades tolerantes no se observaron cambios en la estructura del mesófilo, no así en la variedad clasificada como susceptible (CC 25-9 negro), en la cual se evidenció la separación de las células del parénquima clorofílico en empalizada, aumentando los espacios intercelulares en las condiciones de estrés. La epidermis tuvo un comportamiento similar en las tolerantes, no así en la CC 25-9 negro donde se observó un cambio en la anatomía de las células estomáticas. Los valores de CRA en la variedad susceptible a estrés hídrico mostró una disminución en condiciones de sequía (20 % CC). De manera general se pudo observar que dicha variedad manifestó un decrecimiento significativo en el contenido de clorofila a, b, total y fenoles, con el aumento de las condiciones del estrés hídrico, a diferencia de las variedades tolerantes. En las hojas estresadas de todas las variedades se elevó la prolina libre y la actividad catalasas disminuyó, a diferencia de la actividad peroxidasas que se incrementó, excepto en la variedad CC 25-9 colorado clasificada como tolerante.

Palabras clave: *Phaseolus vulgaris* L., estrés hídrico, leguminosa, clorofila, Prolina, fenoles, actividad enzimática.

Abstract

The beans constitute one of the principal feeding sources but droughts negatively affects its cultivation, therefore, the aim of this work is to study the response to water stress of five varieties of *Phaseolus vulgaris* L. commercialized in Cuba, which were submitted to different irrigations: 70 %, 40 % and 20 % field capacity (CC). From 15 days, of applying the mentioned irrigations, it was possible to state some morphologic and biochemical changes. In the tolerant varieties, changes were not observed in the structure of the mesophyll, contrary to the sensitive variety (CC 25-9 black), in which there was demonstrated the separation of the cells of the chlorophyll parenchyma in palisade, increasing the intercellular spaces in the conditions of stress. The epidermis had a similar behavior in the tolerant ones; in contrast with the sensitive ones where a change was observed in the anatomy of the stomatal cells. The values of CRA in the variety sensitive to water stress, showed a significant reduction under drastic conditions (20 % CC). Generally, it was possible to observe that the sensitive variety demonstrated a significant decrease in the content of chlorophyll a, b, total and phenols, with the increase of the conditions of water stress, unlike the tolerant varieties. The free

Revista Avanzada Científica Mayo – Agosto Vol. 15 No. 2 Año 2012



proline was significantly increased in the stressed leaves. The catalase activity diminished in the leaves of the plants with water deficit, unlike the peroxidase activity that was increased in the plants by water deficit, except in the variety CC 25-9 coloured, that is one of the tolerant ones.

Keywords: *Phaseolus vulgaris* L., *water stress*, *leguminous*, *chlorophyll*, *Proline*, *phenols*, *enzymatic activity*.

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 contrarrestar enfermedades del corazón, el cáncer y la diabetes (Hangen & Bennink, 2003). A pesar del importante papel que tienen las leguminosas en la alimentación tanto del hombre como de los animales, son varios los factores que influyen sobre su cultivo (Miklas, Kelly, Beebe, & Blair, 2006; Moussa & Abdel-Aziz, 2008), debido a que afecta negativamente 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, Gopi, Sankar, Gomathinayagam, & Panneerselvam., 2008; Farooq, Basra, Wahid, Cheema, Cheema, & Khaliq, 2008).

Recientemente se estimó que la sequía es la causante del 60% de las hambrunas y subnutrición, especialmente en las zonas rurales donde la población depende de la agricultura local para obtener tanto alimentos como ingresos (EROSKI, 2011). La única respuesta a este problema mundial es 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 a enfermedades, suelos ácidos, estrés hídrico, y otros factores medioambientales que afectan la producción y la productividad (Quecini, de Oliveira, Alves, & Vieira, 2002).

La respuesta fisiológica de las plantas al estrés abiótico es multigénica, ya que varios procesos vinculados a los mecanismos de tolerancia se ven afectados, tales como la producción de compuestos osmóticamente activos, como la prolina, la producción de especies reactivas del oxígeno y los mecanismos de defensa antioxidante, así como mecanismos que implican 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). Es por ello que resulta de gran interés abordar tanto el aspecto anatómico como bioquímicos en los estudios de respuesta a estrés hídrico.

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 (CC 25-9 colorado, CC 25-9 negro, CC 25-9 blanco, BAT 58 negro y Bolita 42, negro) provenientes de la Empresa Provincial de Semillas de Matanzas.

Las semillas se esterilizaron por inmersión en etanol, al 70% durante un minuto, inmediatamente fueron lavadas y desinfectadas con hipoclorito de sodio (0.5%), durante 10 minutos. A continuación se realizaron tres enjuagues sucesivos con agua destilada estéril. Posteriormente se sembraron en condiciones estéril, en placas petri y se mantuvieron en oscuridad por 72 horas. Una vez germinadas las semillas se sembraron en vasos de 400 mL de volumen, que contenían sustrato (25% de suelo ferralítico rojo típico y 75% de humus de lombriz). Luego se trasladaron al invernadero con un fotoperíodo 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: uno con riego a 70 % CC (control o riego normal), y el otro a 20% CC (estrés severo). Se hicieron tres réplicas por tipo de riego, para un total de 30 plantas para cada variedad. Las plantas se clasificaron en tolerantes, medianamente tolerantes y susceptibles según marchitez, teniendo en cuenta lo reportado por Alemán, Domínguez, Domínguez, Fuentes, Pérez, Pernía, Sosa, Sosa & Infante, (2010). Se evaluaron los diferentes indicadores anatómicos 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 & Collazo (2006).

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 riego 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.

Una vez que se detectaron los primeros síntomas de marchitez, las hojas de las distintas variedades estresadas y no estresadas fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C . Posteriormente se evaluó la respuesta metabólica al estrés de las diferentes variedades estudiadas.

La medición del área foliar se hizo al finalizar el ensayo y se expresó en porcentaje con respecto al control. Se utilizó el método del papel heliográfico, el cual consiste en imprimir sobre el papel la superficie de las hojas y revelar luego con vapores de amoníaco. El área foliar se obtuvo en forma gravimétrica, es decir, se usó la relación que existe entre peso y área, para lo cual se pesaron previamente, varios cuadros de papel heliográfico de superficie conocida.

Estudio Bioquímico

- Determinación de la concentración de clorofila a, b y total

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

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

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

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

Ca= concentración de clorofila a

Cb= 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 3000 rpm. El precipitado se resuspendió en NaOH 2M para la extracción de los fenoles ligados a las paredes celulares, neutralizándose en igual volumen de HCl 2M. 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 peso fresco de hojas.

- Determinación de la actividad enzimática

a) Actividad catalasas

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

b) Actividad Peróxidasas

La actividad peroxidasas se realizó en un volumen final de 3 mL., según Bergmeyer (1974) Para la reacción se adicionó en una cubeta de cuarzo 2,80 mL de solución tampón fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.0; 50 μ L de solución guajacol 0.018 M; 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 Los datos experimentales se analizaron para conocer si existirá normalidad y homogeneidad de varianzas utilizando el método de Shapiro-wilk. Tras cumplir los requisitos de normalidad homogeneidad se realizó el análisis de varianza por el método de comparación, Test de Duncan, a fin de comprobar el nivel de significación para $p < 0,05$ y $0,01$.

Resultados y discusión

La Tabla 1 muestra el comportamiento, de las variedades en estudio, ante el déficit hídrico.

Tabla 1. Variedades estudiadas y su clasificación según grado de marchitez bajo condiciones de estrés hídrico

Nº	Variedades	Respuesta a estrés 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)

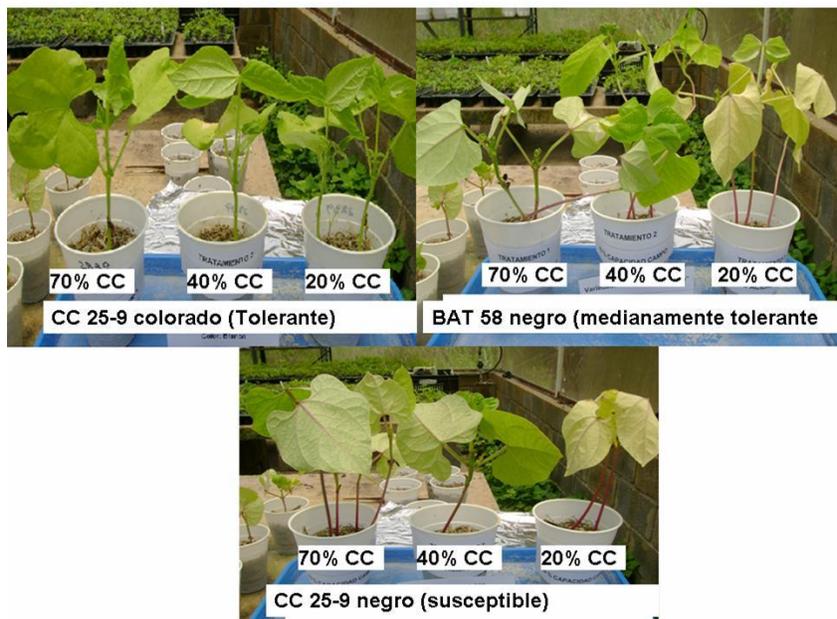


Figura 1. Síntomas de marchitez de los primordios foliares de *P. vulgaris* L transcurrida 15 días de tratamientos con los diferentes riegos.

Dichas variedades 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 según los riegos aplicados, sin que llegara a alcanzar el punto de marchitez permanente. Dos variedades se clasificaron en tolerantes, otras dos en medianamente tolerante y por último una se clasificó como susceptible. A través de la observación macroscópica se observó 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 riego al 20% CC. La susceptible mostró síntomas de marchitez al tratamiento de estrés severo, como muestra la Fig. 1.

Un estrés severo provocado por 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 (Herrera-Flores, Cárdenas-Soriano, Ortíz-Cereceres, Acosta Gallegos & Mendoza-Castillo, 2005).

En todas las variedades el arreglo y forma del mesófilo y las células epidérmicas es semejante por ambas caras, presentando paredes onduladas mucho más marcadas en la cara abaxial, rasgo característico del género *Phaseolus*. Estas características han sido reportadas por Stenglein, Arambarri, Menéndez Sevillano & Balatti (2003).

Observaciones de la morfología de las hojas

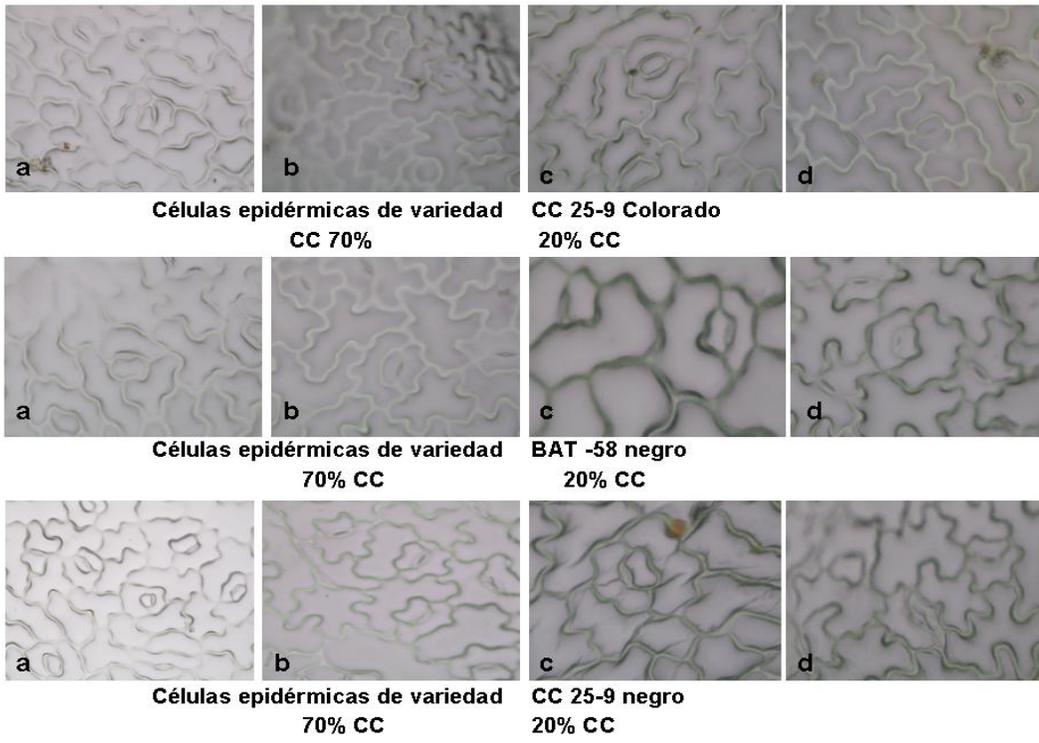


Figura 2. Morfología de células epidérmicas de hojas de *phaseolus vulgaris* no estresadas (riego 70% CC) y estresadas (20% CC). Aumento 40x, cara adaxial (a y c) y cara abaxial (b y d).

Al comparar la anatomía del mesófilo de las plantas sometidas a los tres niveles de riego, se comprobó 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, 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. 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 y por consiguiente la disminución de cloroplastos y el amarillamiento de las hojas en la variedad susceptible (ver Fig. 1). La Rosa, Contreras, Mendoza, Macabilca & Gutiérrez (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.

La epidermis tuvo un comportamiento similar en las tolerantes, no así en la susceptible donde se observó un cambio en la anatomía de las células estomáticas y típicas (Ver figura 2).

Determinación Área Foliar.

Se observó que en todas las variedades el área foliar disminuyó significativamente en condiciones de estrés (20% CC). La variedad CC 25-9 colorado conservó el mayor área foliar relativa con respecto a las hojas no estresadas. El área foliar relativa del resto de las variedades fue semejante (ver figura 3).

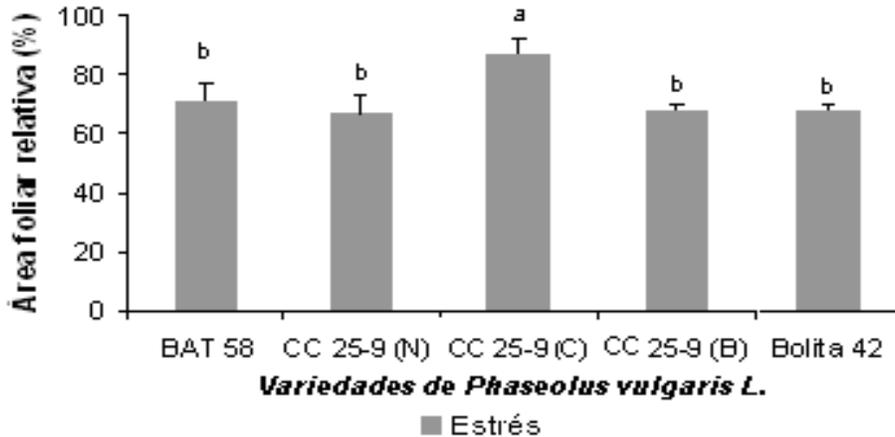


Figura 3. Área Foliar Relativa en variedades de *Phaseolus vulgaris* L. sometidas a condiciones severas de estrés hídrico (20 % CC). Las letras diferentes indican diferencias estadísticas entre las medias del tratamiento con estrés entre las diferentes variedades, $p < 0,05$ según Test de Duncan.

Según Passioura (2002) la variación del área foliar es una de las respuestas macroscópicas más tempranas en plantas que sufren déficit hídrico. Además uno de los primeros síntomas que aparecen en condiciones de estrés hídrico es el cierre de los estomas (Aleman et al, 2010), lo que trae como consecuencia una menor captación de CO_2 , necesario para la fotosíntesis, lo que conlleva a la marchitez, un envejecimiento prematuro de la hoja y finalmente la muerte. Esta respuesta diferente de las distintas variedades al estrés hídrico pueden estar relacionada con la capacidad de absorción de agua del suelo y/o la capacidad de controlar la pérdida de agua a través de los estomas (Bayoumi, Manal & Metwali, 2008). 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 y la fotosíntesis, así como para la adquisición de CO_2 (Medici, Azevedo, Canellas, Machado & Pimente, 2007).

Contenido de Clorofila

Al estudiar el efecto del estrés sobre el contenido de clorofila a, b y total en *Phaseolus vulgaris*, se pudo constatar un decrecimiento en las concentraciones de clorofila a, b (datos no mostrados) y de la clorofila total en las hojas estresadas de la variedad que fue clasificada como susceptible (CC 25-9 negro), a diferencia de las variedades tolerantes que tuvieron un comportamiento homogéneo en cuanto a niveles de clorofila a, b y total, no observándose diferencia significativa con el aumento de las condiciones de estrés hídrico (Figura 4).

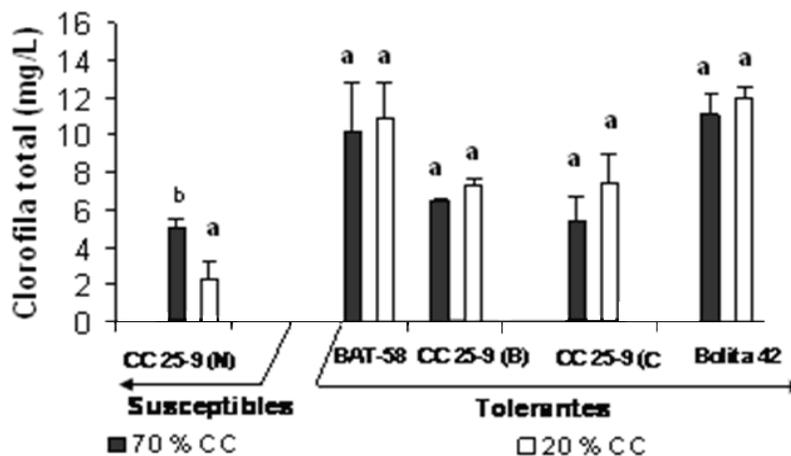


Figura 5. Concentración de clorofila total en variedades susceptibles y tolerantes de *Phaseolus vulgaris* sometidas a diferentes condiciones de riego. Letras diferentes indican diferencias significativas para $P \leq 0.05$ según Test de Duncan

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

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

En la figura 5 se representan 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. Resultados similares fueron obtenidos por Tomasz, Grzesiak, Hura, Thiemt, Tokarz & Wedzony (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 una disminución en los genotipos estresados respecto al control. De manera similar, se reportan genotipos sensibles que responden indistintamente al estrés hídrico, pudiendo aumentar, disminuir o no variar en diferentes condiciones de sequía (Telesinski, Nowak, Smolik, Dubowska & Skrzypiec, 2008).



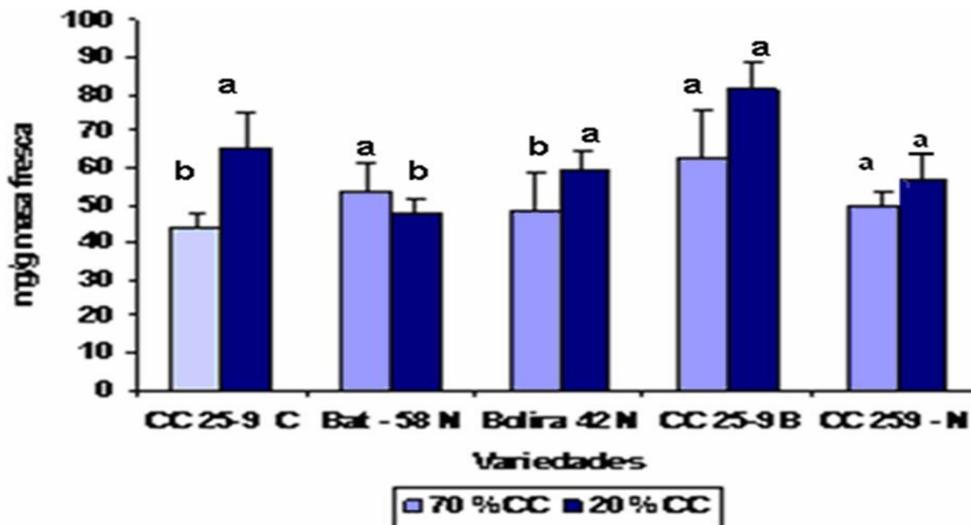


Figura 5. Contenido de fenoles totales (mg/g masa fresca) en hojas de variedades de *Phaseolus vulgaris* L. no estresadas (70%) y estresadas (20 % CC). Las letras diferentes indican diferencias estadísticas entre las medias de los grupos estresados y no estresados de cada variedad, $p < 0,05$ según Test de Duncan

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

Los resultados de la concentración de prolina en hojas de *phaseolus vulgaris* L. se muestran en la figura 6, donde se observó un incremento significativo en la concentración de prolina, en condiciones de estrés severo (20 % CC), en todas las variedades. Al comparar la relación entre el contenido de prolina de las hojas estresadas (20 % CC) y las no estresadas (70 % CC) de los diferentes grupos clasificados, según el comportamiento frente al estrés hídrico (tolerantes y susceptible), se constató que al aumentar la susceptibilidad al déficit hídrico, aumenta la diferencia entre el contenido de prolina entre las hojas estresadas y las no estresadas.

Aguilar, Cutipa, Machaca, Lopez & Jacobsen (2003) encontraron resultados semejantes en diferentes variedades de quinua, atribuyendo este comportamiento a la diversidad de procedencia de las variedades, lo que las hace desarrollar en cierta medida esta característica de adaptación.

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 previniendo el desbalance osmótico y evitando la deshidratación sin alterar su metabolismo (Avendaño, Trejo, López, Molina, Santacruz & Castillo 2005; Celikkol, Ercan, Kavas, Yildiz, Yilmaz, Oktem & Yucel, 2010), lo que permite mantener la turgencia de los tejidos y por ende la función

celular. Por otra parte, la acumulación de prolina ha sido atribuida a un aumento de su biosíntesis y disminución en su degradación (Kavi Kishor, Sangam, Amrutha, SriLaxmi, Naidu, Rao, Sreenath Rao, Reddy, 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-Ferrat & Lovatt, 1999).

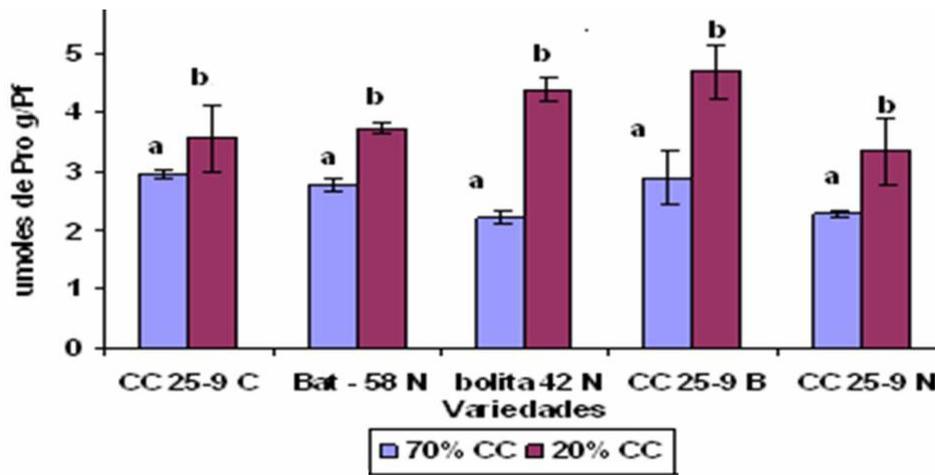


Figura 6. Concentración de prolina en hojas de 5 variedades de *Phaseolus vulgaris* no estresadas (70% CC) y estresadas (20% CC). Las letras diferentes indican diferencias estadísticas entre las medias de los grupos estresados y no estresados de cada variedad, $p < 0,01$ según Test de Duncan

Actividad catalasas y peroxidasas

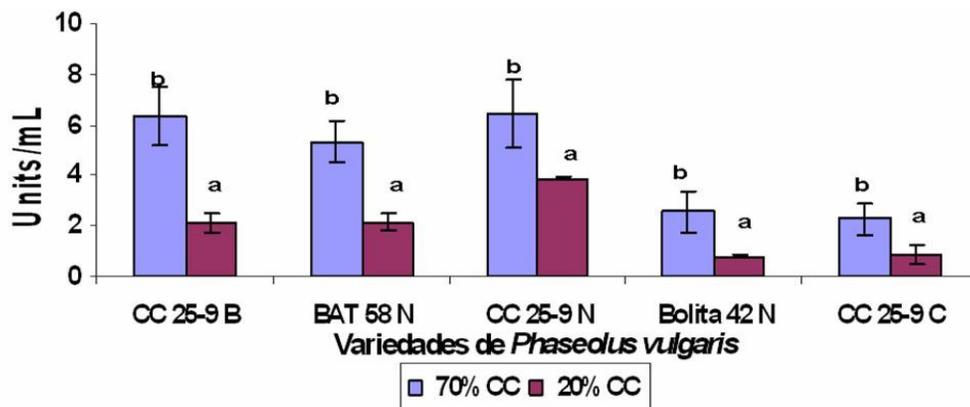


Figura 7. Actividad catalasa en hojas de *Phaseolus vulgaris* L. no estresadas (70% CC) y estresadas (20% CC). Las letras diferentes indican diferencias

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 catalasa en las hojas estresadas (20% CC), al compararlas con las no estresadas (70% CC). Al analizar los resultados obtenidos de actividad en las diferentes variedades, en las diferentes condiciones de riego, se pudo constatar que las variedades tolerantes (CC 25-9 colorado y Bolita 42) presentaron los niveles de actividad más bajo en cada condición de riego y entre ellas no hubo diferencias. Los mayores niveles, tanto en las plantas estresadas como las no estresadas, lo presentó la variedad CC25-9 negro (susceptible), siendo significativamente diferente a las restantes (ver figura 7).

En la actividad peroxidasa no hubo un comportamiento homogéneo. En la variedad CC 25-9 blanco el déficit hídrico no afectó la actividad peroxidasa. En el caso de las variedades CC 25-9 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 CC 25-9 colorada que hubo una disminución en condiciones de estrés. Al comparar la respuesta varietal en las diferentes condiciones de riego, se pudo constatar que las variedades medianamente tolerantes y susceptible presentaron los valores más bajo de actividad peroxidasa 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 (ver figura 8).

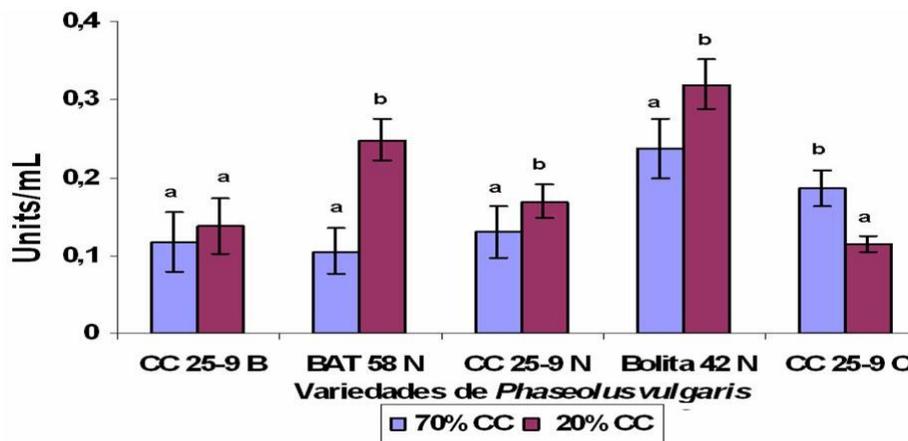


Figura 8. Actividad peroxidasa en hojas de 5 variedades de *Phaseolus vulgaris* L. en hojas de *Phaseolus vulgaris* L. no estresadas (70% CC) y estresadas (20% CC). Las letras diferentes indican diferencias estadísticas



entre las medias de los grupos estresados y no estresados de cada variedad, $p < 0,01$ según Test de Duncan

Los efectos del estrés hídrico sobre la actividad enzimática, descrito en la literatura, son controvertidos, porque si bien es reconocido que estos sistemas enzimáticos juegan un papel importante en la eliminación de las especies reactivas del oxígeno (ERO) producidas en condiciones de déficit hídrico, lo que permite a la planta crecer en condiciones adversas del medio ambiente (Bai, Gong, Chen, Kang & Wang, 2009). Se ha reportado en diversos estudios que la respuesta al estrés depende del tipo de cultivo, del grado del mismo, del desarrollo de la planta y del grado de tolerancia al déficit hídrico (Contour-Ansel, Torres-Franklin, Cruz, de Carvalho, D'arcy-Lameta & Zuily-Fodil, 2006), por lo que el rol que juegan los diferentes sistemas antioxidantes puede variar con la familia, y las variedades. (Celikkol et al., 2010)

Conclusiones

Se pudo constatar algunos cambios morfológicos y bioquímicos en todas las variedades en las condiciones de sequía experimental.

En las variedades tolerantes no se observaron cambios en la estructura del mesófilo, no así en la susceptible (CC 25-9 negro), en la cual se evidenció la separación de las células del parénquima clorofílico en empalizada, aumentando los espacios intercelulares en las condiciones de estrés.

La epidermis tuvo un comportamiento similar en las tolerantes, no así en la CC 25-9 negro donde se observó un cambio en la anatomía de las células estomáticas.

Los valores de CRA en la variedad susceptible a estrés hídrico mostró una disminución en condiciones drásticas de sequía (20 % CC). De manera general se observó que dicha variedad manifestó un decrecimiento significativo en el contenido de clorofila a, b, total y fenoles, con el aumento de las condiciones del estrés hídrico, a diferencia de las variedades tolerantes.

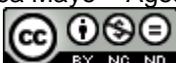
En las hojas estresadas de todas las variedades se elevó la prolina libre y la actividad catalasas disminuyó, a diferencia de la actividad peroxidasas que se incrementó, excepto en la variedad CC 25-9 colorado clasificada como tolerante.

Agradecimientos

Le agradecemos, a la Empresa Provincial de Semillas de Matanzas y al Centro Nacionales de Biotecnología Agrícola (IDEA, Venezuela), por su valiosa ayuda sin la cual este trabajo no hubiese sido posible

REFERENCIAS

- Aguilar, P.C., Cutipa Z., Machaca E., Lopez M & Jacobsen S.-E. (2003). Variation of proline content of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) in high beds (waru-waru). *Food Reviews Internacional*, 19, 121-127
- 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*, 1 (1), 89-99.
- Avendaño C.H., Trejo, C., López, C., Molina, J. D., Santacruz A., & 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. & 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.
- Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. Short communication. *Plant and Soil*, 39, 205-207.
- Bayoumi, T.Y., Manal, H. E., & 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
- Bergmeyer, H.U. (1974). *Methods of Enzymatic Analysis 1*, Academic Press, New York. 2nd Edition, 495
- Celikkol, U., Ercan, O., Kavas, M., Yildiz, C., Yilmaz, H., Oktem,A., & Yucel, M. (2010). Drought-induced oxidative damage and antioxidant responses in peanut (*Arachis hypogaea* L.) seedlings. *Plant Growth Regul* , 61, 21–28.
- Contour-Ansel, D., Torres-Franklin, M.L., Cruz, H., de Carvalho, M., D'arcy-Lameta, A., & Zuily-Fodil 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.
- Chance, B., & Machley, A. (1955). Assays of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol*, 2, 764-775.
- EROSKI CONSUMER. (2011), Medio Ambiente Urbano. Disponible en: <http://Estrés hídrico EROSKI CONSUMER.mht> [Consulta Junio, 23, 2011]
- Farooq, M., Basra, S.M.A., Wahid, A., Cheema, Z.A., Cheema, M.A., & 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.
- García, P. (2005). *Plasticidad estructural de la pared celular durante la habituación-deshabituación decultivos celulares de alubia a diclobenil*. Tesis en opción del grado de Doctor en Ciencias Biológicas, Universidad de León, España.
 - 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>.
 - Hangen, L.A., & 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-Flores, T.S., Cárdenas-Soriano, E., Ortiz-Cereceres, J., Acosta Gallegos, J., & Mendoza-Castillo, M. C. (2005). Anatomy of the pod of three species of the genus *Phaseolus*, *Agrociencia*, 39, 595-602.
 - Jaleel, C.A., Gopi, R., Sankar, B., Gomathinayagam, M., & Panneerselvam, R. (2008). Differential responses in water use efficiency in two varieties of *Catharanthus roseus* under drought stress. *Comp. Rend. Biol.*, 33, 42-47.
 - Kavi Kishor, P.B., Sangam, S., Amrutha, R.N, SriLaxmi, P., Naidu, K.R., Rao, K.R., Sreenath Rao, S.S., Reddy K.J., Theriappan P., & 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.
 - Khalafallah, A.A, Tawfik, K.M., Zinab, A., & Abd 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.
 - La Rosa, R., Contreras, J., Mendoza, A., Macabilca, Y., & Gutiérrez, A. (2008). Cambios morfofisiológicos de *Ipomoea batata* (L.) Lam. durante el estrés por sequía. *Biologist (Lima)*, 6(1), 8-12.
 - Lazcano-Ferrat I. & 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.
 - Médiçi, L.O., Azevedo, R.A., Canellas, L.P., Machado, A.T., & Pimentel, C. (2007). Stomatal conductance of maize under water and nitrogen deficits. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42, 599-601.
 - Moussa, I., & Abdel-Aziz, S.M. (2008). Comparative response of drought tolerant and drought sensitive maize genotypes to water stress.[Online]. *Australian Journal of Crop Science*, 1, 31.
 - Passioura, JB. (2002). Soil conditions and plant growth. *Plant Cell and Environment*, 25, 311-318.

- Miklas, P.N., Kelly J.D., Beebe, S. E., & Blair M. W. (2006). Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses. *Euphytica*, 147, 105-131
- Quecini, V.M., de Oliveira, C.A., Alves, A.C., & Vieira, M.L.C. (2002) Factors influencing electroporation-mediated gene transfer to *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. protoplasts. *Genetics and Molecular Biology*, 25 (1), 73-80.
- Rodés, G.R. & Collazo, O. M. (2006). *Manual de Prácticas de Fotosíntesis*, p.7.1era ed. Universidad Autónoma de México ISBN: 970-32-3313-9.
- Stenglein, S.A; Arambarri, A.M.; Menéndez Sevillano, M.C., & 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>
- Telesinski, A., Nowak, J., Smolik, B., Dubowska, A., & 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.
- Tomasz, H., Grzesiak, S., Hura, K., Thiemt, E., Tokarz, K., & 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.
- Wintermans, J., & De Mots, A. (1965). Spectrophotometric of chlorophylla and b and their pheophytins in etanol. *Biochem. Biophys Acta*, 109, 448-454.

Fecha de recepción: 13/01/2012

Fecha de aprobación: 25/05/2012

