

Efecto del estrés hídrico inducido con PEG 6000 sobre la germinación *in vitro* de semillas de *Phaseolus vulgaris* L. cv. 'ICA Pijao'

Lourdes R García¹, Michel Leiva-Mora¹, Annerys Carabeo Pérez², Raúl Collado¹, Ivian Poveda Martínez², Novisel Veitía¹, Amanda Martirena¹, Damaris Torres¹, Leonardo Rivero¹

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830 e-mail: lourdes@ibp.co.cu

²Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5.5, Santa Clara, Villa Clara.

RESUMEN

La producción de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) tiene gran importancia en Cuba, sin embargo, diversos factores afectan el rendimiento de este cultivo y no todos los cultivares de frijol responden de la misma forma a las condiciones estresantes. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del estrés hídrico inducido con PEG 6000 sobre la germinación *in vitro* de semillas del cultivar 'ICA Pijao'. Los resultados mostraron que el incremento de las concentraciones de PEG 6000 redujo el porcentaje de germinación *in vitro* de semillas de *P. vulgaris* cv. 'ICA Pijao'. Esto confirmó que el agente estresante puede ser utilizado para determinar la respuesta fisiológica y que las concentraciones de PEG 6000 a utilizar en bioensayos para evaluar la respuesta de la planta en este cultivar deben ser menores de 18%.

Palabras clave: frijol común, selección *in vitro*, sequía

Effect of water stress induced by PEG 6000 on *in vitro* germination of *Phaseolus vulgaris* L. cv. 'ICA Pijao' seeds

ABSTRACT

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) production has been very important in Cuba, however, several factors affect the yield of this crop and not all cultivars of beans respond the same way to the stressful conditions. The aim of this study was to determine the effect of water deficit induced by PEG 6000 on the cultivar 'ICA Pijao'. The results showed that increasing concentrations of PEG 6000, reduced the percentage of *P. vulgaris* cv. ICA Pijao *in vitro* germination, which confirmed that this stressor agent could be useful to elucidate the physiological response and concentrations PEG 6000 to be used in bioassays to evaluate the plant response in this cultivar should be less than 18 %.

Key words: common beans, drought, *in vitro* selection

INTRODUCCIÓN

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

A pesar de su alto valor alimenticio la producción de frijol es limitada, pues frecuentemente este

cultivo es afectado tanto por factores bióticos como abióticos. Los factores abióticos como la sequía, la salinidad, la temperatura, la humedad, la intensidad luminosa y la acidez de los suelos influyen en el desarrollo del cultivo (Campos *et al.*, 2011).

De hecho, todos estos factores pueden provocar estrés en la planta (Mahajan y Tuteja, 2005; Abdellatif *et al.*, 2012) lo cual afecta su rendimiento biológico y agrícola. Se ha estimado que la sequía reduce en un 60% la producción mundial de granos de frijol

común (Porch *et al.*, 2009). Por ello, se hace necesario el desarrollo de investigaciones encaminadas a la identificación y la obtención de cultivares tolerantes al estrés hídrico, que contribuyan al incremento de la producción de este cultivo (Domínguez *et al.*, 2014). Para ello el cultivo de tejidos y la selección *in vitro* pudieran ser herramientas a utilizar en programas de mejoramiento genético en esta especie.

A nivel de laboratorio, con el empleo de agentes estresantes, es posible simular condiciones de estrés hídrico. Dentro de los compuestos empleados para este fin el polietilenglicol (PEG) es el más utilizado porque permite mantener el medio experimental a valores predeterminados de potencial hídrico y es capaz de competir con las células por el agua debido a su alto peso molecular. Esto facilita la retención de líquido y provoca descensos en el potencial osmótico de manera similar a lo que ocurre cuando se seca el sustrato en el que se cultivan las plantas (Rai *et al.*, 2011).

Entre las variables morfofisiológicas que permiten observar en qué medida se producen los daños en una especie y cómo se afecta la germinación y el crecimiento ante condiciones edafoclimáticas adversas se encuentran las relacionadas con el crecimiento y el sistema radical. Dentro de ellas, la longitud de la raíz principal, longitud del tallo, número total de raíces, número de hojas, área foliar, materia seca, contenido hídrico relativo, discriminación de isótopos de carbono, porcentaje de pérdida de electrolitos, liberación de fosfato inorgánico, formación de áreas necróticas en el tejido foliar, entre otros (Schulze *et al.*, 2005).

No todos los cultivares de frijol responden de la misma forma a condiciones estresantes pues el nivel de susceptibilidad o tolerancia varía de una a otra. El grado de tolerancia depende además de la intensidad y la etapa de desarrollo del cultivo sobre la que el factor actúe (Domínguez *et al.*, 2014). Por estas razones se requieren ensayos que permitan discriminar entre los cultivares en base a su respuesta. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto del estrés hídrico inducido con Polietilenglicol 6000 sobre la germinación *in vitro* de semillas de frijol común cv. 'ICA Pijao'.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se emplearon semillas maduras de *P. vulgaris* cv. 'Ica Pijao', obtenidas por selección en el Centro Internacional de Agricultura Tropical de Colombia (CIAT) y cultivadas en Cuba.

Desinfección

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

Estrés hídrico inducido

El Polietilenglicol 6000 (PEG 6000) se utilizó como agente estresante para simular condiciones de estrés hídrico *in vitro*. Para ello se prepararon soluciones de PEG 6000 con agua destilada a diferentes concentraciones 6, 8, 10, 12, 14, 16, y 18% (m/v). Como control se empleó agua destilada. El cálculo del potencial osmótico equivalente para cada una de las soluciones, se realizó mediante la ecuación descrita por Michel y Kaufmann (1973) donde: 6% (-0.066 MPa), 8% (-0.103 MPa), 10% (-0.148 MPa), 12% (-0.201 MPa), 14% (-0.262 MPa), 16% (-0.330 MPa) y 18% (-0.407 MPa).

Cada semilla embebida se colocó sobre un papel de filtro (Whatman No. 42) colocado en forma de M dentro de un tubo de ensayo (150 mm largo x 20 mm diámetro) con 10 ml de la solución de PEG 6000.

El material vegetal se mantuvo en una cámara de cultivo a 25 ± 2 °C bajo un fotoperíodo de 16 h luz / 8 h oscuridad. Para la iluminación de la cámara se emplearon lámparas fluorescentes con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos de $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

A las 48 h se calculó el porcentaje de germinación (PG) de acuerdo con la siguiente ecuación: $PG = (SG / NTS) \times 100$. Donde SG

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

Entre los tres y seis días se evaluaron otras variables asociadas a la germinación tales como: longitud del tallo (longitud del hipocótilo + longitud del epicótilo (mm), longitud de la raíz (mm) y área foliar de las primeras hojas (cm²).

El área de la hoja se determinó a través de la ecuación propuesta por Barrios *et al.* (1998): $Ah = 0.603 + 0.581 (L \times A)$, donde Ah (área de la hoja), 0.603 y 0.581 (coeficientes establecidos para cálculo de área foliar en la especie *P. vulgaris*), L (Largo de la hoja) y A (ancho de la hoja).

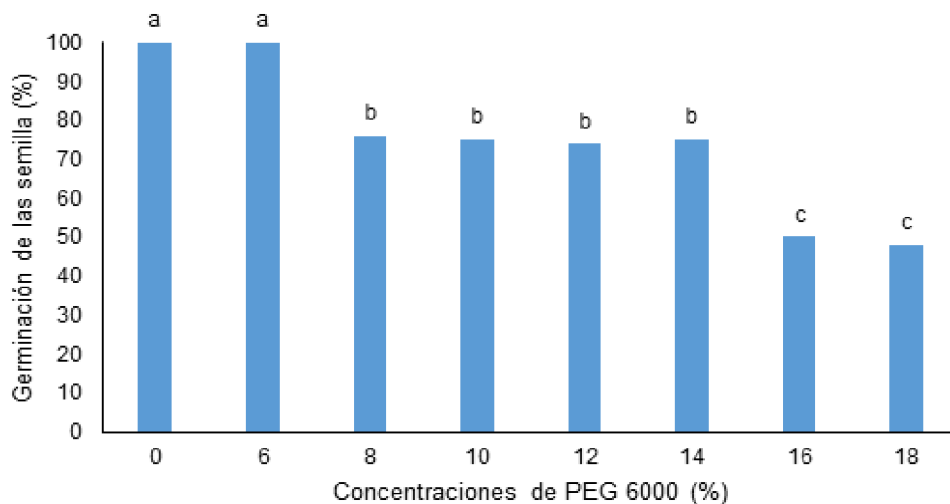
Para el análisis estadístico de los datos experimentales se utilizó el Paquete estadístico SPSS versión 21.0. Se comprobó la normalidad y la homogeneidad de varianza, mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la prueba de Levene, respectivamente. Como los datos no cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza, se aplicó un análisis no paramétrico mediante las pruebas de Kruskal Wallis y Mann Whitney para un nivel de confianza del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las semillas previamente embebidas germinaron en todos los tratamientos. Sin embargo, con el aumento de las concentraciones de PEG 6000 disminuyó el porcentaje de germinación (Figura 1).

Con la menor concentración de PEG 6000 (6%) no se afectó la germinación, en este tratamiento al igual que en el control se alcanzó un 100% de germinación. En las soluciones con concentraciones entre 8 y 14% el porcentaje de germinación decreció más de un 20% sin diferencias entre estos tratamientos, pero significativamente inferior al valor presentado en el control. La germinación fue drásticamente reducida con 16 y 18% de PEG 6000, las semillas colocadas en ambas concentraciones mostraron los porcentajes más bajos en esta variable (Figura 1).

En este sentido, la germinación de la semilla y el crecimiento prematuro de la plántula son consideradas fases críticas para la colonización y el establecimiento de cualquier especie de planta. Según Zhu *et al.* (2011) la



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

Figura 1. Germinación de semillas de *Phaseolus vulgaris* L. cv. 'ICA Pijao' después de 48 horas en presencia de PEG 6000.

inducción *in vitro* del estrés hídrico, utilizando PEG 6000 en semillas de *P. vulgaris*, facilita la evaluación de parámetros fisiológicos asociados con la germinación que podrían ser usados como fuente para discriminar líneas de *P. vulgaris* tolerantes a la sequía.

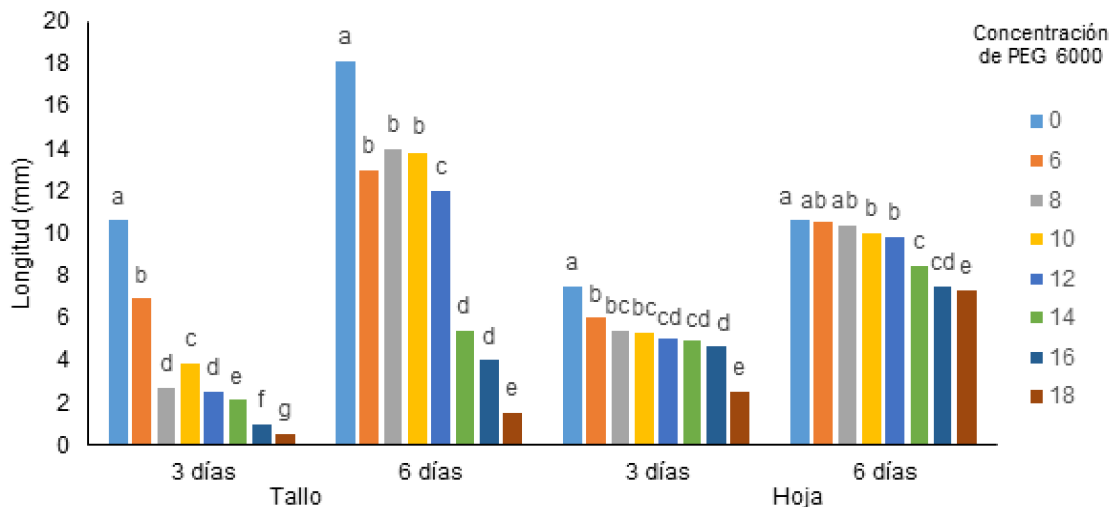
En este trabajo, las altas concentraciones de PEG 6000 (16 y 18%) redujeron la absorción de agua por las semillas, lo que trajo como consecuencia la disminución en un 50% del porcentaje de germinación. Estos resultados son similares a los obtenidos por Moraes *et al.* (2005), quienes observaron una significativa reducción de la germinación y el vigor de las plántulas de *P. vulgaris* cuando las concentraciones de PEG 6000 estaban por encima del 14%.

De igual forma, con la aplicación de este agente estresante, Hamidi y Safarnejad (2010) detectaron una disminución del porcentaje de germinación en semillas de alfalfa (*Medicago sativa* L.). Por el contrario, Erice *et al.* (2010), en esta misma especie no encontraron diferencias entre cuatro genotipos respecto a la longitud y la masa seca de las semillas bajo condiciones de estrés hídrico *in vitro*. Sin embargo, en investigaciones realizadas por Suárez *et al.* (2014) evaluaron el efecto del PEG 8000 sobre la germinación de las semillas de *P. vulgaris* L. y obtuvieron como resultado una disminución marcada del

porcentaje de germinación en los diferentes cultivares al 10 y 15% de PEG 8000 al compararlos con el control no estresado.

La adición de PEG 6000 también afectó el crecimiento de otros órganos como la raíz y el tallo. Con el incremento de las concentraciones de este agente estresante se observó un aumento del número de raíces secundarias y una reducción de la longitud del tallo y la raíz en comparación con el control. Para la variable longitud de las raíces se observaron menores afectaciones que para la longitud del tallo. Las diferencias en el crecimiento de ambos órganos (tallo y raíz), en dependencia de la concentración de PEG 6000 empleada, se apreciaron al inicio de la germinación, a los tres días y en la culminación de esta etapa, a los seis días (Figura 2).

El crecimiento del tallo y la raíz fue inversamente proporcional al aumento de las concentraciones de PEG 6000. Las mayores afectaciones se obtuvieron con la concentración de 18% donde fue muy pobre el crecimiento del tallo, tanto a los tres como a los seis días después de la germinación, lo que difirió significativamente con los demás tratamientos (Figura 3). Estos resultados evidencian que en el cultivar 'ICA Pijao' las concentraciones de PEG 6000 a utilizar en bioensayos para evaluar la respuesta de la planta deben ser menores de 18%.



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

Figura 2. Crecimiento de tallo y raíz en plántulas de *Phaseolus vulgaris* L. cv. 'ICA Pijao' de semillas germinadas en presencia de diferentes concentraciones de PEG 6000 a los tres y seis días.

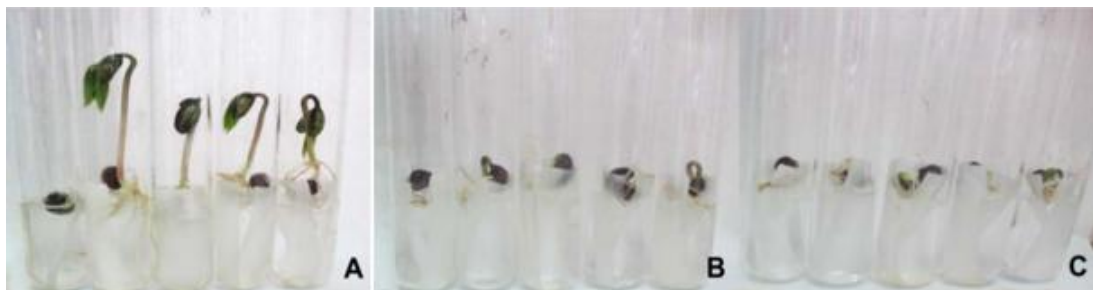


Figura 3. Efecto de PEG 6000 sobre semillas de *Phaseolus vulgaris* cv. 'ICA Pijao' a los seis días A) Control, B) 16% de PEG 6000 y C) 18 % de PEG 6000.

Los resultados de este trabajo se corresponden con lo planteado por Barrios *et al.* (1998) quienes demostraron que el frijol común duplica el número de raíces secundarias y terciarias en respuesta a la sequía. Una respuesta común de las plantas a la sequía es la disminución del crecimiento de las semillas y favorecer el crecimiento de la raíz para aumentar la absorción de agua (Wu *et al.*, 2008). Sobre lo anterior, Rashidi (2011) observó una reducción del crecimiento de las semillas de diferentes genotipos de *P. vulgaris* sometidos a los efectos de la sequía en condiciones de campo. De igual forma, Suárez *et al.* (2014) al analizar la longitud del tallo y la raíz comprobaron que estos parámetros de crecimiento se afectaron en los genotipos estudiados de *P. vulgaris*, en las condiciones de sequía experimental, siendo la afectación más severa en las semillas germinadas en la concentración de 20% de PEG.

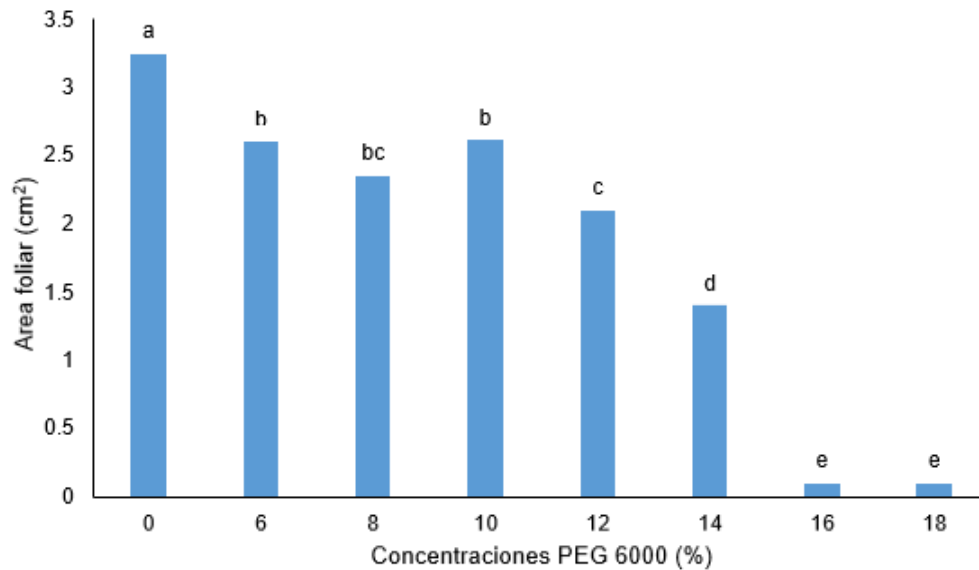
Además, según lo planteado por Bhatt y Srinivasa (2005), la reducción del crecimiento en las plantas está asociada con la disminución del ancho de la célula y una mayor senescencia bajo el estrés hídrico. Por esto, se puede decir que las deformaciones observadas en la arquitectura de la planta después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

Un profundo y extenso sistema radicular respalda el incremento de la productividad de las leguminosas bajo condiciones de

sequía. La longitud de la raíz podría ser una característica importante en la selección *in vitro* de cultivares de frijol tolerantes a la sequía con una mejor capacidad para obtener agua.

El PEG 6000 también afectó el desarrollo del área foliar de *P. vulgaris* cv. 'ICA Pijao'. En presencia de las menores concentraciones (6, 8 y 10%) de este agente estresante, la expansión de las hojas primarias fue significativamente inferior comparada con el tratamiento control (Figura 4). El incremento de las concentraciones de PEG 6000 a partir del 12% redujo considerablemente el área de las hojas primarias. La mayor afectación en el área foliar, se observó con PEG 6000 al 16 y 18%. En estos tratamientos las plántulas no presentaron hojas expandidas.

Resultados similares fueron informados por Gunton y Evenson (1980) y Barrios *et al.* (1998), quienes observaron una reducción del área foliar de las plantas de frijol cuando estas fueron expuestas a estrés hídrico durante la fase de crecimiento vegetativo. De igual forma, concuerdan con lo planteado por Passioura (2002), quien refiere que la variación del área foliar es una de las respuestas macroscópicas más tempranas en plantas que sufren déficit hídrico. Se ha considerado que el déficit hídrico reduce el crecimiento de la hoja y como consecuencia el área foliar en muchas especies de leguminosas como el frijol (Zhang *et al.*, 2004), lo que trae como consecuencia una disminución de los procesos fotosintéticos. En este sentido, Sánchez-Blanco *et al.* (2009) indujeron la disminución del área foliar en plantas expuestas a diferentes regímenes de agua y Emam *et al.* (2010) observaron reducción del área foliar en dos cultivares de frijol común con diferentes hábitat de crecimiento bajo los efectos de sequía.



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

Figura 4. Área foliar de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. cv. 'ICA Pijao' obtenidas de semillas germinadas en presencia de diferentes concentraciones de PEG 6000 a los seis días.

La disminución del área foliar por planta constituye una respuesta adaptativa que se produce una vez que aumenta la concentración de la solución de PEG 6000, lo cual contribuye a controlar la pérdida de agua bajo condiciones de sequía inducida. Por tanto la disminución del área foliar constituye una variable morfofisiológica que podría servir como criterio de selección para encontrar genotipos de frijol tolerantes al estrés hídrico en programas de mejoramiento genético.

CONCLUSIONES

El PEG 6000 puede ser utilizado para determinar la respuesta fisiológica de plantas de frijol común 'ICA Pijao' ante estrés hídrico. El incremento de las concentraciones de este agente estresante redujo el porcentaje de germinación *in vitro* de semillas. Las concentraciones a utilizar deben ser menores de 18%.

REFERENCIAS

Abdellatif KA, El S, El Ab, Zakaria A (2012) Drought stress tolerance of faba bean as studied by morphological traits and seed storage protein pattern. *Journal of Plant Studies* 1 (2):47-54

Domínguez A, Pérez Y, Alemán S, Sosa M, Fuentes L, Darias R, Demey J, Rea R, Sosa D (2014)

Respuesta de cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. al estrés por Sequía. *Biotecnología Vegetal* 14 (1): 29-36

Barrios A, Ritchie NJ, Smucker AJ (1998) El efecto de la sequía en el crecimiento, la fotosíntesis y la interceptación de luz en el frijol común. *Agronomía Mesoamericana* 9: 1-8

Bhatt R, Srinivasa N (2005) Influence of pod load on response of okra to water stress. *Indian journal of plant physiology* 10: 54-59

Campos GM, García D, Pérez Y, Ramis C (2011) Respuesta de 20 variedades de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) ante el estrés por NaCl durante la germinación y en fase plantular. *Biagro* 23(3): 215-224

Emam Y, Shekoofa A, Saleh, F, Jalali A (2010) Water stress effects on two common bean cultivars with contrasting growth habits. *Am-Eur J Agric Environ Sci.* 9: 495-499

Erice G, Louahlia S, Irigoyen JJ, Sanchez-Diaz M, Avicé J-C (2010) Biomass partitioning, morphology and water status of four alfalfa genotypes submitted to progressive drought and subsequent recovery. *Journal of plant physiology* 167: 114-120

Gunton J, Evenson J (1980) Moisture stress in navy beans. I. Effect of withholding irrigation at different phenological stages on growth and yield. *Irrigation Science* 2: 49-58

- Hamidi H, Safarnejad A (2010) Effect of drought stress on alfalfa cultivars (*Medicago sativa* L.) in germination stage. Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci. 8 (6): 705-709
- Jaleel CA, Manivannan P, Wahid A, Farooq M, Al-Juburi H J, Somasundaram R, Panneerselvam R (2009) Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. Int. J. Agric. Biol. 11: 100-105
- Mahajan S, Tuteja N (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview. Archives of biochemistry and biophysics 444: 139-158
- Michel B E, Kaufmann M R (1973) The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. Plant physiology 51: 914-916
- Moraes GAF, Menezes NL, Pasqualli LL (2005) Bean seed performance under different osmotic potentials. Ciência Rural 35: 776-780
- Passioura J (2002) Soil conditions and plant growth. Plant, Cell & Environment 25: 311-318
- Porch T, Ramírez V, Santana D, Harmsen E (2009) Evaluation of common bean for drought tolerance in Juana Díaz, Puerto Rico. Journal of Agronomy & Crop Science 195:328-334
- Rai MK, Kalia RK, Singh R, Gangola MP, Dhawan A (2011) Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection—an overview of the recent progress. Environmental and Experimental Botany 71: 89-98
- Ramírez JCR, Rangel IBEU (2011) El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. Revista Fuente 3 (8): 5-9
- Rashidi V (2011) Drought effects on morphological traits of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes. Annals of Biological Research 2 (5): 95-99
- Sánchez-Blanco MJ, Álvarez S, Navarro A, Bañón S (2009) Changes in leaf water relations, gas exchange, growth and flowering quality in potted geranium plants irrigated with different water regimes. Journal of plant physiology 166: 467-476
- Schulze ED, Beck E, Muller-Hohenstein K (2005) Environment as Stress Factor: Stress Physiology of Plants. En: Schulze ED, Beck E, Muller-Hohenstein K (Eds). Plant Ecology, pp. 7-19. Springer. Berlín.
- Suárez AD, Hernández YP, del Castillo MS, del Castillo DS, Suárez RR (2014) Efecto del estrés hídrico sobre la germinación de genotipos de frijol común en condiciones experimentales de sequía. Avanzada Científica 17: 53-67
- Wu F, Bao W, Li F, Wu N (2008) Effects of drought stress and N supply on the growth, biomass partitioning and water-use efficiency of *Sophora davidii* seedlings. Environmental and Experimental Botany 63: 248-255
- Zhang M, Duan L, Zhai Z, Li J, Tian X, Wang B, He Z, Li Z (2004) Effects of plant growth regulators on water deficit-induced yield loss in soybean. Proceedings of the 4th International Crop Science Congress, pp. 252-256. Brisbane, Australia.
- Zhu J, Ingram PA, Benfey PN, Elich T (2011) From lab to field, new approaches to phenotyping root system architecture. Current opinion in plant biology 14: 310-317

Recibido: 22-06-2015

Aceptado: 25-09-2015