

## Diferenciación de cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. mediante respuesta del tejido foliar expuesto a estrés hídrico y salino

Raúl Collado<sup>1</sup>, Annerys Carabeo Pérez<sup>2</sup>, Ivian Poveda Martínez<sup>2</sup>, Luis E. Rojas<sup>1</sup>, Michel Leiva-Mora<sup>1</sup>, Lourdes R García<sup>1</sup>, Novisel Veitía<sup>1</sup>, Amanda Martirena<sup>1</sup>, Damaris Torres<sup>1</sup>, Leonardo Rivero<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54830.  
e-mail: raulc@ibp.co.cu

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54830.

### RESUMEN

La identificación de cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. capaces de tolerar estrés abiótico sin que se afecte su rendimiento es un propósito de los programas de mejoramiento genético de esta leguminosa. El objetivo de este trabajo fue diferenciar cultivares de *P. vulgaris* mediante la respuesta de tejido foliar expuesto a estrés hídrico y salino inducido *in vitro*. Discos de hojas del cultivar 'Cuba Cueto 25-9 Negro' se colocaron en placas Petri sobre papel de filtro. En cada placa se añadieron 2 ml de solución de PEG 6000 al 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 18% (m/v) o NaCl a 50, 100, 150, 200, 250 y 300 mM para inducir estrés hídrico o salino. Como control se empleó agua desionizada. Las placas se mantuvieron durante 48 h a 25 ± 2 °C. Se elaboró una escala de grados de afectación según el porcentaje de área foliar con necrosis. En diez cultivares se aplicó el ensayo y se registró su respuesta mediante la escala elaborada. El tejido foliar a las 48 h presentó áreas necróticas. La escala diseñada se estructuró con siete grados donde el grado 1 se correspondió con tejido no afectado y el siete con tejido con necrosis total. Se observó predominio de los grados 3, 4 y 5. La respuesta de los cultivares expuestos a PEG 6000 y NaCl estuvo influenciada por el tipo de agente estresante y se clasificó en alta, intermedia o baja. El ensayo de discos de hojas de *P. vulgaris* sometidos a estrés hídrico y salino inducidos *in vitro* permitió diferenciar la respuesta de cultivares a estas condiciones mediante una escala cualitativa elaborada basada en el porcentaje de área con necrosis.

Palabras clave: áreas necróticas, leguminosa, mejoramiento genético, NaCl, PEG 6000

## Differentiation of *Phaseolus vulgaris* L. cultivars by leaf tissue response exposed to drought and salinity stress

### ABSTRACT

The identification of *Phaseolus vulgaris* L. cultivars capable to tolerate abiotic stress without affecting its yield is a purpose of the breeding programs of this legume. The objective of this work was to differentiate *P. vulgaris* cultivars by the foliar tissue response exposed to hydric and saline stress *in vitro* induced. Leaf discs of 'Cuba Cueto 25-9 Negro' cultivar were placed in Petri dishes on filter paper. On each plate 2 ml of 6, 8, 10, 12, 14, 16 and 18% (w / v) PEG 6000 or 50, 100, 150, 200, 250, and 300 mM NaCl solution were added to induce hydric or saline stress. Deionized water was used as the control. The plates were maintained for 48 h at 25 ± 2 ° C. A scale of degrees of affectation was elaborated according to the percentage of foliar area with necrosis. In ten cultivars of *P. vulgaris* the assay was applied and its response recorded by the elaborated scale. Leaf tissue at 48 h showed necrotic areas. The designed scale was structured with seven grades where grade 1 corresponded with unaffected tissue and seven with tissue with total necrosis. The predominance of grade 3, 4 and 5 was observed. The response of cultivars exposed to PEG 6000 and NaCl was influenced by the type of stressor and it was classified as high, intermediate or low. The test of *P. vulgaris* leaf discs subjected to *in vitro* induced hydric and saline stress allows differentiation of the response of cultivars to these conditions through an elaborated qualitative scale based on the percentage of area with necrosis.

Keywords: necrotic areas, legume, genetic improvement, NaCl, PEG 6000

### INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), es la leguminosa más importante en la dieta diaria

de los cubanos, por necesidades nutricionales y por estar al alcance de la mayoría. Su alto contenido en proteínas lo sitúa como un cultivo estratégico del país ya que permite palear el

déficit de proteínas en la dieta alimentaria, uno de los mayores problemas de los países en desarrollo (Porrata *et al.*, 2008). Según la Oficina Nacional de Estadística e Información de la República de Cuba (ONEI, 2016) la producción de frijol en el 2015 fue de 117.6 miles de toneladas, la que decreció en un 13.2% respecto al 2014.

El estrés hídrico, provocado por déficit de agua, constituye la segunda causa que limita la producción de frijol en Cuba (Polón *et al.*, 2014) y en América Latina (Suárez *et al.*, 2016). Cuando el déficit hídrico se presenta durante la etapa reproductiva tiene efectos adversos sobre el rendimiento del frijol (Boicet, 2010). El estrés salino es otro factor ambiental importante que afecta el crecimiento y desarrollo de este cultivo. Aunque *P. vulgaris* se considera una de las especies con tolerancia a la salinidad (Barrero *et al.*, 2012), se ha informado que bajo condiciones de estrés salino se afecta la germinación de las semillas, su emergencia o el posterior establecimiento de las plántulas (Dantas *et al.*, 2007, Kaymakanova, 2009), se reduce la formación de nódulos (Ashraf y Harris, 2004) y se retarda el crecimiento vegetativo (García *et al.*, 2010), todo lo cual repercute negativamente sobre la productividad de este cultivo. Por ello, se requiere de investigaciones que contribuyan con la identificación de cultivares de frijol tolerantes al estrés hídrico.

A nivel de laboratorio es posible, con el empleo de agentes estresantes, simular condiciones de estrés hídrico y salino para determinar el grado de tolerancia o afectación de tejido y plantas a estos ambientes adversos. En relación con esto, se han utilizado diferentes compuestos entre los que se recomiendan: manitol, sorbitol, cloruro de sodio (NaCl) (Zeng y Shannon, 2000; Ashraf y Harris, 2004; Zeid, 2004; Shereen *et al.*, 2005) y el polietilenglicol (PEG) (Lu y Neumann, 1999; Basra *et al.*, 2005). De ellos, los más utilizados son PEG y NaCl (Rai *et al.*, 2011; Thiam *et al.*, 2013).

Ante un escenario de estrés hídrico o salino, la planta se marchita y sobre las zonas afectadas es característica la aparición de manchas necróticas. En condiciones de laboratorio, la presencia de estos síntomas se han observado en discos de hojas, después de ser incubados durante dos días con diferentes

concentraciones de PEG 6000 o NaCl (Schulze *et al.*, 2005). El empleo de una escala basada en las dimensiones de estas áreas necróticas permitiría a través de un análisis cuantitativo, comparar la respuesta al estrés hídrico o salino de diferentes cultivares y podría ser un indicador de cuáles son las concentraciones de NaCl o PEG a tolerar por cada cultivar. Sin embargo, la formación de áreas necróticas en el tejido ha sido poco explorada como variable y en la literatura científica internacional no se han descrito escalas para equiparar el área de las zonas afectadas con valores cuantitativos de tolerancia a estrés abiótico en frijol común. Este trabajo se realizó con el objetivo de diferenciar cultivares de *P. vulgaris* mediante la respuesta de tejido foliar expuesto a estrés hídrico y salino inducido *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Material vegetal, condiciones de cultivo y colecta de muestras*

Se emplearon semillas de *P. vulgaris* de los cultivares 'ICA Pijao', 'I45R', 'L68.3', 'L84.9', 'L84.6', 'L84.4', 'Tomeguín-93', 'BAT-93', 'Cuba Cueto 25-9 Negro' y 'Guamá-23', procedentes del banco de germoplasma del Centro de Investigaciones Agropecuarias de la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas.

El material vegetal se mantuvo en una casa de cultivos protegidos con condiciones semicontroladas (temperatura ambiente de  $27 \pm 5$  °C, humedad relativa de  $84 \pm 5\%$  y una densidad de flujo de fotones fotosintéticos en el rango de  $280-400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). La siembra se realizó en bolsas de polietileno rellenas con  $1004.8 \text{ cm}^3$  de mezcla de sustrato (materia orgánica y zeolita en proporción 4:1). Se colocaron tres semillas por bolsa y se emplearon 25 bolsas por cada cultivar. Se efectuaron dos riegos al día con un sistema automático de aspersores.

Se colectaron la segunda y tercera hoja trifoliada de plantas con 30-35 días después de la germinación. Los foliolos se seccionaron en discos de 1.1 cm de diámetro con un horador. En todos los casos, las nervaduras principales y los extremos terminales de los foliolos se desecharon. Los discos de hojas obtenidos se utilizaron para evaluar la

respuesta del tejido foliar en condiciones de estrés hídrico y salino.

### **Respuesta del tejido foliar expuesto a condiciones de estrés hídrico y salino**

Con el objetivo de determinar la respuesta del tejido foliar bajo estrés hídrico y salino, se utilizaron placas Petri plásticas (8.5 cm diámetro) dentro de las cuales se colocó un papel de filtro (Whatman No. 42) que cubrió el área de la base de la placa. Se colocaron ocho discos de hojas en cada placa. Cada disco representó una unidad experimental, por lo que se establecieron ocho réplicas por cultivar. A cada placa se le añadieron 2 ml de solución de PEG 6000 o NaCl para inducir estrés hídrico o salino respectivamente. Como control se empleó agua desionizada.

El cultivar 'Cuba Cueto 25-9 Negro' sensible al estrés hídrico (Domínguez *et al.*, 2014) se empleó para la elaboración de una escala cualitativa que se utilizó para la evaluación de los grados de afectación por necrosis. Para ello la solución de PEG 6000 y agua desionizada se preparó a las concentraciones 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 18% (m/v) que equivalen a los potenciales osmóticos: 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). En el caso del NaCl, se incluyeron seis concentraciones (50, 100, 150, 200, 250 y 300 mM), su equivalencia con los potenciales osmóticos es la siguiente: 50 mM (-0.2 MPa), 100 mM (-0.4 MPa), 150 mM (-0.6 MPa), 200 mM (-0.8 MPa), 250 mM (-1.0 MPa) y 300 mM (-1.2 MPa) según lo descrito por Sosa *et al.* (2005).

La escala se estructuró con grados definidos según el porcentaje de área afectada por necrosis. Se cuantificó el número de discos por grado de afectación y se realizó un análisis de frecuencia de aparición mediante el empleo de estadísticos descriptivos a través de tablas de frecuencia. Además, se hizo un análisis de regresión múltiple de los datos.

Con la escala elaborada se determinó la respuesta del tejido foliar de 10 cultivares de *P. vulgaris* expuesto a estrés hídrico inducido con PEG 6000 al 6% y salino con NaCl a 200 mM.

Las placas con las muestras expuestas a estrés hídrico y salino, así como el control,

fueron mantenidas durante 48 h a  $25 \pm 2$  °C. Luego de este período con la escala elaborada se comparó la respuesta de los cultivares incluidos en el estudio.

### *Análisis estadístico*

Los datos experimentales se analizaron con el paquete estadístico SPSS versión 21.0. La normalidad y la homogeneidad de varianza, se comprobaron mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y de Levene, respectivamente. Para los datos que no cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza, se aplicó un análisis no paramétrico mediante las pruebas H de Kruskal Wallis y U de Mann Whitney para un nivel de confianza del 95%.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**








### **Respuesta del tejido foliar expuesto a condiciones de estrés hídrico y salino**

El tejido foliar del cultivar 'Cuba Cueto 25-9 Negro' expuesto a condiciones de estrés inducido con PEG 6000 y NaCl, a las 48 h presentó áreas necróticas, lo que podría estar relacionado con la muerte de las células que forman ese tejido. Atendiendo al porcentaje de área del disco foliar con necrosis la escala diseñada se estructuró con siete grados donde el grado 1 se correspondió con tejido no afectado y el siete con tejido con necrosis total (Tabla 1).

La frecuencia de aparición de los grados de afectación definidos varió en las muestras del cultivar 'Cuba Cueto 25-9 Negro' utilizadas para la confección de la escala con predominio de los grados 3, 4 y 5. El gráfico que se obtuvo mostró una distribución gaussiana por la normalidad con la que se distribuyeron los datos y se ajustó a un modelo polinómico de grado 2 ( $R^2 = 0.9847$ ) (Figura 1).

Cuando se analizó la respuesta de los diferentes cultivares expuestos a PEG 6000 y NaCl se observó que la frecuencia relativa de aparición de los grados de afectación estuvo influenciada por el tipo de agente estresante empleado (Figuras 2 y 3). A causa de ello tanto para las muestras expuestas al PEG 6000 como para aquellas tratadas con NaCl esta respuesta se clasificó en alta, intermedia o baja.

Tabla 1. Escala cualitativa para la evaluación de la formación de áreas necróticas en tejido foliar de *P. vulgaris* expuesto a estrés hídrico y salino inducido con PEG 6000 o NaCl.

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

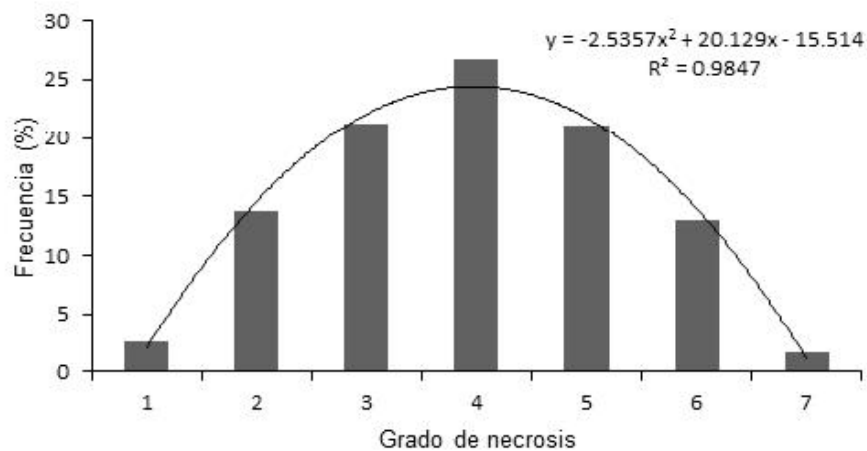


Figura 1. Frecuencia relativa de aparición de los grados de afectación del tejido foliar de *P. vulgaris* expuesto a diferentes concentraciones de NaCl y PEG 6000. 1. tejido no afectado, 2. 10% de necrosis, 3. 25% de necrosis, 4. 50% de necrosis, 5. 75% de necrosis, 6. 90% de necrosis, 7. tejido con necrosis total.

Con 6% de PEG 6000, se observó una respuesta variada en dependencia del cultivar (Figura 2). En este caso los cultivares que tuvieron menor grado de afectación fueron 'ICA Pijao' e 'I45R' que mostraron una respuesta alta, pues según la

escala propuesta la afectación observada fue solo de grado 2. A ellos le siguieron los cultivares 'Tomeguín-93', 'L84.9', 'L68.3', 'L84.6' y 'Guamá 23' que mostraron respuesta intermedia, los que presentaron grados de afectación 2, 3 y 4. La

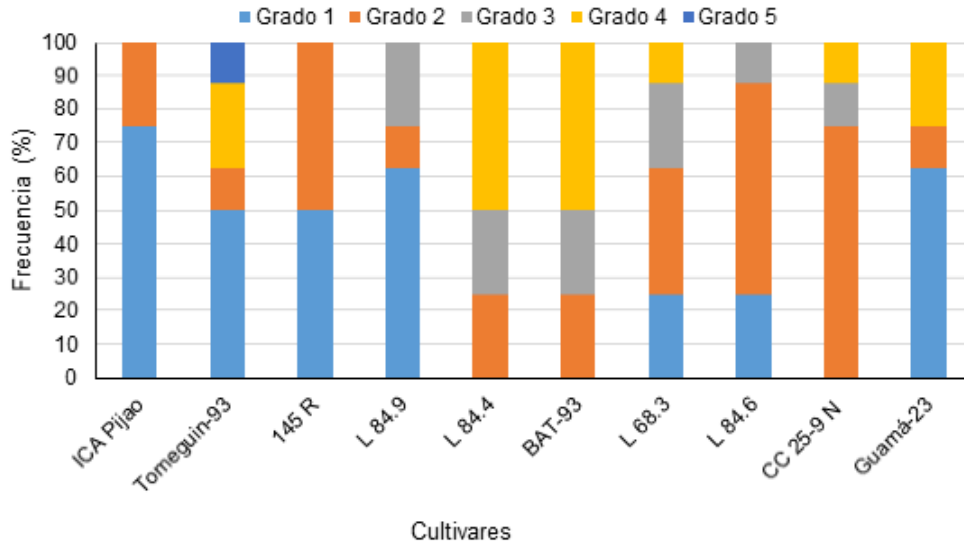
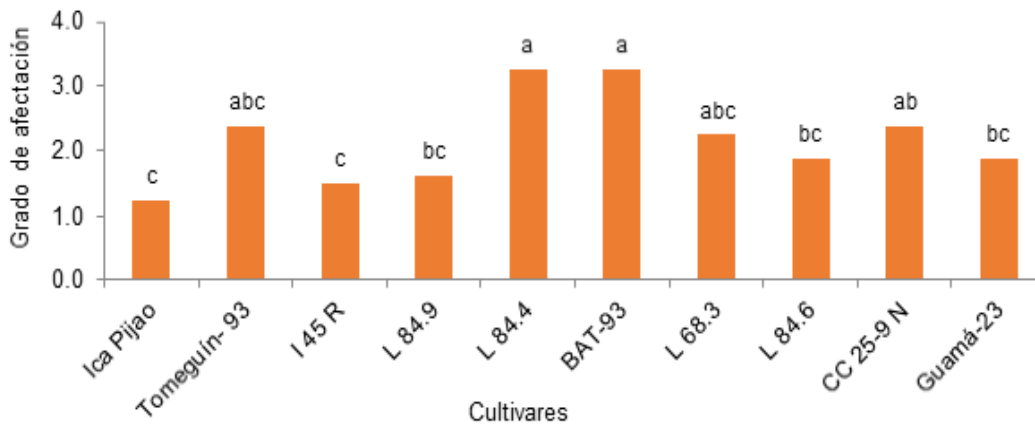


Figura 2. Frecuencia de aparición de grados de afectación del tejido foliar de *P. vulgaris* expuesto a 6% de PEG 6000. 1. tejido no afectado, 2. 10% de necrosis, 3. 25% de necrosis, 4. 50% de necrosis, 5. 75% de necrosis.



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

Figura 3. Grado de afectación promedio del tejido foliar de diferentes cultivares de *P. vulgaris* colocados en una solución con 6% de PEG 6000.

respuesta más baja se identificó en los cultivares 'L84.4', 'BAT-93' y 'Cuba Cueto 25-9 Negro', estos presentaron el mayor grado de afectación promedio. Es de destacar que aunque en el tejido foliar de 'L84.4' y 'BAT-93' se identificaron varios grados de afectación, el 4 (disco con 50% de necrosis) tuvo la mayor frecuencia de aparición (Figura 3).

El estrés hídrico produce pérdida de clorofilas acompañada de clorosis característica y posteriormente necrosis del tejido (Wong y

Nadeson, 1993). En la presente investigación se observó esta secuencia sintomatológica en los discos de hojas expuestos a diferentes concentraciones de PEG 6000. La formación de las áreas necróticas es una consecuencia de la senescencia del tejido foliar, pues bajo estrés hídrico, se afectan diferentes procesos metabólicos y bioquímicos como la reducción del contenido de clorofila y la síntesis de otros pigmentos que afectan el proceso de la fotosíntesis (Jaleel *et al.*, 2009).

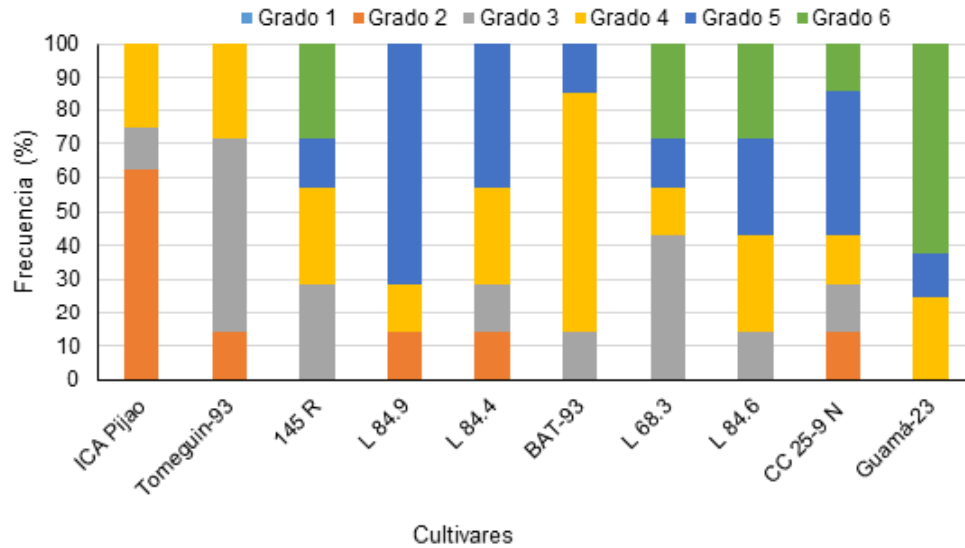


Figura 4. Frecuencia de aparición de los grados de afectación del tejido foliar de *P. vulgaris* expuesto a 200mM de NaCl. 1. tejido no afectado, 2. 10% de necrosis, 3. 25% de necrosis, 4. 50% de necrosis, 5. 75% de necrosis, 6. 90% de necrosis.

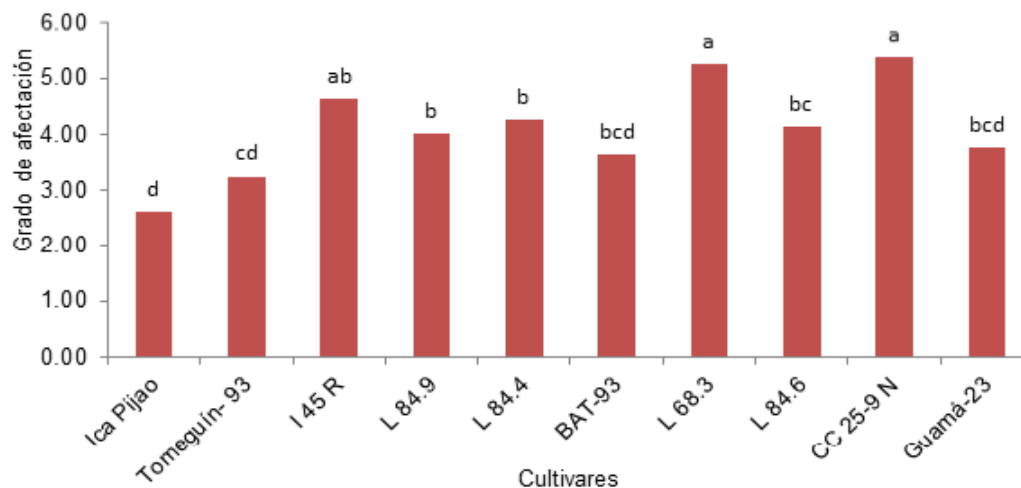
Hasta la fecha no se encontraron informes acerca de la respuesta al estrés hídrico y salino de la mayoría de los cultivares de *P. vulgaris* evaluados, de ahí su importancia para iniciar estudios que corroboren estos resultados en planta en condiciones de casa de cultivo y campo. Es de destacar que los resultados del cultivar 'Cuba Cueto 25-9 Negro' coincidieron con lo informado por Domínguez *et al.* (2014) que lo refieren como sensible en condiciones de estrés hídrico. Ello indicó que el ensayo de discos de hojas colocados en condiciones de estrés hídrico y salino puede ser una herramienta útil para la selección de cultivares de frijol común tolerantes a estrés hídrico.

El tejido foliar de los diferentes cultivares tratados con 200 mM de NaCl también presentó afectaciones. El cultivar 'ICA Pijao' tuvo la respuesta más alta con el menor grado de afectación. En este cultivar el grado 2 de afectación presentó la mayor frecuencia de aparición, aunque también se observaron afectaciones de grado 3 y 4. En el caso de los cultivares '145 R', 'L68.3', 'L84.6', 'Cuba Cueto 25-9 Negro' y 'Guamá-23' que presentaron mayor grado de afectación con una respuesta baja, se observó tejido con grado 6, pues este resultó afectado hasta en un 90% (Figura 5).

Respecto a la respuesta fisiológica de las leguminosas al estrés salino se han encontrado

diferentes planteamientos. Por ejemplo, Garzón y García (2011) en el estudio del efecto de NaCl (100 mM) sobre la anatomía radicular y foliar en dos cultivares de frijol de la especie *Vigna unguiculata* (L.) Walp., revelaron una inducción de tricomas glandulares en las hojas primarias de las plantas estresadas, así como invaginaciones en las células del parénquima en empalizada y arreglo menos compacto del mesófilo. En tres cultivares también encontraron una reducción significativa del grosor de la hoja y de la epidermis adaxial del parénquima clorofílico en empalizada y esponjoso. Estos autores concluyeron que los mecanismos anatómicos de adaptación de esta especie al estrés por NaCl están relacionados con el mantenimiento de la integridad del tejido foliar. Sin embargo, las respuestas obtenidas en este trabajo en los diferentes cultivares evaluados no se han descrito para frijol común en la literatura científica consultada.

Los resultados demostraron que la formación de áreas necróticas bajo las condiciones establecidas en esta investigación permiten diferenciar la respuesta de los cultivares de frijol expuestos a estrés hídrico o salino. La validación de este procedimiento como una herramienta para seleccionar cultivares de frijol tolerantes al estrés hídrico o salino requiere de futuras investigaciones para correlacionar estos



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

Figura 5. Grado de afectación promedio del tejido foliar de 10 cultivares de *P. vulgaris* expuesto a estrés hídrico inducido con 200 mM de NaCl.

resultados con la respuesta de los cultivares expuestos a déficit hídrico y altas concentraciones de sales en condiciones de campo.

## CONCLUSIONES

El ensayo de discos de hojas de *P. vulgaris* sometidos a condiciones de estrés hídrico y salino inducidos *in vitro* permite diferenciar la respuesta de cultivares mediante una escala cualitativa elaborada basada en el porcentaje de área con necrosis.

## REFERENCIAS

Ashraf M, Harris P (2004) Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science* 166: 3-16; doi: 10.1016/j.plantsci.2003.10.024

Barrero KYA, Sánchez RL, Flores RA, Garcés IA, Pascual MF (2012) Tolerancia a la salinidad de cuatro genotipos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Centro Agrícola* 39 (4): 39-43

Basra S, Farooq M, Tabassam R, Ahmad N (2005) Physiological and biochemical aspects of pre-sowing seed treatments in fine rice (*Oryza sativa* L.). *Seed Science and Technology* 33 (3): 623-628; doi: 10.15258/sst.2005.33.3.09

Boicet T (2010) Estrés hídrico y la distribución de características vegetativas y reproductivas en genotipos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). En: Ediciones INCA (ed) Libro Resumen XVII Congreso

Científico Internacional del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, pp. 145. INCA, La Habana

Dantas BF, Ribeiro LdS, Aragão CA (2007) Germinação, crescimento inicial e teor de proteína nos cotiledones de feijão em estresse salino. *Revista Brasileira de Sementes* 29 (1): 106-110; doi: 10.1590/S0101-31222007000200014

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

García M, García G, Sanabria M (2010) Efecto de la salinidad sobre el crecimiento, daño oxidativo y concentración foliar de metabolitos secundarios en dos variedades de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.). *Interciencia* 35 (11): 840-846

Garzón P, García M (2011) Efecto del estrés por NaCl sobre la anatomía radical y foliar en dos genotipos de frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Bioagro* 23 (3): 153-160

Jaleel CA, Manivannan P, Wahid A, Farooq M, Al-Juburi HJ, Somasundaram R, Panneerselvam R (2009) Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *Int J Agric Biol* 11 (1): 100-105

Kaymakanova M (2009) Effect of salinity on germination and seed physiology in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 23 (2): 326-329; doi:10.1080/13102818.2009.10818430

- Lu Z, Neumann PM (1999) Water stress inhibits hydraulic conductance and leaf growth in rice seedlings but not the transport of water via mercury-sensitive water channels in the root. *Plant Physiology* 120: 143-152; doi:10.1104/pp.120.1.143
- Oficinal Nacional de Estadística e Información (2016) Anuario estadístico de Cuba 2016. Disponible en: <http://www.one.cu/aec2015.htm> Consultado 06/09/2016
- Polón Pérez R, Miranda Caballero A, Ramírez Arrebato MA, Maqueira López LA (2014) Efectos del estrés de agua sobre el rendimiento de granos en la fase vegetativa en el cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias* 23 (4): 33-36
- Porrata Maury C, Hernández Triana M, Abuín Landín A, Campa Huergo C, Pianesi M (2008) Caracterización y evaluación nutricional de las dietas macrobióticas Ma-Pi. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 27: 3-4
- 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 (1): 89-98; doi: 10.1016/j.envexpbot.2010.10.021
- Schulze ED, Beck E, Muller-Hohenstein K (2005) *Plant Ecology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New Delhi; ISBN: 978-3-540-20833-4
- Shereen A, Mumtaz S, Raza S, Khan M, Solangi S (2005) Salinity effects on seedling growth and yield components of different inbred rice lines. *Pak J Bot* 37 (1): 131-139
- Sosa L, Llanes A, Reinoso H, Reginato M, Luna V (2005) Osmotic and specific ion effects on the germination of *Prosopis strombulifera*. *Annals of botany* 96 (2): 261-267; doi:10.1093/aob/mci173
- Suárez AD, Davalo YM, Hernandez YP, Alfonso LF, Rodríguez RD, del Castillo MS, del Castillo, DS (2016) Comportamiento de variedades cubanas y venezolanas de frijol común, cultivados en condiciones de sequía. *Revista Ciencia UNEMI* 9 (20): 68-75
- Thiam M, Champion A, Diouf D, Oureye M (2013). NaCl effects on *in vitro* germination and growth of some senegalese cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cultivars. *ISRN Biotechnology* 2013(2013): 1-11; doi:10.5402/2013/382417
- Wong N, Nadeson R (1993) Water stress and leaf necrosis symptom of rambutan seedlings (*Nephelium lappaceum* Linn.). *MARDI Res J* 21 (1): 51-58
- Zeid IM (2004) Response of bean (*Phaseolus vulgaris*) to exogenous putrescine treatment under salinity stress. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 7 (2): 219-225; doi:10.3923/pjbs.2004.219.225
- Zeng L, Shannon MC (2000) Salinity effects on seedling growth and yield components of rice. *Crop Sci* 40 (4): 996–1003; doi:10.2135/cropsci2000.404996x

Recibido: 12-12-2016  
Aceptado: 26-01-2017