



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**Caracterización fisiológica de cinco  
cultivares de frijol arbustivo (*Phaseolus  
vulgaris* L.) adaptados a la zona alto  
andina de Colombia y crecidas en  
condiciones de estrés por hipoxia**

**Nixon Flórez Velasco**

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento agronomía

Bogotá, Colombia

2017



# **Caracterización fisiológica de cinco cultivares de frijol arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L.) adaptados a la zona alto andina de Colombia y crecidas en condiciones de estrés por hipoxia**

**Nixon Flórez Velasco**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Fisiología de Cultivos**

Directora:

Ph.D., Liz Patricia Moreno Fonseca

Codirector:

Ph.D., Gustavo Adolfo Ligarreto

Línea de Investigación:

Fisiología de Cultivos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento agronomía

Bogotá, Colombia

2017

IV Caracterización fisiológica de cinco cultivares de frijol arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L.)  
adaptados a la zona alto andina de Colombia y crecidas en condiciones de estrés por hipoxia

---

*A mis padres*

## **Agradecimientos**

Agradezco a Dios por darme la sabiduría y mostrarme el camino que me permitió ingresar a la Universidad Nacional de Colombia, a mis padres Bernarda Velasco y Edison Flórez que gracias a su apoyo y colaboración hicieron posible la realización de esta tesis.

A mi directora Liz Patricia Moreno por su colaboración, disposición y asesoría en la realización de esta tesis y de mi formación como magister.

A mi codirector Gustavo Adolfo Ligarreto por su colaboración, consejos y asesoría en la elaboración de esta tesis

Al profesor Herman Restrepo Díaz por su asesoría en la planeación del ensayo preliminar y parte del primer ensayo de esta tesis.

A mis compañeros Alefsi David Sánchez y Cristian Camilo Chávez por su motivación y colaboración durante el desarrollo de esta tesis y por su constante apoyo.

A la beca exención de derechos académicos de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia.

Al programa estímulos a la investigación Thomas van der Hammen del Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis por la financiación de parte de esta tesis

Al programa jóvenes investigadores de Colciencias

VI Caracterización fisiológica de cinco cultivares de frijol arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L.) adaptados a la zona alto andina de Colombia y crecidas en condiciones de estrés por hipoxia

---

A la fundación para la promoción de la investigación y la tecnología del Banco de la República por la financiación de parte de esta tesis.

Al proyecto “Implementación de una innovación pedagógica basada en proyectos de investigación para promover el aprendizaje anclado a la práctica a través del trabajo colaborativo en el curso de fisiología vegetal”

Al proyecto “Mejoramiento de la competitividad de los cultivos de frijol y maíz en las regiones de Ubaté y Guavio en el departamento de Cundinamarca”.

Gracias a todas las personas que me brindaron su apoyo en esta etapa de mi vida.

## Resumen

Los sistemas productivos agrícolas están influenciados por las condiciones ambientales, que modifican el desempeño de las funciones fisiológicas de las especies cultivadas. El cambio climático trae como consecuencia el aumento en la frecuencia de fenómenos climáticos como La Niña, que pueden generar periodos prolongados de encharcamiento por el incremento en la intensidad de las lluvias, afectando negativamente el rendimiento de los cultivos. El objetivo de este trabajo es evaluar las respuestas fisiológicas y el rendimiento de grano en cinco materiales de frijol arbustivo en condiciones de estrés por anegamiento en condiciones controladas y semi-controladas. Se realizaron dos experimentos utilizando semillas de los cultivares Cerinza, Bachue, Bianca, Bacatá y NUA35. El primer experimento se realizó en el laboratorio de fisiología vegetal de la Facultad de Ciencias agrarias en condiciones controladas sobre un sistema hidropónico simulando hipoxia a través de bombeo de  $N_2$  a la solución nutritiva durante 14 días. Los resultados mostraron que para todas las cultivares que el tratamiento de hipoxia causó la reducción en  $P_n$ ,  $g_s$ ,  $\Phi_{PSII}$  (22%), NPQ (25%) y ETR (29%) y también una disminución significativa en el contenido de los pigmentos Chl *a* (24%), Chl *b* (13%), Chl total (33%) y Car (26%). La hipoxia también causó un incremento en el contenido de prolina en los cultivares Bachue, Bianca, Cerinza y NUA35 y aumentó PE en 270% en todos los cultivares. El Cultivar con mayor WUE y menor pérdida de masa seca fue Cerinza seguido por NUA35. De acuerdo con el coeficiente

de tolerancia al anegamiento (WTC) los cultivares Cerinza y NUA35 mostraron mayor tolerancia a la condición de hipoxia. El segundo experimento se realizó en los invernaderos de la facultad de Ciencias Agrarias en invernadero de plástico utilizando suelo. Semillas de los cinco cultivares fueron puestas en bolsas y sometidas a anegamiento durante 4 días y 8 días de recuperación en dos estados fenológicos, vegetativo y floración. A los cuatro días de anegamiento se observó una disminución significativa en la fotosíntesis (89 %), la conductancia estomática (83%), contenido relativo de clorofila (15%),  $F_o$  (7%),  $F_m$  (21%) y  $F_v/F_m$  (4%) respecto a las plantas control en los cinco cultivares evaluados. A los ocho días de recuperación se redujo significativamente la fotosíntesis (89%), la conductancia estomática (89%), contenido relativo de clorofila (54%),  $F_o$  (18%),  $F_m$  (15%) y  $F_v/F_m$  (8%) en todos los cultivares. El anegamiento impuesto en el estado vegetativo incrementó la producción de etileno (89%) en todos los cultivares. El anegamiento impuesto en el estado vegetativo causó reducción en el rendimiento de 64% y en el estado de floración de 84% en todos los cultivares, principalmente debido a reducción en el peso de las semillas, semillas por planta y vainas por planta. Según el coeficiente de tolerancia al anegamiento (WTC) el cultivar con mayor tolerancia al anegamiento en ambos estados fenológicos fue Cerinza. Se propone que la tolerancia en el estado vegetativo posiblemente se debe al aumento en la densidad del tejido de la hoja (DTH) y a la reducción en el área foliar específica (AFE), mientras que en el estado de floración se debe al aumento en el peso seco de la raíz (PSR) debido a una mayor partición de fotoasimilados hacia la raíz.

**Palabras clave: leguminosas, fotosíntesis, conductancia estomática, fenología, masa seca, índice de tolerancia, inundación.**

## **Abstract**

Agricultural production systems are influenced by environmental conditions, which modify the performance of the physiological functions of cultivated species. Climate change leads to an increase in the frequency of climatic events, such as La Niña, which can lead to prolonged periods of waterlogging due to the increase in rainfall intensity, adversely affecting crop yields. The objective of this work is to evaluate the physiological responses y grain yield in five shrub bean cultivars under conditions of hypoxia stress under controlled y semi-controlled conditions. Two experiments were carried out using seeds of the cultivars Cerinza, Bachue, Bianca, Bacatá y NUA35. The first experiment was carried out in the laboratory of plant physiology of the Faculty of Agricultural Sciences under controlled conditions on a hydroponic system simulating hypoxia through pumping N<sub>2</sub> to the nutrient solution for 14 days. The results showed that for all cultivars the hypoxia treatment caused the reduction in  $P_n$ ,  $g_s$ ,  $\Phi_{PSII}$  (22%), NPQ (25%) y ETR (29%) y a significant decrease in the content of the pigments Chl *a* (24%), Chl *b* (13%), Chl Total (33%) y Car (26%). Hypoxia also caused an increase in proline content in the cultivars Bachue, Bianca, Cerinza

y NUA35 y increased PE by 270% in all cultivars. Cultivar with higher WUE y lower loss of dry mass was Cerinza followed by NUA35. According to the waterlogging tolerance coefficient (WTC), the cultivars Cerinza y NUA35 showed greater tolerance to the hypoxia condition. The second experiment was carried out in the greenhouses of the Faculty of Agricultural Sciences in a plastic greenhouse using soil. Seeds of the five cultivars were placed in plastics bags y submitted to waterlogging during 4 days y 8 days of recovery in two phenological, vegetative y flowering stages. A four - day flooding showed a significant decrease in photosynthesis (89%), conductance (83%), relative content of chlorophyll (15%),  $F_o$  (7%),  $F_m$  (21%) y  $F_v/F_m$  (4%) compared to control plants in the five cultivars evaluated. At 8 days of recovery, photosynthesis (89%), stomatal conductance (89%), relative content of chlorophyll (54%),  $F_o$  (18%),  $F_m$  (15%) y  $F_v/F_m$  (8%). In all cultivars. Waterlogging imposed on the vegetative state increased the production of ethylene (89%) in all cultivars. Waterlogging imposed on the vegetative state caused a reduction in yield of 64% y in the flowering state of 84% in all cultivars, mainly due to reduction in seed weight, seeds per plant y pods per plant. According to the waterlogging tolerance coefficient (WTC), the cultivar with the greatest tolerance to waterlogging in both phenological states was Cerinza. It is proposed that the tolerance in the vegetative state is possibly due to the increase in leaf tissue density (DTH) y reduction in the specific leaf area (AFE), whereas in the flowering state it is due to the increase in leaf area Root dry weight (PSR) due to a greater partition of assimilates to the root.

**Keywords: Legumes, photosynthesis, stomatal conductance, phenology, dry mass, tolerance index, flooding.**

---

# Contenido

<b>Resumen.....</b>	<b>VII</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>IX</b>
<b>Lista de figuras.....</b>	<b>XIV</b>
<b>Lista de tablas.....</b>	<b>XVII</b>
<b>Lista de Símbolos y abreviaturas.....</b>	<b>XIX</b>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Objetivo general .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Objetivos específicos .....</b>	<b>5</b>
<b>3. Capítulo 1 Marco teórico.....</b>	<b>7</b>
<b>3.1 Estrés por anegamiento e hipoxia .....</b>	<b>7</b>
<b>3.2 Percepción y señalización de estrés por anegamiento .....</b>	<b>9</b>
<b>3.3 Producción de etileno en anegamiento .....</b>	<b>11</b>
<b>3.4 Efecto del anegamiento sobre parámetros fisiológicos.....</b>	<b>11</b>
<b>3.5 Producción de especies reactivas de oxígeno bajo condiciones de anegamiento .....</b>	<b>14</b>
<b>3.6 Estrés oxidativo en plantas bajo condiciones de anegamiento .....</b>	<b>15</b>
<b>3.7 Efectos de anegamiento en la toma de nutrientes .....</b>	<b>17</b>
<b>3.8 Respuestas anatómicas de las plantas a condiciones de anegamiento.....</b>	<b>18</b>

<b>4. Capítulo 2. Respuestas fisiológicas de cinco genotipos de frijol arbustivo (Phaseolus vulgaris L.) sometidos a hipoxia en condiciones controladas .....</b>	<b>20</b>
<b>4.1 Resumen.....</b>	<b>20</b>
<b>4.2 Introducción .....</b>	<b>21</b>
<b>4.3 Materiales y métodos .....</b>	<b>24</b>
4.3.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	24
4.3.2 Tratamientos de hipoxia .....	25
4.3.3 Intercambio gaseoso y uso eficiente del agua.....	26
4.3.4 Fluorescencia de la clorofila.....	26
4.3.5 Contenido de clorofilas, contenido de carotenoides y estabilidad de las membranas.....	27
4.3.6 Contenido de prolina .....	27
4.3.7 Crecimiento y coeficiente de tolerancia al anegamiento (WTC).....	28
4.3.8 Análisis de los datos .....	28
<b>4.4 Resultados.....</b>	<b>28</b>
4.4.1 Intercambio gaseoso y uso eficiente del agua.....	29
4.4.2 Fluorescencia de la clorofila.....	30
4.4.3 Contenido de clorofilas, contenido de carotenoides y estabilidad de las membranas.....	33
4.4.4 Contenido de prolina .....	33
4.4.5 Crecimiento y coeficiente de tolerancia al anegamiento (WTC).....	34
<b>4.5 Discusión.....</b>	<b>36</b>
<b>4.6 Conclusiones .....</b>	<b>40</b>
<b>5. Capítulo 2. Respuesta fisiológica y rendimiento de cinco genotipos de frijol arbustivo (Phaseolus vulgaris L.) sometidos a hipoxia en condiciones semi-controladas.....</b>	<b>41</b>
<b>5.1 Resumen.....</b>	<b>41</b>
<b>5.2 Introducción .....</b>	<b>42</b>
<b>5.3 Materiales y métodos .....</b>	<b>45</b>
5.3.1 Material vegetal y establecimiento del experimento .....	45
5.3.2 Fotosíntesis, conductancia estomática y carbono intercelular .....	47
5.3.3 Parámetros de fluorescencia de la clorofila a .....	47
5.3.4 Contenido relativo de clorofilas.....	48
5.3.5 Contenido de etileno.....	48
5.3.6 Crecimiento, índices foliares y distribución de masa seca.....	48
5.3.7 Rendimiento de semilla y componentes de rendimiento .....	49
5.3.8 Coeficiente de tolerancia al anegamiento (WTC) y porcentaje de reducción en rendimiento (PR) 49	
5.3.9 Análisis estadístico .....	50
<b>5.4 Resultados.....</b>	<b>50</b>
5.4.1 Fotosíntesis, conductancia estomática y carbono intercelular .....	53
5.4.2 Fluorescencia de la clorofila a .....	55
5.4.3 Contenido relativo de clorofilas.....	57

---

5.4.4	Producción de etileno .....	58
5.4.5	Crecimiento, índices foliares y distribución de masa seca.....	59
5.4.6	Rendimiento de semilla y componentes de rendimiento.....	64
5.4.7	Índices de tolerancia .....	66
<b>5.5</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>67</b>
<b>5.6</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>72</b>
<b>6.</b>	<b>Discusión general .....</b>	<b>73</b>
<b>6.1</b>	<b>Conclusiones finales .....</b>	<b>77</b>
<b>7.</b>	<b>Modelo conceptual .....</b>	<b>77</b>
<b>8.</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>77</b>

---

## Lista de figuras

- Figura 1. Intercambio gaseoso de la hoja en plantas de cinco cultivares de frijol arbustivo sometidas a condiciones de hipoxia. A. Fotosíntesis neta ( $P_n$ ); B. Conductancia estomática ( $g_s$ ); C. Transpiración (E) y D. uso eficiente del agua (WUE). Valores son promedios de cuatro datos  $\pm$  error estándar. Promedios seguidos por la misma letra no difieren significativamente según test de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). ..... 31
- Figura 2. Efecto de condiciones de hipoxia sobre quenching fotoquímico (qP), en cinco cultivares de frijol arbustivo. Valores son promedios de cuatro datos  $\pm$  error estándar. Promedios seguidos por la misma letra no difieren significativamente según test de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). ..... 32
- Figura 3. Efecto de condiciones de hipoxia sobre el contenido de prolina en cinco cultivares de frijol arbustivo. Valores son promedios de cuatro datos  $\pm$  error estándar. Promedios seguidos por la misma letra no difieren significativamente según test de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). ..... 34
- Figura 4. Efecto de condiciones de hipoxia sobre peso seco total (PSTo) en cinco cultivares de frijol arbustivo. Valores son promedios de cuatro datos  $\pm$  error estándar. Promedios seguidos por la misma letra no difieren significativamente según test de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). ..... 35

---

Figura 2. Efecto del anegamiento y el estado fenológico sobre A, fotosíntesis neta ( $P_n$ ) y C, conductancia estomática (gs); efecto de la recuperación sobre B, fotosíntesis neta ( $P_n$ ) y D, conductancia estomática (gs) de plantas de frijol arbustivo. Los valores son promedios de cuatro repeticiones  $\pm$  error estándar. Promedios con letras diferentes representan diferencias estadísticas significantes de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ )..... 55

Figura 3. Efecto del anegamiento y los cultivares sobre A, eficiencia fotoquímica máxima de PSII ( $F_v/F_m$ ); efecto de la recuperación sobre B, eficiencia fotoquímica máxima de PSII ( $F_v/F_m$ ) de plantas de frijol arbustivo. Los valores son promedios de cuatro repeticiones  $\pm$  error estándar. Promedios con letras diferentes representan diferencias estadísticas significantes de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). ..... 56

Figura 4. Efecto de la recuperación y el estado fenológico sobre ( $F_o$ ) de plantas de frijol arbustivo. Los valores son promedios de cuatro repeticiones  $\pm$  error estándar. Promedios con letras diferentes representan diferencias estadísticas significantes de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ )..... 57

Figura 5. Efecto del anegamiento y la recuperación sobre la producción de etileno de cultivares de frijol arbustivo. Los valores son promedios de cuatro repeticiones  $\pm$  error estándar. Promedios con letras diferentes representan diferencias estadísticas significantes de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ )..... 58

Figura 6. Efecto de los cultivares, anegamiento y su interacción A, peso seco de hojas (PSH); B, peso seco de raíz (PSR); C, peso seco total (PSTo) de plantas de frijol arbustivo. Los valores son promedios de cuatro repeticiones  $\pm$  error estándar. Promedios con letras diferentes representan diferencias estadísticas significantes de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). ..... 61

Figura 7. Efecto de los cultivares, el anegamiento y su interacción A, densidad del tejido de la hoja (DTH); B, área foliar específica (AFE) de plantas de frijol arbustivo. Los valores son promedios de cuatro repeticiones  $\pm$  error estándar. Promedios con letras diferentes representan diferencias estadísticas significantes de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). ..... 62

Figura 8. Efecto de los cultivares y el anegamiento en dos estados de desarrollo sobre la distribución de masa seca de plantas de frijol arbustivo. Los valores son promedios de cuatro repeticiones  $\pm$  error estándar. .... 63

Figura 9. Modelo conceptual de las respuestas de plantas de frijol arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L.) a condiciones de anegamiento ..... 80

---

## Lista de tablas

Tabla 1. Resumen de análisis de varianza del efecto de los cultivares e hipoxia sobre el comportamiento fisiológico de plantas de cinco cultivares de frijol arbustivo. ....	29
Tabla 2. Efecto de los tratamientos de hipoxia sobre la eficiencia fotoquímica actual del PSII ( $\Phi_{PSII}$ ), tasa de transporte de electrones (ETR) y quenching no fotoquímico (NPQ) en plantas de cinco cultivares de frijol arbustivo.....	32
Tabla 3. Efecto de los tratamientos de hipoxia sobre clorofila a (Chl a), clorofila b (Chl b), clorofila total (Total Chl), carotenoides (Car) y pérdida de electrolitos (PE) en plantas de cinco cultivares de frijol arbustivo.....	33
Tabla 3. Coeficiente de tolerancia al anegamiento (WTC) de cinco cultivares de frijol arbustivo.....	35
Tabla 1. Análisis de varianza del efecto de los tratamientos (T), cultivares (C), estado fenológico (E) y sus interacciones sobre el comportamiento fisiológico de plantas de frijol. ....	51
Tabla 2. Análisis de varianza del efecto de los cultivares (C), tratamientos (T) y su interacción (C x T) sobre los componentes de rendimiento y variables de crecimiento. ...	52
Tabla 3. Efecto de los cultivares, tratamientos y estado fenológico sobre fotosíntesis neta ( $P_n$ ), conductancia estomática ( $g_s$ ), carbono intercelular ( $C_i$ ), contenido relativo de	

clorofilas (CCI), fluorescencia inicial ( $F_o$ ), fluorescencia máxima ( $F_m$ ), eficiencia fotoquímica máxima de PSII ( $F_v/F_m$ ) en plantas de frijol arbustivo sometidas a anegamiento y recuperación. ....	54
Tabla 4. Efecto de los cultivares y el anegamiento sobre variables de crecimiento de plantas de frijol arbustivo.....	59
Tabla 5. Efecto de los cultivares, el anegamiento y su interacción sobre los componentes de rendimiento de plantas de frijol arbustivo.....	65
Tabla 6. Promedios de rendimiento e índices de selección de cinco cultivares de frijol arbustivo sometidos a anegamiento en dos estados fenológicos. ....	66

## Lista de Símbolos y abreviaturas

### Abreviaturas

#### Abreviatura Término

---

PSTo	Peso seco total
$P_n$	Fotosíntesis neta
$g_s$	Conductancia estomática
$E$	Transpiración
WUE	Uso eficiente del agua
Chl a	Clorofila a
Chl b	Clorofila b
Total Chl	Clorofila total
Car	Carotenoides
PE	Pérdida de electrolitos
PSII	Fotosistema II
$\Phi_{PSII}$	Eficiencia actual del PSII
ETR	Tasa de transporte de electrones
$qP$	Quenching fotoquímico
NPQ	Quenching no fotoquímico
WTC	Coeficiente de tolerancia al anegamiento
PPFD	densidad de flujo de fotones fotosintéticos
$F_o$	Fluorescencia mínima
$F_m$	Fluorescencia máxima
$F_v/F_m$	Eficiencia fotoquímica máxima de PSII
CCI	Contenido relativo de clorofilas
AF	Área foliar
PR	Porcentaje de reducción en rendimiento
$C_i$	Carbono intercelular
PFH	Peso fresco de la hoja
PSH	Peso seco de la hoja
PST	Peso seco de tallo
PSR	Peso seco de raíz
PSV	Peso seco de vainas
DTH	Densidad del tejido de la hoja
SUC	Suculencia
S:R	Relación parte aérea raíz
AFE	Área foliar específica
Yns	Promedio de rendimiento de plantas control

**Abreviatura Término**

---

<i>Y<sub>v</sub></i>	Promedios de plantas estresadas en estado vegetativo
<i>Y<sub>f</sub></i>	Promedios de plantas estresadas en estado de floración

# 1. Introducción

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es una especie leguminosa importante como cultivo en todo el mundo (Rahmani *et al.*, 2011), pertenece a la familia Fabaceae y su centro de origen se ubica en Mesoamérica y Sudamérica, desde México hasta Argentina (Chacón *et al.*, 2005). Las condiciones ambientales en áreas cultivadas han variado rápidamente, principalmente atribuido al cambio climático global. Como resultado, varios desastres meteorológicos que incluye sequías, salinidad, altas y bajas temperaturas inusuales y anegamiento, ocurren en áreas de cultivo en el mundo entero (Fan *et al.*, 2012). El panel gubernamental del cambio climático (IPCC) (IPCC, 2007) reportaron que el cambio inducido antropogenicamente del clima mundial aumenta la frecuencia de precipitaciones fuertes. Es probable que esto genere fenómenos más frecuentes de inundación en tierras de cultivo afectando particularmente a los pequeños productores (Change, 2001). Muchas regiones del mundo (e.g. Australia, Canada, EE.UU) son frecuentemente sometidas a anegamiento debido a fuertes lluvias, topografía plana, y/o pobre drenaje del suelo (Collaku y Harrison, 2002). El contenido de agua en la capa superficial del suelo, cuando supera, al menos en un 20% la capacidad de campo del terreno conduce al estancamiento de agua libre en la superficie del suelo (Aggarwal *et al.*, 2006). Excesos de agua ocasionan anoxia en los suelos, tasas lentas de difusión de oxígeno ( $10^{-4}$ ), baja solubilidad y aumento en la actividad microbiana, que

reduce la disponibilidad de oxígeno y puede liberar componentes orgánicos e inorgánicos tóxicos al suelo (Gambrell *et al.*, 1991; Ponnampereuma, 1984). La transición a hipoxia genera especies reactivas de oxígeno (ROS) en las raíces y las bajas tasas de difusión de oxígeno induce la formación de ácido 1-aminociclopropano 1- carboxílico (ACC), el cual en las partes aérea de las plantas es convertido a etileno que señala las respuestas de la planta al estrés por inundación, induciendo apoptosis para la formación de aerénquima (Subbaiah y Sachs, 2003). El etileno también media la formación de raíces adventicias, reduce el contenido hídrico de la hoja y estimula el cierre estomático (Irfan *et al.*, 2010).

El grado de daño en la planta por el anegamiento varía con la especie, con el estado fenológico y la duración del anegamiento (Rao y Li, 2003). Para determinar la tolerancia al anegamiento se han realizado estudios tanto en condiciones de hidroponía como en substratos anegados (Amarante y Sodek, 2006; Bertholdsson *et al.*, 2015; James *et al.*, 2011; Mao *et al.*, 2003). Sin embargo, la tolerancia al estrés por anegamiento puede aumentar cuando se eliminan factores como la temperatura, disponibilidad de nutrientes y tipo de suelo (Li *et al.*, 2008). De este modo, plantas de soya no toleran 3 días de anegamiento en condiciones de campo (Sullivan 2001). Estudios han mostrado que la soya puede tolerar 14 días de anegamiento en condiciones de hidroponía (Boru *et al.*, 2003). Muchos rasgos de selección usados en mejoramiento como; clorosis, germinación, reducción del crecimiento y componentes de rendimiento, son difíciles de usar especialmente en campo con alta interacción genotipo por ambiente. Bertholdsoon (2013) desarrollo un método hidropónico de cultivo de plántulas en solución nutritiva sin O<sub>2</sub>, que permite que muchas plantas sean evaluadas en un espacio limitado bajo condiciones de crecimiento controlado. En sus

---

estudios, la reducción en el crecimiento en condiciones de hipoxia fue correlacionado con resultados obtenidos en estudios en suelo (Bertholdsson et al., 2015).

En Colombia el frijol es considerado como uno de los productos básicos de la economía campesina y uno de los cultivos obligatorios en los programas de seguridad alimentaria por su alto contenido de proteína y minerales de bajo costo (Fenalce, 2004). En Colombia el frijol es consumido ampliamente como grano seco y es apetecido por su contenido de proteínas y carbohidratos. Para el año 2012 en el país, se reportó una extensión de 109.632 ha cultivadas con frijol con una producción de 141.349 toneladas (FAO, 2007; Fenalce, 2012). La agricultura colombiana, en especial la de pequeños productores, se ve fuertemente influenciada por las variaciones ambientales, que modifican la fisiología de las plantas y por tanto la eficiencia de los sistemas productivos (Pinilla Herrera *et al.*, 2012). Fenómenos climáticos como El Niño y La Niña pueden afectar el abastecimiento de alimentos con repercusiones socioeconómicas (Cardona, 2009). La Niña causa, en algunas zonas del país, aumento en la frecuencia e intensidad de lluvias, esto sumado a drenajes deficientes y suelos compactados ocasiona el anegamiento de áreas de importancia agrícola (Caicedo y Torres, 2007).

Se han reportado reducciones en el rendimiento del cultivo de frijol de 2% por efecto de La Niña, esto significó una pérdida de 7.322 millones de pesos (\$ 7.322) durante la ola invernal 2010-2011 en Colombia (Cepal, 2012). Según Lau *et al.* (2011) es probable que se presenten precipitaciones erráticas en Colombia y se pronostica que alteraciones en las precipitaciones en el orden del 3 % a 5 % causarán una reducción de la producción de un 48.9% en frijol.

Además, estudios en frijol han demostrado que el anegamiento retarda el crecimiento y reduce drásticamente el rendimiento (Rao y Li, 2003).

Se ha encontrado una gran variación genética en la respuesta al estrés por anegamiento entre variedades o líneas de mejoramiento de diversos cultivos como trigo (Huang *et al.*, 1994), maíz (Fausey *et al.*, 1985) y frijol (Celik y Turhan, 2013). Igualmente se ha encontrado que las variedades de frijol responden de manera diferente a las condiciones de anegamiento (Celik y Turhan, 2013). En este contexto se hace necesario evaluar la respuesta de las variedades promisorias de frijol frente a condiciones de baja disponibilidad de oxígeno en el suelo, causadas por el anegamiento, con el fin de encontrar marcadores que puedan usarse para detectar genotipos tolerantes para ser usados en programas de fitomejoramiento. La obtención de variedades resistentes al estrés mediante fitomejoramiento, es el medio más económico y eficaz para aumentar y estabilizar el rendimiento en condiciones de estrés (Blum y Jordan, 1985; Sánchez *et al.*, 1998). Por otra parte, existe poca información de la respuesta de plantas de frijol a condiciones de anegamiento y se desconoce la respuesta de variedades de importancia en el país como NUA35, ICA-Bachue, Cerinza, Blanco y 34400 a condiciones de anegamiento. El conocimiento de esta información permitiría diseñar estrategias de manejo con el fin de reducir las pérdidas de rendimiento en zonas marginales propensas al anegamiento de los suelos en donde la fuente principal de ingreso o seguridad alimentaria sea el cultivo de frijol.

## 2. Objetivo general

- Caracterizar la respuesta fisiológica de cinco cultivares de frijol arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L.) adaptados a la zona alto yina de Colombia y crecidas en condiciones de estrés por hipoxia.

### 2.1 Objetivos específicos

- Determinar las respuestas fisiológicas de cinco cultivares de frijol arbustivo sometidos a hipoxia en condiciones controladas.
- Determinar la respuesta fisiológica y rendimiento de cinco cultivares de frijol arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L.) sometidos a hipoxia en condiciones semi-controladas
- Determinar el índice de tolerancia al anegamiento de cinco cultivares de frijol arbustivo sometidos a hipoxia.
- Determinar la etapa fenológica crítica en que hay mayor reducción en el rendimiento en cultivares diferencialmente tolerantes al anegamiento.



## **3. Capítulo 1 Marco teórico**

### **3.1 Estrés por anegamiento e hipoxia**

El anegamiento se produce cuando la tasa de infiltración de la precipitación excede las tasas combinadas de drenaje y la evaporación de una cuenca o cuando la inundación sumerge un área (Elzenga y Veen, 2010). El anegamiento suele ser resultado del uso excesivo de agua de riego y es una seria limitación debido a sus efectos perjudiciales. La falta de oxígeno ha sido propuesta como el principal problema asociado con anegamiento (Armstrong, 1980; Jackson y Drew, 1984; Kozlowski, 1984). Una causa importante de baja productividad en algunos cultivos es el estrés por déficit de O<sub>2</sub> como consecuencia de estrés por anegamiento en plantas (Agarwal y Grover, 2006). La tasa de difusión de gases en el agua es severamente afectada (Armstrong, 1980). En anegamiento la concentración de O<sub>2</sub> usualmente se encuentra por debajo de la saturación del aire conduciendo a situaciones de hipoxia o anoxia (Agarwal y Grover, 2006). En condiciones de hipoxia los procesos de crecimiento se detienen debido al bajo suministro de energía. Plantas tolerantes muestran ser capaces de mantener la producción o conservación de energía pero también es común la presencia de mecanismos de escape (Bertholdsson et al., 2015). Existen amplias similitudes entre la hipoxia impuesta en sistemas hidropónicos y el anegamiento en condiciones de suelo (Boru et al., 2003). Se han desarrollado métodos hidropónicos para el cultivo de plántulas que ofrecen una fenotipificación más precisa a la hora de evaluar la tolerancia al anegamiento

de diferentes cultivares (Bertholdsson et al., 2015). Así mismo, los sistemas hidropónicos reflejan lo que sucede desde el primer día cuando el suelo es anegado y una situación de hipoxia ocurre (Agarwal y Grover, 2006)

Las condiciones de deficiencia de oxígeno en el suelo tienen efectos adversos sobre diversos procesos fisiológicos que generan una reducción en el rendimiento en diferentes especies de importancia agronómica: trigo (Hossait et al., 2011; Araki et al., 2012a; Hayashi et al., 2013; Haque et al., 2014), maíz (Tang et al., 2010; Abiko et al., 2012; Kuang et al., 2012), sésamo (Wei et al., 2013), soya (Shi et al., 2008), leguminosas (Pociecha et al., 2008; Pociecha, 2013), manzana (Amador et al., 2012), durazno (Iacona et al., 2013), coles (Issarakraisila et al., 2007), cebollas (Yiu et al., 2009a; Yiu et al., 2009b), menta (Candan y Leman, 2012), girasol (Grassini et al., 2007), algodón (Milroy y Bange, 2013; Kuai et al., 2014), crisantemo (Yin et al., 2009). Se han reportado ampliamente reducciones en el rendimiento en leguminosas causadas por el anegamiento (Kahn et al., 1985; Lakitan et al., 1992; Musgrave y Vanhoy, 1989; Tabbada y Flores, 1982). El rendimiento se ve severamente afectado cuando el anegamiento es impuesto en la fase reproductiva en soya (Griffing y Saxton, 1988), frijol mungo (*Vigna radiata*) (Trung et al., 1985), habichuela (Lakitan et al., 1992) y caupí (*Vigna unguiculata*) (Umaharan et al., 1997). Los rendimientos de frijol mungo (*Vigna radiata*), maní (*Arachis hipogaea*) y soya (*Glycine max*), se redujeron en 56%, 49% y 37% respectivamente, cuando el anegamiento se impuso a los 30 días después de siembra (Herrera y Zandstra, 1979). Estas reducciones en el rendimiento se atribuyen en el descenso en el número de vainas, causado por la absorción del pedúnculo debido a la senescencia temprana de la hoja, además se presenta una reducción en el número de yemas laterales

como resultado del acortamiento del periodo reproductivo (Nawata *et al.*, 1990; Linkemer *et al.*, 1998; Umaharan *et al.*, 1997). En algunos estudios se ha concluido que los mayores daños a los cultivos, y la máxima reducción en el rendimiento, ocurren cuando son sometidos a anegamiento en estados tempranos del crecimiento (Herrera y Zandstra, 1979; Sharma y Swarup, 1989). Por otra parte, el rendimiento del grano es un rasgo complejo resultado de muchos procesos de crecimiento y desarrollo y es expresado en componentes de rendimiento (Pantuwan *et al.*, 2002). En muchas leguminosas se han reportados como componentes de rendimiento, el número de vainas por planta, el número de semillas por vaina y el peso de las semillas (Yassin, 1973). En condiciones de anegamiento plantas de soya reducen su rendimiento de 2543 a 1550 kg ha<sup>-1</sup>, estas pérdidas de rendimiento son atribuidas principalmente al descenso en la producción de vainas resultado de la disminución del número de vainas por nudo (Linkemer, 1998). Una estrategia adaptativa de las plantas es reducir su tiempo a floración, una floración temprana hace posible que se extienda la fase reproductiva en ambientes desfavorables y puede conducir a incrementar el rendimiento a través del uso más eficiente del agua (Kumar y Abbo, 2001).

### **3.2 Percepción y señalización de estrés por anegamiento**

La reducción del consumo de energía en procesos no esenciales como la síntesis de compuestos de almacenamiento (almidón, proteínas y lípidos) es la primera respuesta metabólica a bajas condiciones de oxígeno (Bailey-Serres y Voeselek, 2008). Por lo tanto, las reacciones que dependen de PPi son favorecidas sobre aquellas que dependen de gasto de ATP (Greenway y Gibbs, 2003; Zabalza *et al.*, 2009). Una consecuencia temprana de la deficiencia de oxígeno es la reducción del pH citoplasmático como resultado de la

acumulación de ácido láctico. El descenso en el pH inactiva al lactato deshidrogenasa (LDH) y activa la piruvato descarboxilasa (PDC) y alcohol deshidrogenasa (ADH). Por lo tanto, el piruvato es dirigido a la producción de etanol o ácido láctico de una manera pH-dependiente (Sairam et al., 2008a). Así mismo, las condiciones de hipoxia estimulan la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma el cual es requerido para la inducción de *ADHI*, uno de los genes nucleares de respuesta a hipoxia, relacionado con la producción de etileno (Peng et al., 2001). Además, el  $\text{Ca}^{2+}$  está involucrado en la traducción de la señal que conduce a la biosíntesis de etileno (Subbaiah et al., 1994).

Se ha sugerido que la percepción de la concentración de oxígeno por las plantas es mediada por alteraciones metabólicas causadas por la reducción del oxígeno como la acidificación del citoplasma, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), óxido nítrico (NO) o flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  (Licausi y Perata, 2009). Igualmente, se ha analizado la expresión de genes que codifican factores de transcripción (TF) en diferentes especies de plantas *Arabidopsis thaliana* (Licausi et al., 2011), arroz (*Oriza sativa* L.), Álamo (*Populus x canescens*) y algodón (*Gossypium hirsutum* L.) en condiciones de hipoxia o anegamiento. Dentro de las familias de genes de TF, el grupo VII de la familia Factores de Respuesta a Etileno (ERF) es frecuentemente asociado con arroz bajo inmersión y se ha demostrado que miembros de este grupo pueden activar la expresión de genes que se inducen en condiciones de hipoxia (Licausi et al., 2011; Xu et al., 2006).

Se ha sugerido que los factores de transcripción RAP2.2 y RAP2.12, son desencadenantes respuestas de aclimatación molecular a la condición anaeróbica (Bailey-Serres et al., 2012). RAP2.12 se encuentra unido a las proteínas acyl-CoA en la membrana plasmática y las

protegen de su degradación aeróbica, en bajas concentraciones de oxígeno RAP2.12 es liberado de la membrana y se localiza en el núcleo, donde activa las respuestas moleculares a la deficiencia de oxígeno (van Dongen y Licausi, 2014).

### **3.3 Producción de etileno en anegamiento**

La fitohormona etileno induce muchas de las respuestas adaptativas en partes aéreas y raíces de plantas a la hipoxia (Sairam et al., 2008a). El precursor inmediato de etileno es el 1 - aminociclopropano 1 – carboxílico (ACC) que es sintetizado en gran medida en las raíces (Bradford y Yang, 1980). En condiciones de anegamiento la actividad de ACC sintasa es estimulada en la raíz (Cohen y Kende, 1987). El ACC es luego transportado de las células anaeróbicas de la raíz hacia las porciones aeróbicas de la raíz y tallo, donde es convertido a etileno en la presencia de oxígeno catalizado por la enzima ACC oxidasa (Sairam et al., 2008a)

### **3.4 Efecto del anegamiento sobre parámetros fisiológicos**

En cultivos como el trigo (*Triticum aestivum* L.) y la cebolla (*Allium fistulosum* L.), se ha reportado que en condiciones de anegamiento se presenta una reducción de la tasa neta de fotosíntesis que está estrechamente relacionada con una limitación estomática y acompañada con senescencia de las hojas (Yiu et al., 2009b; Hayashi et al., 2013). De otro lado, Ahmed et al. (2006) reportan que la reducción de la fotosíntesis puede estar ligada a una limitación

no estomática, asociada principalmente a daños en la maquinaria fotosintética reflejada en una reducción de la eficiencia máxima del quantum del fotosistema II (PSII). Pociecha *et al.* (2008) también reportan que en plantas de haba (*Vicia faba* L.) en condiciones de estrés por anegamiento, se presenta una reducción en la actividad de la enzima rubisco, incremento de la senescencia de las hojas y reducción en el rendimiento del quantum del PSII, dichos efectos muestran diferencias con la etapa fenológica en la cual las plantas fueron estresadas.

Otros estudios reportan que la respiración aeróbica de las raíces de las plantas bajo condiciones de anegamiento es muy baja. Araki *et al.* (2012b), encontraron que la actividad de la respiración de las raíces en plantas de trigo después de dos días en suelos anegados es menor respecto a plantas sin encharcar; pero con el aumento de días en estrés, la producción de CO<sub>2</sub> se incrementa. Además, cuando el oxígeno en el suelo es consumido y es poco probable obtener ATP a través de la fosforilación oxidativa en la mitocondria, las células vegetales sólo tienen una pequeña cantidad de ATP que se produce a través de la glucólisis. En esta vía se consume NAD<sup>+</sup>, y la activación de las vías fermentativas garantiza la oxidación del NADH en ausencia de la fosforilación oxidativa (Tadege *et al.* 1999). La vía de la glucólisis es fuertemente regulada por las células para maximizar la producción de energía, un fenómeno conocido como el efecto Pasteur (Summers *et al.* 2000).

En algunas especies de leguminosas se ha reportado que resisten un periodo de anegamiento de hasta 20 días (Heinrichs, 1970). Sin embargo, en plantas como fríjol un periodo de anegamiento de 4 días, en estado de crecimiento vegetativo, causa una respuesta en reducción del rendimiento, mientras que 16 días de anegamiento reduce el crecimiento hasta la formación de raíces adventicias (Nawata *et al.*, 1991). En otras especies de plantas como

el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) el anegamiento induce alteraciones fisiológicas; reduce la conductancia estomática y la translocación de nutrientes y disminuye la permeabilidad hidráulica de la raíz (Dell'Amico *et al.*, 2001). Dichas alteraciones aumentan con el periodo de anegamiento, 10 días de estrés por anegamiento en tomate, en el estado de plántula, afectan la altura de la planta, el área foliar, el contenido de clorofilas, la tasa de respiración e incrementan las epinastias en hojas y la acumulación de prolina libre (Lopez y Rosario, 1983). Se ha reportado un descenso en el contenido de clorofila, como un síntoma común, en plantas sometidas a anegamiento (Rao y Li, 2003). Se sabe que el anegamiento induce la síntesis del precursor de etileno (ACC) que es transportado a la parte aérea de la planta y convertido en etileno, hormona que induce la activación de enzimas que degradan clorofilas (Christianson *et al.*, 2010).

El crecimiento es uno de los parámetros más afectados por los diferentes tipos de estrés, en condiciones de anegamiento se ha reportado reducción en el crecimiento en plantas de algodón (Kuai *et al.*, 2015), tomate (Reid y Crozier, 1971), trigo (Huang *et al.*, 1994) y lulo (Flórez-Velasco *et al.*, 2015). En plantas de algodón diferentes periodos de anegamiento redujeron el crecimiento en términos de altura de planta incluso después de finalizar el anegamiento (Kuai *et al.*, 2015)

Uno de los cambios más importantes durante el anegamiento es la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) que son altamente reactivas y pueden alterar el metabolismo normal celular dañando a lípidos de membrana, proteínas y ácidos nucleicos (McKersie y Leshem, 1994). El contenido de Malondialdehído (MDA) es un producto de la peroxidación de lípidos y ha sido considerado un indicador de daño oxidativo (Tang *et al.*, 2010).

### 3.5 Producción de especies reactivas de oxígeno bajo condiciones de anegamiento

En plantas sometidas a inundación se reduce la tasa fotosintética comúnmente debido a bajos niveles de radiación y al descenso en el intercambio de CO<sub>2</sub> por la limitación estomática (Colmer y Voesenek, 2009). Esto causa sobre-reducción en la cadena de transporte de electrones generándose un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS), como peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), y el radical superoxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) (El-Enany *et al.*, 2013). Las ROS causan un efecto negativo en el metabolismo celular debido a su capacidad de oxidar moléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Kumutha *et al.*, 2009).

Kumutha *et al.* (2009) reportaron la producción de ROS especialmente de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y un aumento en la peroxidación de lípidos expresada en sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico en plantas de guandul (*Cajanus cajan* L.). Las plantas sometidas a dos días de anegamiento redujeron significativamente la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lo que puede ser atribuido al cambio de respiración aeróbica a fermentación, en tejidos de la raíz la cadena de transporte de electrones es el principal sitio de producción de ROS.

Durante el anegamiento el incremento en el contenido de O<sub>2</sub><sup>-</sup> es debido a la enzima cloruro iodonio difenileno NADPH oxidasa (Sairam *et al.*, 2008). Los descensos en las concentraciones de oxígeno conducen a la activación de NADPH oxidasas que desencadena un estallido oxidativo (Pucciariello *et al.*, 2012). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido mediante el estallido oxidativo puede ser una señal regulatoria en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA),

especialmente la enzima aconitasa que es altamente sensible a ROS y la actividad de esta enzima es altamente inhibida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Las ROS y las especies reactivas de nitrógeno (RNS) son factores que inducen el aumento de una proteasa denominada caspasa que está involucrada en la apoptosis y en la muerte celular programada (PCD) (Rodríguez-Serrano *et al.*, 2012). El NO estimula y regula la muerte celular programada, en estudios desarrollados en *Arabidopsis thaliana* se reporta que el óxido nítrico (NO) promueve la activación de caspasa-3 mediada por MPK6 en la PCD inducida por exposición a cadmio (Ye *et al.*, 2013).

Se ha reportado que cuando las plantas se exponen a privación de oxígeno se produce NO (Perazzolli *et al.*, 2004). Cuando las concentraciones de NO aumentan como consecuencia de la hipoxia, las hemoglobinas no simbióticas se sobreexpresan y se reducen los niveles de NO. Las reacciones en las que las oxihemoglobinas reaccionan con NO para producir nitrato, representan los principales mecanismos por los cuales el NO es removido de las plantas (Igamberdiev *et al.*, 2006).

### **3.6 Estrés oxidativo en plantas bajo condiciones de anegamiento**

Normalmente, las plantas producen ROS durante los procesos metabólicos, pero en condiciones de anegamiento, la producción de ROS se incrementa. Yiu *et al.* (2009b), determinaron la concentración de ROS en tejidos de cebolla, encontrando un aumento en radicales como el O<sub>2</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y en la degradación de la clorofila, de las membranas celulares

y de las membranas tilacoidales. Además, se encontró un incremento en la producción de malondialdehído (MDA) como resultado de la peroxidación lipídica de las membranas. Resultados similares fueron reportados para crisantemo (*Chrysanthemum*), donde las concentraciones de MDA se incrementaron a medida que las plantas permanecían mayor tiempo bajo condiciones de anegamiento, evidenciando síntomas de daño por ROS en el tejido foliar (Yin *et al.*, 2009). Asimismo, Yiu *et al.*, (2009a) reporta que la actividad de ROS muestra una relación inversamente proporcional con la eficiencia máxima del PSII ( $F_v/F_m$ ), indicando una limitación no estomática de la fotosíntesis. La estabilidad de la membrana celular en las plantas está relacionada directamente con el funcionamiento del metabolismo celular y en condiciones de estrés, se ve altamente afectada por la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) (McKersie y Lesheim, 2013). La peroxidación lipídica cambia la permeabilidad de la membrana por lo que la pérdida de electrolitos es una medida de la integridad de la membrana (Bajji *et al.*, 2002).

Como resultado del estrés oxidativo, las plantas adoptan mecanismos de defensa para mitigar el efecto nocivo de las ROS. Tang *et al.* (2010) encontraron que en el cultivo de maíz (*Zea mays*) bajo condiciones de anoxia, se estimula la actividad de enzimas antioxidantes como la ascorbato peroxidasa (APX) y glutatión reductasa (GR), sin embargo, la actividad puede ser menor en cultivares susceptibles, principalmente en otras enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa (POD) y catalasa (CAT), indicando que, dependiendo de la especie, los mecanismos de defensa pueden diferir.

Debido al corto periodo de vida de las ROS, sus efectos dañinos son usualmente restringidos a los sitios de su producción (Mittler, 2002). Por consiguiente, la protección antioxidante

bajo hipoxia es compleja y altamente compartimentada, que comprende componentes no enzimáticos y enzimáticos (Blokhina et al., 2003). Durante anegamiento genotipos tolerantes mantienen niveles relativamente altos de carotenoides indicando el papel protector de los carotenoides en tolerancia al anegamiento (Kumar et al., 2013)

Parvin y Karmoker (2013), reportan en plantas de yute (*Corchorus capsularis* L.) bajo condiciones de anegamiento, incrementan los contenidos de prolina, principalmente en las hojas. Se ha reportado que la prolina además de ser un osmolito funciona como un antioxidante (Szabados y Savoure, 2010). En genotipos tolerantes de maíz y varias especies de género *Capsicum* el anegamiento ocasiona la acumulación de prolina en hojas que puede otorgar tolerancia a la condición de estrés (Ou et al., 2011; Singh et al., 1985).

### **3.7 Efectos de anegamiento en la toma de nutrientes**

El anegamiento afecta el funcionamiento de las raíces y la toma de agua y nutrientes (Elzenga y Veen, 2010). La tasa de difusión de oxígeno en el agua es  $10^4$  veces menor que en el aire (Irfan *et al.*, 2010). En condiciones de anegamiento el intercambio gaseoso se reduce ampliamente, se limita la entrada de oxígeno inhibiendo la respiración aeróbica, las células de las raíces hacen un cambio de respiración aeróbica a glucolisis, una vía menos eficiente en la producción de ATP que la aeróbica (2 ATP/glucosa y 38 ATP/glucosa respectivamente) (Elzenga y Veen, 2010). Como consecuencia de la baja producción de ATP en condiciones anaerobias hay un efecto negativo sobre el crecimiento, desarrollo y la toma de nutrientes por las raíces.

Dresbøll y Thorup-Kristensen (2012) observaron que plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) sometidas a anegamiento, reducen la toma de  $^{15}\text{N}$  después de 5 días de anegamiento. Sin embargo, luego del drenaje de las macetas por 24 horas, demostró que este tiempo es insuficiente para recuperar las raíces. En contraste, las plantas sometidas a periodos cortos de anegamiento (24 h) restablecen la toma de nitrógeno seis horas después que el agua ha sido retirada, posiblemente las raíces son capaces de sobrevivir a periodos cortos de anegamientos permaneciendo en un estado de espera, mientras que el aumento del tiempo de anoxia resulta en daño. Algunas plantas pueden adaptarse a periodos largos de anegamiento y producir nuevas raíces con aumento de la formación de tejido de aerénquima (Drew, 1997).

En condiciones de anegamiento, particularmente en suelos ácidos, se reducen componentes minerales oxidados como  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Mn}^{4+}$ , lo que conduce al aumento de las concentraciones de estos minerales en el suelo, resultando tóxicas para las plantas reduciendo su crecimiento (Khabaz-Saberi y Rengel, 2010). Se han propuesto modelos que sugieren que la tolerancia al anegamiento es producto de la tolerancia a la anaerobiosis y a las concentraciones altas de micronutrientes, así líneas de trigo tolerantes a anegamiento en condiciones ambientales y suelos particulares, no presentan esta misma tolerancia si se modifica el ambiente y suelo donde crecen (Setter *et al.*, 2009).

### **3.8 Respuestas anatómicas de las plantas a condiciones de anegamiento**

En plantas en condiciones de anegamiento comúnmente se observa la formación de tejido de aerénquima producto de apoptosis celular para facilitar el intercambio gaseoso entre las

partes aéreas y las raíces (Sairam et al., 2008a). Asimismo, Haque *et al.* (2014), encontraron que en trigo existe una señalización de genes asociados a la producción de tejido de aerenquima en las raíces. Abiko *et al.* (2012), encontraron que, en plantas de maíz bajo condiciones de anegamiento, la producción de tejido de aerenquima incrementa la proporción de los espacios a medida que los cortes se realizan más distantes de la punta de las raíces adventicias, y pueden abarcar un espacio aproximadamente del 21.6% del área del corte transversal a los 80 cm desde el mismo punto de partida. Adicionalmente, el tejido de aerenquima está acompañado por la formación de laminillas de suberina entre la exodermis y la hipodermis, la cual permite una mayor resistencia al daño por especies reactivas de oxígeno.

Otros procesos son mediados por etileno en condiciones de anegamiento, como la muerte de puntas de las raíces, la emergencia de raíces adventicias facilitada por la muerte de células epidermales y la presencia de epinastias en hojas (Sairam et al., 2008b). Igualmente, Araki *et al.* (2012) muestran que cuando plantas de trigo se encuentran en condiciones de estrés por anegamiento durante su etapa de floración y llenado del grano, pueden presentar senescencia de hojas, como consecuencia de la sobreproducción de etileno.

Otras plantas como manglares y cultivos adaptados a sistemas de riego por inundación como el arroz, tienen como estrategia de supervivencia la formación de raíces adventicias alargadas que permiten explorar nuevos lugares para poder acceder a oxígeno (Colmer y Pedersen, 2007; Maruena *et al.*, 2012; Brownstein *et al.*, 2013). En trigo se ha reportado que una mayor conductancia estomática está asociada a una mayor longitud de las raíces (Hayasi *et al.*, 2013).

## **4. Capítulo 2. Respuestas fisiológicas de cinco genotipos de frijol arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L.) sometidos a hipoxia en condiciones controladas**

### **4.1 Resumen**

El anegamiento es un problema global debido al incremento en la frecuencia de eventos climáticos extremos. El objetivo de este estudio fue determinar las respuestas fisiológicas de cinco genotipos de frijol arbustivo sometidos a hipoxia en condiciones controladas. Plántulas de frijol de los cultivares Cerinza, Bachue, Bianca, Bacatá y NUA35 fueron crecidas en condiciones hidropónicas y sometidas a hipoxia en la etapa de 3 hojas verdaderas durante 14 días usando N<sub>2</sub> gaseoso a la solución nutritiva. Se evaluaron las variables de fotosíntesis neta ( $P_n$ ), conductancia estomática ( $g_s$ ), eficiencia en el uso del agua (WUE), eficiencia actual del fotosistema II ( $\Phi_{PSII}$ ), quenching no fotoquímico (NPQ), tasa de transporte de electrones (ETR), contenido de clorofilas a y b (Chl *a*, Chl *b*), contenido de carotenoides (Car), pérdida de electrolitos (PE), contenido de prolina, masa seca y el coeficiente de tolerancia a anegamiento (WTC). Los resultados mostraron que para todas las cultivares que el tratamiento de hipoxia causó la reducción en  $P_n$ ,  $g_s$ ,  $\Phi_{PSII}$  (22%), NPQ (25%) y ETR (29%) y también una disminución significativa en el contenido de los pigmentos Chl *a* (24%), Chl *b* (13%), Chl total (33%) y Car (26%). La hipoxia también causó un incremento en el contenido de prolina en los cultivares Bachue, Bianca, Cerinza y NUA35 y aumentó PE en 270% en todos los cultivares. El Cultivar con mayor WUE y menor pérdida de masa seca fue Cerinza seguido por NUA35. De acuerdo con el coeficiente de

tolerancia al anegamiento (WTC) los cultivares Cerinza y NUA35 mostraron mayor tolerancia a la condición de hipoxia.

## 4.2 Introducción

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es una especie leguminosa importante como cultivo en todo el mundo (Rahmani et al., 2011), su centro de origen se ubica en Mesoamérica y Sudamérica, desde México hasta Argentina (Chacón et al., 2005). En Colombia es consumido ampliamente como grano seco y es apetecido por su contenido de proteínas y carbohidratos. Para el año 2016, se reportó una extensión de 84220 ha cultivadas con frijol con una producción de 141278 toneladas (FAO, 2007; Fenalce, 2016).

El anegamiento es un problema global debido al incremento en la frecuencia de eventos climáticos extremos (Wollenweber y Porter, 2003). En Colombia, fenómenos climáticos como la Niña producen un incremento en la frecuencia e intensidad de las precipitaciones, causando anegamiento y por tanto periodos de deficiencia de oxígeno en el suelo (Duran y Pinto, 2011). El anegamiento produce alteraciones en la fisiología de las plantas y afecta la productividad del cultivo de fríjol (Lakitan et al., 1992; Sairam et al., 2008a).

Los suelos se consideran anegados cuando el exceso de agua satura los poros del suelo inhibiendo el intercambio gaseoso entre las raíces y la atmósfera (Setter y Waters, 2003; Striker, 2012). El primer cambio químico que sucede en el anegamiento es el agotamiento del O<sub>2</sub> debido a que los gases difunden 10000 veces más lento en el agua que en el aire (Armstrong, 1980). El daño y la muerte de las plantas anegadas ha sido atribuido a la

ausencia de oxígeno o hipoxia en el suelo (Kozlowski, 1984; Boru et al., 2003a; Setter y Waters, 2003). Las respuesta de la planta al anegamiento dependen de factores como la especie o variedad (Cannell et al., 1984; Setter et al., 1999), el estado de desarrollo (Belford, 1981; T.L. Setter y Waters, 2003) y la duración y severidad del anegamiento (Collaku y Harrison, 2002; Malik et al., 2002).

El primer efecto del anegamiento en las plantas es la reducción en la producción de ATP generado por el cambio del metabolismo aerobio al metabolismo anaerobio (Sairam et al., 2008b). La disminución en ATP durante el anegamiento causa una disminución en la velocidad de todos los procesos metabólicos de la planta (Bailey-Serres et al., 2012; Gibbs y Greenway, 2003). Se ha reportado en plantas en anegamiento la disminución en la conductancia estomática ( $g_s$ ), así como una reducción en la tasa de fotosíntesis ( $P_n$ ) y la transpiración ( $E$ ) (Kumar et al., 2013; Rao y Li, 2003). Jones (2013) reporta que plantas con alta eficiencia en el uso del agua (WUE) pueden presentar mayor potencial de crecimiento y rendimiento en condiciones ambientales fluctuantes. Sin embargo, en plantas de millo y manzana, el anegamiento causa descensos en WUE (Jie et al., 2001; Zegada-Lizarazu y Iijima, 2005). La disminución en la fotosíntesis ha sido asociada en parte a la disminución en  $g_s$  aunque también se ha reportado la presencia de daños en el aparato fotosintético debidos a la sobre-reducción por un desbalance entre las dos fases de la fotosíntesis (Bota et al., 2004). La sobre-reducción de la cadena de transporte de electrones causa la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (El-Enany *et al.*, 2013). Las ROS son moléculas altamente reactivas que causan daño en clorofilas, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (Blokhina et al., 2003). En condiciones de anegamiento se ha encontrado un incremento en

ROS debido a la producción de  $O_2^-$  dependiente de la NADPH oxidasa (Sairam et al. 2011). Durante anegamiento se ha observado un aumento en la pérdida de electrolitos (PE) debida a la peroxidación de lípidos de membrana (Sairam et al., 2009). También se ha observado durante el anegamiento degradación de clorofilas, proteínas y RNA y disminución de la concentración de nutrientes como nitrógeno, fosforo e iones metálicos (Li et al., 2008). En condiciones de anegamiento el contenido de clorofila *a* y *b* disminuyen en varias especies de frijol (Kumar et al., 2013, 1998; Rao y Li, 2003; R. K. Sairam et al., 2009). La disminución en la producción de ATP, así como la reducción en la tasa de fotosíntesis afecta la producción de fotoasimilados disminuyendo el crecimiento de las plantas (Celik y Turhan, 2011; Flórez-Velasco et al., 2015; Kumar et al., 2013). Las plantas presentan mecanismos de respuesta para contender con el estrés (Elzenga y Veen, 2010; Sairam et al., 2008b; Voesenek y Bailey-Serres, 2015). Durante el estrés por anegamiento muchas plantas aumentan la síntesis de moléculas protectoras como la prolina, que pueden estar relacionados con mecanismos de tolerancia (Ou et al., 2011; Parvin y Karmoker, 2013; Singh y Singh, 1981). Se han usado rasgos como el contenido de clorofilas y la producción de biomasa como índices de selección indirectos para tolerancia al anegamiento en condiciones de estrés por hipoxia ya que presentan alta heredabilidad (Collaku y Harrison, 2005; Li et al., 2008). Sin embargo, la tolerancia al anegamiento es compleja ya que está influenciada por otros factores como la temperatura, el tipo de suelo, la disponibilidad de nutrientes y los microorganismos presentes en el suelo (Li et al., 2008). Cultivos como la soya se ven afectados en suelo inundados sin embargo, pueden crecer en aguas estancadas con deficiencia de oxígeno en condiciones controladas (Boru et al., 2003). Bertholdsoon (2013) desarrollo un método hidropónico de cultivo de plántulas en solución nutritiva sin

O<sub>2</sub>, que permite que muchas plantas sean evaluadas en un espacio limitado bajo condiciones de crecimiento controlado. En sus estudios, la reducción en el crecimiento en condiciones de hipoxia fue correlacionado con resultados obtenidos en estudios en suelo.

Se ha reportado que los genotipos de frijol responden de manera diferente al exceso de agua en el suelo (Celik y Turhan, 2011). En Colombia existe una amplia variabilidad genética en frijol (Mayor-Duran et al., 2016). Estos genotipos se han originado a partir de mejoramiento genético tradicional. Hasta ahora no ha información disponible sobre posibles mecanismos de tolerancia de estos cultivares a las condiciones de hipoxia asociadas al estrés por anegamiento. Por lo tanto, El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del estrés por hipoxia en las variables fisiológicas de intercambio gaseoso, eficiencia en el uso del agua, parámetros de la fluorescencia de la clorofila, pigmentos fotosintéticos, estabilidad de la membrana, masa seca y en el grado de tolerancia en cinco genotipos de frijol arbustivo sometidos a hipoxia en condiciones controladas.

## **4.3 Materiales y métodos**

### **4.3.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento**

Se utilizaron semillas de cinco cultivares de frijol arbustivo (ICA Cerinza, ICA Bachue, Bacatá, Bianca y NUA35. Obtenidas en el laboratorio de fitomejoramiento, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia). Las semillas fueron sumergidas en hipoclorito de sodio al 5% (NaOCl) por 15 min, lavadas con agua de grifo y sembradas usando como

substrato arena cuarcítica. La germinación se realizó en una cámara de germinación en condiciones de 25°C y 60% HR en el laboratorio de fisiología vegetal de la Universidad Nacional de Colombia. Cuando emergió la primera hoja las plantas fueron retiradas de la arena y colocadas sobre láminas de poliestireno en un sistema flotante sobre macetas que contenían una solución nutritiva con la siguiente concentración: 220 mg L<sup>-1</sup> de N, 44.5 mg L<sup>-1</sup> de P, 210 mg L<sup>-1</sup> de K, 144 mg L<sup>-1</sup> de Ca, 57 mg L<sup>-1</sup> de Mg, 5 mg L<sup>-1</sup> de S, 5.6 mg L<sup>-1</sup> de Fe, 0.564 mg L<sup>-1</sup> de Mn, 0.06 mg L<sup>-1</sup> de Cu, 0.132 mg L<sup>-1</sup> de Zn, 0.53 mg L<sup>-1</sup> de Bo, 0.006 mg L<sup>-1</sup> de Mo y 0.0018 mg L<sup>-1</sup> de Co, que fue renovada cada 5 días.

### **4.3.2 Tratamientos de hipoxia**

Plantas de 20 ddt (días después de trasplante) fueron sometidas durante 14 días a dos tratamientos de disponibilidad de oxígeno a nivel de la raíz: i) alta disponibilidad de oxígeno en la solución nutritiva con el sistema de oxigenación y ii) baja disponibilidad de oxígeno o hipoxia simulando una condición de anegamiento utilizando nitrógeno gaseoso (N<sub>2</sub>) en la solución nutritiva para desplazar el oxígeno del agua, hasta concentraciones de oxígeno disuelto (OD) de 55 µm, es decir 20% de la saturación del aire. Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial donde el primer factor corresponde a los cinco cultivares y el segundo a la disponibilidad de oxígeno en la solución nutritiva. Se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento y la unidad experimental fue una planta.

### 4.3.3 Intercambio gaseoso y uso eficiente del agua

La tasa de fotosíntesis ( $P_n$ ) y la conductancia estomática ( $g_s$ ) fueron medidas en la segunda hoja desde el ápice, entre las 9:00 am y 11:00 am con una concentración de  $\text{CO}_2$  de  $500 \mu\text{l L}^{-1}$  y una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD) de  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  usando un sistema portátil conectado a un analizador infrarrojo de gases (LI-6200, Lincoln, Nebraska, USA.). La transpiración ( $E$ ) se determinó empleando un porómetro de estado estable (LI-1600, Lincoln, Nebraska, USA.). El uso eficiente del agua (WUE) fue calculada con los datos de fotosíntesis y transpiración ( $P_n/E$ ). Se tomaron ocho hojas por cada tratamiento para realizar las mediciones.

### 4.3.4 Fluorescencia de la clorofila

En las mismas hojas utilizadas para medir la  $P_n$  se realizaron las mediciones de fluorescencia con el fin de evaluar el estado del aparato fotosintético. Las hojas se adaptaron previamente a la oscuridad por 30 min. Las mediciones se realizaron con un fluorómetro modulado (Mini-PAM, Walz, Alemania). Se empleó una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD) de  $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Se registraron las variables de tasa de transporte de electrones (ETR), eficiencia fotoquímica actual del PSII ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ), quenching fotoquímico (qP) y quenching no fotoquímico (NPQ).

### **4.3.5 Contenido de clorofilas, contenido de carotenoides y estabilidad de las membranas**

Los pigmentos fueron extraídos de acuerdo con Sims y Gamon (2002). La segunda hoja totalmente expandida de cada planta fue homogenizada en acetona al 80%. Se determinó el contenido de Clorofila a (Chl *a*) por espectrofotometría a una densidad óptica de 663 nm, clorofila b (Chl *b*) a 647 nm y carotenoides a 470 nm de acuerdo a Wellburn (1994). Para estimar la estabilidad de la membrana celular se determinó la pérdida de electrolitos usando el método descrito por Gong et al. (1995). Las mediciones se realizaron a partir de 5 cm<sup>2</sup> de tejido foliar de la segunda hoja desde el ápice, el material vegetal fue colocado en un tubo con 20 mL de agua desionizada e incubado por 2h a 30°C, luego se determinó la conductividad eléctrica inicial (CE1). Posteriormente, cada muestra fue llevada a ebullición en baño maría por 15 min y enfriada a temperatura ambiente, registrándose la conductividad eléctrica final del medio (CE2). El porcentaje de electrolitos fue calculado con la fórmula:  $CE1/CE2 \times 100$ .

### **4.3.6 Contenido de prolina**

El contenido de prolina fue determinado de acuerdo al método de Bates et al. (1973) basado en la reacción de prolina con ninhidrina. Para la determinación de prolina una solución de prolina, ninhidrina y ácido acético glacial 1:1:1 fue incubada a 100°C por 1 hora. La reacción fue detenida en un baño de hielo, el cromoforo fue extraído con tolueno y su absorbancia

fue medida en 520 nm. La concentración de prolina fue determinada usando una curva estándar y expresada como  $\mu\text{mol}$  prolina  $\text{g}^{-1}$  peso fresco (FW).

#### **4.3.7 Crecimiento y coeficiente de tolerancia al anegamiento (WTC)**

Al finalizar el periodo de hipoxia se cosecharon cuatro plantas por tratamiento y se colocaron en un horno de secado a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 72 horas para determinar el peso seco total (PSTo). Se empleó el WTC como un indicativo de la tolerancia al anegamiento, este índice elimina las diferencias entre los cultivares y es apropiado para la comparación entre sus características (Liu et al., 2010). El WTC se calculó por la siguiente formula:

$$\text{WTC} = \text{Peso seco plantas anegadas (PSToA)} / \text{Peso seco plantas control (PSToC)}$$

#### **4.3.8 Análisis de los datos**

Se realizaron las pruebas de Levene y Shapiro-wilk para evaluar los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad de los datos, respectivamente. Los datos fueron analizados mediante un ANAVA y para determinar el efecto de los tratamientos sobre las variables se empleó la prueba comparativa de medias de Tukey a  $p \leq 0.05$ .

### **4.4 Resultados**

En la tabla 1 se resume el análisis de varianza del efecto de los tratamientos de hipoxia sobre las variables analizadas en este estudio en los cinco cultivares de frijol arbustivo.

Tabla 1. Resumen de análisis de varianza del efecto de los cultivares e hipoxia sobre el comportamiento fisiológico de plantas de cinco cultivares de frijol arbustivo.

Variable	Abr.	Fuente de variación		
		Variedad	Hipoxia	Variedad × Hipoxia
Peso seco total	PSTo	***	***	**
Fotosíntesis neta	$P_n$	**	***	**
Conductancia estomática	$g_s$	**	***	**
Transpiración	$E$	***	***	***
Uso eficiente del agua	WUE	**	**	**
Clorofila a	Chl <i>a</i>	ns	***	ns
Clorofila b	Chl <i>b</i>	ns	*	ns
Clorofila Total	Total Chl	ns	***	ns
Carotenoides	Car	ns	***	ns
Pérdida de electrolitos	PE	ns	***	ns
Prolina		***	***	***
Eficiencia fotoquímica actual del PSII	$\Phi_{PSII}$	ns	*	ns
Tasa de transporte de electrones	$ETR$	ns	*	ns
Quenching fotoquímico	$qP$	ns	***	*
Quenching no fotoquímico	$NPQ$	ns	*	ns

\*, \*\*, y \*\*\* diferencias significativas en los niveles de probabilidad de 0.05, 0.01 y 0.001, respectivamente.

ns, no significativo en  $\alpha = 0.05$ .

#### 4.4.1 Intercambio gaseoso y uso eficiente del agua

Se presentó una reducción significativa en las variables de  $P_n$ ,  $g_s$  y  $E$  en las plantas sometidas a condiciones de hipoxia en comparación con los controles para todos los cultivares (Figura 1A, B y C). El cultivar con mayor reducción en  $P_n$  fue Bianca (86%) de reducción, mientras

que el cultivar con menor reducción fue NUA35 con (62%) (Figura 1A.). Los cultivares Bachue, Cerinza y Bacatá mostraron reducciones en  $P_n$  de 82%, 77% y 64%, respectivamente. Los cultivares Cerinza y NUA35 en hipoxia mostraron reducciones en  $g_s$  de 97% y 93%, respectivamente. En los cultivares Bacatá y Bachue en hipoxia la  $g_s$  se redujo en 80% en promedio. El cultivar con menor reducción en  $g_s$  fue Bianca con 73% de reducción (Figura 1B). El mismo comportamiento de  $g_s$  se observa en  $E$  en hipoxia (Figura 1C). Los cultivares con mayor reducción en hipoxia fueron Cerinza (94%) y NUA35 (92%). En los cultivares Bacatá y Bachue se presentó una reducción de 73% en promedio y Bianca mostró la menor reducción en  $E$  (51%). Los cultivares Cerinza y NUA35 presentaron un aumento en el WUE en hipoxia (4.85  $\mu\text{mol CO}_2/\text{mol H}_2\text{O}$  y 3.05  $\mu\text{mol CO}_2/\text{mol H}_2\text{O}$ , respectivamente), mientras que el cultivar Bianca presentó una disminución con respecto al control (0.33  $\mu\text{mol CO}_2/\text{mol H}_2\text{O}$ ) (Figura 1D).

#### 4.4.2 Fluorescencia de la clorofila

La condición de hipoxia indujo la reducción en  $\Phi_{\text{PSII}}$  (22%), NPQ (25%) y ETR (29%) en todos los cultivares en condiciones de hipoxia (Tabla 2). Bianca fue el cultivar que en hipoxia mostró una mayor reducción en qP (79%) respecto al control (Figura 2).

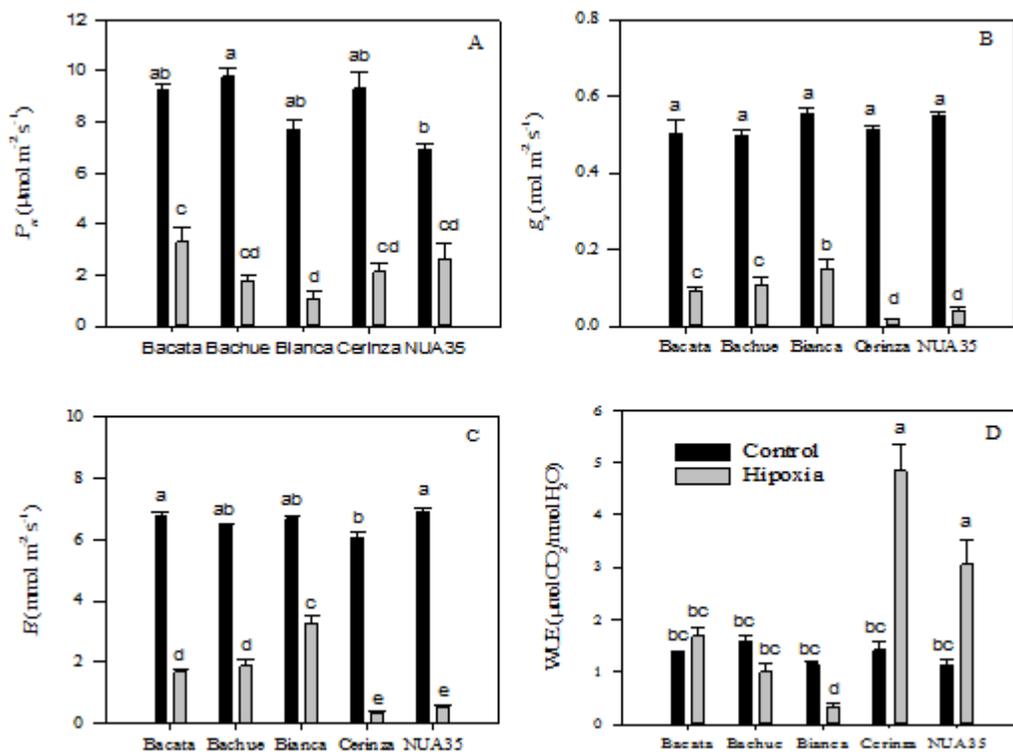


Figura 1. Intercambio gaseoso de la hoja en plantas de cinco cultivares de frijol arbustivo sometidas a condiciones de hipoxia. A. Fotosíntesis neta ( $P_n$ ); B. Conductancia estomática ( $g_s$ ); C. Transpiración ( $E$ ) y D. uso eficiente del agua (WUE). Valores son promedios de cuatro datos  $\pm$  error estándar. Promedios seguidos por la misma letra no difieren significativamente según test de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

Tabla 2. Efecto de los tratamientos de hipoxia sobre la eficiencia fotoquímica actual del PSII ( $\Phi_{PSII}$ ), tasa de transporte de electrones (ETR) y quenching no fotoquímico (NPQ) en plantas de cinco cultivares de frijol arbustivo.

Tratamientos	$\Phi_{PSII}$	ETR	
		$(\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1})$	
			NPQ
Control	0.09 ± 0.00 a	69.34 ± 5.88 a	1.37 ± 0.06 a
Hipoxia	0.07 ± 0.00 b	49.12 ± 5.70 b	1.03 ± 0.06 b
Significancia	*	*	***
CV (%)	47.01	47	23.65

Promedios con letras diferentes representan diferencias estadísticas significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

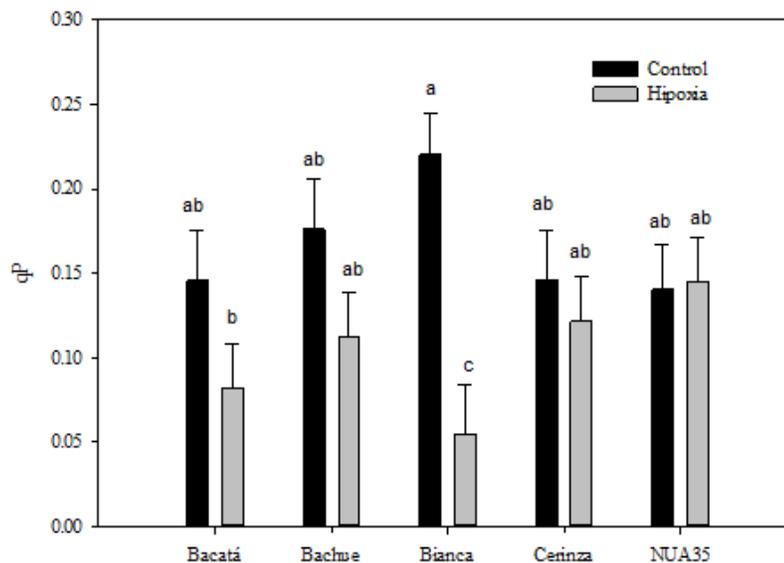


Figura 2. Efecto de condiciones de hipoxia sobre quenching fotoquímico (qP), en cinco cultivares de frijol arbustivo. Valores son promedios de cuatro datos ± error estándar. Promedios seguidos por la misma letra no difieren significativamente según test de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

### 4.4.3 Contenido de clorofilas, contenido de carotenoides y estabilidad de las membranas

El contenido de pigmentos disminuyó en todos los cultivares en condiciones de hipoxia para Chl *a* (24%), Chl *b* (13%), Total Chl (33%) y Car (26%). La condición de hipoxia ocasionó un aumento en la permeabilidad de las membranas expresada en PE en todos los cultivares de frijol (~38%) (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de los tratamientos de hipoxia sobre clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*), clorofila total (Total Chl), carotenoides (Car) y pérdida de electrolitos (PE) en plantas de cinco cultivares de frijol arbustivo.

Tratamientos	Chl <i>a</i> (mg g <sup>-1</sup> FW)	Chl <i>b</i> (mg g <sup>-1</sup> FW)	Total Chl (mg g <sup>-1</sup> FW)	Car (mg g <sup>-1</sup> FW)	PE (%)
Control	3.92 ± 0.15 a	1.92 ± 0.06 a	7.05 ± 0.18 a	0.72 ± 0.02 a	19.53 ± 0.94 b
Hipoxia	2.96 ± 0.16 b	1.68 ± 0.07 b	4.74 ± 0.18 b	0.53 ± 0.03 b	27.06 ± 1.06 a
Significancia	***	*	***	***	***
CV (%)	18.01	15.26	16.12	19.02	18.19

Promedios con letras diferentes representan diferencias estadísticas significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

### 4.4.4 Contenido de prolina

Se presentó un aumento en el contenido de prolina en condiciones de hipoxia en los cultivares Bachue, Bianca, Cerinza y NUA35, siendo mayor en los cultivares Bianca (366%) y Bachue (500%) y menor en NUA35 (206%) (Figura 3). El cultivar Bacatá no incrementó el contenido de prolina en condiciones de hipoxia.

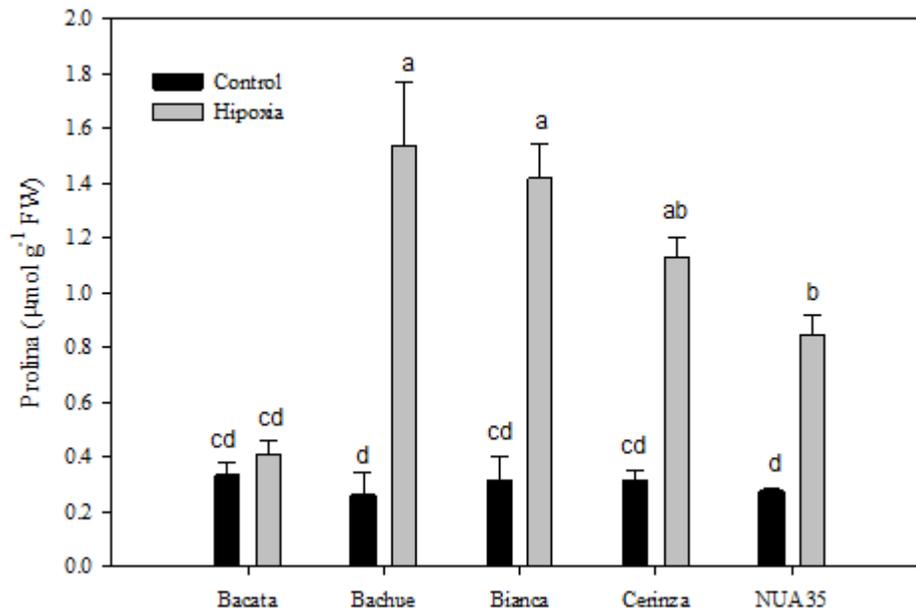


Figura 3. Efecto de condiciones de hipoxia sobre el contenido de prolina en cinco cultivares de frijol arbustivo. Valores son promedios de cuatro datos  $\pm$  error estándar. Promedios seguidos por la misma letra no difieren significativamente según test de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

#### 4.4.5 Crecimiento y coeficiente de tolerancia al anegamiento (WTC)

El tratamiento de hipoxia generó una reducción en PSTo en todos los cultivares (~70%). El cultivar NUA35 presentó la menor reducción en masa seca (53%) seguido por Cerinza (61.5%), mientras que el cultivar Bachue presentó la mayor reducción en masa seca (83%) comparados con sus respectivos controles (Figura 4). El WTC fue mayor en Cerinza (0.38), seguido de NUA35 (0.36), mientras que Bachue presentó el menor valor (0.17).

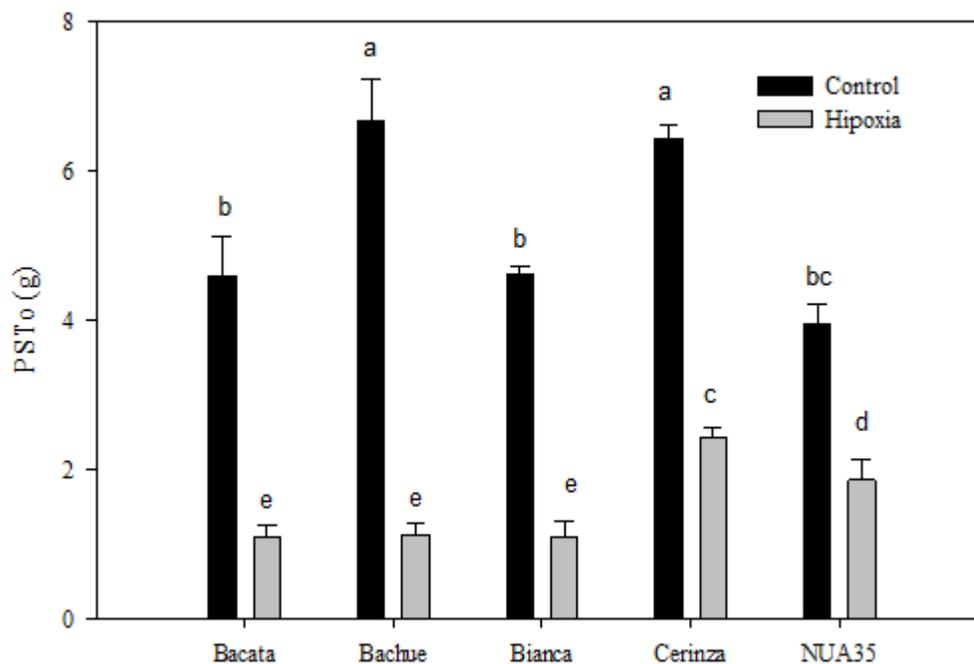


Figura 4. Efecto de condiciones de hipoxia sobre peso seco total (PSTo) en cinco cultivares de frijol arbustivo. Valores son promedios de cuatro datos  $\pm$  error estándar. Promedios seguidos por la misma letra no difieren significativamente según test de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

Tabla 3. Coeficiente de tolerancia al anegamiento (WTC) de cinco cultivares de frijol arbustivo.

	Cerinza	NUA35	Bacatá	Bianca	Bachue	Significancia	CV (%)
WTC	0.38	0.36	0.31	0.20	0.17	*	25.87

## 4.5 Discusión

La falta de oxígeno ha sido propuesta como el principal problema asociado con anegamiento (Armstrong, 1980; Jackson y Drew, 1984; Kozłowski, 1984). La hipoxia impuesta con N<sub>2</sub> en sistemas hidropónicos es muy similar a la generada por el anegamiento en condiciones de suelo respecto a la limitación de O<sub>2</sub> (Boru et al., 2003). Esto sugiere que la tolerancia de una planta a la hipoxia en cultivos hidropónicos podría reflejar la tolerancia de la planta al anegamiento en suelos en condiciones de campo (Nguyen et al., 2017). En este estudio se evaluó el efecto del estrés por hipoxia en variables fisiológicas en cinco cultivares de frijol arbustivo. Se ha reportado ampliamente que la condición de deficiencia de oxígeno causa reducción en  $P_n$ ,  $g_s$  y  $E$  en plantas como trigo (*Triticum aestivum* L.) (Shao et al., 2013), caupí (*Vigna unguiculata* L.) (Takele y McDavid, 1994), soya (*Glycine max* L.) (Jung et al., 2008) y garbanzo (*Cicer arietinum* L.) (Meena et al., 2015). En este estudio se observó que los cultivares NUA35, Bacata y Cerinza presentaron la menor disminución en  $P_n$ , mientras que Cerinza y NUA35 presentaron la menor disminución en  $E$  y  $g_s$  en hipoxia. La WUE aumentó en condiciones de hipoxia solo para los cultivares Cerinza y NUA35. Meena et al., (2015) reportaron que genotipos susceptibles a condiciones de estrés presentan mayores reducciones en WUE. Estos resultados sugieren que los cultivares Cerinza y NUA35 tienen una eficiente capacidad de regulación estomática (Kumar et al., 1998). Jones (2013) reportó que genotipos tolerantes con altos WUE pueden presentar mayor potencial de crecimiento y rendimiento en condiciones ambientales fluctuantes. También se ha observado como un

efecto común del anegamiento en varias especies de plantas herbáceas el cierre estomático y el mantenimiento de altos potenciales hídricos (Bradford, 1983).

La fluorescencia de la clorofila es una herramienta eficiente para detectar cambios en las funciones de PSII, es particularmente sensible a condiciones de estrés y puede ser usado en estudios de anegamiento (Shao et al., 2013; Waldhoff et al., 2002). En todos los cultivares evaluados la hipoxia redujo los valores de  $\Phi_{PSII}$ , ETR y NPQ. También se observó una menor reducción en qP en los cultivares NUA35 y Cerinza. Descensos en los parámetros de fluorescencia puede indicar daño en PSII (Ahmed et al., 2006; Maxwell, 2000; Zheng et al., 2009). Como se observó hubo una reducción en  $P_n$  en condiciones de hipoxia en todos los cultivares, esta reducción puede estar asociada a daños en PSII ya que los cultivares que presentaron menor disminución en qP también presentaron menor disminución en  $P_n$ . El mal funcionamiento del PSII reduce el transporte eficiente de electrones para las reacciones fotosintéticas lo que puede resultar en la acumulación de ROS y en la reducción de  $P_n$  (Zheng et al., 2009).

La reducción en el contenido de pigmentos fotosintéticos en plantas sometidas a hipoxia ha sido reportada en varios cultivos (Flórez-Velasco et al., 2015; Rao y Li, 2003). Así mismo, la clorosis de la hoja ha sido usada como índice de selección de plantas susceptibles al estrés por hipoxia en diferentes cultivos como trigo (*Triticum aestivum* L.), soya (*Glycine max* L.) y cebada (*Hordeum vulgare* L.) (Boru et al., 2001; Cai et al., 1995; Cao et al., 1995; Ikeda et al., 1954; Reyna et al., 2003). Se ha sugerido que el contenido de clorofila presenta alta heredabilidad y puede ser usado como una vía muy eficiente en la selección de genotipos tolerantes a la deficiencia de oxígeno (Li et al., 2008). En este estudio la hipoxia ocasionó

la reducción en los contenidos de Chl *a*, Chl *b*, Total Chl y Car en todos los cultivares. Se sabe que el anegamiento induce la síntesis del precursor de etileno (ACC) que es transportado a la parte aérea de la planta y convertido en etileno, hormona que induce la activación de enzimas que degradan clorofilas (Christianson et al., 2010). Así mismo, la no disponibilidad de oxígeno en el sustrato induce la muerte celular en la raíz limitando la toma de agua y nutrientes especialmente nitrógeno lo que ocasiona clorosis por un descenso del contenido de clorofilas en las hojas (Zhu et al., 2016). La reducción de clorofilas también puede ser un mecanismo de fotoprotección en condiciones de estrés, ya que reduce la cantidad de fotones absorbidos por las hojas (Galmés et al., 2007).

La estabilidad de la membrana celular en las plantas está relacionada directamente con el funcionamiento del metabolismo celular y en condiciones de estrés se ve modificada por la presencia de ROS (McKersie y Lesheim, 2013). En condiciones de anegamiento se ha encontrado un incremento en ROS debido a la producción de  $O_2^-$  debido a la enzima NADPH oxidasa (Sairam et al., 2011) Aquí se observó que la hipoxia aumentó la pérdida de electrolitos en todos los cultivares sugiriendo un incremento en la permeabilidad de las membranas celulares. Resultados similares fueron reportados en plantas de guandú (*Cajanus cajan* L. Mill) sometidas a seis días de anegamiento (Bansal y Srivastava, 2015). Este daño en las membranas, al igual que el daño en el fotosistema evidenciado por las variables de la fluorescencia de la clorofila en condiciones de hipoxia puede deberse a la peroxidación lipídica causada por el incremento en ROS

La prolina es un aminoácido no proteico que además de ser osmolito y antioxidante tiene una función protectora de macromoléculas y estructuras celulares (Kavikishor et al., 2005;

Paleg et al., 1981; Stewart y Lee, 1974). La prolina se acumula en muchas especies de plantas en respuesta a diferentes estreses ambientales (Szabados y Savoure, 2010; Claussen, 2005; Hamilton y Heckathorn, 2001). Aquí se encontró que la hipoxia ocasionó el incremento en el contenido de prolina en las hojas de los cultivares Bachue, Bianca, Ceriza y NUA35. Se ha reportado un aumento en el contenido de prolina en genotipos tolerantes de Maíz (*Zea mays* L.), yute (*Corchorus capsularis* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y en plantas de varias especies del género *Capsicum* a hipoxia (Ou et al., 2011; Horchani et al., 2010; Singh et al., 1985). La acumulación de prolina observada en los cultivares de frijón puede ser una respuesta para evitar el daño en macromoléculas y estructuras causado por el aumento de ROS inducido por el estrés por hipoxia (Aloni y Rosenshtein, 1982; Paleg et al., 1981). Estos resultados sugieren que la prolina es uno de los mecanismos de defensa que se inducen en cuatro de los cultivares evaluados. En cultivares de tomate tolerantes a hipoxia se ha observado la acumulación de prolina y ha sido propuesta como un sustrato para el metabolismo post-estrés. Los cultivares que producen altos niveles de prolina pueden usarla como fuente de energía, nitrógeno o carbono para reanudar el crecimiento una vez el estrés ha cesado (Aloni y Rosenshtein, 1982).

La tolerancia al anegamiento en estudios fisiológicos es definida como la supervivencia o el mantenimiento de las tasas de crecimiento en condiciones de anegamiento en diferentes estados de desarrollo (Setter y Waters, 2003). Igualmente, una menor reducción en la biomasa es otro rasgo de alta heredabilidad y es asociado con tolerancia a hipoxia (Li et al, 2008). En este estudio, los cultivares Cerinza y NUA35 presentaron mayores WTC, además de mostrar la menor reducción en biomasa. Estos cultivares también presentaron un mayor

aumento en la WUE en hipoxia, rasgo que se ha asociado a una eficiente capacidad de regulación estomática que podría estar asociada a la tolerancia en condiciones de estrés (Kumar et al., 1998). Igualmente, los cultivares Cerinza y NUA35 presentan un aumento en el contenido de prolina superior al cultivar Bacatá pero menor que los cultivares Bachue y Bianca que presentaron los menores WTC. Aunque la producción de prolina puede ser un mecanismo para contender con estrés por hipoxia la producción de altas cantidades de este aminoácido disminuyen la disponibilidad de N nitrógeno y carbono para otras moléculas y puede generar una disminución en el crecimiento (Aloni y Rosenshtein, 1982; Kavikishor et al., 2005).

## **4.6 Conclusiones**

Con base en los resultados obtenidos se plantea que los genotipos Cerinza y NUA35 son más tolerantes al estrés por hipoxia que los demás genotipos (Bacata, Bianca, Bachue). Las tolerancias de estos genotipos pueden ser otorgada por una mayor WUE, menor reducción en qP y menor reducción en la producción de masa seca. Igualmente, la producción prolina puede ser un mecanismo de defensa que disminuye los daños causados por el estrés por hipoxia en la homeostasis celular tal como se ha reportado en plantas de tomate, yute, maíz y ají

## **5. Capítulo 2. Respuesta fisiológica y rendimiento de cinco genotipos de frijol arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L.) sometidos a hipoxia en condiciones semi-controladas**

### **5.1 Resumen**

El cambio climático aumenta la frecuencia de fenómenos climáticos como La Niña, que pueden generar periodos prolongados de anegamiento, afectando negativamente el rendimiento de los cultivos. En este estudio plantas de cinco cultivares de frijol en los estados fenológicos vegetativo (3-4 hojas verdaderas) y de floración (emergencia de la inflorescencia) en condiciones semicontroladas, fueron sometidas a anegamiento por 4 días y posteriormente fueron recuperadas. Se evaluaron las variables fotosíntesis, conductancia estomática, carbono intercelular, fluorescencia de la clorofila *a*, contenido relativo de clorofila, producción de etileno, crecimiento, índices foliares, distribución de masa seca, rendimiento de semilla, componentes de rendimiento e índices de tolerancia. A los cuatro días de anegamiento se observó una disminución significativa en la fotosíntesis (89 %), la conductancia estomática (83%), contenido relativo de clorofila (15%),  $F_o$  (7%),  $F_m$  (21%) y  $F_v/F_m$  (4%) respecto a las plantas control en los cinco cultivares evaluados. A los ocho días de recuperación se redujo significativamente la fotosíntesis (89%), la conductancia estomática (89%), contenido relativo de clorofila (54%),  $F_o$  (18%),  $F_m$  (15%) y  $F_v/F_m$  (8%)

en todos los cultivares. El anegamiento impuesto en el estado vegetativo incrementó la producción de etileno (89%) en todos los cultivares. El anegamiento impuesto en el estado vegetativo causó reducción en el rendimiento de 64% y en el estado de floración de 84% en todos los cultivares, principalmente debido a reducción en el peso de las semillas, semillas por planta y vainas por planta. Según el coeficiente de tolerancia al anegamiento (WTC) el cultivar con mayor tolerancia al anegamiento en ambos estados fenológicos fue Cerinza. Se propone que la tolerancia en el estado vegetativo posiblemente se debe al aumento en la densidad del tejido de la hoja (DTH) y a la reducción en el área foliar específica (AFE), mientras que en el estado de floración se debe al aumento en el peso seco de la raíz (PSR) debido a una mayor partición de fotoasimilados hacia la raíz.

## 5.2 Introducción

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es una especie leguminosa importante como cultivo en todo el mundo (Rahmani et al., 2011). En Colombia es consumido ampliamente como grano seco y es apetecido por su contenido de proteínas y carbohidratos. El frijol ha sido considerado como uno de los productos básicos de la economía campesina y uno de los cultivos obligatorios en los programas de seguridad alimentaria por su alto contenido de proteína y minerales de bajo costo (Fenalce, 2004). Para el año 2016, se reportó una extensión de 84220 ha cultivadas con frijol con una producción de 141278 toneladas (FAO, 2007; Fenalce, 2016).

El cambio climático causa con mayor frecuencia eventos climáticos severos como las inundaciones, los que se han presentado en todo el mundo (Bailey-Serres et al., 2012). En

Colombia, La Niña causa el aumento en la frecuencia e intensidad de las precipitaciones, esto sumado a drenajes deficientes y suelos compactados ocasiona el anegamiento de áreas de importancia agrícola (Caicedo y Torres, 2007). Los efectos del anegamiento en el suelo son las bajas tasas de difusión de gases como O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y etileno y EL aumento en la actividad microbiana que pueden liberar componentes tóxicos, exacerbando los efectos de estrés (Gambrell et al., 1991; Ponnampereuma, 1984). El anegamiento causa alteraciones en la fisiología de la mayoría de plantas principalmente debidas a las condiciones de hipoxia o anoxia generadas (Lakitan et al., 1992; Sairam et al., 2008a). Se ha observado un descenso de la fotosíntesis y la conductancia estomática y por lo tanto en la producción de masa seca (Irfan et al., 2010). La fluorescencia de la clorofila es ampliamente aceptada como indicador del estado del fotosistema II y es altamente sensible a condiciones de estrés (Fracheboud et al., 2004; Gu et al., 2012; Guo et al., 2008). Esta herramienta es usada para la detección de genotipos tolerantes al estrés por anegamiento (N. Bertholdsson et al., 2015). La hipoxia induce en la planta la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden causar daños en el aparato fotosintético (Blokchina et al., 2003). Igualmente, la baja tasa de difusión de O<sub>2</sub> induce la formación de ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico (ACC), el cual en la parte aérea de las plantas es convertido a etileno, hormona que señala las respuestas de la planta al estrés por inundación (Subbaiah y Sachs, 2003).

Se ha reportado, que los efectos del anegamiento en las plantas puede ser observados incluso mucho tiempo después de que ha cesado el estrés (Pociecha, 2013). En plantas de haba descensos en clorofila *a* y *b* persisten después de finalizado el anegamiento (Pociecha et al., 2008). Igualmente, estudios mencionan que una vez cesa el anegamiento la transición a

normoxia ocasiona el incremento en ROS que causa clorosis y marchitamiento de las hojas (Sasidharan y Voeselek, 2015; Setter et al., 2010). Se han reportado ampliamente reducciones en el rendimiento en leguminosas causadas por el anegamiento (Lakitan et al., 1992; Kahn et al., 1985; Musgrave y Vanhoy, 1989; Tabbada y Flores, 1982). El grado de daño en la planta por el anegamiento varía con la especie, el estado fenológico y la duración del anegamiento (Rao y Li, 2003). En algunas especies de leguminosas se ha reportado que resisten un periodo de anegamiento de hasta 20 días (Heinrichs, 1970). Sin embargo, en frijol un periodo de anegamiento de 4 días, en estado de crecimiento vegetativo, causa una respuesta en reducción del rendimiento (Nawata et al., 1991). El rendimiento se ve severamente afectado cuando el anegamiento es impuesto en la fase reproductiva en soya (*Glycine max* L.) (Griffing y Saxton, 1988), frijol mungo (*Vigna radiata* L.) (Trung et al., 1985), habichuela (*Phaseolus vulgaris* L.) (Lakitan et al., 1992) y caupí (*Vigna unguiculata* L.) (Umaharan et al., 1997). Por otra parte, en algunos estudios se ha concluido que los mayores daños a los cultivos, y la máxima reducción en el rendimiento, ocurren cuando son sometidos a anegamiento en estados tempranos del crecimiento (Herrera y Zandstra, 1979; Sharma y Swarup, 1989).

En las leguminosas se han reportados como componentes de rendimiento, el número de vainas por planta, el número de semillas por vaina y el peso de las semillas (Yassin, 1973). En plantas de soya (*G. Max* L.) las pérdidas en rendimiento por anegamiento son atribuidas principalmente al descenso en la producción de vainas resultado de la disminución del número de vainas por nudo (Linkemer, 1998). Se ha encontrado variación en la respuesta al estrés por anegamiento entre cultivares o líneas de mejoramiento de cultivos como trigo

(*Triticum* spp.) (Huang et al., 1994), maíz (*Zea mays* L.) (Fausey et al., 1985) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) (Celik y Turhan, 2011). En Colombia existe una amplia variabilidad de genotipos de frijol arbustivo (Mayor-Duran et al., 2016), de los cuales no existe información sobre la respuesta tanto a condiciones de anegamiento como durante su posterior periodo de recuperación. También, se desconoce la etapa fenológica en la cual el anegamiento causa las mayores pérdidas en rendimiento en frijol. Por lo tanto, es importante conocer las respuestas fisiológicas de cultivares promisorios de frijol arbustivo a la condición de anegamiento y detectar genotipos tolerantes para cultivarlos en zonas propensas al anegamiento. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del estrés por hipoxia y posterior periodo de recuperación en las variables fisiológicas de intercambio gaseoso, parámetros de la fluorescencia de la clorofila, contenido de clorofilas, masa seca, componentes de rendimiento y en el grado de tolerancia en cinco genotipos de frijol arbustivo sometidos a anegamiento en dos estados fenológicos en condiciones semi-controladas.

## **5.3 Materiales y métodos**

### **5.3.1 Material vegetal y establecimiento del experimento**

El estudio se realizó en los invernaderos de la facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá (4° 35'56'' y 74°04'51''), usando plantas de los cultivares ICA Cerinza, Bacatá, Bianca, ICA Bachue y NUA35 (laboratorio de fitomejoramiento, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia). Se sembraron dos semillas de cada variedad en cada bolsa de polietileno con 2 kg de suelo. Se implementó un

manejo de la fertilidad y fitosanitario según recomendaciones técnicas para el cultivo de frijol (CIAT, 2016). Con base en los resultados del análisis de suelo (Anexo 1) y se ajustó el plan de fertilización.

Los cinco cultivares de frijol se sometieron a un periodo de anegamiento de 4 días en dos estados fenológicos con base en la escala descrita por Feller *et al.* (1995): i) 3-4 hojas verdaderas (vegetativo) y ii) emergencia de la inflorescencia (floración). La condición de anegamiento e hipoxia en el sustrato fue establecida cubriendo los orificios de drenaje de las bolsas para asegurar una lámina de agua constante de 3 cm en la superficie del sustrato. Una vez terminado el periodo de anegamiento se permitió el drenaje y 8 días después se evaluó el periodo de recuperación. Las plantas control de los cinco cultivares se mantuvieron en 80% de capacidad de materia durante todo el experimento. Se empleó un diseño completamente al azar con arreglo factorial, con cuatro repeticiones y 10 plantas como unidad experimental (Figura 1).

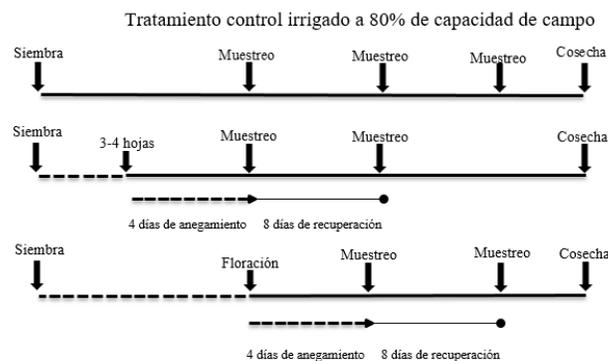


Figura 1. Diseño experimental usado para determinar el efecto de 4 días de anegamiento y 8 días de recuperación en dos estados fenológicos en plantas de cinco cultivares de frijol arbustivo.

### 5.3.2 Fotosíntesis, conductancia estomática y carbono intercelular

Se tomaron dos hojas totalmente expandidas de cada planta en cada repetición para la determinación de la fotosíntesis. La tasa de fotosíntesis ( $P_n$ ), la conductancia estomática ( $g_s$ ) y el carbono intercelular ( $C_i$ ) fueron medidos entre las 9:00 am y 11:00 am con una concentración de  $\text{CO}_2$  de  $400 \mu\text{l L}^{-1}$  y una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD) de  $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  usando un sistema portátil conectado a un analizador infrarrojo de gases (LCpro-SD, BioScientific, Inglaterra).

### 5.3.3 Parámetros de fluorescencia de la clorofila *a*

En las mismas hojas utilizadas para  $P_n$  se realizaron las mediciones de fluorescencia con el fin de evaluar el estado del aparato fotosintético. Las hojas se adaptaron previamente a la oscuridad por 60 min. Las mediciones se realizaron con un fluorómetro modulado (Junior-PAM, Walz, Alemania). Se empleó una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD) de  $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Se registraron las variables de fluorescencia mínima ( $F_o$ ), fluorescencia máxima ( $F_m$ ) y eficiencia fotoquímica máxima de PSII ( $F_v/F_m$ ).

### **5.3.4 Contenido relativo de clorofilas**

El contenido de clorofilas se estimó de acuerdo con Richardson et al. (2002) Se utilizó el clorofilometro CCM-200 (Opti-Sciences, Tyngsboro, Massachusetts, EE.UU). Cinco mediciones fueron hechas en cada hoja y el promedio aritmético fue utilizado para el análisis estadístico. Las mediciones se expresaron como índice de contenido de clorofila (CCI).

### **5.3.5 Contenido de etileno**

Al finalizar el anegamiento y 8 días de recuperación Cuatro Hojas de plantas de cada cultivar se colocaron en viales de 40 mL en el estado vegetativo. La cantidad de etileno en el espacio de cabeza del recipiente se determinó por cromatografía de gases, extrayendo 1 ml de gas con una jeringa e inyectándolo dentro de un cromatografo de gases (7890A Agilent Technologies) equipado con una columna capilar TRB-5 (0.32 mm; 30 m longitud; 0.25  $\mu$ m) y un detector de ionización de llama. Las temperaturas de la columna, la inyección, y el detector fueron de 50 °C, 150°C y 150 °C, respectivamente. Se utilizó nitrógeno como gas portador. La cantidad de etileno liberado se expresó en  $\mu$ l por kg de tejido por hora.

### **5.3.6 Crecimiento, índices foliares y distribución de masa seca**

En la madurez fisiológica las plantas fueron cosechadas para determinar el área foliar (AF) con un medidor de área foliar (Li-3100, Li-COR, inc. Lincoln, Nebraska, EEUU), el peso

fresco de las hojas (PFH) y seco de hojas (PSH), tallos (PST), raíces (PSR), vainas (PSV), y total (PSTo) de las plantas. Se utilizaron cuatro plantas por tratamiento. También, fueron obtenidos los siguientes índices: densidad del tejido de la hoja ( $DTH = \text{peso seco de la hoja (PSH)}/\text{peso fresco de la hoja (PFH)} \text{ g kg}^{-1}$ ), succulencia de la hoja ( $SUC = (PFH - PSH)/AF$ ;  $\text{mg H}_2\text{O mm}^{-2}$ ), relación parte aérea raíz (S:R) y área foliar específica ( $AFE = (AF/PSH)$ ) (Flórez-Velasco et al., 2015).

### **5.3.7 Rendimiento de semilla y componentes de rendimiento**

Al culminar la madurez fisiológica de las plantas (cuando los granos llegan a su máximo contenido de masa seca), se registró el rendimiento, longitud de vainas, peso total de semillas, número de vainas por planta, número de semillas por vaina, semillas por planta y el peso de 100 semillas.

### **5.3.8 Coeficiente de tolerancia al anegamiento (WTC) y porcentaje de reducción en rendimiento (PR)**

Cuando las plantas alcanzaron la madurez fisiológica, cuatro plantas por tratamiento fueron cosechadas y puestas en horno de secado a 65 °C durante 72 horas para determinar el peso seco total (PSTo). Se empleó el WTC como un indicativo de la tolerancia al anegamiento, este índice elimina las diferencias entre las cultivares y es apropiado para la comparación entre sus características (Liu et al., 2010). El WTC se calculó por la siguiente fórmula:

$$\text{WTC} = \text{Peso seco plantas anegadas (PSToA)} / \text{Peso seco plantas control (PSToC)}$$

El porcentaje de reducción en rendimiento de grano (PR) se utilizó como un índice de selección de acuerdo con White et al. (1991) fue calculado como:

$$PR = 100 [1 - (Y_s / Y_{ns})]$$

Donde  $Y_s$  fue el promedio de rendimiento de grano de un cultivar en condiciones de estrés y  $Y_{ns}$  fue el promedio del rendimiento de grano en condiciones de no estrés.

### **5.3.9 Análisis estadístico**

Todos los datos se sometieron a prueba de normalidad de Shapiro Wilk y Levene para homogeneidad de varianza. Los datos que no cumplieron con los supuestos fueron transformados. Posteriormente, se realizó un análisis de varianza (ANAVA), seguido de un test de Tukey HSD ( $p \leq 0.05$ ), para determinar el efecto de los tratamientos sobre las variables. Los datos se analizarán usando el programa Statistix v 9.0 (software analítico, Tallahassee, FL, US).

## **5.4 Resultados**

En las tablas 1 y 2 se resume el análisis de varianza del efecto de los tratamientos de anegamiento sobre las variables analizadas en este estudio en los cinco cultivares de frijol arbustivo.

Tabla 1. Análisis de varianza del efecto de los tratamientos (T), cultivares (C), estado fenológico (E) y sus interacciones sobre el comportamiento fisiológico de plantas de frijol.

	Abbr.	Fuente de variación													
		Anegamiento							Recuperación						
		C	T	E	C x T	C x E	T x E	C x T x E	C	T	E	C x T	C x E	T x E	C x T x E
Fotosíntesis	$P_n$	ns	***	***	ns	ns	***	ns	ns	***	***	ns	ns	***	ns
Conductancia estomática	$g_s$	*	***	ns	ns	*	***	ns	ns	***	***	ns	ns	***	*
Carbono intercelular	$C_i$	ns	***	***	ns	ns	**	ns	ns	***	***	*	*	ns	*
Contenido relativo de clorofilas	CCI	*	***	***	ns	*	ns	ns	**	***	***	ns	ns	ns	ns
Fluorescencia mínima	$F_o$	**	**	***	ns	ns	ns	ns	*	***	***	*	ns	***	ns
Fluorescencia máxima	$F_m$	ns	***	***	ns	ns	ns	ns	***	***	***	ns	ns	***	ns
Eficiencia fotoquímica máxima de PSII	$F_v/F_m$	***	***	***	**	**	ns	ns	***	***	***	*	**	ns	ns

\*, \*\*, y \*\*\* diferencias significativas en los niveles de probabilidad de 0.05, 0.01 y 0.001, respectivamente. ns, no significativo en  $\alpha = 0.05$ .

Tabla 2. Análisis de varianza del efecto de los cultivares (C), tratamientos (T) y su interacción (C x T) sobre los componentes de rendimiento y variables de crecimiento.

Variable	C	T	C x T
Rendimiento	ns	***	ns
Longitud de vaina	***	***	ns
Peso semillas	ns	***	ns
Semillas por planta	ns	***	ns
Semillas por vaina	ns	***	**
Vainas por planta	ns	***	ns
Peso de 100 semillas	***	***	***
Crecimiento			
Área foliar	ns	***	ns
Peso seco hojas	**	***	***
Peso seco vainas	***	***	ns
Peso seco tallo	*	***	ns
Peso seco raíz	***	***	***
Peso seco total	*	***	***
Área foliar específica	ns	ns	*
Suculencia	ns	***	ns
Densidad del tejido de la hoja	***	***	***
Relación parte aérea: raíz	**	***	ns

\*, \*\*, y \*\*\* diferencias significativas en los niveles de probabilidad de 0.05, 0.01 y 0.001, respectivamente. ns, no significativo en  $\alpha = 0.05$ .

### 5.4.1 Fotosíntesis, conductancia estomática y carbono intercelular

Las variables de  $P_n$ ,  $g_s$  fueron 89% y 83% menores en anegamiento que en condiciones control, mientras que el  $C_i$  se incrementó 110%. Durante el periodo de recuperación  $P_n$  y  $g_s$  disminuyen 96% y 90%, respectivamente, y  $C_i$  se incrementa en 186%, respecto a condiciones control. En la figura 2 se observa la interacción entre el estado fenológico y los tratamientos de anegamiento y recuperación sobre  $P_n$  y  $g_s$ . El anegamiento en el estado vegetativo causó reducción en  $P_n$  (89%) y  $g_s$  (78%) (Figura 2A, y C). En el periodo de recuperación la reducción de  $P_n$  fue de 94% y  $g_s$  de 89%. En el anegamiento impuesto en la etapa de floración,  $P_n$  y  $g_s$  disminuyeron 92% y 91%, respectivamente. En el periodo de recuperación del anegamiento en estado de floración, los valores de  $P_n$  y  $g_s$  disminuyeron 99% y 92%, respectivamente (Figura 2B y D).

Tabla 3. Efecto de los cultivares, tratamientos y estado fenológico sobre fotosíntesis neta ( $P_n$ ), conductancia estomática ( $g_s$ ), carbono intercelular ( $C_i$ ), contenido relativo de clorofilas (CCI), fluorescencia inicial ( $F_o$ ), fluorescencia máxima ( $F_m$ ), eficiencia fotoquímica máxima de PSII ( $F_v/F_m$ ) en plantas de frijol arbustivo sometidas a anegamiento y recuperación.

	Anegamiento							Recuperación						
	$P_n$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$g_s$ ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$C_i$ ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ )	CCI	$F_o$	$F_m$	$F_v/F_m$	$P_n$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$g_s$ ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$C_i$ ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ )	CCI	$F_o$	$F_m$	$F_v/F_m$
Cultivar														
Bacatá	5.6	146.41 ab	280.33	21.41 b	67.65 ab	337	0.796 a	5.35	136.72	319.83	16.81 b	74.31 b	342.12 ab	0.787 a
Bachue	6.19	145 ab	236.06	22.81 ab	73 a	314.25	0.757 b	5.74	1331.31	298.69	17.90 ab	77.81 ab	326.77 ab	0.755 bc
Bianca	6.18	168.94 a	246.5	23.35 ab	62.85 b	297.31	0.804 a	5.74	149.63	310.48	17.06 b	74.10 b	299.31 b	0.776 ab
Ceranza	6.1	157.7 ab	289.75	23.55 ab	74.02 a	337.06	0.764 b	5.78	154.36	373.92	19.23 ab	87.17 a	349.44 a	0.735 c
NUA35	5.57	133.81 b	277.31	26.83 a	68.69 ab	325.1	0.792 a	5.19	130.83	323.12	22.06 a	76.94 ab	343.69 ab	0.773 ab
Significancia	ns	*	ns	*	**	ns	***	ns	ns	ns	**	*	***	***
Tratamientos														
Control	10.67 a	257.3 a	168.70 b	25.48 a	71.68 a	359.57 a	0.797 a	10.67 a	257.3 a	168.7 b	25.48 a	71.68 b	359.57 a	0.796 a
Tratamiento	1.18 b	43.44 b	363.48 a	21.70 b	66.81 b	284.72 b	0.769 b	0.45 b	24.64 b	481.72 a	11.69 b	84.46 a	304.96 b	0.734 b
Significancia	***	***	***	***	**	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Estado fenológico														
Vegetativo	3.69 b	144.29	245.81 b	21.35 b	58.74 b	246.45 b	0.768 b	3.57 b	129 b	290.71 b	16.73 b	72.72 b	289.61 b	0.750 b
Floración	8.16 a	156.46	286.37 a	25.83 a	79.74 a	397.84 a	0.798 a	7.55 a	152.94 a	359.71 a	20.44 a	83.42 a	374.93 a	0.780 a
Significancia	***	ns	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
CV (%)	23.28	18.82	23.48	21.16	11	16.02	2.96	22.67	20.42	22.98	25.86	13.61	14.71	3.61

Promedios con letras diferentes representan diferencias estadísticas significantes de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

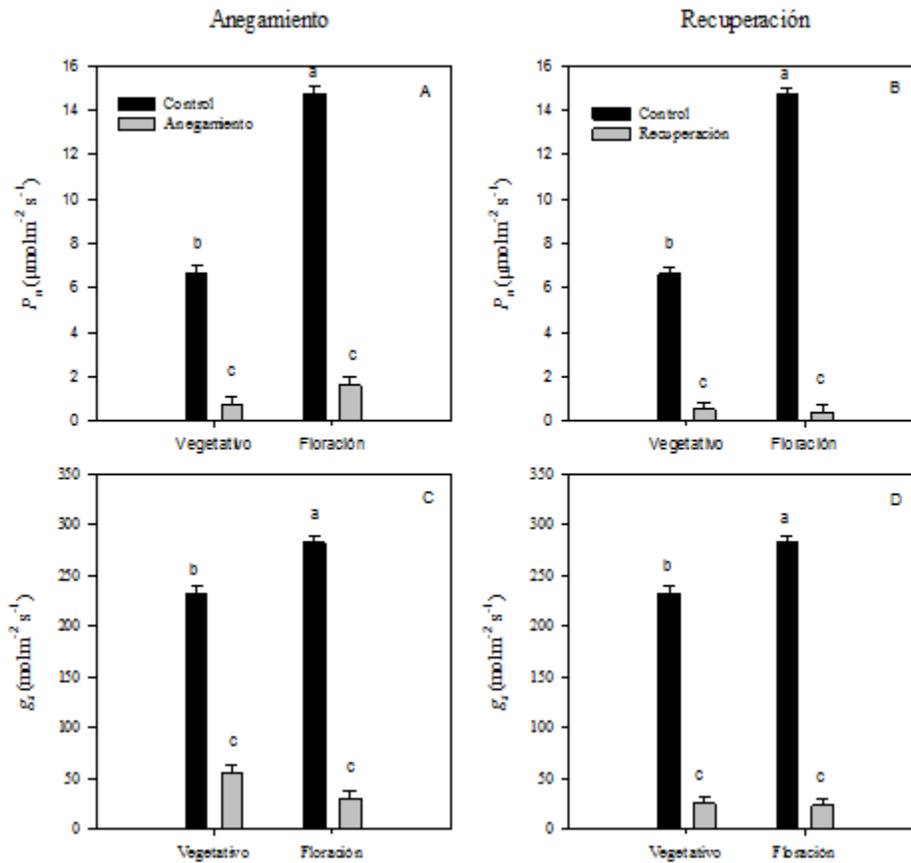


Figura 2. Efecto del anegamiento y el estado fenológico sobre A, fotosíntesis neta ( $P_n$ ) y C, conductancia estomática ( $g_s$ ); efecto de la recuperación sobre B, fotosíntesis neta ( $P_n$ ) y D, conductancia estomática ( $g_s$ ) de plantas de frijol arbustivo. Los valores son promedios de cuatro repeticiones  $\pm$  error estándar. Promedios con letras diferentes representan diferencias estadísticas significantes de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

### 5.4.2 Fluorescencia de la clorofila a

Se observó que  $F_o$ ,  $F_m$  y  $F_v/F_m$  descienden en el tratamiento de negamiento en 7%, 21% y 4%, respectivamente, Durante el periodo de recuperación los valores de  $F_o$ ,  $F_m$  y  $F_v/F_m$  descienden en 18%, 15% y 8%, respectivamente (Tabla 3). Los valores de  $F_v/F_m$  de la

interacción de los cultivares y los tratamientos anegamiento y recuperación se muestran en la figura 3.  $F_v/F_m$  desciende en los cultivares Bachue (8%) y Cerinza (5%) cuando sometidos a anegamiento (Figura 3A). Durante la recuperación hubo un descenso en  $F_v/F_m$  en los cultivares Bachue (9%), Bianca (8%), Cerinza (13%) y NUA35 (7%) respecto al control (Figura 3B). Los valores de  $F_o$  aumentaron en el cultivar Cerinza anegado (32%) respecto a las plantas control (Figura 4).

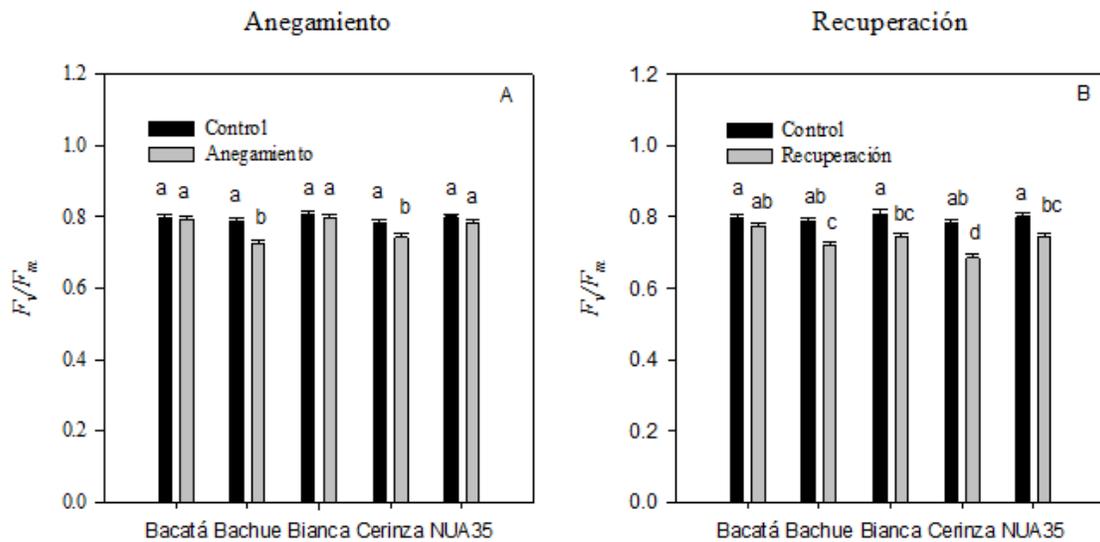


Figura 3. Efecto del anegamiento y los cultivares sobre A, eficiencia fotoquímica máxima de PSII ( $F_v/F_m$ ); efecto de la recuperación sobre B, eficiencia fotoquímica máxima de PSII ( $F_v/F_m$ ) de plantas de frijol arbustivo. Los valores son promedios de cuatro repeticiones  $\pm$  error estándar. Promedios con letras diferentes representan diferencias estadísticas significantes de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

### 5.4.3 Contenido relativo de clorofilas

El contenido relativo de clorofilas (CCI) se redujo en condiciones de anegamiento 15% y durante el periodo de recuperación CCI disminuyó 54% (Tabla 3).

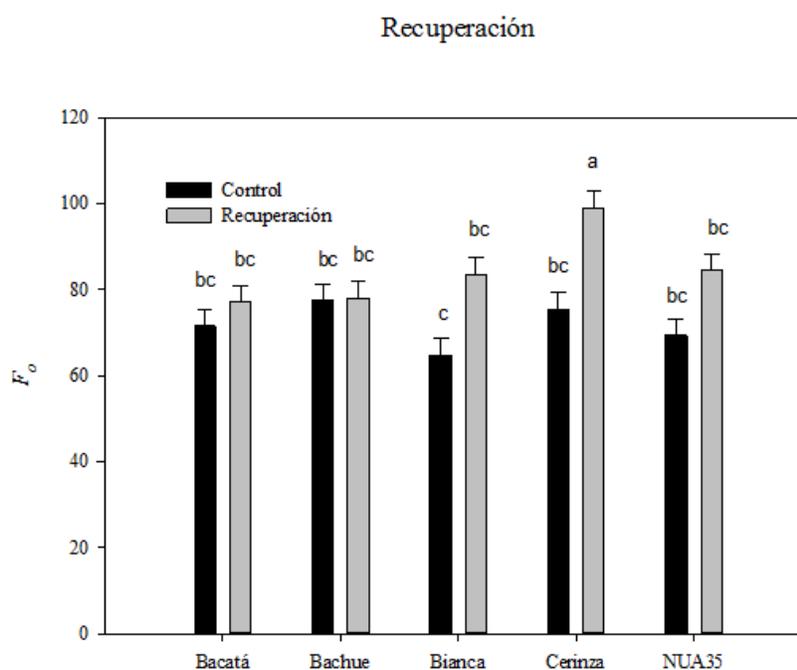


Figura 4. Efecto de la recuperación y el estado fenológico sobre ( $F_o$ ) de plantas de frijol arbustivo. Los valores son promedios de cuatro repeticiones  $\pm$  error estándar. Promedios con letras diferentes representan diferencias estadísticas significantes de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

#### 5.4.4 Producción de etileno

El anegamiento causó el incremento (89%) en la producción de etileno en los todos los cultivares. Sin embargo, en el periodo de recuperación posterior al estrés la producción de etileno desciende hasta valores control en todos los cultivares (Figura 5).

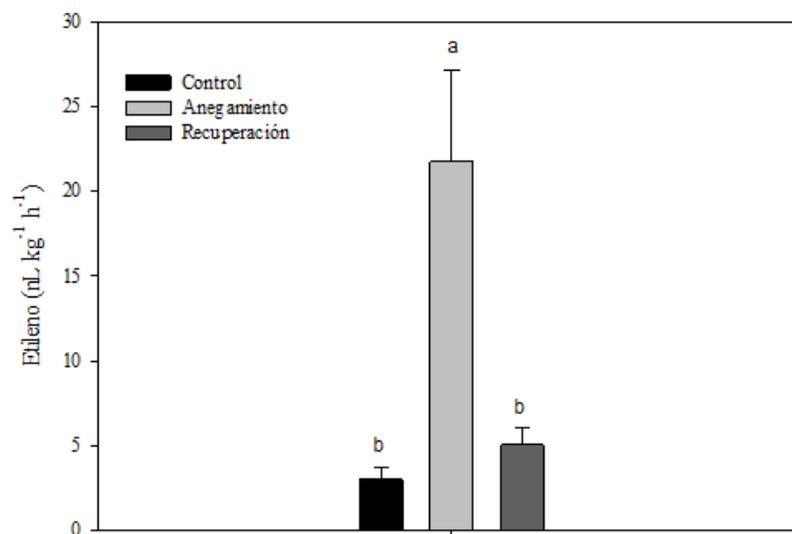


Figura 5. Efecto del anegamiento y la recuperación sobre la producción de etileno de cultivares de frijol arbustivo. Los valores son promedios de cuatro repeticiones  $\pm$  error estándar. Promedios con letras diferentes representan diferencias estadísticas significantes de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

### 5.4.5 Crecimiento, índices foliares y distribución de masa seca

La tabla 4 resume el efecto simple de los cultivares y los tratamientos de anegamiento en estado vegetativo y floración sobre parámetros de crecimiento. El anegamiento en la etapa vegetativa causó descenso en AF (89%), PSV (87%), PST (59%), SUC (28%), S:R (23%). En la etapa de floración el anegamiento ocasionó descensos en PSV (97%), PST (64%) y S:R (69%).

Tabla 4. Efecto de los cultivares y el anegamiento sobre variables de crecimiento de plantas de frijol arbustivo

	AF (cm <sup>2</sup> )	PSV (g)	PST (g)	SUC (mg H <sub>2</sub> O mm <sup>-2</sup> )	S:R
<b>Cultivar</b>					
Bacatá	230.87	1.093	1.59 ab	0.26	2.02 b
Bachue	235.53	1.85	1.1 ab	0.26	4.13 a
Bianca	244.65	2.63	1.67 a	0.26	3.26 ab
Cerinza	255.72	2.38	1.4 ab	0.23	3.66 ab
NUA35	184.54	1.65	1.04 b	0.23	2.48 ab
Significancia	ns	ns	*	ns	***
<b>Tratamientos</b>					
Control	543.22 a	4.97 a	2.31 a	0.29 a	4.49 a
Anegamiento Vegetativo	58.17 b	0.63 b	0.95 b	0.21 b	3.44 a
Anegamiento Floración	89.39 b	0.15 b	0.83 b	0.24 b	1.41 b
Significancia	***	***	*	***	**
CV (%)		65.79	42.21	20.78	44.97

Promedios con letras diferentes representan diferencias estadísticas significantes de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

En la Figura 6 se muestra el efecto de cultivar y el anegamiento en vegetativo y floración sobre el peso seco. El anegamiento impuesto en el estado vegetativo causó la reducción en PSH (84%) PSR (79%) y PSTo (81%). El cultivar Cerinza mostró el menor descenso en PSH

(45%) en comparación a su control. Cuando el anegamiento se impuso en la etapa de floración ocasionó descensos en PSH (84%), PSR (55%) Y PSTo (79%), respectivamente. Sin embargo, el cultivar Cerinza presentó un incremento en el PSR de 21% sometido a anegamiento en el estado de floración. El anegamiento en la etapa vegetativa incrementó el DTH en el cultivar Cerinza (233%) y NUA35 (220%) (Figura 7). El AFE se redujo en los cultivares Cerinza (53%) y NUA35 (70%), en el anegamiento impuesto en la etapa vegetativa (Figura 7). Los cultivares sometidos a anegamiento cambiaron el patrón de distribución de fotoasimilados dependiendo del estado de desarrollo (Figura 8). El cultivar Cerinza mostró una mayor partición de fotoasimilados hacia las hojas cuando el anegamiento es impuesto en la etapa vegetativa. El cultivar NUA35 translocó los fotoasimilados en mayor proporción hacia el tallo. Sin embargo, en la etapa de floración los fotoasimilados se dirigen en mayor proporción hacia la raíz en todos los cultivares evaluados aquí. En el cultivar Cerinza se observó la mayor acumulación de biomasa en la raíz (Figura 8C).

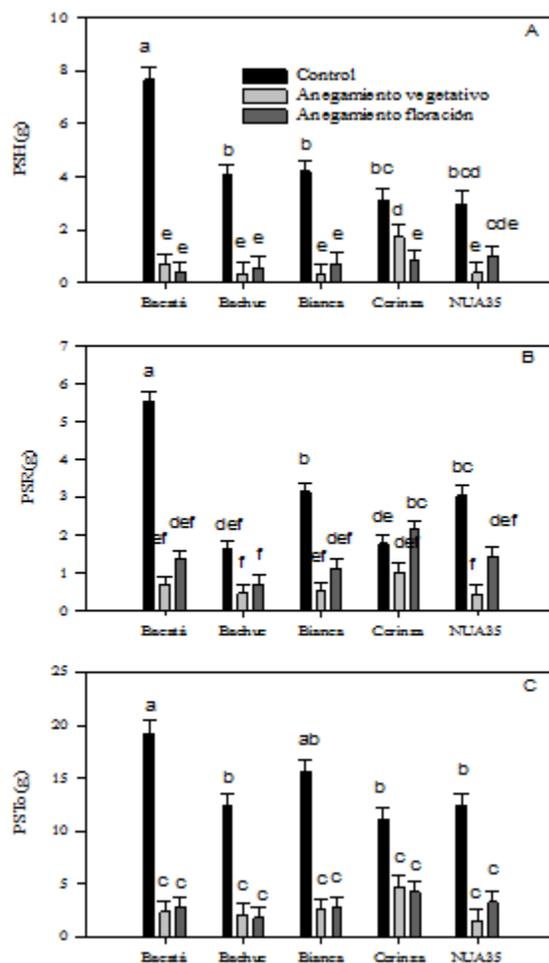


Figura 6. Efecto de los cultivares, anegamiento y su interacción A, peso seco de hojas (PSH); B, peso seco de raíz (PSR); C, peso seco total (PSTo) de plantas de frijol arbustivo. Los valores son promedios de cuatro repeticiones  $\pm$  error estándar. Promedios con letras diferentes representan diferencias estadísticas significantes de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

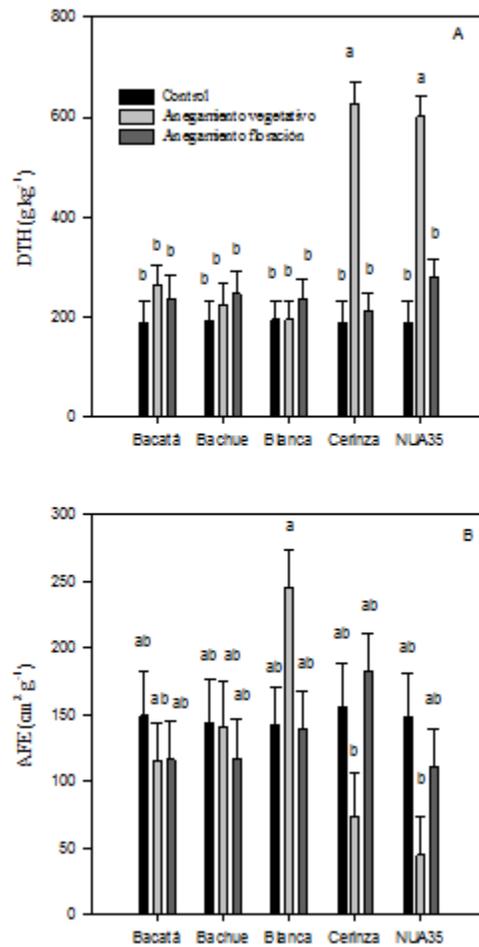


Figura 7. Efecto de los cultivares, el anegamiento y su interacción A, densidad del tejido de la hoja (DTH); B, área foliar específica (AFE) de plantas de frijol arbustivo. Los valores son promedios de cuatro repeticiones  $\pm$  error estándar. Promedios con letras diferentes representan diferencias estadísticas significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

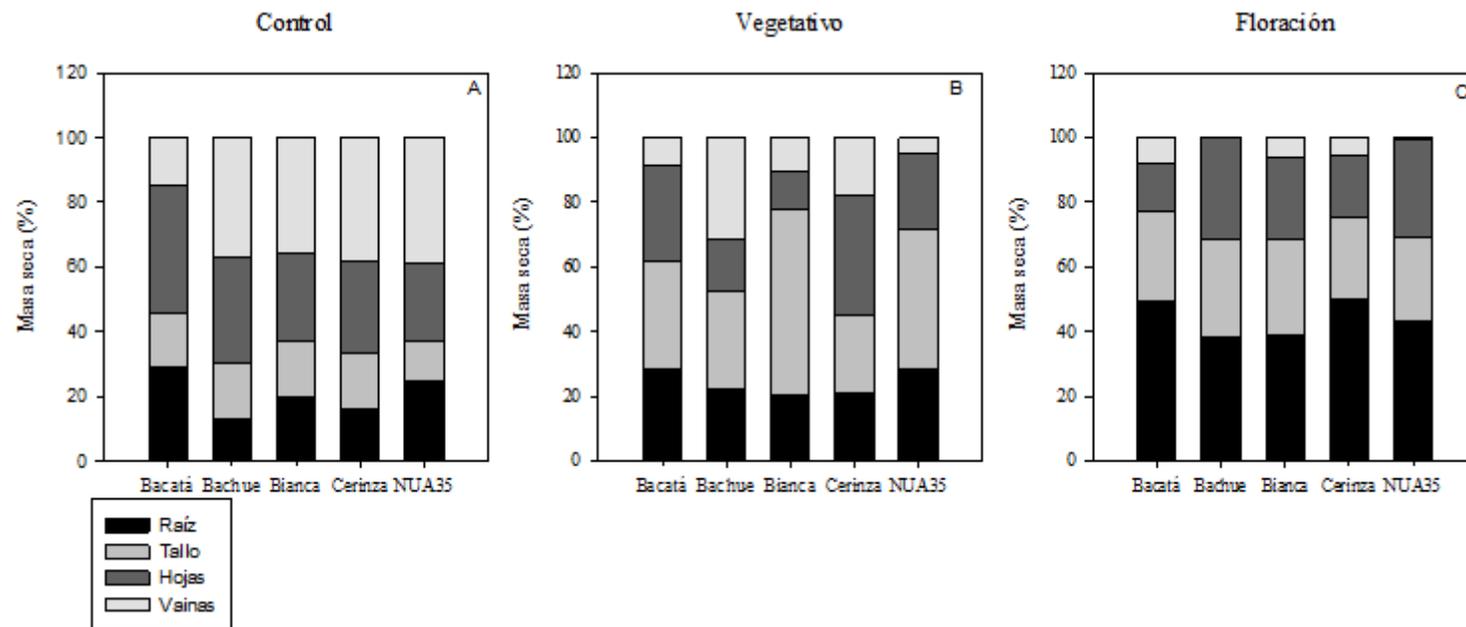


Figura 8. Efecto de los cultivares y el anegamiento en dos estados de desarrollo sobre la distribución de masa seca de plantas de frijol arbustivo. Los valores son promedios de cuatro repeticiones  $\pm$  error estándar.

#### **5.4.6 Rendimiento de semilla y componentes de rendimiento**

El rendimiento en semilla y los componentes de rendimiento fueron afectados por el anegamiento (Tabla 5). En el estado vegetativo el anegamiento causó una reducción en el rendimiento en semilla de 64% respecto al control. Se presentó una reducción en la Longitud de la vaina (14%), peso de semillas (64%), número de semillas por planta (48%), número de semillas por vaina (23%), vainas por planta (35%) y peso de 100 semillas (27%). Sin embargo, en el estado de floración el anegamiento causó una mayor reducción en rendimiento en semilla (84%), peso de semillas (84%), semillas por planta (46%) y en vainas por planta (62%) (tabla 5). NUA35 fue el cultivar que presentó el mayor descenso en semillas por vaina (51%) en el estado de floración respecto a su control. Por otra parte, el cultivar Bacata sometido a anegamiento en el estado de floración mostró la mayor reducción en el peso de 100 semillas (55%).

Tabla 5. Efecto de los cultivares, el anegamiento y su interacción sobre los componentes de rendimiento de plantas de frijol arbustivo.

	Rendimiento (g m <sup>-2</sup> )	Longitud de vaina (cm)	Peso semillas (g)	Semillas por planta	Semillas por vaina	Vainas por planta	Peso de 100 semillas (g)
Cultivar							
Bacatá	82.01	8.33 bc	5.13	7.18	2.36	3.01	60.28 b
Bachue	62.83	7.93 c	3.74	6.04	2.25	2.76	55.64 b
Bianca	85.22	8.92 bc	5.51	9.27	2.63	3.91	58.72 b
Cerinza	70.51	8.50 bc	4.41	6.12	2.11	3.47	68.51 a
NUA35	82.49	10.67 a	5.14	7.05	2.26	3.30	65.95 a
Significancia	ns	***	ns	ns	ns	ns	***
Tratamientos							
Control	150.77 a	9.73 a	9.42 a	11.93 a	2.74 a	4.86 a	75.70 a
Anegamiento en Vegetativo	54.92 b	8.38 b	3.42 b	6.15 b	2.1 b	3.18 b	55.01 b
Anegamiento en Floración	24.13 c	8.50 b	1.51 c	3.31 c	2.13 b	1.83 c	54.75 b
Significancia	***	***	***	***	***	***	***
Cultivar x Tratamiento							
Bacatá x Control	174.41	9.11	10.90	13.29	2.33 ab	5.57	86.85 a
Bacatá x Vegetativo	52.87	8.58	3.30	5.36	2.31 ab	2.25	55.36 efg
Bacatá x Floración	18.74	7.30	1.17	2.89	2.44 ab	1.20	38.65 h
Bachue x Control	113.29	9.11	6.51	9.29	2.80 a	3.69	70.09 bcd
Bachue x Vegetativo	53.15	7.13	3.32	6.00	1.85 ab	3.25	48.64 gh
Bachue x Floración	22.05	7.55	1.38	2.83	2.10 ab	1.33	48.2 gh
Bianca x Control	166.18	10.09	10.93	13.73	3.04 a	5.12	71.31 bcd
Bianca x Vegetativo	68.12	7.90	4.26	8.83	2.28 ab	4.17	55.59 efg
Bianca x Floración	21.35	8.77	1.33	5.25	2.58 ab	2.44	49.25 fgh
Cerinza x Control	135.93	9.35	8.50	11.18	2.64 ab	4.79	75.99 ab
Cerinza x Vegetativo	46.15	7.48	2.89	4.50	1.60 ab	3.71	68.97 bcd
Cerinza x Floración	29.44	8.67	1.84	2.67	2.08 ab	1.90	60.55 def
NUA35 x Control	164.05	11.01	10.25	12.15	2.92 a	5.14	74.25 abc
NUA35 x Vegetativo	54.33	10.82	3.36	6.08	2.44 ab	2.50	61.93 cde
NUA35 x Floración	29.10	10.19	1.82	2.93	1.43 b	2.27	61.68 def
Significancia	ns	ns	ns	ns	**	ns	***
CV (%)	32.98	15.44	31.14	26.87	33.63	25.63	7.32

Promedios con letras diferentes representan diferencias estadísticas significantes de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

### 5.4.7 Índices de tolerancia

Para detectar los cultivares tolerantes a la condición de anegamiento, el peso seco total y el rendimiento de grano en condiciones de estrés y no estrés fueron medidos para calcular dos diferentes índices de tolerancia (Tabla 6). Basado en el WTC el cultivar con mayor tolerancia al anegamiento fue Cerinza en ambos estados fenológicos. Sin embargo, según el PR el cultivar Bachue presentó la menor reducción en el rendimiento de semilla en el tratamiento de anegamiento en el estado vegetativo (Tabla 6). Por último, el cultivar Cerinza mostró el menor PR en el estado de floración y Bacatá el mayor PR en estado de floración.

Tabla 6. Promedios de rendimiento e índices de selección de cinco cultivares de frijol arbustivo sometidos a anegamiento en dos estados fenológicos.

Cultivar	Y <sub>ns</sub>	Y <sub>v</sub>	Y <sub>f</sub>	WTC		PR	
				Vegetativo	Floración	Vegetativo	Floración
Bacata	174.41	52.87	17.12	0.13	0.18	69.69	91.14
Bachue	104.12	53.15	29.10	0.12	0.15	48.96	83.56
Bianca	149.81	68.12	15.46	0.14	0.16	54.53	85.75
Cerinza	135.93	46.15	21.35	0.50	0.45	66.05	78.34
NUA35	147.86	55.76	29.44	0.16	0.34	62.29	80.32

Y<sub>ns</sub>= promedios de plantas control; Y<sub>v</sub>= promedios de plantas estresadas en estado vegetativo; Y<sub>f</sub>= promedios de plantas estresadas en estado de floración; WTC=coeficiente de tolerancia al anegamiento y PR= porcentaje de reducción en rendimiento.

## 5.5 Discusión

Plantas de cinco cultivares de frijol arbustivo de amplia aceptación en Colombia fueron utilizadas en este estudio para evaluar el efecto del estrés por anegamiento y recuperación en variables fisiológicas y rendimiento. Se ha reportado ampliamente el efecto del anegamiento sobre parámetros fotosintéticos en plantas (Kumar et al., 2013; Najeeb et al., 2015). Los resultados de este estudio muestran tanto durante el anegamiento como durante la recuperación la reducción en  $P_n$ ,  $g_s$  y el aumento en  $C_i$  lo que sugiere que la disminución en  $P_n$  puede deberse en parte a limitaciones estomáticas (Farquhar y Sharkey, 1982; Sun et al., 2013). Se ha encontrado que el anegamiento induce acidificación citoplasmática y protonación de acuaporinas, afectando la toma de agua y la conductividad hidráulica de la raíz, ocasionando el cierre estomático (Tournaire-Roux et al., 2003). Igualmente, se encontró que 8 días de recuperación no son suficientes para restablecer  $P_n$ ,  $g_s$  y  $C_i$  a los valores control en plantas de frijol. De hecho, a los 8 días de recuperación los valores de  $P_n$  y  $g_s$  fueron menores que durante el anegamiento y hubo un aumento en  $C_i$  lo cual indica un mayor desbalance metabólico en recuperación. La capacidad para la reapertura estomática varía con la especie y la duración del anegamiento (Kozlowski, 1997). Plantas de *Vaccinium corymbosum* anegadas durante 24 días tardan 18 días para recobrar la conductancia estomática de las plantas control (Davies y Flore, 1986). Sin embargo, plantas como *Carya illinoensis* abren sus estomas pasados 15 días de drenaje, luego de ocho días de anegamiento (Smith y Ager, 1988). También se encontró que el anegamiento impuesto en el estado reproductivo de plantas de frijol ocasionó la mayor reducción en parámetros fotosintéticos

este dato es consistente con lo encontrado por Ahmed et al. (2002) en dos cultivares de frijol mungo (*Vigna radiata* L.), donde el anegamiento causó mayor reducción en los parámetros fotosintéticos cuando el anegamiento se hizo en el estado reproductivo. Se ha reportado un descenso en el contenido de clorofila, como un síntoma común, en plantas sometidas a anegamiento (Rao y Li, 2003). En nuestros resultados el tratamiento de anegamiento por cuatro días redujo significativamente el contenido de clorofilas en todos los cultivares evaluados, presentándose una mayor reducción de clorofila en el periodo posterior de recuperación. Estos datos son similares a los reportados en plantas de haba (*Vicia faba* L.), donde el anegamiento ocasionó descenso en el contenido de clorofila *a* que se mantuvo durante el periodo de recuperación (Pociecha et al., 2008). Se sabe que el anegamiento induce la síntesis del precursor de etileno (ACC) que es transportado a la parte aérea de la planta y convertido en etileno, hormona que induce la activación de enzimas que degradan clorofilas (Christianson et al., 2010). Igualmente, la reducción de clorofilas también puede ser un mecanismo de fotoprotección en condiciones de estrés, ya que reduce la cantidad de fotones absorbidos por las hojas (Galmés et al., 2007). Por otra parte, Sasidharan y Voesenek (2015) mencionan que en periodos posteriores al anegamiento el incremento en el oxígeno puede aumentar ROS y por lo tanto ocasionar daños en las membranas celulares y moléculas como las clorofilas. Debido a esto, algunas plantas muestran síntomas de clorosis y marchitamiento en las hojas después de reoxigenación (Setter et al., 2010). La disminución en la fotosíntesis también puede estar relacionado con limitaciones no estomáticas como daños en el aparato fotosintético (Bota et al., 2004). Descensos en  $F_v/F_m$  se han asociado a daños en el fotosistema II y han sido observados en numerosas plantas en condiciones de estrés (Zhao et al., 2014; Zheng et al., 2009). Aquí se presentaron mayores descensos en  $F_v/F_m$  en el periodo

de recuperación, indicando un posible daño del PSII. Estos resultados son diferentes a lo reportado por Smethurst et al. (2005) quienes encontraron, en plantas de alfalfa (*Medicago sativa* L.), una completa recuperación de los parámetros de fluorescencia de la clorofila en el periodo de drenaje. La mayor reducción en el contenido de clorofilas en el periodo de reoxigenación observada en este estudio puede estar asociada a la reducción en  $F_v/F_m$  (Setter et al., 2010; Shangguan et al., 2000). Estos resultados sugieren que la reducción en la fotosíntesis durante el periodo de reoxigenación se debe tanto a limitaciones estomáticas como no estomáticas (Bota et al., 2004; Farquhar y Sharkey, 1982). Incrementos en  $F_o$ , otro parámetro de la fluorescencia de la clorofila, se han asociado con el desacople de las antenas y los centros de reacción del PSII, indicando que menos energía alcanza los centros de reacción y por lo tanto menos energía es usada en fotoquímica (Smethurst et al., 2005). El aumento observado en este estudio en  $F_o$  durante el periodo de recuperación indica la ocurrencia de fotoinhibición (Maxwell, 2000). Estos resultados son consistentes con lo reportado en plantas de haba (*Vicia faba* L.) (Pociecha et al., 2008), alfalfa (*Medicago sativa* L.) (Smethurst et al., 2005) y trigo (*Triticum* spp.) (Tan et al., 2008). Durante el anegamiento hay un aumento en la producción de etileno hormona clave involucrada en la respuesta al estrés por anegamiento debido a que induce las respuestas de regulación hormonal, actividad enzimática y expresión genética (Kim et al., 2015). Nuestros resultados muestran que el anegamiento induce el aumento en etileno en las plantas de los cultivares de frijol. Sin embargo, en el periodo de reoxigenación el etileno desciende, lo que no explica la degradación de clorofilas, y los descensos en los parámetros fotosintéticos en el periodo de recuperación. Este comportamiento pueden deberse al aumento de ROS y no a respuestas mediadas por etileno, como ha sido descrito en otras plantas (Blokhina et al., 2003;

Sasidharan y Voesenek, 2015). Otro parámetro fisiológico altamente afectado durante el estrés por anegamiento es el crecimiento (Flórez-Velasco et al., 2015; Kumar et al., 2013; Singh et al., 1991). Aquí en condiciones de anegamiento se observó una reducción en el crecimiento, la acumulación de masa seca y en el rendimiento, datos similares han sido reportados en otras especies de frijoles (Celik y Turhan, 2011; Kumar et al., 2013; Pocięcha et al., 2008). La reducción en área foliar es considerada un mecanismo de aclimatación a estrés por anegamiento para evitar pérdidas de agua y ha sido reportada en plantas de soya (Bacanamwo y Purcell, 1999). En este experimento todos los cultivares presentaron una alta reducción en área foliar que podría estar relacionada con el mantenimiento del balance hídrico (Bacanamwo y Purcell, 1999). En plantas de frijol sometidas a anegamiento se ha observado reducción en el peso seco de la raíz y un menor número de hojas y área foliar ocasionado por la senescencia de las hojas inferiores (Singh et al., 1991). Se ha encontrado que mayor DTH indica una menor pérdida de agua y un incremento en la densidad de la capa del mesófilo (Bosabalidis y Kofidis, 2002). Existe una fuerte relación entre el AFE y el grosor de las hojas (Wilson et al., 1999). En este ensayo, los valores bajos de AFE y altos de DTH en plantas anegadas en el estado vegetativo indican un aumento en el grosor de las hojas, que puede estar relacionado con el incremento en la distribución de fotoasimilados hacia las hojas en las plantas estresadas. Se ha reportado que hojas con baja AFE se desempeñan mejor en ambientes pobres en recursos donde la retención de los recursos capturados es una alta prioridad (Wilson et al., 1999). Existe amplia evidencia sobre la importancia tanto de la presencia de reservas como azúcar en la raíz como de la presencia de la enzima que hidroliza sacarosa en la tolerancia de las plantas al anegamiento (Sairam et al., 2008b). Aquí, se observó que el cultivar Cerinza incrementó el peso seco de la raíz al someterlo a anegamiento

en la etapa reproductiva, lo que puede estar relacionado con el aumento de partición de azúcares a la raíz. Debido al cambio del metabolismo aeróbico al metabolismo anaeróbico, la energía disponible es limitada, por la poca generación de ATP en la fase de conservación de energía de la glicolisis (Bailey-Serres y Voesenek, 2008). Bajo estas condiciones, la planta requiere una alta disponibilidad de azúcar fácilmente metabolizable (Huang y Johnson, 1995; Jackson et al., 1982). Estudios en garbanzo (*Cicer arietinum* L.) han mostrado que las raíces de los genotipos tolerantes al anegamiento contienen mayores contenidos de azúcares totales, reductores y no reductores que los genotipos susceptibles (Sairam et al., 2008b). El anegamiento tiene un efecto importante en el rendimiento de los cultivos ya que afecta negativamente la fisiología de las plantas (Elzenga y Veen, 2010; Lakitan et al., 1992; Meena et al., 2015). Se ha reportado una reducción en el rendimiento en varias plantas cultivadas como frijol mungo (*Vigna radiata* L.) (Ahmed et al., 2002), trigo (*Triticum* spp.) y cebada (*Hordeum vulgare* L.) (de San Celedonio et al., 2014). Los resultados obtenidos en este estudio indican que la reducción en el rendimiento es más marcada en el estado reproductivo que en el estado vegetativo, esto se debe principalmente a la reducción en el número de vainas por planta y al peso de las semillas. Resultados similares han sido encontrados en plantas de frijol mungo (*V. radiata*) (Ahmed et al., 2002) y frijol (*P. vulgaris*) (Trung et al., 1985). Especies como la soya (*Glycine max* L.), frijol mungo (*V. radiata*) y tomate (*Solanum lycopersicum* L.) han mostrado mayor sensibilidad al anegamiento en el estado reproductivo (Lopez y Rosario, 1983; Oosterhuis et al., 1990; Scott et al., 1989; Trung et al., 1985). La mayor sensibilidad en este estado puede estar relacionada con la inducción de hormonas como etileno (Christianson et al., 2010) que puede causar la caída de flores y la reducción en el cuajado de vainas (Lakitan et al., 1992; Umaharan et al.,

1997). Así mismo, la mayor reducción en los parámetros fotosintéticos en el estado reproductivo puede explicar en parte la mayor reducción en el rendimiento en el estado de floración. Sin embargo, el rendimiento no es un rasgo considerado para la detección de genotipos tolerantes al anegamiento debido a su baja heredabilidad (Li et al., 2008). Otros rasgos como la producción de biomasa son usados en índices de selección (Bertholdsson et al., 2015). En este experimento se empleó el WTC con base en la producción de biomasa (Liu et al., 2010). Según este índice los cultivares Cerinza y NUA35 presentaron la mayor tolerancia al anegamiento en ambos estados fenológicos, sin embargo no fueron los cultivares que presentaron el menor porcentaje de reducción del rendimiento. El rendimiento ha mostrado ser un carácter de baja heredabilidad en plantas de haba, trigo y cebada (Keneni y Jarso, 2002). Por otra parte, el cultivar Cerinza muestra potencial para ser utilizado como parental en programas de fitomejoramiento, así como en la siembra de zonas con marginales con condiciones que favorecen periodos cortos de anegamiento.

## 5.6 Conclusiones

El anegamiento afectó de manera severa los parámetros fotosintéticos en todos los cultivares evaluados. sin embargo, el periodo de recuperación o reoxigenación ocasionó mayores descensos en parámetros como  $P_n$ ,  $g_s$  y CCI en todos los cultivares, lo que podría sugerir que el periodo de recuperación posterior al anegamiento causa daños más severos que el mismo estrés a las plantas de frijol arbustivo. De esta manera, los efectos en la recuperación posiblemente no son mediados por los contenidos de etileno, que descienden al nivel de las plantas control, sino por el aumento en especies reactivas de oxígeno. Los cultivares de frijol

arbustivo presentaron mayor susceptibilidad al anegamiento en el estado de floración lo que está relacionado con mayores descensos en fotosíntesis. Por último, el cultivar que presentó mayor tolerancia al estrés por anegamiento tanto en estado vegetativo como en floración fue Cerinza. En el estado vegetativo la tolerancia posiblemente se debe al aumento en la densidad del tejido de la hoja (DTH) y a la reducción en el área foliar específica (AFE), mientras que en el estado de floración posiblemente está relacionada con el aumento en el peso seco de la raíz (PSR) debido a una mayor partición de fotoasimilados hacia la raíz.

## **6. Discusión general**

El objetivo de este trabajo fue caracterizar la respuesta fisiológica de cinco cultivares de frijol arbustivo, adaptados a la zona alto yina de Colombia, crecidos en condiciones de estrés por hipoxia en hidroponía y en suelo. En plantas de frijol la hipoxia causada en hidroponía, (experimento uno) y en suelo (experimento dos) ocasionó varias alteraciones en la fisiología de las plantas de frijol que incluyen reducción en fotosíntesis, contenido de clorofilas, acumulación de masa seca y un aumento en la producción de etileno, estas modificaciones resultaron en una disminución significativa en el rendimiento en estado vegetativo (64%) y floración (84%). De acuerdo con los resultados obtenidos en el experimento uno, en condiciones en hidroponía, los cultivares de frijol toleraron la hipoxia durante 14 días, momento en el cual aún no se presentaban marchitamiento ni pérdida de turgor en las hojas.

Sin embargo, cuando los mismos cultivares fueron sometidos, en el experimento dos, a condiciones de hipoxia por anegamiento del suelo, solo toleraron 4 días, presentando pérdida de turgor y marchitamiento en las hojas inferiores. Estos resultados son consistentes, en cuanto a la duración del estrés, con lo reportado por Boru et al. (2003) en plantas de soya, quienes mencionan que la anoxia y/o hipoxia por 14 días en un cultivo hidropónico no tuvo efectos sobre la supervivencia de las plantas y el verdor de las hojas. Sin embargo, la reducción en los días de tolerancia a la hipoxia en suelo anegado encontrada aquí en plantas de frijol puede deberse a la presencia de estreses adicionales asociados al ambiente y al suelo como la alta temperatura y radiación y la baja disponibilidad de nutrientes debida al metabolismo de los microorganismos, al tipo de suelo y a sustancias toxicas liberadas por bacterias (Li et al., 2008). Igualmente, la concentración de CO<sub>2</sub> en suelo anegados puede alcanzar 50% (v/v) del total de gases disueltos, lo que puede ser toxico para las plantas (Ponnamperuma, 1972). Se ha observado que el incremento en las concentraciones de CO<sub>2</sub> en sistemas hidropónicos ocasiona alteraciones fisiológicas en varias especies de plantas (Adams et al., 1995; Boru et al., 2003; Stolwijk y Thimann, 1957; Zhang et al., 1995). En plantas de soya anegadas durante 3 días en condiciones de campo se encontró la presencia de clorosis, defoliación y detención del crecimiento y muerte (Oosterhuis et al., 1990). Teniendo en cuenta los datos de masa seca y rendimiento se puede decir que los cultivares de fríjol arbustivo evaluados son relativamente sensibles a periodos largos de hipoxia en condiciones de anegamiento en suelo, tolerando máximo 4 días en anegamiento en suelo con una disminución significativa en el crecimiento y rendimiento.

En los dos experimentos se encontró que el cultivar con mayor tolerancia al anegamiento es Cerinza. En condiciones de hidroponía la tolerancia del cultivar Cerinza probablemente está relacionada al mayor WUE producto de la disminución de la conductancia estomática por el cierre de los estomas. Se ha reportado que genotipos que presentan altos WUE pueden presentar mayor potencial de crecimiento y rendimiento en condiciones ambientales fluctuantes (Jones, 2013). Un efecto común del anegamiento sobre varias especies de plantas herbáceas es el cierre estomático y el mantenimiento de altos potenciales hídricos (Bradford, 1983). De esta manera, genotipos que mantienen mayores WUE tienen una capacidad eficiente de regulación estomática (Kumar et al., 1998). Los resultados del experimento dos en suelo muestran igualmente que Cerinza es el cultivar con mayor tolerancia. En este caso, la tolerancia podría asociarse a que los valores de  $F_o$  en este cultivar se incrementaron lo que se ha asociado con el desacople de las antenas y los centros de reacción del PSII (Smethurst et al., 2005). Igualmente, incrementos en  $F_o$  indican que una menor cantidad de energía alcanza los centros de reacción y por lo tanto una menor energía es usada en fotoquímica (Smethurst et al., 2005). Sin embargo, el aumento en  $F_o$  también puede estar asociado al retardo en el ensamblaje de las proteínas D1 y D2 en el complejo PSII, proceso conocido como fotoinhibición (Koivuniemi et al., 1995; Peng et al., 2006). Se ha considerado que la fotoinhibición del PSII es a menudo una estrategia de fotoprotección (Anderson et al., 1997; Takahashi y Badger, 2011). Así mismo, el cultivar Cerinza incrementó el grosor de las hojas cuando el anegamiento fue impuesto en la etapa vegetativa e incrementó el peso seco de la raíz en el anegamiento de la etapa reproductiva. Se ha reportado que hojas con baja AFE se desempeñan mejor en ambientes pobres en recursos, donde la retención de los recursos capturados es una alta prioridad (Wilson et al., 1999). Existe amplia evidencia que confirma

la importancia de la presencia de reservas de azúcar en la raíz y de la enzima que hidroliza sacarosa, en la tolerancia de las plantas al anegamiento (Sairam et al., 2008). Debido al cambio en el metabolismo de aeróbico a anaeróbico, la energía requerida es restringida debido a que poco ATP es generado. Por lo tanto, se requiere una alta disponibilidad de azúcar fácilmente metabolizable (Huang y Johnson, 1995; Jackson et al., 1982). Estudios en garbanzo han mostrado que las raíces de genotipos tolerantes al anegamiento contienen mayor contenido de azúcares totales, reductores y no reductores que los genotipos susceptibles (Sairam et al., 2008).

De acuerdo con Nguyen et al. (2012) el estrés por anegamiento durante el estado vegetativo en plantas de soya causa reducciones en el rendimiento de 17-40%, mientras que durante el estado reproductivo causa reducciones del rendimiento entre un 40-57%. En el experimento dos el anegamiento causó reducción en el rendimiento de 64% en el estado vegetativo y de 84% en el estado de floración. De esta manera los resultados indican una mayor sensibilidad del frijol al anegamiento en el estado reproductivo, lo que se debe posiblemente a la mayor reducción en parámetros fotosintéticos que presentaron las plantas en este estado. Algunos autores asocian la sensibilidad del estado reproductivo a la síntesis de etileno y la subsecuente caída de flores y reducción en el llenado de vainas (Christianson et al., 2010; Lakitan et al., 1992; Umaharan et al., 1997).

De acuerdo a los resultados obtenidos con el índice de selección WTC presentados aquí, el uso de sistemas hidropónicos para la selección de cultivares de frijol tolerantes al estrés por anegamiento puede ser una herramienta de bajo costo. Igualmente, la evaluación de la tolerancia al anegamiento en condiciones semi-controladas en invernadero mostró ser otra

alternativa para detectar cultivares de frijol tolerantes al anegamiento. En experimentos realizados en condiciones de campo, donde no es posible controlar el ambiente, muchas veces los resultados no son reproducibles (Yang et al., 2012).

## 6.1 Conclusiones finales

- Todos los cultivares de frijol mostraron alta sensibilidad al anegamiento la cual se vio reflejada en la alta disminución en el rendimiento en las dos etapas fenológicas.
- El cultivar Cerinza fue el más tolerante al anegamiento lo que sugiere que puede ser utilizado como parental en programas de mejoramiento al estrés por anegamiento o en el establecimiento de cultivos en zonas propensas a inundaciones transitorias.
- La tolerancia de la variedad Cerinza frijol a la hipoxia por anegamiento se debe principalmente a un mayor uso eficiente del agua, reducción en  $F_o$  y a la partición de fotoasimilados a hojas y raíz.
- La hipoxia por anegamiento en suelo causa un estrés más severo debido a factores adicionales asociados al ambiente y al suelo.

## 7. Modelo conceptual

En el modelo se muestran las respuestas de la planta de frijol frente al estrés por hipoxia en hidroponía y en suelo. La primera respuesta de la planta de frijol es la percepción de la señal

de los descensos en el contenido de O<sub>2</sub> en el sustrato mediante el incremento de ROS, acidificación citoplasmática y flujos de Ca<sup>2+</sup>. La acidificación citoplasmática debido a la acumulación de ácido láctico, producto de la respiración anaeróbica, ocasiona el cambio conformacional de las acuaporinas que reduce la conductividad hidráulica de la raíz afectando el estado hídrico de la planta causando el cierre estomático y por tanto reduciendo la fotosíntesis.

El aumento en el Ca<sup>2+</sup> está involucrado en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de la hormona etileno. El aumento de la ACC sintasa incrementa el ACC en raíz que es transportado a hojas y tallos y convertido en etileno. Se ha reportado que el etileno es la hormona que induce las respuestas genéticas, hormonales y enzimáticas involucradas en el estrés por anegamiento. En el ensayo en suelo se observó el incremento en la producción de etileno en plantas de frijol en el periodo de anegamiento. Se sabe que el etileno induce la síntesis de enzimas como clorofilasas involucradas en la degradación de clorofilas que a su vez pueden ocasionar descensos en parámetros como *Fv/Fm* relacionados con el estado del aparato fotosintético. Los daños en el fotosistema II y en las clorofilas por el aumento de ROS debido tanto al desacople entre la fase luminosa y oscura de la fotosíntesis, como a la actividad de la enzima NAD(P)H oxidasa de la membrana, generan limitaciones no estomáticas de la fotosíntesis. La reducción en la fotosíntesis causa una disminución en el contenido de fotoasimilados y por tanto reduce el peso seco total de la planta. En el ensayo en hidroponía las plantas de frijol toleraron 14 días de anegamiento sin presentar clorosis ni marchitamiento. El mayor descenso en la conductancia estomática en el cultivar cerinza causó un aumento en el uso eficiente del agua y por lo tanto menor reducción en el peso seco

total de este cultivar. También se presentó un mayor incremento en prolina en los cultivares sensibles al estrés lo que puede aumentar el gasto energético y de esta manera causar una disminución en el peso seco de estos cultivares.

El anegamiento en suelo afectó severamente las plantas de frijol mostrando una menor tolerancia (4 días de anegamiento). El suelo contiene bacterias que utilizan oxígeno y nutrientes para su metabolismo y liberan sustancias tóxicas al medio que aumentan el efecto del estrés por anegamiento en las plantas. Otros factores como la alta temperatura y luminosidad pueden ser estreses adicionales en condiciones semi-controladas. En el experimento en suelo los fotoasimilados se utilizan como sustrato en la respiración anaeróbica para la generación de ATP y en el mantenimiento del metabolismo básico. En el cultivar Cerinza, un mecanismo de tolerancia es la partición de fotoasimilados a hojas aumentando el grosor de la hoja y hacia raíz para ser utilizados como sustrato en la producción de energía para mantener el metabolismo celular. Al finalizar el periodo de recuperación  $F_0$  se incrementó indicando la posible presencia de fotoprotección del aparato fotosintético. Este mecanismo puede estar asociado a la tolerancia al anegamiento del cultivar Cerinza. Por otra parte, el descenso en la producción de etileno en el periodo de recuperación no explica el aumento en la degradación de clorofilas. Lo cual se ha asociado al aumento de ROS debido a la reoxigenación causando clorosis y marchitamiento.

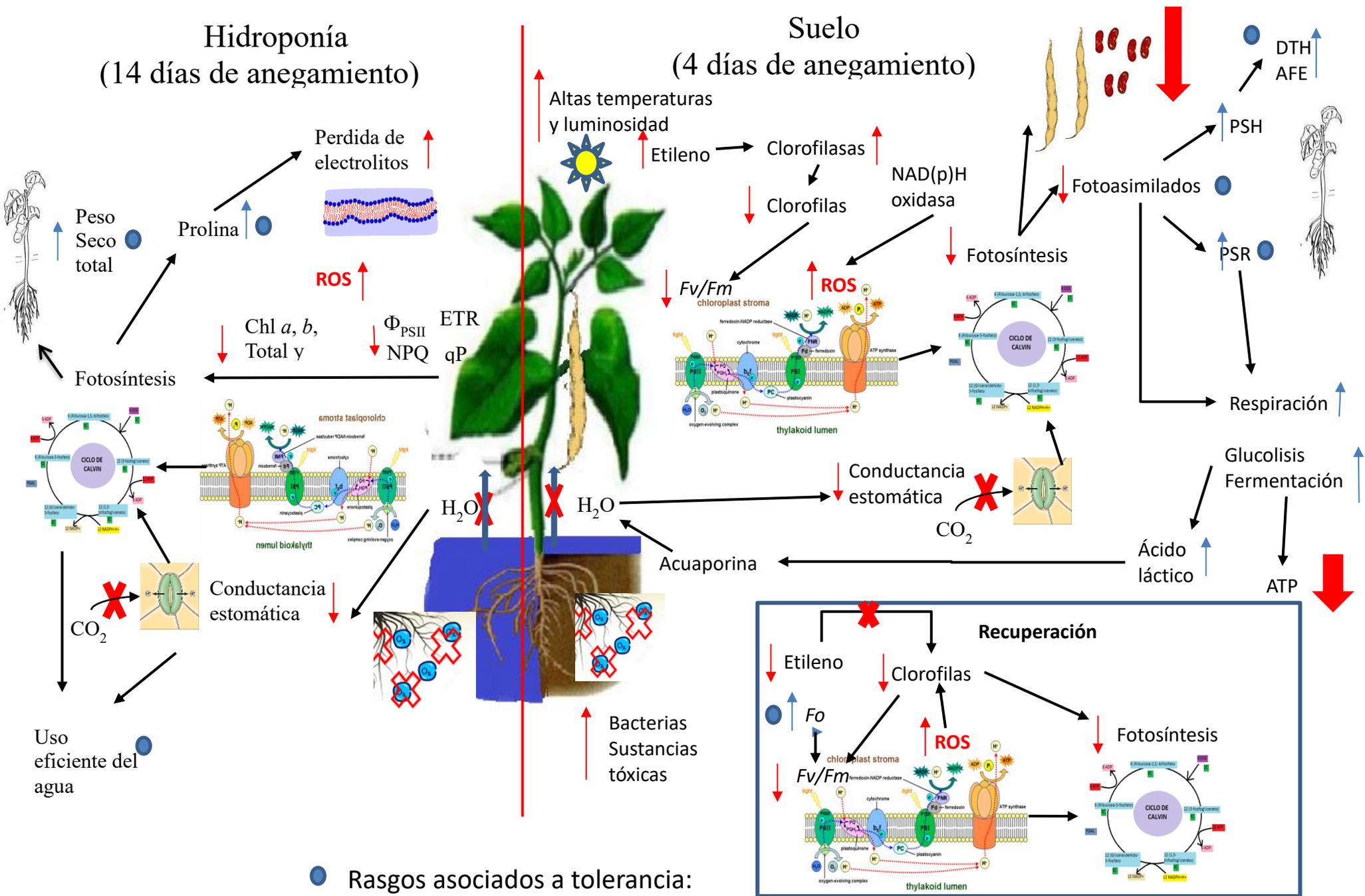


Figura 9. Modelo conceptual de las respuestas de plantas de frijol arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L.) a condiciones de anegamiento

## 8. Bibliografía

Adams, W., Demmig-Adams, B., Verhoeven, A., 1995. "Photoinhibition" during winter stress: involvement of sustained xanthophyll cycle-dependent energy dissipation. *Funct. Plant.*

Ahmed, S., Nawata, E., Sakuratani, T., 2006. Changes of endogenous ABA y ACC, y their correlations to photosynthesis y water relations in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczak cv. KPS1) during waterlogging. *Environ. Exp. Bot.* 57, 278–284.

doi:10.1016/j.envexpbot.2005.06.006

Ahmed, S., Nawata, E., Sakuratani, T., 2002. Effects of Waterlogging at Vegetative y Reproductive Growth Stages on Photosynthesis, Leaf Water Potential y Yield in Mungbean. *Plant Prod. Sci.* 5, 117–123. doi:10.1626/pp.5.117

Alzate, A.C., 2009. Mapeo Institucional Actores relacionados con el abordaje del cambio climático en Colombia.

Anderson, J., Park, Y., Chow, W., 1997. Photoinactivation y photoprotection of photosystem II in nature. *Physiol. Plant.*

Armstrong, W., 1980. Aeration in higher plants. *Adv. Bot. Res.*

Bacanamwo, M., Purcell, L.C., 1999. Soybean Root Morphological y Anatomical Traits Associated with Acclimation to Flooding. *Crop Sci.* 39, 143.

doi:10.2135/cropsci1999.0011183X003900010023x

Bansal, R., Srivastava, J.P., 2015. Effect of waterlogging on photosynthetic y biochemical parameters in pigeonpea. *Russ. J. Plant Physiol.* 62, 322–327.

doi:10.1134/S1021443715030036

Belford, R., 1981. Response of winter wheat to prolonged waterlogging under outdoor conditions. *J. Agric. Sci.*

Boru, G., Ginkel, M. Van, Kronstad, W., Boersma, L., 2001. Expression y inheritance of tolerance to waterlogging stress in wheat. *Euphytica*.

Boru, G., Vantoai, T., Alves, J., Hua, D., Knee, M., 2003a. Responses of soybean to oxygen deficiency y elevated root-zone carbon dioxide concentration. *Ann. Bot.* 91, 447–453.

doi:10.1093/aob/mcg040

Boru, G., Vantoai, T., Alves, J., Hua, D., Knee, M., 2003b. Responses of soybean to oxygen deficiency y elevated root-zone carbon dioxide concentration. *Ann. Bot.* 91, 447–453.

doi:10.1093/aob/mcg040

Bosabalidis, A.M., Kofidis, G., 2002. Comparati v e effects of drought stress on leaf anatomy of two oli v e culti v ars 163.

Bradford, K., 1983. Effects of soil flooding on leaf gas exchange of tomato plants. *Plant Physiol.*

Cai, S., Cao, Y., Fang, X., 1995. Studies on the variability y combining ability of waterlogging tolerance in common wheat. *Jiangsu J. Agric. Sci.*

Cannell, R., Belford, R., Gales, K., Thomson, R., 1984. Effects of waterlogging y drought on

- winter wheat y winter barley grown on a clay y a sandy loam soil. *Plant Soil*.
- Cao, Y., Cai, S., Zhu, W.W., Fang, X., 1995. Studies on Genetle Features of Waterlogging Tolerance in Wheat. *Jiangsu J.*
- Celik, G., Turhan, E., 2011. Genotypic variation in growth y physiological responses of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings to flooding. *African J. Biotechnol.* 10, 7372–7380. doi:10.5897/AJB11.500
- CEPAL, 2012. Valoración de daños y pérdidas ola invernol en Colombia 2010-2011 240.
- Chacón S, M.I., Pickersgill, B., Debouck, D.G., 2005. Domestication patterns in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) y the origin of the Mesoamerican y yeon cultivated races. *Theor. Appl. Genet.* 110, 432–44. doi:10.1007/s00122-004-1842-2
- Christianson, J., Llewellyn, D., Dennis, E., Wilson, I., 2010. Global Gene Expression Responses to Waterlogging in Roots y Leaves of Cotton (*Gossypium hirsutum* L.).
- Claussen, W., 2005. Proline as a measure of stress in tomato plants. *Plant Sci.*
- Collaku, A., Harrison, S., 2005. Heritability of waterlogging tolerance in wheat. *Crop Sci.*
- Collaku, A., Harrison, S.A., 2002. Losses in Wheat Due to Waterlogging Approved for publication by the Director of the LAES as manuscript no. 01-09-220. . *Crop Sci.* 42, 444–450. doi:10.2135/cropsci2002.4440
- Davies, F., Flore, J., 1986. Flooding, gas exchange y hydraulic root conductivity of highbush blueberry. *Physiol. Plant.*
- de San Celedonio, R.P., Abeledo, L.G., Miralles, D.J., 2014. Identifying the critical period for

waterlogging on yield y its components in wheat y barley. *Plant Soil* 1–13.

doi:10.1007/s11104-014-2028-6

Dell'Amico, J., Torrecillas, a, Rodríguez, P., Morales, D., Sánchez-Blanco, M.J., 2001.

Differences in the effects of flooding the soil early y late in the photoperiod on the water relations of pot-grown tomato plants. *Plant Sci.* 160, 481–487.

Farquhar, G.D., Sharkey, T.D., 1982. Stomatal Conductance y Photosynthesis. *Annu. Rev. Plant*

*Physiol.* 33, 317–345. doi:10.1146/annurev.pp.33.060182.001533

Federación Nacional de Cultivadores de Cereales y Leguminosas (FENALCE), 2015. Área,

Produccion y Rendimiento Cereales y Leguminosas 2015 A.

Flórez-Velasco, N., Balaguera-López, H.E., Restrepo-Díaz, H., 2015. Effects of foliar urea

application on lulo (*Solanum quitoense* cv. septentrionale) plants grown under different waterlogging y nitrogen conditions. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 186, 154–162.

doi:10.1016/j.scienta.2015.02.021

Galmés, J., Abadía, A., Cifre, J., Medrano, H., Flexas, J., 2007. Photoprotection processes under

water stress y recovery in Mediterranean plants with different growth forms y leaf habits.

*Physiol. Plant.* 130, 495–510. doi:10.1111/j.1399-3054.2007.00919.x

Hamilton, E., Heckathorn, S., 2001. Mitochondrial adaptations to NaCl. Complex I is protected

by anti-oxidants y small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline y betaine. *Plant Physiol.*

Huang, B., Johnson, J., 1995. Root respiration y carbohydrate status of two wheat genotypes in

- response to hypoxia. *Ann. Bot.*
- Huang, B., Johnson, J., Nesmith, S., 1994. Growth, physiological y anatomical responses of two wheat genotypes to waterlogging y nutrient supply. *Exp. Bot.*
- Ikeda, T., S, H., T, K., S, S., 1954. Studies on the wet-injury resistance of wheat y barley varieties. (I) Studies on the method of testing wet-injury resistance of wheat y barley varieties - Google Académico. *Japanese Bull. Div. Plant Breed. Cultiv.* 1, 21–26.
- Irfan, M., Hayat, S., Hayat, Q., Afroz, S., Ahmad, A., 2010. Physiological y biochemical changes in plants under waterlogging. *Protoplasma* 241, 3–17. doi:10.1007/s00709-009-0098-8
- Jackson, M., Drew, M., 1984. Effects of flooding on growth y metabolism of herbaceous plants - Google Académico. *Flooding y plant growth* 1, 47–128.
- Jackson, M.B., HERMAN, B., GOODENOUGH, A., 1982. An examination of the importance of ethanol in causing injury to flooded plants. *Plant. Cell Environ.* 5, 163–172.  
doi:10.1111/1365-3040.ep11571590
- Jones, H.G., 2013. *Plants y Microclimate: A Quantitative Approach to Environmental Plant Physiology.*
- Jung, G., Matsunami, T., Oki, Y., Kokubun, M., 2008. Effects of Waterlogging on Nitrogen Fixation y Photosynthesis in Supernodulating Soybean Cultivar Kanto 100. *Plant Prod. Sci.* 11, 291–297. doi:10.1626/pp.11.291
- Kim, Y.-H., Hwang, S.-J., Waqas, M., Khan, A.L., Lee, J.-H., Lee, J.-D., Nguyen, H.T., Lee, I.-J., 2015. Comparative analysis of endogenous hormones level in two soybean (*Glycine max*

- L.) lines differing in waterlogging tolerance. *Front. Plant Sci.* 6, 1–13.  
doi:10.3389/fpls.2015.00714
- Koivuniemi, A., Aro, E., yersson, B., 1995. Degradation of the D1-and D2-proteins of photosystem II in higher plants is regulated by reversible phosphorylation. *Biochemistry.*
- Kozłowski, T., 1997. Responses of woody plants to flooding y salinity. *Tree Physiol.*
- Kozłowski, T., 1984. Extent, causes, y impact of flooding. *Flooding y plant growth.*
- Kumar, P., Dube, S., Chauhan, V., 1998. Relationship among yield y some physiological traits in wheat. *Indian J. plant Physiol.*
- Kumar, P., Pal, M., Joshi, R., Sairam, R.K., 2013. Yield, growth y physiological responses of mung bean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] genotypes to waterlogging at vegetative stage. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 19, 209–220. doi:10.1007/s12298-012-0153-3
- Lakitan, B., Wolfe, D., Zobel, R., 1992. Flooding affects snap bean yield y genotypic variation in leaf gas exchange y root growth response. *J.*
- Li, H., Vaillancourt, R., Mendham, N., 2008. Comparative mapping of quantitative trait loci associated with waterlogging tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Bmc.*
- Liu, Y., Tang, B., Zheng, Y., Ma, K., Xu, S., Qiu, F., 2010. Screening Methods for Waterlogging Tolerance at Maize (*Zea mays* L.) Seedling Stage. *Agric. Sci. China* 9, 362–369.  
doi:10.1016/S1671-2927(09)60105-X
- Lopez, M., Rosario, D. Del, 1983. Performance of tomatoes (*Lycopersicon lycopersicum* (L.) Karsten) under waterlogged condition. *Philipp. J. Crop Sci.*

- 
- Malik, A., Colmer, T., Lambers, H., Setter, T., 2002. Short-term waterlogging has long-term effects on the growth y physiology of wheat. *New.*
- Maxwell, K., 2000. Chlorophyll fluorescence--a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51, 659–668.  
doi:10.1093/jexbot/51.345.659
- McKersie, B., Lesheim, Y., 2013. Stress y stress coping in cultivated plants.
- Meena, K.C., Rao, S., Gontia, A.S., Upadhyaya, A., Rao, S.K., 2015. Physiological performance of pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] genotypes after recovery from waterlogging. *Indian J. Plant Physiol.* 20, 162–166. doi:10.1007/s40502-015-0146-7
- Najeeb, U., Atwell, B.J., Bange, M.P., Tan, D.K.Y., 2015. Aminoethoxyvinylglycine (AVG) ameliorates waterlogging-induced damage in cotton by inhibiting ethylene synthesis y sustaining photosynthetic capacity. *Plant Growth Regul.* 76, 83–98. doi:10.1007/s10725-015-0037-y
- Nguyen, V., Vuong, T., VanToai, T., Lee, J., 2012. Mapping of quantitative trait loci associated with resistance to y flooding tolerance in soybean. *Crop.*
- Nguyen, L. Van, Takahashi, R., Githiri, S., 2017. Mapping quantitative trait loci for root development under hypoxia conditions in soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Theor. Appl. Nutricional*, A.Y., 2011. FAO Naciones Unidas.
- Oosterhuis, D., Scott, H., Wullschleger, S., 1990. Photosynthetic y yield responses of two soybean cultivars to flooding. *Arkansas farm.*
- Ou, L., Dai, X., Zhang, Z., Zou, X., 2011. Responses of pepper to waterlogging stress.

Photosynthetica.

- Peng, L., Ma, J., Chi, W., Guo, J., Zhu, S., Lu, Q., Lu, C., Zhang, L., 2006. LOW PSII ACCUMULATION1 is involved in efficient assembly of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 18, 955–69. doi:10.1105/tpc.105.037689
- Pociecha, E., Kościelniak, J., Filek, W., 2008. Effects of root flooding y stage of development on the growth y photosynthesis of field bean (*Vicia faba* L. minor). *Acta Physiol. Plant.* 30, 529–535. doi:10.1007/s11738-008-0151-9
- Ponnamperuma, F., 1972. The chemistry of submerged soils. *Adv. Agron.*
- Rahmani, H.A., Räsänen, L.A., Afshari, M., Lindström, K., 2011. Genetic diversity y symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. grown in soils of Iran. *Appl. Soil Ecol.* 48, 287–293.
- Rao, R., Li, Y., 2003. Management of Flooding Effects on Growth of Vegetable y Selected Field Crops. *Horttechnology* 13, 610–616.
- Reyna, N., Cornelious, B., Shannon, J., 2003. Evaluation of a QTL for waterlogging tolerance in southern soybean germplasm. *Crop.*
- Richardson, A.D., Duigan, S.P., Berlyn, G.P., 2002. An evaluation of noninvasive methods to estimate\rfoliar chlorophyll content. *New Phytol.* 153, 185–194. doi:10.1046/j.0028-646X.2001.00289.x
- Sairam, R.K., Dharmar, K., Chinnusamy, V., Lekshmy, S., Joshi, R., Bhattacharya, P., 2011. NADPH oxidase as the source of ROS produced under waterlogging in roots of mung bean.

- Biol. Plant. 55, 741–746. doi:10.1007/s10535-011-0179-3
- Sairam, R.K., Kumutha, D., Ezhilmathi, K., Deshmukh, P.S., Srivastava, G.C., Physiology, P., Agricultural, I., Delhi-, N., 2008. Physiology y biochemistry of waterlogging tolerance in plants. Biol. Plant. 52, 401–412. doi:10.1007/s10535-008-0084-6
- Santander, D., Carolina, M., Herrera, P., Rueda, A., Pinzón, C., Sánchez, J., 2012. variabilidad climática y cambio climático entre campesinos del centro de Santander , Colombia \*
- Perceptions on Climate Variability y Climate Change Among Farmers in Central Santander , Colombia Perceptions sur les phénomènes de la variabilité et du chan.
- Sasidharan, R., Voesenek, L., 2015. Ethylene-mediated acclimations to flooding stress. Plant Physiol.
- Schobert, B., Tschesche, H., 1978. Unusual solution properties of proline y its interaction with proteins. Biochim. Biophys. Acta (BBA)-General.
- Scott, H., DeAngulo, J., Daniels, M., 1989. Flood duration effects on soybean growth y yield. Agronomy.
- Setter, T., Bhekasut, P., Greenway, H., 2010. Desiccation of leaves after de-submergence is one cause for intolerance to complete submergence of the rice cultivar IR 42. Funct. Plant Biol.
- Setter, T., Burgess, P., Waters, I., Kuo, J., 1999. Genetic diversity of barley y wheat for waterlogging tolerance in Western Australia. Proc. 9th.
- Setter, T.L., Waters, I., 2003. Review of prospects for germplasm improvement for waterlogging tolerance in wheat, barley y oats. Plant Soil 253, 1–34. doi:10.1023/A:1024573305997

- Setter, T.L., Waters, I., 2003. Review of prospects for germplasm improvement for waterlogging tolerance in wheat, barley y oats. *Plant Soil* 253, 1–34. doi:10.1023/A:1024573305997
- Shangguan, Z., Shao, M., Dyckmans, J., 2000. Effects of nitrogen nutrition y water deficit on net photosynthetic rate y chlorophyll fluorescence in winter wheat. *J. Plant Physiol.* 156, 46–51. doi:10.1016/S0176-1617(00)80271-0
- Shao, G.C., Lan, J.J., Yu, S.E., Liu, N., Guo, R.Q., She, D.L., 2013. Photosynthesis y growth of winter wheat in response to waterlogging at different growth stages. *Photosynthetica* 51, 429–437. doi:10.1007/s11099-013-0039-9
- Sims, D.A., Gamon, J.A., 2002. Relationships between leaf pigment content y spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures y developmental stages. *Remote Sens. Environ.* 81, 337–354. doi:10.1016/S0034-4257(02)00010-X
- Singh, B., Tucker, K., Sutton, J., 1991. Flooding reduces gas exchange y growth in snap bean.
- Singh, N.T., Vig, A.C., Singh, R., 1985. Nitrogen response of maize under temporary flooding. *Fertil. Res.* 6, 111–120. doi:10.1007/BF01051005
- Smethurst, C., Garnett, T., Shabala, S., 2005. Nutritional y chlorophyll fluorescence responses of lucerne (*Medicago sativa*) to waterlogging y subsequent recovery. *Plant Soil*.
- Smethurst, C.F., Garnett, T., Shabala, S., 2005. Nutritional y chlorophyll fluorescence responses of lucerne (*Medicago sativa*) to waterlogging y subsequent recovery. *Plant Soil* 270, 31–45. doi:10.1007/s11104-004-1082-x
- Smith, M., Ager, P., 1988. Effects of soil flooding on leaf gas exchange of seedling pecan trees.

HortScience.

Stolwijk, J., Thimann, K., 1957. On the Uptake of Carbon Dioxide y Bicarbonate by Roots, y Its Influence on Growth. *Plant Physiol.*

Striker, G., 2012. Flooding stress on plants: anatomical, morphological y physiological responses.

Sun, J., Gu, J., Zeng, J., Han, S., Song, A., Chen, F., Fang, W., Jiang, J., Chen, S., 2013. Changes in leaf morphology, antioxidant activity y photosynthesis capacity in two different drought-tolerant cultivars of chrysanthemum during y after water stress. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 161, 249–258. doi:10.1016/j.scienta.2013.07.015

Szabados, L., Savoure, A., 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* 15, 89–97. doi:10.1016/j.tplants.2009.11.009

Takahashi, S., Badger, M.R., 2011. Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. *Trends Plant Sci.* 16, 53–60. doi:10.1016/j.tplants.2010.10.001

Takele, A., McDavid, C.R., 1994. Effects of short-term waterlogging on cultivars of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. *Trop. Agric.* 71, 275–280.

Tan, W., Liu, J., Dai, T., Jing, Q., Cao, W., Jiang, D., 2008. Alterations in photosynthesis y antioxidant enzyme activity in winter wheat subjected to post-anthesis water-logging. *Photosynthetica* 46, 21–27. doi:10.1007/s11099-008-0005-0

Tournaire-Roux, C., Sutka, M., Javot, H., Gout, E., Gerbeau, P., Luu, D.-T., Bligny, R., Maurel, C., 2003. Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of

- aquaporins. *Nature* 425, 393–397. doi:10.1038/nature01853
- Trung, B.C., Yoshida, S., Kobayashi, Y., 1985. Influence of excess soil moisture on the nitrogen nutrition y grain productivity of mungbean. *Japan J. Crop Sci.* 1, 79–83.
- Umaharan, P., Ariyanayagam, R., Haque, S., 1997. Effect of short-term waterlogging applied at various growth phases on growth, development y yield in *Vigna unguiculata*. *J.*
- Waldhoff, D., Furch, B., Junk, W., 2002. Fluorescence parameters, chlorophyll concentration, y anatomical features as indicators for flood adaptation of an abundant tree species in Central Amazonia: *Environ. Exp. Bot.*
- White, J., Singh, S., Schoonhoven, A., 1991. Breeding for adaptation to drought. *beans Res.* ....
- Wilson, P.J., Thompson, K., Hodgson, J.G., 1999. Specific leaf area y leaf dry matter content as alternative predictors of plant strategies. *New Phytol.* 143, 155–162. doi:10.1046/j.1469-8137.1999.00427.x
- Wollenweber, B., Porter, J., 2003. Lack of Interaction between Extreme High-Temperature Events at Vegetative y Reproductive Growth Stages in Wheat. *J. Agron.*
- Xu, M., Ma, H., Zeng, L., Cheng, Y., Lu, G., Xu, J., Zhang, X., 2015. The effect of waterlogging on yield y seed quality at the early flowering stage in *Brassica napus* L. *F. Crop.*
- Yang, Q., Fan, C., Guo, Z., Qin, J., Wu, J., Li, Q., Fu, T., Zhou, Y., 2012. Identification of FAD2 y FAD3 genes in *Brassica napus* genome y development of allele-specific markers for high oleic y low linolenic acid contents. *Theor. Appl. Genet.* 125, 715–729. doi:10.1007/s00122-012-1863-1

- 
- Zhang, J., Liang, J., Wong, M., 1995. The effect of high CO<sub>2</sub> y low O<sub>2</sub> concentrations in simulated landfill gas on the growth y nodule activity of *Leucaena leucocephala*. *Plant cell Physiol.*
- Zhao, H., Zhao, Y., Zhang, C., 2014. Growth, leaf gas exchange, y chlorophyll fluorescence responses of two cultivars of *Salix integra* Thunb. to waterlogging stress. *J. Agric. ....*
- Zheng, C., Jiang, D., Liu, F., Dai, T., Jing, Q., Cao, W., 2009. Effects of salt y waterlogging stresses y their combination on leaf photosynthesis, chloroplast ATP synthesis, y antioxidant capacity in wheat. *Plant Sci.* 176, 575–582. doi:10.1016/j.plantsci.2009.01.015
- Zhu, M., Li, F., Shi, Z., 2016. Morphological y photosynthetic response of waxy corn inbred line to waterlogging. *Photosynthetica.*