



Revista Colombiana de Biotecnología

ISSN: 0123-3475

revcbib\_bog@unal.edu.co

Universidad Nacional de Colombia

Colombia

Moreno-Bermúdez, Leonardo J.; Reyes, Maritza; Rodríguez, Mayelín; Kosky, Rafael G.;  
Roque, Berkis; Chong-Pérez, Borys

Respuesta de cultivares de Musa spp. al estrés hídrico in vitro inducido con  
polietilenglicol 6000

Revista Colombiana de Biotecnología, vol. XIX, núm. 2, julio-diciembre, 2017, pp. 75-85

Universidad Nacional de Colombia

Bogotá, Colombia

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77654661008>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

# Respuesta de cultivares de *Musa* spp. al estrés hídrico *in vitro* inducido con polietilenglicol 6000

## Responses of *Musa* spp. cultivars to *in vitro* water stress induced with polyethylene glycol 6000

Leonardo J. Moreno-Bermúdez<sup>\*,1</sup>, Maritza Reyes<sup>\*\*</sup>, Mayelín Rodríguez<sup>\*\*</sup>, Rafael G. Kosky<sup>\*\*\*</sup>, Berkis Roque<sup>\*\*\*\*</sup>, Borys Chong-Pérez<sup>\*\*\*\*\*,1</sup>

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.60405

### RESUMEN

Los plátanos y bananos son cultivos sensibles al déficit hídrico. Las sequías cada vez más prolongadas sugieren la necesidad de obtener plantas tolerantes a este factor; la selección temprana de estas plantas, comparada con la selección en campo, permite ahorrar tiempo y trabajar con mayores volúmenes de individuos. Para ello es conveniente contar con cultivares patrones cuya respuesta al déficit hídrico *in vitro* sea favorable. El objetivo del presente trabajo fue determinar la respuesta de cultivares de *Musa* spp. con diferente composición genómica al estrés hídrico inducido *in vitro* con polietilenglicol 6000 (PEG-6000). Se estudiaron los cultivares 'Pelipita' (ABB), 'Manzano' (AAB) y 'Grande naine' (AAA). El estrés se indujo con 30 g/L de PEG-6000 en medio de cultivo semisólido de multiplicación. A los 30 días se evaluaron variables indicadoras de estrés morfológicas (altura y número de brotes por explante), fisiológicas (masa fresca y masa seca) y bioquímicas (contenido prolina, peróxido de hidrógeno y malondialdehído). En el cultivar 'Pelipita' se afectó solamente la altura de las plantas, mientras que en los demás se afectaron todas las variables excepto la masa seca en el 'Manzano'. En este último y en el 'Grande naine' se incrementó la prolina, el peróxido de hidrógeno y el malondialdehído, lo que evidenció un mayor estrés oxidativo y daño en las membranas celulares. Los cultivares estudiados, pudieran emplearse como controles de tolerancia ('Pelipita') y sensibilidad ('Grande naine' y 'Manzano') en la selección *in vitro* de plantas tolerantes a la sequía, en futuros programas de mejoramiento genético.

**Palabras clave:** bananos, PEG, plátanos, selección *in vitro*, sequía.

- 
- \* MSc. en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830. <sup>1</sup>Autor correspondencia: lmoreno@ibp.co.cu.
- \*\* MSc. en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, CP 54 830. maritza@ibp.co.cu; mayelin@ibp.co.cu.
- \*\*\* PhD. en Ciencias Agrícolas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, CP 54 830. (Dirección actual: Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar (ETICA Villa Clara) Autopista Nacional Km. 246, Ranchuelo, Villa Clara, Cuba. CP 53100). rafael.kosky@inicavc.azcuba.cu.
- \*\*\*\* Téc. Esp. en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830. berkis@ibp.co.cu.
- \*\*\*\*\* PhD. en Ciencias Agrícolas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, CP 54 830. (Dirección actual: Centro de Biotecnología de los Recursos Naturales, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Católica del Maule, Avda. San Miguel 3605, Talca, Chile). <sup>1</sup>Autor para correspondencia: boryschong@gmail.com.
-

## ABSTRACT

Bananas and plantains are crops very sensitive to water deficit. Increasingly prolonged drought condition suggests the need for tolerant plants to this factor. The early selection of these plants in *in vitro* conditions save time and allow working with large volumes of individuals. This requires having genotypes with favorable response to *in vitro* water deficit. The aim of this work was to determine the response of *Musa* spp. cultivars, with different genotype contribution, to *in vitro* water stress induced by polyethylene glycol 6000 (PEG-6000). Cultivars 'Pelipita' (ABB), 'Manzano' (AAB) and 'Grande naine' (AAA) were cultured in semisolid multiplication medium supplemented with PEG-6000 30 g/L. Different stress indicator traits were evaluated after 30 days (morphological: height and number of shoots per explant; physiological: fresh and dry weight; and biochemical: proline, hydrogen peroxide and malondialdehyde content). As results, osmotic stress affected only plant height in 'Pelipita' cultivar. However, in the other cultivars all variables were affected, except dry weight in 'Manzano'. Moreover cv. 'Grande naine' and 'Manzano' increased proline, hydrogen peroxide and malondialdehyde content. These results indicate that osmotic pressure could induce oxidative stress and cell membrane damages in these cultivars. The obtained results suggested that these genotypes could be used as a tolerant ('Pelipita') and sensitive ('Grande naine' and 'Manzano') controls in *in vitro* selection of drought-tolerant plants in future breeding programs.

**Key words:** bananas, drought, *in vitro* selection, PEG, plantains.

**Recibido:** agosto 16 de 2016

**Aprobado:** diciembre 5 de 2017

## INTRODUCCIÓN

Los plátanos y bananos (*Musa* spp.) se encuentran ampliamente distribuidos en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, donde tienen gran importancia nutricional, económica y social ya que son fuente de alimento, ingreso económico y empleo (Ramírez-Villalobos *et al.*, 2012). Según datos estadísticos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) la producción de estos cultivos para el año 2016 fue de aproximadamente 148.344.104 toneladas (FAOSTAT, 2017).

Al ser cultivos que se desarrollan en los trópicos están adaptados a buenas condiciones de humedad, necesitan por lo menos 25 mm de agua por semana, y para mantener una productividad óptima requieren de precipitaciones anuales de 2000-2500 mm uniformemente distribuidas a lo largo del año. Cuando las condiciones de riego son limitadas, la sequía constituye para ellos una de las principales causas de las pérdidas en los rendimientos agrícolas (Vanhove *et al.*, 2012).

En las últimas décadas como consecuencia del cambio climático se ha percibido un incremento en la temperatura global del planeta, lo cual ha provocado la incidencia de sequías prolongadas en las zonas productoras de plátanos y bananos. Esta problemática ha llevado a la comunidad científica a pensar en la necesidad de obtener nuevos genotipos tolerantes al déficit hídrico (Salazar *et al.*, 2014).

Los cultivares de *Musa* spp. que poseen mayor valor comercial son generalmente estériles, poliploides y se

propagan vegetativamente (Ravi *et al.*, 2013), por esta razón para su mejoramiento genético no resulta conveniente utilizar las técnicas clásicas. En su lugar, la biotecnología ofrece múltiples ventajas, entre ellas la selección *in vitro*, ya que permite ahorrar tiempo, recursos y trabajar con un mayor volumen de individuos. Además se plantea que existe una correlación entre las respuestas de las plantas en condiciones *in vitro* e *in vivo* (Mohamed *et al.*, 2000).

Para poder seleccionar en cultivares sensibles a la sequía, plantas que hayan adquirido tolerancia luego de haber transitado por un proceso de mejoramiento genético, es necesario conocer aspectos como el agente selectivo a emplear, las variables a determinar para detectar la tolerancia, y los cultivares a usar como referencia por su tolerancia y/o sensibilidad frente al estrés. En este sentido, como agentes selectivos para la detección de plantas tolerantes a estrés hídrico, han sido usadas en varios cultivos sustancias como la sacarosa, el manitol, el sorbitol y el PEG (Rai *et al.*, 2011). En *Musa* spp. esta última ha sido empleada por varios autores (Shekhawat *et al.*, 2011; Bidabadi *et al.*, 2012).

Como variables para detectar la tolerancia a estrés hídrico en varios cultivos incluidas las musáceas han sido utilizados indicadores del crecimiento vegetal, y del funcionamiento de procesos fisiológicos y bioquímicos. La relevancia de medir estos indicadores radica en las modificaciones que sufren ante la presencia de un estrés en la planta. Algunos de ellos son la altura de las plantas, la longitud de las raíces, el número de brotes por explante, las masas fresca y seca, el contenido relativo de agua, y los contenidos de prolina, malondial-

dehído y peróxido de hidrógeno entre otros (Mahmood *et al.*, 2012; Rustagi *et al.*, 2015; Tak *et al.*, 2017).

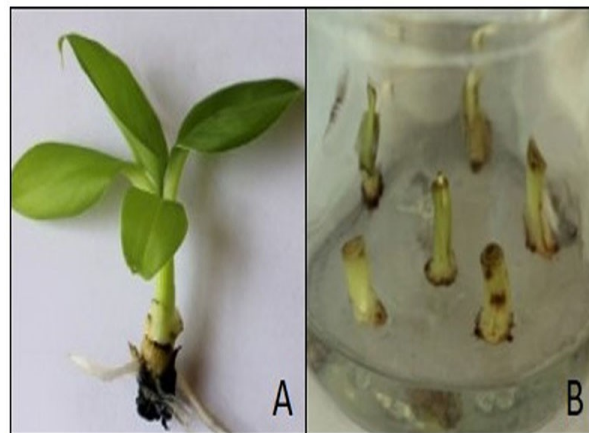
Por otro lado, se refiere que en *Musa* spp. los cultivares que poseen en su genoma la contribución de *M. balbisiana* (representado con la letra B), toleran mejor el déficit hídrico que aquellos que solamente tienen la contribución de *M. acuminata* (representado con la letra A) (Ravi *et al.*, 2013). Sin embargo, la mayoría de estos conocimientos se basan en la respuesta de las plantas en condiciones de campo o *in vivo*. Se encuentran escasos trabajos que muestran un análisis comparativo entre cultivares de plátanos y bananos con diferente composición genómica, en condiciones *in vitro* y ante escenarios de estrés hídrico inducido (Vanhove *et al.*, 2012). Investigaciones de este tipo podrían ser de gran utilidad en el momento de establecer un esquema de selección temprana, en el cual deba conocerse, qué respuesta a la sequía manifiestan *in vitro* aquellos cultivares que se decida emplear como controles de tolerancia y/o sensibilidad.

Teniendo en cuenta lo anterior, en la presente investigación se estudian tres cultivares de *Musa* spp. con diferente composición genómica: ‘Grande naine’ (AAA), ‘Pelipita’ (ABB) y ‘Manzano’ (AAB). Los dos primeros han sido estudiados en trabajos de este tipo por autores como Moreno-Bermúdez *et al.* (2014) y Moreno-Bermúdez *et al.* (2015). Sin embargo, la determinación de una mayor cantidad de variables indicadoras de estrés para cada uno, pudiera contribuir a comprender mejor su respuesta frente al déficit hídrico *in vitro*. Por otra parte, para el cultivar ‘Manzano’ no han sido informados resultados en esta temática. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la respuesta de los tres cultivares referidos frente al estrés hídrico *in vitro* inducido con PEG-6000.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se emplearon los cultivares de *Musa* spp. ‘Grande naine’ (AAA) y ‘Manzano’ (AAB) por poseer un alto valor comercial debido a las propiedades organolépticas de sus frutos. Además, se tuvo en cuenta el cultivar de plátano ‘Pelipita’ (ABB) con el objetivo de estudiar genotipos con un amplio rango de respuesta al estrés hídrico. Se usaron brotes provenientes de plantas *in vitro* que se encontraban en fase de multiplicación entre el tercer y el quinto subcultivo, propagadas vía organogénesis según el protocolo propuesto por Orellana (1994). Se seleccionaron plantas con tres o más hojas completamente expandidas (figura 1A), estas fueron cortadas por su parte superior aproximadamente a 1,0



**Figura 1.** A: planta *in vitro* de *Musa* spp. seleccionada para los experimentos de estrés hídrico. B: brotes *in vitro* de *Musa* spp. en el momento de la siembra en medio de cultivo semisólido de multiplicación suplementado con PEG-6000.

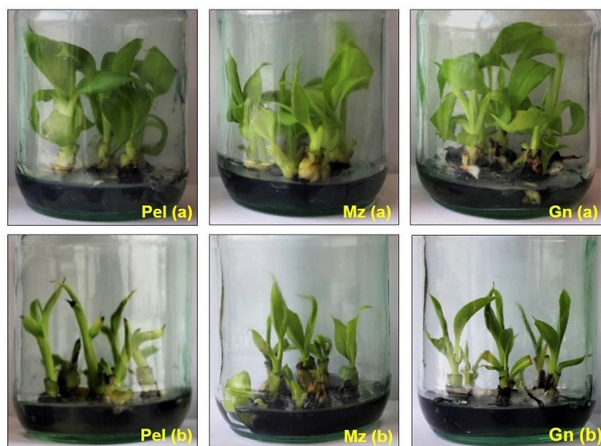
cm de longitud medido desde la base. También se eliminaron del pseudotallo las capas de hojas más externas hasta obtener un explante inicial de aproximadamente 0,5 cm de diámetro y 1,0 cm de altura; luego fueron colocados seis explantes por cada frasco de cultivo (figura 1B).

### Medios de cultivo

Se utilizó un medio de cultivo semisólido de multiplicación, compuesto por el 100% de las sales MS (Murashige & Skoog, 1962) (Duchefa, Holanda), tiamina 1,0 mg/L, 6-bencilaminopurina (6-BAP) 4,0 mg/L, ácido indolacético (AIA) 0,65 mg/L, mio-inositol 100 mg/L, ácido cítrico 50 mg/L, sacarosa 30 g/L y Gelrite® (Duchefa, Holanda) 2,8 g/L. Además, como agente inductor del estrés hídrico se adicionó PEG-6000 (Merck, Alemania) a una concentración de 30 g/L, seleccionada a partir de lo informado por Moreno-Bermúdez *et al.* (2014). El pH del medio de cultivo fue ajustado a 5,8 con NaOH 0,1 M y HCl 0,1 M, y se dosificó en frascos de cultivo de vidrio con capacidad total de 250 mL (30 mL/frasco). Posteriormente los frascos fueron esterilizados en autoclave a 121°C y 1,2 kg/cm<sup>2</sup> de presión durante 20 min según la información técnica de la firma Sigma-Aldrich (2012) (St. Louis City, Missouri, USA).

### Condiciones de cultivo

Los frascos de cultivo con los brotes fueron colocados en una cámara de crecimiento con luz solar con una intensidad de Flujo de Fotones Fotosintéticos entre 48-65  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , un fotoperíodo de 13 horas al día, y una temperatura de  $27 \pm 2$  °C. Los brotes se mantuvieron en estas condiciones durante 30 días.



**Figura 2.** Plantas *in vitro* de diferentes cultivares de *Musa* spp. no sometidas a estrés (a) y sometidas a estrés hídrico (b) inducido con PEG-6000 a los 30 días de cultivo. Pel y Mz: cultivares de plátano ‘Pelipita’ (ABB) y ‘Manzano’ (AAB) respectivamente, Gn: cultivar de banano ‘Grande naine’ (AAA).

### **Determinación de indicadores de estrés hídrico**

A los 30 días de cultivo se evaluaron variables morfológicas, fisiológicas y bioquímicas como indicadores de estrés hídrico.

#### *Morfológicos*

Se determinó el número de brotes por explante y la altura de la planta (cm) medida con una regla graduada desde la base de cada planta hasta el punto de inserción en el pseudotallo de la hoja más joven completamente expandida.

#### *Fisiológicos*

Se determinó la masa fresca (MF) (g) y la masa seca (MS) (g) de las plantas. La primera de estas variables se obtuvo tras pesar las plantas inmediatamente después de extraerlas de los frascos de cultivo. Para determinar la MS las plantas se secaron en la estufa a 60°C y se pesaron varias veces en el tiempo hasta mantener peso constante.

#### *Bioquímicos*

Se evaluaron tres indicadores bioquímicos correspondientes a: contenido de prolina y de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> los cuales se determinaron de acuerdo a lo descrito por Moreno-Bermúdez *et al.* (2014), y el contenido de malondialdehído (MDA) que se determinó según Wang *et al.* (2009).

#### *Diseño experimental y procesamiento estadístico*

Se tuvieron en cuenta dos tratamientos: plantas *in vitro* sometidas a estrés y plantas *in vitro* no sometidas a

estrés hídrico con PEG-6000. De cada tratamiento, para cada cultivar estudiado, se tuvieron en cuenta 12 réplicas; cada una estuvo conformada por un frasco de cultivo con seis plantas *in vitro*.

Para la determinación de las variables morfológicas y la MF se evaluaron 72 plantas, mientras que para la MS se evaluaron 24 plantas de cada cultivar para cada tratamiento respectivamente. Para determinar las variables bioquímicas fueron empleadas como material vegetal las plantas *in vitro* completas de ocho réplicas de cada cultivar para cada tratamiento. Las seis plantas de cada réplica se pulverizaron juntas en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C, para posteriormente tomar la cantidad necesaria para hacer las determinaciones. Estas se realizaron por espectrofotometría, con el uso de un espectrofotómetro GENESYS 6 (Thermo Electron Corporation (USA); Visionlite; Versión 2,1). Las determinaciones de los indicadores bioquímicos, para cada una de las réplicas de cada cultivar y tratamiento fueron realizadas tres veces.

Para el análisis estadístico se empleó el programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences) ver. 18,0 para Windows. Para el procesamiento de los resultados se comprobaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas por las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene respectivamente. Debido a que los datos no cumplieron con estos supuestos, para buscar diferencias entre los tratamientos se realizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para un intervalo de confianza del 95% ( $p < 0,05$ ). Las comparaciones para cada variable fueron realizadas entre ambos tratamientos para un mismo cultivar.

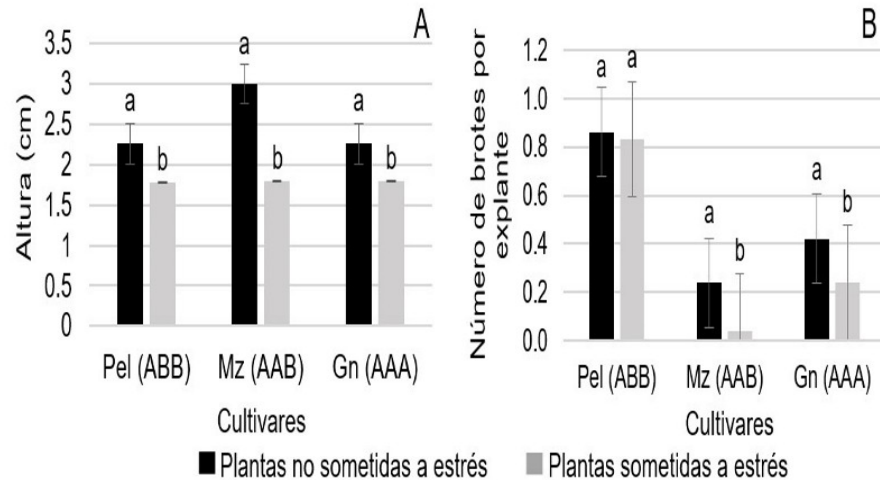
## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Determinación de indicadores de estrés hídrico**

#### *Morfológicos*

Se observó una disminución en la altura de las plantas de los tres cultivares estudiados sometidas a estrés hídrico con PEG-6000, cuando se compararon con las plantas no sometidas a estrés (figura 2). Estas diferencias comenzaron a notarse a partir de los 15 días de cultivo, y fueron significativas al finalizar el experimento a los 30 días (figura 3A). Por otro lado, el número de brotes por explante también disminuyó significativamente para el cultivar ‘Manzano’ en las plantas tratadas con PEG-6000 cuando se realiza la misma comparación (figura 3B).

Tanto la altura como el número de brotes por explante son variables que se relacionan con el crecimiento vegetal. Jaleel *et al.* (2009) plantean que el crecimiento es



**Figura 3.** Efecto del estrés hídrico inducido con PEG-6000 sobre la altura (A) y número de brotes por explante (B) de plantas *in vitro* de diferentes cultivares de *Musa* spp. a los 30 días de cultivo. Pel y Mz: cultivares de plátano ‘Pelipita’ (ABB) y ‘Manzano’ (AAB) respectivamente, Gn: cultivar de banano ‘Grande naine’ (AAA). Letras no comunes sobre barras indican diferencias significativas entre ambos tratamientos para un mismo cultivar según prueba de Mann-Whitney para  $p < 0,05$ . (n=72).

uno de los procesos que se ven afectados en las plantas a causa del estrés abiótico. Por otro lado, Surendar *et al.* (2013b) refieren que la altura de la planta es un importante indicador morfológico relacionado con el crecimiento y desarrollo de los cultivos, procesos que envuelven a su vez el crecimiento y desarrollo celular. Estos últimos consisten en la división, alargamiento y diferenciación de las células, y son muy sensibles al déficit hídrico por su dependencia con el grado de turgencia de las mismas (Wareing y Phillips, 1970).

De acuerdo con los criterios anteriores la disminución en la altura de las plantas para los tres cultivares estudiados, podría constituir una evidencia de su sensibilidad al déficit hídrico impuesto. Sin embargo, también se plantea que como consecuencia de la falta de agua, las plantas limitan su crecimiento para evitar o tolerar la deshidratación, lo cual constituye un mecanismo de defensa ante el estrés (Valladares *et al.*, 2004).

Por otra parte, la disminución en el número de brotes por el efecto del PEG-6000 significativa solo para el cultivar ‘Manzano’ podría ser indicativo de una mayor sensibilidad por parte de este a un déficit de agua. Esta respuesta pudiera deberse a su composición genómica, ya que a pesar de poseer la contribución de la especie *M. balbisiana*, Ravi *et al.* (2013) lo clasifican como sensible al estrés hídrico.

Una disminución en diferentes caracteres morfológicos de plantas de *Musa* spp. sometidas a estrés hídrico, tam-

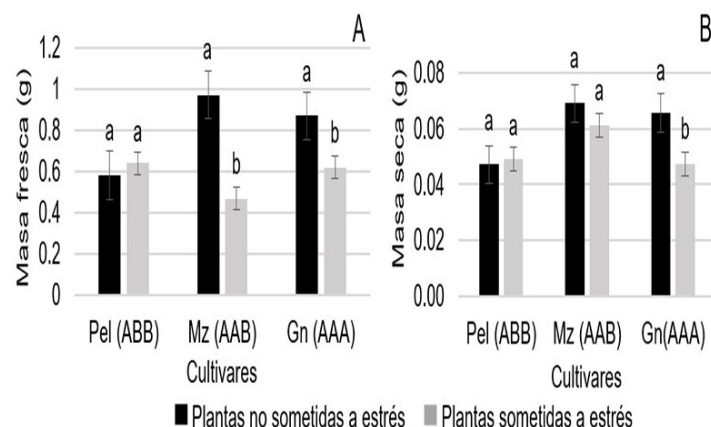
bién ha sido informada por otros autores, por ejemplo, Moreno-Bermúdez *et al.* (2014) en el cultivar ‘Grande naine’, Bidabadi *et al.* (2012) y Mahmood *et al.* (2012), en el cultivar ‘Berangan’ (AAA) sometido a estrés hídrico *in vitro* con PEG-6000. En cultivares de plátano con genotipo B, que como se mencionó con anterioridad se les atribuye una mejor tolerancia a la sequía, solo se han encontrado respuestas semejantes para las variables morfológicas aquí evaluadas, en condiciones *ex vitro*. Ejemplos de lo anterior son los estudios realizados por Ismail *et al.* (2004) en el cultivar ‘Pisang mas’ (ABB), y Surendar *et al.* (2013b) en los cultivares ‘Ney Poovan’ (AB), ‘Poovan’ (AAB), ‘Karpuravalli’ (ABB) y ‘Saba’ (ABB).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el presente trabajo para las variables morfológicas evaluadas, sería necesario el análisis de otras variables para llegar a una mejor conclusión sobre el grado de tolerancia o sensibilidad de los cultivares estudiados al estrés hídrico *in vitro*.

#### Fisiológicos

La MF no varió de manera significativa a causa del estrés en el cultivar ‘Pelipita’, sin embargo en el ‘Manzano’ y el ‘Grande naine’ se observó una reducción significativa en aquellas plantas crecidas en presencia del PEG-600, en comparación con las que crecieron en condiciones normales (Figura 4A). Por otra parte, la MS disminuyó significativamente solo para las plantas sometidas a estrés del cultivar ‘Grande naine’ (figura 4B).





**Figura 4.** Efecto del estrés hídrico inducido con PEG-6000 sobre la masa fresca (A) y la masa seca (B) de plantas *in vitro* de diferentes cultivares de *Musa* spp. a los 30 días de cultivo. Pel y Mz: cultivares de plátano ‘Pelipita’ (ABB) y ‘Manzano’ (AAB) respectivamente, Gn: cultivar de banano ‘Grande naine’ (AAA). Letras no comunes sobre barras indican diferencias significativas entre ambos tratamientos para un mismo cultivar según prueba de Mann-Whitney para  $p < 0,05$ . (A:  $n=72$ , B:  $n=24$ ).

La MF y la MS son variables que tienen implícito el factor biomasa, una disminución de estas puede indicar una menor cantidad de biomasa. La MF además, incluye la cantidad de agua en los tejidos de la planta, por lo que una disminución de la misma también refleja la dificultad de las plantas para estar hidratadas (Rodríguez & Leihner, 2006).

Teniendo en cuenta lo anterior, la afectación de la MF en las plantas de ‘Manzano’ y ‘Grande naine’ sometidas a estrés, sugiere una sensibilidad por parte de estos cultivares al déficit hídrico *in vitro*, por la dificultad para producir biomasa. Si se tiene en cuenta que en el cultivar ‘Grande naine’ también se afectó de manera negativa la MS, pudiera asumirse que la sensibilidad fue mayor que en el ‘Manzano’. Por otro lado, el hecho de que para el cultivar ‘Pelipita’ ninguna de estas dos variables se haya modificado de manera significativa por el estrés (figura 4A y B), pudiera indicar que las plantas tratadas con el PEG-6000 fueron capaces de tolerarlo.

Los resultados de este acápite concuerdan con lo informado por Ravi *et al.* (2013), quienes clasifican al ‘Manzano’ y al ‘Grande naine’ susceptible y altamente susceptible al déficit hídrico respectivamente. Por otra parte, también en el trabajo referido se clasifica al grupo genómico ABB, al cual pertenece el ‘Pelipita’, como tolerante al factor abiótico evaluado. Estos autores basan su clasificación en observaciones realizadas en el ambiente *ex vitro*. Los resultados del presente trabajo muestran que en condiciones *in vitro*, los cultivares evaluados res-

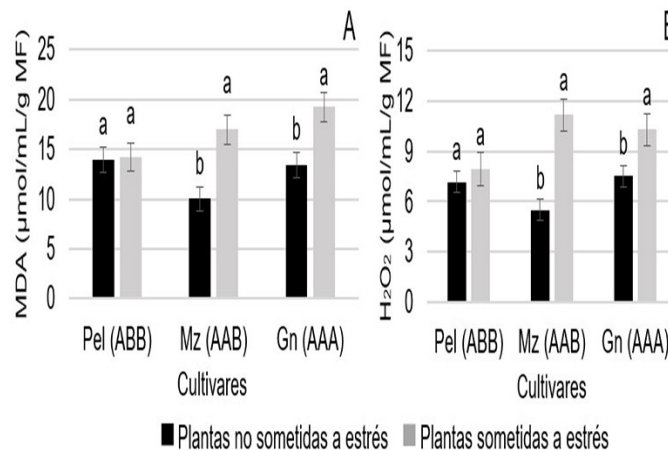
ponden de manera similar. Adicionalmente, Moreno-Bermúdez *et al.* (2015), le confieren al cultivar ‘Pelipita’ tolerancia al estrés hídrico, tras evaluar la variable fisiológica “contenido de agua” en condiciones *in vitro*.

Por otro lado, Placide *et al.* (2012), obtuvieron resultados similares a los del presente trabajo en las variables MF y MS, tras evaluar la respuesta de diferentes cultivares de *Musa* spp. al estrés hídrico *in vitro*. Estos autores estudiaron los cultivares ‘Lep Chang’ (BBB), ‘Cachaco’ (ABB), ‘Popoulou’ (AAB), ‘Obino l’Ewai’ (AAB), ‘Williams’ (AAA), y ‘Mbwazirume’ (AAA). Los resultados mostraron que los cultivares en los cuales ambas variables fisiológicas se afectaron en menor medida, fueron los de mayor contribución de *M. balbisiana* (‘Cachaco’ y ‘Lep Chang’), por el contrario, el más afectado fue el ‘Mbwazirume’, y en el resto la afectación de estas y otras variables fue intermedia. De igual manera Bidabadi *et al.* (2012) y Mahmood *et al.* (2012) observaron una reducción de la MF en plantas de ‘Berangan’ sometidas a estrés hídrico con 30 g/L PEG-6000 como en el presente estudio.

#### Bioquímicos

##### Contenido de Malondialdehído (MDA)

Se observó un aumento significativo del contenido de MDA en las plantas sometidas a estrés de los cultivares ‘Manzano’ y ‘Grande naine’ cuando se comparan con las plantas no tratadas con PEG-6000 respectivamente. Para el cultivar ‘Pelipita’ no se observaron diferencias



**Figura 5.** Efecto del estrés hídrico inducido con PEG-6000 en el contenido de malondialdehído (MDA) (A) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (B) de plantas *in vitro* de diferentes cultivares de *Musa* spp. a los 30 días de cultivo. Pel y Mz: cultivares de plátano ‘Pelipita’ (ABB) y ‘Manzano’ (AAB) respectivamente, Gn: cultivar de banano ‘Grande naine’ (AAA). Letras no comunes sobre barras indican diferencias significativas entre ambos tratamientos para un mismo cultivar según prueba de Mann-Whitney para  $p < 0,05$ . ( $n=24$ ).

significativas en el contenido de este indicador entre plantas de ambos tratamientos (figura 5A).

El MDA es un indicador de daños celulares causados por estrés oxidativo, este es el producto final de la peroxidación lipídica, proceso que hace referencia a la degradación oxidativa de los lípidos tras sucesivas reacciones en cadena, ocasionadas por los radicales libres generados ante situaciones de estrés. Este proceso afecta el complejo de membranas de la célula, por lo que puede incidir de manera negativa en procesos celulares tales como la respiración (cuando afecta las membranas mitocondriales) y la fotosíntesis (cuando afecta las membranas de los tilacoides en los cloroplastos) (Mahouachi *et al.*, 2005). Por tanto, aquellas plantas sometidas a estrés en las que no se observa un incremento en los niveles de MDA, presentan una mayor capacidad para tolerar tal condición.

De acuerdo con las explicaciones anteriores, los resultados presentados en la figura 5A sugieren que se produjo una afectación a las membranas celulares de las plantas sometidas a estrés tanto para el cultivar ‘Manzano’ como para el ‘Grande naine’. En cambio, el resultado obtenido para el cultivar ‘Pelipita’ sugiere que no se produjeron tales daños producto del déficit hídrico. Estos resultados pueden relacionarse entonces con una tolerancia del ‘Pelipita’ y una sensibilidad del ‘Manzano’ y el ‘Grande naine’ al factor abiótico estudiado bajo las condiciones evaluadas.

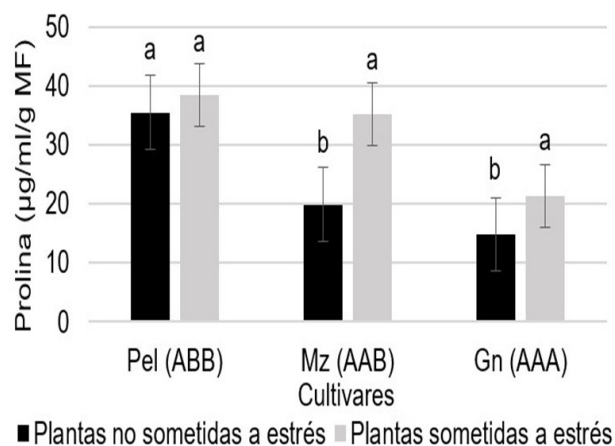
Otros estudios como este en *Musa* spp. también han informado la presencia de daños a nivel de membranas celulares producto de un estrés hídrico *in vitro*. Por ejemplo, Moreno-Bermúdez *et al.* (2014), en el cultivar de banano ‘Grande naine’, Shekhawat & Ganapathi (2014) y Tak *et al.* (2017), en el cultivar de plátano ‘Rasthali’ (AAB) y Chai *et al.* (2005), y Rustagi *et al.* (2015), en los cultivares de banano ‘Berangan’ y ‘Matti’ (AA) respectivamente. En todos estos casos se relacionó el aumento en los contenidos de MDA con una sensibilidad al estrés, y aquellas plantas cuyos valores de MDA no se incrementaron de manera significativa fueron consideradas más tolerantes.

#### Contenido de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )

Se observó un incremento significativo del contenido de  $H_2O_2$  en las plantas sometidas a estrés de los cultivares ‘Manzano’ y ‘Grande naine’ cuando se comparan con las plantas no tratadas con PEG-6000. En las plantas del cultivar ‘Pelipita’ no se observaron diferencias significativas cuando se comparan ambos tratamientos. (Figura 5B).

El  $H_2O_2$  está considerado como una especie reactiva del oxígeno (ERO) conjuntamente con el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el radical hidroxilo (OH) y el oxígeno en estado de singlete ( $^1O_2$ ) (Puthur, 2016). En condiciones normales las células vegetales producen ERO continuamente como subproductos de varias rutas metabólicas localizadas en diferentes compartimentos celulares (cloroplastos, mitocondrias y microcuerpos), pero a un





**Figura 6.** Efecto del estrés hídrico inducido con PEG-6000 en el contenido de prolina de plantas *in vitro* de diferentes cultivares de *Musa* spp. a los 30 días de cultivo. Pel y Mz: cultivares de plátano ‘Pelipita’ (ABB) y ‘Manzano’ (AAB) respectivamente, Gn: cultivar de banano ‘Grande naine’ (AAA). Letras no comunes sobre barras indican diferencias significativas entre ambos tratamientos para un mismo cultivar según prueba de Mann-Whitney para  $p < 0,05$ . (n=24).

nivel bajo en el que son rápidamente eliminadas por los diferentes sistemas antioxidantes y no provocan daño celular (Tadeo & Gómez-Cárdenas, 2008). En condiciones de estrés la producción de este tipo de compuestos se eleva drásticamente y daña diferentes biomoléculas estructurales de la célula como el ADN, las proteínas y a los lípidos de las membranas a través de la peroxidación lipídica (Rai *et al.*, 2011).

Teniendo en cuenta lo anterior, el incremento significativo en el contenido de  $H_2O_2$ , observado en los cultivares ‘Manzano’ y ‘Grande naine’ producto del déficit hídrico, sugiere un mayor estrés oxidativo que pudo resultar en un mayor daño a las membranas celulares. Esto último lo corrobora el incremento en el contenido de MDA discutido con anterioridad, significativo también para estos dos cultivares (figura 5A). Estos resultados, por tanto, demuestran la sensibilidad del ‘Manzano’ y ‘Grande naine’ al estrés ocasionado por el PEG-6000. Por otra parte la respuesta observada para el cultivar ‘Pelipita’ en el contenido de  $H_2O_2$ , de igual manera que para los indicadores anteriores donde no se observó variación significativa entre ambos tratamientos, pudo deberse a la tolerancia de este cultivar a las condiciones de estrés osmótico a las que fue sometido.

Aumentos en el contenido de  $H_2O_2$  en plantas de *Musa* spp. sometidas a estrés hídrico *in vitro* han sido también observados por varios autores, por ejemplo, Shekhawat *et al.* (2011), en el cultivar de plátano y ‘Rasthali’ y Bida-

badi *et al.* (2012) en banano cv. ‘Berangan’. En todos estos estudios, como en el presente, los incrementos en el contenido de  $H_2O_2$  estuvieron acompañados de incrementos en los contenidos de MDA, y ambos se han relacionado con una sensibilidad de las plantas a la falta de agua.

#### Contenido de prolina

Se observó un incremento significativo del contenido de prolina en las plantas sometidas a estrés, comparadas con aquellas crecidas en ausencia de PEG-6000 para los cultivares ‘Grande naine’ y ‘Manzano’. En el cultivar ‘Pelipita’ se observó una tendencia al aumento de este indicador debido al déficit hídrico, sin embargo no hubo diferencias significativas entre ambos tratamientos. (Figura 6).

La respuesta en el contenido de este aminoácido fue similar a la observada para el resto de los indicadores bioquímicos en los tres cultivares. Los incrementos de  $H_2O_2$  y MDA en el ‘Grande naine’ y el ‘Manzano’ demostraron un mayor daño por estrés oxidativo y a las membranas celulares respectivamente. Lo anterior fue interpretado como una muestra de su sensibilidad al estrés por sequía. Por tanto, pudiera decirse que los incrementos de prolina, significativos también solo para estos dos cultivares, se relacionan en estos casos con la sensibilidad al déficit de agua.

Incrementos en el contenido de prolina pueden ocurrir debido a la hidrólisis de las proteínas bajo condiciones de estrés hídrico (Kramer & Boyer, 1983). Por otro lado, como se mencionó con anterioridad, las proteínas son biomoléculas que pueden resultar dañadas ante un déficit de agua por la acción de ERO como el  $H_2O_2$  (Rai *et al.*, 2011). Teniendo en cuenta estos criterios, en el presente estudio los incrementos de la concentración de  $H_2O_2$  pudieron ocasionar un daño a las proteínas, lo cual pudo provocar su hidrólisis, y como consecuencia, ocurrir el aumento en el contenido de prolina libre. lo anterior explicaría la respuesta observada para esta variable. Parra corroborar lo anteriormente argumentado se pudiera tener en cuenta en futuros experimentos la determinación del contenido de proteínas totales, usada también como indicador de tolerancia o sensibilidad a estrés hídrico por autores como Surendar *et al.* (2013a).

Otra explicación a lo observado para el contenido de prolina en los cultivares ‘Grande naine’ y ‘Manzano’, podría ser que el aminoácido haya tenido que incrementarse, como una necesidad para contrarrestar el déficit de agua al que estaban sometidos. Según Tadeo y Gómez-Cárdenas (2008), esta molécula es un com-

puesto osmoprotector y un soluto compatible con el funcionamiento celular con la función de conferir estabilidad estructural a las membranas. También se le atribuyen funciones como la captura de ERO y el mantenimiento del potencial redox celular (Hare *et al.*, 1998; Peleg y Blumwald, 2011). No obstante, a pesar del incremento de prolina probablemente como un mecanismo de defensa ante el estrés osmótico, los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y MDA se mantuvieron elevados. Esto demuestra que en el 'Grande naine' y el 'Manzano' la condición impuesta no pudo ser contrarrestada, y corrobora su sensibilidad.

En el cultivar 'Pelipita' no se observaron diferencias significativas para este indicador entre ambos tratamientos. Esta misma respuesta para el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y MDA fue interpretada como una prueba de la tolerancia de este cultivar al estrés al que fue sometido. De acuerdo con lo anterior, el resultado obtenido para el contenido de prolina en este caso, se pudiera relacionar con una manifestación de tolerancia al estrés hídrico. Es posible que en el 'Pelipita' no existiera la necesidad de incrementar los niveles de prolina de manera significativa, por su capacidad para soportar el déficit de agua a la concentración de PEG-6000 utilizada. Este resultado concuerda con lo informado por Tsoata *et al.* (2015), quienes demostraron que bajos contenidos de prolina son indicadores de una mejor tolerancia al estrés por sequía.

En *Musa* spp. la determinación del contenido de prolina ha sido útil para identificar plantas tolerantes al déficit hídrico (Mahmood *et al.*, 2012; Sreedharan *et al.*, 2013). En estos estudios se han relacionado los incrementos de este aminoácido con una tolerancia al estrés, contrario a lo observado en el presente trabajo. Sin embargo, el rol de la prolina ante un déficit hídrico es una cuestión controversial, ya que existen criterios diversos y no se ha llegado a un consenso en este sentido. (Reyes *et al.*, 2012; Florido & Bao, 2014). Algunos autores asocian los incrementos con una tolerancia al estrés (Llano & Alcaraz, 2012; Lum *et al.*, 2014) y otros con una sensibilidad (Lamz *et al.*, 2013).

Los resultados de la presente investigación comprueban la relación que existe entre las respuestas de las plantas en condiciones *in vitro* e *in vivo*. Lo anterior lo corrobora el hecho de que los genotipos de *Musa* spp. estudiados en este trabajo, respondieron de manera similar a como se ha referido en la literatura científica, responden en condiciones naturales (Ravi *et al.*, 2013).

Por otra parte, la determinación de una mayor cantidad de variables indicadoras de estrés hídrico para los cultivares 'Grande naine' y 'Pelipita' en este trabajo, con

respecto a trabajos previos (Moreno-Bermúdez *et al.*, 2014, Moreno-Bermúdez *et al.*, 2015), contribuye a comprender mejor su respuesta al déficit de agua en condiciones *in vitro*. Los resultados obtenidos para el 'Manzano', además, constituyen los primeros informes para este último cultivar en la temática abordada.

## CONCLUSIONES

El cultivar de plátano 'Manzano' y el de banano 'Grande naine', mostraron sensibilidad a las condiciones de estrés impuestas, al verse afectadas en ellos de manera negativa la mayoría de las variables evaluadas. El cultivar de plátano 'Pelipita' toleró el déficit hídrico al que fue sometido en el presente estudio, ya que solamente se afectó en este caso la variable altura de la planta. Por la respuesta mostrada estos tres cultivares pudieran ser empleados como controles de referencia para la selección *in vitro* de plantas de *Musa* spp. tolerantes a la sequía, unido a la determinación de las variables masa fresca, masa seca, contenido de malondialdehído, peróxido de hidrógeno y prolina como indicadores de estrés.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bidabadi, S. S., Mahmood, M., Ghobadi, C., & Baninasab, B. (2012). Influence of salicylic acid on morphological and physiological responses of banana (*Musa acuminata* cv. 'Berangan', AAA) shoot tips to *in vitro* water stress induced by polyethylene glycol. *Plant Omics Journal*, 5(1), 33.
- Chai, T. T., Fadzillah, N. M., Kusnan, M., & Mahmood, M. (2005). Water stress-induced oxidative damage and antioxidant responses in micropropagated banana plantlets. *Biologia Plantarum*, 49(1), 153-156.
- FAOSTAT (2017). Food and Agriculture Organization of United Nations. Recuperado: Diciembre 1 de 2017 en: <http://faostat.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- Florido, B. M., & Bao, F. L. (2014). Tolerancia a estrés por déficit hídrico en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Cultivos tropicales*, 35(3), 70-88.
- Hare, P. D., Cress, W. A., & Van Staden, J. (1998). Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell & Environment*, 21(6), 535-553.
- Jaleel, C. A., Riadh, K., Gopi, R., Manivannan, P., Ines, J., Al-Juburi, H. J., Chang-Xing, Hong-Bo, Z. S., & Panneerselvam, R. (2009). Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31(3), 427-436.

- Kramer, P. J., & Boyer, J. S. (1983). Water Relations of Plants. New York, United States of America: Academic press, 489 pp.
- Lamz, P. A., Reyes, G. Y., & González C. M. C. (2013). Indicadores bioquímicos para la selección temprana de genotipos de arroz (*Oryza sativa* L.) con tolerancia a la salinidad. *Cultivos Tropicales*, 34(1), 11-17.
- Llano, S. J. M., & Alcaraz, M. L. (2012). Análisis de pigmentos, peroxidasa, prolina y proteínas de tres especies de *Paulownia* bajo estrés hídrico. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 3(9), 69-80.
- Lum, M. S., Hanafi, M. M., Rafii, Y. M., & Akmar, A. S. N. (2014). Effect of drought stress on growth, proline and antioxidant enzyme activities of upland rice. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 24(5), 1487-1493.
- Mahmood, M., Bidabadi, S. S., Ghobadi, C., & Gray, D. J. (2012). Effect of methyl jasmonate treatments on alleviation of polyethylene glycol-mediated water stress in banana (*Musa acuminata* cv. 'Berangan', AAA) shoot tip cultures. *Plant Growth Regulation*, 68(2), 161-169.
- Mahouachi, J., Gómez-Cadenas, A., Primo-Millo, E., & Talon, M. (2005). Antagonistic changes between abscisic acid and gibberellins in citrus fruits subjected to a series of different water conditions. *Journal of Plant Growth Regulation*, 24(3), 179-187.
- Mohamed, M. H., Harris, P. J. C., & Henderson, J. (2000). *In vitro* selection and characterisation of a drought tolerant clone of *Tagetes minuta*. *Plant Science*, 159(2), 213-222.
- Ismail, M. R., Yusoff, M. K., & Mahmood, M. (2004). Growth, water relations, stomatal conductance and proline concentration in water stressed banana (*Musa* spp.) plants. *Asian Journal of Plant Sciences*, 3(6), 709-713.
- Moreno-Bermúdez, L. J., Kosky, R. G., Reyes, M., Mbabazi, C., & Chong-Pérez, B. (2014). Respuesta de plantas *in vitro* de banano cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA) al estrés hídrico inducido con polietilenglicol. *Biotechnología Vegetal*, 14(1), 21-27.
- Moreno-Bermúdez L. J., Reyes, M., Kosky, R. G., Rodríguez M., & Chong-Pérez, B. (2015). Efecto del estrés hídrico inducido con PEG 6000 sobre el contenido de agua de plantas *in vitro* de *Musa* spp. 'Grande naine' (AAA) y 'Pelipita' (ABB). *Biotechnología Vegetal*, 15(4), 251-254.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Orellana, P. P. (1994). Tecnología para la micropropagación *in vitro* de clones de *Musa* spp. Tesis en opción del Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas, Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara-Cuba. 120 pp.
- Peleg, Z., & Blumwald, E. (2011). Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(3), 290-295.
- Placide, R., Christian, C. S., & Rony, S. (2012). Development of *in vitro* technique to screen for drought tolerant banana varieties by sorbitol induced osmotic stress. *African Journal of Plant Science*, 6(15), 16-425.
- Puthur, J. T. (2016). Antioxidants and cellular antioxidant mechanism in plants. *South Indian Journal of Biological Sciences*, 2(1), 14-17.
- Rai, M. K., Kalia, R. K., Singh, R., Gangola, M. P., & Dhanwan, A. K. (2011). Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection—an overview of the recent progress. *Environmental and Experimental Botany*, 71(1), 89-98.
- Ramírez-Villalobos, M., De García, E., & Lindorf, H. (2012). Análisis de patrones morfológicos y anatómicos en la embriogénesis somática del banano Williams (AAA). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 41-52.
- Ravi, I., Uma, S., Vaganan, M. M., & Mustaffa, M. M. (2013). Phenotyping bananas for drought resistance. *Frontiers in Physiology*, 4(9), 1-14.
- Reyes, Y., Martínez, L., Rosabal, L., Mazorra, L. M., Pieters, A., & Núñez, M. (2012). Efecto de la 24-epibrasinólida en el crecimiento, los niveles de prolina y de malondialdehído de plántulas de arroz (*Oryza sativa* L.) sometidas a estrés salino. *Cultivos Tropicales*, 33(1), 19-27.
- Rodríguez, W., & Leihner, D. (2006). Análisis del crecimiento vegetal. Fisiología de la producción de cultivos tropicales. San José, Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica. 37 pp.
- Rustagi, A., Jain, S., Kumar, D., Shekhar, S., Jain, M., Bhat, V., & Sarin, N. B. (2015). High efficiency transformation of banana [*Musa acuminata* L. cv. Matti (AA)] for enhanced tolerance to salt and drought stress through overexpression of a peanut salinity-induced pathogenesis-related class 10 protein. *Molecular Biotechnology*, 57(1), 27-35.
- Salazar, E., Trujillo, I., Macías, M. P., Gutiérrez, M. A., Castro, L., Vallejo, E., & Torrealba, M. (2014). Respuesta fisiológica al estrés hídrico de plantas de banano cv. 'Pineo gigante' (*Musa* AAA)

- regeneradas a partir de yemas irradiadas. *Biotecnología Vegetal*, 14(3), 155-162.
- Shekhawat, U. K. S., Srinivas, L., & Ganapathi, T. R. (2011). *MusaDHN-1*, a novel multiple stress-inducible SK3-type dehydrin gene, contributes affirmatively to drought and salt-stress tolerance in banana. *Planta*, 234(5), 915.
- Shekhawat, U. K. S., & Ganapathi, T. R. (2014). Transgenic banana plants overexpressing *MusaZIP53* display severe growth retardation with enhanced sucrose and polyphenol oxidase activity. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 116(3), 387-402.
- Sigma-Aldrich (2012) En: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma>. recuperado: 29 de Enero de 2015.
- Sreedharan, S., Shekhawat, U. K., & Ganapathi, T. R. (2013). Transgenic banana plants overexpressing a native plasma membrane aquaporin *MusaPIP1;2* display high tolerance levels to different abiotic stresses. *Plant Biotechnology Journal*, 11(8), 942-952.
- Surendar, K. K., Devi, D. D., Ravi, I., Jeyakumar, P., & Velayudham, K. (2013a). Water stress affects plant relative water content, soluble protein, total chlorophyll content and yield of Ratoon Banana. *International Journal of Horticulture*, 3(17), 96-103.
- Surendar, K. K., Devi, D. D., Ravi, I., Jeyakumar, P., Kumar, S. R., & Velayudham, K. (2013b). Studies on the impact of water deficit on plant height, relative water content, total chlorophyll, osmotic potential and yield of banana (*Musa* spp.) cultivars and hybrids. *International Journal of Horticulture*, 3(11), 52-60.
- Tadeo, F. R., & Gómez-Cadenas, A. (2008). Fisiología de las plantas y el estrés. Azcón-Bieto J., & Talón M., (Eds.), *Fundamentos de Fisiología Vegetal* (17-64). Madrid, España: McGraw-Hill/Interamericana.
- Tak, H., Negi, S., & Ganapathi, T. R. (2017). Banana NAC transcription factor *MusaNAC042* is positively associated with drought and salinity tolerance. *Protoplasma*, 254(2), 803-816.
- Tsoata, E., Njock, S. R., Youmbi, E., & Nwaga, D. (2015). Early effects of water stress on some biochemical and mineral parameters of mycorrhizal *Vigna subterranea* (L.) Verdc. (*Fabaceae*) cultivated in Cameroon. *International Journal of Agronomy and Agriculture Research (IJAAR)*, 7(2), 21-35.
- Valladares, F., Vilagrosa, A., Peñuelas, J., Ogaya, R., Camarero, J. J., Corcuera, L., Sisó, S., & Gil-Pelegrín, E. (2004). Estrés hídrico: ecofisiología y escalas de la sequía. Valladares F., (Ed.), *Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante* (163-190). Madrid, España: ERGRA, S.A.
- Vanhove, A. C., Vermaelen, W., Panis, B., Swennen, R., & Carpentier, S. C. (2012). Screening the banana biodiversity for drought tolerance: can an *in vitro* growth model and proteomics be used as a tool to discover tolerant varieties and understand homeostasis. *Frontiers in Plant Science*, 3, 1-10.
- Wang, F., Zeng, B., Sun, Z., & Zhu, C. (2009). Relationship between proline and  $Hg^{2+}$ -induced oxidative stress in a tolerant rice mutant. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 56(4), 723.
- Wareing, P. F., & Phillips I. D. J. (1970) The control and development in plants. Oxford, England: Pergamon Press. 410 pp.