

Efecto del déficit hídrico en la anatomía foliar de seis cultivares de poroto *Phaseolus vulgaris*

Effect of water stress on the leaf anatomy of six cultivars of the common bean
Phaseolus vulgaris

HERMAN SILVA ¹, JUAN P. MARTINEZ ², CECILIA BAGINSKY ² y MANUEL PINTO ²

¹ Laboratorio de Relación Suelo-Agua-Planta, ² Laboratorio de Bioquímica. Departamento de Producción Agrícola, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Casilla 1004, Santiago, Chile

RESUMEN

Se evaluó el efecto del déficit hídrico sobre la anatomía foliar de seis variedades de poroto *Phaseolus vulgaris* L. cultivados en la región centro-sur de Chile, en función del número y tamaño de tricomas, la densidad de estomas, las dimensiones de células oclusivas y del ostíolo en superficie adaxial y abaxial medidos en secciones tangenciales paralelas a la epidermis. Con el objeto de estimar la superficie de paredes celulares expuestas al intercambio gaseoso se evaluó la longitud, el diámetro y volumen celular del mesófilo. Los resultados demuestran que en condiciones de déficit hídrico se produce un aumento significativo de tricomas por unidad de superficie alrededor de un 35%, una disminución del volumen celular en un 26% y un aumento en el número de estomas por unidad de superficie de 25 a 150 en la superficie adaxial y de 167 a 216 estomas por mm². Esto último podría explicarse por el menor tamaño celular observado en las plantas sometidas a déficit hídrico. Además, en plantas estresadas se observó un aumento en el grosor del mesófilo de 207 a 282 µm y en consecuencia un aumento del peso foliar específico. Los cambios en las dimensiones celulares producen cambios importantes en la relación de áreas A^{mes}/A. Se concluye que los cultivares estudiados muestran plasticidad morfo-anatómica foliar ante la condición de estrés hídrico.

Palabras clave: *Phaseolus* sp., déficit hídrico, anatomía foliar, tejido fotosintético, relación de áreas.

ABSTRACT

The effect of water deficit on the leaf anatomy of six varieties of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) commonly grown in the Central-Southern region of Chile was evaluated by measuring the size and number of trichomes; the density of the stomata, the dimensions of the occlusive cells and stomatal pore in adaxial and abaxial leaf surfaces were measured in tangential sections. The length, diameter and volume of cells of spongy and palisade parenchyma tissue were evaluated in transverse and tangential sections with the purpose of estimating the surface of the cell walls exposed to the gaseous interchange (A^{mes}/A). The results showed an increase in the number of trichomes approximately 35% by unit of surface, a decrease in cell volume in 26% and an increase in the density of stomata of 25 to 150 in adaxial surface and 167 to 216 stomata by mm² in the abaxial surface. The latter could be explained by the smaller cell size in plants under water stress. In addition, stressed plants showed an increased thickness of the mesophyll from 207 to 282 µm, and consequently, an increased specific leaf weight. The changes in the cells dimensions resulted in important changes in the relation of areas (A^{mes}/A). It is concluded that the cultivars analyzed showed anatomical plasticity under water stress.

Key words: *Phaseolus* sp., water stress, anatomy, photosynthetic tissue, area ratio.

INTRODUCCION

Pocos estudios han analizado aspectos ecológicos y funcionales basados en la anatomía foliar, debido principalmente a la dificultad de relacionar ésta con la fisiología, la cual cambia en los distintos órganos de la planta. Por ello los estudios se han

enfocado a aspectos descriptivos. Sólo a partir de los trabajos de El-Sharkawi & Heskett (1965) posteriormente Nobel et al. (1975), Nobel (1980), Silva & Acevedo (1984), Nobel & Walker (1985) se ha reestablecido la estrecha dependencia de los cambios anatómicos y los cambios de carácter fisiológico.

La superficie foliar proporciona una interfase importante entre la planta y su medio contribuyendo significativamente al balance energético. La sobrevivencia de las plantas en ambientes estresantes puede depender de las características de su superficie y del espacio vital incluido entre ambas epidermis. La presencia de tricomas y el grosor cuticular pueden influir sobre la temperatura foliar y aumentar la resistencia al intercambio gaseoso de la capa límite cercana a la hoja, disminuyendo la transpiración y aumentando la eficiencia en el uso del agua (Van Rensburg et al. 1993; Grammatikopoulos & Manetas 1994). Es sabido que la temperatura foliar afecta la tasa transpiratoria a través de su influencia en la diferencia de concentración de vapor de agua entre la hoja y el aire externo (Smith & Nobel 1977).

El aumento o disminución en el número de estomas influye en la resistencia en fase gaseosa al flujo de CO_2 y agua. Buttery et al. (1993) han establecido una estrecha relación entre la densidad estomática y el déficit hídrico en poroto soya. El-Sharkawy & Heskett (1965) demostraron que en especies donde los estomas son escasos o están ausentes, la conductancia al intercambio gaseoso en la epidermis superior disminuye al igual que la fotosíntesis y transpiración. Nerkar et al. (1981) encontró una correlación entre densidad estomática y la conductancia foliar. Sin embargo, en dos genotipos de cebada que diferían en su frecuencia estomática, Jones (1976) encontró conductancias similares, probablemente porque en el genotipo con un menor número de estomas las dimensiones del ostiolo eran más grandes que en el genotipo con mayor número de estomas.

La disminución en la frecuencia estomática podría explicar una disminución de conductancia y esto reduciría la tasa de pérdida de agua (Slatyer 1967). Por lo tanto, una disminución de la conductancia (o aumento de la resistencia) también reduciría la tasa de fotosíntesis (Gaastra 1959; Jones 1976). La relación entre fotosíntesis y transpiración, conocida como eficiencia en el uso del agua (EUA) o eficiencia transpiracional (F/T), se utiliza como criterio de selección de especies, especial-

mente para zonas de pluviometría limitada (Fischer & Turner 1978, Condon & Richards 1992).

Las plantas difieren ampliamente en la sensibilidad de los estomas a la falta de agua. Esta variabilidad está parcialmente asociada con estrategias de adaptación basadas en: 1) evasión de la sequía, la que generalmente se encuentra en especies con alta sensibilidad estomática, o 2) tolerancia a la sequía, encontrada en especies con baja sensibilidad estomática, pero que poseen caracteres funcionales como el ajuste osmótico y/o morfológicos de adaptación (Picon et al. 1996).

Plantas cultivadas capaces de mantener sus estomas abiertos durante el estrés hídrico son más estables en términos de rendimiento (Venora & Calcagno 1991). En plantas de trigo creciendo bajo estrés hídrico las dimensiones de estomas abiertos constituyen un carácter útil para seleccionar genotipos tolerantes a la sequía. Las dimensiones del área estomática pueden ser utilizadas para seleccionar genotipos que pueden alcanzar altos rendimientos, con alta tasa transpiratoria en combinación con una fotosíntesis eficiente (Venora & Calcagno 1991).

Para interpretar cuantitativamente el efecto de la anatomía foliar sobre el intercambio gaseoso se necesita analizar el modelo de flujo de CO_2 y agua a nivel foliar. Una aproximación útil ha sido tratar las diversas etapas en el proceso como una serie de resistencias análogas a un circuito eléctrico (Nobel 1991), en que cada resistencia es asociada directa o indirectamente, a la estructura foliar. En estas condiciones el vapor de agua que va desde desde las células del mesófilo al medio externo debe atravesar espacios intercelulares, estomas, tricomas, cutícula y capa límite, flujo que depende de las dimensiones de cada compartimento a nivel foliar. De manera similar el influjo de CO_2 hasta los sitios de carboxilación es afectado por las mismas resistencias que se presentan para el vapor de agua, además de las resistencias en fase líquida que ofrecen las paredes y membranas celulares, y en el citoplasma la distancia que existe desde las membranas hasta los cloroplastos.

La anatomía foliar puede cambiar bajo condiciones de alta densidad de flujo radiativo (Silva et al. 1995) o por falta de agua (Ehleringer et al. 1981, Nobel 1980, Nobel & Walker 1985, Buttery et al. 1993). En diversas especies se ha demostrado que, en el caso del clorénquima, la estructura puede ser una característica fija o fenotípicamente plástica (Nobel & Walker 1985). Los cambios anatómicos foliares pueden influir en las características físicas o bioquímicas del intercambio gaseoso a nivel de las células del mesófilo (Strauss-Debenedetti & Berlyn 1994). Específicamente, la resistencia de los espacios intercelulares al intercambio gaseoso es directamente proporcional al grosor del mesófilo e inversamente proporcional a la fracción volumétrica del mesófilo ocupado por los espacios intercelulares. Las resistencias para CO_2 , dependen estrechamente de la relación de áreas A^{mes}/A , en que A^{mes} representa la superficie total de las células del mesófilo expuesta a los espacios intercelulares mientras que A es la superficie fotosintética total. Esta relación es definida como la superficie de paredes celulares de las células del mesófilo aprovechable para la asimilación de CO_2 por unidad de superficie foliar (Nobel, et al. 1975; Longstreth et al. 1980), la cual es función de las dimensiones celulares de las células del mesófilo (Nobel 1980, Silva 1982, Silva & Acevedo 1984, Silva 1990).

Los cambios en la estructura foliar como su grosor, las dimensiones celulares y la relación entre la superficie de las paredes celulares del clorénquima y la superficie de la sección de tejido (A^{mes}/A) sirven a la planta como adaptaciones a medios calurosos y secos (Nobel et al. 1975, Nobel 1980, Nobel & Walker 1985). La superficie de paredes celulares a través de la cual difunde el CO_2 es más grande que la superficie foliar considerada (El-Sharkawy & Heskett 1965, Nobel 1977). Esta relación de superficies representa la superficie efectiva de difusión para el CO_2 que influye sobre la fotosíntesis y sobre la EUA (Nobel 1980, Patton & Jones, 1989). Un aumento en la relación de áreas influye en la resistencia en fase líquida al flujo de CO_2 . La variación de esta relación está determinada prin-

cialmente por la temperatura, el nivel de radiación y el déficit hídrico.

Este trabajo forma parte de un estudio de los mecanismos adaptativos al estrés hídrico en especies de cultivo cuyo objetivo fue analizar el efecto del déficit hídrico en la anatomía foliar de seis variedades de *Phaseolus vulgaris* L. cultivados en la zona centro-sur de Chile. Estudios previos de la fluorescencia de la clorofila "a" en estas variedades demuestran que la condición de estrés hídrico no altera el funcionamiento del fotosistema II (Martínez 1996), y que la capacidad fotosintética, evaluada mediante la carboxilación, disminuye por efecto del tratamiento, en tres de seis variedades. De manera similar en el estudio de las relaciones hídricas se demuestra que cuatro de seis variedades se adaptan al déficit hídrico en función de cambios morfo-funcionales como es la elasticidad de paredes celulares (Martínez 1996). La mayor o menor capacidad fotosintética y las relaciones hídricas bajo condición de estrés hídrico podrían ser explicadas en función de los cambios anatómicos foliares.

MATERIALES Y METODOS

El trabajo se realizó en la Estación Experimental Agronómica Antumapu, perteneciente a la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, ubicada en la Región Metropolitana (30°13'S y 71°13'O). Los cultivares utilizados son originarios de la zona centro-sur del país. La elección de los cultivares se basó en la proyección económica y en el hábito de crecimiento. Así los cv Tórtola INIA y Coscorrón INIA son los más consumidos por la población; Pinto 114, Arroz tuscola y Orfeo INIA son principalmente de exportación; Barbucho es un cv. de tipo local consumido sólo en la zona sur (VIII Región).

Condiciones del cultivo

Las plantas se obtuvieron por siembra directa en condiciones de campo y los tratamientos hídricos se aplicaron una vez establecidas las plantas a partir del día 91.

Diseño experimental y análisis de resultados

El ensayo se realizó de acuerdo a un diseño al azar en experimento factorial, con dos tratamientos, seis subtratamientos y cuatro repeticiones. El tratamiento correspondió a la frecuencia de riego y los subtratamientos a los cultivares. La unidad experimental correspondió a la parcela con una dimensión de 3 m de ancho por 6,5 m de largo, y una separación entre hilera y número de plantas según el hábito de crecimiento del cultivar. Las parcelas eran de cinco hileras, siendo las tres centrales las que se evaluaron. Los tratamientos fueron: T1, tratamiento sin déficit hídrico con una frecuencia de riego de 7 días, con un total de riegos de 11 y un potencial hídrico de pre-alba promedio de $-0,56 \pm 0,03$ MPa durante el periodo reproductivo; y T2 tratamiento con déficit hídrico, correspondió a una frecuencia de riego de 21 días, con un total de 4 riegos y un potencial hídrico de pre-alba de $-0,78 \pm 0,02$ MPa durante la fase reproductiva. El potencial hídrico se midió con una cámara a presión tipo Scholander (Scholander et al. 1965). Por cada unidad experimental se tomaron cinco muestras foliares, colectadas al finalizar la etapa reproductiva en hojas trifoliadas completamente expandidas, provenientes de la parte media de la planta.

Los datos fueron procesados a través de un análisis de varianza de dos vías (ANDEVA) y la prueba de comparación múltiple de DUNCAN (Mcintosh 1983).

Análisis anatómico

Una vez seleccionados, los trozos de tejido fueron colocados bajo iluminación y a saturación en agua destilada durante 4 horas, para lograr la turgencia necesaria del tejido para la medición de estomas y dimensiones del ostiolo. Los cortes de aproximadamente 25 μm se realizaron en micrótopo de congelación y a mano alzada, posteriormente fueron montados en portaobjetos para las mediciones usando un microscopio fotónico (LEITZS) con un micrómetro ocular previamente calibrado para cada aumento. El número de campos (0.16 mm^2

cada uno) analizados fue de 16 por cada superficie, para cada cultivar (cuatro por planta). El estudio de las superficies adaxial y abaxial (dimensión, densidad de tricomas y estomas) se realizó mediante secciones tangenciales. Las dimensiones de tricomas y de las células del mesófilo se evaluaron en secciones transversales.

La longitud, el diámetro de las células y el grosor del mesófilo fueron medidos en secciones transversales. En función de la relación materia seca foliar y el área foliar se calculó el peso foliar específico, al finalizar el período experimental, expresado en g de materia seca foliar por m^2 de superficie foliar. Para determinar el área foliar se utilizó un medidor de área foliar LI-COR modelo LI-3050 y se secó el material a 70°C durante 48 horas. Las secciones tangenciales o paradérmicas y transversales permiten la construcción de un modelo tridimensional para estimar la relación de áreas (A^{mes}/A) (Turrell 1936). Esta se estimó en función de las dimensiones celulares en el tejido en empalizada y esponjoso, de acuerdo al modelo propuesto por Nobel (1980), Nobel & Walker (1985), en que las células del mesófilo se representan como cilindros con terminales hemisféricos en el tejido en empalizada y como esferas en el tejido esponjoso. El cálculo se realizó en función de las mediciones de las células del mesófilo, suponiendo una corrida de células del tejido en empalizada equivalente a tres capas celulares del tejido esponjoso, de acuerdo a metodología propuesta por Nobel (1980).

RESULTADOS

Efecto del déficit hídrico sobre el tejido epidérmico

Tricomas: Los cultivares analizados poseen tricomas en ambas superficies, los cuales están constituidos por dos células, con forma aguzada en su extremo terminal (Fig. 1). La longitud de tricomas en la superficie inferior es menor en comparación a la superficie superior (Tabla 1). El valor promedio de longitud de tricomas en la superficie adaxial y abaxial aumentó en

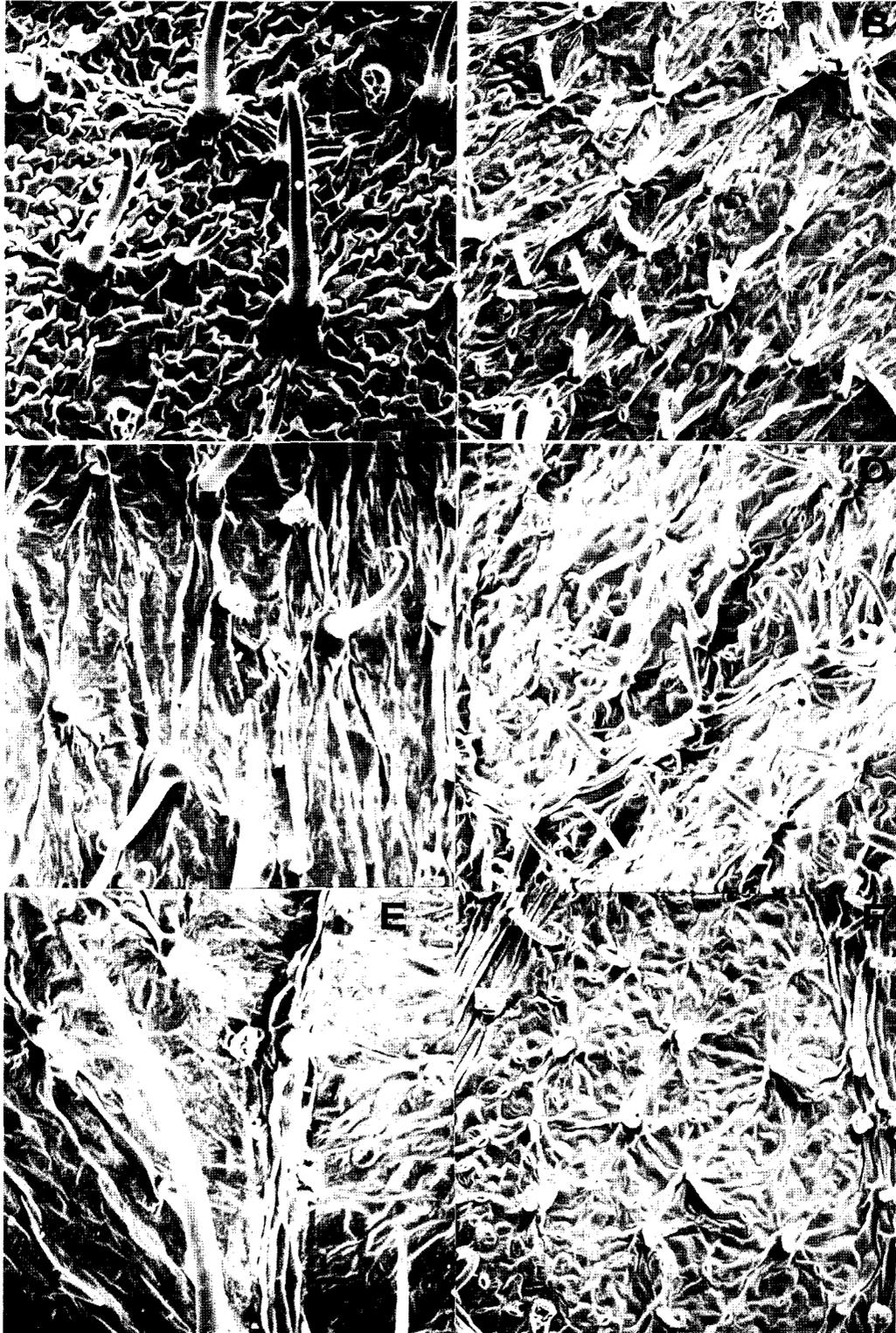


Fig. 1: Fotomicrografía electrónica al microscopio de barrido de la superficie adaxial y abaxial en Coscorrón (A-B), Tórtola (C-D) y Arroz (E-F). Se observa detalles de la estructura, longitud y densidad de tricomas. 1900 x.

Scanning electronic micrograph of adaxial and abaxial surface of cultivars Coscorrón (A-B), Tórtola (C-D) and Arroz (E-F) illustrating differences of structure, length and density of trichomes. 1900 x.

116 y 76%, respectivamente, por efecto del estrés hídrico. En la superficie adaxial, los seis cultivares presentaron incrementos significativos en longitud debido a la restricción hídrica, siendo Barbucho, Coscorrón y Pinto los que aumentaron en mayor proporción (Tabla 1). La longitud de tricomas en la superficie abaxial, en cuatro cultivares varió significativamente, siendo Coscorrón el que presentó la mayor diferencia con dimensiones de 77,3 a 201,3 μm en T1 y T2 respectivamente. La variedad cultivada Arroz Tuscola presentó en la superficie inferior la menor dimensión, con diferencias significativas en relación al resto de los cultivares.

En los cultivares estudiados, la densidad de los tricomas fue mayor en la superficie abaxial en relación a la superficie adaxial (Fig. 1, Tabla 1). El valor promedio de densidad de tricomas en la superficie superior, aumentó en 53% en comparación al 16% de aumento de la superficie inferior por efecto del déficit hídrico. En la superficie adaxial sólo el cultivar Barbucho presentó diferencias significativas de densi-

dad de los tricomas debido al efecto del déficit hídrico. Por otra parte, los valores de este parámetro en la superficie abaxial, sólo presentaron diferencias significativas en los cultivares Barbucho y Tórtola-INIA.

Estomas: En los seis cultivares se observó presencia de estomas en ambas epidermis, característica generalmente asociada a una mayor capacidad fotosintética en plantas desarrolladas en condiciones de suministro de agua adecuado (Fig. 2), pues favorece la difusión del CO_2 hacia las células del mesófilo en ambas superficies (Bolhâr et al. 1993).

De acuerdo a lo esperado, el número de estomas fue mayor en la superficie inferior en comparación a la superior, con valores promedios de 200 y 45 estomas por mm^2 respectivamente. Los valores registrados en la superficie superior muestran variación significativa por efecto de tratamiento en los seis cultivares ($P \leq 0,05$). En plantas del T1 los valores promedios fluctuaron entre 13 y 43 estomas por mm^2 , en cambio, en el T2 los valores variaron entre 40 y 70

TABLA 1

Longitud y densidad promedio de tricomas a nivel de la superficie adaxial y abaxial en plantas con alta (T1) y baja frecuencia de riego (T2) en seis cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. (n = 10) (Longitud: (σ superficie adaxial = 43,95%; (σ superficie abaxial = 12,86 % y densidad: (σ superficie adaxial = 70,15%; (σ superficie abaxial = 31,3 %)

Average length and frequency of trichomes in adaxial and abaxial surfaces in plants under high (T1) and low (T2) irrigation frequency of six cultivars of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)

Cultivar	Longitud (μm)				Densidad ($\text{N}^\circ \text{mm}^{-2}$)			
	Adaxial		Abaxial		Adaxial		Abaxial	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
Arroz	137,4 a ¹ A ²	151,1 d B	85,3 a A	99,3 a A	3,8 a A	8,0 b A	21,9 b A	16 cdA
Barbucho	102,7 c A	306,2 b B	98,4 a A	196,5 b B	8,2 a A	13,7 a B	14,7 c A	30,4 b B
Coscorrón	134,4 a A	316,8 a B	77,3 b A	201,3 b B	8,2 a A	8,7 b A	18,9 ab A	14,8 d A
Orfeo	128,7 ab A	272,5 c B	137,3 c A	193,0 b A	4,6 a A	5,7 b A	16,4 bc A	21,4 cd
Pinto	133,6 a A	323,1 a B	78,4 b A	138,8 b B	5,7 a A	9,1 b A	16,8 bc A	18,3 cd
Tórtola	123,0 b A	275,0 c B	97,5 a A	181,5 b B	4,4 a A	7,9 b A	32,2 a A	39,3 a B
Promedio	126,6	274,1	95,7	168,4	5,8	8,9	20,2	23,4

¹ Entre cultivares los valores promedios seguidos por la misma letra minúscula no son diferentes estadísticamente ($P \leq 0,05$).

² Para una frecuencia de riego (T1,T2), los valores promedios seguidos por la misma letra mayúscula no son diferentes ($P \leq 0,05$).

For given levels of soil moisture (T1 or T2), the averages followed by the capital letter are not statistically different, for a cultivar the averages followed by the same lower case letter are not significantly different ($P \leq 0,05$).

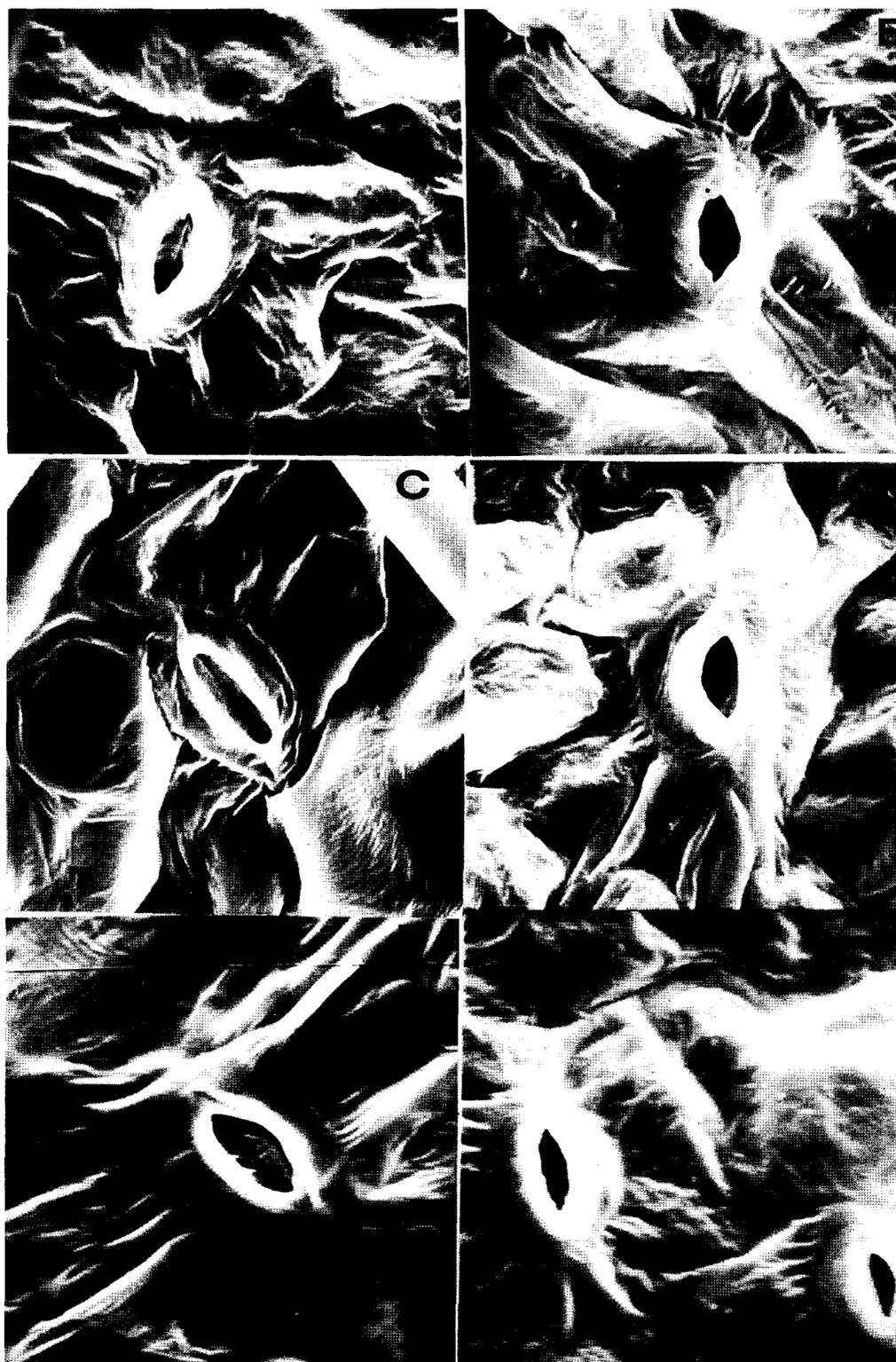


Fig. 2: Fotomicrografía electrónica al microscopio de barrido mostrando el efecto del déficit hídrico en la apertura de los estomas (A, C y E) en comparación a plantas regadas (B, D y F) in the abaxial surface of los cultivares Coscorrón, Tórtola y Arroz. 1900x.

Scanning electronic micrograph showing differences in the apertura of stomatal under low (A, C and E) and high irrigation frequency (B, D and F) in the abaxial surface of cultivars Coscorrón, Tórtola and Arroz . 1900x.

estomas por mm^2 (Fig. 3A). En la epidermis inferior de los cultivares Pinto 114 y Barbucho, no se detectó efecto de tratamiento, presentando un número similar de estomas cercanos a 250 y 136 por mm^2 respectivamente. Las otros taxas registraron un mayor número de estomas por unidad de superficie en plantas del T2 con diferencias estadísticas al nivel de $P \leq 0,05$. El cultivar Orfeo-INIA registró la mayor

densidad de estomas de 308 por mm^2 en T2 y 243 estomas por mm^2 en T1 (Fig. 3B).

El ancho máximo de las células oclusivas en la superficie adaxial (C) alcanzó un valor promedio de $23 \mu\text{m}$ y con diferencias significativas en cuatro de los seis cultivares por efecto del déficit hídrico, valores que permanecen sin grandes variaciones a nivel de la superficie abaxial (D) (Fig. 3).

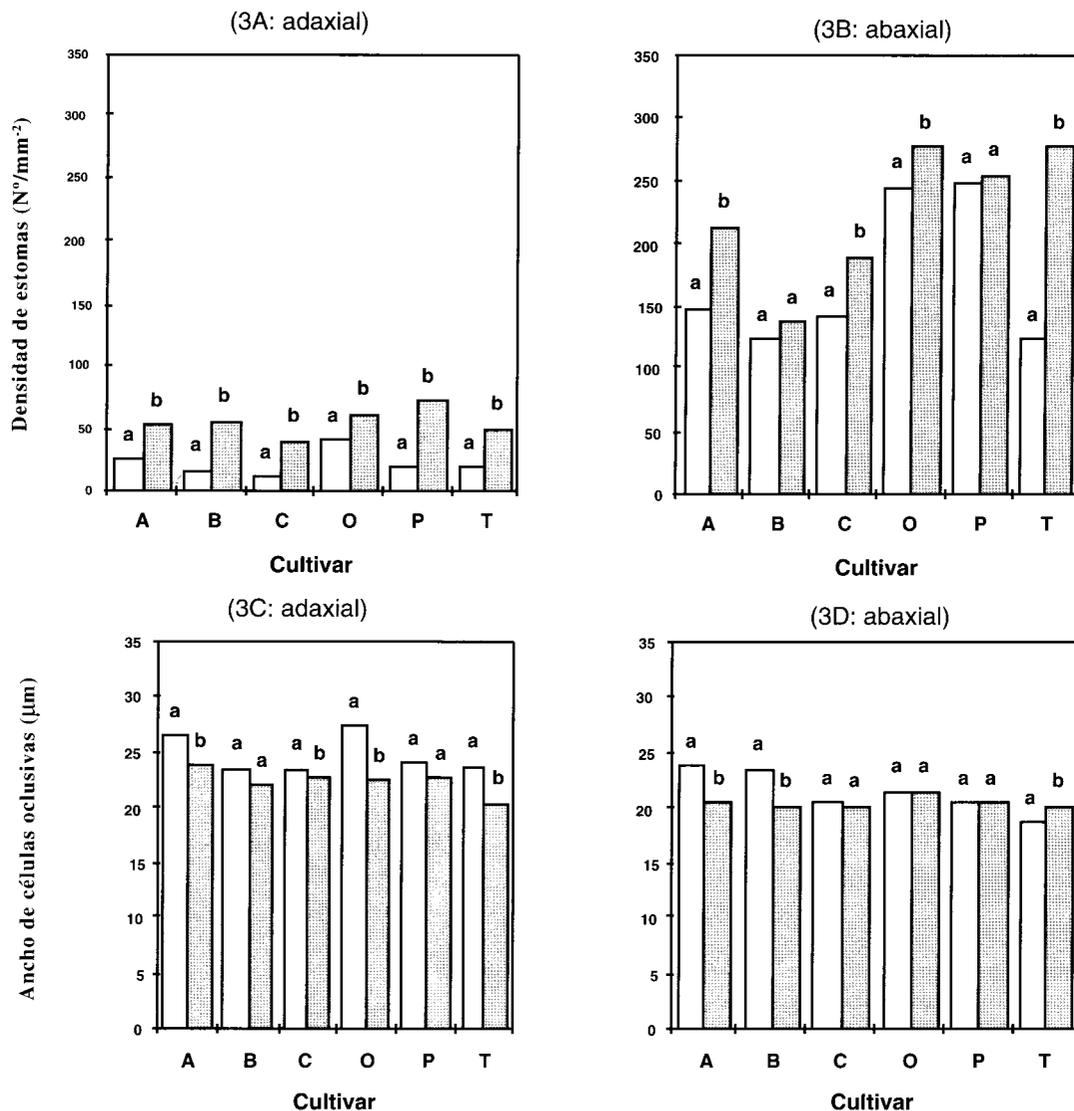


Fig. 3: Densidad de estomas ($\text{N}^{\circ} \text{mm}^{-2}$) (3A y 3B) y ancho de las células oclusivas (3C y 3D) en la superficie adaxial y abaxial en seis cultivares de frejol (*Phaseolus vulgaris* L. A: Arroz tuscola, B: Barbucho, C: Coscorrón, O: Orfeo, P: Pinto 114 y T: Tórtola), bajo dos frecuencias de riego. T1 (\square), T2 (\blacksquare). En cada cultivar letra minúscula diferente indica efecto del tratamiento ($P \leq 0,05$).

Stomatal frequency ($\text{N}^{\circ} \text{mm}^{-2}$) (3A - 3B) and width of occlusive cells (3C - 3D) of abaxial and adaxial surfaces in plant under high T1 and low (T2) irrigation frequency of six cultivars of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). For a cultivar the averages followed by the same lower case letter are not significantly different $P \leq 0,05$.

Ostíolo: La longitud del ostíolo de la superficie adaxial presentó una disminución significativa ($P \leq 0,05$) en cuatro de los seis cultivares por efecto tratamiento (Fig. 4A). Los valores del T1 fluctuaron en un rango de 14 a 9 μm y en el T2 entre 13 y 6 μm . En la Fig. 4B, se observa que la longitud del ostíolo a nivel de la superficie abaxial disminuye en promedio de 8,6 a 6,4 μm en

plantas del T1 y T2 respectivamente, por efecto del déficit hídrico, y con diferencias significativas en los cultivares Arroz Tuscola, Orfeo-INIA y Coscorrón-INIA.

El ancho de los ostíolos fue mayor en la superficie abaxial (Figura 4D) en comparación a la superficie adaxial (Figura 4C). El cultivar Pinto 114 fue el único que presentó diferencias significativas en el ancho de

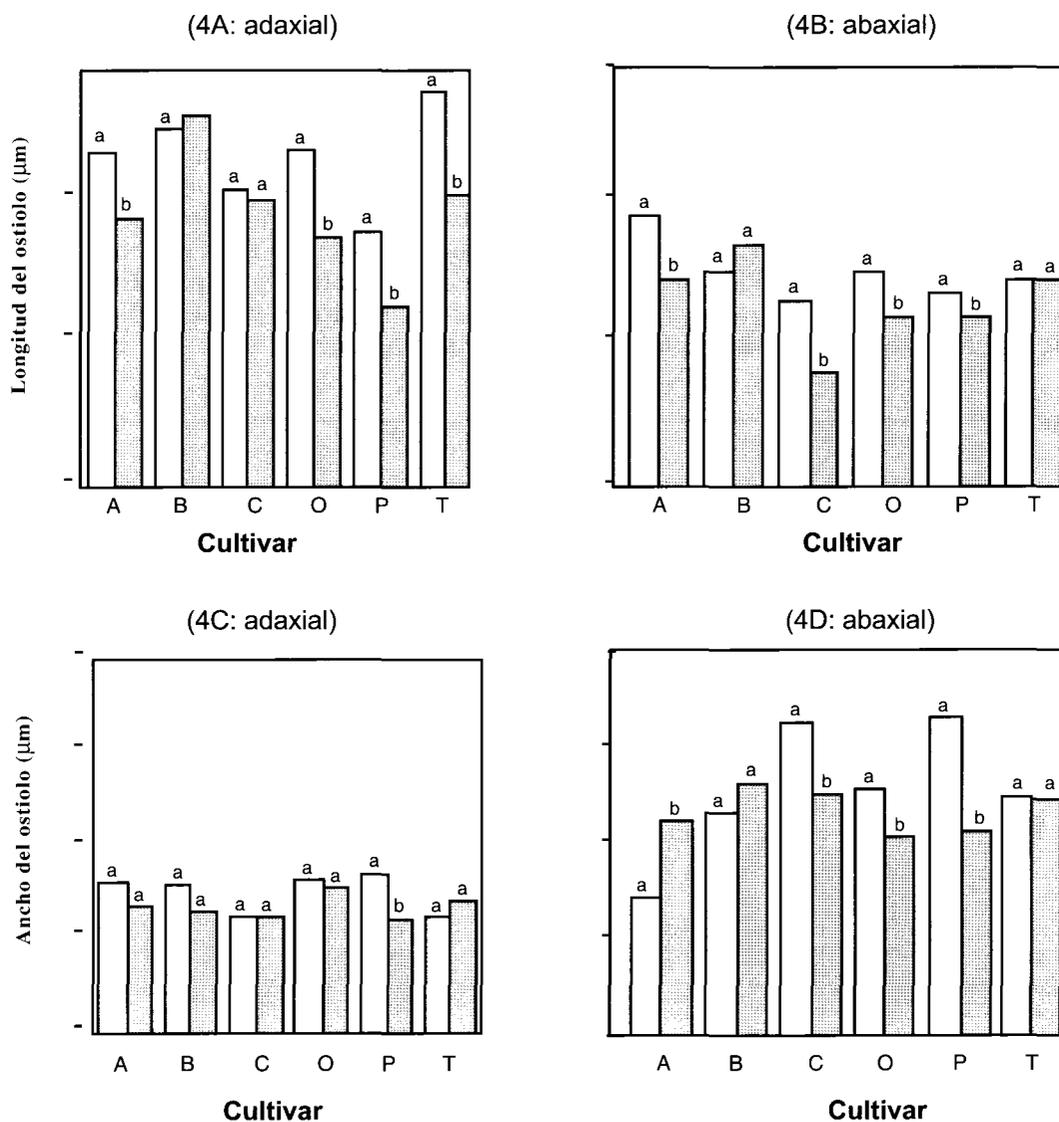


Fig. 4: Longitud (4A - 4B) y ancho (4C - 4D) del ostiolo de la superficie adaxial y abaxial, en seis cultivares de frejol, (*Phaseolus vulgaris* L. A: Arroz tuscola, B: Barbucho, C: Coscorrón, O: Orfeo, P: Pinto 114 y T: Tórtola) bajo dos frecuencias de riego: T1 (□), T2 (■) En cada cultivar la letra minúscula diferente indica efecto de tratamiento (P L. A: Arroz tuscola, B: Barbucho, C: Coscorrón, O: Orfeo, P: Pinto 114 y T: Tórtola) bajo dos frecuencias de riego: T1 (□), T2 (■) En cada cultivar la letra minúscula diferente indica efecto de tratamiento ($P \leq 0,05$).

Length (4A - 4B) and width (4C - 4D) of ostiolo in adaxial and abaxial surface in plant under high (T1) and low (T2) irrigation frequency of six cultivars of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). For a cultivar the averages followed by the same lower case letter are not significantly different ($P \leq 0,05$).

los ostíolos por efecto de tratamiento con una disminución de 5,2 a 3,6 μm en T1 y T2 respectivamente. (Figura 4D). En la superficie abaxial se produjo una disminución significativa de esta propiedad en los cultivares Pinto 114, Coscorrón INIA y Orfeo INIA a excepción del cultivar Arroz tuscola que mostró un aumento significativo (Fig. 4D). En la cara adaxial las dimensiones del ostíolo disminuyeron significativamente en Pinto 114, Arroz tuscola, Barbucho y Orfeo INIA (Fig. 4C).

Efecto del déficit hídrico en el mesófilo

El tejido fotosintético de los cultivares estudiados de *Phaseolus vulgaris* L. se diferencian en dos tipos celulares, los que forman el parénquima empalizada y aquellos que forman el tejido esponjoso. Las dimensiones del parénquima en empalizada

representan aproximadamente 2/3 del grosor del mesófilo constituido por una a dos capas celulares y las células del parénquima esponjoso con una forma irregular a isodiamétrica, constituyen hasta diez capas celulares. El efecto del tratamiento fue evidente en las dimensiones celulares produciendo variaciones en el grosor de mesófilo (Tabla 3) y en el peso foliar específico (Fig. 5).

Tejido en empalizada. El déficit hídrico provocó un aumento en longitud celular de 73 a 96 μm , con diferencias significativas en cinco cultivares (Tabla 2). El diámetro celular presentó una variación significativa en cinco variedades, con una disminución promedio de 29%. El rango de variación en plantas del T1 fluctuó entre 12 y 22 μm y en el T2 entre 8 y 15 μm . El volumen celular del tejido en empalizada presentó una disminución del 26% por efecto del

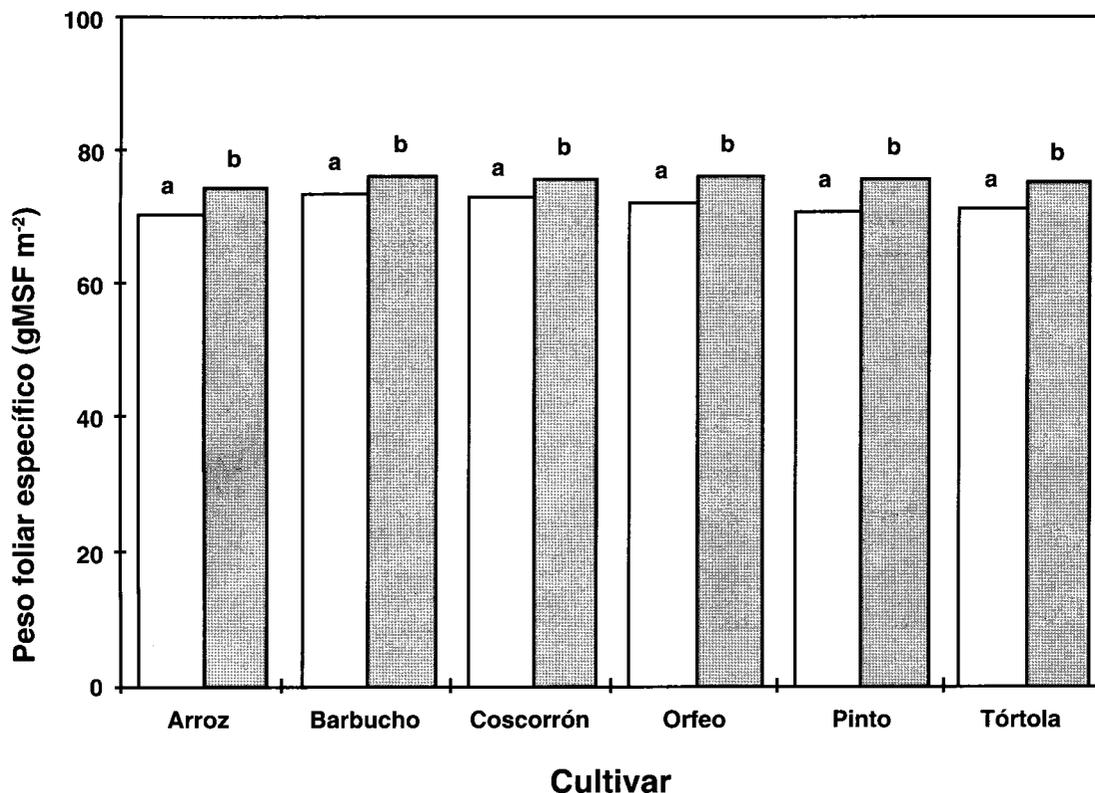


Fig. 5. Peso foliar específico (gMSF m⁻²) de seis cultivares de frejol (*Phaseolus vulgaris* L.), bajo dos frecuencias de riego. T1 (□), T2 (■). En cada cultivar letra minúscula diferente indica efecto de tratamiento ($P \leq 0,05$).

Specific weight of leaves in plant under high (T1) and low (T2) irrigation frequency of six cultivars of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). For cultivars, the averages followed by the same lower case letter are not significantly different ($P \leq 0,05$).

TABLA 2

Longitud, diámetro y volumen celular promedio del tejido en empalizada; diámetro y volumen celular del tejido esponjoso en plantas con alta frecuencia (T1) y con baja frecuencia (T2) de riego en seis cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. (n = 16) (σ longitud empalizada = 8,4%) (σ diámetro empalizada = 15,03 %; volumen empalizada = 28%)

Average length, diameter and volume of cells of palisade parenchyma tissue; diameter and cell volume of spongy parenchyma in plants under high (T1) and low (T2) irrigation frequency of six cultivars of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)

Cultivar	Longitud (μm)		Parénquima en empalizada Diámetro (μm)		Volumen ($\mu\text{m}^3 \times 10^3$)		Parénquima esponjoso Diámetro (μm)		Volumen ($\mu\text{m}^3 \times 10^3$)	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
Arroz	102,5 a ¹ A ²	110,5 ab B	16,7 b A	13,9 b A	21,32 a A	17,18 ab A	37,2 a A	27,7 a A	27,35 a A	11,32 a B
Barbucho	62,7 d A	89,3 d B	16,4 b A	14,1 b B	13,33 bc A	14,00 bc A	24,3 c A	17,4 c B	7,05 d A	2,77 b B
Coscorrón	78,1 c A	106,5 bc B	18,2 b A	14,3 ab B	19,25 a A	17,31 ab A	23,4 c A	17,9 c B	6,97 d A	4,03 b A
Orfeo	94,3 b A	99,3 c A	12,8 c A	8,4 d B	12,37 c A	6,91 d	28,6 b A	22,1 b B	12,31 b A	5,48 b B
Pinto	49,4 e A	58,8 f B	22,7 a A	15,5 ab B	20,91 ab A	10,91 c B	26,8 b A	17,3 c B	8,76 cd A	4,15 b B
Tórtola	51,6 e A	116,6 a B	21,8 a A	10,9 c B	17,96 a A	11,30 c B	27,1 b A	18,2 c B	11,45 bc A	3,14 b B
Promedio	73,1	96,8	18,19	12,9	17,51	12,94	27,9	20,1	12,32	5,15

¹ Entre cultivares los valores promedios seguidos por la misma letra minúscula no son diferentes estadísticamente ($P \leq 0,05$).

² Para una frecuencia de riego (T1, T2) los valores promedios seguidos por la misma letra mayúscula no son diferentes ($P \leq 0,05$).

For given levels of soil moisture (T1 or T2), the averages followed by the capital letter are not statistically different, for a cultivar the averages followed by the same lower case letter are not different ($p \leq 0,05$).

déficit hídrico con diferencias significativas en los cultivares Orfeo-INIA, Pinto 114 y Tórtola INIA (Tabla 2). El cultivar Orfeo en ambos tratamientos presentó el menor volumen celular en comparación con los otros con valores de 12370 y 6910 μm^3 en el T1 y T2 respectivamente.

Tejido esponjoso. El diámetro celular en los seis cultivares presentó una disminución significativa por efecto del tratamiento (Tabla 2), con una variación promedio entre 28 y 20 μm en T1 y T2 respectivamente. En ambos tratamientos la variedad cultivada Arroz Tuscola mostró el mayor diámetro en relación a los otros cultivares.

El volumen celular en cinco de las seis variedades cultivadas presentó diferencias significativas por efecto del déficit hídrico. El cultivar Arroz Tuscola presentó mayor volumen celular en el tejido esponjoso en comparación con las otras tasas, similar a lo observado en el tejido en empalizada (Tabla 2).

Grosor de mesófilo

El grosor de mesófilo de las variedades cultivadas de frejol aumentó en promedio de 36% por efecto tratamiento (Tabla 3). El único cultivar que no presentó diferencias significativas, fue Coscorrón-INIA; sin embargo, este genotipo presentó uno de los valores más altos en comparación a las otras tasas, con valor cercano a 274 μm . Los cultivares Barbucho y Tórtola fueron los que incrementaron en mayor proporción en este parámetro con 63 y 85%, respectivamente.

El aumento del grosor del mesófilo se debe probablemente al incremento de la longitud de las células del tejido en empalizada (Tabla 2) y al aumento en el número de capas celulares a nivel de mesófilo especialmente las del tejido esponjoso. El grosor del mesófilo presentó una correlación significativa ($r = 0,697$, $P \leq 0,05$) con el peso específico foliar.

TABLA 3

Valor promedio de grosor del mesófilo y relación de áreas (A^{mes}/A) en plantas con alta frecuencia (T1) y con baja frecuencia (T2) de riego de seis cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. ($n = 16$) ($\sigma = 10,87\%$)

Average thickness of mesophyll and ratio of A^{mes}/A areas in plants under high (T1) and low (T2) irrigation frequency of six cultivars of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)

Cultivar	Grosor (μm)		A^{mes}/A	
Arroz	181,2 e ¹ A ²	266,1 bcdB	8,9 d ¹ A ²	18,8 d B
Barbucho	163,1 ef A	266,6 a B	14,5 c A	37,9 b B
Coscorrón	266,3 bc A	281,5 ab A	29,6 a A	39,9 ab B
Orfeo	246,5 ab A	274,6 cd B	18,1 c A	25,9 c B
Pinto	235,3 d A	296,7 d B	25,1 b A	42,8 a B
Tórtola	149,7 f A	276,8 ab B	16,1 c A	36,4 b B
Promedio	207,0	282,1	18,7	33,6

¹ Entre los cultivares los valores promedios seguidos por la misma letra minúscula no son diferentes estadísticamente ($P \leq 0,05$).

² Para una frecuencia de riego (T1, T2), los valores promedios seguidos por la misma letra mayúscula no son diferentes ($P \leq 0,05$).

For given levels of soil moisture (T1 or T2), the averages followed by the capital letter are not statistically different; for a cultivar the averages followed by the same lower case letter are not different ($P \leq 0,05$).

Peso foliar específico

El valor promedio del peso específico aumentó 5% en plantas sometidas a déficit hídrico, con diferencias significativas en los seis genotipos analizados. El cultivar Orfeo-INIA presentó el valor máximo de 76 gMSF m⁻², en cambio, el valor mínimo correspondió al cultivar Arroz Tuscola con 74,01 gMSF m⁻², en condición de menor disponibilidad de agua (Fig. 5).

El incremento del peso específico se debió probablemente al aumento del número de capas celulares a nivel del tejido de mesófilo, por la alta correlación existente con los valores de grosor de mesófilo ($r = 0,7$) y, por otra parte, debido a las reducciones del tamaño celular en el tejido en empalizada ($r = -0,726$) y en el esponjoso ($r = -0,762$ $P \leq 0,05$).

Relación de áreas

Los cultivares presentaron diferencias significativas en la relación de áreas por efecto del estrés hídrico, con un incremento en promedio de 55 % (Tabla 3). Generalmente incrementos en A^{mes}/A se asocian a aumentos de capas celulares del mesófilo y al incremento del peso específico foliar (Nobel 1977, Nobel & Walker 1985).

En frejol el aumento de la relación de áreas se correlacionó significativamente con el aumento en grosor del mesófilo ($r = 0,797$, a $P \leq 0,01$). Además se detectó correlaciones significativas de este parámetro ($r = 0,697$; $P \leq 0,01$) con el peso específico foliar y otros caracteres de anatomía foliar (Martínez 1996).

En el T1 se detectó diferencias significativas por efecto cultivar, siendo Coscorrón-INIA el que presentó una mayor relación de áreas y Arroz Tuscola la menor. Para el T2, también se detectaron variaciones significativas por efecto cultivar, presentando el mayor valor Pinto 114 y Arroz Tuscola el menor (Tabla 3). Además, se observó una interacción significativa entre los factores riego y cultivar ($P \leq 0,05$), en el cual Orfeo INIA, cambia la relación por efecto de tratamiento en menor magnitud que los otros cultivares.

DISCUSION

El déficit hídrico aumentó la longitud y la densidad de tricomas especialmente en la cara adaxial en todas las variedades. Este aumento podría aumentar la reflectancia reduciendo la energía absorbida y por lo tanto disminuyendo la temperatura foliar, como se ha indicado en otras especies (Ehleringer et al. 1981, Silva & Acevedo 1984). En estas condiciones la presencia de tricomas protege al aparato fotosintético de la radiación excesiva. Ehleringer et al. (1981), postulan que al inicio del crecimiento y después de las primeras lluvias la densidad de tricomas es muy baja, condicionando una alta absorbancia foliar y un alto potencial fotosintético. A medida que el estrés es más severo y la temperatura del aire aumenta, se desarrollan los tricomas lo cual disminuye la absorbancia foliar y regula la temperatura foliar para fotosintetizar adecuadamente. La presencia de tricomas sobre las superficies foliares también afecta las características de absorción, transmisión y reflexión de la radiación incidente en las hojas. El aumento de la reflectancia reduce la temperatura de la hoja y por lo tanto, la diferencia de presión de vapor hoja-aire y la pérdida de agua (Smith & Nobel 1977), produciendo una disminución de la transpiración por aumento de la resistencia de la capa límite (Kim & Stadelman 1984). Según Richards et al. (1987), la fotosíntesis es menos afectada que la transpiración por la presencia de tricomas y el resultado neto de estas respuestas es aumentar la eficiencia de transpiración. Baldochi et al. (1983) encontraron que una pubescencia densa reduce la evapotranspiración sin afectar la absorción de CO₂, causando un aumento en la eficiencia de transpiración.

Generalmente la densidad de los tricomas es relativamente baja en las plantas cultivadas sin restricción hídrica (Mooney et al. 1977, Ehleringer et al. 1981, Silva & Acevedo 1984), sin embargo, cuando se desarrollan en condiciones de estrés ésta aumenta (Bôlhar et al. 1993).

Durante el período experimental se registraron niveles de radiación que alcanzaron

a 1800 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y la temperatura foliar máxima registrada llegó a 32°C. En estas condiciones también se observó movimientos paraheliotrópicos y diaheliotrópicos en todos los cultivares. La posición foliar con respecto a la radiación, puede ser considerada como un mecanismo para evitar la deshidratación. Estos movimientos asociados a la presencia de tricomas ayudan a disminuir la radiación absorbida por las hojas reduciendo la temperatura foliar y la pérdida de agua. Por lo tanto, aumentan la evasión a la deshidratación (Ludlow & Bjorkman 1985), y podrían contribuir a la estabilidad del rendimiento en medios con sequía intermitente, aumentando la posibilidad de sobrevivencia. Estos movimientos foliares son respuestas reversibles y la intercepción luminosa retorna a niveles normales después que el déficit hídrico ha terminado.

Con respecto a la densidad estomática los resultados indican diferencias varietales a nivel de plantas regadas que se acentúan por efecto de tratamiento en 4 de las 6 variedades. Este aumento en la densidad estomática por efecto de tratamiento, es producto de la disminución del volumen celular (Tabla 2). El número de estomas no permanece constante, como se ha demostrado en otras especies (Peterson et al. 1986). Algunas de las diferencias en la densidad estomática son probablemente causadas por las condiciones ambientales durante el crecimiento. Ciha & Brun (1975), encontraron que la temperatura, la intensidad luminosa y el déficit hídrico alteran la densidad estomática en soya.

Bôlhar et al. (1993), señalan que en *Phaseolus vulgaris* L. la densidad estomática de la epidermis superior varía entre 8 y 16 por mm^2 y en la epidermis inferior entre 132 a 184 por mm^2 . Otras especies C3 como *Salvia pitcheri* presenta una densidad estomática en la superficie adaxial y abaxial de 60 y 175 estomas por mm^2 respectivamente (Knapp et al. 1994). En *Eucaliptus globulus* y *E. camaldulensis* la densidad estomática alcanza aproximadamente a 300 estomas por mm^2 (Pereira & Kozlowski 1976). En especies C4 como en *Atriplex repanda*, se señala una densidad promedio de 115 por mm^2 (Silva

& Acevedo 1984); para especies del Género *Opuntia* (CAM) se señala una amplia variación entre 16 y 62 estomas por mm^2 (Silva 1990). En soya, se ha observado aumentos en la densidad de estomas bajo condiciones de sequía, tanto en la superficie adaxial y abaxial, con incrementos de 149 a 158 y de 357 a 418 estomas por mm^2 respectivamente (Ciha & Brun 1975). Posteriormente Buttery et al. (1993), observaron en soya una respuesta similar bajo condiciones de una menor disponibilidad de agua, con un incremento en la densidad total de 263 a 290 estomas por mm^2 . Sin embargo, en otras especies como *Atriplex repanda* Phil., no se presentan cambios significativos cuando se somete a un estrés hídrico severo de -3,5 MPa con valores promedios de estomas en la superficie adaxial y abaxial de 101 y 128 por mm^2 respectivamente (Silva 1982).

Baginsky (comunicación personal), trabajando en forma simultánea en los mismos cultivares de poroto demuestra que el área foliar disminuye significativamente ($P \leq 0,01$) en las plantas bajo estrés hídrico. La disminución del potencial hídrico de -0.7 MPa a -1.6 MPa inhibió el alargamiento foliar en todos los cultivares. La expansión foliar es altamente sensible al déficit hídrico especialmente durante la etapa de crecimiento vegetativo (Boyer 1970, Andrade et al. 1993). En consecuencia se podría atribuir la menor expansión foliar a un aumento de la densidad celular. Además bajo condición de estrés hídrico, posiblemente se acelere el proceso de división celular y las células alcanzan menor dimensión (Boyer 1982, Parvleliet et al. 1991).

Lugg & Sinclair (1979) y Buttery et al. (1992) demostraron que la densidad estomática aumenta significativamente en la superficie abaxial bajo condiciones de sombreado. La menor radiación incidente y el déficit hídrico estarían asociados a una disminución de flavonoides (Buttery et al. 1993). Trabajos en desarrollo en los mismos cultivares (Pastenes, comunicación personal), demuestran que el aumento de la radiación está asociado a un aumento de flavonoides a nivel foliar y que el déficit hídrico lo disminuye lo que per-

mitiría un aumento de la densidad estomática.

La longitud (Martínez 1996) y el ancho de los estomas de los cultivares estudiados son menores que en otras especies del tipo C3, por ejemplo incienso (*Flourensia thurifera*) y rumpiato (*Bridgesia incisifolia*) del tipo C3, nativas del secano árido de IV región de Chile. El incienso presenta longitud y ancho de 28 y 19 μm respectivamente, y en rumpiato estas mismas dimensiones son de 42 y 30 μm (Silva 1990). Las cuales son mayores en comparación a especies C4 (*A. repanda*) (Silva 1982).

Según Silva (comunicación personal), en 10 procedencias de *Opuntia* (CAM), establecidas en el secano árido de la IV Región de Chile los valores de longitud promedio de estomas varían de 59 a 95 μm y el ancho en un rango de 64 a 78 μm .

A nivel de las células del mesófilo se observaron los cambios más significativos por efecto del tratamiento especialmente en la disminución del diámetro en alrededor del 30% y por lo tanto en el volumen celular de las células del tejido en empalizada. En tanto que el tejido esponjoso disminuyó el diámetro celular en alrededor del 60%. En el caso de especies de cultivo como por ejemplo espinacas, la reducción del potencial hídrico a nivel foliar por debajo de -1 MPa reduce sustancialmente el volumen del protoplasto (Boyer 1982). Esta reducción de volumen implica menor dimensión de cloroplastos y por lo tanto, disminuye la capacidad fotosintética (Berkowitz & Kroll 1988, Sen Gupta & Berkowitz 1987). La medición de los cambios de volumen celulares en hojas de plantas sometidas a déficit hídrico puede constituirse en un buen índice de las características fisiológicas del tejido fotosintético.

A^{mes}/A , se asocia a propiedades fisiológicas de flujo de CO_2 en la fase líquida (Nobel et al. 1975, Longstreth et al. 1980, Nobel & Walker 1985). La relación A^{mes}/A varía con las especies vegetales, con su desarrollo foliar y condiciones hídricas del medio, estimándose en mesófitas entre 15 y 45, mientras que en xerófitas que se caracterizan por presentar un tejido en empalizada altamente desarrollado, la relación alcanza valores entre 20 y 70 (Nobel 1980).

El déficit hídrico determinó un aumento del 55% de la relación A^{mes}/A en comparación a plantas control. Similar respuesta, fue encontrada por Nobel (1980) en *Plectranthus parviflorus* y *Encelia farinosa* con un incremento de 40 y 50% en esta relación. Silva (1990) observó aumentos de esta relación de área en distintas especies del norte de la IV región de Chile, tales como *Atriplex repanda* Phil., *Bridgesia incisifolia*, *Flourensia thurifera*, *Simmondsia chinensis* y *Acacia acaven*, al ser sometidas a déficit hídrico.

En general, en plantas sometidas a déficit hídrico, se produce un aumento en la relación de área, posiblemente determinada por una disminución del diámetro en células del tejido en empalizada y de su volumen (Tabla 2) (Longstreth et al. 1980, Silva 1990).

En los cultivares estudiados, el aumento de esta relación probablemente también se debió a una disminución del volumen celular del tejido esponjoso ($r=0,784$; $P \leq 0,01$). Las variaciones en parámetros foliares tales como: el grosor foliar, peso específico, tamaño celular y la relación de áreas, sirven como adaptaciones de las plantas a medios calurosos y secos (Nobel et al. 1975, Nobel 1980). Según Nobel (1977), la relación de áreas es uno de los parámetros anatómicos más importante, pues incorpora formas y tamaños celulares y representa la superficie efectiva de difusión para el CO_2 influyendo significativamente en la fotosíntesis y en la EUA.

El efecto del tratamiento no sólo determinó una menor tasa de expansión celular sino también un menor tamaño máximo de hojas individuales. A medida que el tamaño de un objeto disminuye, la superficie por unidad de volumen aumenta. Teóricamente esto conduciría a un aumento en la relación de áreas lo cual aumentaría la capacidad fotosintética en las plantas sometidas a estrés. Las observaciones anatómicas indican que las hojas de plantas estresadas aumentan su relación de área y el grosor del mesófilo, lo que determinó un mayor peso foliar específico. Por lo tanto, las variedades analizadas presentaron plasticidad a nivel foliar sugerente de una aclimatación ante la condición de estrés hídrico.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Proyecto FONDECYT 1950860 y la preparación del manuscrito por el Proyecto 1950867.

LITERATURA CITADA

- ANDRADE A, DW WOLFE & E FERERES (1993) Leaf expansion, photosynthesis and water relations of sunflowers plants grown on compacte soil. *Plant and Soil* 149:175-184.
- BALDOCHI DD, SB VERMA, NL ROSEMBERG, BL BLAD, A GARAY & JE SPECHT (1983) Leaf pubescence effects on the mass and energy exchange between soybean canopies and the atmosphere. *Agronomy Journal* 75:537-543.
- BERKOWITZ GA & KS KROLL (1988) Acclimation of photosynthesis in *Zea mays* to low water potentials involves altered degree of protoplast volume reduction. *Planta* 175:374-379.
- BOLHAR-NORDEMKAMPF HR & G. DRAXLER (1993) Functional leaf anatomy. En: DO Hall, JMO Scurlock, HR Bôlhar-Nordemkampf, RC Leegood & SP Long (eds) *Photosynthesis an Production in a Changing Environment: a field and laboratory manual*. Chapter 7: 91-112. Chapman & Hall, London.
- BOYER JS (1970) Different sensivity of photosynthesis to low leaf water potential on corn and soybean. *Plant Physiology* 46: 816-820.
- BOYER JS (1982) *Plant Productivity and environment*. Science 218:443-448.
- BUTTERY BR, JD GAYNOR, RI BUZZEL, DC MacTAVISH & RJ ARMSTRONG (1992) The effects of shading on kaempferol content and leaf characteristics of five soybeans lines. *Physiologia Plantarum* 86:279-284.
- BUTTERY BR, CS TAN, RI BUZZEL, JD GAYNOR & DC MacTAVISH (1993) Stomatal numbers of soybean and response to water stress. *Plant and Soil* 149:283-288.
- CIHA AJ & WA BRUN (1975) Stomatal size and frequency in Soybeans. *Crop Science* 15:309-313.
- CONDON AG & RA RICHARDS (1992) Broad Sense Heretability and Genotype x Environment Interaction for Carbon Isotope Discrimination in field-Grown Wheat. *Australian Journal Agricultural Research* 43:921-934.
- EHLERINGER J, H MOONEY, SL GULMON & P RUNDELL (1981) Parallel evolution of leaf pubescence in *Encelia* in Coastal Deserts of north and south America. *Oecologia* 49:38-41.
- EL-SHARKAWY M & J HESKETT (1965) Photosynthetic among species in relation to characteristics of leaf anatomy and CO₂ diffusion resistances. *Crop Science* 5:517-521.
- FISCHER RA & N TURNER (1978) Plant productivity in the arid and semiarid zones. *Annual Review of Plant Physiolgy*. 29: 277-317.
- GAASTRA P (1959) Photosynthesis of crops plants as influenced by light, carbon dioxide, temperature and stomatal diffusion resistance. *Meded. Landbouwhogesch*, 69:1-68.
- GRAMMATIKOPOULOS G & Y MANETAS (1994) Direct absorption of water by hairy leaves of *Phlomis fruticosa* and its contribution to drought avoidance. *Canadian Journal of Botany* 72:1805-1811.
- JONES HG (1976) Crop characteristics and the ratio between assimilation and transpiration. *Journal Applied Ecology* 13:605-622.
- KIM J & YL STADELMAN (1984) Water relations and cell wall elasticity quantities in *Phaseolus vulgaris* L.) leaves. *Journal of Experimental Botany* 35(155):841-858.
- KNAP AK, E MEAGAN COCKE, CA HAMMERLYNCK & CE OWENSBY (1994) Effect of elevated CO₂ on stomatal density and distribution in a C₄ grass and a C₃ forb under field conditions. *Annals of Botany* 74:595-599.
- LONGSTRETH DJ, TL HARTSOCK & PS NOBEL (1980) Mesophyll cell properties for some C₃ and C₄ species with high photosynthetic rates. *Physiology Plantarum* 48:494-498.
- LUGG DG & TR SINCLAIR (1979) Variation in stomatal density with leaf position in field-grown soybeans. *Crop Science* 19:407- 409.
- LUDLOW MM & O BJORKMAN (1985) Paraheliotropic leaf movement as a protective mechanism against drought-induced damage excessive light and heat. *Planta* 161:505-518.
- MARTINEZ JP (1996) Caracterización ecofisiológica de seis variedades de poroto *Phaseolus vulgaris* L. a dos niveles de disponibilidad de agua. Tesis Ingeniero Agrónomo, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad de Chile. 115 p.
- MCINTOSH MS (1983) Analysis of combined experiments. *Agronomy Journal* 75:153-155.
- MOONEY HA, J EHLERINGER & JA BERRY (1976) High photosynthetic capacity of winter annual in death valley. *Science* 194:322-324.
- NERKAR YS, D WILSON & DA LAWES (1981) Genetic variation in stomatal characteristics and behaviour, water use and growth in five *Vicia faba* L. genotypes under contrasting soil moisture regimes. *Euphytica* 30:335-345.
- NOBEL PS, LJ ZARAGOZA & WK SMITH (1975) Relations between mesophyll surface area, photosynthesis rate and illumination level during development for leaves of *Plectranthus parviflorus* H. *Plant Physiology* 55: 1067-1070.
- NOBEL PS (1977) Internal area and celular CO₂ resistance. Photosynthetic implications of variation with growth conditions and plants species. *Physiology Plantarum* 40: 137-144.
- NOBEL PS (1980) Leaf Anatomy and Water Use Efficiency. En : NC Turner & PJ Kramer (eds) *Adaptations of plant to water and high temperature stress: 43-55*. Wiley, New York.
- NOBEL PS & DB WALKER (1985) Structure of leaf photosynthetic tissue. En: J Barber & NR Baker (eds) *Photosynthetic Mechanisms and the Environment*. Chapter 12 : 501-535.
- NOBEL PS (1991) *Biophysical Plant Physiology and Ecology*. W.H. Freemand Company San Francisco. 608 pp.
- PARLEVLIET JE, DE HAAN & JA SCHELLEKENS (1991) Drought tolerance research: Possibilities and Constraints. Department of Plant Breeding, Agricultural University, Wageningen, The Netherlands 44 p.

- PATTON L & MB JONES (1989) Some relationships between leaf anatomy and photosynthetic characteristics of willow. *New Phytologist* 111:657-661.
- PEREIRA JS & TT KOZLOSWKI (1976) Leaf anatomy and water relations of *Eucaliptus camaldulensis* and *E. globulus* seedlings. *Canadian Journal Botany* 54: 36-43.
- PETERSON JC, DJ DURKIN & JN SACALES (1986) Effects of light level upon leaf area, anatomy and stomatal frequency of *Ficus benjamina* L. Ohio State University oardc Res. Circ. 289:21-26.
- PICON C, JM GUEHL & A FERI (1996) Leaf gas exchange and carbon isotope composition responses to drought in a drought-avoiding (*Pinus pinaster*) and a drought-tolerant (*Quercus petraea*) species under present and elevated atmospheric CO₂ concentrations. *Plant Physiology* 107:125-130.
- RICHARDS RA & TF TOWLEY-SMITH (1987) Variation in leaf area developments and its effect on water use, yield and harvest index of droughted wheat. *Australian Journal Agricultural Research* 38:938-992.
- SEN GUPTA & GA BERKOWITZ (1987) Osmotic adjustment, symplast volume, and nonstomatally mediated water stress inhibition of photosynthesis in wheat. *Plant Physiology* 89:1358-1365.
- SCHOLANDER PF, HT HAMMEL, DE BRADSTREET & EA HEMMINGSEN (1965) Sap in the rattan vine. *Science* 134:1835-1838.
- SILVA H (1982) Adaptación a la sequía. Crecimiento y eficiencia en el uso del agua en *Atriplex repanda* Phil., a dos niveles de disponibilidad de agua. Tesis Ms. Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile 208 pp.
- SILVA H & E ACEVEDO (1984) Adaptaciones anatomomorfológicas al déficit hídrico en *Atriplex repanda* Phil. *Revista Chilena de Historia Natural* 57 : 69-78.
- SILVA H (1990) Efficacité de l'utilisation de l'eau chez des espèces natives et introduites de la region aride mediterrannée du Chili. These Doctorat. Université de Montpellier II, France 207 pp.
- SILVA H & E ACEVEDO (1995) Eficiencia en el uso del agua de diez taxa de *Opuntia* introducidas en la región mediterránea de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 68:271-282.
- SLATYER RO (1967) *Plant Water Relationships*. Academic Press, New York 366 pp.
- SMITH WK & PS NOBEL (1977) Influence of seasonal changes in leaf morphology on water use efficiency for three desert broadleaf shrubs. *Ecology* 58: 1033-1043.
- STRAUSS-DEBENEDETTI S & GP BERLYN (1994) Leaf anatomical responses in five triopical moraceae of different sucesional status. *American Journal of Botany* 8:1582-1591.
- TURREL F (1936) The area of the internal exposed surface of dicotyledon leaves. *American Journal of Botany* 23:255-264.
- VAN RENSBURG L, GHJ KRUGER & H KRUGER (1993) Assesing the drought-resistance adaptative advantage of some anatomical and physiological features in *Nicotiana tabacum*. *Canadian Journal of Botany* 72:1445-1454.
- VENORA G & F CALCAGNO (1991) Study of stomatal parameters for selection of drought resistant varieties in *Triticum durum* DESF. *Euphytica* 57:275-283.