

TÉCNICAS DE INTERÉS EN LA MEJORA DE CEBADAS TOLERANTES A LA SEQUÍA Y TEMPERATURAS ELEVADAS.

I. ESTABILIDAD DE LAS MEMBRANAS CELULARES

Águeda González

*Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural Agrario y Alimentario (IMIDRA)
Apdo. 127, 28800 Alcalá de Henares. E-mail: agueda.gonzalez@madrid.org*

Resumen

La sequía al final del ciclo del cultivo de la cebada es frecuente en la mayoría de las regiones españolas por lo que conseguir variedades mejor adaptadas a la disponibilidad de agua del cultivo es importante, tanto en programas de mejora tradicional como en sistema de cultivo ecológico. La estabilidad de las membranas celulares es uno de los índices de selección de tolerancia a la sequía más importantes utilizados en cereales. Para ver la variabilidad de este carácter se utilizaron catorce genotipos de cebada cultivados en el campo, sometiendo las muestras de hoja a distintos tratamientos de temperatura y distintas concentraciones de PEG. Se ha observado que la diferencia entre genotipos es muy significativa ($p < 0,001$) y que la temperatura de 51°C y concentraciones de PEG del 40% (p/v) son las más adecuadas para los materiales estudiados. Con estos tratamientos se obtienen la mejor separación entre genotipos con menor porcentaje de daño causado a los tejidos.

Palabras clave: Cebada, tolerancia a la sequía, estabilidad de membrana, estrés osmótico.

Summary

Interesting techniques in barley breeding for drought and high temperature tolerance. I. Cell membranes stability.

In most areas of Spain, drought at the end of the barley growth cycle is common. The production of varieties better adapted to the reduced amount of water available at this time is therefore important; this is true for both traditional and ecological agricultural systems. The stability of the cell membrane is one of the most important selection indices for drought tolerance in cereals. The variability in this trait was examined in 14 barley genotypes, all raised in the field, by subjecting leaf samples to different temperatures and different concentrations of PEG. Very significant differences were seen between the genotypes ($p < 0.001$). A temperature of 51°C and a PEG concentration of 40% (p/v) were the best conditions for discerning these differences, achieving the best separation between genotypes while causing the least damage to the tissues.

Key words: Barley, drought tolerance, membrane stability, osmotic stress.

Introducción

De acuerdo con los principios de la agricultura ecológica, un cultivo debe ser capaz de completar su ciclo de vida en condiciones naturales. Esto asegura que el cultivo mantiene su desarrollo potencial en diferentes condiciones de crecimiento y garantiza un uso sostenible. Por tanto, En agricultura ecológica es importante que las plantas sean capaces de adaptarse fácilmente a las variaciones naturales del ambiente en que se desa-

rrollan ya que las características de las plantas están determinadas por sus genes y por las condiciones medioambientales. En este sistema de cultivo, la adaptación significa la conveniencia de utilizar variedades para condiciones de producción específicas (Lammerts van Bueren *et al.* 1998).

En agricultura ecológica se prioriza la estabilidad en el rendimiento frente a rendimientos altos obtenidos mediante la utilización de inputs externos. Para ello es necesario disponer de variedades que toleren las con-

diciones medioambientales adversas y la presión de enfermedades sin grandes fluctuaciones en el rendimiento y la calidad del grano. De este modo la mejora ecológica puede conseguir ambos objetivos: ecológico y socio-económico, teniendo en cuenta que las plantas o los cultivos deben ser estudiados en su interacción con el medio ambiente, es decir, como un todo.

Hay pocos trabajos sobre producción de cultivos realizados en sistema totalmente ecológico. En cereales, los estudios más detallados se han realizado en trigo (Lammerts van Bueren 2002) y en la mayoría, sino en todos los ensayos realizados, utilizando variedades seleccionadas para producción en sistemas de cultivo tradicionales.

En climas de tipo Mediterráneo, en los que las lluvias son escasas al final del ciclo del cultivo, la fase reproductiva es la más afectada por la escasez de agua (López-Castañeda y Richards 1994), lo que repercute especialmente en el rendimiento del grano. En estas condiciones agroclimáticas, los cereales son cultivos prioritarios, ya que se adaptan mejor a condiciones adversas como la sequía y altas temperaturas que tienen lugar al final del ciclo del cultivo en la mayoría de las regiones españolas.

Uno de los criterios que se utilizan para la mejora de cultivos ecológicos es la adaptación y la integración activa de los cultivos con el medio ambiente. Este criterio es de especial interés en climas en que el agua es un factor limitante para el desarrollo de los cultivos puesto que permite una alternativa viable a la gestión sostenible del agua y el suelo (Chocano *et al.* 2007). Actualmente, la mejora de plantas para agricultura ecológica, no dispone de variedades seleccionadas específicamente para estos sistemas de cultivo, por tanto tiene que utilizar variedades obtenidas por el sistema de mejora tradicional. Teniendo en cuenta que uno de los beneficios más importantes de la agricultura ecológica es la conservación de la humedad del suelo y de los recursos hídricos (Pimentel *et al.* 2005), la obtención de variedades tolerantes a sequía debe ser un objetivo prioritario en este sistema de cultivo.

Para acelerar el proceso de mejora es importante utilizar técnicas sencillas, rápidas y económicas que permitan agilizar el proceso de obtención de nuevas variedades mejor adaptadas a condiciones de sequía y temperaturas elevadas. La estabilidad de las membranas celulares y la movilización de fotoasimilados al grano son técnicas muy útiles para conseguir este objetivo (Dhanda *et al.* 2007).

Las membranas celulares son imprescindibles para mantener las actividades metabólicas de la célula. La deshidratación celular afecta, además de a la estructura, a la composición y funciones de la membrana, por lo que la estabilidad de la membrana celular desempeña un papel crítico en condiciones de estrés, siendo uno de los principales componentes de la tolerancia a la sequía (Bewley 1979). La pérdida de la estructura inicial permite la difusión de solutos fuera de la célula lo que posibi-

lita la medida del daño producido por el estrés sobre las células de las plantas que lo sufren (Blum 1988). Por ello en los últimos años, uno de los aspectos de la tolerancia a la sequía que ha suscitado mayor interés ha sido la estabilidad de la membrana celular cuando las plantas están sometidas a estrés hídrico o temperaturas elevadas. Se han desarrollado métodos indirectos para medir la tolerancia al estrés que son muy útiles en programas de mejora (Sullivan 1972, 1979). La sencillez de la técnica, unido a la existencia de una variabilidad genética importante entre poblaciones así como su heredabilidad (Martineau *et al.* 1979 a, b, Dhanda *et al.* 2004), hacen que este carácter pueda ser utilizado como criterio de selección en programas de mejora.

También se han utilizado las medidas de estabilidad de membrana en cereales como un test de tolerancia a la sequía. Para estudiar la tolerancia a la sequía en condiciones controladas se ha utilizado polietilén glicol-6000 (PEG-6000) o manitol como agente desecante a distintas concentraciones (Blum y Ebercon 1981, Faroq y Azam 2005). La tolerancia a la sequía, en términos de estabilidad de membrana, es mayor en los tejidos de hoja más jóvenes que en los más viejos. Después de someter las plantas a estrés hídrico, la tolerancia a la sequía es mayor que si las plantas están bien hidratadas. Esto indica la existencia de un ajuste de la estabilidad de la membrana celular al estrés hídrico. La eficacia del test del polietilén glicol para medir la estabilidad de la membrana celular, así como su interés en la selección de genotipos tolerantes a sequía, ha sido comprobada para distintos cultivos de cereales (Premachandra y Shimada 1987, 1988, Premachandra *et al.* 1991, Singh *et al.* 1991).

El objetivo de este trabajo ha sido, en primer lugar, comprobar si existe variabilidad para este carácter entre los materiales de cebada utilizados en el ensayo y ver la temperatura y concentración de PEG que proporcionan mejor separación entre los genotipos estudiados.

Material y métodos

Los ensayos se llevaron a cabo en la estación experimental de EL ENCIN, del Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural Agrario y Alimentario (IMI-DRA), situado en Alcalá de Henares, a una latitud de 40° 32' N, longitud 3°19' O y altitud de 600 m.

Se sembraron catorce genotipos de cebada en el campo (cinco líneas de mejora: L31, L40, L47, L38, L90 y nueve variedades comerciales: Tipper, Plaisant, Viva, Reinette, Albacete, Alpha, Barbarrosa, Pané-1 y Priver). El diseño del experimento fue de bloques al azar con cuatro repeticiones. Cada parcela elemental tenía una superficie de 2 m².

Test de tolerancia al calor

Una forma de medir la estabilidad de las membranas se realiza sometiendo el tejido a un choque por alta tem-

peratura. Este test se basa en que cuando el tejido de las hojas sufre un daño al someterlo a temperaturas elevadas, la permeabilidad de la membrana celular aumenta y los electrolitos difunden fuera de las células. Si se lava el tejido en agua desionizada inmediatamente después de aplicar el estrés por calor, la cantidad de electrolitos liberados puede evaluarse por medidas de conductancia electrolítica. Puesto que la cantidad de electrolitos liberados es función de la permeabilidad de las membranas, la termoestabilidad de las membranas de diferentes genotipos se puede determinar en términos de conductividad.

Para llevar a cabo esta estimación, seguimos el método descrito por Martineau *et al.* (1979). Las muestras se tomaron cuando las plantas estaban en hoja bandera (estado 41 de la escala de Zedoks). Se cortaron cuatro tallos principales a la altura del tercer nudo, en cada repetición y se introdujeron en unas bolsas de plástico identificadas, con un papel de filtro húmedo en su interior. En el laboratorio se cortó un rectángulo de 3,6 cm² de la hoja bandera y dos rectángulos de 6,5 cm² cada uno de la segunda hoja, dando una superficie total de 16,6 cm². Las tres porciones se introdujeron en un tubo con agua destilada.

Se prepararon cuatro tubos por cada combinación genotipo y tratamiento, con tres porciones de hoja en cada uno. Las muestras se lavaron tres veces con agua destilada para eliminar los electrolitos adheridos a la superficie del tejido y los liberados por las heridas producidas por el corte al preparar la muestra. Posteriormente se eliminó el agua de los tubos dejando en su interior el tejido húmedo, así como algún residuo de agua en sus paredes. Se taparon los tubos, y los que se sometieron a tratamiento de estrés se incubaron en baños termostatizados durante 15 minutos a temperaturas de 35, 45, 50, 51, 53 y 55°C. Los controles se dejaron a 22°C durante el mismo tiempo. A continuación se añadieron 30 ml de agua destilada a los tubos del tratamiento y del control y se dejaron en nevera, a 8 °C durante 18 horas, para permitir la difusión de los electrolitos del tejido. Al día siguiente se midió la conductividad inicial con un conductímetro CRISON 525. Finalmente se taparon los

tubos con papel de aluminio y se llevan a un autoclave donde se sometieron a 1,4 kg/cm² durante 10 minutos para destruir totalmente las membranas celulares. A continuación se midió la conductividad final. El daño inducido como resultado de los distintos tratamientos de estrés se calculó mediante la fórmula:

$$\% \text{ daño} = \{1 - [(1 - (T_1/T_2)) / (1 - (C_1/C_2))]\} \times 100$$

Siendo T = tratamiento; C = control; 1 = inicial; 2 = final.

Test de tolerancia a la sequía

Otra forma de medir la estabilidad de membrana se realiza sometiendo el tejido a un choque osmótico. Para este tipo de estimación seguimos el método descrito por Blum y Ebercon (1981).

El procedimiento y los cálculos se hicieron como para el test de tolerancia a temperaturas elevadas, variando únicamente el tratamiento de estrés. Una vez lavadas las muestras, a los tubos control se les añadieron 20 ml de agua destilada y a los tubos tratamiento 20 ml de una solución de polietilén glicol-6000 (PEG-6000), a concentraciones de 30, 40 y 50% (p/v). Los tubos se taparon y se dejaron en nevera 24 horas a 8°C. Posteriormente se retiraron las soluciones de PEG-6000 y después de hacer tres lavados con agua destilada se añadieron nuevamente 30 ml de agua destilada a cada tubo, se taparon y se dejaron en nevera 18 horas. A continuación se midieron la conductividad inicial y la conductividad final siguiendo el mismo procedimiento que para el test de tolerancia al calor.

Resultados

Test de tolerancia al calor

Para ver la tolerancia al calor se sometieron 14 genotipos de cebada a seis tratamientos de temperatura, observando la respuesta de cada genotipo a dichos tratamientos. En la Figura 1 A y B, se representa el daño producido por los distintos tratamientos de temperatura en las membranas celulares de las hojas de los

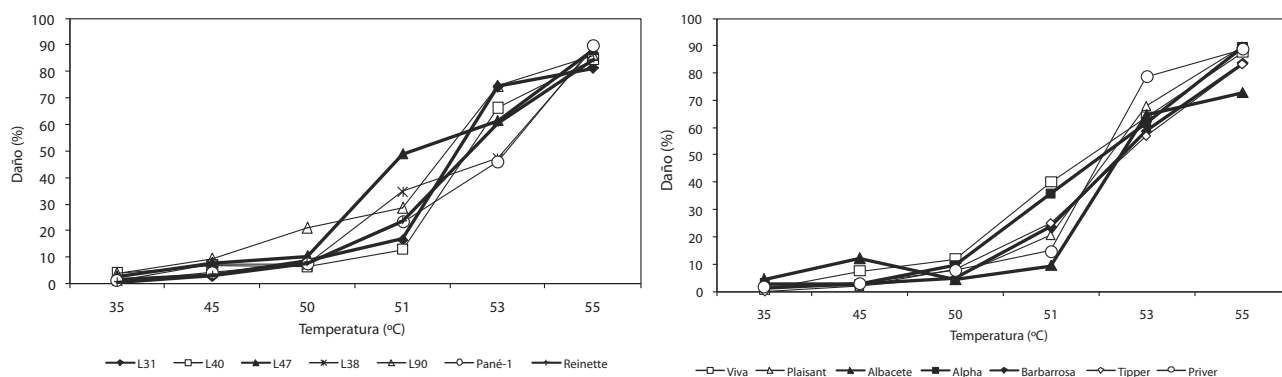


Figura 1. Daño producido por distintos tratamientos de temperatura en las membranas celulares de hojas de catorce genotipos de cebada cultivados en el campo. Cada punto representa la media de cuatro repeticiones.

genotipos estudiados. En esta figura se observa que la relación entre el daño producido en porciones de hoja de cebada y el tratamiento de temperatura que indujo ese daño fue de tipo sigmoïdal y las diferencias entre genotipos fueron distintas según el tratamiento utilizado. El efecto del tratamiento fue muy significativo ($p < 0,001$). Para una temperatura de 35 °C el daño medio de los genotipos fue del 2,03% y las diferencias entre genotipos fueron mínimas, aumentando esas diferencias al someter el material vegetal a 45 y 50°C con un daño medio de 5,23 y 8,54% respectivamente. Cuando se aplicaron tratamientos de 51 y 53°C se observaron las mayores diferencias entre genotipos con un daño medio de 25,33 y 63,32 %. Para 55°C los daños producidos en las membranas celulares de las hojas fueron los más elevados 85,47% de media, sin embargo las diferencias entre genotipos fueron mínimas para la mayoría de los genotipos estudiados.

De los datos obtenidos podemos deducir que el tratamiento de temperatura más indicado para conseguir una buena separación entre genotipos fue el de 51°C por lo que utilizamos este tratamiento para la separación de genotipos. En la Tabla 1 se presentan los valores medios de daño para cada genotipo para este tratamiento. La línea de mejora L47 sufrió el mayor porcentaje de daño, seguida de Viva de la que no difería de forma significativa. Estos dos genotipos sufrieron un daño superior al 40%. En un grupo intermedio, entre el 20 y el 40%, se encontraban Alpha, L38, L90, Tipper, Barbarrosa, Reïnette, Pané-1 y Plaisant. Con los valores de daño más bajos, menores del 20% se encontraban L31, Priver, L40 y Albacete.

Teniendo en cuenta el daño inducido por el tratamiento de 51°C, podemos decir que los genotipos L47 y Albacete presentaron los valores extremos entre los genotipos estudiados, con un 48,91 y un 9,52% de daño respectivamente, es decir, la línea de mejora L47 tenía las membranas celulares más termolábiles y la variedad Albacete es la que presentó mayor termoestabilidad de las membranas de todos los genotipos estudiados.

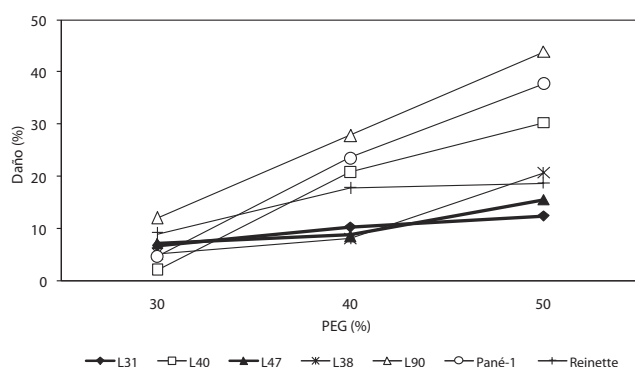


Tabla 1. Valores medios del daño producido por distintos tratamientos de temperatura y PEG en hojas de catorce genotipos de cebada cultivados en el campo.

Genotipo	51 °C		50% PEG	
	Daño (%)		Daño (%)	
L31	15,56	efg	12,40	de
L40	12,67	fg	30,25	abcd
L47	48,91	a	15,53	cde
L38	34,66	bcd	20,69	bcde
L90	26,35	cde	43,75	a
Tipper	25,27	cdef	30,98	abc
Plaisant	20,93	efg	14,28	cde
Viva	40,05	ab	17,26	cde
Reïnette	23,41	cdef	18,68	cde
Albacete	9,52	g	6,81	e
Alpha	35,95	bc	28,94	abcd
Barbarrosa	23,61	cdef	11,98	de
Pané-1	22,97	def	37,78	ab
Priver	14,71	efg	29,59	abcd
Medias	25,33		22,79	

Dentro de cada columna los genotipos seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según el test de Duncan

Test de tolerancia a la sequía.

En la Figura 2 A y B se muestra el daño sufrido por los distintos genotipos incluidos en el experimento al someterlos a un proceso de deshidratación producida por tres tratamientos de PEG-6000 al 30, 40 y 50% (p/v). El efecto del tratamiento fue muy significativo ($p < 0,001$) y el daño medio inducido en las membranas celulares de los distintos genotipos para estos tratamientos fue del 5,71, 14,89 y 22,79% respectivamente. En dicha figura se observa que para todos los genotipos estudiados el daño ocasionado fue mayor al aumentar la concentración del agente desecante (excepto para la variedad Plaisant que para el tratamiento del 50% se mantuvo prácticamente al mismo nivel que para el tratamiento del 40%). La separación mayor entre genotipos tuvo lugar para concentraciones más altas de PEG, ya que las diferencias entre genotipos fueron más importantes y el daño producido en el material vegetal fue el más

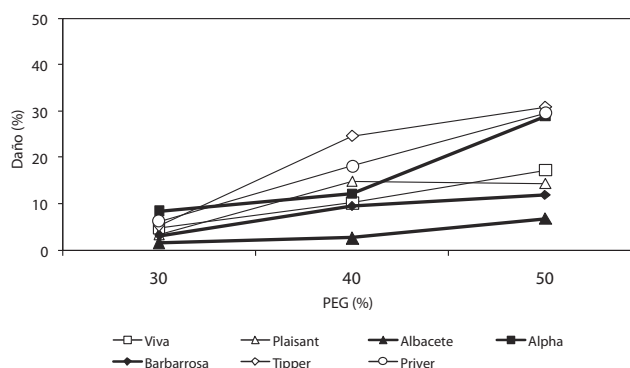


Figura 2. Daño producido por distintos tratamientos de polietilén glicol-6000 (PEG) en las membranas celulares de hojas de catorce genotipos de cebada cultivados en el campo. Cada punto representa la media de cuatro repeticiones.

cercano al producido por el tratamiento de 51°C, por lo que consideramos el tratamiento del 50% para la separación de genotipos. En los datos de la Tabla 1 se puede ver que los genotipos con un porcentaje de daño más alto para este tratamiento fueron L90, que era mayor del 40%. En un grupo intermedio se encontraban Pané-1, Tipper, L40, Priver, Alpha y L38, con un porcentaje de daño comprendido entre el 20 y el 40%. El grupo con valores de daño menores del 20% lo formaban ReINETTE, Viva, L47 y Plaisant junto con L31, Barbarrosa y Albacete que mostraron los valores de daño más bajos. Los valores extremos de daño inducido en los distintos genotipos por este tratamiento fueron del 43,75% para L90 y del 6,81% para Albacete.

No hemos encontrado una correlación significativa entre el daño producido por temperatura y el daño producido por el PEG, sin embargo algunos genotipos han mostrado un comportamiento similar en ambos tratamientos como Alpha, que está entre los genotipos que han sufrido un porcentaje de daño más alto a 51°C y al 50% de PEG. Plaisant, L31 y Albacete están entre los genotipos con porcentajes de daño más bajos para los dos tratamientos.

Discusión

En los materiales de cebada utilizados para estudiar la estabilidad de la membrana celular como medida de tolerancia al calor y a la sequía, se ha observado un efecto muy significativo de los tratamientos ($p < 0,001$) y un efecto muy importante del genotipo para los tratamientos que producían mayores diferencias entre genotipos ($p < 0,001$), lo que indica que existe variabilidad para este carácter entre los genotipos estudiados y por tanto se puede utilizar como criterio de selección en programas de mejora de cebada para tolerancia a la sequía.

La variabilidad genética para la estabilidad de membrana se ha puesto de manifiesto en otros cultivos como en soja (Martineau *et al.* 1979b), en trigo (Blum y Ebercon 1981, Premachandra y Shimada 1987, 1988, Chandrasekar *et al.* 2000) y en caupí (Ismail y Hall 1999).

De los seis tratamientos de temperatura utilizados para el test de tolerancia al calor se deduce que, en nuestros materiales, el tratamiento de 51°C fue el que proporcionó mejor separación entre genotipos ya que causó un rango de daño comprendido entre un 48,91% en la línea de mejora L47 y el 9,52% en la variedad Albacete. Esta temperatura fue más elevada que la requerida para conseguir una buena separación entre genotipos en otros cultivos como en soja que se alcanzó a 48,5°C (Martineau *et al.* 1979a) y en trigo se obtuvo la mejor separación entre genotipos a 44°C y 40°C (Blum y Ebercon 1981, Chandrasekar *et al.* 2000). Posiblemente la mayor temperatura requerida por nuestros materiales se debió a que son más tolerantes al calor ya que la cebada, generalmente, se adapta mejor a condiciones de estrés y

por tanto necesita temperaturas más altas para producir un daño similar al del trigo.

En el test de tolerancia a la sequía fue el tratamiento de PEG al 50% el que dio lugar a una separación mejor entre los genotipos estudiados. El daño inducido por este tratamiento varió entre el 43,75% de L90 y el 6,81% de Albacete. En trigo la concentración de PEG requerida fue del 40% (Blum y Ebercon 1981, Singh *et al.* 1991). La mayor concentración del agente desecante requerida por nuestros materiales puede ser debida a la mayor adaptación de la cebada a la sequía, como ocurría para el test de tolerancia al calor.

Llama la atención el comportamiento de la variedad Albacete que tanto para el tratamiento de 51°C como para el de 50% de PEG presentó el menor porcentaje de daño inducido por estos tratamientos. Es posible que ese daño tan bajo estuviese influenciado por las condiciones ambientales que tuvieron lugar en el momento de tomar las muestras. Esta variedad es más tardía, por tanto alcanzó el estado de hoja bandera, establecido para tomar las muestras, más tarde que los demás genotipos. En esta fecha las temperaturas eran más altas, lo que pudo afectar a las plantas produciéndose un fenómeno de ajuste de la membrana celular al estrés. Algunos autores han observado un efecto parecido ya que el someter las plantas a un tratamiento previo de estrés por temperatura o sequía afectaba a la estabilidad de las membranas celulares (Blum y Ebercon 1981)

Aunque hay una correspondencia en algunos genotipos como Alpha, Plaisant, L31 o Albacete, no se ha encontrado una correlación estadísticamente significativa entre el test de tolerancia al calor y el test de tolerancia a la sequía para el conjunto de los genotipos estudiados. Esto hace que, a pesar de ser más rápido y más barato, el test de tolerancia al calor, no pueda utilizarse también para estimar la tolerancia a sequía en cebada. En trigo tampoco se encontró correlación entre los resultados de los dos test (Blum y Ebercon 1981).

De los datos obtenidos podemos concluir que esta técnica permite la separación de genotipos de cebada, pero no se puede utilizar como criterio único en la selección de genotipos de cebada tolerantes a sequía ya que es muy sensible a las condiciones ambientales y al estado de desarrollo de la planta como se ha demostrado en trigo (Premachandra y Shimada 1988, Blum y Ebercon 1981, Shanahan *et al.* 1990). Es posible que en plantas crecidas en condiciones controladas y con tiempos de incubación más largos los resultados de los test de estabilidad de membrana sean más concluyentes como se han observado para caupí (Ismail y Hall 1999, Labuschagne *et al.* 2008). En este cultivo se ha comprobado que la liberación de electrolitos de las líneas más tolerantes al calor en el estado reproductivo era más lenta que la de las líneas susceptibles al calor y además, las líneas tolerantes tenían rendimientos más altos que las susceptibles. En esta línea están los resultados ob-

tenidos por Chandrasekar *et al.* (2000) ya que los trigos con mejor comportamiento en cuanto al test de estabilidad de membrana se adaptaban mejor a condiciones adversas. Estos resultados, junto con los obtenidos por Tripathy *et al.* 1999 al conseguir mapear QTLs asociados con la estabilidad de las membranas celulares en condiciones naturales de estrés hídrico, hacen que esta técnica se considere uno de los principales índices de tolerancia a sequía en cereales.

Referencias

- Bewley JD. 1979. Physiological aspects of desiccation tolerance. *Annual Review of Plant Physiology* 30: 195-238.
- Blum A. 1988. Drought resistance. En: *Plant breeding for stress environments*. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc, pp 43-77.
- Blum A, Ebercon A. 1981. Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. *Crop Science* 21: 43-47
- Chandrasekar V, Sairam RK, Srivastava GC. 2000. Physiological and biochemical responses of hexaploid and tetraploid wheat to drought stress. *Journal of Agronomy & Crop Science* 185: 219-227.
- Chocano C, Sánchez C, López F. 2007. La Agroecología como alternativa a la prevención y lucha contra la desertificación en la región de Murcia: la comarca del Noroeste. *Agroecología* 2: 75-84.
- Dhanda SS, Sethi GS, Behl RK. 2004. Indices of drought tolerance in wheat genotypes at early stages of plant growth. *Journal of Agronomy & Crop Science* 190: 6-12.
- Dhanda SS, Behl RK, Shinano T, Osaki M. 2007. Wheat improvement under deficit conditions in semi arid tropics and subtropics. *Tropics* 16: 181-190.
- Farooq S, Azam F. 2005. The use of cell membrane stability (CMS) technique to screen for salt tolerant wheat varieties. *Journal of Plant Physiology* 163: 629-637.
- Ismail AM, Hall AE. 1999. Reproductive-stage heat tolerance, leaf membrane thermostability and plant morphology in cowpea. *Crop Science* 39: 1762-1768
- Labuschagne MT, Verhoeven R, Nkouanessi M. 2008. Drought tolerance assessment of African cowpea accessions based on stomatal behaviour and cell membrane stability. *The Journal of Agricultural Science* 146: 689-694.
- Lammerts van Bueren ET, Hulscher M, Jongerden J, Harina M, Hoogendoorn J, Mansvelt JD van, Ruivinkamp GTP. 1998. Sustainable organic plant breeding. Louis Bolk Institute, Driebergen.
- Lammerts van Bueren ET. 2002. Organic plant breeding and propagation: concepts and strategies. Wageningen University and Research Centre, Wageningen.
- López-Castañeda, C, Richards, RA. 1994. Variation in temperate cereals in rainfed environments. I. Grain yield, biomass and agronomic characteristics. *Field Crops Research* 37: 51-62.
- Martineau JR, Specht JE, Willians JH, Sullivan CY. 1979a. Temperature tolerance in soybeans. I. Evaluation of a technique for assessing cellular membrane thermostability. *Crop Science* 19: 75-78.
- Martineau JR, Willians JH, Specht JE. 1979b. Temperature tolerance in soybeans. II. Evaluation of segregating populations for membrane thermostability. *Crop Science* 19: 79-81.
- Pimentel D, Hepperly P, Hanson J, Douds D, Seidel R. 2005. Environmental, energetic and economic comparisons of organic and conventional farming systems. *BioScience* 55: 573-582.
- Premachandra GS, Shimada T. 1987. The measurement of cell membrane stability using polyethylene glycol as a drought tolerance test in wheat. *Japanese Journal of Crop Science* 56: 92-98.
- Premachandra GS, Shimada T. 1988. Evaluation of polyethylene glycol test of measuring cell membrane stability as a drought tolerance test in wheat. *Journal of Agricultural Science* 110: 0001-0005.
- Premachandra GS, Saneoka H, Kanaya M, Ogata S. 1991. Cell membrane stability and leaf surface wax content as affected by increasing water deficits in maize. *Journal of Experimental Botany* 42: 167-171.
- Shanahan JF, Edwards IB, Quick JS, Fenwick JR. 1990. Membrane thermostability and heat tolerance of spring wheat. *Crop Science* 30: 247-251.
- Singh M, Srivastava JP, Kumar A. 1991. Cell membrane stability in relation to drought tolerance in wheat genotypes. *Journal of Agronomy and Crop Science* 168: 186-190.
- Sullivan CY. 1972. Mechanisms of heat and drought resistance in grain sorghum and methods of measurement. En *Sorghum in the seventies* (Rao NGP, House LR, eds.), pp 249-264.
- Sullivan CY, Ross WM. 1979. Selecting for drought and heat resistance in grain sorghum. En *Stress physiology in crop plants, sorghum* (Hussel H, Staples R, eds.), pp 263-281.
- Tripathy NJ, Zhang J, Robin S, Nguyen TT, Nguyen HT. 1999. QTLs for cell-membrane stability mapped in rice (*Oryza sativa* L.) under drought stress. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 1197-1202.