



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN
EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO DE BOTÁNICA

Anatomía, fisiología y bioquímica de la raíz de plántulas de
frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray var. *latifolius*) en
estrés hídrico

ANDRÉS ORDUÑO CRUZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2008

La presente tesis titulada: "Anatomía, fisiología y bioquímica de la raíz de plántulas de frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray var. *latifolius*) en estrés hídrico", realizada por el alumno: Andrés Orduño Cruz, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
BOTÁNICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

Dr. Carlos Trejo López

ASESOR

Dra. Teresa Terrazas Salgado

ASESOR

Dra. Cecilia Peña Valdivia

ASESOR

Dr. Carlos Ramírez Ayala

ASESOR

Dr. Joel Meza Rangel

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Noviembre de 2008

Agradecimientos

Agradezco infinitamente a los miembros de mi comité particular: **Dr. Carlos Trejo**, Dra. **Teresa Terrazas**, Dra. **Cecilia Peña**, Dr. **Carlos Ramírez**, Dr. **Joel Meza** y Dr. **Victor Conde** por su apoyo en la realización de este trabajo. Agradezco la orientación y las observaciones para mejorar el trabajo experimental, la paciencia y empeño en la revisión de los manuscritos para contribuir a mejorarlos sustancialmente.

Agradezco al Colegio de Postgraduados y particularmente al postgrado en Botánica por la formación tanto a nivel maestría como a nivel doctorado, por haberme proporcionado las herramientas para seguir en esta profesión. Por otro lado, agradezco las facilidades otorgadas para realizar las distintas fases de este trabajo, donde siempre fui bien recibido.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México, por otorgarme una beca con el No. 97376. Para realizar mis estudios de doctorado.

También agradezco a las autoridades del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste por los permisos otorgados para la realización de mis estudios de doctorado, especialmente a CIBNOR-Guerrero Negro del Programa de Agricultura en Zonas Áridas.

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mis padres Margarita y Gerardo

A mis hermanas
Columba, María Isabel, Mariana y Nuvia

Como agradecimiento a su cariño

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	2
PRESENTACIÓN.....	3
LITERATURA CITADA.....	9
Capítulo 1 Frijol tepari (<i>Phaseolus acutifolius</i> A. Gray) su adaptación a la sequía y la respuesta de la raíz a los factores estresantes.....	10
Frijol tepari.....	11
Estado actual de (<i>Phaseolus acutifolius</i> A. Gray).....	13
Influencia de factores ambientales sobre el crecimiento y desarrollo de frijol tepari....	14
Tolerancia a sequía.....	15
Tolerancia a temperaturas altas.....	17
Tolerancia a la salinidad.....	19
Estudios anatómicos y morfológicos.....	20
Estrés propiciado por condiciones ambientales.....	21
Respuesta generalizada al estrés de agua.....	22
Efectos en el crecimiento.....	24
Mecanismos por los cuales las plantas compensan la limitación de agua.....	24
Escape a la sequía.....	25
Tolerancia a la sequía con Ψ_A bajo en los tejidos.....	27
Tolerancia a la sequía con Ψ_A alto en los tejidos.....	29
Ajustes del potencial osmótico.....	30
Prolina.....	31
Acido abscísico (ABA).....	33
Funciones del ABA en la raíz.....	34
Estructura de la raíz.....	35
Estructura primaria de la raíz.....	36
Estructura secundaria de la raíz.....	38
Funciones de la raíz.....	39
Desarrollo del sistema de la raíz.....	40
Crecimiento de la raíz.....	41
LITERATURA CITADA.....	42
Capítulo 2. Crecimiento y contenido de prolina en la raíz de plántulas de frijol tepari (<i>Phaseolus acutifolius</i> A. Gray) en reacción al potencial de agua del sustrato.....	50
RESUMEN.....	51
SUMMARY.....	51
INTRODUCCION.....	52
MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	56
CONCLUSIONES.....	65
LITERATURA CITADA.....	66

Capítulo 3. Crecimiento y anatomía de la raíz de plántulas de frijol tepari (<i>Phaseolus acutifolius</i> A. Gray) en diferentes potenciales de agua.....	69
RESUMEN.....	70
SUMMARY.....	70
INTRODUCCION.....	71
MATERIALES Y MÉTODOS.....	73
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	76
CONCLUSIONES.....	86
LITERATURA CITADA.....	87
Capitulo 4. Determinación de proteínas solubles en la raíz de frijol tepari (<i>Phaseolus acutifolius</i> A. Gray) en estrés hídrico.....	91
RESUMEN.....	92
SUMMARY.....	92
INTRODUCCIÓN.....	93
MATERIALES Y MÉTODOS.....	97
RESULTADOS Y DISCUSION.....	101
CONCLUSIONES.....	109
LITERATURA CITADA.....	110
Discusión general.....	115
LITERATURA CITADA.....	125

ÍNDICE DE CUADROS

Capítulo 1

Cuadro 1. Comparación entre frijol tepari silvestre y frijol tepari domesticado (*Phaseolus acutifolius* A. Gray). Tomado de Nabhan y Felger (1978)..... 13

Cuadro 2. Mecanismos por los cuales las plantas pueden tolerar o escapar de las limitaciones de agua. Tomado de Nilsen y Orcut (1996)..... 26

Capítulo 2

Cuadro 1. Contenido relativo de agua (CRA) y longitud de la raíz (mm) de plántulas de cuatro cultivares de frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) después de 24 horas en vermiculita con distintos potenciales de agua (Ψ_A)..... 56

Cuadro 2. Biomasa fresca (mg), biomasa turgente (mg) y biomasa seca (mg) de la raíz de plántulas de cuatro cultivares de frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray). Después de 24 horas en vermiculita con diferentes potenciales de agua (Ψ_A)..... 60

Capítulo 3

Cuadro 1. Promedio de la longitud de la raíz (mm), diámetro de la raíz (μm), diámetro del cilindro central (μm) medidas en un corte transversal de la raíz de frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray)..... 77

Cuadro 2. Promedio del área del tejido vascular (μm^2), densidad de células de córtex (Células/ mm^2), área de las células del córtex (mm^2), anchura de las células del córtex (μm) medidas en un corte transversal de la raíz de frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray)..... 83

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 2

Figura 1. Diámetro de la raíz de frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) en el segmento de la raíz de 0 a 3.0 mm. Las graficas individuales corresponden a un cultivar los símbolos representan el Ψ_A del sustrato en el que las raíces crecieron: Ψ_A de -0.03 MPa (○), -0.07 MPa(●) , -0.51 MPa(▽) y -2.01 MPa(▼). Cada punto representa el promedio del diámetro de la raíz de 0 a 3.0 mm en cada Ψ_A del sustrato \pm el error estándar..... 61

Figura 2. Concentración de prolina en la raíz de frijo tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray). En cada subgrafica se presenta la concentración de prolina por cultivar. En dos zonas de la raíz (unidas por una línea discontinua donde ZA=Zona apical (●) y ZM=Zona media (○). Cada punto representa el promedio de la concentración de prolina en cada Ψ_A del sustrato \pm el error estándar..... 63

Capítulo 3

Figura 1. Diagrama que muestra el sitio de muestreo en la raíz de frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray). Se muestra el lugar donde se realizaron los cortes y medición del diámetro en los primeros 20 mm de la raíz después de 24 h de permanecer en sustrato con diferentes Ψ_A . El punto en negro y verde indica el sitio donde se marco antes de someter las plantas a diferentes Ψ_A en el sustrato. Las marcas en rojo muestra exactamente donde se realizaron los cortes anatómicos (El dibujo no esta a escala)..... 75

Figura 2. Anatomía de la raíz de frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray). **A.** Corte longitudinal del segmento apical (primeros 2.7 mm) de plántulas de 4 días después de la germinación. **B.** Acercamiento a corte longitudinal de la zona de división celular donde se muestra de izquierda a derecha 2 hileras de células de la epidermis y hasta 6 hileras de células de córtex y las células que formarán el cilindro central. **C.** Acercamiento en un corte longitudinal a 2.7 mm donde se observa mayor diferenciación celular. **D.** Corte transversal a 6.5 mm después del ápice donde se observan la epidermis, el córtex aún con la endodermis en división y el tejido vascular concuatro cordones de floema y xilema junto al parénquima central. Ep = epidermis, co = córtex, Pa = parénquima a manera de medula, X = xilema, F = floema, las flechas encontradas ($\rightarrow\leftarrow$) división de la endodermis, las flecha con dos puntas señala los limites del córtex (\leftrightarrow). Barras de las escalas en A = 200 μ m, B, C = 25 μ m, D = 75 μ m..... 79

Figura 3. Cortes transversales del segmento de 6.5 a 7.0 mm de raíces de plántulas frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) creciendo en diferentes Ψ_A en el

sustrato. Los cultivares se muestran en los renglones y los Ψ_A (de -0.03, -0.07, -0.51, y -2.01 MPa en las columnas. La barra de escala esquivale a 100 μm 81

Capítulo 4

Figura 1. Esquema que ilustra la forma en que se tomaron las muestras para análisis de proteína soluble en plántulas de 96 horas después del inicio de la imbibición de frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray). La flecha entre los dibujos de la planta indica el tratamiento de agua en el sustrato, la flecha delgada en dibujo de plántula derecha indica la zona de muestreo en la raíz..... 99

Figura 2. Concentraciones de proteína soluble en dos zonas de la raíz: A) zona apical y B) zona media de cuatro cultivares de frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray). Cada barra representa el promedio de la concentración de proteína soluble en el tejido fresco de la raíz y la barra indica \pm el error estándar..... 102

Figura 3. Patrones de proteínas solubles de plántulas de dos los cultivares de frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray). A) Negro y B) Blanco. Obtenidas de dos zonas de la raíz (zona apical y zona Media) que crecieron con humedad suficiente (sustrato con $\Psi_A = -0.07$ MPa) y con déficit de humedad (sustrato con $\Psi_A = -2.01$ MPa). Las proteínas fueron separadas en geles SDS-PAGE al 12%, en todos los casos la concentración de proteína fue de 60 μg por cavidad..... 104

Figura 4. Patrones de proteínas solubles en la zona de 70 – 97 KDa de dos zonas de la raíz (ZA=Zona apical y ZM= Zona Media) de plántulas de dos cultivares de frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) que crecieron con humedad suficiente (sustrato con $\Psi_A = -0.07$ MPa) y con déficit de humedad (sustrato con $\Psi_A = -2.01$ MPa). Separadas por SDS-PAGE al 12% (en todos los casos fueron 60 μg de proteína por cavidad y carril)..... 105

RESUMEN

Esta investigación se realizó para documentar los cambios morfológicos, anatómicos, fisiológicos y bioquímicos que ocurren en la raíz de plántulas de frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray var. *latifolius*) de los cultivares “Brown-Yellow-Red” (RYB), “Negro”, “Tohono Oodham” y “Blanco de Sinaloa” que crecieron en sustrato con diferentes potenciales de agua (Ψ_A) de -0.03, -0.07, -0.51 y -2.01 MPa. De esta forma contribuir a revalorar a frijol tepari como un recurso alimenticio y como un reservorio de genes importante en la agricultura; debido a que su uso como alimento ha sido desplazado y muchos cultivares de México y el suroeste de Estados Unidos están en peligro de desaparecer. Se encontró que el crecimiento de la raíz de plántulas de los cultivares evaluados, fue influenciado por las condiciones de humedad y proporcional al potencial de agua del sustrato. La longitud de la raíz fue mayor en sustratos moderadamente secos, respecto a los más húmedos o muy secos; lo que confirma la adaptación de la raíz de frijol tepari a crecer en ambientes áridos. El contenido relativo de agua (CRA) en el tejido de la raíz se mantuvo alto y permaneció constante aun cuando el Ψ_A en el sustrato pasó de -0.51 a -2.01 MPa. A nivel anatómico, el efecto del Ψ_A sobre el crecimiento longitudinal y radial fue heterogéneo entre los cultivares de frijol tepari y permitió observar que el crecimiento de la raíz es modulado por la humedad del sustrato. Se encontró que el arreglo y número de células de los distintos tejidos fue similar entre los cultivares. El tamaño de las células si mostró diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre los cultivares y entre los niveles de humedad, con una tendencia a disminuir con los Ψ_A menores del sustrato. El crecimiento radial de la raíz mostró un incremento natural progresivo de su diámetro a lo largo de los primeros 15 mm; se observaron raíces delgadas con el estrés hídrico y raíces gruesas en sustratos cercanos a capacidad de campo; excepto en el segmento de la raíz de 0.5 mm donde el crecimiento radial de la raíz no fue afectado por los Ψ_A en el sustrato. En general, los tejidos de la raíz crecieron coordinadamente y las células del córtex mostraron el mayor crecimiento radial que contribuyó en mayor proporción al aumento del diámetro total de la raíz. Sin embargo, se observó que las células de córtex además tienen una mayor expansión en dirección longitudinal. Por otra parte, la concentración de prolina en los tejidos de la zona apical fue consistentes con la idea de que la prolina participa en el ajuste osmótico, como un soluto citoplásmico, para mantener el crecimiento a Ψ_A bajos en el sustrato. La concentración de proteína soluble fue mayor en la zona apical en comparación con la zona media de la raíz, pero solo en los sustratos con Ψ_A bajos. Se concluyó que la raíz de las plántulas de frijol tepari sobrevivió y mantuvo su crecimiento en sustratos con Ψ_A bajos, debido a que su zona apical tiene un crecimiento dinámico y fisiológicamente complejo ante el estrés hídrico.

SUMMARY

This research was performed to document the morphological, anatomical, physiological, and biochemical changes that root of tepary bean seedlings has (*Phaseolus acutifolius* A. Gray var. *latifolius*) in the cultivars “Brown-Yellow-Red” (RYB), “Black”, “Tohono Oodham”, and “Blanco de Sinaloa”; when it grows at water potentials (Ψ_w): -0.03, -0.07, -0.51, and -2.01 MPa in the substrate. And this would contribute to reevaluate the use of tepary bean as a food and important gene pool; because of tepary bean use has been replaced as a food source and many cultivars in Mexico and southern United States are prone to disappear. The root growth of the cultivars proved to be influenced by humidity and was proportional to the level substrate water potential. Root length was greater in moderately dry substrates than in humid or dry ones; which confirms that root tepary beans is adapted to growth in arid environments. The relative water content (RWC) in the root tissue remained high and constant even when Ψ_w in the substrate went from -0.51 to -2.01 MPa. At anatomical level, the effect of Ψ_w on length and radial growth was heterogeneous among the cultivars of tepary beans and allowed to observe that root growth is modulated by the substrate humidity. The arrangement and number of cells of the different tissues was similar among cultivars. There was, however, a significant difference ($P \leq 0.05$) in cell size among cultivars and substrate water levels, with a tendency to decrease with lower Ψ_w in the substrate. Radial growth of the root showed a progressive natural increase in diameter in the first 15 mm; thin roots were present with water stress, and thicker ones in substrates near field capacity, except in the segment where the radial root growth was not affected by the substrate Ψ_w . In general, root tissues grew coordinately and cortex cells showed the greatest radial growth, which contributed more to the increase in the total root diameter. Nevertheless, cortex cells also showed a greater expansion lengthwise. On the other hand, the concentration of proline in the tissues of the apical zone was consistent with the idea that proline has a roll in the osmotic adjustment, as a cytoplasm solute, to maintain growth with low Ψ_w in the substrate. The concentration of soluble protein was greater in the apical zone than in the middle zone of the root, but only in substrates with low Ψ_w . It was conclude that the root of tepary bean seedlings survives and maintains growth in substrates with low Ψ_w because its apical zone has a dynamic and physiologically complex growth as a response to water stress.

PRESENTACIÓN

El estrés que imponen las condiciones del ambiente representa el factor más limitante en la productividad de los cultivos en cualquier parte del mundo. De esta forma, una proporción grande del rendimiento se pierde por el efecto adverso del estrés que se presenta cuando hay extremos en la temperatura, sequía y salinidad (Hirt y Shinozaki, 2004); debido a que este estrés causa la inhibición de todos los procesos fisiológicos y en general la reducción del crecimiento vegetal (Kozlowki y Pallardy, 2002).

Por otro lado, se conoce que las exposiciones breves a estos factores son esenciales para el desarrollo óptimo de las plantas (Kozlowki y Pallardy, 2002).

La disponibilidad de agua es una de las mayores limitantes de la productividad de las plantas (Boyer, 1982). Sin embargo, se considera que arriba del 35% de la superficie del la tierra es árida o semiárida con precipitaciones que son inadecuadas para uso agrícola.

Además, de acuerdo con UNEP (2007) a nivel global la precipitación es raramente uniforme. Por una parte, algunas regiones presentan una estación seca predecible mientras que otras experimentan un periodo impredecible de sequía

El término sequía de acuerdo con Bartels y Souer (2004) deriva de un contexto agronómico. Sin embargo, el termino sequía también se aplica cuando el agua en la planta sufre un desbalance debido a una insuficiencia de agua en el sustrato, entonces la planta experimenta o pasa por un déficit de agua y posteriormente sufre por un estrés de agua,

también referido como sequía. Por otra parte, también es conocido que en, regiones con precipitación suficiente para completar el ciclo de vida de las plantas, pueden presentar ambientes con limitaciones de agua; así, todas las regiones agrícolas pueden experimentar sequía. Bartels y Souer (2004) al referirse a la importancia que tiene el agua en las plantas mencionan que es central para todos los procesos fisiológicos en las plantas, en el nivel celular y es el principal medio por el que se transportan metabolitos y nutrientes.

De acuerdo con Kozlowski y Pallardy (2002) las plantas difieren ampliamente en su capacidad para adaptarse la sequía. Éstas pueden ser convenientemente separadas por la capacidad para mantener el estatus hídrico de la planta. El estatus del agua de una planta se describe por medio del potencial de agua (Ψ_A) y el contenido relativo de agua (CRA).

Así, las plantas han desarrollado muchos mecanismos para adaptar su crecimiento a la disponibilidad de agua. Estas adaptaciones son dependientes de la severidad y duración del déficit de agua, así como también del estado de desarrollo y las características morfológicas y anatómicas de la planta.

En general, se pueden distinguir respuestas rápidas ante una emergencia y respuestas adaptativas lentas (Wood, 2005). Algunas estrategias para sobrevivir en ambientes con limitaciones de agua son evitarlos completamente, escapar al daño inducido por la sequía y completar el ciclo de vida rápidamente. El escape a la sequía es una adaptación extremadamente importante para sobrevivir en ambientes con limitaciones de agua (Jones *et al.*, 1981).

Sin embargo, los fisiólogos vegetales están generalmente más interesados en plantas que son capaces de tolerar la sequía y que mantienen contenidos altos de agua en las células mediante adaptaciones anatómicas, del desarrollo, bioquímicas, fisiológicas y moleculares que limitan la desecación de sus tejidos.

En la actualidad existe un gran interés en investigar la sequía y su efecto en la vida de las plantas (Hirt y Shinozaki, 2004). Los estudios se han incrementado debido los cambios ambientales que suceden actualmente a nivel global. Como ya es conocido, el incremento de los gases con efecto invernadero sobre el ambiente global propician cambios en las temperaturas y con esto, muchos cambios de patrones del clima local que afectan a las poblaciones de plantas y animales (UNEP, 2007).

Por otra parte, el uso de fertilizantes químicos e irrigación artificial en la agricultura mundial se asocia con el incremento la salinidad de las tierras cultivables causando efectos parecidos a los de la sequia. Por lo que la de resistencia y adaptación a factores abióticos generadores de estrés en plantas se investiga ampliamente.

En esta investigación se estudió el efecto que tiene el sustrato con distintos Ψ_A en el crecimiento de la raíz de plántulas de frijol tepari *Phaseolus acutifolius*, que de acuerdo con Nabhan y Felger (1978) ha sido descrito como una de las especies domesticadas más resistentes al estrés por deficiencia de agua.

Se realizaron experimentos para conocer el Ψ_A del sustrato en el que la raíz puede continuar viva y realiza funciones fisiológicas básicas; el efecto que tiene la disminución

del Ψ_A del sustrato en el crecimiento de la raíz, enfocando las observaciones a la zona apical de la raíz. Utilizando técnicas de anatomía y morfología con las que se evaluó el crecimiento a nivel celular, de tejidos particulares y del órgano en general. Además, se cuantificó la concentración de prolina y proteínas solubles conocidas por su acumulación en tejido durante el estrés hídrico.

Se resolvieron preguntas planteadas al principio de la investigación como:

¿Es frijol tepari en realidad capaz de tolerar niveles de humedad en el sustrato que producen un estrés hídrico en sus tejidos?

¿Cuál es el Ψ_A del sustrato menor que mantiene el crecimiento del frijol tepari?

¿Qué posibilidad existe que en la fase de plántula, el frijol tepari sobreviva a un estrés hídrico ocasionado por un Ψ_A bajo en el sustrato?

¿A qué nivel (celular de tejidos o de órgano) se presentan las modificaciones debido al estrés hídrico?

¿Se acumulan sustancias en la raíz como una respuesta al estrés hídrico para permitir el crecimiento?

Este trabajo se divide en cuatro capítulos.

El primero es una revisión sobre distintos aspectos teóricos que se abordaron durante las distintas etapas del trabajo de tesis e incluye aspectos generales sobre la identidad

botánica de frijol tepari, descripción morfológica de la especie y su adaptación a factores ambientales extremos.

Además, se presenta una revisión general sobre el estrés ocasionado por déficit de agua en plantas y sobre las estrategias de adaptación. Para finalizar, se mencionan temas relacionados con la raíz, considerando su origen, morfología, anatomía y adaptación al déficit de agua del suelo.

En el segundo capítulo se analizó el efecto de diferentes Ψ_A del sustrato en el crecimiento en dirección longitudinal y radial en la zona apical y subapical de la raíz de frijol tepari. Además, se cuantificó el contenido de prolina en dos zonas de la raíz principal de las plántulas.

En el tercer capítulo se abordó el tema del crecimiento y desarrollo de las raíces de frijol tepari bajo estrés hídrico, en él se describe la anatomía de la raíz de frijol tepari y los cambios en el tamaño celular de los tejidos y del órgano ocasionados por estrés hídrico en plantas que han crecido en sustratos con Ψ_A diferente.

En el capítulo cuarto se hizo un análisis de la acumulación de proteína soluble en plántulas de frijol tepari crecidas en condiciones de estrés hídrico, donde se describe el método generado para su cuantificación y como separar en geles de poliacrilamida (PAGE) proteínas de alto peso molecular.

Además se mencionan aspectos importantes sobre la bioquímica y naturaleza de éstas. Finalmente se presenta una discusión sobre las adaptaciones de frijol tepari a ambientes estresantes y como este trabajo contribuirá a responder algunas preguntas al respecto.

LITERATURA CITADA

- Boyer, J.S. 1982. Plant productivity and environment. *Science* 218: 443-448.
- Bartel, D., E. Souer. 2004. Molecular responses of higher plants to dehydration. En: Hirt, H., C. Shinosaki (eds.) *Plant responses to abiotic stress*. Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg, Germany. Pp: 9-37.
- Hirt, H. 2004. Introduction. En: Hirt, H., C. Shinosaki (eds.) *Plant responses to abiotic stress*. Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg, Germany. *Plant responses to abiotic stress*. Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg, Germany. Pp: 1-7.
- Jones, M.M., N.C. Turner, C.B. Osmond. 1981. Mechanisms of drought resistance. En: Pelag L.G., D. Aspinall (eds.) *The physiology and biochemistry of drought resistance in plants*. Academic Press. Australia. Pp: 15-37
- Kozlowski, T.T., S.G. Pallardy. 2002. Acclimation and adaptive responses of woody plants to environmental stresses. *The Botanical Review* 68: 270-334.
- Nabhan, G.P., R.S. Felger. 1978. Teparies in southwestern North America. A biogeographical and ethnohistorical study of *Phaseolus acutifolius*. *Economic Botany* 32: 2-19.
- United Nations Environment Programme. 2007. *Global Environment Outlook GEO4, environment for development*. United Nations Environment Programme, by Progress Press Ltd, Malta.
- Wood, J.A. 2005. Eco-physiological adaptations to limited water environments. En: Jenks, A.M., P.M. Hasegawa (eds.) *Plant abiotic stress*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK. Pp: 1-10.

Capítulo 1

Frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) su adaptación a la sequía y la respuesta de la raíz a los factores estresantes

Frijol tepari

De acuerdo con Freytang y Debouck (2002) el frijol tepari pertenece a la sección *Acutifolii* del género *Phaseolus* y las plantas de esta sección son: enredaderas anuales delicadas, de cuatro metros de longitud aproximadamente, con raíz típica, foliolos laminares principalmente angostos y alargados. Inflorescencias cortas, con pocas flores, bractéolas cortas de 1-3 mm de largo, estigma lateral introrso, vainas principalmente comprimidas, carpelo con suturas pronunciadas y generalmente cubiertas con tricomas uncinados distintivos. Los eofilos (hojas primarias) de las plántulas son peciolados cortamente menos de un centímetro de largo y usualmente reducidos a los pulvinulos. La sección *Acutifolii* es pequeña y consiste solo de dos especies que son *Phaseolus acutifolius* y *Phaseolus parvifolius* y sus variantes. (Freytag y Debouck, 2002).

Buhrow (1983) menciona que son conocidas cuatro formas de *P. acutifolius*. Las variedades domesticadas de la variedad *latifolius* (Freeman, 1912), las variedades silvestres de la variedad *latifolius*, las variedades silvestres de la variedad *acutifolius* y las variedades silvestres de la variedad *tenuifolius*, que son comúnmente conocidas como frijol tepari por los nativos del noroeste de México y suroeste de Estados Unidos.

Las variantes silvestres se encuentran creciendo en cañones, bancos de arena y pie de colinas, en el desierto y áreas secas del suroeste de Estados Unidos y noroeste de México.

Además, su distribución se extiende hacia el sur, a través del área central seca del altiplano de México hasta el centro de Chiapas y Guatemala. Las plantas de frijol tepari

cultivado *Phaseolus acutifolius* A Gray. var *latifolius* según Freytang y Debouck (2002) son enredaderas trepadoras pequeñas, de 1 a 4 m de longitud, estípulas lanceoladas fuertemente, 4-nervadas adpresas. Hojas 6.5-20 cm de largo, pecíolo delgado, 2-6.8 cm de largo, pulvínulo estriado, fuertemente uncinado; foliolo terminal ampliamente ovado, 4-6.4 cm de largo, 2.2-3.7 cm de ancho y proporción largo: ancho del foliolo terminal 1.7, con base aguda; foliolos laterales básicamente de la misma forma que el foliolo terminal, pero ligeramente delgados y uniequiláteros, 3.8-5.6 cm de largo y 2.0-3.3 cm de ancho.

Inflorescencia peduncular de 2-5 cm de largo, densamente urcinada, raquis 1-3 cm de largo con 2-5 flores, densamente urcinadas; brácteas primarias triangulares a lanceoladas, fuertemente 1-nervadas, 2-2.5 mm de largas y 0.3-0.5 mm de anchas.

Color de flores de violeta a blanco de 15-20 mm de longitud, cáliz ampliamente campánulado 3-4 mm de largo. Vainas rectas o ligeramente curvadas, generalmente redondeadas y algunas veces aplanadas 7.3-10 cm de largo y 10.5-13 mm de ancho, con 6-8 tabiques, valvas con dehiscencia explosiva y únicamente enrolladas con la dehiscencia.

Semillas de de tonalidad oscura y colores que varían del negro al rojo; de formas angulares y redondeadas o completamente planas, pequeñas, 5-7 mm de largo, 3.5-7.5 mm de ancho y 2.5-5.5 mm en grosor (Cuadro 1).

Nabhan y Felger (1978) hacen una comparación de las características morfológicas entre los frijoles teparis cultivados y silvestres, las cuales se sintetizan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Comparación entre tepari silvestre y tepari domesticado (*Phaseolus acutifolius*). Tomado de Nabhan y Felger (1978).

Carácter	Silvestre	Domesticado
Forma de crecimiento	Efímero(anual)	Efímero (anual)
Hábito	Enredadera polinodal con entrenudos largos	Enredadera polinodal con entrenudos largos o cortos o semiarbustiva
Forma de los foliolos	Casi lineal a ovado lanceolados	Ovado lanceolados
Dehiscencia de las vainas	Explosiva	Débil y tardía
Longitud de la vaina	30-75 m	50-90 mm
Ancho de la vaina	3-9 mm	8-13 mm
Semillas por vaina	2-10 (6 en promedio)	2-7 (4 en promedio)
Longitud de semilla	3.4-6.3 mm	6.6-12.0 mm (8.6 mm en promedio)
Ancho de semilla	2.5-4.5 mm	4.4-7.8 mm (5.8 mm en promedio)
Peso de semilla (seco)	17-58 mg	130-220 mg (150 mg en promedio)
Retraso de germinación	Sí	No
Color de semilla	Verde-café moteado, negro	Blanco, naranja-café, negro, ante, moteado

Estado actual de frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray)

Pratt y Nabhan (1998) mencionan que la presencia de frijol tepari tanto en forma domesticada como formas silvestres en el desierto de Sonora nos harían pensar en esta zona como su centro de diversidad y centro de origen. Sin embargo, las evidencia arqueológica existente en el suroeste de Estados Unidos, no soportan los argumentos para plantear la domesticación temprana de frijol tepari en el área. Kaplan (1965) menciona que la presencia de frijol tepari en excavaciones de cavernas de hace 5000 años en el área de Tehuacan dan evidencias arqueológicas para mencionar que los sitios de domesticación de frijol tepari son los valles semiaridos por sombra de agua del sur de México. Así la fecha más temprana para la domesticación de frijol tepari se traslapa con la de frijol y maíz en un sentido temporal y espacial. Sin embargo Pratt y Nabhan (1998) permanecen en desacuerdo con la domesticación de frijol tepari en el valle de Tehuacan exclusivamente y mencionan al atiplano de Jalisco como un posible candidato para la domesticación de frijol tepari.

Pratt y Nabhan (1988) mencionaron que en esta especie han ocurrido periodos de erosión genética severa en el transcurso de su historia y señalan que se perdió considerable variación genética en los teparis domesticados al inicio del siglo pasado, cuando las tribus Papago de Norteamérica abandonaron la agricultura tradicional, para adoptar la agricultura con irrigación. En la actualidad, otros factores que contribuyeron a la pérdida de poblaciones silvestres de esta especie son: La degradación del hábitat por el sobre pastoreo, el fuego intencional y sobre explotación de leña y la eliminación del hábitat debido a cambios de uso del suelo que incluyen el corte de los arroyos, conversión de la vegetación, urbanización y desmonte para cultivos comerciales. Por otra parte, los cambios climáticos y la desertificación que han sucedido en México durante la última cuarta parte del siglo XX también afectaron la permanencia de muchas poblaciones silvestres de frijol tepari. Además, el énfasis exclusivo del mejoramiento de frijol *P. vulgaris*, tanto en México como en Estados Unidos, ha conducido a que las variedades de tepari locales permanezcan en unas cuantas localidades entre Arizona y Sonora sin mejorar (Pratt y Nabhan, 1988). Debido a esto, deben realizarse muchos esfuerzos para contribuir al conocimiento y conservación de frijol tepari.

Influencia de factores ambientales sobre el crecimiento y desarrollo de frijol tepari

Desde su descripción agronómica (Freeman, 1913) se ha considerado al frijol tepari como un cultivo adaptado a la sequía. Se ha documentado que *P. acutifolius* tiene mayores rendimientos que *P. vulgaris*, en ambientes secos, donde es común el déficit de humedad en el suelo y el aire, temperaturas altas y ambientes salino. A continuación se hace

referencia a los trabajos que destacan la influencia de los factores ambientales sobre el crecimiento y desarrollo de frijol tepari.

Tolerancia a sequía

De acuerdo con Montoya (1985), *P. acutifolius* tiene características que le permiten una eficiencia alta en el uso de agua. En su estudio reportó que la planta cuenta con estomas que son sensibles a la disminución del potencial de agua en las hojas, un sistema radical profundo y la capacidad de movimiento de sus hojas (paraheliotropismo) que también fue reportado por Yu y Vergs (1994).

Pearson y Davis (1978) realizaron estudios con el fin de explicar la capacidad del *P. acutifolius* para soportar condiciones extremas de sequía. Los citados autores descubrieron mecanismos fisiológicos de adaptación como: temperatura baja en las hojas, niveles de clorofila constante, valores medios de transpiración y cambios morfológicos como hojas pequeñas y delgadas. Comparativamente *P. acutifolius* tiene la capacidad de cerrar sus estomas a potencial hídrico más bajo que *P. vulgaris* (Thomas y Waines 1981). Sin embargo, Serrano (1963) encontró que la transpiración fue significativamente mayor en frijol tepari que en el *P. vulgaris* y se debió a que en frijol tepari, los estomas permanecieron abiertos durante periodos de temperatura alta y humedad relativa baja, mientras que los estomas del *P. vulgaris* permanecieron cerrados en estas condiciones.

Coyne y Serrano (1963) realizaron estudios sobre los cambios diurnos de los sólidos solubles, carbohidratos y tasas de respiración en *P. acutifolius* y *P. vulgaris*. Encontraron

que *P. acutifolius* tiene la capacidad de mantener la fotosíntesis bajo deficiencias de agua y proporciona los sustratos para el mantenimiento de una tasa de respiración casi normal. Los mismos autores señalan además que, dado que los sólidos solubles de las hojas de frijol son una característica altamente heredable, este valor puede proporcionar un índice útil de selección para desarrollar tolerancia a la sequía.

Varios estudios han demostrado que *P. acutifolius* conserva y optimiza el uso de agua en condiciones de sequía posponiendo la deshidratación (Markhart, 1985; Castonguay y Markhart, 1991; Castonguay y Markhart, 1992).

Se han demostrado que *P. acutifolius* es más resistente al estrés hídrico que *P. vulgaris* (Montoya, 1985). Sin embargo, Lazcano y Lovatt (1999) encontraron que plantas estresadas de *P. acutifolius* acumularon 55% menos materia seca en el tallo y 70% menos en la raíz en comparación con *P. vulgaris* con 14% y 24% en el tallo y la raíz, respectivamente; además, el contenido relativo de agua (CRA) se mantuvo alto en el tallo de plantas estresadas de *P. acutifolius* en contraste con *P. vulgaris*. Sin embargo, se ha encontrado que dentro de la especie hay variación considerable respecto a su tolerancia al estrés hídrico (Montoya, 1985)

Mohamed y Tawfik (2007) mostraron que los rendimientos altos de semilla de frijol tepari bajo condiciones de agua limitada son en parte el resultado del mecanismo de escape a la sequía de frijol tepari y está condicionada por el aumento de la masa de la raíz y la resistencia estomática acompañada con un potencial osmótico celular bajo.

Tolerancia a temperaturas altas

El comportamiento de plantas de *P. acutifolius* ante las temperaturas altas se ha estudiado desde etapas muy tempranas de su desarrollo. En germinación, Scully y Waines (1987) reportaron que *P. acutifolius* tarda un día más en germinar a temperaturas de 10 y 14 °C que *P. vulgaris*, mientras que a 16 °C tarda un día menos en germinar que *P. vulgaris*. En un intervalo de 10 a 35 °C se encontró que *P. vulgaris* y *P. acutifolius* tardan el mismo tiempo en germinar excepto para 35 °C donde *P. acutifolius* germina más rápido. Por lo tanto, el intervalo óptimo de temperatura para la germinación de *P. acutifolius* es de 25 a 35 °C. Estos resultados indican que una vez superada una temperatura crítica mínima, el metabolismo de germinación es más activo en algunos *P. acutifolius* que en *P. vulgaris*. Estos autores señalaron que la imbibición y germinación rápidas de *P. acutifolius* puede ser un mecanismo adaptativo que permite el uso inmediato del agua de lluvias en condiciones áridas. Los frijoles tepari de los desiertos mexicanos no germinan con las lluvias de invierno debido a las condiciones frías del suelo y las plantas se observan únicamente en sus hábitats nativos en la estación húmeda de verano.

Scully y Waines (1988) encontraron que en condiciones de campo los frijoles tepari emergen 1.5 días más temprano que *P. vulgaris* a una temperatura de 18-28 °C. Evaluando el efecto de la temperatura en el desarrollo vegetativo con un sistema de unidades calor, se encontró que el *P. vulgaris* tiene una temperatura base media menor que *P. acutifolius* y requiere más unidades calor para llegar a antesis. Además, se demostró que hay diferencias genotípicas dentro de especies en la respuesta a la temperatura base

requerida y las unidades calor para llegar a antesis. Así, los frijoles tepari produjeron rendimientos altos bajo condiciones calientes de verano, pero rendimientos bajos en condiciones de primavera temprana en dos localidades de California en comparación con *P. vulgaris*. Por su parte, Marsh y Davis (1985) encontraron que *P. acutifolius* disminuyó el número de vainas ante el aumento de temperatura de (26.7, 32.2 y 37.3 °C) en exposiciones cortas en etapa vegetativa y llenado de grano, mientras que en el inicio de la floración se observó un ligero aumento sólo a 32.2 °C. Undomprasert *et al.* (1995) realizaron una serie de experimentos para determinar el punto en el cual el nivel de citocininas en la raíz es importante en la tolerancia al calor por la planta. Se realizaron injertos recíprocos entre un *P. acutifolius*, tolerante al calor y una recolecta de *P. vulgaris* sensible a calor. En los resultados preliminares se encontró que *P. acutifolius* conto con niveles altos de citocininas en la raíz y hojas en comparación con *P. vulgaris* en todas las condiciones de calor. Sin embargo, las temperaturas altas (45/45 °C) en raíz y tallo la concentración de citocininas disminuyó en los genotipos evaluados. El injerto recíproco entre raíz de *P. acutifolius* y vástago de *P. vulgaris* incrementó el nivel de citocininas en las hojas pero no la actividad fotosintética. Los autores llegaron a la conclusión de que el nivel de citocininas en la raíz no es importante para determinar la tolerancia al calor.

Rainey y Griffiths (2005) encontraron que las accesiones de frijol tepari evaluadas en su estudio son capaces de amarrar un número sustancial de vainas y semillas en condiciones de temperatura alta (32-35°) en comparación con líneas tolerantes a calor que permanecieron sin producir vainas bajo condiciones similares.

Tolerancia a la salinidad

En condiciones de campo los frijoles son expuestos a salinidad y temperatura alta durante su germinación en las regiones con clima semiárido; esto se debe a que la germinación se presenta a unos cuantos centímetros de la superficie del suelo, donde la sal se acumula por el movimiento ascendente del agua con la evaporación y la temperatura del suelo es mayor a la óptima para la germinación de algunos frijoles. Así, la temperatura alta y los niveles de sal en el suelo interactúan disminuyendo el porcentaje de germinación.

Goertz y Coons (1989) compararon la germinación de recolectas de *P. acutifolius* y *P. vulgaris*, en distintas concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) y temperaturas altas. Se encontró que *P. vulgaris* germinó menos que *P. acutifolius* con una concentración alta de sal en todos los intervalos de temperaturas evaluadas. Sin embargo, las semillas germinadas con alta concentración de NaCl no mostraron plántulas vigorosas. En general, *P. acutifolius* fue más tolerante al NaCl que *P. vulgaris*.

Goertz y Coons (1991), mostraron que *P. acutifolius* tolera mejor la concentración de -0.9 MPa de NaCl que *P. vulgaris* durante la germinación y la emergencia. A una concentración de -1.5 MPa no se observó la emergencia de plantas de ninguna de las dos especies. Se encontró que *P. acutifolius* tiende a mantener el potencial osmótico e hídrico mayor en un rango de 0.0 a -1.5 MPa utilizadas en este experimento. Por otra parte, el área foliar se redujo más en *P. vulgaris* que en *P. acutifolius* durante dos semanas de crecimiento.

Zaiter y Mahfouz (1993) encontraron que en cultivo hidropónico, las plantas de *P. acutifolius* mostraron los efectos de la salinidad con niveles menores que las de *P. vulgaris*. Mientras que, en cultivo en arena las plantas de *P. acutifolius* como de *P. vulgaris* mostraron un buen nivel de tolerancia a los niveles de salinidad. Estos resultados mostraron que el mecanismo para tolerar la salinidad en *P. acutifolius* puede ser diferente al de *P. vulgaris*.

Lazcano y Lovatt (1997) realizaron un experimento para cuantificar el efecto de la salinidad en la capacidad de las hojas de *P. acutifolius* y *P. vulgaris* para sintetizar arginina y determinar la habilidad de estas dos especies para tolerar salinidad durante la fase de crecimiento vegetativo. La salinidad causó gran reducción de la materia seca del tallo en *P. acutifolius* en comparación con *P. vulgaris* en plantas cultivadas hidropónicamente; en cambio el crecimiento de la raíz no fue afectado por la salinidad en ninguna de las dos especies. En conjunto estos estudios, generan duda de que *P. acutifolius* realmente sea tolerante a la salinidad o la evite. Bajo condiciones de campo *P. acutifolius* tiene crecimiento rápido y sistema radical profundo que lo habilita para evitar la salinidad como fue señalado por (Mohamed y Tawfik ,2007)

Estudios anatómicos y morfológicos

Para *P. acutifolius* los estudios sobre su estructura (morfología y anatomía) son muy pocos, destaca el trabajo de morfología de Weis y Websters (1990) donde se analizaron los patrones de floración y fructificación. En ese estudio fueron delimitados los eventos de

antes y abscisión de flores o frutos inmaduros. Este tipo de estudios también son escasos en especies relacionadas como frijol *P. vulgaris*. Otros trabajos que relacionan aspectos del desarrollo de los primordios florales en *P. vulgaris* (Ojeaga, 1966) con aspectos de la anatomía y morfología general de *P. vulgaris*, donde además, se describe la morfología de las yemas reproductivas en diferentes etapas de desarrollo (Engleman, 1979). Otros trabajos sobre anatomía de frijol son el estudio anatómico y fisiología del aborto de la semilla (Yáñez, 1977) y el de infección de la semilla por antracnosis (Cárdenas, 1979). Estudios recientes sobre anatomía, morfología y fisiología en *P. vulgaris* se realizaron por Navea *et al.* (2002) y Navea (2003) concluyeron que la domesticación en *P. vulgaris* originó poblaciones con mayor proporción de parénquima en empalizada y mayor aborto estomático (estomas no desarrollados) en hojas como mecanismo adicional de control de la transpiración bajo condiciones de estrés hídrico, así como una reducción del xilema.

Estrés propiciado por condiciones ambientales

Las plantas están sujetas a múltiples situaciones de estrés que influyen adversamente en su crecimiento cuyo origen es causado por la inducción de disfunciones fisiológicas (Kozlowski, 1964; Kozlowsky y Pallardy, 1997). La preocupación por los impactos perjudiciales del estrés propiciado por alguna característica del ambiente en las plantas, ha restado importancia a algunos de sus efectos benéficos (Grierson *et al.*, 1982).

Es conocido que exposiciones cortas de la planta a condiciones extremas de abastecimiento de agua, temperatura o humedad y algunas combinaciones de estos

factores del ambiente, son esenciales para un desarrollo óptimo y/o protección de la planta a subsecuentes daños por variaciones extremas de las condiciones de su ambiente. Los incrementos lentos del estrés, inducen ajustes fisiológicos en las plantas y las protege de daños mayores (Kozlowski y Pallardy, 2002) y por lo general todas las plantas terrestres, en sistemas naturales o agrícolas, experimentan un abastecimiento de agua temporal y espacial heterogéneo. Dependiendo de la especie, las plantas podrán tener una disponibilidad de agua inadecuada en algún lugar o en algún tiempo durante su ciclo de vida.

Respuesta generalizada al estrés de agua

De acuerdo con Nilsen y Orcut (1996) se puede sugerir una progresión de eventos generalizada por el impacto de la limitación de agua en la mayoría de las plantas. Así, durante una limitación de agua, en el estado inicial, la presión de turgencia disminuye causando una reducción en la expansión celular y cambios en la distribución de los reguladores del crecimiento. La disminución del potencial de turgencia en el tejido, junto con un aumento de ácido abscísico libre en la hoja causa cierre estomático.

El cierre de estomas, reduce el flujo de agua a través del sistema y disminuye el CO_2 intercelular. La disminución de carbono intercelular puede estimular una reapertura de los estomas si la disminución del agua no ocurre rápidamente. Sin embargo, si la turgencia continúa disminuyendo, los estomas pueden continuar cerrados y la fotorespiración se puede incrementar. La reducción del flujo interno de carbón dentro de la hoja (reduce la

fotosíntesis) puede causar una movilización de almidón y parcialmente un incremento en la respiración.

De esta forma, una reducción en el potencial de agua (Ψ_A) del mesofilo (con o sin una reducción de la presión de turgencia) puede afectar la fisiología de las células en diferentes formas:

1. Una actividad química baja del agua puede causar un cambio en la estructura de la capa de hidratación de las proteínas y así reducir su eficiencia.
2. Las relaciones entre las membranas intercelulares de los cloroplastos, núcleo mitocondria, retículo endoplasmático, plasmalema y otros pueden cambiar debido a que su posición celular también puede modificarse.
3. Una pérdida de turgencia puede causar un cambio en la posición espacial de los canales de transporte y enzimas de las membranas y disminución del grosor de la membrana.
4. Un cambio en la presión celular, con la disminución del volumen de la célula que, a la vez, puede constreñir la entrada de los plasmodesmos.
5. La concentración de diversas moléculas en regiones específicas de la célula puede cambiar debido a la pérdida de agua en las regiones subcelulares.

Los fenómenos enlistados afectan la fisiología general de la célula y es posible observar los efectos en la planta (Nilsen y Orucut, 1996).

Efectos en el crecimiento

Cuando las limitaciones de agua en el sustrato aumentan el déficit de agua del tejido, se produce una reducción de la presión de turgencia (Sharp *et al.*, 1988) y debido a que la expansión celular es dependiente del Ψ_A las células en desarrollo se expandirán menos y su tamaño será pequeño (Boyer, 1970). La reducción del tamaño de las células tendrá consecuencias para los patrones de crecimiento de toda la planta, su magnitud dependerá del tiempo que dure la limitación de agua y la etapa fenológica en que ésta ocurra. Así, una limitación de agua al inicio del ciclo de crecimiento, reduce el área foliar y por consecuencia las ganancias de carbón disminuirían durante el crecimiento vegetativo debido a las hojas pequeñas. Por otra parte, si la reducción de la turgencia ocurre durante el desarrollo de la inflorescencia, el número de flores se reduce y posiblemente todo el esfuerzo reproductivo puede ser abortado, y si la limitación ocurre durante la maduración de los frutos, el llenado de las semillas se podría inhibir y la abscisión de los frutos podría ocurrir (O'Toole y Chang 1979).

Mecanismos por los cuales las plantas compensan la limitación de agua

Jones *et al.* (1981) mencionan que las plantas difieren ampliamente en su capacidad para sobrellevar las deficiencias de humedad en el suelo. Las diferencias, en general se refieren a la capacidad para mantener la hidratación (Ψ_A) y el contenido relativo de agua (CRA) en sus tejidos. Así, los mecanismos con los que las plantas pueden compensar las limitaciones de agua son tan variados como el número de especies de plantas que son

tolerantes al estrés de agua que existen. Dentro de las comunidades vegetales que sufren de alguna limitación temporal de agua, se encuentran especies sobreviviendo con alguna combinación de mecanismos para compensar la limitación de agua. (Turner, 1986 y Nilsen y Orcut, 1996)

Turner (1986) menciona que los mecanismos de tolerancia a la sequía pueden ser divididos en aquellos que evitan las condiciones secas en el suelo y aquellos que resultan en tolerar la reducida disponibilidad de agua. Mediante mecanismos que mantienen el Ψ_A alto en el tejido y aquellos que resultan en una caída significativa en el Ψ_A del tejido. Ninguna de estas categorías es mutuamente excluyente y muchos de los mecanismos individuales son dependientes de otros mecanismos para resolver el problema de las limitaciones de agua (Jones *et al.*, 1981; Turner, 1986) y algunos de ellos se sintetizan en el Cuadro 2.

Escape a la sequía

Wilson y Witcombe (1985) mencionan que las plantas con capacidad de escape a la sequía son conocidas como efímeras. Estas plantas, aparecen rápidamente después de lluvias intensas formando comunidades extensas en los desiertos. Estas especies crecen rápido y producen semillas antes de que el abastecimiento de agua del suelo se agote. Se considera que las plantas efímeras no tienen mecanismos fisiológicos, morfológicos y bioquímicos para lidiar con el déficit de agua. No obstante, es conocido que muchas

efímeras de verano, tienen una anatomía tipo “Kranz”, típica del metabolismo fotosintético C4, el cual es más eficiente en el uso de agua (Mulroy y Rundel, 1977).

Cuadro 2. Mecanismos por los cuales las plantas pueden tolerar o escapar de las limitaciones de agua (tomado de Nilsen y Orcut, 1996).

I: Escape a la sequía

- A. Desarrollo fenológico rápido
- B. Plasticidad en el desarrollo (defoliación)
- C. Latencia extendida (dormancia)

II: Tolerancia a la sequía con potencial de agua bajo

- A. Mantenimiento del potencial de turgencia
 - 1. Ajuste osmótico
 - 2. Incremento o disminución de los módulos de elasticidad
 - 3. Disminución en el volumen celular
 - 4. Disminución en el volumen simplástico y volumen apoplástico
- B. Tolerancia a la desecación
 - 1. Tolerancia protoplasmática
 - 2. Pocos plasmodesmos

III: Tolerancia a la sequía con potencial de agua alto

- A. Reducción en la pérdida de agua
 - 1. Disminución de la conductancia foliar
 - 2. Disminución del área foliar de la copa
 - 3. Regulación de la temperatura de la hoja
 - B. Mejorar la acumulación de agua
 - 1. Incremento de la densidad de la raíz y profundidad
 - 2. Incremento de la conductancia eléctrica
 - 3. Incremento de la capacitancia
 - 4. Esfuerzo hidráulico
-

Las efímeras, aparentemente sobreviven a ambientes áridos debido a su crecimiento rápido y plasticidad. Hay muchos casos de maduración rápida, varias de estas plantas pueden llegar a producir sólo un par de hojas después florecen y maduran su semillas, en un tiempo muy corto, aunque en años húmedos su hábito de crecimiento indeterminado les permite producir gran cantidad de semillas (Nabhan y Felger, 1985).

Nilsen y Orcut (1996) mencionan que el escape a la sequía es la habilidad de las plantas para completar su ciclo de vida antes de que se presente un déficit de agua severo. Las plantas con mecanismos de escape a las limitaciones de agua, normalmente se relacionan con un aspecto del desarrollo del ciclo de vida en especies anuales y/o un estado del desarrollo fenológico en plantas perennes. Otra forma de escape a la sequía se observa en especies con un órgano perenne subterráneo que les permite sobrevivir hasta que las condiciones de humedad son adecuadas. Las especies con tubérculos, cormos o bulbos, comúnmente tienen una capacidad alta de almacén de agua y cuentan con periodos de rebrote para producir hojas flores y semillas.

Las especies perennes también usan cambios en su desarrollo para evitar periodos temporales de limitación de agua. Es relevante mencionar los periodos de pérdida de hojas de las plantas de climas mediterráneos o desiertos. Las especies deciduas de lugares secos sobreviven a los periodos de estrés de agua en un estado latente (Nilsen y Muller, 1982)

Tolerancia a la sequía con Ψ_A bajo en los tejidos

En algunas especies, los procesos metabólicos continúan a pesar de que el Ψ_A del tejido disminuye. Los mecanismos usados por las especies para continuar su metabolismo a un Ψ_A bajo son diferentes de aquellos usados por las plantas que mantiene un Ψ_A alto en sus tejidos durante las limitaciones de agua. Frecuentemente las especies utilizan una combinación de mecanismos para moderar la disminución del Ψ_A del tejido y mantener las

actividades metabólicas. Las especies que utilizan estos mecanismos, son capaces de tolerar periodos de baja disponibilidad de agua, sin llegar a un estado de latencia, experimentando Ψ_A bajo.

Turner (1986) señala el ajuste del potencial osmótico (Ψ_s) como uno de los más importantes mecanismos que permite que el potencial de turgencia (Ψ_t) se mantenga con Ψ_A bajos. Un ajuste osmótico verdadero ocurre cuando se incrementan los solutos osmóticamente activos en el simplasto sin algún cambio en la proporción de agua en el mismo. Otros mecanismos que se mencionan son cambios en la elasticidad del tejido. Los incrementos o disminuciones de la elasticidad del tejido han sido considerados como un mecanismo de tolerancia a la baja disponibilidad de agua. Así, si la elasticidad disminuye, la célula puede mantener el potencia de presión (Ψ_p) ante un gran déficit de agua celular.

Por otra parte Sperry y Tyree (1988) mencionan que la cavitación de elementos del vaso en el sistema vascular interrumpe el flujo de agua de la raíz a las hojas. Por una parte, existen especies que cuentan con estructuras en el xilema que impiden los embolismos y su tejido vascular está protegido contra la cavitación cuando existen condiciones de estrés de agua. Algunos científicos argumentan que las plantas que son susceptibles a cavitación pueden hacer mejor uso del agua durante los periodos de baja disponibilidad de agua (Sperry y Tyree, 1988; Sperry y Sullivan, 1991).

Algunas especies, particularmente plantas vasculares inferiores, son tolerantes a contenidos de agua muy bajos en su tejido, estas especies pueden tener pocos

plasmodesmos, tolerar un citoplasma muy concentrado (muchos solutos) y tener una pared celular tolerante a la desecación (Gaff, 1997).

Tolerancia a la sequía con Ψ_A alto en los tejidos

Muchas especies pueden resistir a las limitaciones de agua manteniendo un Ψ_A alto en sus tejidos. La habilidad para mantener alto el Ψ_A en el tejido cuando la disponibilidad de agua en el suelo disminuye o cuando la demanda atmosférica incrementa, incluye mecanismos que desacoplan la dinámica del flujo hidráulico normal, estos mecanismos pueden ocurrir a nivel de hoja, tallo o raíz. Las especies con estos mecanismos no utilizan ajuste osmótico o cambios en la elasticidad de la pared celular (Parker 1968, Nilsen y Orcut ,1996)

Algunas plantas puede reducir la cantidad de agua que usan, por cambios en la conductancia foliar, particularmente durante periodos de alta demanda atmosférica de agua. Así, una disminución de la conductancia durante un periodo con presión de vapor atmosférico alta puede reducir el impacto negativo de la demanda atmosférica de agua sobre el Ψ_A celular (Fanjul y Jones, 1982). El cierre estomático puede también reducir la transpiración en respuesta a baja disponibilidad de humedad del suelo. En este caso, cuando las raíces perciben un déficit, mandan una señal a las células guarda las cuales inducen cierre estomático y la señal es probablemente mediada por ácido abscísico (ABA) (Bates y Hall, 1981).

En muchas comunidades vegetales, se ha observado la disminución del área foliar para reducir la pérdida de agua. Donde se presenta un dimorfismo temporal en las hojas,

predominando hojas chicas en la temporada seca y hojas comparativamente grandes en la temporada húmeda (Gill y Mahall, 1986). Por otra parte, otras especies presentan tallos fotosintéticos verdes que compensan una reducción en el área foliar (Gibson, 1983).

Ajustes del potencial osmótico

Se sabe que el Ψ_A en el tejido es la suma del potencial osmótico (Ψ_s) y potencial de presión o la presión de turgencia (Ψ_p). Así, cuando Ψ_A del tejido disminuye, un cambio en el Ψ_s puede ser capaz de mantener el Ψ_p a un Ψ_A que podría resultar en una pérdida de turgencia del tejido. Se ha encontrado que los cambios en la concentración de solutos se asocian a perturbaciones ambientales, tales como incrementos en la salinidad, temperatura baja y disminución de la humedad (Slatyer, 1967; Passioura, 1982; Nobel, 1983). El ajuste osmótico puede ser un mecanismo efectivo para mantener la presión de turgencia durante el estrés moderado de agua. El mantenimiento de la presión de turgencia permitirá mantener a los estomas abiertos manteniendo la conductancia estomática alta y por consecuencia la fotosíntesis con la ganancia de carbono. Sin embargo, si la disminución del agua se prolonga por tiempo largo, el ajuste osmótico no es capaz de sobrellevar los efectos perjudiciales de las limitaciones de agua (Nilsen y Orcut, 1996).

Jones *et al.* (1981) mencionaron que el término ajuste osmótico en plantas superiores, se refiere al abatimiento del potencial osmótico originado por la acumulación neta de solutos en respuesta al déficit de agua o la salinidad. Además, distingue la acumulación activa de

solutos de la concentración pasiva de éstos. Estos autores recomiendan además, que se use el término ajuste osmótico sólo para designar la acumulación de solutos en plantas superiores en respuesta al déficit de agua o a salinidad y que el término osmoregulación y la regulación de turgencia sea usado cuando se refiere a plantas inferiores o microorganismos.

En plantas, el ajuste osmótico es un mecanismo importante de tolerancia a la sequía (Jones *et al.*, 1981). La evidencia acumulada hasta el momento muestra que el ajuste osmótico ocurre en hojas, hipocótilos, raíces y órganos reproductivos de varias especies de plantas. Se conocen varios factores que influyen en la cantidad de ajuste osmótico, como el nivel del déficit de agua, la tasa de desarrollo del estrés, las condiciones ambientales, el órgano de la planta y las especies.

El ajuste osmótico permite mantener el alargamiento celular en Ψ_A reducidos. En algunas especies se ha reportado un crecimiento mayor si la turgencia se mantiene en el ápice de la raíz. Así, el volumen del suelo explorado en la búsqueda de agua aumenta (Hsiao *et al.*, 1976).

Prolina

La acumulación de prolina es una respuesta metabólica común de las plantas superiores al déficit de agua y ha sido ampliamente revisada en los últimos años (Stewart y Larher, 1980; Samaras *et al.*, 1995, Rhodes *et al.*, 1986). Su papel en el ajuste osmótico en muchas

especies de plantas en diversas condiciones de estrés, lo hace importante en la fisiología vegetal.

En el área apical de la raíz de maíz, la prolina es el soluto de mayor importancia alcanzando concentraciones de 120 mM a un Ψ_A de -1.6 MPa, contribuyendo con cerca del 50% del ajuste osmótico en la región apical (Voetberg y Sharp, 1991). Debido a que la raíz de maíz es conocida por sintetizar prolina (Oaks *et al.*, 1970), se desconoce hasta la fecha si el aumento en la disposición de prolina en la región apical es consecuencia del incremento en el transporte hacia el ápice o existe una síntesis de prolina *de novo* en el ápice (Voetberg y Sharp, 1991). Over y Sharp (1994) documentaron que en la raíz de maíz la concentración de prolina aumentó en el ápice en sustrato con Ψ_A bajos. Así, Verslues y Sharp (1999) encontraron que la prolina se concentro específicamente en la zona de elongación de la raíz y en la zona apical no se encontraron evidencias de su incremento.

Raymond y Smirnoff (2002) investigaron la acumulación de prolina en el ápice de la raíz de maíz en Ψ_A reducidos. Concluyeron que la prolina se acumuló a un Ψ_A bajo y esta fue importada del endospermo de las plántulas. Además, reportaron que en los tejidos apicales de la raíz hubo una tasa reducida de oxidación de la prolina dando evidencias de que en la zona apical la prolina no es utilizada. En otro estudio, Xiong *et al.* (2002) encontraron que la remoción del endospermo disminuyó la acumulación de prolina en la raíz en un Ψ_A bajo, mostrando que la prolina efectivamente fue importada de otras partes de la plantula.

Acido abscísico (ABA)

Hose *et al.* (2002) menciona que el ABA juega un papel relevante como una hormona de estrés en plantas y usualmente su biosíntesis se incrementa bajo algún estrés. Después de su transporte desde las células de origen, el ABA mejora las relaciones hídricas de las plantas terrestres permite el cierre de los estomas y afectando el crecimiento de los meristemas.

Hose *et al.* (2000) mencionan que las raíces son capaces de sintetizar ABA y que las concentraciones de ABA en la raíz son muy variables dentro de especies de plantas y entre raíces de plantas individuales de la misma especie. Además, se ha reportado un gradiente longitudinal de concentración en la raíz. Así, los primeros milímetros cercanos al ápice presentan mayor concentración que el resto de la raíz. El ABA se distribuye en compartimentos alcalinos de la célula de la raíz y se ha encontrado que la concentración citosólica es diez veces más alta que la concentración vacuolar. Se conoce que muchos genes son inducidos durante la sequía, son regulados por la hormona vegetal ABA, estos genes requieren niveles altos de ABA para su expresión (Cohen y Bray, 1990).

La biosíntesis del ABA se origina de una ramificación de la vía de los carotenoides (Bartels y Seur, 2003) y muchas enzimas para la biosíntesis del ABA son sobre reguladas por la deshidratación. El ABA se forma en el tejido verde por una ruta indirecta vía zeaxantina y xantona. Perry y Horgan (1992) mostraron que las raíces contienen todos los precursores, que son necesarios para la formación de ABA vía carotenoides; sin embargo, su

concentración es muy baja. En plantas intactas el ABA puede ser liberado desde el ápice del tallo al ápice de la raíz. Saab *et al.* (1990) utilizaron Fluoridona para prevenir la formación de pigmentos que son precursores de ABA como zeaxantina en plántulas de maíz y encontró que la concentración de ABA se mantuvo siempre en cantidades residuales y nunca alcanzó niveles de cero.

En la biosíntesis de ABA todos los pasos enzimáticos requieren oxígeno y por consecuencia la biosíntesis de ABA se retrasa por exceso de agua. La acumulación de ABA en el ápice de la raíz depende de las importaciones y las exportaciones vía el floema y el xilema respectivamente. Zhang y Davies (1987, 1989) encontraron en un gradiente de suelo seco incremento en la concentración de ABA en el tejido de la raíz. Sin embargo, no encontraron un nivel de humedad del suelo para que inicie la acumulación.

Funciones del ABA en la raíz

Se sabe que todos los factores ambientales relacionados con el déficit de agua en el suelo resultan en la acumulación de ABA en el tejido de la raíz (Bartels y Souer, 2003). Mediante experimentos con raíz dividida en maíz, Blakcman y Davies (1985) mostraron que los estomas se cerraron aún cuando el Ψ_A se mantuvo en valores altos en las hojas. Estos datos mostraron que las raíces perciben algún estímulo relacionado con el estatus del agua en el suelo y sintetizan un mensajero químico que posiblemente es ABA y es enviado al tallo.

Con respecto a los mecanismos de transporte de ABA en las raíces, se conoce que el ABA puede ser transportado lateralmente a través de la endodermis en raíces de frijol hacia el cilindro central (Hartung, 1975). Teniendo en cuenta que la difusión es la principal forma de transporte de ABA dentro de la célula, la permeabilidad de la membrana determina la velocidad de la distribución de ABA dentro de las células de la raíz y de los tejidos.

Sinnot (1960) describió las respuestas morfológicas y fisiológicas de la raíz en sequía y Trewabas y Jones (1991) demostraron que ABA genera respuestas similares al evaluar el crecimiento de la raíz de maíz en Ψ_A reducidos y mostraron que: los ápices de la raíz continuaron creciendo, aun cuando el desarrollo del tallo fue completamente inhibido y la concentración de ABA en el ápice de la raíz se incrementó substancialmente. Así, al mantener el crecimiento de la raíz a Ψ_A bajos e incrementar la concentración de ABA interno, se asocia con una acumulación substancial de prolina y con un incremento de la actividad de la xiloglucan endotransglucosilasa sobre expansinas (Sharp *et al.*, 1988; Saab *et al.*, 1990; Sharp, 1990). Por otra parte, el ABA incrementa y mantiene la tolerancia a la sequía y la desecación en embriones de semillas maduras (Ingram y Bartels, 1996).

Estructura de la raíz

La anatomía de la raíz es compleja y con estructura variable entre y dentro de especies. Hay diferencias considerables entre grupos taxonómicos especialmente entre angiospermas y gimnospermas, monocotiledóneas y dicotiledóneas, entre hábitats y a lo largo de raíces individuales (Esau, 1977). Diferencias comunes en la estructura incluyen la

muerte de las células de la epidermis y en algunas especies las células del córtex entero, desarrollo de aerénquima en el córtex, desarrollo de endodermis y exodermis (con paredes modificadas y engrosadas por paredes completas o bandas dentro de una pared y suberina en la lámina media) y la producción de peridermis (Steudle y Peterson, 1998). Por otra parte, es importante notar que muchos trabajos publicados sobre anatomía de raíz se han realizado con plantas jóvenes, creciendo en ambientes controlados. Así, mucho de lo que conocemos de las funciones de la raíz se ha entendido a partir de estudios con raíces de plántulas creciendo en soluciones, de tal forma que la actividad exacta de un elemento en particular de la raíz dentro de un sistema de raíces creciendo en el suelo permanece desconocido.

Estructura primaria de la raíz

En su crecimiento primario, las raíces muestran una separación clara entre sus tejidos. La epidermis (dérmico), el córtex (fundamental) y el xilema y el floema (vascular) que en la mayoría de las raíces de dicotiledóneas, forma un cilindro central. Pero en monocotiledóneas, forma un cilindro alrededor de una médula. Estos tres tejidos forman un conjunto de células visibles en cortes transversales y longitudinales (Esau, 1977).

En raíces jóvenes, la epidermis es un tejido especializado en absorción, incluyendo pelos radicales que son células especializadas que se han modificado a proyecciones y que se originan de la epidermis, los cuales reciben el nombre de tricoblastos (Bibikova y Gilroy, 2003). La formación de pelos radicales es un proceso complejo, regulado por muchos

genes y son también sensibles a una gran variedad de estímulos ambientales. La función del los pelos radicales es aumentar la superficie de absorción. De acuerdo con Bates y Lynch (1996) los pelos radicales constituyeron el 91% de área total de la superficie de la raíz en *Arabidopsis*. Gregory (2006) menciona que los pelos radicales varían ampliamente en longitud y frecuencia a lo largo de una raíz pero estos tienen, típicamente de 0.1-1.5 mm de longitud y 5-20 μm en diámetro y en cantidad varían de 2 / mm^2 en raíces de algunos árboles hasta 50-100/ mm^2 en algunas raíces de pastos o *proteáceas*. Usualmente el tamaño de la zona de pelos radicales es pequeño debido a que los pelos radicales tienen una vida corta de pocos días o semanas.

El tejido vascular, se encuentra principalmente dentro del cilindro vascular y consiste de xilema y floema y una o más capas de tejido no vascular en forma intercalada o en patrones bien definidos como el periciclo, el cual rodea el tejido vascular. El cilindro central de la raíz de muchas dicotiledóneas consiste de un núcleo xilema primario en parches o flamas que se proyectan hasta antes del periciclo (Esau, 1977), entre los parches de xilema primario se encuentran los parches de floema primario. El número de parches de xilema varía entre especies y entre raíces de la misma especie. El número de parches se usa frecuentemente para designar a la raíz como diarca, triarca, tetarca, etc.

En el crecimiento primario de la raíz, el primer elemento del xilema que pierde su contenido y madura (el protoxilema) es aquel que está cercano al periciclo, mientras que aquellos que están cercanos al centro son típicamente elementos del metaxilema los cuales maduran después y comúnmente tienen paredes secundarias con punteaduras

rebordeadas. Como se ha visto con el xilema primario de la raíz, el floema de la raíz muestra un orden centrípeto de diferenciación con el protofloema cerca del periciclo y metafloema cerca del centro de la raíz. Las células del periciclo son células de parénquima con pared primaria que pueden lignificarse.

Estructura secundaria de la raíz

De acuerdo con Esau (1985) las raíces que presentan crecimiento secundario y por consecuencia, xilema secundario son las raíces leñosas de dicotiledóneas. La literatura clásica y los libros de texto de anatomía vegetal (Esau, 1977; Mauseth, 1988; Dickison, 2000) mencionan que la estructura del xilema secundario de la raíz en angiospermas y en particular de dicotiledóneas tiene las características de una madera fibrosa. De esta forma la estructura del xilema secundario de la raíz y el tallo estará formada por: el sistema axial y el sistema radial dentro de cada uno se encuentran distintos tipos celulares asociados entre sí en cuya descripción se siguen las recomendaciones del comité de IAWA (1989, 2004). En este contexto se ha observado que la estructura del xilema secundario del tallo ha sido extensivamente estudiada, mientras que la anatomía del xilema secundario de la raíz ha recibido mucho menos atención (Mauseth y Stone-Palmquist, 2001). Mauseth y Stone-Palmquist (2001) compararon el xilema secundario del tallo con el xilema secundario en la raíz de muchas cactáceas y encontraron que la raíz tiene todo el intervalo de variación estructural que ha sido encontrado en el tallo.

Los argumentos presentados, nos indican que tanto el xilema secundario de la raíz como el xilema secundario del tallo comparte toda la diversidad estructural que se presenta en el xilema secundario del tallo que hasta el momento se tiene conocido, debido a que todo parece indicar que el cámbium vascular, es el meristemo secundario que da origen a la madera en tallos y raíces es el mismo y que permite formar el continuo de xilema entre raíz y tallo para permitir un transporte eficiente desde la raíz, pasando por el tallo y continuando en la parte aérea.

Funciones de la raíz

Gregory (2006) menciona que la raíz tiene varias funciones simultáneas; proporciona una plataforma estable a la parte aérea que permite a los órganos fotosintéticos interceptar luz y también provee una red que puede explotar agua y nutrientes del suelo. Sin embargo, la disponibilidad y movimiento de los recursos dentro del suelo es altamente variable y frecuentemente la raíz se somete a condiciones ambientales variables.

El anclaje es ampliamente reconocido como una de las principales funciones del sistema de la raíz, pero el entendimiento cuantitativo es muy escaso comparado con otras funciones como la absorción de agua y nutrientes. Hay muchas razones del escaso conocimiento de esta función, además de la complejidad del tema. Ennos (2000) reportó un estudio amplio de la física del anclaje y la interacción con la morfología de la raíz.

El agua acarrea nutrientes hacia la raíz, es el solvente y medio de muchas reacciones bioquímicas entre las plantas y el suelo. Para las plantas terrestres, el suelo es la fuente de

agua y la adquisición de agua del suelo por las raíces y ha sido uno de los grandes temas en la investigación suelo/planta. La demanda de nutrientes está dada por el metabolismo de la planta y la planta ejerce un control sobre la entrada de nutrientes y otros iones.

Existen un gran número de imprecisiones sobre el entendimiento de cómo se absorbe el agua por la raíz, principalmente debido a la complejidad de la estructura y función de ésta, la interacción entre la raíz y el suelo que modifica su establecimiento, las diferencias en la organización espacial del sistema de la raíz entre especies y los ciclos de crecimiento de la raíz. Otro inconveniente que se ha presentado es que el estudio de la raíz requiere el conocimiento detallado de conceptos de física, química y biología (Nobel, 1999; Tinker y Nye, 2000). Para entender completamente el movimiento del agua desde el suelo hasta su evaporación hacia la atmósfera en la hoja.

Desarrollo del sistema de la raíz

Las plantas normalmente pasan por una secuencia predecible de estados entre la germinación y la madurez. El progreso de esta secuencia y la duración de los estados son afectados por las condiciones ambientales. El orden de los estados está determinado genéticamente y sólo puede ser alterado por ambientes extremos.

Así, las plantas perennes y las anuales se distinguen por estados de desarrollo en su estructura aérea. Para la raíz, el desarrollo también se presenta en una forma ordenada, esto es mucho menos conocido y descripciones cuantitativas son escasas (Gregory, 2006).

Crecimiento de la raíz

El desarrollo del sistema de la raíz se inicia con la emergencia del eje radical y emergencia de ramas laterales, para formar raíces laterales de primer orden, las cuales en su turno generan ramas para formar raíces laterales de segundo orden y así, sucesivamente en orden creciente. Pero el crecimiento solo se presenta en las zonas meristemáticas del tallo y la raíz donde este fenómeno fisiológico se repite.

El límite proximal de la parte en crecimiento de la raíz es relativamente cercano al ápice, donde el crecimiento de la células cesa es entre 5.2, 7.0 y 10 mm del ápice en *Pisum*, *Zea* y *Vicia* respectivamente (Torrey, 1965). La división celular está confinada al intervalo apical entre 1 y 3 mm en muchas raíces, mientras que el alargamiento rápido de las células está confinado a los primeros 10 mm después del ápice. De acuerdo con Webster y MacLeod (1996) una célula puede dedicar varios días en el meristemo, incrementando su tamaño al doble en el inter de cada ciclo mitótico. Una célula puede tardar en alargarse y salir del área meristemática de 5 a 15 horas, durante este tiempo la célula se extiende a una tasa relativa de 20 a 50% e incrementa su longitud por un factor de 10 a 20 (Ivanov, 1983). En el lado contrario o lado distal de la coleorriza las células también dejan de dividirse y llegan a alargarse. Así, una célula que es desplazada a lo largo de la columna de la coleorriza de *Convolvulus* incrementa su longitud en factor de 4 desde su origen en el ápice hasta su desprendimiento en periferia de la coleorriza (Phillips y Torrey, 1974).

LITERATURA CITADA

- Bates, L.M., A.E. Hall. 1981. Stomatal closure with soil water depletion not associated with changes in bulk water status. *Oecologia* 50: 62-65.
- Bates, T.R., J.P. Lynch. 1996. Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorus availability. *Plant, Cell and Environment* 19: 529-538.
- Bartel, D., E. Souer. 2004. Molecular responses of higher plants to dehydration. En: Hirt, H., C. Shinosaki (eds.) *Plant responses to abiotic stress*. Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg, Germany. Pp: 9-37.
- Bibikova, T., S. Gilroy. 2003. Root hair development. *Journal of Plant Growth Regulation* 21: 383-415.
- Blackmann, P.G., W.J. Davies 1985. Root to shoot communication in maize plants and the effect of soil drying. *Journal of Experimental Botany* 6: 39-48.
- Boyer, J.S. 1970. Leaf enlargement and metabolic rates in corn, soybean, and sunflower at various leaf water potentials. *Plant Physiology* 46: 233-235.
- Buhrow, R. 1983. The wild beans of south western North America. *Desert Plants* 5: 67-88.
- Cárdenas, S.E. 1979 Cambios anatómicos en la semilla de *Phaseolus vulgaris* durante la infección por *Colletotrichum lindemuthianum*. Tesis de Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.
- Castonguay, Y., A.H. Markhart. 1991. Saturated rates of photosynthesis in Water stressed leaves of common bean and tepary beans. *Crop Science* 31: 1605-1611.
- Castonguay, Y., A.H. Markhart. 1992. Leaf gas exchange in water stressed common bean and tepary bean. *Crop Science* 32: 980-986.
- Cohen, A., E.A. Bray 1990. Characterization of three mRNAs that accumulate in wilted tomato leaves in response to elevated levels of endogenous-abscisic acid. *Planta* 182: 27-33.
- Coyne, D.P., J.L. Serrano. 1963. Diurnal variation of soluble solids. Carbohydrates and respiration rates of drought tolerant and susceptible bean species and varieties. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 83: 453-460.

- Davies, J.W., J. Zhang. 1991. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annual Review, Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 55-76.
- Dickison, W.C. 2000. *Integrative plant anatomy*. Academic Press. Orlando, USA.
- Engleman, E.M. 1979. Anatomía y morfología. En: E.M. Engleman (ed.) *Contribuciones al conocimiento del frijol (Phaseolus) en México*. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. Pp: 23-37.
- Ennos, A.R. 2000. The mechanics of root anchorage. *Advances in Botany Research* 33: 133-157.
- Esau, K. 1985. *Anatomía vegetal*. Tercera edición revisada y puesta al día. Ediciones Omega. Barcelona, España.
- Esau, K. 1977. *Anatomy of seed plant* 2nd. Edition. John Wiley and Sons. Inc. New York. U.S.A.
- Fanjul, L., H.G Jones. 1982. Rapid stomatal responses to humidity. *Planta* 154: 135-138.
- Freeman, G.F. 1913. The tepary a new cultivated legume from the southwest. *Botanical Gazette* 56: 395-417.
- Freeman, G.F. 1912. Southwestern beans and teparies. *University of Arizona Agricultural Experimental Station Bulletin* 68: 573-619.
- Freytag, G.F., D.G. Debouck. 2002. Taxonomy, distribution and ecology of the genus *Phaseolus* (Leguminosae-Papilionoideae) in North America, México and Central America. *Sida. Botanical Miscellany*.
- Gaff, D.F. 1997. Mechanisms of desiccation tolerance in resurrection vascular plants. En: Basra, A. S. y R. K. Basra (eds.) *Mechanisms of environmental stress resistance in plants*. Harwood Academic Publishers, London. Pp: 43-58.
- Gibson, A.C. 1983. Anatomy of photosynthetic old stems of nonsucculent dicotyledons from North American deserts. *Botanical Gazette*. 144: 347-362.
- Gill, D.S., B.E. Mahall. 1986. Quantitative phenology and water relations of an evergreen and a deciduous shrub species at a common chaparral site. *Ecological Monographs* 56: 127-143.

- Goertz, S.H., J.M. Coons. 1989. Germination response of tepary and navy beans to sodium chloride and temperature. *Hortscience* 24: 923-925.
- Goertz, S.H., J.M. Coons. 1991. Tolerance of tepary and navy beans to NaCl during germination and emergence. *Hortscience* 26: 246-249.
- Gregory, P. 2006. *Plant root Growth, activity and interaction with soils*. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Grierson, W., J. Solule, K. Kawada. 1982. Beneficial aspects of physiological stress. *Horticultural Review* 4: 247-271.
- Hartung, W.B. 1975. Lokalization des akropetalen transport von ^{14}C abscisinsäure in wurzeln von *Phaseolus coccineus* L. Undhinweisefur einen radialtransport von ABA Zwinchen zentralzylinderund rindezylinder. *Planta* 122: 53-59.
- Hose, E., E. Steudle, W. Hartung. 2000. Abscisic acid and hydraulic conductivity of maize roots: a root cell pressure probe study. *Planta* 211:874-882.
- Hose, E., A. Sauter, W. Hartung. 2002 . Abscisic acid in roots -biochemistry and physiology. En: Waisel, Y., A. Eshel, U. Kafkafi. (eds.) *Plant roots. The hidden half*. Marcel Dekker, Inc. New York. USA. Pp: 435-448.
- Hsiao, T.C., E. Acevedo, E. Fereres, D.W. Henderson. 1976. Water stress, growth, and osmotic adjustment. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 273: 479-500.
- IAWA Committee. 1989. List of microscopic features for hardwood identification. *IAWA Bull.n.s.* 10: 219-332.
- IAWA Committee. 2004. list of microscopic features for softwood identification. *IAWA Journal* 24: 1-70.
- Ingram, J., D. Bartels. 1996. The molecular basis of the dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 377-403.
- Jones, M. M., N.C. Turner, C.B. Osmond. 1981. Mechanisms of drought resistance. En: Pelag L.G., D. Aspinall (eds.) *The physiology and biochemistry of drought resistance in plants*. Academic Press. Australia. Pp: 15-37

- Kaplan, L., T.F. Lynch. 1998. *Phaseolus* (Fabaceae) in archeology: AMS radiocarbon dates and their significance for Pre-Colombian agriculture. *Economic Botany* 53: 261-272.
- Kozlowski, T.T. 1964. Shoot growth in woody plants. *The Botanical Review* 30: 335-392.
- Kozlowski, T.T., G.S. Pallardy. 1997. *Physiology of Woody Plants*. Academic Press. New York, USA.
- Kozlowski, T.T., S.G. Pallardy. 2002. Acclimation and adaptive responses of woody plants to environmental stresses. *The Botanical Review* 68: 270-334.
- Lazcano F.I., C.J. Lovatt. 1997. Effect of salinity on arginine biosynthesis in leaves of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. acutifolius* A. Gray. *Crop Science* 37: 469-475.
- Lazcano F.I., C.J. Lovatt. 1999. Relationships between relative water content, nitrogen pools and growth of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. acutifolius* A. Gray during Water deficit. *Crop Science* 39: 467-475.
- Markhart III, A. H. 1985. Comparative water relations of *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus acutifolius* Gray. *Plant Physiology* 77: 113-117.
- Marsh, L.E., D.W. Davis. 1985. Influence of high temperature on the performance of some *Phaseolus* species at different developmental stages. *Euphytica* 34: 431-439.
- Mauseth, J.D. 1988. *Plant Anatomy*. The Benjamin Cummings Publishing Company Inc. Manlo Park, USA.
- Mauseth, J.D., M.E. Stone-Palmquist. 2001. Root wood differs strongly from shoot wood within Individual plants of many Cactaceae. *International Journal of Plant Sciences* 162: 67-776.
- Mohamed, M.F., A.A. Tawfik. 2007. Intact plant, callus and field grain yield responses of tepary bean to drought. *Journal Agronomy & Crop Science* 193: 305-312.
- Montoya, C.L. 1985. Respuesta del frijol tepari *Phaseolus acutifolius* Gray var. *latifolius* Freeman a dos regímenes de humedad en el suelo. Tesis de maestría, Centro de Botánica del Colegio de Postgraduados. Chapingo, México
- Mulroy, T.W., P.W Rundel. 1977 Annual plants: adaptation to desert environments. *Bio Science* 27: 109-114.

- Nabhan G.P., R.S. Felger. 1985. Wild desert relatives of crops: Their direct uses as food. En: Wikens, G. E., J. R. Goodin, D.V. Field. (eds.) Plant for arid Land: Proceedings of the Kew international conference on economic plant for arid lands. Unwin Hyman Ltd, Kew, England. Pp: 19-33.
- Nabhan, G.P., R.S. Felger. 1978. Teparies in southwestern North America. A biogeographical and ethnohistorical study of *Phaseolus acutifolius*. Economic Botany 32: 2-19.
- Navari-Izzo, F., N. Rascio. 2002. Plant response to water-deficit conditions En: Pessaraki M. (Ed.) Handbook of plant and crop stress. Second edition revised and expanded. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. Pp: 231-270.
- Navea C., T. Terrazas, A. Delgado-Salinas, P. Ramírez. 2002 Foliar response of wild and domesticated *Phaseolus vulgaris* L. to water stress. Genetic Resources and Crop Evolution 49: 125-132
- Navea T. C. R. 2003. Efecto de la domesticación de *Phaseolus vulgaris* L. sobre la respuesta anatómica del déficit hídrico. Tesis para obtener el grado de doctor en ciencias (biología), Universidad Nacional Autónoma de México. México. 74p.
- Nilsen, E.T., D.M. Orcutt. 1996. The physiology of plants under stress. John Wiley & Sons Inc. New York. USA.
- Nilsen, E.T., W.H. Muller. 1982. The influence of photoperiod on drought induction of dormancy in *Lotus scoparius* (Nutt. in T & G). Oecologia. 53:79-83.
- Nobel, P.S. 1983, Biophysical plant physiology and ecology. W.H. Freeman. San Francisco, USA.
- Nobel, P.S. 1999. Physicochemical and environmental plant physiology. 2^a edn. Academic Press. New York, USA.
- Ober, S.E., R.E. Sharp. 1994. Proline accumulation in maize (*Zea mays* L.) primary roots at low water potentials. I. Requirement for increased level of abscisic acid. Plant Physiology 105: 981-987.
- Ojeaga, O.O. 1966. The development of flower primordia of *Phaseolus vulgaris* (L) Savi. Annals of Botany 30:487-492.
- O'toole, J. C., T. T. Chang. 1979. Drought resistance in cereals: rice, a case study. En: H Mussell and RC Staples (eds.), Stress Physiology of Crop Plants. Wiley-Interscience, New York, USA. Pp: 373-40.

- Passioura, J.B. 1982. Water in the soil plant atmosphere continuum. En: O.L.Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond, H. Ziegler (eds.) Encyclopedia of plant physiology, New series, vol. 12b. Springer-Verlag, Berlin. Pp: 5-33.
- Perry, A. D., R. Horgan. 1992. Abscisic acid biosynthesis in roots. I. The identification of potential abscisic acid precursors, and other carotenoids. *Planta* 187: 185-191.
- Peterson, C. A., E. Steudle. 1993. Lateral hydraulic conductivity of early metaxylem vessels in *Zea mays* L. roots. *Planta* 189: 288-97.
- Peterson, C. A., M. Murrmann, E. Steudle. 1993. Location of major barriers to water and ion movement in young roots of *Zea mays* L. *Planta* 190: 127-36.
- Phillips, H.L., J.G. Torrey. 1974. The ultrastructure of root cap in cultured roots of *Convolvulus*. *American Journal of Botany* 59:183-188.
- Pratt, R.C., G. Nabhan. 1988. Evolution and diversity of *Phaseolus acutifolius* genetic resources. En: Gepts, P. (ed.) Genetic resources of *Phaseolus* beans; their maintenance, domestication, evolution, and utilization. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holland. Pp: 409-440.
- Psaras, G.K., I. Sofroniou. 2004. Stem and root wood anatomy of the shrub *Phlomis fruticosa* (labiateae). *IAWA Journal* 25:71-77.
- Raymond, M.J., N. Smirnoff. 2002. Proline metabolism and transport in maize seedlings at low water potential. *Annals of Botany* 89: 813-823.
- Rhodes, D., S. Handa, R.A. Bressan. 1986. Metabolic changes associated with adaptation of plant cells to water stress. *Plant Physiology* 82: 890-903.
- Saab, I.N., R.E. Sharp, J. Pritchard, G.S. Voetberg. 1990. Increased endogenous abscisic acid maintains primary root growth and inhibits shoot growth of maize seedlings at low water potentials. *Plant Physiology* 93: 1329-1336.
- Samaras, Y., R.A. Bressan, L.N. Csonka, M.G. Garcia-Rios, M. Paino D'Urzo, D. Rhodes. 1995. Proline accumulation during drought and salinity. En: Smirnoff, N. (ed.) Environment and Plant Metabolism: Flexibility and Acclimation. Bios Scientific Publishers, Oxford, UK. Pp: 161-187.
- Scully, B., J.G. Waines. 1987. Germination and emergence response of common and tepary beans to controlled temperature. *Agronomy Journal* 79: 287-291.

- Scully, B., J.G. Waines. 1988. Ontogeny and yield response of common and tepary beans to temperature. *Agronomy Journal*. 80: 921-925.
- Serrano., J.L. 1963. Algunas diferencias fisiológicas y morfológicas de especies y variedades de frijol tolerantes a la sequía. *Agricultura Técnica en México*. 2:161-164.
- Sharp, E.R., W.K. Silk, T.C. Hsiao. 1988. Growth of the maize primary root at low water potentials. I Spatial distribution of expansive growth. *Plant Physiology* 87: 50-57.
- Sharp, R.E. 1990. Comparative sensitivity of root and shoot growth at low water potential. *British Society of Plant Growth Regulation Monogr* 21: 29-44.
- Sinnott, E.W. 1960. *Plant morphogenesis*. McGraw-Hill. New York, USA.
- Slatyer, R.O. 1967. *Plant-water relationships*. Academic Press. London, UK.
- Sperry, J.S., J.E.M. Sullivan. 1991. Xylem Embolism in Response to Freeze-Thaw Cycles and Water Stress in Ring-Porous, Diffuse-Porous, and Conifer Species. *Plant Physiology* 100: 605-613.
- Sperry, J.S., M.T. Tyree. 1988. Mechanism of water-stress induced xylem embolism. *Plant Physiology* 88: 581-587.
- Steudle, E., C.A. Peterson. 1998. How does water get through roots? *Journal of Experimental Botany* 49: 775-788.
- Steudle, E., M. Murrmann, C.A. Peterson. 1993. Transport of water and solutes across maize roots modified by puncturing the endodermis. Further evidence for the composite transport model of the root. *Plant Physiology* 103: 335-349.
- Stewart, C.R. 1981. Proline accumulation: Biochemical aspects. En: Paleg L.G., D. Aspinall (eds.) *Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants*. Academic Press, Sydney. Pp: 243-259.
- Thomas, C.C., J.G. Waines. 1981. Field comparison of rooting depth of *Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus acutifolius*. *Annual Report Bean Improvement Cooperative* 24: 61.
- Tinker, P.B., P.H. Nye. 2000. *Solute movement in the rhizosphere*. Oxford University Press. Oxford, UK.
- Torrey, J.P. 1965. Physiological bases of organization of development in the root. *Handbuch Pflanzenphysiologie* 15: 1256-1327.

- Trewavas, A.J., H.G. Jones. 1991. An assessment of the role of ABA in plant development. En: Davies, W.J., H.G. Jones (eds.) Abscisic acid physiology and Biochemistry. Bios Scientific. Oxford, UK. Pp: 169-188.
- Turner, N.C. 1986. Adaptation to water deficit: a changing perspective. Australian Journal of Plant Physiology 13: 175-190.
- Undomprasert, N., P.H. Li, D. W. Davis, A. H. Markhart III. 1995. Root cytokinin level in relation to heat tolerance of *Phaseolus acutifolius* and *Phaseolus vulgaris*. Crop Science 35: 486-490.
- Verslues, E.P., R.E. Sharp. 1999. Proline accumulation in maize (*Zea mays* L.) primary roots at low water potentials. II. Metabolic source of increased proline deposition in the elongation zone. Plant Physiology 119: 1349-1360.
- Webster, L.P., R.D. MacLeod. 1996. The root apical Meristem and its Margins. En: Waisel, Y. A. Eshel, U. Kafkafi (eds.) Plant Roots. The hidden half, 2nd edition. Marcel Dekker, Inc. New York. USA. Pp: 51-76.
- Weis, K.G., B.D. Webster. 1990. Flower and fruit development in tepary bean. Hortscience 25: 119-120.
- Xiong, L., K.S. Shumaker, J.K. Zhu. 2002. Cell signaling during cold, drought, and salt stresses. Plant Cell 14: 5165-5183.
- Yañes, J. P. 1977. Aborto de semillas de *Phaseolus vulgaris* L.: Morfología y ensayo con reguladores del crecimiento. Tesis de Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.
- Yu, F., S. Vergs. 1994. Control of paraheliotropism in two *Phaseolus* species. Plant Physiology. 106: 1567-1573.
- Zaiter, H.Z., B. Mahfouz. 1993. Salinity affect on root and shoot characteristics of common and tepary beans evaluated under hydroponic solution and sand culture. Journal of Plant Nutrition 16: 1569-1592.
- Zhang, J., W.J. Davies. 1987. Increased synthesis of ABA in Partially dehydrated root tips and aba transport from roots to leaves. Jouenal of Experimental Botany 38: 2015-2023.
- Zhang, J., W.J. Davies. 1989. Abscisic acid produced in dehydrating roots may enable the plant to measure the water status of the soil. Plant Cell Environment 12: 72-81.

Capítulo 2

Crecimiento y contenido de prolina en la raíz de plántulas de frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) en reacción al potencial de agua del sustrato

RESUMEN

En este estudio se evaluó el efecto de cuatro potenciales de agua (Ψ_A) de vermiculita a (-0.03, -0.07, -0.51 y -2.01 MPa) en el crecimiento longitudinal-radial y el contenido de prolina de la raíz principal de plántulas de cuatro cultivares de frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray var. *latifolius*). La raíz primaria mantuvo su crecimiento durante las primeras 24 horas en todos los Ψ_A evaluados. El crecimiento máximo se observó con Ψ_A de -0.07 y -0.51 MPa y ninguno de los Ψ_A afectó el crecimiento de la zona apical de la raíz. Además, en este segmento con el menor Ψ_A del sustrato se observó un incremento de la concentración de prolina, respecto a la concentración de la zona media de la raíz (25 a 35 mm desde el ápice). El crecimiento radial de los primeros 3 mm del segmento apical de la raíz disminuyó con los Ψ_A menores, pero este efecto no se observó en la sección de los primeros 5.0 mm del ápice.

Palabras clave: crecimiento de raíz, frijol tepari, potencial de agua, prolina en raíz.

SUMMARY

This research was conducted to learn the effect four water potentials (Ψ_w) -0.03, -0.07, -0.51 and -2.01 MPa in the vermiculite substrate on the longitudinal-radial growth and in the proline concentration in roots of four tepary beans cultivars (*Phaseolus acutifolius* A. Gray var. *latifolius*). The root maintained its growth through 24 hours in all water potential tested (Ψ_w). The maximum longitudinal growth was at Ψ_w of -0.07, -0.51 MPa. The apical growth zone was not affected by any Ψ_w substrate tested. On the other hand, in the apical root zone growing at low Ψ_w (-2.01 MPa) there was highest proline concentration in contrast with the middle root zone (25 a 35 mm after root cap). Radial root growth from the first apical 3.0 mm was diminished with the lowest Ψ_w however, this effect was not observed in the first apical 5.0 mm.

Key words: Root growth, tepary bean, water potential, root proline

INTRODUCCION

El déficit de humedad es el factor ambiental principal que reduce el crecimiento y la productividad de las plantas (Sharp *et al.*, 2004; Malamy, 2005). Estudios previos en maíz han mostrado que en la zona de elongación de la raíz primaria ocurren cambios morfológicos, bioquímicos, moleculares y biofísicos en respuesta a una reducción del potencial de agua (Ψ_A) (Wu *et al.*, 1996; Sharp *et al.*, 1988). Así, en plantas con estrés moderado por falta de agua el crecimiento neto de la raíz puede ser estimulado (van der Weele *et al.*, 2000). Se conoce que esta adaptación permitirá el desarrollo del sistema radical y el abastecimiento de agua en condiciones limitantes de humedad en el suelo (Ober y Sharp, 2003). Es bien conocido que en ambientes secos, donde el crecimiento del tallo se inhibe, la raíz puede continuar su crecimiento mediante elongación celular que se mantiene preferentemente hacia el ápice de la raíz (Sharp *et al.*, 1988 y Sharp *et al.*, 2004).

El frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) es una especie que ha sido considerada resistente a sequía, desde las primeras descripciones agronómicas hechas por Freeman (1913), y a la fecha, ha sido demostrado experimentalmente que *P. acutifolius* crece bien en ambientes secos donde son comunes las condiciones de déficit de humedad en el suelo, temperaturas altas en verano y suelo salino. Pearson y Davis (1978) realizaron estudios con el fin de explicar la capacidad del *P. acutifolius* para soportar condiciones extremas de sequía y descubrieron mecanismos fisiológicos de adaptación, tales como: niveles de clorofila constante, temperatura baja de las hojas, valores medios de

transpiración y cambios morfológicos en hojas y raíz (Castonguay y Markhart III, 1992). Markhart III (1985), Castonguay y Markhart III (1991 y 1992) encontraron que *P. acutifolius* conserva y optimiza el uso de agua en condiciones de sequía, y pospone la deshidratación mediante el crecimiento de la raíz.

Entre las especies de *Phaseolus* la mayor resistencia a la sequía la presenta *P. acutifolius* (Markhart III, 1985); sin embargo, Montoya en 1985 reportó que hay considerable variación entre cultivares. En los últimos años se ha presentado un renovado interés sobre frijol tepari entre los mejoradores de frijol *P. vulgaris* L. (Mohamed *et al.*, 2002), ya que se considera que el frijol tepari representa una fuente potencial de genes útiles para mejorar caracteres específicos relacionados con resistencia a la sequía. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes Ψ_A del sustrato en el crecimiento longitudinal-radial y el contenido de prolina de la raíz principal de plántulas de cuatro cultivares de frijol tepari (*P. acutifolius*) en condiciones de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron los cultivares de frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray), “Brown-Yellow-Red” (RYB), “Negro”, “Tohono Oodham” y “Blanco de Sinaloa”. Las semillas fueron multiplicadas en condiciones de invernadero en las instalaciones del Colegio de Postgraduados en Montecillo Texcoco, Estado de México, durante el ciclo primavera verano de 2004, después de la cosecha fueron almacenadas en condiciones de laboratorio, hasta su uso en la primavera de 2005.

Se seleccionaron semillas de forma y tamaño homogéneo. Cada semilla fue escarificada manualmente y desinfectada en una solución de hipoclorito de sodio comercial (Clorox®) al 10 % durante 10 min. Las semillas fueron germinadas a una temperatura de 25 ± 1 °C, en la oscuridad, en charolas con una inclinación de 35°, por 48 h. (Ellis *et al.*, 1985). Este tiempo fue suficiente para que la raíz principal alcanzara una longitud de 35 a 40 mm. En ese momento, se puso una marca con tinta china en la raíz de cada plántula a 2.0 mm del ápice y las plántulas fueron transplantadas dentro de tubos de cloruro de polivinilo (PVC) (40 mm de diámetro interno y 100 mm de longitud, sellados en la base con un fragmento de polietileno color negro detenido con una banda elástica, con vermiculita con Ψ_A de -0.03, -0.07, -0.51 y -2.01 MPa.

Los Ψ_A se obtuvieron al mezclar vermiculita seca con 100, 10, 8 y 6 partes de agua destilada, respectivamente (peso:volumen). Las mezclas fueron colocadas en bolsas de polietileno e incubadas por 48 h antes de transplantar las plántulas; así, se aseguró que el contenido de la bolsas alcanzara el equilibrio. Transcurrido este tiempo, el Ψ_A de la vermiculita se determinó incubando una muestra de cada bolsa en cámaras psicrométricas (Wescon C-52, Inc, Utha, USA), por 4 h, conectadas a un microvoltmetro de punto de rocío (Wescon HR-33T, Inc, Utha, USA).

Cada tubo fue cubierto con polietileno negro y ajustado con una banda elástica para mantener el Ψ_A de la vermiculita con los menores cambios posibles. Los tubos, con las plántulas, se mantuvieron por 24 h en la oscuridad a una temperatura de 25 ± 1 °C. Transcurrido el tiempo, las raíces fueron cosechadas y se cuantificó su crecimiento

longitudinal total, el desplazamiento de la marca de los 2 mm, su grosor a la altura de los primeros 3 mm del ápice. Los segmentos de la raíz fueron almacenados en una solución fijadora de FAA (formaldehído, ácido acético, alcohol y agua; Berlyn y Miksche, 1976) hasta su análisis, el que se realizó después de transferir los segmentos a una solución de GAA (glicerina, alcohol y agua, 1:1:1). El diámetro fue medido directamente de las imágenes de los segmentos del tejido vistos en un microscopio-estereoscopio y un analizador de imágenes (Media Cybernetics, 1997).

En segmentos equivalentes a los utilizados para la determinación de las dimensiones de la raíz, se cuantificó el contenido relativo de agua ($CRA = (Pf - Ps) / (Pt - Ps) \times 100$).

Mediante la determinación de Pf = peso fresco, Ps = peso seco y Pt = peso túrgido, de acuerdo con el método propuesto por Hellmuth (1970). También se determinó el contenido de prolina en la zona apical y la zona media de la raíz en muestras compuestas de seis raíces.

El contenido de prolina fue evaluado con el método calorimétrico descrito por Bates *et al.* (1973) y la concentración de prolina en el tejido se calculó con una curva de calibración de este aminoácido en una concentración máxima de 1000 nmoles.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos, en el que los factores y niveles fueron: los cultivares (Brown-Yellow-Red, Negro, Tohono Oodham Brown y Blanco de Sinaloa) y el Ψ_A del sustrato (-0.03, -0.07, -0.51 y -2.01 MPa), respectivamente. Las unidades experimentales fueron grupos de 4 a 12

plántulas y se realizaron cuatro repeticiones. Los datos fueron analizados con un análisis de varianza (Proc GLM) y una prueba de comparación de medias de Tukey con el programa estadístico SAS (SAS Institute, 1999-2000, versión 8.1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El Contenido relativo de agua (CRA) en la raíz de las plántulas que crecieron en la vermiculita a un Ψ_A de -0.03 MPa presentó valores entre 94 y 98%. Los Ψ_A entre -0.07, -0.51 y -2.01 MPa, disminuyeron en forma no significativa, entre 11 y 18% el CRA radical, respecto al Ψ_A de -0.03 MPa (Cuadro 1).

Cuadro 1. Contenido relativo de agua (%) y longitud de la raíz (mm) de plántulas de cuatro cultivares de frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) después de 24 horas en vermiculita con distintos potenciales de agua (Ψ_A).

Variable	Cultivar	Ψ_A del sustrato (MPa)				Promedio	C.V.(%)
		-0.03	-0.07	-0.51	-2.01		
CRA	Negro	94.5 a	80.1 b	79.3 b	78.3 b	83.1 a	
	Blanco	96.9 a	82.9 b	82.7 b	78.5 b	85.3 a	
	RBY	93.9 a	82.8 b	81.0 b	81.8 b	84.9 a	
	Tohono	97.8 a	80.3 b	79.9 b	79.2 b	84.3 a	
	Promedio	95.8 a	81.5 b	80.7 b	79.5 b		
	C.V. (%)	-	-	-	-	-	74.08
Longitud	Negro	25.6 f	35.4 a	36.4 a	26.9 ef	31.1 a	
	Blanco	27.3 edf	33.2 abc	31.2 bcd	28.6 def	30.1 a	
	RBY	26.4 f	34.7 ab	33.8 abc	25.3 f	30.0 a	
	Tohono	25.2 f	35.1 ab	35.4 a	30.5 cde	31.5 a	
	Promedio	26.1 c	34.6 a	34.2 a	27.8 b		
	C.V. (%)	-	-	-	-	-	27.05

Los datos son promedios de 40 raíces. Medias con letras iguales dentro de columnas son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05) dentro de cada Ψ_A y medias con letras iguales dentro de renglones son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05) dentro de cada cultivar. RBY.= cultivar Red-Yellow-Brown, C.V. = Coeficiente de Variación, CRA= Contenido relativo de agua.

El CRA ha sido utilizado como un índice simple y reproducible del estatus hídrico de los tejidos vegetales (Barrs, 1968; Mansfiel y Anderson, 1980). Los resultados de la presente investigación mostraron que la raíz de los cuatro cultivares de frijol tepari mantuvo su CRA alto, permaneció viva y mantuvo su crecimiento durante 24 h, en un sustrato con un Ψ_A entre -0.03 y -2.01 MPa. Resultados similares fueron obtenidos en la raíz de plántulas de maíz, soya, vigna, calabaza y algodón, cuando el Ψ_A del sustrato fue de -1.5 MPa (Sharp *et al.*, 1988). La raíz de *P. vulgaris* L. (silvestre y domesticado) y *Agave salmiana* también continuó su crecimiento en vermiculita con Ψ_A de hasta -2.5 MPa; además, también se ha observado diferencias en la respuesta del frijol silvestre respecto al domesticado (Sánchez Urdaneta *et al.*, 2003). Los resultados de la presente investigación mostraron que la raíz de los cuatro cultivares de frijol tepari se mantuvo hidratada aún cuando el sustrato en el que se permanecieron por 24 horas estuvo parcialmente deshidratado en el intervalo de Ψ_A de -0.07 a -2.5 MPa.

Los resultados mostraron que el crecimiento en longitud de la raíz continuó en los primeros milímetros de la raíz, en los cuatro cultivares de frijol tepari, durante las primeras 24 horas de permanencia en la vermiculita con los Ψ_A diferentes del sustrato. Cada cultivar mostró un crecimiento particular de su raíz en un intervalo de 30.0 a 31.5 mm de crecimiento. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en su crecimiento longitudinal (Cuadro 1). Estos resultados difieren de los obtenidos en raíces de frijol *P. vulgaris* L. (Sánchez-Urdaneta *et al.*, 2004) y otros cultivares de frijol tepari

(Mohamed *et al.*, 2002), pues en ambos casos si se observaron cambios significativos en el crecimiento de la raíz entre variantes domesticadas y silvestres respectivamente.

El Ψ_A de -0.03 MPa permitió que la raíz alcanzara una longitud de 26.1 mm; mientras que, con el Ψ_A de -2.01 MPa, la raíz alcanzó 27.8 mm. Por otra parte, una reducción del Ψ_A del sustrato de -0.03 a -0.07 MPa generó un aumento significativo de la longitud de la raíz en los cuatro cultivares de frijol, con un valor promedio de 34.6 mm. Este aumento se mantuvo (34.2 mm) aún en las plántulas que permanecieron en la vermiculita con uno de los Ψ_A menores, -0.51 MPa (Cuadro 1). Es conveniente subrayar el hecho de que, con el Ψ_A del sustrato más hidratado (-0.03 MPa) la raíz de los cuatro cultivares no alcanzó su máximo crecimiento longitudinal (Cuadro 1). Este comportamiento no había sido documentado anteriormente en plántulas de frijol tepari. Comúnmente, entre las diferentes especies, el crecimiento máximo de la raíz es favorecido con el potencial de agua del sustrato generado con -0.03 MPa, como fue observado en raíces de maíz y otras especies (Liang *et al.*, 1997; Sánchez-Urdaneta *et al.*, 2005). En contraste, el Ψ_A del sustrato de -2.05 MPa si propició la disminución del crecimiento longitudinal de raíz de los cuatro cultivares, pero no lo inhibió completamente. Sharp *et al.* (1988) encontraron que las raíces de maíz continuaron creciendo abajo de - 1.5 MPa, mientras que el desarrollo del tallo fue inhibido completamente.

La respuesta positiva de la raíz de plántulas de frijol tepari a los Ψ_A menores a -0.03 MPa, entre -0.07 y -0.51 MPa, puede estar relacionada con una adaptación específica a ambientes áridos, donde las raíces alcanzan su crecimiento máximo; este comportamiento

ha sido observado previamente en *Arabidopsis thaliana*, y otros cultivares de tepari, en diferentes estados fenológicos, en los que la deshidratación moderada del sustrato también estimuló el crecimiento de la raíz (van der Weele *et al.*, 2000; Mohamed *et al.*, 2002). Por otra parte, se ha documentado que en sustratos con Ψ_A cercanos a capacidad de campo, la raíz de algunas especies tienden a disminuir su crecimiento, propiciado por una deficiencia en la difusión de oxígeno en el medio que generalmente se encuentra muy hidratado. Bajo estas condiciones el tejido sufre hipertrofia por la acumulación de etileno (Levitt, 1980) y después forma aerénquima. Ninguno de estos efectos fue observado en las raíces de frijol tepari; sin embargo, su crecimiento sí disminuyó durante las 24 horas de evaluación.

La materia seca o biomasa de la raíz mostró diferencias significativas entre los cultivares. Los cultivares Negro y Blanco acumularon una cantidad significativamente mayor de biomasa (0.75 y 0.73 mg, respectivamente), respecto a Tohono y RYB (0.63 y 0.57 mg, respectivamente); pero, no mostraron diferencias significativas entre ellos dos, ni entre las dos últimas (Cuadro 2).

El Ψ_A del sustrato más hidratados y más deshidratado, -0.03 y -2.01 MPa, respectivamente, condujeron a la menor acumulación de biomasa en la raíz; mientras que con los Ψ_A del sustrato intermedios (- 0.07 y -0.51 MPa) la acumulación fue mayor (Cuadro 2).

Cuadro 2. Biomasa fresca (mg), biomasa turgente (mg) y biomasa seca (mg) de la raíz de plántulas de cuatro cultivares de frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray). Después de 24 horas en sustratos con diferentes potenciales de agua (Ψ_A).

Variable	Cultivar	Ψ_A del sustrato (MPa)				Promedio	C.V.(%)
		-0.03	-0.07	-0.51	-2.01		
P. Fresco	Negro	18.0 ab	18.6 ab	17.1 b	12.5 c	16.5 b	0.013
	Blanco	18.2 ab	18.0 ab	17.4 ab	14.0 c	16.9 ab	
	RBY	20.0 a	18.3 ab	17.1 b	11.6 c	16.8 ab	
	Tohono	19.7 ab	18.7 ab	18.0 ab	14.2 c	17.7 a	
	Promedio	19.0 a	18.4 bc	17.4 b	13.1 c		
	C.V. (%)	-	-	-	-	-	
P. Turgente	Negro	18.1 defg	23.6 a	21.4 abc	15.6 hg	19.7 b	0.018
	Blanco	18.6cdefg	21.4 abc	20.8 abcde	17.3 fgh	19.5 b	
	RBY	21.3 abcd	22.0 ab	21.1 abcde	14.2 h	19.7 b	
	Tohono	20.0 bcdef	23.1 ab	22.3 ab	18.0 efg	20.9 a	
	Promedio	19.5 b	22.6 a	21.4 a	16.3 c		
	C.V. (%)	-	-	-	-	-	
P. Seco	Negro	0.53 ef	0.90 ab	0.92 a	0.58 def	0.73 a	0.00011
	Blanco	0.66 abcdef	0.81 abcd	0.50 abc	0.70 abcde	0.75 a	
	RBY	0.64 bcdef	0.60 cdef	0.60 cdef	0.43 f	0.57 b	
	Tohono	0.57 def	0.67 abcdef	0.73 abcde	0.58 def	0.63 b	
	Promedio	0.6 b	0.74 a	0.77 a	0.57 b		
	C.V. (%)	-	-	-	-	-	

Los datos numéricos son medias de 40 raíces. Medias con letras iguales dentro de columnas son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05) dentro de cada Ψ_A y medias con letras iguales dentro de renglones son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05) dentro de cada cultivar. RYB.= Variedad Red-Yellow-Brown. C.V. = Coeficiente de Variación.

En general, entre los cultivares, la biomasa acumulada mostró una tendencia de cambio similar al crecimiento longitudinal. Experimentalmente se ha demostrado que la acumulación de materia seca disminuyó con el estrés hídrico en las raíces de las plántulas de frijol, agave y maíz (Sharp *et al.*, 1988; Sánchez-Urdaneta *et al.*, 2003).

Se observaron diferencias significativas en el diámetro de la raíz entre los cultivares, en cada punto intermedio a lo largo de los primeros tres milímetros de la raíz. El cultivar RYB tuvo el diámetro mayor, los cultivares Blanco y Tohono presentaron los diámetros menores en cada zona medida, excepto a los 0.5 y 2.0 mm del ápice, donde el diámetro menor lo presentó el cultivar Negro (Figura 1).

El efecto del Ψ_A del sustrato sobre el diámetro de la raíz fue no significativo a 0.5 mm del ápice y sólo a partir del primer milímetro se observaron diferencias significativas. El crecimiento radial mayor lo presentaron las raíces con el Ψ_A de -0.03 MPa, en contraste las de menor diámetro se obtuvieron con los Ψ_A de -0.07, -0.51 y -2.01 MPa, y no mostró diferencias significativas entre los tres Ψ_A (Figura 1).

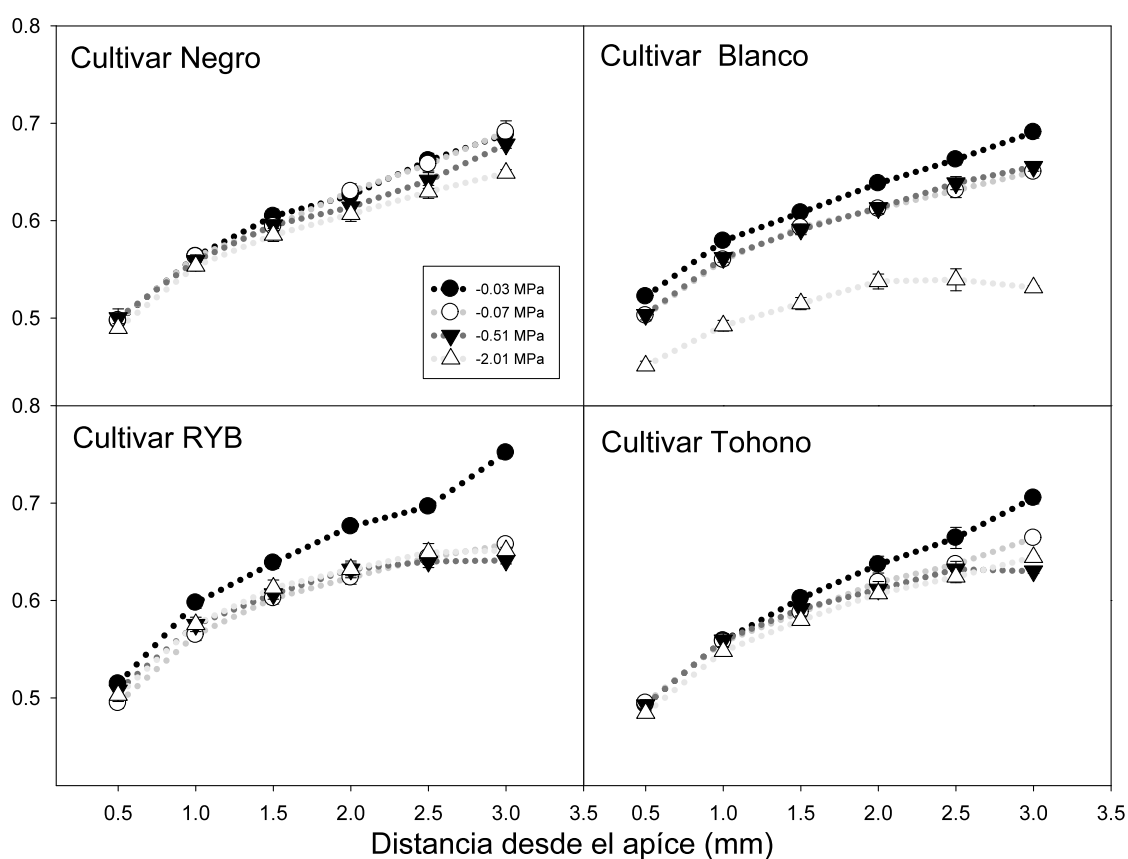


Figura 1. Diámetro de la raíz de frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) en el segmento de la raíz de 0 a 3.0 mm. Las graficas individuales corresponden a un cultivar los símbolos representan el Ψ_A del sustrato en el que las raíces crecieron: Ψ_A de -0.03 MPa (○), -0.07 MPa (●), -0.51 MPa (△) y -2.01 MPa (▼). Cada punto representa el promedio del diámetro de la raíz de 0 a 3.0 mm en cada Ψ_A del sustrato \pm el error estándar.

En general, se observó un incremento del diámetro de la raíz desde el ápice hacia el cuello, diferente para cada cultivar y cada potencial de agua. Este incremento fue debido a cambios morfológicos programados por el desarrollo de este órgano. De acuerdo con Liang *et al.* (1997), la respuesta morfológicas de la raíz al ambiente en el que se desarrolla, debe ser estudiado tomando en cuenta los cambios propios de crecimiento y desarrollo de la raíz. Así, a lo largo de los 3.0 mm observados, el diámetro de raíz en los diferentes Ψ_A del sustrato mostró diferencias significativas, excepto en los primeros 0.5 mm, la zona más cercana al ápice; lo que indica, que el frijol tepari es poco o no afectado en el segmento de la raíz cercano al ápice por los Ψ_A bajos del sustrato. El efecto similar fue observado en las raíces de maíz (Sharp *et al.*, 1988).

Al evaluar los diámetros de las raíces se encontró que las raíces más gruesas correspondieron con el Ψ_A de -0.03 MPa, mientras que con -2.01 MPa, se observaron las raíces más delgadas. Así, se comprobó que los Ψ_A del sustrato son determinantes en el crecimiento radial de raíces de frijol tepari. Al respecto, se ha documentado que el diámetro de la raíz primaria de plantas con estrés de agua es menor que el de las plantas bien hidratadas. En general, se ha observado que el déficit de agua induce raíces delgadas como fue observado para la raíz primaria de maíz. (Sharp *et al.*, 1988) y *A. thaliana* (van der Weele *et al.*, 2000).

La concentración de prolina en la zona apical mostro diferencias significativas entre los cultivares. El cv. Negro mostró la concentración significativamente mayor, entre los cultivares RYB y Blanco similar, mientras que el cultivar Tohono mostró la menor

concentración entre los cuatro cultivares (Figura 2). En la zona apical la concentración de prolina mostró diferencias significativas entre los Ψ_A del sustrato. Los cuatro cultivares con el Ψ_A menor (-2.01 MPa) incrementaron la concentración de prolina, mientras con el sustrato más hidratado (Ψ_A de -0.03 MPa) los cuatro cultivares acumularon la concentración menor (Figura 2).

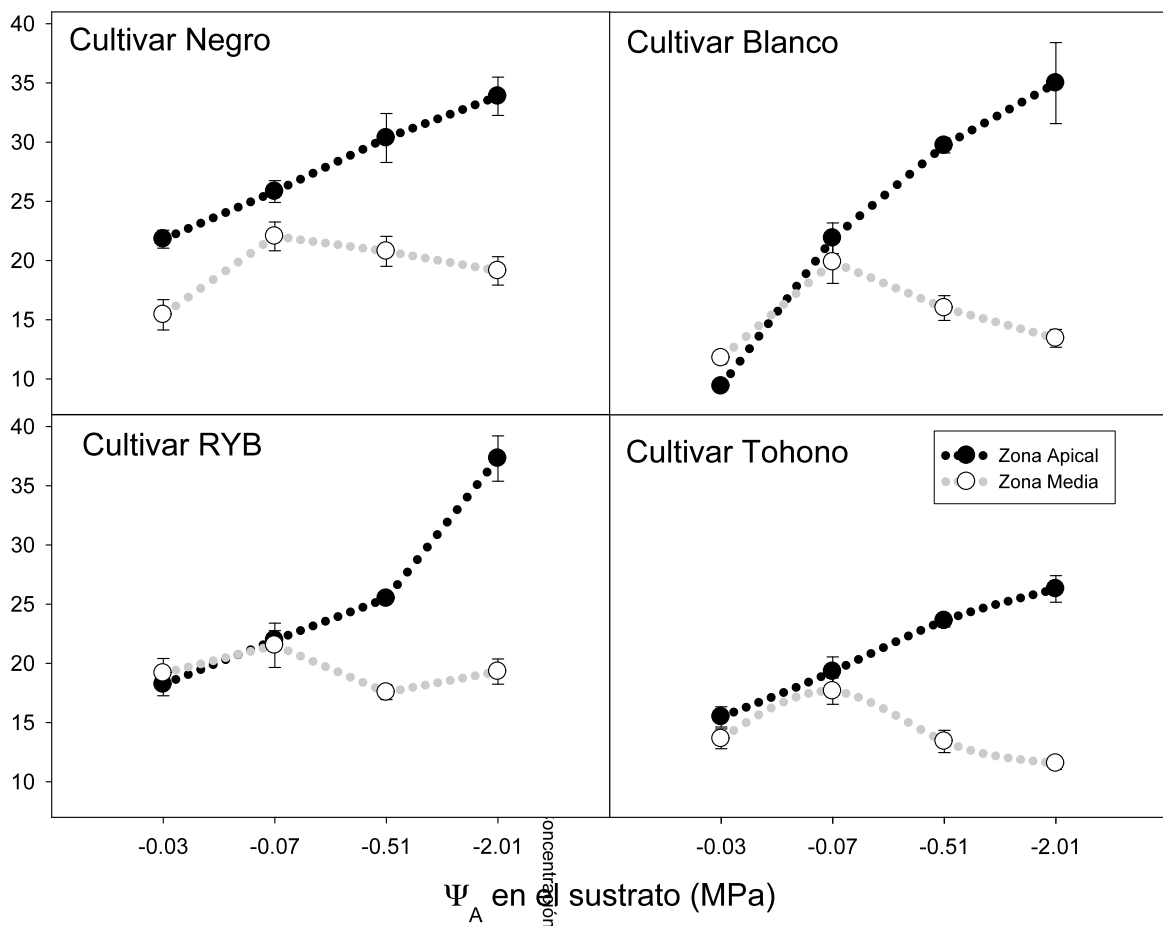


Figura 2. Concentración de prolina en la raíz de frijo tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray). En cada gráfica se presenta la concentración de prolina por cultivar. En dos zonas de la raíz (unidas por una línea discontinua donde ZA=Zona apical (●) y ZM=Zona media (○)). Cada punto representa el promedio de la concentración de prolina en cada Ψ_A del sustrato \pm el error estándar.

En la zona media la concentración de prolina mostró diferencias significativas entre los cultivares y los Ψ_A en el sustrato. El cultivar RYB con una concentración alta de prolina fue estadísticamente similar al cultivar Negro y los cultivares Blanco y Tohono no mostraron diferencias entre ellos y presentaron los valores menores de prolina. En este segmento, el Ψ_A de -0.07 MPa generó la concentración estadísticamente mayor de prolina, respecto a los Ψ_A de -0.03, -0.51 y -2.01 MPa, los que generaron concentraciones similares entre sí.

En general, se observó que la concentración de prolina fue mayor en la zona apical que en la zona media, además la concentración se incrementó en los Ψ_A menores y en las zona cercana al ápice (primeros 10 mm). Este comportamiento fue documentado en maíz, donde la concentración alta de prolina fue relacionada con la disminución del potencial osmótico en el interior de la célula, lo que propició el ajuste osmótico en las células de la zona apical y mantuvo el crecimiento (Voetberg y Sharp, 1991; Ober y Sharp, 1994).

La concentración de prolina en la zona de crecimiento de la raíz se ha considerado como un indicador del ajuste osmótico y algunos autores mencionan al ajuste osmótico como un índice de selección de plantas con resistencia ya que se ha documentado que la prolina contribuye con cerca del 50 % del total de los solutos en las células del ápice de la raíz en plántulas de maíz (Voetberg y Sharp, 1991), además se ha mencionado que la prolina actúa como un soluto citoplásmico aún en concentración alta (Phillips *et al.*, 2002)

Sin embargo, Bokhari y Trent (1995) mencionaron que los incrementos de prolina no representan un índice de resistencia a la sequía, debido a que las especies vegetales

pueden diferir considerablemente en la cantidad de prolina que acumulan en los distintos tejidos durante el estrés. De esta manera, la concentración de prolina en los tejidos apicales de frijol tepari indicaron que probablemente en la raíz de este frijol existe un ajuste osmótico por la acumulación de prolina que juega un papel esencial en el mantenimiento del crecimiento de la raíz primaria en sustratos con Ψ_A bajos.

CONCLUSIONES

El crecimiento de las raíces de plántulas de frijol tepari es influenciado directamente por las condiciones de humedad del medio en el que se encuentran creciendo. Los cuatro cultivares evaluados sobreviven y mantienen sus crecimiento, tanto en dirección radial como longitudinal, con Ψ_A en el sustrato hasta de -2.01 MPa. Las raíces de frijol tepari crecieron mejor en el sustrato moderadamente seco, respecto a los más húmedos o secos; lo que confirma la adaptación de frijol tepari a ambientes áridos. El CRA en el tejido de la raíz se mantiene alto y permanece constante aunque el Ψ_A en el sustrato disminuya de -0.51 a -2.01 MPa. La concentración de prolina en los tejidos de la zona apical son consistentes con la idea de que la acumulación de prolina propició un ajuste osmótico, que permitió mantener el crecimiento en sustrato con Ψ_A bajos.

LITERATURA CITADA

- Barrs D.H. 1968. Determination of water deficits in plant tissue. En: T.T. Kozlowski (ed.) Water deficits and plant growth. Vol. 1. Development, control, and measurement. Academic Press Inc. New York, USA. Pp: 235-368
- Bates, L.W., R.P. Waldren, L.D. Teare. 1973. Rapid determination of proline for water stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.
- Berlyn, G., P. Miksche. 1976. Botanical microtechnique and cytochemistry. Iowa State University Press. Ames, USA.
- Bokhari, G.U., J.D. Trent. 1985. Proline concentration in water stressed grasses. *Journal of Range Management* 38: 37-38.
- Castonguay, Y., A.H. Markhart. 1991. Saturated rates of photosynthesis in Water stressed leaves of common bean and tepary beans. *Crop Science* 31: 1605-1611.
- Castonguay, Y., A.H. Markhart. 1992. Leaf gas exchange in water stressed common bean and tepary bean. *Crop Science* 32: 980-986.
- Ellis R.H., T.D. Hong, E.H. Roberts. 1985. Handbook of Seed Technology for Genebanks - Volume II. Compendium of Specific Germination Information and Test Recommendations. International Board for Plant Genetic Resources Institute, Italia. Pp: 221-237.
- Freeman, G.F. 1913. The tepary, a new cultivated legume from the southwest. *Botanical Gazette* 56: 395-417.
- Hellmuth, E.O. 1970. Measurement of leaf water deficit with particular reference to the whole leaf method. *The Journal of Ecology* 58: 409-417.
- Levitt, J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. Vol. II. Water, radiation, salt and other stresses. Academic Press Inc. New York, USA.
- Liang, M.B, R.E. Sharp, T.I. Baskin. 1997. Regulation of growth anisotropy in wall-watered and water-stressed maize roots. I: Spatial distribution of longitudinal, radial and tangential expansion rates. *Plant Physiology* 115: 101-111.
- Malamy, E.J. 2005. Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant, Cell and Environment* 28: 67-77.

- Mansfiel, D.H., J.E. Anderson. 1980. Measuring plant water status : A simple Method for investigative laboratories. *The American Biology Teacher* 12: 541-544.
- Markhart III, A. H. 1985. Comparative water relations of *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus acutifolius* Gray. *Plant Physiology* 77: 113-117.
- Mohamed, M.F., N. Keutgen, A. A. Tawfik, G. Noga. 2002. Dehydration-avoidance responses of tepary bean lines differing in drought resistance. *Journal Plant Physiology* 159: 31-38.
- Montoya, C.L. 1985. Respuesta del frijol tepari *Phaseolus acutifolius* Gray var. *latifolius* Freeman a dos regímenes de humedad en el suelo. Tesis de maestría, Centro de Botánica del Colegio de Postgraduados. Chapingo, México
- Ober, S.E., R.E. Sharp. 1994. Proline accumulation in maize (*Zea mays* L.) primary roots at low water potentials. I. Requirement for increased level of abscisic acid. *Plant Physiology* 105: 981-987.
- Ober, S.E., R.E. Sharp. 2003. Electrophysiological responses of maize root to low water potencias: relationship to growth and ABA accumulation. *Journal of Experimental Botany* 54: 813-824.
- Phillips, R.J., M.J. Oliver, D. Bartels. 2002. Molecular genetics of desiccation and tolerant systems. En: Black, M., H.W. Pritchard (eds.) *Desiccation and Survival in Plants: Drying Without Dying*. CABI Publishing, Wallingford Oxon, UK. pp: 321-341.
- Sánchez-Urdaneta, A., C. Peña-Valdivia, C. Trejo, J.R. Aguirre, E. Cárdenas. 2005. Root growth and proline content in drought sensitive and tolerant maize (*Zea mays* L.) seedlings under different water potential. *Cereal Research Communications* 33: 697-703.
- Sánchez-Urdaneta, A., C. Peña-Valdivia, C. Trejo, J.R. Aguirre, E. Cárdenas. 2004. Efectos del potencial de agua en el crecimiento radical de plántulas de *Agave salmiana*. *Otto Ex Salm-Dyck. Interciencia* 29: 626-631.
- Sánchez-Urdaneta, A., C. Peña-Valdivia, C. Trejo, J.R. Aguirre, E. Cárdenas, A. Galicia. 2003. Permeabilidad de las membranas radicales de plantulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L) silvestre y domesticado bajo déficit de humedad. *Interciencia* 28: 597-603.
- SAS (Statistical Analysis System) Institute Inc. 1999-2000. *SAS/STAT User`s Guide*. Version 6. Fourth Edition. Vol. 1. SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA. 943 p.

- Sharp, E.R., W.K. Silk, T.C. Hsiao. 1988. Growth of the maize primary root at low water potentials. I Spatial distribution of expansive growth. *Plant Physiology* 87: 50-57.
- Sharp, E.R. 2002. Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. *Plant, Cell and Environment* 25: 211-222.
- Sharp, E.R., V. Poroyko, L.G. Hejlek, W.G. Spollen, G.K. Springer, H.J. Bohnert, T. Nguyen. 2004. Root growth maintenance during water deficit: physiology to functional genomics. *Journal of Experimental Botany* 55: 2343-2351.
- van der Weele, M.C., W.G. Spollen, R.E. Sharp, T.I. Baskin. 2000. Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. *Journal of Experimental Botany* 51: 1555-1562.
- Voetberg, S.G, R.E. Sharp. 1991. Growth of the maize primary root at low water potential. III. Role of increased praline deposition in osmotic adjustment. *Plant Physiology* 96: 1125-1130.
- Wu, Y., R.E. Sharp, D.M. Durachko, D.J. Cosgrove. 1996. Growth maintenance of the maize primary root at low water potentials involves increases in cell-wall extension properties, expansin activity, and wall susceptibility to expansins. *Plant Physiology* 111: 765-772.

Capítulo 3

Crecimiento y anatomía de la raíz de plántulas de frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) en diferentes potenciales de agua

RESUMEN

Se realizaron evaluaciones morfológicas y anatómicas en la raíz de plántulas de cuatro cultivares de frijol tepari cultivado *Phaseolus acutifolius* A. Gray var. *latifolius* con la finalidad de evaluar el efecto del potencial de agua (Ψ_A) del sustrato (-0.03, -0.07, -0.51 y -2.01 MPa) sobre su crecimiento y anatomía. El efecto del Ψ_A sobre el crecimiento longitudinal y radial fue heterogéneo entre los cultivares de frijol tepari y permitió observar que el crecimiento de la raíz es modulado por la humedad del sustrato. El arreglo y número de células de los distintos tejidos fue similar entre los cultivares de frijol; sin embargo, en el tamaño celular si se observaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre los cultivares y entre los niveles de humedad, con una tendencia a disminuir con los Ψ_A menores del sustrato. En general, los tejidos de la raíz crecieron coordinadamente. Las células del córtex mostraron el mayor crecimiento radial y contribuyeron más al aumento del diámetro total de la raíz, con una mayor expansión en dirección longitudinal.

Palabras clave: *Phaseolus acutifolius*, raíz, crecimiento, anatomía frijol tepari

SUMMARY

Roots of four varieties of tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) seedlings were studied to assess the effect of different substrate water potential (Ψ_w -0.03, -0.07, -0.51 and -2.01 MPa) on their growth and anatomy. The effect of Ψ_w on longitudinal and radial growth was heterogeneous among tepary bean varieties, and showed that root growth is modulated by substrate moisture. The arrangement and number of cells in different tissues were

similar among tepary bean varieties, but significant differences ($P \leq 0.05$) in cell size were observed among varieties and moisture levels. Cell size tended to be smaller with lower substrate Ψ_w . In general, the different root tissues grew coordinated; however cortical cells exhibited the most radial growth and contributed the most to total root diameter increase and expanded most in the longitudinal direction.

Keywords: Growth, *Phaseolus acutifolius*, root anatomy, soil moisture levels, tepary bean, water deficit.

INTRODUCCION

El principal efecto del estrés hídrico en las plantas es la reducción del crecimiento (Kramer, 1983, Davis y Zhang, 1991; Kozlowski y Pallardy, 2002). En el tejido vegetal el crecimiento se origina por la división y alargamiento de los componentes celulares (Hunt, 1982). Las células vegetales pueden controlar su tasa de expansión en diferentes direcciones para construir un órgano con forma específica y su importancia es esencial para todos los procesos morfogénicos en los vegetales (Erickson y Silk, 1980; Cosgrove, 2000). En este contexto, de acuerdo con Sharp y Davies (1979) el crecimiento en el suelo deshidratado puede reducirse o inhibirse totalmente debido a la pérdida de presión de turgencia, todo como una consecuencia del desbalance general del contenido de agua en el tejido.

La raíz es la parte de la planta más vulnerable al estrés hídrico debido a que está directamente en contacto con el suelo (Munns, 2002) y generalmente causa inhibición de

su crecimiento (Dubrobsky y Gomez-Lomeli, 2003). Además, en potenciales de agua bajos el crecimiento se mantuvo preferentemente en el ápice de la raíz y muchos cambios fisiológicos asociados a este crecimiento se presentaron específicamente en dicho segmento, en comparación con el resto de la raíz, que generalmente disminuyó su crecimiento (Sharp *et al.*, 2004).

Se considera que el frijol tepari *Phaseolus acutifolius* A. Gray es una especie adaptada a la sequía. Se ha documentado que el frijol tepari crece bien en ambientes áridos donde son comunes las condiciones de déficit de humedad en el suelo, temperaturas altas y suelo salino (Freeman, 1913; Nabhan y Felger, 1978). Parson y Davis (1978) reportaron mecanismos fisiológicos de adaptación a sequía como valores medios de transpiración, niveles constantes de clorofila y temperatura baja en las hojas. También se han descrito cambios morfológicos en las hojas (Thomas y Waines, 1981) y mecanismos relacionados con el crecimiento de la raíz que pospone la deshidratación en esta especie (Markhart, 1985; Castonguay y Markhart, 1991, 1992; Sanders y Markhart, 1992). A pesar de que *P. acutifolius* es la especie de *Phaseolus* con la mayor resistencia a la sequía (Thomas *et al.*, 1983; Markhart, 1985), se ha demostrado una variación considerable dentro de *P. acutifolius* (Montoya, 1985). De modo que algunos teparis crecen bien bajo condiciones de sequía, mientras que otros requieren humedad alta.

En este trabajo se evalúa la hipótesis de que existen adaptaciones morfo-anatómicas en la raíz durante la etapa de germinación–emergencia relacionadas con la tolerancia al déficit de agua. Por ello, los objetivos fueron mostrar el efecto del Ψ_A del sustrato en el

crecimiento de la raíz de plántulas de frijol tepari, así como describir modificaciones anatómicas relacionadas con el crecimiento longitudinal y radial de la raíz en cuatro cultivares de frijol tepari.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cuatro cultivares de frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) designadas como Café-rojo-amarillo (RYB), Negro (Neg), Café-Tohono (TOH) y Blanco de Sinaloa (BLA) fueron multiplicadas en un invernadero del Colegio de Postgraduados, en Montecillo Texcoco, Estado de México (19° 31' de latitud norte, 98° 53' longitud oeste, 2353 m s.n.m.), durante el ciclo primavera verano de 2004. Las semillas fueron almacenadas en condiciones de laboratorio hasta su uso en la primavera de 2005.

Se evaluaron cuatro niveles de humedad, equivalentes a cuatro Ψ_A de -0.03, -0.07, -0.51 y -2.01 MPa, los cuales se obtuvieron al mezclar vermiculita seca y limpia con 100, 10, 8 y 6 partes de agua destilada en proporción (P:V), respectivamente. Las mezclas de vermiculita y agua se mantuvieron dentro de bolsas de polietileno cerradas herméticamente y se agitaron periódicamente para lograr una distribución homogénea del agua en la vermiculita. Después de 48 h, a una muestra de cada uno de los niveles de humedad, se le cuantificó su Ψ_A en cámaras psicrométricas (Wescor C-52 Inc. Utah, USA), se incubaron las muestra de sustrato por 4 h e inmediatamente se determinó el Ψ_A con un microvoltímetro (Wescor HR33T Inc. Utah, USA) mediante la técnica de punto de rocío.

Para los experimentos se seleccionaron semillas de forma regular y tamaño medio (peso promedio una muestra de 100 semillas en el lote (140 -170 mg). Para obtener una germinación homogénea, cada semilla seleccionada fue escarificada manualmente, haciendo una incisión pequeña y superficial en la testa en uno de sus costados. Posteriormente, fueron desinfectadas mediante enjuagues en una solución de hipoclorito de sodio comercial (Clorox®) al 10 % durante 10 min. y tres enjuagues con agua destilada.

Las semillas fueron colocadas en charolas cubiertas con papel absorbente saturado con agua destilada para su germinación y crecimiento inicial durante 48 h, en la oscuridad y temperatura constante de 25 ± 1 °C. Cada charola fue colocada en una posición inclinada con respecto al plano a 45° para permitir el crecimiento recto de las raíces.

Cuando la raíz de las plántulas alcanzó una longitud de 35 a 40 mm, fueron sometidas a los diferentes tratamientos de humedad dentro de tubos de PVC (cloruro de polivinilo), con 40 mm de diámetro interno y 100 mm de longitud. Se seleccionaron plántulas con un tamaño homogéneo (en un intervalo de 35 a 45 mm) y su raíz fue marcada con un punto pequeño de tinta (Precise V5 Rollin ball PILOT® Japon) a 2.0 mm sobre del ápice (Figura 1), e inmediatamente fueron colocadas dentro de los tubos y cubiertas con vermiculita. Para mantener las condiciones de humedad constantes dentro del tubo se cerraron los extremos con un segmento de polietileno negro ajustados con una banda de látex. La manipulación de las plántulas se realizó con una luz de protección color verde para evitar posibles efectos de la luz visible en las raíces. La exposición de las plántulas al ambiente fue el menor tiempo posible (< 1.0 min) para evitar la deshidratación. Los tubos de PVC

con los tratamientos se mantuvieron en contenedores de material aislante térmico por 24 h en la oscuridad a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

El análisis anatómico se realizó en un segmento de 2.0 mm de raíz dentro de los primeros 6.0 a 7.5 mm desde ápice (Figura 1), en 12 a 15 raíces por tratamiento, y se procesaron por medio de la técnica de inclusión en glicol-metacrilato o plástico (Fedder y O'brien, 1968).

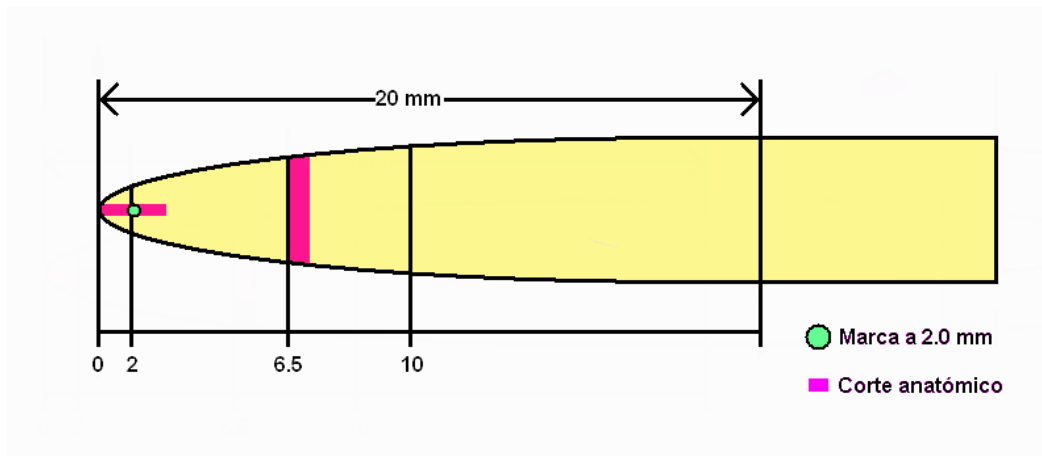


Figura 1. Diagrama que muestra el sitio de muestreo en la raíz de frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray). Se muestra el lugar donde se realizaron los cortes y medición del diámetro en los primeros 20 mm de la raíz después de 24 h de permanecer en sustrato con diferentes Ψ_A . El punto en negro y verde indica el sitio donde se marco antes de someter las plantas a diferentes Ψ_A en el sustrato. Las marcas en rojo muestra exactamente donde se realizaron los cortes anatómicos (El dibujo no esta a escala).

Se realizaron cortes longitudinales y transversales a $5\text{ }\mu\text{m}$ de grosor con un micrótomo rotatorio y se tiñeron con azul de toluidina acuosa (0.5 g en 100 ml de agua destilada) y el colorante remanente se eliminó con una solución de ácido bórico (1.0 g en 100 ml de

agua) mediante una serie de enjuagues. En los cortes transversales, se midió el diámetro de la raíz, diámetro de la estela y grosor del córtex; además, se cuantificó el área del tejido vascular, que incluyó xilema y floema. También se midió el diámetro radial de células del córtex y la anchura de las células de la epidermis y se calculó la densidad de células en el córtex (células/ mm²). Todas las mediciones se realizaron con un microscopio óptico y un analizador de imágenes (Media Cybernetics, 1997).

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos. Los factores y niveles fueron las cuatro cultivares y los cuatro Ψ_A del sustrato el propósito de detectar diferencias significativas entre los cultivares y el efecto del Ψ_A en los cultivares, así como de sus interacciones. Se realizó un análisis de varianza (Proc GLM) y una prueba de Tukey comparación de medias, mediante el programa estadístico SAS (SAS Institute, 1999-2000, versión 8.1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El crecimiento longitudinal de la raíz, evaluado por el desplazamiento de la marca en la raíz realizada a los 2 mm antes del tratamiento y medida después de transferir las plántulas a la vermiculita con los diferentes Ψ_A mostró diferencias significativas entre los Ψ_A del sustrato; además, la interacción cultivar * Ψ_A fue estadísticamente significativa (Cuadro 1). En los cuatro cultivares se encontró que los dos primeros milímetros de la raíz a partir del ápice pueden crecer durante las primeras 24 h después de haber sido

transferidos a sustrato con distintos Ψ_A . En general los cultivares alcanzaron entre 30.0 a 31.5 mm longitud respectivamente, sin diferencias significativas entre ellos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Promedio de la longitud de la raíz (mm), diámetro de la raíz (μm), diámetro del cilindro central (μm) medidas en un corte transversal de la raíz de frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray).

Cultivar	Ψ_A del sustrato (MPa)				Promedio	C.V.(%)
	-0.03	-0.07	-0.51	-2.01		
Longitud de la raíz (mm)						
Negro	25.6 f	35.4 a	36.4 a	26.9 ef	31.1 a	-
Blanco	27.3 edf	33.2 abc	31.2 bcd	28.6 def	30.1 a	-
RYB	26.4 f	34.7 ab	33.8 abc	25.3 f	30.0 a	-
Tohono	25.2 f	35.1 ab	35.4 a	30.5 cde	31.5 a	-
Promedio	26.1 c	34.6 a	34.2 a	27.8 b	-	-
C.V. (%)	-	-	-	-	-	8.08
Diámetro de la raíz en segmento de 6.0 a 7.5 mm (μm)						
Negro	806 bc	772 bcd	714 cde	686 ed	744 b	-
Blanco	912 a	756 bcd	741 cde	733 cde	784 a	-
RYB	842 ab	698 de	705 de	721 cde	741 b	-
Tohono	769 bcd	716 cde	651 e	702 de	710 b	-
Promedio	834 a	734 b	702 b	713 b	-	-
C.V. (%)	-	-	-	-	-	7.83
Diámetro del cilindro central (μm)						
Negro	473 abc	439 bcd	415 bcd	370 d	424 ab	-
Blanco	537 a	417 bcd	420 bcd	415 bcd	447 a	-
RYB	483 ab	391 cd	391 cd	394 bcd	415 ab	-
Tohono	439 bcd	419 bcd	361 d	410 bcd	407 b	-
Promedio	484 a	415 b	396 b	398 b	-	-
C.V. (%)	-	-	-	-	-	13.13

Datos de longitud de raíz son medias de 40 repeticiones. Las variables anatómicas fueron medidas en 20 raíces. Dentro de cada columna letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$) para cada Ψ_A en el sustrato y dentro de cada renglón letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$) para cada cultivar de frijol tepari. CV es coeficiente de variación.

La longitud de la raíz fue altamente influenciada por el Ψ_A del sustrato y resulto con diferencias significativas. El sustrato más húmedo con Ψ_A de -0.03 MPa y el sustrato más seco con Ψ_A de -2.01 MPa, generaron el menor crecimiento en longitud de 26.1 mm y 27.8 mm respectivamente. Los sustratos intermedios con Ψ_A de -0.07 y -0.51 MPa con 34.6 mm y 34.2 mm resultaron con el mayor crecimiento en longitud, respectivamente (Cuadro 1)

La interacción con mayor crecimiento en longitudinal fueron observada en combinaciones de los cultivares Blanco, Negro, Tohono y RYB y los Ψ_A de 0.51 y 0.07 MPa; mientras que

los menores promedios en longitud de la raíz fueron observados en combinaciones de Blanco, Negro, Tohono y RYB y los Ψ_A 0.03 MPa y 2.01 MPa sin mostrar una tendencia entre los cultivares (Cuadro 1).

Anatómicamente, la raíz primaria de frijol tepari como en muchas dicotiledóneas tiene una organización interna típica y con la diferenciación propia del desarrollo del sistema radical. En un corte longitudinal, se observó una separación de los tejidos (Figura 2). Esto ya se ha registrado en la raíz de frijol (*P. vulgaris*) (Engleman, 1979). Morfológicamente, se confirmó que la región cercana al ápice de la raíz de frijol tepari está formada por cuatro zonas como fue observado en la raíz de *Nicotiana* y *Daucus carota* (Esau, 1940) entre las que se encuentran, la cofia o caliptra (Figura 2A); la zona meristemática compuesta por las células iniciales que en frijol tepari se presenta antes de los 0.5 mm y la zona de división entre los 0.75 a 1.0 mm (Figura 2B), la zona de alargamiento, donde las células del córtex no presentan más divisiones de 1.5 a 1.75 mm (Figura 2C) y una zona de maduración más allá de los 20 mm, donde se presentan pelos radicales y la mayoría de las células han completado su diferenciación alcanzan su máximo diámetro radial y todavía seguirán creciendo en longitud (Figura 2A).

La epidermis de la raíz de frijol tepari está formada por un estrato de células que en los cortes longitudinales se observan alargadas y delgadas, en ocasiones, la pared tangencial que limita con el exterior presenta una deformación redondeada formando pelos radicales.

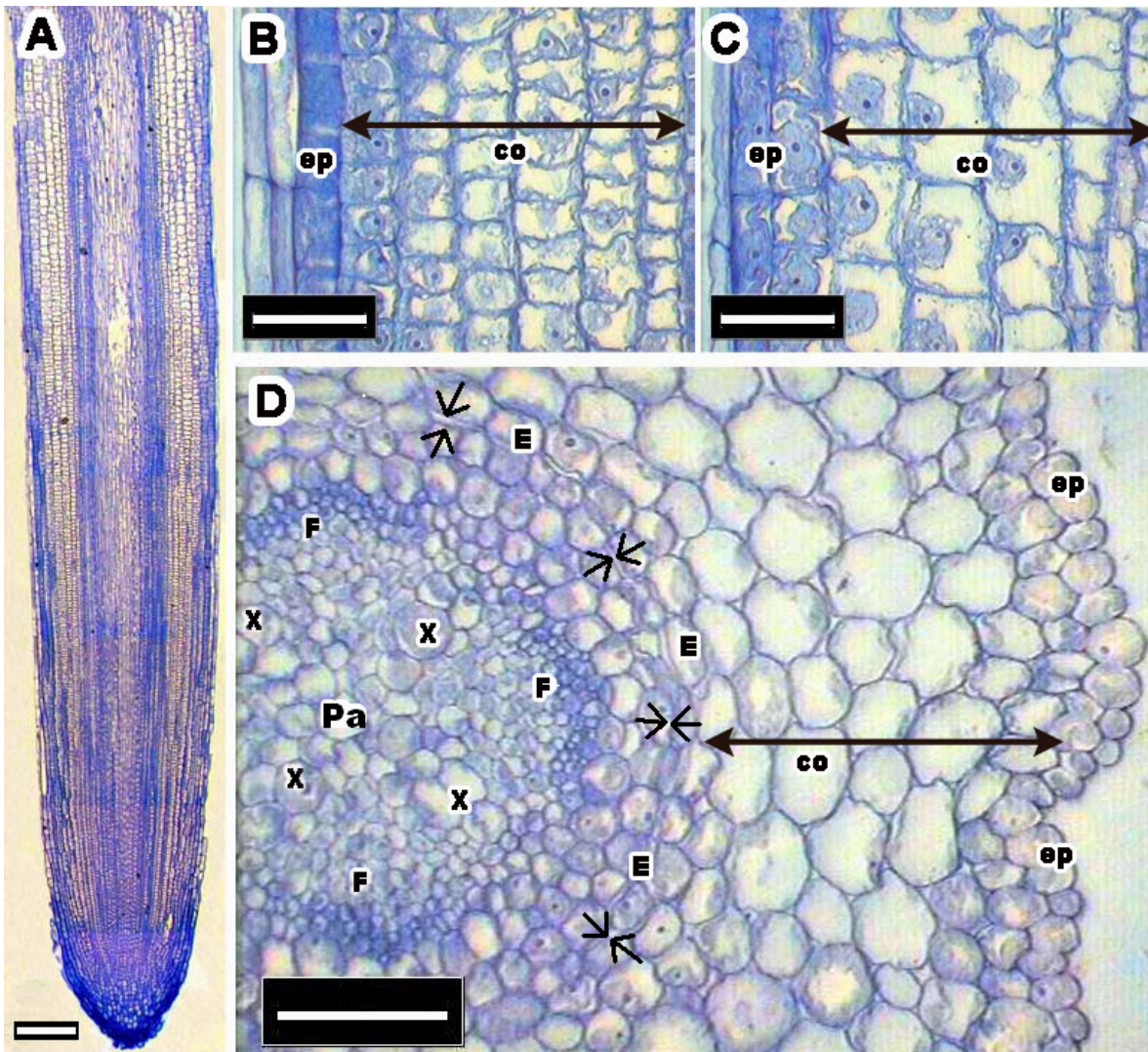


Figura 2. Anatomía de la raíz de frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray). **A.** Corte longitudinal del segmento apical (primeros 2.7 mm) de plántulas de 4 días después de la germinación. **B.** Acercamiento a corte longitudinal de la zona de división celular donde se muestra de izquierda a derecha 2 hileras de células de la epidermis y hasta 6 hileras de células de córtex y las células que formarán el cilindro central. **C.** Acercamiento en un corte longitudinal a 2.7 mm donde se observa mayor diferenciación celular. **D.** Corte transversal a 6.5 mm después del ápice donde se observan la epidermis, el córtex aún con la endodermis en división y el tejido vascular con cuatro cordones de floema y xilema junto al parénquima central. Ep = epidermis, co = córtex, Pa = parénquima a manera de medula, X = xilema, F = floema, las flechas encontradas ($\rightarrow\leftarrow$) división de la endodermis, las flecha con dos puntas señala los límites del córtex (\leftrightarrow). Barras de las escalas en A = 200 μm , B, C = 25 μm , D = 75 μm .

El córtex está generalmente constituido por 5 a 7 estratos de células de parénquima, cuya forma y tamaño varía a lo largo de la raíz dependiendo de su estado de desarrollo y es común que se presenten espacios intercelulares a medida que las células del córtex aumentan su tamaño (Figura. 2B, 2C y 2D).

Las células que se diferenciarán en endodermis son definidas muy tempranamente en áreas cercanas al ápice, antes de la zona de división, alcanzan su diferenciación entre 6.5 a 7.0 mm. Este estrato único de células representa límite del córtex y el cilindro central. Sin embargo, se desconoce si en este segmento las células de la endodermis son funcionales.

El cilindro central está formado por pocas células parenquimáticas en el centro que están rodeadas por cuatro polos de tejido vascular. En la etapa de desarrollo evaluada a 6.5 a 7.0 mm del ápice ya se han diferenciado los primeros elementos del protoxilema y en algunos casos metaxilema hacia el exterior casi vecino al periciclo y en su costados se identificaron los haces de floema primario. Estos rodeados por una capa de células que formaran fibras extrafloemáticas junto al periciclo (Figura 2D).

El crecimiento radial fue medido en el corte transversal del segmento de la raíz entre los 6.0 mm y 7.5 mm (Figura 1), donde se cuantificó diámetro de la raíz y diámetro del cilindro central, se encontraron diferencias significativas en el diámetro de la raíz entre los cultivares y los Ψ_A del sustrato y además la interacción cultivar * Ψ_A del sustrato fue estadísticamente significativa (Cuadro 1). En el diámetro de la raíz medido entre 6.0 y 7.5 mm no se detectaron diferencias significativas entre el cultivar Negro Tohono y RYB. El

cultivar Blanco si mostró diferencias significativas respecto a las otras tres cultivares con el mayor diámetro (Cuadro 1). La influencia del Ψ_A del sustrato en el diámetro de la raíz mostró raíces más gruesas en potenciales de agua del sustrato con -0.03 MPa y son más delgadas en potenciales de agua del sustrato desde -0.51 MPa (Figura 3 y Cuadro 1).

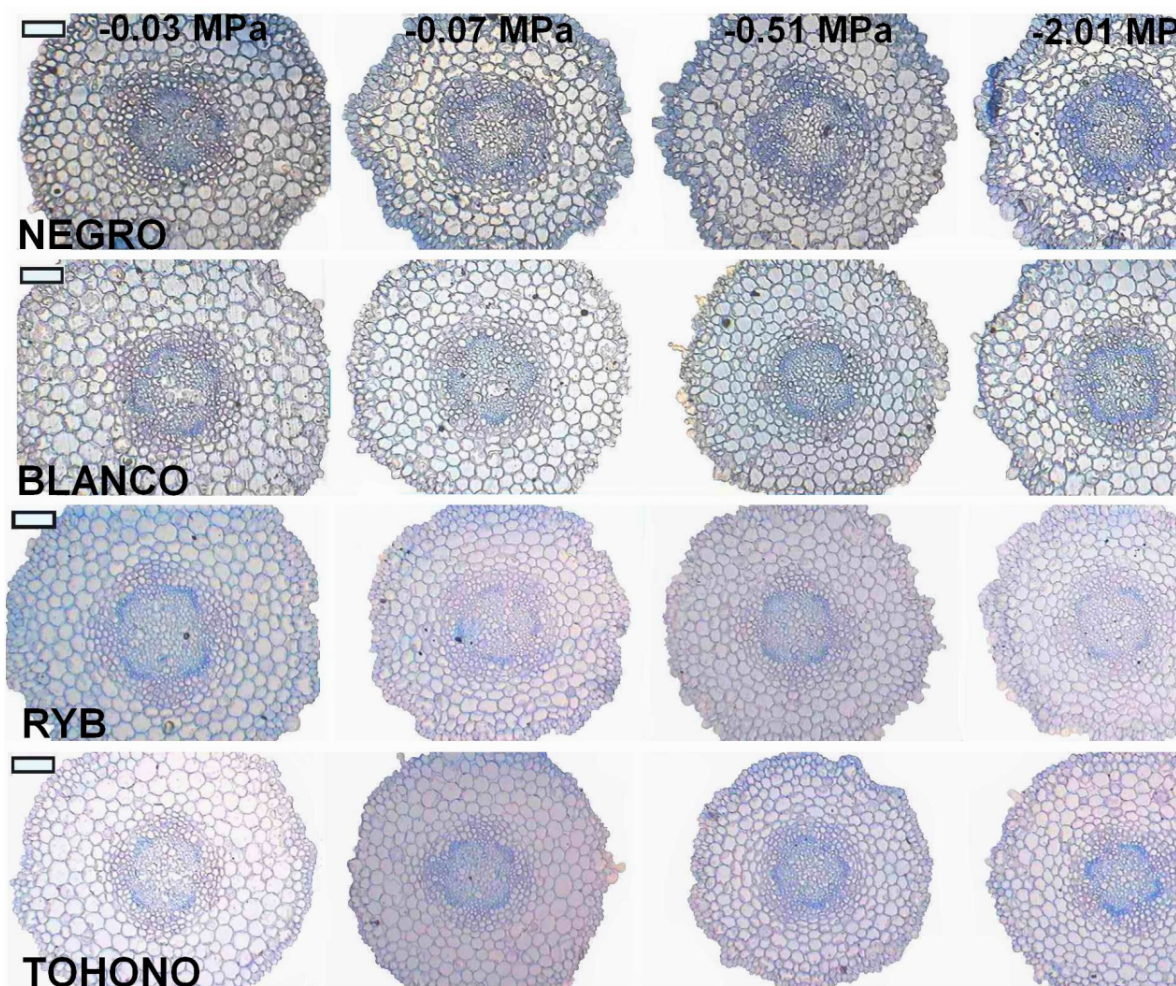


Figura 3. Cortes transversales del segmento de 6.5 a 7.0 mm de raíces de plántulas frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) creciendo en diferentes Ψ_A en el sustrato. Los cultivares se muestran en los renglones y los Ψ_A (de -0.03, -0.07, -0.51, y -2.01 MPa en las columnas). La barra de escala equivale a 100 μm .

En un corte transversal de la raíz, el diámetro del cilindro central si mostró diferencias significativas entre los cultivares. Así, el cultivar Blanco resultó con el mayor diámetro mientras que cultivar Tohono el menor diámetro y con diferencias significativas entre ellas (Cuadro1); sin embargo, las variedades Negro y RYB no mostraron diferencias significativas entre ellas ni con los cultivares Blanco y Tohono.

El Ψ_A del sustrato afectó el crecimiento del diámetro del cilindro central, sin embargo, no se observaron diferencias significativas a -0.07, -0.51 y -2.01 MPa. Pero en el Ψ_A de -0.03 MPa sí mostró diferencias significativas con el resto de los Ψ_A mostrando además, el mayor diámetro del cilindro central.

En células individuales, el diámetro radial de las células de la epidermis de los cuatro cultivares fue diferente estadísticamente. Así, las células de la epidermis del cultivar Negro fueron las más anchas (24.42 μm) y las del cultivar Tohono las más angostas (20.44 μm); los cultivares Blanco y RYB resultaron con valores intermedios y sin diferencias significativas (Figura 3). El Ψ_A del sustrato sí afectó el diámetro radial de las células de la epidermis; sin embargo sólo hubo diferencias entre el Ψ_A del sustrato más húmedo de -0.03 MPa con un diámetro mayor y el Ψ_A del sustrato más seco de -2.01 MPa resultó con el menor diámetro de células de la epidermis. En cuanto al área de las células del córtex, se observaron diferencias significativas entre los cultivares. Sin embargo, únicamente el cultivar Tohono fue diferente estadísticamente al resto de los cultivares. El área de las células del córtex fue afectado por Ψ_A del sustrato y sólo el Ψ_A del sustrato de -0.03 MPa mostró diferencias significativas al resto de los cultivares (Cuadro 2). En cuanto al ancho

de la célula del córtex y las células de córtex por unidad de área, se observó que diámetros pequeños mostraron mayor número de células por unidad de área, mientras que, diámetros grandes resultaron en un menor número de células por unidad de área.

Cuadro 2. Promedio del área del tejido vascular (μm^2), densidad de células de córtex (células/ mm^2), área de las células del córtex (mm^2), anchura de las células del córtex (μm) medidas en un corte transversal de la raíz de frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray).

Cultivar	Ψ_A del sustrato (MPa)				Promedio	C.V. (%)
	-0.03	-0.07	-0.51	-2.01		
Área del tejido vascular (μm^2)						
Negro	29758 bcd	25162 cdef	23706 def	23615 def	25560 bc	-
Blanco	37364 a	29190 bcde	26811 cdef	26392 cdef	29852 a	-
RYB	33220 ab	25423 cdef	25696 cdef	27539 bcde	27969 ab	-
Tohono	30814 abc	25379 cdef	20640 f	22964 ef	24901 c	-
Promedio	32948 a	26347 b	24240 b	25180 b	-	-
C.V. (%)	-	-	-	-	-	15.53
Densidad de células de córtex (mm^2)						
Negro	610 cdef	602 cdef	814 abcd	832 abc	711 b	-
Blanco	469 f	758 bcde	778 bcde	728 bcde	679 b	-
RYB	540 ef	881 ab	947 ab	946 ab	829 a	-
Tohono	581 def	785 bcde	927 ab	1052 a	836 a	-
Promedio	545 c	765 b	869 a	890 a	-	-
C.V. (%)	-	-	-	-	-	20.05
Área de células de córtex (μm^2)						
Negro	1833 abc	1279 de	10876 e	983 e	1288 b	-
White	1709 bcd	1723 bcd	1245 de	1167 e	1461 ab	-
RYB	2323 a	1341 cde	1295 de	1420 bcde	1608 a	-
Tohono	1894 ab	1154 e	1063 e	1080 e	1298 b	-
Promedio	1961 a	1356 b	1169 b	1164 b	-	-
C.V. (%)	-	-	-	-	-	23.7
Ancho de las células de córtex (μm)						
Negro	45.7 ab	41.6 bcde	33.5 fg	33.2 fg	38.7 a	-
Blanco	51.6 a	37.4 cdef	36.9 fg	35.9 fg	40.8 a	-
RYB	43.1 bc	34.4 efg	32.0 fg	30.5 fg	34.9 b	-
Tohono	41.7 bcd	34.4 fg	32.0 fg	27.9 g	33.9 b	-
Promedio	45.7 a	36.7 b	33.6 c	31.5 c	-	-
C.V. (%)	-	-	-	-	-	12.07

Datos son medias de 40 repeticiones. Las variables anatómicas fueron medidas en 20 raíces. Dentro de cada columna letras diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) para cada Ψ_A en el sustrato y dentro de cada renglón letras diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) para cada cultivar de frijol tepari. CV es coeficiente de variación.

Fueron observadas diferencias significativas en los cultivares Blanco y Negro con diámetros grandes y menor número de células por unidad de área y los cultivares RYB y Tohono con diámetros pequeños y mayor número de células por unidad de área. Así

mismo los Ψ_A del sustrato que mostraron mayor diámetro de las células de córtex y menor número de células por unidad de área fueron Ψ_A de -0.003 MPa y -0.07 MPa y los Ψ_A del sustrato con -0.51 MPa y -2.01 MPa mostraron mayor diámetro y menor número de células por unidad de área (Cuadro 2).

El área del tejido vascular sólo mostró diferencias significativas entre los cultivares Blanco y Tohono y el tamaño de este tejido fue influenciado sólo por el Ψ_A del sustrato de -0.03 MPa con diferencias significativas con el resto de los Ψ_A del sustrato (Cuadro 2).

En la presente investigación las plántulas de los cuatro cultivares de frijol tepari alcanzaron su mayor crecimiento en longitud bajo un estrés moderado de agua. Una respuesta similar ya ha sido reportada para *A. thaliana* (van der Weele *et al.*, 2000) y para frijol tepari (Mohamed *et al.*, 2002), donde la raíz si pudo incrementar su tamaño en ambientes con humedad restringida para explorar mayor volumen de suelo. Las plántulas de frijol tepari que crecieron a capacidad de campo del sustrato con Ψ_A de -0.03 MPa, no alcanzaron el crecimiento máximo como se ha documentado para maíz y otras especies de frijol (Sharp y Davies, 1979; Liang *et al.*, 1997; Sánchez-Urdaneta, 2005).

La disminución del crecimiento de las raíces de frijol tepari en el sustrato con el mayor Ψ_A no ha sido registrada anteriormente. En muchos casos la disminución del crecimiento en niveles altos de humedad han sido reportados por deficiencias en la difusión del oxígeno a la raíz, que causa disminución del crecimiento e hipertrofia del hipocótilo por la acumulación de etileno en los tejido (Levitt, 1980). Sin embargo, en la anatomía no se

encontraron evidencias de efectos relacionados el estrés por falta de oxígeno en la raíz de frijol tepari creciendo en sustratos de -0.03 MPa después de 24 h. Los argumentos que podrían explicar el crecimiento de las raíces de plántulas de frijol tepari en condiciones moderadamente secas podrían estar relacionados con una adaptación específica del frijol tepari a ambientes con humedad limitada, donde las raíces alcanzan un crecimiento máximo. Spollen *et al.* (1993) registraron que en las condiciones de suelo seco, algunas especies, en la etapa de plántula la raíz primaria crece y favorece su establecimiento para asegurar el abastecimiento de agua antes de que el epicótilo emerja sobre la superficie del suelo e inicie su principal función fisiológica que es la fotosíntesis.

Por muchos años se ha demostrado que los sistemas radicales con déficit de agua producen raíces delgadas, debido a que el diámetro de la raíz se reduce a medida que el suelo tiene menor contenido de agua. Sharp *et al.* (1988) reportaron la disminución del diámetro de la raíz de maíz en la zona de alargamiento, asociado a la humedad reducida del sustrato. Sin embargo, van der Weele *et al.*, (2000) demostraron que las raíces de *A. thaliana* no se adelgazaron en sustrato de Ψ_A bajo. En esta investigación se observó que los niveles bajos de humedad del sustrato influyeron negativamente en el diámetro a lo largo de la raíz con respuestas diferentes para cada cultivar.

Morfológicamente, se observó que la raíz de frijol tepari creció en proporción, donde pareciera que todos sus componentes crecieron simultáneamente de acuerdo al modelo de dinámica de fluidos propuesto por Ericksson y Silk (1980). Sin embargo, como es mencionado por Liang *et al.* (1997), el crecimiento de un tejido vegetal es más complejo,

debido a que un órgano está compuesto de tejidos especializados, complejos con varios tipos celulares con un gradiente de tamaño y que se conectan en una red poliédrica donde las células vegetales individuales pueden controlar completamente su tasa y dirección de expansión y parecen expandirse coordinadamente.

Se observó que las células del córtex contribuyeron más al crecimiento radial de la raíz, además, estas células de parénquima mostraron mayor capacidad para modificar su diámetro en los diferentes Ψ_A del sustrato. Se presentó un crecimiento particular en frijol tepari para cada una de las condiciones evaluadas en cada uno de los tejidos de la raíz, epidermis, córtex y cilindro central. Liang *et al.* (1997) encontró que el adelgazamiento en raíces de *A. thaliana* es causado por la restricción de la tasa de expansión lateral de las células en el cilindro central y el córtex a medida que disminuyó la humedad en el medio, como fue documentado en este estudio en los primeros 5 mm de la raíz de frijol tepari.

CONCLUSIONES

La raíz principal de frijol tepari creció en el sustrato con Ψ_A de hasta -2.01 MPa. Sin embargo, la longitud de la raíz disminuyó fuertemente en este Ψ_A ; en el sustrato con Ψ_A de -0.03 MPa la longitud de la raíz de frijol tepari es limitada y se relacionó con su adaptación a ambientes con niveles de humedad moderadamente secos, donde el crecimiento es estimulado positivamente. Anatómicamente, el arreglo y número de células de los distintos tejidos fue similar entre los cultivares y su crecimiento fue coordinado, las células de parénquima del córtex mantienen una tasa de expansión

longitudinal mayor. Se observó que el diámetro de las células de córtex se modificó altamente con los Ψ_A en el sustrato. Así, se observaron raíces delgadas en Ψ_A bajos y raíces gruesas en sustratos con Ψ_A mayores en el segmento de 6.5 y 7.5 mm. El efecto del Ψ_A en la zona inmediata al ápice de la raíz fue homogéneo y no modificó el diámetro de la raíz hasta los 0.5 mm después del ápice.

LITERATURA CITADA

- Berlyn, G., P. Miksche. 1976. Botanical microtechnique and cytochemistry. Iowa State University Press. Ames, USA.
- Castonguay, Y., A.H. Markhart. 1991. Saturated rates of photosynthesis in Water stressed leaves of common bean and tepary beans. *Crop Science* 31: 1605-1611.
- Castonguay, Y., A.H. Markhart. 1992. Leaf gas exchange in water stressed common bean and tepary bean. *Crop Science* 32: 980-986.
- Cosgrove, J.D. 2000. Loosening of plant cell wall by expansins. *Nature* 407: 321-326.
- Davies, J.W., J. Zhang. 1991. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annual Review, Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 55-76.
- Dubrovsky, G.J., L.F. Gomez-Lomeli. 2003. Water deficit accelerates determinate developmental program of the primary root and does not affect lateral root initiation in a Sonoran Desert cactus (*Pachycereus pringlei*, Cactaceae). *American Journal of Botany* 90: 823-831.
- Engleman, E.M. 1979. Anatomía y morfología. En: E.M. Engleman (ed.) *Contribuciones al conocimiento del frijol (*Phaseolus*) en México*. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. Pp: 23-37.
- Erickson, O.E. 1976. Modeling of plant growth. *Annual Review of Plant Physiology* 27: 407-434.
- Erickson, O.R., W. Silk. 1980. The kinematics of plant growth. *Scientific American* 242: 102-113.

- Esau, K. 1940. Developmental anatomy of the fleshy storage organ of *Daucus carota*. *Hilgardia* 13: 175-226.
- Esau, K. 1985. Anatomía vegetal. Tercera edición revisada y puesta al día. Ediciones Omega . Barcelona
- Fedder, N., T.P. O'Brien. 1968. Plant Microtechnique. Some principles and new methods. *American Journal of Botany* 55: 123-142.
- Freeman, G.F. 1913. The tepary, a new cultivated legume from the southwest. *Botanical Gazette* 56: 395-417.
- Hunt, R. 1982. Plant growth curves. The functional approach to plant growth analysis. Arnold. London, UK.
- Kozłowski, T.T., S.G. Pallardy. 2002. Acclimation and adaptive responses of woody plants to environmental stresses. *The Botanical Review* 68: 270-334.
- Kramer, J.P. 1983. Water relations of plants. Academic Press Inc. Orlando, Florida, USA..
- Levitt, J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. Vol. II. Water, radiation, salt and other stresses. Academic Press Inc. New York, USA.
- Liang, M.B, R.E. Sharp, T.I. Baskin. 1997. Regulation of growth anisotropy in well-watered and water-stressed maize roots. I: Spatial distribution of longitudinal, radial and tangential expansion rates. *Plant Physiology* 115: 101-111.
- Markhart III, A.H. 1985. Comparative water relations of *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus acutifolius* Gray. *Plant Physiology* 77: 113-117.
- Media Cybernetics, 1997, Image-Pro Plus Reference Guide for Windows. Silver Spring, USA.
- Mohamed, M.F., N. Keutgen, A. A. Tawfik, G. Noga. 2002. Dehydration-avoidance responses of tepary bean lines differing in drought resistance. *Journal Plant Physiology* 159: 31-38.
- Montoya, C.L. 1985. Respuesta del frijol tepari *Phaseolus acutifolius* Gray var. *latifolius* Freeman a dos regímenes de humedad en el suelo. Tesis de maestría, Centro de Botánica del Colegio de Postgraduados. Chapingo, México.
- Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell Environment* 25: 239-250.

- Nabhan, G.P., R.S. Felger. 1978. Teparies in southwestern North America. A biogeographical and ethnohistorical study of *Phaseolus acutifolius*. *Economic Botany* 32: 2-19.
- Peña-Valdivia, C.B., A.B Sánchez-Urdaneta, C. Trejo, R.J.R. Aguirre, E. Cárdenas. 2005. Root anatomy of drought sensitive and tolerant maize (*Zea mays* L.) seedlings under different water potentials. *Cereal Research. Communication* 33: 705-712.
- Peña-Valdivia, C.B., A.B Sánchez-Urdaneta, C. Trejo, R.J.R. Aguirre, E. Cárdenas. 2004. Efectos del potencial de agua en el crecimiento radical de plántulas de *Agave salmiana*. *Otto Ex Salm-Dyck. Interciencia* 29: 626-631.
- Sánchez-Urdaneta, A., C. Peña-Valdivia, C. Trejo, J.R. Aguirre, E. Cárdenas. 2005. Root growth and proline content in drought sensitive and tolerant maize (*Zea mays* L.) seedlings under different water potential. *Cereal Research Communications* 33: 697-703.
- Sanders, P.L., A.H. Markhart III. 1992. Interspecific grafts demonstrate root system control of leaf water status in water-stressed. *Journal Experimental of Botany* 43: 1563-1567.
- SAS (Statistical Analysis System) Institute Inc. 1999-2000. SAS/STAT User`s Guide. Version 6. Fourth Edition. Vol. 1. SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA.
- Sharp, E.R., T.C. Hsiao, W.K. Silk. 1990. Growth of the maize primary root at low water potentials. II. Role of growth and deposition of hexose and potassium in osmotic adjustment. *Plant Physiology* 93: 1337-1346.
- Sharp, E.R., V. Poroyko, L.G. Hejlek, W.G. Spollen, G.K. Springer, H.J. Bohnert, T. Nguyen. 2004. Root growth maintenance during water deficit: physiology to functional genomics. *Journal of Experimental Botany* 55: 2343-2351.
- Sharp, E.R., W.J. Davies. 1979. Solute regulation and growth by roots and shoots of water-stressed maize plants. *Planta* 147: 43-49.
- Sharp, E.R., W.K. Silk, T.C Hsiao. 1988. Growth of the maize primary root at low water potentials. I Spatial distribution of expansive growth. *Plant Physiology* 87: 50-57.
- Spollen, W.G., R.E. Sharp, I.N. Saab, Y. Wu. 1993. Regulation of cell expansion in roots and shoots at low water potentials. En: Smith, J.A.C., H. Griffiths. (eds.) *Water Deficits: Plant Responses from Cell to Community*. BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK. Pp: 37-52.

Taiz, L., E. Zeiger. 2002. Plant Physiology. Third Edition. Sinauer Associates Inc. Sutherland, USA.

Thomas, C.C., J.G. Waines. 1981. Field comparison of rooting depth of *Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus acutifolius*. Annual Report Bean Improvement Cooperative 24: 61.

Thomas, C.V., R.M. Manshardt, J.G. Waines. 1983. Tepary as a source of useful trait for improving common beans (*Phaseolus acutifolius* hybridization with *Phaseolus vulgaris*). Desert Plants 5: 43-48.

van der Weele, M.C., W. G. Spollen, R.E. Sharp, T.I. Baskin. 2000. Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. Journal of Experimental Botany 51: 1555-1562.

Capítulo 4

Determinación de proteínas solubles en la raíz de frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) en estrés hídrico

RESUMEN

Se cuantificaron y caracterizaron las proteínas solubles en raíces de plántulas de frijol tepari sometidas a un estrés hídrico durante 24 horas. En general, se observó que existe una mayor acumulación de proteínas solubles en la zona apical comparada con la zona media para todos los cultivares evaluados. Además, la mayor acumulación de proteínas se observó en las raíces que crecieron en sustratos con Ψ_A de -2.01 MPa. Se detectaron hasta 18 bandas de proteína en la zona apical de la raíz, mientras que en la zona media se observaron 19 bandas; en ambos casos, con igual o diferente peso molecular e intensidad de tinción. Las dos condiciones de humedad evaluadas no mostraron diferencias notables en el número de bandas. Se observaron bandas con pesos moleculares de 33 y 36 KDa que han sido reportadas por otros autores en frijol *P. vulgaris*, y descritas como proteínas ricas en el aminoácido prolina, que también han sido localizadas en la fracción soluble de la pared celular que son conocidas como proteínas ricas en prolina e hidroxiprolina (PRPs) y designadas como p33/p36.

SUMMARY

The soluble proteins were classified and quantified in root seedlings of tepari bean subjected to water stress for 24 hours. In general, we could observe a greater concentration of soluble proteins in the apical zone than in the middle zone of the root in all the cultivars evaluated. Moreover, the greatest accumulation of proteins was observed in roots grown in substrates with Ψ_w -2.01 MPa. Up to 18 protein bands were detected in the apical zone of the root, while in the middle zone, 19 bands were observed, both cases with equal or different molecular weight and hue intensity. The two water conditions evaluated did not show notable differences in the number of bands. In this research, bands with molecular weights of 33 and 36 Kda were observed which have been reported by other authors for *P. vulgaris*, and described as proteins rich in proline amino acid and

which have also been located in the soluble part of the cell wall known as proteins rich in proline and hydroxiprolin (PRPs) and defined as p33/p36.

INTRODUCCIÓN

La sequía puede ser definida como un periodo bajo de precipitación normal que limita la productividad vegetal en un sistema natural o agrícola (Boyer, 1982; Kramer y Boyer, 1995). En el campo se pueden observar diferentes condiciones de estrés, éstas pueden ser por exceso o falta de luz, temperaturas altas o bajas, déficit o toxicidad por nutrientes, etc. En el caso del estrés que define a la sequía, es una disminución en la disponibilidad de agua en el suelo. Los efectos del déficit de agua en el crecimiento de la raíz pueden variar y ocasionar cambios que van desde el incremento en la producción de raíces laterales, longitud total de la raíz que define la profundidad de enraizamiento y el peso seco (Sharp y Davies, 1979). De acuerdo con Verslue *et al.* (2006) en muchos de los mecanismos de tolerancia a la deshidratación estudiados a la fecha, la función principal es proteger a la estructura celular primaria de los efectos de la deshidratación. Bray (1997) mencionó que el déficit de agua dispara una serie de respuestas que inician con la percepción del estrés, el cual se induce una o varias señales de transducción y éstas se manifiestan en niveles celulares, fisiológicos y del desarrollo. El último paso en la cascada de señales como respuesta a la deshidratación es la activación de genes responsables de la síntesis de compuestos que sirven para proteger a la estructura celular. Las plantas que sobreviven a estas condiciones han desarrollado varias adaptaciones, entre las que se encuentra la síntesis de proteínas con funciones protectoras (Bartels y Soeur, 2004). Entre las proteínas

protectoras mejor conocidas por acumularse en respuesta a la disminución de agua en el tejido de las plantas cuando son sometidas a un estrés abiótico o durante el desarrollo de la semilla son las dehidrinas y las proteínas LEA (proteínas abundantes en embriogénesis tardía (Close, 1996). Debido a que las funciones de muchas dehidrinas y proteínas LEA son conocidas parcialmente, parte de sus funciones son actuar como chaperonas que protegen proteínas y la estructura de la membrana. Bray (1997) encontró que la acumulación de estas proteínas requiere un déficit de agua en el tejido que induce incrementos en el ácido abscísico (ABA). Hirt (2003) mencionó que el ABA es importante en múltiples respuestas de estrés, incluyendo la deshidratación. Así, como respuesta inmediata dispara el cierre de estomas para evitar la pérdida de agua por transpiración y la acumulación de ABA induce la expresión de múltiples genes involucrados en la protección contra déficit hídrico como respuestas lentas.

Existe poca literatura que mencione las posibles funciones de la acumulación de proteínas en la raíz. Kamenetsky *et al.* (2005) encontraron que en la raíz tuberosa de *Ranunculus asiaticus*, la acumulación de proteínas posiblemente sirve como un almacén de nitrógeno para apoyar la fase inicial del crecimiento del tallo durante su rebrote en la primavera; además, otras proteínas pueden tener función protectora a temperaturas altas y/o condiciones de desecación que se presentan durante la etapa de reposo.

Verdoy *et al.* (2004) mencionaron que varios cADN son inducidos por el déficit de agua e identificados en raíces de frijol *Phaseolus vulgaris*. Su análisis secuencial sugiere que

codifican la proteína lípido transferasa, dos tipos de proteínas LEA y dos proteínas diferentes ricas en prolina (PRPs) (Colmenero-Flores *et al.*, 1999).

Se ha mostrado que las proteínas lípido transferasa LTPs están presentes en reacciones de protección contra patógenos (Terras *et al.*, 1992) y en respuesta a las condiciones de estrés por sales (Torres-Schumann *et al.*, 1992). Así, muchas LTPs han sido detectadas principalmente en partes aéreas de la planta (Vignols *et al.*, 1994; Canevascini *et al.*, 1996), en la raíz (Song *et al.*, 1998) y también se han reportado como reguladoras en la colonización de micorrizas (Blilou *et al.*, 2000), además se encontraron en nódulos de la raíz de *Phaseolus vulgaris* (Verdoy *et al.*, 2004)

Las proteínas ricas en prolina e hidroxiprolina (PRPs) son importantes en la pared celular de la célula vegetal y en la matriz extracelular (Showalter, 1993; Kieliszewski y Lamport, 1994). Estas proteínas juegan un papel importante en la diferenciación y función de diversos tipos celulares (Ye *et al.*, 1991). Se ha mostrado que algunas de éstas son reguladas por diferentes tipos de estrés (Covarrubias *et al.*, 1995; García-Gómez *et al.*, 2000). En leguminosas están asociadas con la morfogénesis de los nódulos y algunas han sido identificadas como nodulinas (Scheres *et al.*, 1990; van de Wiel *et al.*, 1990; Bettaglia *et al.*, 2007).

Las proteínas LEA se acumulan en semillas secas; su expresión en tejido vegetativo está regulada en respuesta al déficit de agua (Ingram y Bartels 1996; Bray, 1997) y estrés por sal (Ozturk *et al.*, 2002). Son consideraras importantes en el proceso de deshidratación

por ser parte de un grupo grande de proteínas llamado hidrofílicas, las cuales son altamente hidrofílicas y tienen contenido alto de glicina. Las proteínas LEA han sido observadas en células meristemáticas y células vasculares y prevasculares. También se acumulan en las células de la epidermis y cilindro vascular de raíces como respuesta a déficit de agua (Battaglia *et al.*, 2007).

Por otra parte, García y Peña (1995) mencionaron que la pared celular tiene por lo menos seis tipos de proteínas estructurales y un gran número de proteínas catalíticas o enzimas. Entre las proteínas estructurales caracterizadas por la abundante presencia de uno o varios aminoácidos a lo largo de la cadena peptídica se reconocen: extensinas, proteínas ricas en lisina, proteínas ricas en prolina, proteínas ricas arabinogalactanas, lectinas y tioninas. Además, existen otras menos estudiadas como las que son ricas en histidina-triptofano y otras que se denominaron proteínas reguladas por agua.

Por otro lado, entre las numerosas proteínas catalíticas se han identificado: peroxidasas invertasas, α y β manosidasa, β -glucanasa, arabinosidasas, α y β galactosidasa, fosfatasa, pectinasa, pectin-metil-esterasa, malato deshidrogenasa (Cassab y Varner, 1988; Varner y Lin, 1989; Brett y Waldron 1990; Showalter, 1993).

Dada la importancia de las proteínas en los procesos de regulación de los efectos del déficit de agua en los tejidos vegetales, en esta investigación se cuantificaron y caracterizaron las proteínas solubles de raíces de plántulas de frijol tepari sometidas a un estrés hídrico durante 24 horas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron semillas de cuatro cultivares de frijol tepari *Phaseolus acutifolius* “Brown-Yellow-Red” (RYB), “Tohono Oodham”, “Negro” y “Blanco de Sinaloa” las cuales fueron cultivadas en condiciones de invernadero en las instalaciones del Colegio de Postgraduados en Montecillo Texcoco, Estado de México, durante el ciclo primavera-verano de 2005, después de la cosecha fueron almacenadas en condiciones de laboratorio hasta su uso a principios de 2006. Para realizar los experimentos se seleccionaron semillas de forma y tamaño homogéneo. Cada semilla fue escarificada manualmente y desinfectada en una solución de hipoclorito de sodio comercial (Clorox®) al 10 % durante 10 min.

Para obtener los potenciales de humedad del sustrato se humedecieron 100 g de vermiculita seca con 10 y 6 ml de agua para obtener con dos Ψ_A de -0.07 MPa al que se le nombro como condiciones de riego y un sustrato con -2.01 MPa al que se denominó condiciones de sequía, Las mezclas fueron colocadas en bolsas de polietileno e incubadas por 48 h antes de trasplantar las plántulas; así, se aseguró que el contenido de las bolsas alcanzara el equilibrio. Transcurrido este tiempo, el Ψ_A de la vermiculita se determinó incubando una muestra de cada bolsa en cámaras psicrométricas (Wescon C-52, Inc, Utah, USA) por 4 h conectadas a un microvoltímetro de punto de rocío (Wescon HR-33T, Inc, Utah, USA).

Las plántulas se obtuvieron de semillas previamente seleccionadas que fueron germinadas a una temperatura de 25 ± 1 °C, en la oscuridad, en charolas con una inclinación de 35 °, por 48 h. Al final de este periodo la raíz principal alcanzó una longitud de 35 a 40 mm en promedio. Las plántulas fueron trasplantadas dentro de tubos de cloruro de polivinilo (PVC) de 40 mm de diámetro interno y 100 mm de longitud, sellados en la base con un fragmento de polietileno color negro detenido con una banda elástica con vermiculita humedecida con los Ψ_A establecidos y se mantuvieron por 24 h en la oscuridad a una temperatura de 25 ± 1 °C. MPa.

Extracción de proteína soluble. El contenido de proteína soluble se determinó en los cultivares "Brown-Yellow-Red" (RYB), "Tohono Oodham", "Negro" y "Blanco de Sinaloa" en un experimento preparado para este objetivo, en muestras de 25 a 30 raíces tomando de 4 a 6 mm de longitud. Las raíces de cada tratamiento y cada variedad fueron separadas en parte apical y zona media (Figura 1) e inmediatamente fueron colocadas en nitrógeno líquido y almacenadas en un ultra congelador a -60 °C hasta su análisis. De cada tratamiento se prepararon 5 repeticiones con 400 a 600 mg.

Muestras de 400 a 600 mg de tejido de raíz fresco fueron trituradas a 4 °C en un mortero previamente enfriado junto con arena de mar y una solución de extracción amortiguadora (40 mM Tris-HCL pH=8.5, 1 mM Fluoruro de fenil metil sulfonil y 15 mM de β mercapto etanol). La muestra triturada fue colocada inmediatamente en un tubo eppendorf y centrifugada a 13,000 rpm durante 10 min a 4 °C. Las muestras centrifugadas fueron inmediatamente colocadas en hielo y el sobrenadante fue separado en alícuotas de 50 μ l y

se procedió a determinar la proteína soluble de cada muestra. Se utilizaron 10 μl de cada muestra por triplicado para determinar el contenido de proteína soluble por el método de Bradford (Bradford *et al.*, 1976). Se utilizó un estándar de Albumina de suero bovino (2 mg /mL), para calcular el contenido de proteína soluble en cada una de las muestras. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro lector de microplacas a 595 nm.

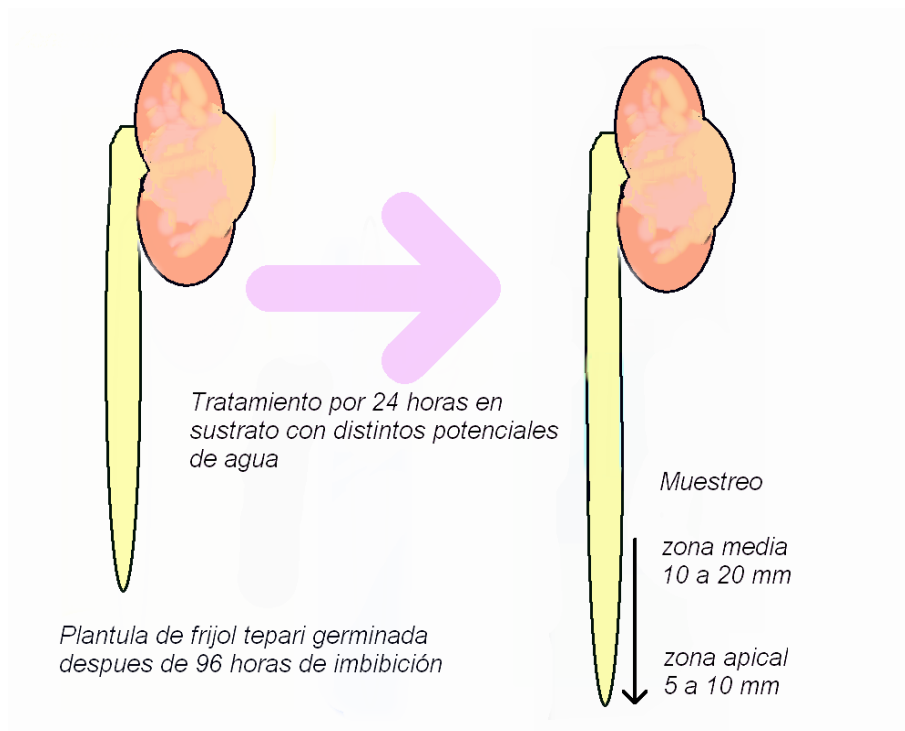


Figura 1. Esquema que ilustra la forma en que se tomaron las muestras para análisis de proteína soluble en plántulas de 96 horas después del inicio de la imbibición de frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray). La flecha entre los dibujos de la planta indica el tratamiento de agua en el sustrato, la flecha delgada en dibujo de plántula derecha indica la zona de muestreo en la raíz

La separación de proteínas fue realizado por electroforesis en minigeles de poliacrilamida (PAGE) y dodecil sulfato de sodio (SDS) al 12 % (Laemmli, 1970). Una vez cuantificada la proteína soluble en las muestras de los cultivares “Negro” y “Blanco de Sinaloa”, se procedió a tomar un volumen equivalente a 60 µg de cada una proteína y se mezcló con la solución “magic mix” (Tris 50 mm (8 ml), Dodecil Sulfato de Sodio (SDS 1ml), Glicerol (1ml), β-mercapto etanol (100 µl) y azul de Bromofenol (1 %)) para dar mayor densidad y color a la muestra (volumen total 35 ul). La muestra se desnaturalizó en un baño maría (100 °C) durante 5 min. Diez cavidades de cada gel fueron cargadas con 35 µl de cada muestra; además se incluyeron 2 muestras con proteínas marcadoras de pesos moleculares conocidos (Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range. Numero de catalogo 161-0305 Bio-Rad Laboratories, 2000 Alfred Nobel Dr., Hercules, CA 94547), las proteínas en el gel fueron separadas por 4 h a 60 V con ayuda de una fuente de poder (BIO RAD). Los geles de poliacrilamida fueron desmontados del sistema de electroforesis y colocados con precaución en recipientes de plástico donde fueron enjuagados con agua destilada e inmediatamente colocados en una solución de azul Coomassie (ácido acético 20 % (100ml), metanol (30 %) y azul de Coomassie (0.5 g), agua destilada (50 %)) de 12 a 15 h. Transcurrido ese tiempo los geles fueron desteñidos con una solución de ácido acético 10 %, metanol 40 % y agua destilada 50 % para retirar el exceso de tinte y hacer evidentes las bandas de proteínas.

Determinación de pesos moleculares de las proteínas separadas. Una vez teñidas las bandas de proteínas en el gel, se determinaron las distancias relativas de migración (Rf) de

cada banda de proteína por carril/muestra, iniciando por el carril de las proteínas marcadoras. Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA 94547 menciona que para determinar un peso molecular de una proteína desconocida se deberá prepararse una curva estándar utilizando el logaritmo base 10 del peso molecular de las proteínas marcadoras en función de sus respectivos R_f calculados. La fuerte relación lineal ($r^2=0.999$) entre el peso molecular de las proteínas y su distancia de migración (R_f) es una indicación confiable para predecir pesos moleculares de proteínas desconocidas.

En el análisis de proteínas se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos, en el que los factores y niveles fueron: los cultivares (Brown-Yellow-Red, Negro, Tohono Oodham y Blanco de Sinaloa) y el Ψ_A del sustrato (-0.07 y -2.01 MPa), respectivamente. Así, para el cálculo de la concentración de las proteínas solubles se utilizaron los cuatro cultivares tomando muestras compuestas de 15 a 20 raíces suficientes para acumular un peso de 600 a 800 μg . Los datos fueron analizados con un análisis de varianza (Proc GLM) y una prueba de comparación de medias de Tukey, con el programa estadístico SAS (SAS Institute, 1999-2000, versión 8.1).

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Figura 2 se muestra que en todos los cultivares evaluados, existe una mayor acumulación de proteína soluble en la zona apical de la raíz (promedio de 2.01 mg/g de peso fresco). Además, se observó mayor acumulación de proteínas solubles en las raíces que crecieron en sustratos con Ψ_A de -2.01 MPa. Los valores fluctuaron entre 1.77 y 2.18 mg/g de peso fresco de raíz. La menor concentración de proteína soluble en el tejido de la

raíz se observó en la zona media (promedio de 1.56 mg/g de peso fresco) y en el sustrato con Ψ_A de -0.07 MPa (entre 1.35 y 1.77 mg/g de peso fresco de raíz), donde la acumulación de proteína disminuyó hasta un 38 % con respecto a la mayor acumulación de proteína soluble (Figura 2.B).

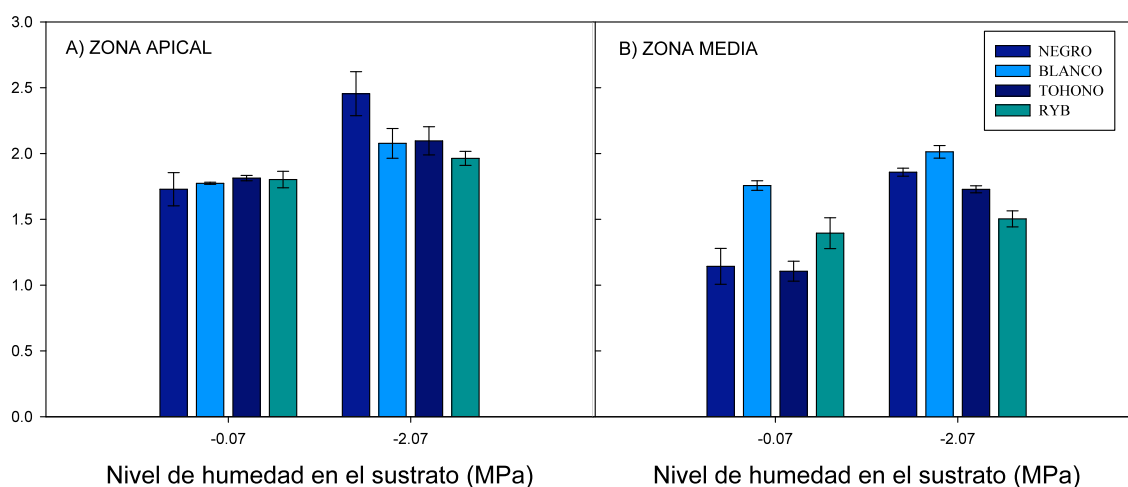


Figura 2. Concentraciones de proteína soluble en dos zonas de la raíz: A) zona apical y B) zona media de cuatro cultivares de frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray). Cada barra en color representa el promedio de la concentración de proteína soluble en el tejido fresco de la raíz y la barra en negro indica \pm el error estándar.

La acumulación de proteína en los tejidos sometidos a un déficit hídrico fue variable. Algunos autores han señalado que la síntesis de proteínas es uno de los procesos bioquímicos que son afectados por el estrés de agua en plantas (Hsiao, 1973; Tod *et al.*, 1972). Sin embargo, Nir *et al.* (1970) y Dhindsa y Cleland (1975) documentaron que los tejidos vegetales que fueron sometidos a estrés por falta de agua generalmente mostraron una reducción en la síntesis de proteínas medida por la síntesis de

aminoácidos. Por otra parte, se ha documentado que plantas que crecen en condiciones ambientales como sequía, salinidad y frío, producen una cascada de proteínas como parte de la respuesta general al estrés (McCue y Hanson, 1990).

Las investigaciones en sequía y que utilizan la biología molecular como una herramienta, generalmente reportan un incremento en la acumulación de proteínas y sus genes específicos que codifican una proteína o grupos de proteínas en respuesta a la condición de sequía, como fue documentado en raíces de frijol *P. vulgaris* (Covarrubias *et al.*, 1995) y frijol tepari (Rodríguez-Uribe y O'Connell, 2006). En esta investigación se encontró mayor acumulación de proteína soluble en la zona apical en ambas condiciones de humedad evaluadas. Sharp (2004) ha mostrado que la respuestas de crecimiento de raíz de maíz I en sustrato con Ψ_A bajo, incluyó un patrón complejo de eventos morfogénicos y metabólicos que se presentaron en la zona cercana al ápice de la raíz. Zhu *et al.* (2006) mostraron que el estrés por déficit de agua indujo cambios en las proteínas de la pared celular del ápice de la raíz de maíz. Esta disminución permitió que muchos procesos moleculares se activaran para regular el alargamiento celular. Zhu *et al.* (2006) también señalaron que en la zona apical fueron identificadas hasta 152 proteínas con relación al déficit de agua, las que categorizaron en cinco grupos basados en su función potencial como: (ROS) "reactive oxygen species", protección y desintoxicación, hidrolasas, metabolismo de carbohidratos y otras de función desconocida.

Los patrones electroforéticos de dos cultivares Blanco y Negro de frijol tepari mostraron 18 bandas de proteína en la zona apical de la raíz, mientras que en la zona media

mostraron 19 bandas de proteínas (Figura 3) La comparación de los resultados de los dos genotipos en las dos condiciones de humedad no mostró diferente número de bandas.

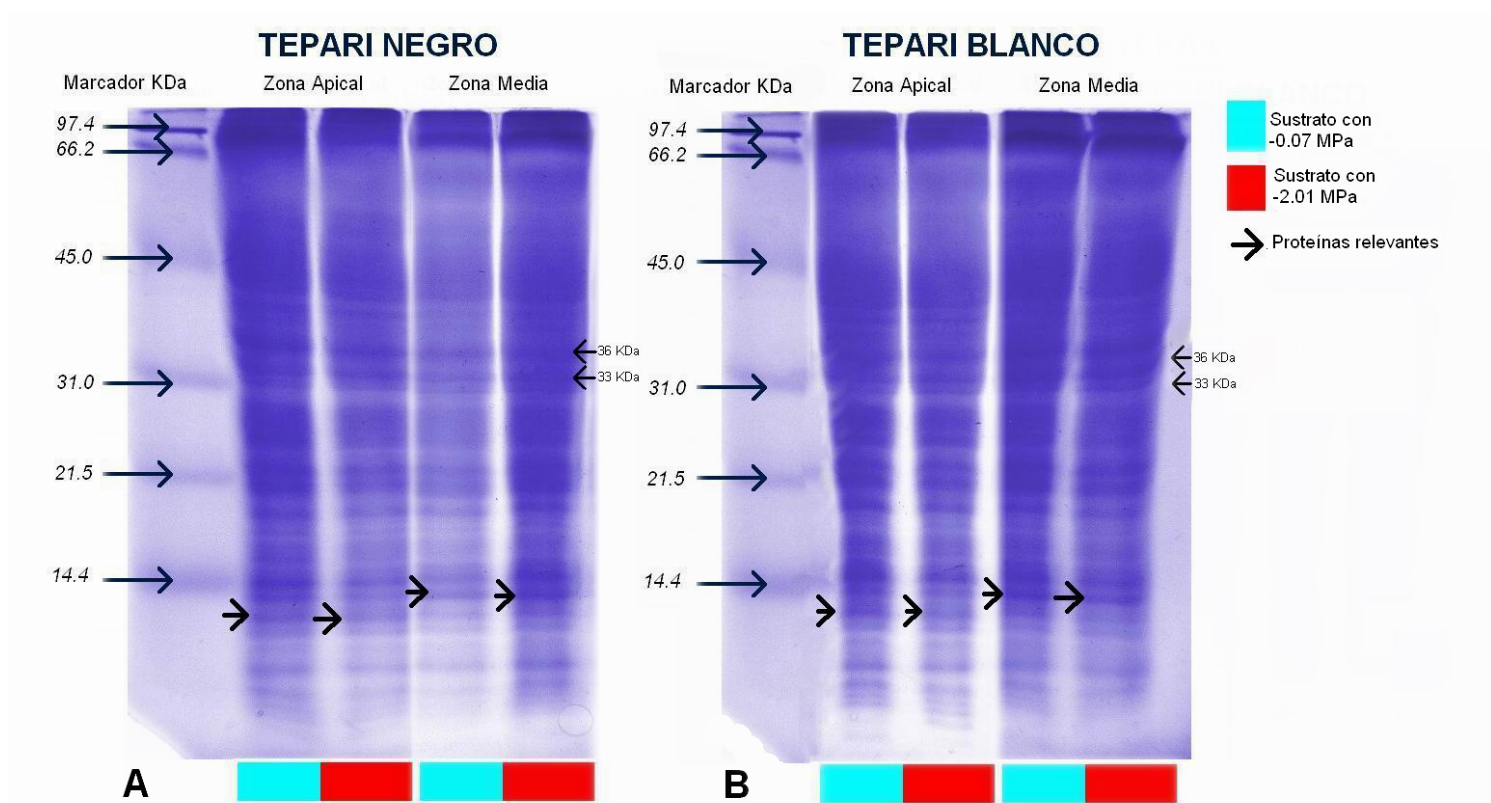


Figura 3. Patrones de proteínas solubles de plántulas de dos los cultivares de frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray). 3A) Negro y 3B) Blanco. Obtenidas de dos zonas de la raíz (Zona apical y Zona Media) que crecieron con buen nivel de humedad (sustrato con $\Psi_A = -0.07$ MPa (■)) y con déficit de humedad (sustrato con $\Psi_A = -2.01$ MPa (■)). Las proteínas fueron separadas en geles SDS-PAGE al 12%, en todos los casos la concentración de proteína fue de 60 μg por cavidad.

Los geles evaluados mostraron bandas más densas con peso molecular de 8, 10, 12, 13, 14, 18, 20, 22, 24, 27, 31, 33, 36, 41, 58, 77 KDa. Las diferencias visibles de la presencia de bandas de proteínas, detectadas directamente, sólo se observaron entre la zona apical y la

zona media de la raíz. No fueron observadas diferencias visibles en las bandas entre los niveles de humedad evaluados.

Así, en la zona apical se observó la presencia de una proteína con un peso molecular 12 KDa (Figura 3A) y la zona media de la raíz, presentó bandas adicionales a los 14.0 KDa (Figura 3B) y entre los 57 a 60 KDa (Figura 3 A y 3B). En la zona arriba del los 70 KDa, (Figura 4) se observaron diferencias claras de la presencia de proteínas diferentes en la zona apical y la zona media de la raíz y sin diferencias entre las condiciones de humedad del sustrato.

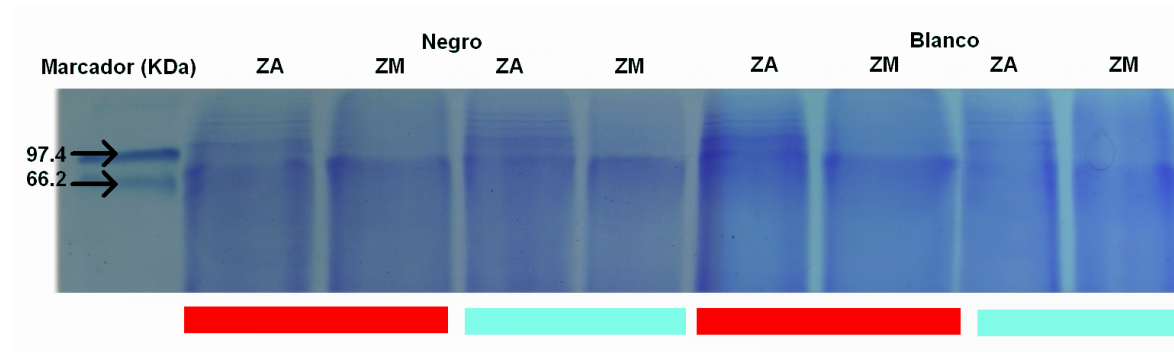


Figura 4. Patrones de proteínas solubles en la zona de 70 – 97 KDa de dos zonas de la raíz (ZA=Zona apical y ZM= Zona Media) de plántulas de los cultivares Negro y Blanco de frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) que crecieron con buen nivel de humedad (sustrato con $\Psi_A = -0.07$ MPa (■)) y con déficit de humedad (sustrato con $\Psi_A = -2.01$ MPa (■)). La proteínas fueron separadas por SDS-PAGE al 12% (en todos los casos fueron 60 μ g de proteína por cavidad y carril).

Los dos cultivares fueron similares en su patrón electroforético en las dos condiciones de humedad evaluadas. Resultados similares fueron observados en los estudios realizados por Camacho y González de Mejía (1998), quienes al separar las proteínas de semillas de

frijol tepari encontraron un patrón electroforético de 26 bandas tanto en sequía como en riego, mientras que con las semillas de frijol *P. vulgaris* el patrón electroforético mostró 21 bandas en riego y sólo 19 bandas en sequía. En semillas de soya con déficit hídrico no se mostraron diferencias cualitativas en los patrones de proteínas en dos condiciones de humedad (Pikaard y Cherry, 1984).

Se ha demostrado que los patrones electroforéticos representan diferencias cualitativas y cuantitativas entre especies de plantas, como en el caso de una comparación de proteínas de semillas de frijol *P. vulgaris* versus frijol tepari (Camacho y González, 1998). El frijol tepari mostró 7 bandas adicionales respecto al frijol *P. vulgaris* que mostró dos bandas que no se encontraron en frijol tepari. Pero los patrones electroforéticos también mostraron diferencias cualitativas y cuantitativas dentro de especies. Este fue el caso de los patrones electroforéticos de la faseolina estudiadas en 55 variantes de semillas de frijol tepari silvestre y ocho variedades de frijol tepari domesticado, donde se documentaron hasta 15 patrones electroforéticos diferentes de faseolina sólo en las variantes silvestres (Schinkel y Gepts, 1998).

En esta investigación se documentó la presencia de la banda 33 y 36 del patrón electroforético o gel obtenido a partir un extracto de proteína soluble en la raíz de frijol tepari y no se observaron diferencias cualitativas de su presencia entre la zona apical o la zona media de la raíz o entre las dos condiciones de humedad evaluadas.

Covarrubias *et al.* (1995) reportó por primera vez las bandas 33 y 36 KDa del patrón electroforético. Posteriormente García-Gómez *et al.* (2000) y Battaglia *et al.* (2007) encontraron que las p33/p36, son proteínas ricas en prolina que representan a una de las clases de proteínas llamadas proteínas estructurales de la pared celular (PEPC o WCP). Estas proteínas se acumulan en respuesta al déficit de agua y a tratamientos de ABA en la pared celular de plantas de frijol (Covarrubias *et al.*, 1995; García-Gómez *et al.*, 2000).

Por otra parte, cabe mencionar que en un principio se reportó que p33/p36 sólo fueron localizadas en la fracción insoluble de la pared celular y no fueron detectadas en la fracción soluble. Sin embargo, Battaglia *et al.* (2007) documentaron que p33/p36 son secretadas en la superficie celular y acumulada en la matriz extracelular, permaneciendo como complejos solubles sin ser enteramente inmovilizadas en la pared celular. Anatómicamente, estas proteínas fueron encontradas en la raíz principal de plántulas de frijol Negro Jamapa creciendo en distintas condiciones de humedad (riego y sequía). Mediante inmunodetección se observó su acumulación en células de la epidermis y el tejido vascular, haciéndose más evidentes en la condición de sequía (Battaglia *et al.*, 2007). García-Gómez *et al.* (2000) y Battaglia *et al.* (2007), reportaron mayor acumulación de p33/p36 en zonas con crecimiento bajo condiciones de déficit hídrico y en zonas con tasa alta de elongación del hipocótilo de frijol negro Jamapa.

En este contexto, dada las condiciones que se utilizaron para la extracción y su presencia en el extracto de proteína soluble, se esperaría que las bandas de 33 y 36 sean similares a

las encontradas y conocidas como proteínas p33/p36 (Covarrubias *et al.*, 1995) y estén presentes en frijol tepari sin un estímulo de déficit de humedad.

Otra banda a la que se hace referencia en la literatura es banda de 14 KDa que coincide con las bandas encontrada en el patrón electroforético de la raíz de frijol tepari de zona apical y en menor grado en la zona media tanto en riego como en sequía.

Colmenero-Flores *et al.* (1999) estudiaron el gene Pvlea-18 en el embrión y el endospermo de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y que codifica una proteína de 14-kDa, que se acumula durante la embriogénesis tardía (Proteína LEA) y además su acumulación se reactiva en diferentes órganos de la plántula de frijol durante el estrés por agua. La acumulación de esta proteína ocurre específicamente en regiones de crecimiento activo de la plántula específicamente en células de protoxilema y tejido meristemático de la raíz.

Es conocido que las proteínas LEA y sus transcriptor se acumulan en muchas semillas secas, pero desaparecen cuando se inicia la germinación, mientras que Colmenero-Flores *et al.* (1999) reportaron que tanto el transcriptor como la proteína reaparecen después de la germinación en partes emergentes con crecimiento activo. Finalmente estos autores reportaron que la presencia de PvLEA-18 en células con alta acumulación de osmolitos puede estar relacionada con la capacidad de esta proteína para capturar agua o realizar una función protectora durante el estrés por agua.

CONCLUSIONES

En raíces de plántulas de frijol tepari la mayor acumulación de proteínas solubles se observó en las raíces que crecieron en sustratos con Ψ_A de -2.01 MPa y la mayor acumulación fue en la zona apical. Los patrones electroforéticos elaborados a partir de proteína soluble de tejido de raíz de frijol tepari no mostraron diferencias notables similitudes para los dos cultivares evaluados. Se observaron 18 bandas de proteína en la zona apical de la raíz, mientras que la zona media mostró 19 bandas de proteínas. Los análisis comparativos entre las dos condiciones de humedad evaluadas no mostraron similitud en el número de bandas. En la zona apical se observó la presencia de una proteína con un peso molecular 12 KDa en ambas condiciones de humedad, mientras que la zona media de la raíz presentó dos bandas adicionales una de 14.0 KDa y otra entre los 57 - 60 KDa. Además, un conjunto de bandas arriba de los 80 KDa presentó diferencias muy marcadas entre la zona apical comparada con la zona media en ambas condiciones de humedad. Los métodos de extracción y separación fueron adecuados para detectar y separar las proteínas, como se ha documentado en otros estudios para frijol *P. vulgaris* en ambientes con estrés de agua. Esta información puede ser de utilidad ya que en frijol tepari la mayoría de las proteínas no se presentaron por estrés de agua, pero si indican una variación de los patrones electroforéticos espaciales entre la zona apical y la zona media de la raíz.

LITERATURA CITADA

- Bartel, D., E. Souer. 2004. Molecular responses of higher plants to dehydration. En: Hirt, H., C. Shinosaki (eds.) Plant responses to abiotic stress. Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg, Germany. Pp: 9-37.
- Battaglia, M., R.M. Solórzano, M. Hernández, S. Cuéllar-Ortiz, B. García-Gómez, J. Márquez, A. A. Covarrubias. 2007. Proline-rich cell wall proteins accumulate in growing regions and phloem tissue in response to water deficit in common bean seedlings. *Planta* 225: 1121-1133.
- Berlyn, G., P. Miksche. 1976. Botanical microtechnique and cytochemistry. Iowa State University Press. Ames, USA.
- Blilou I., J.A Ocampo, J.M. Garcia-Garrido. 2000. Induction of Ltp (lipid transfer protein) and Pal (phenylalanine ammonialyase) gene expression in rice roots colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Journal of Experimental Botany* 51: 1969-1977.
- Boyer, J.S. 1982. Plant productivity and environment. *Science* 218: 443-448.
- Bray, E.A. 1997. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* 2: 48-54.
- Brett, C., K. Waldron. 1990. Physiology and biochemistry of plant cell wall. Unwin Hyman. Ltd. London, UK.
- Camacho, B.M., E. Gonzalez de Mejia. 1998. Comparative study of enzymes related to proline metabolism in tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) and common bean (*Phaseolus vulgaris*) under drought and irrigated conditions, and various urea concentrations. *Plant Foods for Human Nutrition* 52: 119-132.
- Canevascini S., D. Caderas, T. Mandel, A. J. Fleming, I. Dupuis, C. Kuhlemeier. 1996. Tissue-specific expression and promoter analysis of the tobacco ltp1 gene. *Plant Physiology* 112: 513-524.
- Cassab, G., E. Varner. 1988. Cell wall proteins. *Annual Review of Plant Physiology* 39:321-353.
- Chandra, R., K. Bhatt, L.P. Misra. 1998. Effect of Water Stress on Biochemical and Physiological Characteristics of Oat Genotypes. *Journal of Agronomy and Crop Science* 181: 45-48.

- Close, T.J. 1996. Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiologia Plantarum* 97: 795-803.
- Cloutier, Y. 1983. Changes in the electrophoretic patterns of the soluble proteins of winter wheat and rye following cold acclimation and desiccation stress. *Plant Physiol* 71: 400-403.
- Colmenero-Flores, J.M., L.P. Moreno, C.E. Smith, A.A. Covarrubias. 1999. Pvlea-18, a member of a new late-embryogenesis abundant Embryogenesis abundant protein family that accumulates during water stress and in the growing regions of well-irrigated bean seedlings. *Plant Physiology* 120: 93-104.
- Covarrubias, A.A., J.W. Ayala, J.L. Reyes., M. Hernandez, A. Garcia-Rubio. 1995. Cell-wall proteins induced by water deficit in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Plant Physiology* 107: 1119-1128.
- Dhindsa, R.S., J.D. Bewley. 1977. Water Stress and Protein Synthesis. V. Protein synthesis, protein stability, and membrane permeability in a drought sensitive and drought tolerant moos. *Plant Physiology* 59: 295-300.
- Dhindsa, R.S., R.E. Cleland. 1975. Water Stress and Protein Synthesis.II. Interaction between water stress, hydrostatic pressure, and abscisic acid on the pattern of protein synthesis in avena coleoptiles. *Plant Physiology* 55: 782-785.
- García, H.E. del R., C.B Peña-Valdivia. 1995. La pared celular componente fundamental de las células vegetales. Universidad Autonoma Chapingo. Texcoco, México.
- Garcia-Gomez, B.I., F. Campos, M. Hernández, A.A. Covarrubias. 2000. Two bean cell wall proteins more abundant during water deficit are high in proline and interact with a plasma membrane protein. *Plant Journal* 22: 277-288.
- Hirt, H., K. Shinozaki. 2004. Topics in current Genetic, Vol. 4. Plant responses to abiotic stress. Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg, Germany.
- Hsiao, T.C. 1973. Plant responses to water stress. *Annual Review of Plant Physiology* 24: 519-570.
- Ingram, J., D. Bartels. 1996. The molecular basis of the dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 377-403.
- Kamenetsky, R., R.L. Peterson, L.H. Melville, C.F. Machado, J.D. Bewley. 2005. Seasonal adaptations of the tuberous roots of *Ranunculus asiaticus* to desiccation and

resurrection by changes in cell structure and protein content. *New Phytologist* 166: 193-204.

Kavar, T., M. Maras, M. Kidric, J.V. Sustar, V. Meglic. 2008. Identification of genes involved in the response of leaves of *Phaseolus vulgaris* to drought stress. *Molecular Breeding* 21: 159-172.

Kieliszewski, M.J., Lamport D.T. 1994. Extensin: repetitive motifs, functional sites, post-translational codes, and phylogeny. *Plant Journal* 5: 157-172.

Kramer, P., J. Boyer. 1995. *Water relation of plants and soil*. Academic Press, Orlando, Florida, USA.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 22: 680-685.

McCue, K.F., A.D. Hanson. 1990. Drought and salt tolerance: towards understanding and application. *Trends in Biotechnology* 8: 358-362.

Media Cybernetics, 1997, *Image-Pro Plus Reference Guide for Windows*, Silver Spring, USA.

Nir, I., A. Poljaxoff-Mmayber, S. Klein. 1970. The effect of water stress on the polysome population and the ability to incorporate amino acids in maize root tips. *Israel Journal of Botany*. 19: 451-462.

Ozturk, Z.N., V. Talame, M. Deyholos, C.B. Michalowski, D.W. Galbraith, N. Gozukirmizi, R. Tuberosa, H.J. Bohnert. 2002. Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought and salt-stressed barley. *Plant Molecular Biology* 48: 551-573.

Pikaard, S.C., J.H. Cherry. 1984. Maintenance of Normal or supranormal protein accumulation in developing ovules of *Glycine max* L. Merr. during PEG-Induced water stress. *Plant Physiology* 75: 176-180.

Rodriguez-Urbe, L., M.A. O'Connell. 2006. A root-specific bZIP transcription factor is responsive to water deficit stress in tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) and common bean (*P. vulgaris*). *Journal of Experimental Botany* 57: 1391-1398.

Sánchez-Urdaneta, A., C. Peña-Valdivia, C. Trejo, J.R. Aguirre, E. Cárdenas, A. Galicia. 2003. Permeabilidad de las membranas radicales de plantulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L) silvestre y domesticado bajo déficit de humedad. *Interciencia* 28: 597-603.

- Scheres B., C. Van De Wiel, A. Zalensky, B. Horvath, H. Spaink, H. van Eck, F. Zwartkruis, A.M. Wolters, T. Gloudemans, A. van Kammen, T. Bisseling. 1990. The ENOD12 gene product is involved in the infection process during the pea-*Rhizobium* interaction. *Cell* 60: 281-294.
- Schinkel, C., P. Gepts. 1988. Phaseolin diversity in the tepary bean *Phaseolus acutifolius* A. Gray. *Plant Breeding* 101: 292-301.
- Sharp, E.R., W.J. Davies. 1979. Solute regulation and growth by roots and shoots of water-stressed maize plants. *Planta* 147: 43-49.
- Sharp, E.R., W.K. Silk, T.C Hsiao. 1988. Growth of the maize primary root at low water potentials. I Spatial distribution of expansive growth. *Plant Physiology* 87: 50-57.
- Showalter A.M. 1993. Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* 5: 9-23.
- Song, J.Y., D.W. Choi, J.S. Lee, Y.M. Kwon, S.G. Kim. 1998. Cortical tissue-specific accumulation of the root-specific ns-LTP transcripts in the bean (*Phaseolus vulgaris*) seedlings. *Plant Molecular Biology* 38: 735-742.
- Terras F.R., H.M Schoofs., M.F De Bolle., F. Van Leuven, S.B Rees., J. Vanderleyden, B.P Cammue, W.F. Broekaert. 1992. Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *Journal of Biological Chemistry* 267: 15301-15309.
- Todd, G.W. 1972. Water deficits and enzymatic activity. En: T.T. Kozlowski (ed.) *Water deficits and plant growth*, Vol. III. Academic Press. New York. Pp: 177-216.
- Torres, S.S., J.A. Godoy, J.A. Pintor-Toro. 1992. A probable lipid transfer protein gene is induced by NaCl in stems oftomato plants. *Plant Molecular Biology* 18: 749-757.
- van de Wiel, C., B. Scheres, H. Franssen, M.J. van Lierop, A. van Lammeren, A. van Kammen, T. Bisseling. 1990 .The early nodulin transcript ENOD2 is located in the nodule arenchyma (inner cortex) of pea and soybean root nodules. *EMBO Journal* 9: 1-7.
- Varner, J.E., L.S. Lin. 1989. Plant cell wall architecture. *Cell* 56: 231-239.
- Verdoy, D., M.M. Lucas, E. Manrique, A.A. Covarrubias, M.R. de Felipe, J.J. Pueyo. 2004. Differential organ-specific response to salt stress and water deficit in nodulated bean (*Phaseolus vulgaris*). *Plant, Cell and Environment* 27: 757-767.

- Verslues, P.E., M. Agarwal, S. Katiyar-Agarwal, J. Zhu, J. K. Zhu. 2006. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J.* 45: 523-539.
- Vignols F., G. Lund, S. Pammi, D. Tremousaygue, F. Grellet, J.C. Kader, P. Puigdomenech, M. Delseny. 1994. Characterization of a rice gene coding for a lipid transfer protein. *Gene* 142: 265-270.
- Ye, Z.H., Y.R. Song, A. Marcus, J.E. Varner. 1991. Comparative localization of three classes of cell wall proteins. *Plant Journal* 1: 175-183.
- Zhu, J., S. Alvarez, E. Marsh, M.E. Lenoble, I.J. Cho, M. Sivaguru, S. Chen, H.T. Nguyen, Y. Wu, D.P. Schachtman, R.E Sharp. 2007. Cell wall proteome in the maize primary root elongation zone. II. region-specific changes in water soluble and lightly ionically-bound proteins under water deficit. *Plant Physiology* 145: 1533-1548.
- Zhu, J., S. Chen, S. Alvarez, V.S. Asirvatham, D.P. Schachtman, Y. Wu, R.E. Sharp. 2006. Cell wall proteome in the maize primary root elongation zone. I. Extraction and identification of water-soluble and lightly ionically bound proteins. *Plant Physiology* 140: 311-325.

DISCUSIÓN GENERAL

En la presente investigación se encontró que la raíz de frijol tepari mostró un crecimiento particular y continuo principalmente influenciado por los niveles de humedad. Las raíces de frijol tepari mantuvieron un contenido de agua alto en sus tejidos. Como se esperaba, el CRA fue cercano a 100 % en el sustrato con Ψ_A de -0.03 MPa. Sin embargo, una disminución moderada del Ψ_A del sustrato, ocasionó una disminución del CRA hasta 81.5 %. Así, el CRA del tejido de la raíz se mantuvo por encima de 79.5 %, en el sustrato más seco con -2.01 MPa y no mostró cambios significativos en el CRA entre los cultivares. Similar a lo observado por Xu *et al.* (2006) quienes encontraron que el CRA no bajo más allá del 70% en hojas de pastos en un suelo con 9.0% de humedad y contrario a lo observado por Mohamed y Tawfik (2007) que si reportaron cambios significativos del CRA en hojas de frijol tepari ante un estrés de agua. De esta forma esta investigación proporcionó los argumentos necesarios para considerar al CRA como buen parámetro para medir el estatus hídrico en raíces de plántulas de frijol tepari y en general en tejidos vegetales como fue considerado por otros autores (Barrs y Weatherley, 1962; Barrs, 1968; Hellmuth, 1970) pero no se considera por si solo un buen criterio de selección para resistencia a la sequía como ha sido propuesto en genotipos de cebada (Matin *et al.*, 1989).

Como se ha reportado en la raíz de plántulas de algodón, calabaza, maíz, soya y vigna que mantuvieron su crecimiento en un sustrato con Ψ_A -1.5 MPa (Sharp *et al.*, 2004) y para *P. vulgaris* (silvestre y domesticado) en Ψ_A -2.5 (Sánchez Urdaneta *et al.*, 2005). Se encontró

que las raíces de plántulas de frijol tepari también permanecieron vivas en sustrato con un Ψ_A de -2.01 MPa y continuaron su crecimiento durante 24 h. De esta forma, a nivel de órgano el crecimiento de la raíz fue observado específicamente por el incremento en longitud de los primeros dos milímetros de la raíz marcados antes de trasplantar las plántulas en los sustratos con Ψ_A diferentes. Por una parte, se encontró que los cultivares no mostraron diferencias significativas en el incremento de la longitud de la raíz entre ellos contrario a lo reportado en raíces de plántulas de frijol común y maíz reportado por Sánchez-Urdaneta *et al.* (2004) o plantas adultas de frijol tepari creciendo en distintos niveles de humedad (Mohamed *et al.*, 2002).

El crecimiento en longitud fue mayor en los sustratos moderadamente secos con Ψ_A de -0.07 y -0.501 MPa, mientras que en los sustratos muy húmedos o muy secos con Ψ_A de -0.03 y -2.01 MPa respectivamente mostraron poco crecimiento en longitud. La respuesta positiva de la raíz de plántulas de frijol tepari a los Ψ_A del sustrato entre -0.07 y -0.51 MPa, puede estar relacionada con una adaptación específica a ambientes áridos, donde las raíces alcanzan su crecimiento máximo; este comportamiento ha sido observado previamente en *Arabidopsis thaliana* (van der Weele *et al.*, 2000) y otros cultivares de tepari, en diferentes estados fenológicos, en los que la deshidratación moderada del sustrato también estimuló el crecimiento de la raíz (Mohamed *et al.*, 2002).

Se conoce que entre las diferentes especies el crecimiento máximo de la raíz es favorecido con Ψ_A en sustrato cercano a -0.03 MPa (Liang *et al.*, 1997; Sánchez-Urdaneta *et al.*, 2005). Sin embargo, en este estudio la raíz de los cuatro cultivares no alcanzó el máximo

crecimiento en longitud en un sustrato con Ψ_A de -0.03 MPa. Se ha documentado que en sustratos con Ψ_A cercanos a capacidad de campo la raíz de algunas especies tienden a disminuir su crecimiento, propiciado por una deficiencia en la difusión de oxígeno que generalmente causa una hipertrofia en el tejido estimulada por la acumulación de etileno (Levitt, 1980) y después forma aerénquima como una estrategia de adaptación en ambientes inundados, en este estudio estos efectos no fueron observados en las raíces de frijol tepari que crecieron en Ψ_A cercanos a capacidad de campo. En contraparte, los niveles de humedad en el sustrato reducidos de -2.05 MPa resultaron en un crecimiento longitudinal reducido de la raíz de los cuatro cultivares, pero no lo inhibió completamente.

La reducción del crecimiento es ampliamente reportado como un efecto de la sequía, pero las raíces son menos sensibles a sus efectos y permanecen creciendo en condiciones de sequía extrema, cuando el crecimiento del tallo es inhibido completamente (Sharp *et al.*, 1988). Una tendencia similar fue observada en la biomasa de la raíz de los cuatro cultivares donde los niveles de humedad moderadamente secos resultaron con efectos positivos y mayor acumulación de biomasa, se ha demostrado que la acumulación de materia seca disminuyó con el estrés hídrico en las raíces de las plántulas de frijol, agave y maíz (Sánchez-Urdaneta *et al.*, 2004; Sharp *et al.*, 1988).

El diámetro de la raíz se incrementó de forma sucesiva desde el ápice hacia el cuello independientemente de los niveles de humedad en el sustrato y el cultivar, este incremento fue el resultado de los cambios morfológicos programados por el desarrollo de la raíz. Liang *et al.* (1997) mencionan que las respuestas morfológicas de la raíz a

distintos ambientes, deben ser estudiadas tomando en cuenta los cambios propios de crecimiento y desarrollo que han sido fijados en la raíz en el transcurso de la historia evolutiva de la especie. Se encontró también que el diámetro en los 0.5 mm inmediatos al ápice no se registraron cambios entre los Ψ_A del sustrato ni entre los cultivares. De esta forma en el segmento de la raíz cercano al ápice, no fue afectado por los niveles de humedad en todas los cultivares. Similar a lo observado en raíces de maíz (Sharp *et al.*, 1988). Sin embargo, el análisis morfológico, el diámetro de raíz medido en diferentes puntos de los primeros 20 mm de la raíz mostró diferencias significativas para cada cultivar y en cada Ψ_A del sustrato. El segmento entre 6.5 y 7 mm después del ápice de la raíz, se encontró que las raíces que crecieron en sustratos con Ψ_A de -0.03 MPa resultaron ser más gruesas en todas los cultivares, mientras que con las raíces que crecieron en sustratos con Ψ_A -2.01 MPa fueron raíces más delgadas en todas los cultivares. Como se ha reportado en sistemas radicales con déficit de agua, las raíces reducen su diámetro a medida que el suelo disminuyó su contenido de agua, Sharp *et al.* (1988) reportaron la disminución del diámetro de la raíz de maíz en la zona de alargamiento, asociado a la humedad reducida del sustrato. Sin embargo, van der Weele *et al.* (2000) demostraron que las raíces de *A. thaliana* no se adelgazaron en un sustrato de Ψ_A bajo.

La raíz de frijol tepari, vista en un corte longitudinal de los primeros 3 mm mostró la existencias de cuatro regiones como fue registrado en la raíz de *Nicotiana* sp. y *Daucus carota* (Esau, 1940). Estas zonas en la región cercana al ápice de la raíz de frijol tepari son: la zona de la cofia o caliptra; la zona meristemática que se compone por las células

iniciales que se presentaron antes de los 0.5 y 0.74 mm y la zona de división entre los 0.75 a 1.0 mm; la zona de alargamiento, donde las células del córtex alcanzan su máximo tamaño y no presentan más divisiones de 1.5 a 1.75 mm y más allá de los 20 mm una zona de maduración, donde se presentan pelos radicales largos y la mayoría de las células han completado su diferenciación y en algunos casos su alargamiento. Los datos obtenidos coincidieron con los reportados por Jensen y Asthon (1960) quienes observaron que la zona meristemática o iniciales se presenta solamente hasta los 4 mm, la zona de alargamiento inicia a los 8.2 mm y la zona de división se de los 4 a los 8 mm en raíces de *Allium cepa*. Por otra parte, Torrey (1965) encontró en raíces de especies de *Pisum*, *Vicia* y *Zea* que el límite donde la elongación de las células cesa es relativamente cercano al ápice, entre 5.2, 7.0 y 10 mm del ápice respectivamente. La división celular está confinada a menos de 1 a 3 mm en muchas especies, mientras que el crecimiento rápido de las células está en los primeros 10 mm después del ápice.

Anatómicamente, un corte transversal del segmento de 6.5 y 7 mm de la raíz de frijol tepari mostró la estructura de una raíz típica. A este nivel se observaron todos los tipos celulares diferenciados en crecimiento primario. Se observó un cilindro central compuesto por células grandes de parénquima hacia el centro, rodeadas por cuatro polos de tejido vascular que limita con las células de la endodermis formada por una hilera ininterrumpida de células distintivas con paredes angulares. Hacia el exterior, se localizó una capa de células del córtex compuesta por 5 ó 6 hileras de células grandes de parénquima cuyo número no varía entre las variedades estudiadas y en la periferia de la

raíz, la epidermis formada por una capa de células de parénquima distintivas por su contenido celular denso y en ocasiones intercalada con células de pelos radicales.

El cilindro central la raíz de frijol tepari resultó anatómicamente más complejo ya que se compone de distintos tipos celulares, acomodados en patrones originados por la distribución de los cuatro polos del tejido vascular o más bien cordones de xilemáticos (Esau, 1985). La raíz de frijol tepari mostró cuatro cordones xilemáticos y como en todas las raíces de dicotiledóneas el xilema es exarco, esto quiere decir que sus elementos maduran en sentido centrípeto, los primeros elementos en diferenciarse son el protoxilema que se encuentra localizado cerca de la periferia del cilindro central y más tarde se diferencia el metaxilema hacia el centro del cilindro central junto con células grandes de parénquima que parecen formar una médula en las raíces de frijol tepari. El floema de estas raíces tiene una diferenciación es centripeta. Esau (1985) menciona que el protoxilema y el profloema marcan con su aparición el comienzo de la diferenciación vascular. Por lo tanto, pueden utilizarse como puntos de referencia. Vistos en sección transversal, los elementos del xilema de los polos son de menor diámetro que los más centrales y de acuerdo con Esau (1985) la transición entre los elementos anchos y angostos suele ser gradual y por consiguiente, es difícil la separación entre el protoxilema y metaxilema basándose en la diferencia de tamaños y en general los elementos de protoxilema se distinguen por su ubicación y la estructura o la ornamentación de la pared celular.

El análisis de los tamaños celulares mostró un crecimiento diferente para cada una de las condiciones evaluadas en cada uno de los tejidos de la raíz, epidermis, córtex y cilindro central. Para las variables anchura de las células de la epidermis, anchura de las células de córtex, área del tejido vascular y densidad en las células del córtex, se observaron diferencias significativas entre los cultivares y entre los niveles de humedad evaluados, el tamaño mayor fue alcanzado en el Ψ_A de -0.03 MPa, y el tamaño menores en el Ψ_A de -2.01 MPa. Por otra parte, se observó que las células de parénquima que forman el córtex contribuyeron más al crecimiento radial además, mostraron mayor capacidad para modificar su diámetro con los diferentes Ψ_A del sustrato.

Bioquímicamente la concentración de prolina en las zonas de crecimiento de la raíz se ha considerado como un indicador de ajuste osmótico. Por una parte, se ha documentado que la prolina puede contribuir con cerca del 50 % del total de los solutos en las células del ápice de la raíz en plántulas de maíz (Voetberg y Sharp, 1991); además, Phillips *et al.* (2002) encontró que la prolina actúa como un soluto citoplásmico aún en concentración alta. De esta manera la acumulación de prolina en una situación de estrés protege a las células mediante el balance de las fuerzas osmóticas del citosol, las vacuolas y el medio externo (Aspinall y Paleg, 1981). Además, la prolina puede interactuar con las macromoléculas celulares como las enzimas, estabilizando su estructura y función (Jain *et al.*, 2001).

En general, se observó que la concentración de prolina se incrementó en los sustratos con Ψ_A bajos (-2.01 MPa) y en la zona cercana al ápice (primeros 10 mm). Esta tendencia

general también fue observada en hojas en estrés de agua de distintas especies cultivadas como: arroz (Yang *et al.*, 2000), canola (Trotel-Aziz *et al.*, 2000), papa (Büssis *et al.*, 1998), maíz (Thakur y Rai, 1981), tomate (Zgallai *et al.*, 2005) y trigo (Chandrasekar *et al.*, 2000). Los incrementos en la concentración de prolina en raíces de maíz fueron interpretados como una respuesta altamente regulada por una disminución del estatus del agua en la raíz (Voetberg y Sharp, 1991; Ober y Sharp, 1994). Además se conoce que el ajuste osmótico es más grande en ápices de raíz que en hojas, como se ha observado en maíz (Sharp y Davies, 1979). Serraj y Sinclair (2002) mencionaron que el ajuste osmótico en la zona apical de la raíz bajó rápidamente el potencial de agua en este tejido, mientras que en tejido de las hojas el ajuste osmótico sucedió lenta e incompletamente lo cual podría explicar la sensibilidad alta de la hoja en comparación con la raíz. Además, el ajuste osmótico presente en el ápice de la raíz podría desviar el agua de otras partes de la raíz a los ápices de la raíz, resultando en un crecimiento sostenido de la raíz en suelos secos.

A pesar de la relación cercana entre la acumulación libre de prolina y la disminución de agua, encontrada en numerosos trabajos, la concentración de prolina no ha sido considerada un parámetro seguro para describir la habilidad de la planta para resistir estrés. Bokhari y Trent (1995) mencionaron que los incrementos de prolina ante la sequía, no representan un índice de resistencia, debido a que las especies vegetales pueden diferir considerablemente en la cantidad de prolina que acumulan en los distintos tejidos durante el estrés. Karamanos (1995) mencionó que una asociación posible de acumulación de prolina con la resistencia a la sequía de diferentes genotipos tendría una importancia práctica obvia, ya que podría dar un criterio fácil de discriminación a los

mejoradores vegetales y ayudar a los agrónomos a elegir los mejores genotipos. Sin embargo, su investigación, llegó a la conclusión de que prolina es un buen indicador si se usan además otros parámetros de evaluación.

La concentración alta de prolina encontrada en los tejidos apicales de la raíz de frijol tepari, indicó probablemente que en la zona cercana al ápice de la raíz de frijol tepari podría existir un ajuste osmótico y la acumulación de prolina juege un papel esencial en el mantenimiento de crecimiento de la raíz primaria en sustratos con Ψ_A bajos. Este ajuste osmótico mantuvo la turgencia en las células de la raíz, particularmente en las zonas apicales, lo que permitió que el crecimiento no se interrumpiera ante los niveles bajos de humedad en el sustrato. Sin embargo, el ajuste osmótico en el ápices de la raíz no ha sido investigado ampliamente para mejorar el desempeño de la planta en condiciones de déficit de agua. (Serraj y Sinclair, 2002)

Se encontró una mayor acumulación de proteína soluble en la zona apical de la raíz de frijol tepari en sustratos con el Ψ_A de -2.01 MPa. Por una parte, se ha documentado que la síntesis de proteínas es uno de los procesos bioquímicos que disminuyó por el estrés de agua en plantas (Hsiao, 1973; Todd, 1972). Sin embargo, McCue y Hanson (1990) documentaron que en estrés hídrico se presentó una mayor síntesis de proteínas como parte de la respuesta general al estrés por agua. Covarrubias *et al.* (1995), García-Gómez *et al.* (2000), Battaglia *et al.* (2007) y Kavar *et al.* (2008) documentaron que en frijol se acumularon proteínas y sus genes específicos que codifican proteínas particulares o grupos de proteínas en respuesta a la sequía. Así, se ha reportado 152 proteínas en la

zona apical de maíz (Zhu *et al.*, 2007) que intervienen en un patrón complejo de eventos morfogénicos y metabólicos.

Se ha documentado que los patrones electroforéticos son una buena herramienta para evaluar proteínas ya que muestran diferencias cualitativa y cuantitativa dentro de especies o tratamientos. Los patrones electroforéticos de los cultivares blanco y negro no mostraron diferencias entre sequía y riego, similar a lo observado por Camacho y González de Mejía (1998) que encontraron un patrón electroforético de 26 bandas en ambas condiciones. Sin embargo, los patrones electroforéticos mostraron que en frijol tepari existe un patrón espacial de proteínas a lo largo de la raíz con diferencias en los patrones electroforéticos de la zona apical y la zona media.

Las bandas más importantes del patrón electroforético encontradas en esta investigación fueron las bandas 33 y 36 que son similares a las reportadas por Covarrubias *et al.* (1995) y estudiadas por García-Gómez *et al.* (2000) y Battaglia *et al.* (2007) quienes reportaron que las p33/p36, son proteínas estructurales de la pared celular ricas en prolina y que solo se acumulan en respuesta al déficit de agua. Por otra parte, Battaglia *et al.* (2007) documentaron que p33/p36 son secretadas en la superficie celular y acumuladas en la matriz extracelular, donde permanecen como complejos solubles sin ser enteramente inmovilizadas en la pared celular, que permitió que el método de extracción de proteínas solubles pudiera detectarlas con mayor probabilidad. La presencia de las bandas en 33 y 36 KDa en la raíz de frijol tepari tanto en riego como de sequía, mostraron que estas proteínas se acumularon sin el estímulo del déficit de agua en raíces de frijol tepari contrario a lo reportado para frijol en sequía (Covarrubias *et al.*, 1995).

LITERATURA CITADA

- Aspinall, D., L.G. Paleg. 1981. Proline accumulation: Physiological aspects. En: Paleg L.G., Aspinall D. (eds.) The Physiology and biochemistry of drought resistance in plants. Academic Press, Sydney. Pp: 215-228.
- Barrs D.H. 1968. Determination of water deficits in plant tissue. En: T.T. Kozlowski (ed.) Water deficits and plant growth. Vol. 1. Development, control, and measurement. Academic Press Inc. New York, USA. Pp: 235-368.
- Barrs, H.D., P.E. Weatherley. 1962. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. Australian Journal Biological Science 15: 413-428.
- Bartel, D., E. Souer. 2004. Molecular responses of higher plants to dehydration. En: Hirt, H., C. Shinosaki (eds.) Plant responses to abiotic stress. Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg, Germany. Pp: 9-37.
- Battaglia, M., R.M. Solórzano, M. Hernández, S. Cuéllar-Ortiz, B. García-Gómez, J. Márquez, A.A. Covarrubias. 2007. Proline-rich cell wall proteins accumulate in growing regions and phloem tissue in response to water deficit in common bean seedlings. Planta 225: 1121-1133.
- Bokhari, G.U., J.D. Trent. 1985. Proline concentration in water stressed grasses. Journal of Range Management 38: 37-38.
- Büssis, D., F. Kauder, D. Heineke. 1998. Acclimation of potato plants to polyethylene glycol-induced water deficit. I. Photosynthesis and metabolism. Journal of Experimental Botany 49: 1349-1360.
- Camacho, B. M., E. Gonzalez de Mejia. 1998. Comparative study of enzymes related to proline metabolism in tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) and common bean (*Phaseolus vulgaris*) under drought and irrigated conditions, and various urea concentrations. Plant Foods for Human Nutrition 52: 119-132.
- Chandrasekar, V., R.K. Sairam, G.C. Srivastava. 2000. Physiological and biochemical responses of hexaploid and tetraploid wheat to drought stress. Journal of Agronomy and Crop Science 185: 219-227.
- Covarrubias, A.A., J.W. Ayala, J.L. Reyes., M. Hernandez, A.G. Rubio. 1995. Cell-wall proteins induced by water deficit in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. Plant Physiology 107: 1119-1128.

- Esau, K. 1940. Developmental anatomy of the fleshy storage organ of *Daucus carota*. *Hilgardia* 13: 175-226.
- Esau, K. 1985. Anatomía vegetal. Tercera edición revisada y puesta al día. Ediciones Omega. Barcelona, España.
- García-Gómez, B.I., F. Campos, M. Hernández, A.A. Covarrubias. 2000. Two bean cell wall proteins more abundant during water deficit are high in proline and interact with a plasma membrane protein. *Plant Journal* 22: 277-288.
- Hellmuth, E.O. 1970. Measurement of leaf water deficit with particular reference to the whole leaf method. *The Journal of Ecology* 58: 409-417.
- Hsiao, T.C. 1973. Plant responses to water stress. *Annual Review of Plant Physiology* 24: 519-570.
- Ivanov, V.B. 1983. Peculiarities of cellular organization of root growth as compared to other plant organs. En: W. Bohm, L. Kuchera, E. Lichtenegger (eds.) *Wurzelökologie und ihre Nutzenwendug*, International Symposium at Gumpenstein, Bundesanstalt Gupeistein. Irnding, Austria. Pp: 57-62.
- Jain, M., G. Mathur, S. Koul, N.B. Sarin. 2001. Ameliorative effects of proline on salt stress induced lipid peroxidation in cell lines of groundnut (*Arachis hypogea* L.). *Plant Cell Reports* 20: 463-368.
- Karamanos, A.J. 1995. The involvement of proline and some metabolites in water stress and their importance as a drought resistance indicators. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* 21: 98-110.
- Kavar, T., M. Maras, M. Kidric, J. Sustar-Vozlic, V. Meglic. 2008. Identification of genes involved in the response of leaves of *Phaseolus vulgaris* to drought stress. *Molecular Breeding* 21: 159-172.
- Kavi Kishor, P.B., S. Sangam, R.N. Amrutha, P. Sri Laxmi, K.R. Naidu, S.S. Rao, K.J. Reddy, P. Theriappan, N. Sreenivasulu. 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science* 88: 224-438.
- Levitt, J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. Vol. II. Water, radiation, salt and other stresses. Academic Press Inc. New York, USA.

- Liang, M.B, R.E. Sharp, T.I. Baskin. 1997. Regulation of growth anisotropy in well-watered and water-stressed maize roots. I: Spatial distribution of longitudinal, radial and tangential expansion rates. *Plant Physiology* 115: 101-111.
- Matin, M.A., J.H. Brown, H. Ferguson. 1989. Leaf water potential, relative water content, and diffusive resistance as screening techniques for drought resistance in barley. *Agronomy Journal* 81: 100-105.
- Mohamed, M.F., A.A. Tawfik. 2007. Intact plant, callus and field grain yield responses of tepary bean to drought. *Journal Agronomy and Crop Science* 193: 305-312.
- Mohamed, M.F., N. Keutgen, A. A. Tawfik, G. Noga. 2002. Dehydration-avoidance responses of tepary bean lines differing in drought resistance. *Journal Plant Physiology* 159: 31-38.
- Ober, S.E., R.E. Sharp. 1994. Proline accumulation in maize (*Zea mays* L.) primary roots at low water potentials. I. Requirement for increased level of abscisic acid. *Plant Physiology* 105: 981-987.
- Phillips, H.L., J.G. Torrey. 1974. The ultrastructure of root cap in cultured roots of *Convolvulus*. *American Journal of Botany* 59:183-188.
- Phillips, R. J., M. J. Oliver, D. Bartels. 2002. Molecular genetics of desiccation and tolerant systems. En: Black, M., H.W. Pritchard (eds.) *Desiccation and Survival in Plants: Drying Without Dying*. CABI Publishing, Wallingford Oxon, UK. Pp: 321-341.
- Rodriguez-Urbe, L., M. A. O'Connell. 2006. A root-specific bZIP transcription factor is responsive to water deficit stress in tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) and common bean (*P. vulgaris*). *Journal of Experimental Botany* 57: 1391-1398.
- Sánchez-Urdaneta, A., C. Peña-Valdivia, C. Trejo, J.R. Aguirre, E. Cárdenas. 2005. Root growth and proline content in drought sensitive and tolerant maize (*Zea mays* L.) seedlings under different water potential. *Cereal Research Communications* 33: 697-703.
- Sánchez-Urdaneta, A., C. Peña-Valdivia, C. Trejo, J.R. Aguirre, E. Cárdenas. 2004. Efectos del potencial de agua en el crecimiento radical de plántulas de *Agave salmiana*. *Otto Ex Salm-Dyck. Interciencia* 29: 626-631.
- Schinkel, C., P. Gepts. 1988. Phaseolin diversity in the tepary bean *Phaseolus acutifolius* A. Gray. *Plant Breeding* 101: 292-301.

- Serraj, R., T.R. Sinclair. 2002. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions?. *Plant, Cell and Environment*. 25: 333-341.
- Sharp, E.R., V. Poroyko, L.G. Hejlek, W.G. Spollen, G.K. Springer, H.J. Bohnert, T. Nguyen. 2004. Root growth maintenance during water deficit: physiology to functional genomics. *Journal of Experimental Botany* 55: 2343-2351.
- Sharp, E.R., W.K. Silk, T.C Hsiao. 1988. Growth of the maize primary root at low water potentials. I Spatial distribution of expansive growth. *Plant Physiology* 87: 50-57.
- Thakur, P.S., V.K. Rai. 1981. Growth characteristics and proline content in relation to water stress in two *Zea mays* L. cultivars during rehydration. *Biologia Plantarum*. 23: 98-103.
- Todd, G. W. 1972. Water deficits and enzymatic activity. En: T.T. Kozlowski (ed.) *Water Deficits and Plant Growth*, Vol. III. Academic Press, New York. Pp: 177-216.
- Torrey, J.P. 1965. Physiological bases of organization of development in the root. *Handbuch Pflanzenphysiologie* 15: 1256-1327.
- Trotel-Aziz, P., M.F. Niogret, F. Larher. 2000. Proline level is partly under the control of abscisic acid in canola leaf discs during recovery from hyper-osmotic stress. *Physiologia Plantarum* 110: 376-383.
- van der Weele, M. C., W. G. Spollen, R. E. Sharp, T. I. Baskin. 2000. Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. *Journal of Experimental Botany* 51: 1555-1562.
- Voetberg, S.G, R.E. Sharp. 1991. Growth of the maize primary root at low water potential. III. Role of increased proline deposition in osmotic adjustment. *Plant Physiology* 96: 1125-1130.
- Webster, L.P., R.D. MacLeod. 1996. The root apical Meristem and its Margins. En: Waisel, Y. A. Eshel, U. Kafkafi (eds.) *Plant Roots. The hidden half*, 2nd edition. Marcel Dekker, Inc. New York. Pp: 51-76.
- Xu, B., F. Li, L. Shan, Y. Ma, N. Ichizen, J. Huang. 2006. Gas exchange, biomass partition, and water relationships of three grass seedlings under water stress. *Weed Biology and Management* 6: 79-88.
- Yang, C.W., C.C. Lin, C.H. Kao. 2000. Proline, ornithine, arginine and glutamic acid contents in detached rice leaves. *Biologia Plantarum* 43: 305-307.

- Zgallai, H., K. Steppe, R. Lemeur. 2005. Photosynthetic, physiological and biochemical responses of tomato plants to polyethylene glycol-induced water deficit. *Journal of Integrative Plant Biology* 47: 1470-1478.
- Zhu, J., S. Alvarez, E. Marsh, M.E. Lenoble, I.J. Cho, M. Sivaguru, S. Chen, H.T. Nguyen, Y. Wu, D.P. Schachtman, R.E Sharp. 2007. Cell wall proteome in the maize primary root elongation zone. II. region-specific changes in water soluble and lightly ionically-bound proteins under water deficit. *Plant Physiology* 145: 1533-1548.