

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FISIOLOGÍA VEGETAL

**RESPUESTAS BIOQUÍMICO-FISIOLÓGICAS AL ESTRÉS HÍDRICO DE DOS
VARIETADES DE FRIJOL: RESISTENTE PINTO VILLA Y SUSCEPTIBLE
BAYO MADERO**

TERESA SUSANA HERRERA FLORES

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2008

La presente tesis, titulada: **Respuestas bioquímico-fisiológicas al estrés hídrico de dos variedades de frijol: resistente Pinto Villa y susceptible Bayo Madero**, realizada por la alumna: **Teresa Susana Herrera Flores**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FISIOLOGÍA VEGETAL
CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO


DR. JOAQUÍN ORTIZ CERECERES

ASESOR


DRA. ADRIANA DELGADO ALVARADO

ASESOR


DR. CARLOS TREJO LÓPEZ

ASESOR


DRA. MA. DEL CARMEN MENDOZA CASTILLO

ASESOR


DR. JORGE ALBERTO ACOSTA GALLEGOS

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Diciembre de 2008

RESPUESTAS BIOQUÍMICO-FISIOLÓGICAS AL ESTRÉS HÍDRICO DE DOS VARIETADES DE FRIJOL: RESISTENTE PINTO VILLA Y SUSCEPTIBLE BAYO MADERO

**Teresa Susana Herrera Flores, Dra
Colegio de Postgraduados, 2008**

Existen indicadores bioquímicos, fisiológicos, morfológicos y fenológicos de la respuesta de las plantas al déficit de humedad, que pueden ser utilizados de manera práctica por los fitomejoradores, con el fin de optimizar la selección de plantas tolerantes al estrés en diferentes cultivos agrícolas. El objetivo principal fue: evaluar el efecto del déficit hídrico sobre la elongación, y la acumulación de biomasa y de compuestos bioquímicos en la radícula y en las hojas de las variedades Pinto Villa resistente y Bayo Madero susceptible a la sequía. La investigación se dividió en tres fases; en la primera, se estudió el efecto del estrés hídrico en la elongación y la acumulación de biomasa en la radícula, así como la cuantificación de la concentración de solutos compatibles en la segunda fase y, en la tercera además de los solutos compatibles, también se midió la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa en las hojas. Algunos de los resultados sobresalientes, fueron: se observaron diferencias significativas en la elongación de la radícula entre las dos variedades; Pinto Villa tuvo mayor elongación tanto en el potencial de mayor estrés -2.07 MPa con 5.28 cm, como en el de menor -0.16 MPa con 14.85 cm, que Bayo Madero 5.09 y 12.27 cm respectivamente. En cuanto a la redistribución de la biomasa inicial de la semilla a las diferentes estructuras de la misma durante la germinación, no se observaron diferencias entre las dos variedades en el porcentaje relativo al peso inicial de la biomasa en cada estructura (cotiledón + plúmula, radícula y testa) aún cuando Bayo Madero tiene mayor tamaño de semilla que Pinto Villa. Se observaron diferencias significativas en la concentración de prolina, Pinto Villa tuvo 691.57 nm·g⁻¹·pf, mientras que Bayo Madero 486.85 nm·g⁻¹·pf en el potencial de mayor estrés -2.07 MPa; en la concentración de carbohidratos también hubo diferencias significativas, siendo la sacarosa el que se concentró en mayor cantidad. En la última fase se observó una disminución de la concentración de solutos compatibles en las hojas con respecto a la radícula, aún así, se observaron diferencias significativas entre las variedades en la concentración de prolina en las hojas, Pinto Villa fue superior a Bayo Madero, mientras que la concentración de carbohidratos fue más alta en Bayo Madero que en Pinto Villa. La mayor concentración de ácido ascórbico y la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa se tuvo en la 1^a y 2^a hojas trifolioladas respectivamente en Pinto Villa con respecto a Bayo Madero, lo que indica que Pinto Villa tiene mayor concentración de ácido ascórbico en etapas más tempranas de su desarrollo que Bayo Madero. En base a los resultados anteriores se confirma la hipótesis de que Pinto Villa tiene mayores niveles de los indicadores bioquímicos relacionados con la respuesta de mayor tolerancia al estrés de humedad que Bayo Madero.

Palabras clave: Estrés hídrico, frijol, respuestas bioquímicas, solutos.

BIOCHEMICAL AND PHYSIOLOGICAL RESPONSES TO WATER STRESS OF TWO COMMON BEAN VARIETIES: PINTO VILLA RESISTANT AND BAYO MADERO SUSCEPTIBLE

**Teresa Susana Herrera Flores, Dra
Colegio de Postgraduados, 2008**

There are biochemical, physiological, morphological and phenological indicators of the responses of plants to water deficit, which can be used in a practical manner by breeders, in order to optimize the selection of tolerant plants to stress in different agricultural crops. The main objective of this study was to assess the effect of water deficit on the elongation, biomass accumulation and biochemical compounds in the radicle and in the leaves of two common bean varieties Pinto Villa resistant and Bayo Madero drought susceptible. The research was divided into three phases, in the first it was studied, the effect of water stress on the elongation and the accumulation of biomass in the radicle, as well as the quantification of the concentration of compatible solutes in the second phase; and in the third, in addition to the compatible solutes, was also measured the activity of the enzyme ascorbate peroxidase in the leaves. Some of the main results were: significant differences were observed between the two varieties in the elongation of the radicle; Pinto Villa had more elongation (5.28 cm) in the water potential of higher stress -2.07 MPa, while in the potential -0.16 MPa of lower stress the elongation of the radicle was 14.85 cm as compared with Bayo Madero whose radicle had an elongation of 5.09 and 12.27 cm respectively on the same conditions of water potential. Regarding to the redistribution of the initial biomass of the seed to its different structures during germination, there was no difference between the two varieties in the percentage of biomass relative to the initial weight in each structure (cotyledon + plumule, radicle and testa) in spite that Bayo Madero has larger seeds than Pinto Villa. There were significant differences in the concentration of proline between the varieties, Pinto Villa had 691.57 nm·g⁻¹·pf, while Bayo Madero 486.85 nm·g⁻¹·pf at the water potential for higher stress -2.07 MPa. Regarding the concentration of carbohydrates there were significant differences too, between Pinto Villa and Bayo Madero, being sucrose concentrated in larger quantities. In the last phase of the study there was observed a decrease in the concentration of compatible solutes in the leaves with respect to the radicle, even though significant differences on the concentration of proline in the leaves were observed between the two varieties, Pinto Villa outweigh Bayo Madero while carbohydrate concentration was higher in Bayo Madero compared with Pinto Villa. The concentration of ascorbic acid and the activity of the enzyme ascorbate peroxidase were higher in the 1st and 2nd trifoliolate leaves on Pinto Villa with respect to Bayo Madero, suggesting that Pinto Villa accumulate a higher concentration of ascorbic acid at earlier stages of its development as compared with Bayo Madero. The results presented before serve as basis to accept the hypothesis that Pinto Villa have higher levels of biochemical indicators related to its response of tolerance to moisture stress in relation to Bayo Madero.

Keywords: Water stress, biochemical responses, common bean, solutes.

DEDICO ESTA TESIS A

Con cariño y respeto a mis padres: Salvador Herrera Negrete y Celia Flores Campos, gracias por su cariño, confianza y su apoyo incondicional, los cuales han sido un gran aliciente para continuar mi camino. Simplemente GRACIAS por ser mis padres.

Con un amor muy especial para mi hermosa princesita Vanessa Sarahi, quien es mi motivación principal para seguir adelante a pesar de las adversidades que se presenten, gracias hija por ser la luz que me ilumina día con día.

En especial a mi hermana “Co” con quien voy a estar en deuda por siempre, por estar conmigo en uno de los momentos mas importante de mi vida y por realizar a la perfección el papel de madre que a mi me corresponde.

Con cariño a mis hermanos Benjamín, Chava, José, Juan y Mary, quienes me han brindado todo su apoyo y cariño especialmente en estos dos últimos años de mi vida.

A Doris, a quien le reafirmo lo importante que ha sido, es y seguirá siendo para mi y a quien no encuentro las palabras precisas para expresarle mi cariño y agradecimiento por la paciencia brindada y por escucharme y apoyarme incondicionalmente cuando más lo he necesitado.

A Danya y José Ch. por ser unas personas de un enorme corazón, por todo el cariño y el apoyo brindado a mí a mi pequeña Vanessita.

A Gaby quien me dió la oportunidad de ser su amiga, por la paciencia y respeto hacia mi persona y mis actitudes, por escuchar y no juzgar y por recordarme que la dignidad y el respeto a uno mismo es algo que nunca se debe perder, y que a pesar de la distancia deseo que nuestra amistad perdure por mucho tiempo.

A Almita, por dejarme enseñanzas muy importantes, en el aspecto profesional y personal, y siempre le estaré agradecida por haber estado en el momento exacto en que la necesité.

En especial a Nanci Lemus y José E., ya que a pesar de la distancia me han brindado su apoyo para seguir adelante.

A Carlos M. Hernández a quien quiero mucho y le deseo lo mejor en esta vida, por su apoyo incondicional.

A la Sra. Anita, al Sr. Fabián y familia por el cariño y apoyo brindado en todo momento. Personas con mucha calidad humana.

A todos con mucho cariño

“CUANDO UNA PERSONA DESEA REALMENTE ALGO, EL UNIVERSO ENTERO CONSPIRA PARA QUE PUEDA REALIZAR SU SUEÑO”

Paulo Coelho

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a Dios por permitirme lograr lo obtenido hasta el día de hoy y por darme la fortaleza para seguir adelante aun en los momentos más difíciles y con ello comprender que en esta vida nada es casualidad y que con esfuerzo y dedicación se pueden cumplir las metas planteadas.

Manifiesto mi agradecimiento al Colegio de Postgraduados, en especial al Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad-Fisiología Vegetal por darme la oportunidad de cursar mis estudios de doctorado; así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para financiar dichos estudios.

Al Dr. Joaquín Ortiz Cereceres por la oportunidad de trabajar con él durante mis estudios doctorales, por los conocimientos transmitidos y por guiarme en el desarrollo de mi investigación y tesis doctoral.

A la Dra. Adriana Delgado Alvarado por el apoyo recibido durante el trabajo de la investigación, por sus oportunos comentarios y por enseñarme que con paciencia y dedicación todo se puede lograr.

Al Dr. Carlos Trejo López por el apoyo brindado para la realización del trabajo de investigación y por su disposición durante el proceso de la revisión de este documento.

A la Dra. Ma. Del Carmen Medoza Castillo por las sugerencias para mejorar el contenido de esta tesis doctoral.

Al Dr. Jorge Alberto Acosta Gallegos por el interés y disponibilidad para la revisión de este documento.

Al Dr. Victor Conde Martínez por sus acertadas observaciones para mejorar el documento final.

Al Investigador del INIFAP, del Valle de Guadiana en Durango, Arnulfo Pajarito Ravelero por el apoyo incondicional del aporte de semilla de las variedades estudiadas en ésta investigación.

A los profesores del Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad-Fisiología Vegetal por sus conocimientos transmitidos y por ser un ejemplo de superación en la vida.

A todo el personal administrativo del Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad-Fisiología Vegetal, a quienes sin su apoyo no hubiera sido posible la culminación de mis estudios, en especial a Gina y a la Lic. Carmen Padilla.

A todas las personas que en este momento se me escapan de la mente, pero que de alguna u otra manera intervinieron para la culminación de esta investigación.

GRACIAS

CONTENIDO	Pág.
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. Importancia del frijol en México	1
1.2. Raza Durango	3
1.3. Características de Pinto Villa	3
1.4. Características de Bayo Madero	5
1.5. Efecto de factores ambientales limitantes en la producción de frijol	5
1.6. Justificación de la investigación	7
2. OBJETIVO GENERAL	9
3. HIPÓTESIS GENERAL	9
4. REVISION DE LITERATURA	10
4.1. Respuesta de las plantas a condiciones de déficit hídrico	10
4.1.1. Hoja	10
4.1.2. Raíz	11
4.2. Indicadores bioquímicos relacionados con el estrés hídrico	12
4.3. Ajuste osmótico	12
4.4. Acumulación de solutos compatibles en la raíz en condiciones de	
estrés hídrico	14
4.4.1. Prolina	14
4.4.2. Carbohidratos solubles	16
4.5. Acumulación de solutos compatibles en las hojas bajo condiciones	
de estrés hídrico	17
4.5.1. Prolina	17

4.5.2. Carbohidratos solubles	18
4.5.3. Estrés oxidativo	22
4.5.4. Acumulación de ácido ascórbico: antioxidante no enzimático, bajo condiciones de estrés hídrico	25
4.5.5. Actividad de la enzima ascorbato peroxidasa: antioxidante enzimático, bajo condiciones de estrés hídrico	26

FASE I

5. EFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO EN LA ELONGACION DE LA RADÍCULA Y ACUMULACIÓN DE BIOMASA EN LAS SEMILLAS GERMINADAS DE FRIJOL PINTO VILLA Y BAYO MADERO	28
5.1. Introducción	28
5.2. Objetivo	29
5.3. Hipótesis	29
5.4. Materiales y métodos	29
5.5. Resultados y discusión	32
5.5.1. Longitud y biomasa de la radícula	32
5.5.2. Número de raíces secundarias	38
5.5.3. Acumulación y distribución de biomasa (g) en las semillas germinadas de Pinto Villa y Bayo Madero	40
5.6. Conclusiones	44

FASE II

6. EFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO EN LA ACUMULACIÓN DE PROLINA Y CARBOHIDRATOS SOLUBLES EN LA RADÍCULA DE FRIJOL PINTO

VILLA Y BAYO MADERO	46
6.1. Introducción	46
6.2. Objetivo	47
6.3. Hipótesis.....	47
6.4. Materiales y métodos	48
6.4.1. Cuantificación de prolina	48
6.4.2. Cuantificación de carbohidratos solubles: glucosa, fructosa y sacarosa	49
6.4.3. Cuantificación de almidón	51
6.5. Resultados y discusión	53
6.5.1. Concentración de prolina en la radícula de Pinto Villa y Bayo Madero	53
6.5.2. Concentración de carbohidratos en la radícula de Pinto Villa y Bayo Madero	56
6.6. Conclusiones	73

FASE III

7. EFECTO DEL ESTRÉS HIDRICO EN LA CONCENTRACION DE PROLINA, CARBOHIDRATOS SOLUBLES Y ANTIOXIDANTES EN LAS HOJAS DE FRIJOL PINTO VILLA Y BAYO MADERO

7.1. Introducción	74
-------------------------	----

7.2. Objetivo	77
7.3. Hipótesis	77
7.4 Materiales y métodos	78
7.4.1. Cuantificación de la concentración de prolina y carbohidratos solubles: glucosa, fructosa, sacarosa y almidón	80
7.4.2. Cuantificación de la concentración de ácido ascórbico	80
7.4.3. Cuantificación de la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa	81
7.5. Resultados y discusión	83
7.5.1. Concentración de prolina en las hojas de Pinto Villa y Bayo Madero	83
7.5.2. Concentración de carbohidratos solubles y almidón en Pinto Villa y Bayo Madero	89
7.5.3. Concentración de ácido ascórbico: antioxidante no enzimático en Pinto Villa y Bayo Madero	98
7.5.4. Medición de la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa: antioxidante enzimático en Pinto Villa y Bayo Madero	102
7.6. Conclusiones	108
9. DISCUSION GENERAL	110
10. CONCLUSIONES FINALES	117
11. LITERATURA CITADA	120
12. ANEXOS	139

LISTA DE CUADROS

Pág.

Cuadro 1.	Valores de significancia de los factores de variación en la longitud de radícula de dos variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero	32
Cuadro 2.	Longitud de la radícula (cm) de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes potenciales de agua (Ψ_A)....	33
Cuadro 3.	Valores de significancia de los factores de variación en la acumulación de biomasa de dos variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero	36
Cuadro 4.	Biomasa de la radícula (mg) de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes potenciales de agua (Ψ_A) ...	37
Cuadro 5.	Valores de significancia de los factores de variación en el número de raíces secundarias de dos variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero	38
Cuadro 6.	Valores de significancia de los factores de variación en la acumulación de biomasa de las semillas germinadas de dos variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero	41
Cuadro 7.	Acumulación de biomasa (mg) y su relación en porcentajes en las estructuras de las semillas germinadas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes potenciales de agua (Ψ_A) a las 144 h	43
Cuadro 8.	Valores de significancia de la concentración del aminoácido prolina en la radícula de dos variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero	53
Cuadro 9.	Concentración de prolina ($\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes potenciales de agua (Ψ_A)	54
Cuadro 10.	Valores de significancia de la concentración de carbohidratos solubles en la radícula de Pinto Villa y Bayo Madero	57

Cuadro 11.	Concentración de carbohidratos solubles (glucosa + fructosa + sacarosa) ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en las primeras 72 h de desarrollo ..	57
Cuadro 12.	Concentración de carbohidratos solubles (glucosa + fructosa + sacarosa) ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes potenciales de agua (Ψ_A)	58
Cuadro 13.	Valores de significancia de la concentración de glucosa en dos variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero	59
Cuadro 14.	Concentración de glucosa ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes potenciales de agua (Ψ_A)	60
Cuadro 15.	Concentración de glucosa ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero durante las primeras 72 h de desarrollo	61
Cuadro 16.	Valores de significancia en la concentración de fructosa en la radícula de dos variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero..	61
Cuadro 17.	Concentración de fructosa ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes potenciales de agua (Ψ_A)	62
Cuadro 18.	Concentración de fructosa ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero durante las primeras 72 h de desarrollo	63
Cuadro 19.	Valores de significancia en la concentración de sacarosa en la radícula de dos variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero..	63
Cuadro 20.	Concentración de sacarosa ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes potenciales de agua (Ψ_A)	64
Cuadro 21.	Concentración de sacarosa ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero durante las primeras 72 h de desarrollo	65

Cuadro 22.	Valores de significancia en la concentración de almidón en la radícula de dos variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero..	65
Cuadro 23.	Concentración de almidón ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero durante las primeras 72 h de desarrollo	66
Cuadro 24.	Valores de significancia de la concentración de prolina en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero	83
Cuadro 25.	Concentración de prolina ($\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero	84
Cuadro 26.	Concentración de prolina ($\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes tratamientos de humedad	85
Cuadro 27.	Valores de significancia en la concentración de carbohidratos solubles en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero	89
Cuadro 28.	Concentración de carbohidratos solubles (glucosa + fructosa + sacarosa) ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero	90
Cuadro 29.	Valores de significancia de la concentración de glucosa en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.....	91
Cuadro 30.	Valores de significancia en la concentración de fructosa en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.....	92
Cuadro 31.	Valores de significancia en la concentración de sacarosa en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.....	92
Cuadro 32.	Concentración de sacarosa ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero	93

Cuadro 33.	Valores de significancia de la concentración del almidón en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.....	94
Cuadro 34.	Concentración de almidón ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes tratamientos de humedad	95
Cuadro 35.	Concentración de almidón ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero	95
Cuadro 36.	Valores de significancia de la concentración de ácido ascórbico en las hojas de la variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero	98
Cuadro 37.	Concentración de ácido ascórbico total ($\text{mmoles}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes tratamientos de humedad	99
Cuadro 38.	Concentración de ácido ascórbico total ($\text{mmoles}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.....	100
Cuadro 39.	Valores de significancia de la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero	103
Cuadro 40.	Actividad de la enzima ascorbato peroxidasa ($\text{mmoles}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}\cdot\text{min}$) en las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero desarrolladas en diferentes tratamientos de humedad	104
Cuadro 41.	Actividad de la enzima ascorbato peroxidasa ($\text{mmoles}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}\cdot\text{min}$) en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero	104

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Concentración de carbohidratos solubles: glucosa, fructosa y sacarosa, y almidón ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en la radícula de Pinto Villa y Bayo Madero desarrollada en tres potenciales de agua (Ψ_A) (MPa), durante las primeras 72 h	67

LISTA ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Análisis de varianza de la longitud de la radícula de dos variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero	139
Anexo 2. Análisis de varianza de la acumulación biomasa de la radícula de dos variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero	139
Anexo 3. Análisis de varianza del número de raíces secundarias de dos variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero	140
Anexo 4. Análisis de varianza de la acumulación de biomasa de las semillas germinadas de dos variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero	140
Anexo 5. Acumulación de biomasa (mg) en las estructuras de las semillas germinadas de Pinto Villa, en cuatro potenciales de agua (Ψ_A) durante las 144 h	141
Anexo 6. Acumulación de biomasa (mg) en las estructuras de las semillas germinadas de Bayo Madero, en cuatro potenciales de agua (Ψ_A) durante las 144 h	142
Anexo 7. Análisis de varianza de la concentración del aminoácido prolina en la radícula de dos variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero	143
Anexo 8. Análisis de varianza de la concentración de carbohidratos solubles en la radícula de dos variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero	143
Anexo 9. Análisis de varianza de la concentración de glucosa en dos variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero	144

Anexo 10.	Análisis de varianza de la concentración de fructosa en la radícula de dos variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero ...	144
Anexo 11.	Análisis de varianza de la concentración de sacarosa en la radícula de dos variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero ...	145
Anexo 12.	Análisis de varianza de la concentración de almidón en la radícula de dos variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero ...	145
Anexo 13.	Análisis de varianza de la concentración de prolina en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero	146
Anexo 14.	Análisis de varianza de la concentración de carbohidratos solubles en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero	146
Anexo 15.	Análisis de varianza de la concentración de glucosa en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero	147
Anexo 16.	Análisis de varianza de la concentración de fructosa en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero	147
Anexo 17.	Análisis de varianza de la concentración de sacarosa en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero	148
Anexo 18.	Análisis de varianza de la concentración de almidón en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero	148
Anexo 19.	Análisis de varianza de la concentración del ácido ascórbico en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero ...	149
Anexo 20.	Análisis de varianza de la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero	149
Anexo 21.	Longitud de la radícula (cm) de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes potenciales de agua (Ψ_A)	150
Anexo 22.	Biomasa de la radícula (mg) de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes potenciales de agua (Ψ_A)	150

Anexo 23.	Acumulación de biomasa en base a porcentajes en las estructuras de las semillas germinadas de las variedades de frijol Pinto Villa en diferentes potenciales de agua (Ψ_A) a las 144 h	151
Anexo 24.	Acumulación de biomasa en base a porcentajes en las estructuras de las semillas germinadas de las variedades de frijol Pinto Villa en diferentes potenciales de agua (Ψ_A) a las 144 h	151
Anexo 25.	Concentración de prolina ($\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes potenciales de agua (Ψ_A)	152
Anexo 26.	Concentración de carbohidratos solubles (glucosa + fructosa + sacarosa) ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero durante las primeras 72 h de desarrollo	152
Anexo 27.	Concentración de carbohidratos solubles (glucosa + fructosa + sacarosa) ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes potenciales de agua (Ψ_A)	153
Anexo 28.	Concentración de glucosa ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes potenciales de agua (Ψ_A)	153
Anexo 29.	Concentración de glucosa ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero durante las primeras 72 h de desarrollo	154
Anexo 30.	Concentración de fructosa ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes potenciales de agua (Ψ_A)	154
Anexo 31.	Concentración de fructosa ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero durante la primeras 72 h de desarrollo	155

Anexo 32.	Concentración de sacarosa ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes potenciales de agua (Ψ_A)	155
Anexo 33.	Concentración de sacarosa ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero durante las primeras 72 h de desarrollo	156
Anexo 34.	Concentración de almidón ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero durante las primeras 72 h de desarrollo	156
Anexo 35.	Concentración de prolina ($\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero	157
Anexo 36.	Concentración de prolina ($\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero por efecto de los diferentes tratamientos de humedad	157
Anexo 37.	Concentración de carbohidratos solubles (glucosa + fructosa + sacarosa) ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero	158
Anexo 38.	Concentración de sacarosa ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en las hojas de las variedades de frijol Pinto Vila y Bayo Madero	158
Anexo 39.	Concentración de almidón ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero por efecto de los diferentes tratamientos de humedad	159
Anexo 40.	Concentración de almidón ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero	159
Anexo 41.	Concentración de ácido ascórbico total ($\text{mmoles}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Maderos por efecto de los tratamientos de humedad	160
Anexo 42.	Concentración de ácido ascórbico total ($\text{mmoles}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero	160

Anexo 43.	Actividad de la enzima ascorbato peroxidasa ($\text{mmoles}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}\cdot\text{min}$) en las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero por efecto de los tratamientos de humedad	161
Anexo 44.	Actividad de la enzima ascorbato peroxidasa ($\text{mmoles}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}\cdot\text{min}$) en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero	161

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Importancia del frijol en México

El frijol es uno de los cultivos de mayor importancia en México, para la economía de los productores representa una fuente importante de ocupación e ingreso, además de que es una garantía de seguridad alimentaria. Se cultiva en todas las regiones del país, entre las que destaca la Región del Altiplano Semiárido del Norte, con clima muy seco o muy árido (Bs o Bw) (García, 1988), esta región es importante principalmente por su agricultura y comprende los estados y municipios de Chihuahua: Cuauhtémoc, con un clima Bs1 kw (w) (e´) y Madero Cb´ (x´) (e); Durango: Guadalupe Victoria, con un clima BSo kw (e); Zacatecas: Fresnillo, con un clima BS1 kw (w) (e) g y Río Grande, Bso hw (e) w”, Guanajuato: Ocampo y San Felipe, con un clima Cb(wo) (w) (e) gw” y San Luis Potosí: Villa de Arriaga, con un clima Bso kw (e) gw” (García, 1988; Serrano, 2004).

En esos estados se tiene el 68 % de la superficie nacional que se siembra con frijol en el ciclo primavera-verano; entre otras, se utilizan las variedades Pinto Villa, Flor de Mayo, Flor de Junio, Pinto Nacional, Negro San Luis, Negro Querétaro, Garbancillo, Manzano, Bayo Blanco, Bayo Madero, Bayo los Llanos y Río Grande, todas generadas en el programa de frijol del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) (Serrano, 2004). La principal limitante para la producción de frijol en esa región es la escasa disponibilidad de agua, ya que se tiene una baja precipitación pluvial que fluctúa entre 400 y 450 mm anuales

(García, 1988). En el ciclo otoño-invierno, el frijol es importante en la región cálida con invierno seco que comprende los estados y municipios de Sinaloa: Culiacán, con un clima BS1 (h') w (w) (e); Guasave y Los Mochis, Bw (h') w (e) y Nayarit: Acaponeta, con un clima Aw1 (w) (e) (García, 1988); donde se siembran las variedades Negro Jamapa, Azufrado, Mayocoba, Peruano, Flor de Junio Marcela y Flor de Mayo (Serrano, 2004), la superficie sembrada es menor que en el ciclo primavera-verano pero, se obtiene un mayor rendimiento unitario, que en promedio alcanza $600 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ en condiciones de temporal y $1300 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ en riego; en cambio, el rendimiento promedio de frijol en condiciones de temporal en los estados de Zacatecas, Chihuahua y Durango es de $512 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ (SAGARPA, 2000).

En México existen tres razas de frijol: Durango, Mesoamericana y Jalisco, las cuales se han caracterizado con estudios de isoenzimas para identificar faseolinas que son proteínas de reserva de las semillas, solubles en altas concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) que funcionan como marcadores bioquímicos para identificar variedades o especies por sus patrones de bandas específicos (Gepts, 1988; Sing *et al.*, 1991a). Las variedades con las que se trabajó en la presente investigación fueron Pinto Villa y Bayo Madero, que pertenecen a la Raza Durango la cual presenta las siguientes características.

1.2. Raza Durango

Los genotipos que forman parte de esta raza se caracterizan por tener un hábito de crecimiento indeterminado tipo III, con hojas de tamaño pequeño, ovaladas o acorazonadas, con tallos y ramas delgados, entrenudos cortos, la fructificación comienza y se concentra en los nudos basales del tallo, las vainas son de tamaño medio (5-8 cm) con 4 ó 5 semillas de forma romboédrica y un tamaño medio de semilla de 25-40 g/100 semillas.

El color de las semillas es variable: amarillo, crema, gris, negro, blanco, rosa, con o sin rayas o manchas y se caracterizan porque acumulan la proteína faseolina S y en ocasiones la Sd (Singh *et al.*, 1991). Los genotipos representantes de la raza Durango se distribuyen en las zonas semiáridas del Norte y Centro de México y Sur de EE. UU., son fuente de madurez temprana (precocidad), tolerantes a sequía, tienen índice de cosecha alto y son tolerantes a algunas enfermedades virales, en esta raza también se encuentran otras variedades de frijol como Morado de Agua, frijol Bayo y Ojo de Cabra (Singh *et al.*, 1991).

1.3. Características de Pinto Villa

Esta variedad fue desarrollada en el Centro de Investigación Regional del Norte Centro, Campo Experimental Valle de Guadiana (Durango, Dgo.) del INIFAP, por el método de pedigrí, a partir de una cruce entre dos línea mejoradas; el progenitor femenino fue tipo bayo (II 925-M-29-1) adaptado a condiciones de temporal y el

progenitor masculino fue una línea experimental segregante de la cruce de Canario 101 x Pinto Mex. 4-2, del Programa de Mejoramiento del Centro de Investigaciones Forestales y Agropecuarias del Estado de México (Acosta *et al.*, 1993); es una variedad de hábito de crecimiento indeterminado tipo III, con tallos y ramas débiles semierectas, con guías cortas, sin capacidad para trepar (Schoonhoven *et al.*, 1987). La floración se inicia alrededor de los 42 días después de la siembra (dds) y la madurez fisiológica se presenta entre los 90 y 104 (dds) en Chihuahua (Rosales *et al.*, 2004).

Pinto Villa ha mostrado plasticidad fenológica y fisiológica en respuesta a factores ambientales adversos, como falta de humedad y bajas temperaturas en la etapa de llenado de grano, la plasticidad fenológica se manifiesta en un aceleramiento de la madurez y la plasticidad fisiológica en su sensibilidad al fotoperiodo, lo que le permite tener una amplia adaptación (González *et al.*, 2003), alcanza rendimientos de 1723 kg·ha⁻¹ en temporal y 2500 kg·ha⁻¹ en riego (Rosales *et al.*, 2004).

En condiciones de riego, el rendimiento potencial de Pinto Villa puede llegar hasta 3600 kg·ha⁻¹ en siembras del 15 al 30 de junio y en buen temporal su potencial es menor, hasta 1500 kg·ha⁻¹ en siembras de la primera semana de julio (González *et al.*, 2003). Pinto Villa es resistente a la antracnosis y a los tizones bacterianos y, tolerante a pudriciones de la raíz y a la roya (Acosta *et al.*, 1993). En el 2004 se registró una superficie sembrada de la variedad Pinto Villa de 300 mil ha⁻¹ en la región Centro-Norte del país, que comprendió los estados de Chihuahua,

Zacatecas, Durango, Aguascalientes, San Luis Potosí, Jalisco, Guanajuato, Coahuila, Morelos, Estado de México y Tlaxcala¹.

1.4. Características de Bayo Madero

Esta variedad se obtuvo a partir del cruzamiento entre las líneas mejoradas (C-12-159-2-4-1-3-1-3) y (II952-M186-5-2) de la colección Bayo Criollo Calera, posteriormente se aplicó selección masal (Acosta, 1982). Es una variedad de hábito de crecimiento indeterminado tipo III, con tallos y ramas débiles y semierectos, las guías son cortas, sin capacidad para trepar (Schoonhoven *et al.*, 1987). La floración se inicia a los 35-44 días después de la siembra (dds) y la madurez fisiológica a los 79-112 dds. Bayo Madero es una variedad tolerante a antracnosis, roya, tizón común y tizón de halo, es susceptible a la sequía y llega a presentar rendimientos de 604 a 1499 kg·ha⁻¹ (Rosales *et al.*, 2004; Acosta, 1982).

1.5. Efecto de factores ambientales limitantes en la producción de frijol

Los bajos rendimientos unitarios del frijol son consecuencia de factores abióticos como la sequía que se manifiesta por un retraso o insuficiencia de lluvias; por suelos deficientes en nitrógeno y fósforo y de factores bióticos como plagas y enfermedades (SAGARPA²). Para disminuir los efectos negativos de la escasa

¹<http://www.sagarpa.gob.mx/cgcs/boletines/2004/diciembre/B316.htm>
<http://agricultura.com.mx/cgi-bin/modules.php?name=News&file=article&sid=302>

²<http://www.siea.sagarpa.gob.mx/publicaciones/archivos/frijol90-00.pdf.pag.32>

disponibilidad de agua sobre el rendimiento, es conveniente y práctico seleccionar especies vegetales o genotipos dentro de ellas que posean diversos caracteres que les confiere tolerancia al estrés hídrico (Munns, 2002). Los indicadores fisiológicos (conductancia estomática, potencial hídrico, transpiración y temperatura de la hoja) proporcionan información más confiable sobre la respuesta de las plantas a la escasez de agua, que los agronómicos (altura de planta, longitud de raíz y área foliar), cuando se hace selección para tolerancia a la sequía (Yeo, 1994).

A pesar de que existen diversas investigaciones relacionadas con el estrés hídrico orientadas principalmente al estudio de las relaciones hídricas, fotosíntesis y acumulación de diferentes metabolitos orgánicos (aminoácidos, carbohidratos, enzimas antioxidantes) e inorgánicos (iones de potasio), aún no se conocen bien los sitios metabólicos en los que dicho estrés daña a la planta, ni los mecanismos adaptativos utilizados por las plantas para sobrevivir a esas condiciones adversas (Munss, 2002; Hieng *et al.*, 2004).

Se han descrito diferentes indicadores bioquímicos relacionados con la tolerancia al estrés hídrico y existen evidencias de que los aminoácidos glicina, betaína y prolina juegan un papel adaptativo al mediar en el ajuste osmótico y proteger los órganos de la planta bajo estrés. También se ha descrito la participación de enzimas antioxidantes (Shao *et al.*, 2005) y diferentes clases de proteasas involucradas en la respuesta a déficit hídrico (Hieng *et al.*, 2004). El ajuste osmótico es un mecanismo involucrado en la tolerancia al estrés osmótico el cual

es disminuido por la acumulación de solutos. Los principales solutos que se acumulan en las células de los tejidos de las plantas son: iones potasio (K) (Gnanasiri *et al.*, 1995), azúcares (Yakushiji *et al.*, 1996) y aminoácidos como la prolina (Verslues y Sharp, 1999). Estos solutos son conocidos como “solutos compatibles” y no interfieren con la función metabólica normal de las plantas, aún a concentraciones altas. Diversas investigaciones reportan que es conveniente y práctico realizar la selección de especies vegetales que posean indicadores distintivos de tolerancia a un determinado tipo de estrés (Munns, 2002; Ashraf, 2001).

1.6. Justificación de la investigación

Aún cuando existen indicadores fisiológicos, morfológicos, fenológicos y bioquímicos de la tolerancia de las plantas a déficits hídricos que son utilizados de manera práctica por los fitomejoradores, con el propósito de optimizar la selección de plantas tolerantes al estrés en diferentes cultivos agrícolas importantes, su respuesta varía dependiendo de las características de la especie, de la etapa en que se aplica el estrés y de los niveles y duración de éste (Hieng *et al.*, 2004; Meyre *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2000).

Por lo que en esta investigación se trabajó con la variedad de frijol Pinto Villa que es sobresaliente en diferentes condiciones ambientales como: sequía, riego, presencia de enfermedades y bajo contenido de nutrientes en el suelo, principalmente nitrógeno y fósforo, lo que al final se manifiesta en su mayor

rendimiento. Esta variedad se estudió en condiciones de estrés hídrico en el suelo y su respuesta se comparó con la de la variedad Bayo Madero, que se considera susceptible al estrés de humedad, con el fin de identificar algunas características fisiológicas y bioquímicas que pudieran estar relacionadas con los mecanismos de respuesta al déficit hídrico, las cuales podrían ser utilizadas como indicadores de resistencia al estrés hídrico en programas de fitomejoramiento.

La presente investigación se llevó a cabo en tres fases:

Fase 1

Se realizó un estudio sobre el efecto y respuesta al estrés hídrico en la elongación de la radícula y la acumulación de biomasa, en semillas germinadas de frijol Pinto Villa (tolerante a la sequía) y Bayo Madero (susceptible), desarrolladas en diferentes potenciales de humedad del sustrato.

Fase 2

Se cuantificó la concentración de solutos como la prolina y los carbohidratos solubles en la radícula de ambas variedades, para estudiar su relación en la tolerancia al estrés hídrico.

Fase 3

Se cuantificó la concentración de prolina, carbohidratos solubles, ácido ascórbico y la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa, en las hojas simples, y en la primera y segunda hojas trifolioladas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero, para conocer su relación con la tolerancia al estrés hídrico de dichas variedades.

2. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del déficit hídrico en el suelo sobre la elongación de la radícula, acumulación de biomasa y compuestos bioquímicos en la radícula y en las hojas de dos variedades de frijol: Pinto Villa resistente a la sequía con relación a Bayo Madero susceptible a la sequía.

3. HIPÓTESIS GENERAL

El déficit hídrico tendrá mayor efecto negativo sobre la elongación de la radícula y en la acumulación de la biomasa en las estructuras de la semilla, así como en la concentración de compuestos bioquímicos de la radícula y de las hojas de la variedad susceptible Bayo Madero, que en las de la resistente Pinto Villa.

4. REVISION DE LITERATURA

4.1. Respuesta de las plantas a condiciones de déficit hídrico

El tamaño de las hojas del vástago define el tamaño del dosel de la planta (área foliar) para capturar la radiación fotosintéticamente activa y producir fotoasimilados, mientras que el crecimiento de la raíz define la medida en que una planta explora el suelo para la obtención de agua y nutrientes minerales. Así mismo el crecimiento y desarrollo de ambas partes de la planta están en competencia por los fotoasimilados producidos en las hojas y por la absorción de agua y minerales por la raíz (Wilson, 1988). El déficit de humedad tiene un efecto sobre la productividad de las plantas y depende de las condiciones ambientales del clima y suelo que influyen en el uso eficiente de agua de las mismas, por lo que poseen mecanismos de aclimatación que se activan en respuesta al déficit de agua (Taiz y Zeiger, 2006).

4.1.1. Hoja

El crecimiento de las hojas es muy sensible al estrés de humedad. Cuando el déficit de agua se presenta, provoca cambios en el crecimiento y desarrollo de las plantas, uno de los cuales es la disminución en la expansión de la hoja que afecta directamente la fotosíntesis. Al disminuir el contenido de agua en la planta, disminuye la presión de turgencia de la pared celular, que se traduce en la disminución del volumen de la célula y causa la concentración de solutos. Aparte

del tamaño de la hoja, también se limita el número de las mismas, porque disminuye el número y crecimiento de las ramas (Taiz y Zeiger, 2006), por lo que la tasa de crecimiento en condiciones de estrés de humedad es controlada por diversos procesos importantes como la biosíntesis de la membrana, división celular y síntesis de proteínas (Bursens *et al.*, 2000).

4.1.2. Raíz

En condiciones de estrés hídrico las raíces desarrollan respuestas anatómicas, fisiológicas y morfológicas como mayor tamaño y capacidad de profundización, las cuales son consideradas como los principales factores de resistencia a la sequía (Huang y Fry, 1998; Ervin y Kosky, 1998). En frijol la longitud, volumen y biomasa de la radícula disminuyeron cuando el estrés hídrico se incrementó (Al-karaki *et al.*, 1995). Muchas especies responden a la sequía aumentando la translocación de fotoasimilados hacia las raíces, lo que favorece el crecimiento de éstas en relación al del vástago, resultando en un aumento de la relación raíz/vástago y, por lo tanto, un incremento de la cantidad de agua disponible para la planta (Huang y Fry, 1998; Huang y Gao, 2000).

El déficit de agua también afecta el crecimiento y desarrollo de la raíz, pero ésta es más resistente que el vástago. El crecimiento de la raíz y el vástago están correlacionados y el tamaño de cada uno varía en respuesta a las condiciones ambientales y por la utilización de fotoasimilados (Wilson, 1988).

4.2. Indicadores bioquímicos relacionados con el estrés hídrico

La respuesta de las plantas expuestas a diferentes factores abióticos desfavorables es importante para modificar los cultivos y así poder contrarrestar esos efectos. Los factores ambientales como sequía, salinidad, inundaciones, alta intensidad de radiación fotosintéticamente activa, malezas, patógenos y exposición a la contaminación del aire, provocan la disminución en la producción de los cultivos. En las plantas, el estrés se percibe como una disminución de la fotosíntesis y el crecimiento; a nivel molecular el daño oxidativo ocasiona un desbalance de la actividad del O_2 y en las defensas antioxidantes como el ácido ascórbico (AO), la ascorbato peroxidasa (APx), la catalasa (CAT) y la peroxidasa (PX). En condiciones normales, la producción y la destrucción de diversas especies reactivas de oxígeno (EROs) como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los radicales hidroxilo (OH) y el superóxido (O_2^-) son reguladas por las células de las plantas, pero en algún tipo de estrés ambiental el balance entre la producción de las especies reactivas de oxígeno (EROs) y las enzimas antioxidantes es afectado (Foyer *et al.*, 1994; Harinasut *et al.*, 2003).

4.3. Ajuste osmótico

Es un mecanismo importante para la tolerancia al estrés osmótico, ocurre por la acumulación activa de concentraciones altas de solutos de bajo peso molecular conocidos como “solutos compatibles” los cuales no interfieren con la función

metabólica de la planta, aún a concentraciones altas. Los solutos que se acumulan son iones potasio (K) (Gnanasiri *et al.*, 1995), azúcares como trehalosa, sacarosa y fructanos (Nuccio *et al.*, 1999; Yakushiji *et al.*, 1996) y aminoácidos, principalmente prolina (Verslues y Sharp, 1999), compuestos cuaternarios de nitrógeno (glicina, betaina) y polioles (manitol). En plantas de sorgo tolerante a la sequía se observó una alta capacidad para acumular iones de potasio (K), alto contenido relativo de agua, así como alta presión de turgencia en comparación con la línea susceptible (Gnanasiri *et al.*, 1995); mientras que en condiciones de estrés hídrico, en el jugo del fruto de “saluma mandarin” (*Citrus unshiu* Marc.) se incrementaron las concentraciones de sacarosa, glucosa y fructosa debido al ajuste osmótico (Yakushiji *et al.*, 1996).

La acumulación de prolina también contribuye al ajuste osmótico en la zona de crecimiento de la raíz primaria (radícula) en plántulas de maíz, donde su función primordial es el mantenimiento de la elongación de la raíz a potenciales hídricos bajos (Voetberg y Sharp, 1991). En la síntesis y transporte de solutos que contribuyen al ajuste osmótico, se requiere de fotoasimilados (compuestos orgánicos) derivados de la combinación de la radiación fotosintéticamente activa con el agua y el CO₂ (Munns, 2002).

En los cultivos, el ajuste osmótico origina: a) un incremento en la tasa neta de acumulación osmótica que afecta la síntesis, absorción, catabolismo, importación y utilización de solutos y b) un decremento en la tasa de expansión del tejido y en

la tasa de dilución osmótica. En la raíz primaria (radícula) de maíz, las hexosas (monosacáridos: glucosa, galactosa y fructosa) contribuyen al ajuste osmótico en la región distante del ápice de la radícula, mientras que a unos milímetros de la zona apical la concentración de prolina se incrementa considerablemente, bajo condiciones de estrés hídrico y contribuye hasta en un 50% al ajuste osmótico (Sharp *et al.*, 1990; Verslues y Sharp, 1999), por lo que la contribución relativa de cada soluto al ajuste osmótico puede variar con la intensidad del estrés (Ogawa y Yamauchi, 2006).

4.4. Acumulación de solutos compatibles en la raíz en condiciones de estrés hídrico

4.4.1. Prolina

La prolina es un metabolito que se sintetiza en menor cantidad en las plantas cuando crecen en condiciones óptimas, pero se acumula en mayor proporción en las plantas superiores, algas, animales y bacterias cuando se encuentran en condiciones de estrés por salinidad (Jiménez *et al.*, 2006; Tajdoost *et al.*, 2007), sequía (Avendaño *et al.*, 2005) y frío (Konstantinova *et al.*, 2002), por lo que el incremento de prolina se considera un mecanismo de resistencia al estrés, ya que actúa como un agente osmótico que protege de la deshidratación a las células de las plantas (Lutts *et al.*, 1999; Delauney y Verma 1993; Kavi *et al.* 1995; Yoshiba *et al.*, 1997). La prolina también es considerada como estabilizadora de proteínas y membranas; como activadora de genes relacionados con el estrés osmótico (Iyer y

Caplan 1998), como fuente de carbono y nitrógeno, compuestos fácilmente aprovechables durante la rehidratación celular (Brugière *et al.*, 1999) y, como fuente de equivalentes de reducción (del catabolismo de prolina) para favorecer la fosforilación oxidativa y la generación de ATP, durante la recuperación del estrés (Hare y Cress 1997; Hare *et al.*, 1998).

La prolina también contribuye al control de la acidez del citosol y puede mantener la relación NADH/NAD⁺ en valores compatibles con el metabolismo (Hare y Cress 1997); a la detoxificación del exceso de NH₄⁺ (amonio) y ayuda a las células a contrarrestar la tensión oxidativa (Winicov, 1998). La síntesis de prolina es promovida por un incremento en la concentración de metabolitos como poliaminas, amonio, arginina, ornitina, glutamina y glutamato. La presencia de los metabolitos se relaciona con la producción del precursor de la prolina (ácido glutámico) que puede ser la causa principal para su acumulación en los tejidos de las plantas, se encuentren o no en condiciones de estrés (Silveira *et al.*, 2002).

La biosíntesis de la prolina se puede asociar con la regulación del pH del citosol o la producción de NADP⁺ por la estimulación de la pentosa fosfato (Lutts *et al.*, 1999), también puede estar asociada con la disminución en su oxidación, baja demanda de síntesis de proteínas y poca acumulación en los tejidos que restringen su transporte a otras estructuras de la planta (Végas y Silveira, 1999). La concentración de prolina disminuye conforme la distancia al ápice de la raíz es mayor y se relaciona con el desarrollo vacuolar progresivo a

través de la zona de crecimiento (Stewart y Lee, 1974); otras investigaciones indican que la mayor acumulación de prolina se presenta en los primeros 2 mm del ápice de la radícula de plántulas de maíz expuestas al estrés osmótico (Göring *et al.*, 1977); estos resultados son similares a lo observado por Sharp *et al.* (1990) quienes mencionan que la concentración de prolina fue superior en la región meristemática que en regiones maduras del vástago de maíz a bajos potenciales hídricos; también se han detectado otros aminoácidos como la betaina, glutamina, glutamato y asparagina. Chu *et al.* (1976) y Drosopoulos *et al.* (1985) coinciden en que en los tejidos de algunas especies de plantas la concentración de prolina es considerada como una respuesta general a diversos tipos de estrés, entre ellos el déficit hídrico.

4.4.2. Carbohidratos solubles

Las plantas se adaptan al estrés por diversos mecanismos morfológicos, fenológicos, fisiológicos y bioquímicos (Bohnert *et al.*, 1995), esta adaptación está relacionada con el ajuste metabólico que conduce a la acumulación de solutos orgánicos como azúcares, betainas y prolina (Yancey *et al.*, 1982). De los solutos acumulados, el almidón y los lípidos dan lugar a los azúcares que son sintetizados durante la germinación de la semilla y transportados a sitios donde se requieren para el crecimiento (Prabhjot *et al.*, 2002). En especies herbáceas de zonas templadas y algunas dicotiledóneas, el almidón se almacena principalmente en raíces y semillas, por lo que no se considera un producto tan importante de la fotosíntesis como los polímeros de sacarosa y fructosa, que son conocidos como

fructanos, los cuales se encuentran en los tallos y las hojas de estas especies (Salisbury y Ross, 2000). La acumulación de los azúcares solubles: glucosa, fructosa y sacarosa se asocia con la adquisición de la tolerancia a la sequía en las plantas (Crowe *et al.*, 1990; Vertucci y Farrant 1995, Hoesktra y Butink, 2001).

4.5. Acumulación de solutos compatibles en las hojas en condiciones de estrés hídrico

4.5.1. Prolina

La prolina está involucrada en el ajuste osmótico, principalmente como un soluto del citoplasma. La acumulación de la prolina en las hojas es una respuesta a los bajos potenciales hídricos, ocasionada por la combinación del incremento en su biosíntesis y su lenta oxidación en la mitocondria. La síntesis de la prolina vía glutamato Δ^1 - pirrolina-5-carboxilato (P5C) es catalizada por la P5C sintetasa (P5CS) y P5C reductasa. Los niveles de la actividad y transcripción de la P5C son bajos dependiendo de la especie y se incrementan con la exposición a la sequía (Samaras *et al.*, 1995; Yoshiba *et al.*, 1995). La oxidación de la prolina a glutamato en la mitocondria es catalizada por P5C deshidrogenasa y prolina deshidrogenasa (PDH).

La actividad y los niveles de transcripción de la prolina deshidrogenasa (PDH) son rápidos y disminuyen en respuesta al estrés de agua (Kiyosue *et al.*, 1996; Peng *et al.*, 1996; Nakashima *et al.*, 1998). Los cambios en la tasa de biosíntesis y

oxidación que conducen a la acumulación de la prolina son parcialmente controlados por la expresión de genes y por la cantidad de enzimas. En *Arabidopsis* se han identificado transportadores de prolina (ProT1) que incrementan la capacidad de transporte en las plantas que se encuentran en estrés de humedad (Rentsch *et al.*, 1996 y Schwacke *et al.*, 1999).

4.5.2. Carbohidratos solubles

En los tres tipos de metabolismo fotosintético (C_3 , C_4 y CAM) el principal producto que se almacena en los tejidos de las plantas es el almidón que está compuesto de dos polímeros: amilasa (30 %) y amilopectina (70 %), ambos compuestos de (1-4)- α -D-glucano; la amilasa es una molécula lineal ligeramente ramificada con un grado de polimerización de 10^3 , y la amilopectina es altamente ramificada con $\alpha(1-6)$ uniones glucosídicas y un grado de polimerización de 10^4-10^5 que se desdobla a moléculas más sencillas como la sacarosa (disacárido), mientras que los azúcares hexosas: glucosa y fructosa, se encuentran en menor proporción.

Gran parte del carbono producido durante la fotosíntesis es canalizado a la síntesis de sacarosa que es el sustrato principal para el crecimiento y desarrollo de las plantas y es hidrolizada por la enzima homotetramérica sacarosa sintetasa (SS) (Morell y Copeland, 1985). Existen dos mecanismos que permiten a los azúcares proteger a las células durante el estrés de humedad: a) el grupo hidroxilo de los azúcares puede sustituir el agua para mantener la interacción hidrofílica en

membranas y proteínas durante la deshidratación; así, los azúcares interactúan con proteínas y membranas a través de los enlaces de hidrógeno, de esta manera se evita la desnaturalización de la proteína (Williams y Leopold, 1989; Leopold *et al.*, 1994) y, b) los azúcares tienen una mayor contribución a la vitrificación, que consiste en la formación de cristales orgánicos en el citoplasma de las células deshidratadas (Leopold *et al.*, 1994; Buitink *et al.*, 1998). Por su alta viscosidad los cristales intracelulares disminuyen drásticamente el movimiento molecular e impiden la difusión de compuestos reactivos en las células y con ello mantienen la integridad estructural y funcional de las macromoléculas (Sun y Leopold, 1997).

Los cristales ayudan a prolongar la longevidad del tejido deshidratado mediante un proceso degradativo lento durante el almacenamiento de fotosintatos (Buitink *et al.*, 1998). Los azúcares solubles principalmente la sacarosa, se acumulan en semillas, polen y en tejidos vegetativos tolerantes a la sequía, por ejemplo en hojas deshidratadas de *Crasterostigma plantagineum*, la 2-octulosa acumulada se convierte a sacarosa, que comprende 40 % de su biomasa (Oliver y Bewley, 1997).

La sacarosa funciona como un osmoprotector para estabilizar las membranas celulares y para mantener la turgencia de las mismas, actúa como sustituto del agua para mantener los fosfolípidos de la membrana en la fase líquida-cristalina y prevenir cambios estructurales en proteínas solubles, también sirve como una fuente inmediata de energía sobre la rehidratación, puesto que es un azúcar de fácil metabolización (Kerepesi y Galiba, 2000). Durante el estrés hídrico se

incrementan los niveles de sacarosa y de hexosas (glucosa, fructosa y galactosa) mientras que la cantidad de almidón disminuye debido a su hidrólisis (Pelleschi *et al.*, 1997; Vu *et al.*, 1998). La acumulación de sacarosa y de hexosas en las hojas provoca cambios en el potencial osmótico y en la expresión de algunos genes del metabolismo de carbohidratos; sin embargo, otros estudios demuestran que la concentración de azúcares solubles durante el estrés hídrico no cambia la osmolaridad de la hoja (Pelleschi *et al.*, 1997). El estrés de agua induce varias modificaciones en el metabolismo de los carbohidratos. En *Phaseolus vulgaris*, la actividad de la enzima sacarosa-fosfato sintetasa (SPS) es afectada por la deshidratación, en parte por el cierre estomático que conduce a un ciclo de Calvin Benson lento (Vassey *et al.*, 1991).

La mayor parte del carbono acumulado se convierte en sacarosa mientras que la cantidad de almidón disminuye (Norwood *et al.*, 1999; Whittaker *et al.*, 2001); tal como lo observaron (Fredeen *et al.*, 1991) y (Zrenner y Stitt, 1991) en plantas de girasol y espinaca donde la concentración de sacarosa aumentó en condiciones de estrés hídrico; la sacarosa también se acumula en plantas llamadas de resurrección como *Xerophyta viscosa*, *Sporobolus staphianus* y *Craterostigma wilmsii* (Mundree *et al.*, 2002; Whittaker *et al.*, 2001; Cooper y Farrant, 2002).

En la vacuola de plantas de papa transgénica, se asoció la concentración de prolina con la acumulación de glucosa, fructosa y almidón, además de que se observó inhibición de la fotosíntesis y un incremento de la respiración, los cuales se consideraron síntomas de estrés hídrico (Scholes *et al.*, 1996). La glucosa es

importante porque promueve la respiración y el transporte de electrones en la mitocondria (Koster y Leopold, 1988).

La fructosa, además de ser un carbohidrato de reserva, también es importante en los procesos metabólicos de las plantas durante su adaptación al estrés por frío y por sequía (Pontis, 1989; Pollock y Cairns, 1991; Hendry, 1993). La fructosa protege las membranas de los efectos adversos de la sequía e influye directamente en el proceso de crecimiento de las plantas (Pilon *et al.*, 1995). En el frijol de Palo (*Cajanus cajan*) bajo estrés de humedad, se observó una alteración en los niveles de carbohidratos solubles: sacarosa, hexosas (glucosa, fructosa) y almidón (Keller y Ludlow, 1993).

En pasto “rye grass” (*Lolium perenne* L.), trébol blanco (*Trifolium repens* L.) y *Festuca arundinaceae* Scrb, cultivados en riego y sequía, se observó mayor concentración de carbohidratos (fructanos y almidón) en plantas irrigadas que en las plantas en condiciones de sequía a los 10 días después de aplicados los tratamientos, mientras que en plantas de *Festuca* y “rye grass” la concentración de azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa) fue significativamente alta en plantas bajo estrés hídrico a los 20 y 30 días del tratamiento, lo que indica un incremento en la actividad osmótica como respuesta al estrés por sequía (Karsten y McAdam, 2001).

4.5.3. Estrés oxidativo en las hojas

En condiciones normales las especies reactivas de oxígeno (EROS): radicales superóxidos (O_2^-), oxígeno (O_2), radicales hidroxilo (OH) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2) son sintetizadas durante la fotosíntesis por una sola formación de oxígeno así como la foto-reducción del mismo, por lo que el daño foto-oxidativo ocurre cuando la producción de las EROS excede a la capacidad de reacción de los antioxidantes. El estrés oxidativo en las células de las plantas resulta de las condiciones de estrés ambiental y promueven la formación de especies reactivas de oxígeno (EROS), llamadas también radicales libres, que causan severos daños a los lípidos que actúan en la peroxidación de ácidos grasos insaturados en membranas; proteínas que participan en la desnaturalización de enzimas y carbohidratos que ayudan al desdoblamiento de las enzimas, por lo que se altera el metabolismo y se induce la muerte celular; los radicales tóxicos son removidos por la movilización de reservas antioxidantes que reaccionan enzimática y químicamente con ellos (Monk *et al.*, 1989).

Los compuestos antioxidantes de bajo peso molecular no enzimáticos: α -tocoferol (Vitamina E), ácido ascórbico (Vitamina C), glutatión y carotenoides y, enzimas antioxidantes: el superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX) y guaiacol peroxidasa (GPX) (Harinasut *et al.*, 2003) actúan como limpiadores de los radicales libres y protegen la actividad celular de la planta (Salin, 1987; Ahmed *et al.*, 2002). La ascorbato peroxidasa (APX) se localiza en el estroma, la membrana

del tilacoide, el citosol y en los cloroplastos (Jiménez *et al.*, 1997); la catalasa (CAT) en los peroxisomas y los glioxisomas (Scandalios, 2005); la superóxido dismutasa (SOD) que tiene como cofactores Cu/Zn, Fe o Mn, se clasifica en tres grupos: SODFe se localiza en el cloroplasto, SOD Cu/Zn que también se localiza en el cloroplasto, citosol y en el espacio extracelular y SODMn en las mitocondrias y los peroxisomas (Alscher *et al.*, 2002; Scandalios, 2005); glutatión reductasa (GR) se localiza en el cloroplasto, en la mitocondria y en el citosol (Arora *et al.*, 2002) y glutatión (GSH) se localiza en el citosol, cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas (Jiménez *et al.*, 1997). Estos compuestos son importantes en semillas de girasol (Halliwell *et al.*, 1990); tabaco, frijol mungo, maíz, papa dulce (camote), iris, trigo, soya, arroz y árboles de álamo (Kuann *et al.*, 2004).

Los cloroplastos son especialmente sensibles al daño de las especies reactivas de oxígeno (EROS) porque los electrones que se escapan del sistema de transferencia de electrones fotosintéticos, reaccionan ante una alta concentración de oxígeno, ocasionando una disminución de la tasa fotosintética, que finalmente se refleja en el crecimiento de la planta (Foyer *et al.*, 1994). El cierre estomático induce una disminución en la concentración del CO₂ interno y por consiguiente la reducción de la fotosíntesis (Carvalho y Amancio, 1992), por lo que la baja concentración de CO₂ en las hojas aumenta los radicales libres de oxígeno y puede inducir la muerte de la planta (Lin *et al.*, 2004). La reacción de radicales de oxígenos libres y semilibres se manifiesta en la senescencia (Ames *et al.*, 1993).

El radical superóxido (O_2^-) tiene un periodo de vida de al menos un segundo y por lo general es modificado por la enzima superóxido dismutasa a peróxido de hidrogeno (H_2O_2) que es un producto relativamente estable y puede ser eliminado por las enzimas catalasa y peroxidasa (Grant y Loake, 2000); a su vez, Halliwell *et al.* (1990) reportaron que en plantas, la enzima peroxidasa (POD) participa con la superoxidasa dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT) en la regulación oxidativa de varias sustancias como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

En hojas de cultivares de soya (Zheng y Han, 1997), cempoalxóchitl (*Tagetes erecta* L.) (Kurup *et al.*, 1994) y dos especies de yute (*Corchorus capsularis* L. y *C. olitorius*) (Chowdhury y Choudhuri, 1985), se observó un incremento de la actividad de la enzima peroxidasa (POD) y menor concentración de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), lo que indica una función importante de la enzima en las plantas en condiciones de estrés hídrico. Por otra parte, plántulas de trigo (*Triticum aestivum* L.) de tres días de desarrollo, tolerantes y susceptibles a estrés hídrico mostraron incremento en la actividad enzimática de la glutatión reductasa, superóxido dismutasa y catalasa en el coleoptilo, (Farrant *et al.*, 2004), mientras que en las hojas de dos cultivares de maíz uno resistente (LIZA) y otro sensible (LG11) al estrés de agua, de siete y 18 días de desarrollo se observó un aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes glutatión reductasa, superóxido dismutasa y ascorbato peroxidasa (Pastori y Trippi, 1993).

4.5.4. Acumulación de ácido ascórbico: antioxidante no enzimático, bajo condiciones de estrés hídrico

El ácido ascórbico (Asc) y ascorbato peroxidasa (APX) se localizan en células eucarióticas fotosintéticas (plantas, algas y briofitas). El ácido ascórbico se encuentra en el citosol, cloroplastos, vacuolas, mitocondrias y pared celular (Rautenkranz *et al.*, 1994). De los antioxidantes en las plantas, el ácido ascórbico es el más abundante, se encuentra en concentraciones milimolares en un intervalo de 10 a 300 mM y funciona como el principal compuesto en el estado de reducción celular (Smirnoff, 2000).

En las células de las hojas, el 90% del ácido ascórbico se localiza en el citoplasma, pero a diferencia de otros antioxidantes, una proporción importante es exportada hacia el apoplasto, la concentración en los cloroplastos puede ser superior a los 50 mM en espinaca y posiblemente tiene relación con la función central de la fotosíntesis; la presencia del ácido ascórbico en la pared celular está relacionada con la afinidad a la forma oxidada del ascorbato (dehidroascorbato DHA) presente en la membrana plasmática del protoplasto de hojas de avena (Foyer, 1993).

En su función de antioxidante, el ácido ascórbico es usado por la ascorbato peroxidasa (APX) para contrarrestar los efectos del estrés oxidativo y convertir el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua, por lo tanto, el ácido ascórbico puede

eliminar superóxidos (O_2^-), radicales hidroxilos (OH) y oxígeno simple (O_2); también funciona como una enzima cofactor en la deepoxidación de la violaxantina (VDE), xantofila derivada de α o β -Caroteno, que cataliza la conversión de violaxantina a zeaxantina (ciclo de la xantofila que interfiere en la pigmentación amarilla de las flores y frutos), la cual es requerida para la disipación del exceso de excitación de energía durante terminaciones no fotoquímicas (Eskling *et al.*, 1997) y está relacionada en la regulación de la elongación y progresión celular en el ciclo de la célula (Horemans *et al.*, 2000).

El estrés oxidativo ocurre cuando la alta radiación fotosintéticamente activa se combina con la sequía, temperaturas extremas (altas y bajas), deficiencias nutrimentales (Foyer *et al.*, 1994b) y patógenos (Lamb y Dixon, 1997); otros factores ambientales que favorecen la presencia de las EROs son los rayos ultravioleta (UV-B), contaminación del aire (ozono, dióxido de sulfuro), actividad-redox de herbicidas (paraquat) y metales fitotóxicos (Zn, Cu y Cd) (Padh, 1990).

4.5.5. Actividad de la enzima ascorbato peroxidasa: antioxidante enzimático, bajo condiciones de estrés hídrico

La enzima ascorbato peroxidasa (APX) es un gran consumidor de ácido ascórbico, como principal donador de electrones para reducir el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a agua (H_2O) y oxígeno simple (O_2) y utiliza al ascorbato como donador de electrones, en donde el ácido ascórbico es oxidado a monodehidroascorbato

(MDHA) que a su vez, es transformado a ácido ascórbico y a dehidroascorbato (DHA) (Asada, 1992; Shigeoka *et al.*, 2002). La actividad de la enzima ascorbato peroxidasa ocurre en el cloroplasto y el citosoplasma (Foyer, 1993). Las isoenzimas de la ascorbato peroxidasa (APX) se localizan en el estroma (sAPX), en la membrana del tilacoide en el cloroplasto (tAPX), en el citosoplasma (cAPX), peroxisomas y mitocondrias (Jiménez *et al.*, 1997). La actividad de la enzima ascorbato peroxidasa se incrementa con la actividad de otros antioxidantes como la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión reductasa, en respuesta a factores de estrés como frío y salinidad. El aumento de la actividad enzimática de la peroxidasa está asociada a la aclimatación al frío en plántulas de maíz (Anderson *et al.*, 1995), en algodón (Payton *et al.*, 2001) y en la radícula de plántulas de pepino (Kang y Saltveit, 2002), en tubérculos de papa en almacenamiento (Kawakami *et al.*, 2002) y en la dormancia de la papa (Rojas *et al.*, 2000). La enzima ascorbato peroxidasa se localiza en diferentes compartimentos celulares y se han descrito ocho isoformas en arroz (*Oriza sativa*), dos en el citosoplasma (OxAPX1 y OsAPX2), dos en los peroxisomas (OsAPX3 y OsAPX4) y cuatro en los cloroplastos (OsAPX5, OsAPX6, OsAPX7 y OsAPX8) (Teixeira *et al.*, 2004).

FASE I

5. EFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO EN LA ELONGACIÓN DE LA RADÍCULA Y ACUMULACIÓN DE BIOMASA EN LAS SEMILLAS GERMINADAS DE FRIJOL PINTO VILLA Y BAYO MADERO

5.1. Introducción

La germinación es el resultado de una serie de acontecimientos metabólicos que suceden desde la absorción de agua por parte de la semilla, hasta el crecimiento de la radícula. La emergencia de la radícula a través de las estructuras de la semilla es el momento en que termina la germinación de la misma, su elongación puede estar acompañada por una tasa lenta de división celular y, comienza el crecimiento de la plántula (Bewley, 1997).

La elongación de la radícula es un proceso determinado por la turgencia de las células, que requieren de la formación de pared celular en el eje de la raíz embrionaria que se encuentra entre el ápice de la raíz y la base del hipocotilo (Osborne y Boubriak, 1994). Pocos días después de la emergencia de la radícula, aparecen las raíces secundarias, llamadas así, debido a que se forman a partir de la raíz principal (CIAT, 1982).

5.2. Objetivo

Evaluar el efecto del déficit hídrico sobre la elongación y acumulación de biomasa en la radícula y en las demás estructuras de las semillas germinadas de dos variedades de frijol Pinto Villa resistente a la sequía y Bayo Madero susceptible a la sequía.

5.3. Hipótesis

La elongación y acumulación de biomasa en la radícula bajo condiciones de estrés de humedad será mayor en las semillas germinadas de la variedad de frijol Pinto Villa con respecto a las de Bayo Madero como una manifestación de diferencia en tolerancia a la sequía entre las dos variedades.

5.4. Materiales y métodos

El estudio se llevó a cabo en los laboratorios de Fisiología Vegetal Ambiental, Biofísica y Bioquímica del programa de Botánica del Colegio de Postgraduados, durante el periodo de febrero 2006 a mayo 2007. Se utilizaron dos variedades mejoradas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Pinto Villa (resistente a la sequía) y Bayo Madero (susceptible a la sequía) pertenecientes a la Raza Durango, cuyos genotipos representantes se distribuyen en las zonas semiáridas del Norte y Centro de México y Sur de EE. UU., son fuente de madurez temprana

(precocidad), tolerantes a sequía, tienen índice de cosecha alto y muestran tolerancia a algunas enfermedades virales Singh *et al.*, (1991).

Se germinaron 200 semillas de cada variedad en una cámara de germinación (Wisconsin Oven Termacrón mr) a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$; después de 3 ó 4 días, cuando la radícula de ambas variedades alcanzó una longitud de 3 a 5 cm, ésta se marcó con tinta china a 2 mm de distancia del ápice, en ese momento, las semillas germinadas se trasplantaron a tubos de PVC de 10 cm de largo y 6 cm de diámetro, con capacidad de 20 g de vermiculita grado 1 como sustrato. Se utilizó luz verde para iluminar el lugar en donde se realizó el transplante y así, evitar la estimulación de la elongación del gancho del hipocótilo. Los tubos se cubrieron con polietileno negro para mantener la condición de oscuridad y favorecer solo la elongación de la radícula a temperatura ambiente entre $25 - 26^{\circ}\text{C}$.

Para obtener los potenciales de agua (Ψ_A), el sustrato se lavó con agua destilada y se puso a secar durante 72 h, después se colocaron 100 g de vermiculita en bolsas de plástico y se agregaron 6, 10, 12 y 100 ml de agua destilada para obtener el porcentaje de agua deseado y por último se pusieron a reposar durante 72 h para que se homogeneizara la humedad en el sustrato. Por lo que se tuvieron cuatro tratamientos de humedad al sustrato 6, 10, 12 y 100 % que correspondieron a Ψ_A de -2.07, -0.52, -0.27 y -0.16 (Megapascales) MPa respectivamente, los cuales se determinaron en cámaras psicrométricas (Modelo C-52, Wescor) y un microvoltímetro de punto de rocío (Modelo HR-33T, Wescor), las cámaras se calibraron con una solución de cloruro de sodio (NaCl) con concentraciones de 0.1

a 0.8 molal a una temperatura de 25 °C. La humedad del 6 % fue el tratamiento de mayor estrés, mientras que la del 100 % se consideró como testigo.

Se hicieron cuatro mediciones de la longitud de la radícula (a las 24, 48, 72 y 144 h después del trasplante) con una cinta métrica con aproximación de 1 mm a partir de la marca hecha en la radícula, en cinco semillas germinadas por tratamiento de humedad en cada variedad, también se separaron las estructuras de la semilla: testa, cotiledones y radícula, se pusieron a secar en una estufa de circulación de aire durante 72 h a 70 °C y además se contó el número de raíces secundarias de ambas variedades.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, considerando la combinación factorial de los tratamientos aplicados y para conocer si existían diferencias estadísticas para cada una de las variables medidas, se hizo un análisis de varianza mediante el paquete SAS[®] 8.0. Las fuentes de variación consideradas fueron variedades (Var), potenciales de agua (Ψ_A), la interacción Var x (Ψ_A), el error experimental y el total y, se hizo la prueba de comparación de medias de Tukey con una $\alpha = 0.05$.

5.5. Resultados y discusión

5.5.1. Longitud y biomasa de la radícula

Se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en la longitud de la radícula entre las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero, entre los cuatro tiempos de muestreo y entre los cuatro potenciales de agua (Ψ_A) estudiados; también se puede notar que la interacción variedad por potenciales de agua ($\text{Var} * \Psi_A$) resultó estadísticamente significativa (Cuadro 1, Anexo 1).

Cuadro 1. Valores de significancia de los factores de variación en la longitud de radícula de dos variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Factor de variación	gl	F tablas α	F calculada	Significancia
Variedad	1	23.17	<.0001	**
Tiempo de muestreo	3	115.53	<.0001	**
Ψ_A	3	224.42	<.0001	**
$\text{Var} * T_m$	3	0.33	0.8006	NS
$\text{Var} * \Psi_A$	3	5.79	0.0010	*
$T_m * \Psi_A$	9	24.89	<.0001	**
$\text{Var} * T_m * \Psi_A$	9	0.82	0.5961	NS

Var = Variedad, Ψ_A = Potencial de agua, T_m = Tiempo de muestreo, * Significativo, **Altamente significativo, NS = No significativo.

Tanto en el Cuadro 1, como en los demás análisis de varianza que se van a presentar durante todos los resultados de esta investigación no se discutirán las dos últimas interacciones, ya que las interacciones que permiten comprender de

manera más clara y precisa los resultados son las que involucran las variedades por los tiempos de muestreo (Var*Tm) y variedades por los potenciales de agua (Var* Ψ_A).

En el Cuadro 2 (Anexo 21) se muestra la interacción variedad por potenciales de agua (Var* Ψ_A) la cual indica que la longitud de la radícula en ambas variedades tuvo una respuesta diferente al efecto de los potenciales. Se puede observar que la elongación de la radícula en ambas variedades disminuyó a medida que aumentó el estrés de humedad (Ψ_A de -0.16 a -2.07 MPa). En todos los casos la longitud de la radícula en Pinto Villa fue mayor que en Bayo Madero. Sin embargo, esta superioridad de Pinto Vila sólo resultó estadísticamente significativa en los dos potenciales de menor estrés (-0.16 y -0.27 MPa). En los Ψ_A de mayor estrés (-0.54 y -2.07 MPa) no hubo diferencias en la elongación de la radícula entre las dos variedades.

Cuadro 2. Longitud de la radícula (cm) de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes potenciales de agua (Ψ_A).

Variedad	Ψ_A (MPa)				Media
	-2.07	-0.52	-0.27	-0.16	
Pinto Villa	5.28 e	9.30 d	12.88 b	14.85 a	10.57
Bayo Madero	5.09 e	9.09 d	11.14 c	12.27 bc	9.39

DMS = 1.51

Medias con distinta letra entre columnas son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). Ψ_A = Potencial de agua.

Con base en los resultados anteriores, se puede señalar que Pinto Villa tiene mayor capacidad de elongación de la radícula que Bayo Madero aún en los Ψ_A de mayor estrés, lo cual puede estar relacionado con su característica de resistencia a la sequía.

Estos resultados coinciden con lo observado por Akmal e Hirasawa (2004) en plántulas de trigo desarrolladas en vermiculita, en donde la mayor longitud de la radícula ocurrió en los Ψ_A de -0.03 MPa (menor estrés), mientras que en Ψ_A entre -0.4 y -0.5 MPa (mayor estrés), la longitud disminuyó a la mitad, en relación a lo observado en -0.03 MPa; en el mismo sentido, Ogawa y Yamauchi (2006) encontraron que la elongación de la radícula de maíz, se vio fuertemente afectada por el Ψ_A de -0.13 MPa. En maíz, los Ψ_A de -0.40 y -0.80 MPa no influyeron sobre el crecimiento de la raíz primaria (radícula); sin embargo, éste disminuyó significativamente cuando el Ψ_A fue de -1.60 MPa, lo que revela que la región de mayor división celular que es el ápice de la radícula, es afectada en alto grado por Ψ_A bajos reduciendo su crecimiento (Shimazaki *et al.*, 2005).

Es importante mencionar que la disminución de la humedad del suelo se puede reflejar en las plantas en varios aspectos, como: la reducción del crecimiento celular, que es el indicador más sensible al estrés de agua en las plantas, de la expansión de las hojas y de la tasa fotosintética, así como el cierre estomatal y la acumulación de algunos solutos en las células (Taiz y Zeiger, 2002). Existen tres posibles condiciones para el inicio del crecimiento de la radícula: 1) durante la

etapa final de la germinación el potencial osmótico de las células de la radícula es menor debido a la acumulación de solutos y da como resultado la hidrólisis de polímeros de reserva, almidón principalmente, provocando un aumento en la absorción de agua y la turgencia que conduce a la extensión celular (Bewley, 1997); 2) la extensibilidad de las paredes celulares de la radícula permite su elongación, y es resultado de la escisión y la reincorporación de moléculas de xiloglucanas que están unidas a microfibrillas de celulosa y que permiten la expansión por la separación de las microfibrillas, la presencia y la actividad de la enzima xiloglucana endotransglucosilasa (XET) que incrementa la elongación de la región apical de la raíz en plántulas de maíz, lo que ocurre después de que se ha completado la germinación (Wu *et al.*, 1994); y 3) los tejidos de la semilla que rodean a la radícula reblandecen el ápice, lo que favorece la elongación del mismo; cabe mencionar que no existen cambios en el potencial osmótico de la célula antes de que inicie el crecimiento de la radícula, por lo que es claro que el potencial de turgencia de las paredes celulares es suficiente para dar lugar a la elongación (Schopfer y Placy, 1985).

La acumulación de biomasa en la radícula (Cuadro 3, Anexo 2) tuvo un comportamiento similar al de la elongación de la radícula, es decir, se observaron diferencias estadísticas significativas entre las variedades Pinto Villa y Bayo Madero, entre los cuatro tiempos de muestreos y entre los cuatro potenciales de agua (Ψ_A) estudiados, y la interacción de variedad por potenciales de agua ($\text{Var}*\Psi_A$), también resultó significativa estadísticamente lo que indica que la

acumulación de biomasa en la radícula de Pinto Villa y de Bayo Madero tuvo un comportamiento diferente por efecto de los diferentes niveles de humedad.

Cuadro 3. Valores de significancia de los factores de variación en la acumulación de biomasa de dos variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Factor de variación	gl	F tablas α	F calculada	Significancia
Variedad	1	9.32	0.0028	*
Tiempo de muestreo	3	36.29	<.0001	**
Ψ_A	3	51.74	<.0001	**
Var*Tm	3	0.12	0.9467	NS
Var* Ψ_A	3	2.76	0.0450	*
Tm* Ψ_A	9	20.76	<.0001	**
Var*Tm* Ψ_A	9	1.32	0.2332	NS

Var = Variedad, Ψ_A = Potencial de agua, Tm = Tiempo de muestreo, * Significativo, **Altamente significativo, NS = No significativo.

En el Cuadro 4 (Anexo 22) se observan diferencias significativas de la interacción de variedades por potenciales de agua (Var* Ψ_A), la cual mostró un comportamiento similar a lo presentado en la elongación de la radícula, ya que la acumulación de biomasa en la radícula fue disminuyendo conforme el nivel de humedad fue menor (de -0.16 a -2.07 MPa) en ambas variedades. En este caso la mayor acumulación de biomasa se tuvo en la variedad Bayo Madero en los cuatro Ψ_A estudiados con respecto a Pinto Villa.

Cuadro 4. Biomasa de la radícula (mg) de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes potenciales de agua (Ψ_A).

Variedad	Ψ_A (MPa)				Media
	-2.07	-0.52	-0.27	-0.16	
Pinto Villa	15 e	24 cd	33 a	27 bc	24
Bayo Madero	21 de	23 cd	35 a	33 ab	28

DMS = 6.1

Medias con distinta letra entre columnas son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). Ψ_A = Potencial de agua.

Aun cuando se observaron diferencias numéricas en la acumulación de la biomasa en la radícula entre las variedades en cada uno de los Ψ_A estudiados, éstas no fueron significativas en los potenciales de estrés intermedio (-0.52 y -0.27 MPa), pero si lo fueron en los potenciales de menor y mayor estrés (-0.16 y -2.07 MPa). Es importante mencionar que la elongación de la radícula y la acumulación de biomasa forman parte del desarrollo de la planta, por lo tanto se observaron diferencias significativas en la longitud de la radícula en el Ψ_A de -0.27 MPa, siendo mayor Pinto Villa a Bayo Madero (Cuadro 2), así como en la acumulación de biomasa en los Ψ_A potenciales de -2.07 y -0.16 MPa en donde Bayo Madero fue mayor a la variedad Pinto Villa.

5.5.2. Número de raíces secundarias

No se observaron diferencias significativas en el número de raíces secundarias entre las variedades Pinto Villa y Bayo Madero; ni las interacciones de variedad por tiempo de muestreo (Var*Tm) y variedad por potencial de agua (Var* Ψ_A) fueron significativas, donde si se mostraron estas diferencias fue entre los cuatro tiempos de muestreo y entre los cuatro potenciales de agua evaluados (Var* Ψ_A), (Cuadro 5, Anexo 3).

Cuadro 5. Valores de significancia de los factores de variación en el número de raíces secundarias de dos variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Factor de variación	gl	F tablas α	F calculada	Significancia
Variedad	1	0.21	0.6452	NS
Tiempo de muestreo	3	91.261	<.0001	**
Ψ_A	3	45.56	<.0001	**
Var*Tm	3	0.61	0.6074	NS
Var* Ψ_A	3	2.05	0.1101	NS
Tm* Ψ_A	9	7.77	<.0001	**
Var*Tm* Ψ_A	9	0.87	0.5536	NS

Var = Variedad, Ψ_A = Potencial de agua, Tm = Tiempo de muestreo, * Significativo, **Altamente significativo, NS = No significativo.

El análisis anterior demuestra que Pinto Villa y Bayo Madero tienen la misma capacidad de desarrollar raíces secundarias ante diferentes Ψ_A en el sustrato. Aún cuando en esta investigación no se realizó una evaluación sobre la cantidad de fósforo en la radícula de Pinto Villa y Bayo Madero, es importante mencionar que las raíces secundarias contribuyen a una eficiente absorción de fósforo debido al

mejoramiento de la capa superficial del suelo, ya que la baja disponibilidad de este nutrimento es una limitación para la productividad de la planta en muchos ecosistemas naturales y agrícolas. Las plantas muestran un amplio rango de respuestas adaptativas a la baja disponibilidad de fósforo que generalmente sirve para incrementar la movilidad de fósforo en el suelo y por lo tanto su absorción (Thomas *et al.*, 2006). Se ha observado variación genotípica en la formación de raíces secundarias y adventicias en varios cultivos, como frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en suelos con baja disponibilidad de fósforo (Miller *et al.*, 2003), pudriciones de raíz (Navarrete y Acosta, 1999) y en condiciones de suelos inundados como es el caso de la soya (*Glycine max* L.) Bacanamwo y Purcell (1999), *Rumex ssp* (Visser *et al.*, 1996), tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) McNamara y Mitchell (1990) y el maíz (*Zea mays* L.) Mano *et al.* (2005).

Diversas investigaciones muestran ciertas características de la raíz de frijol como la trayectoria gravitrópica de la raíz, raíces secundarias y adventicias, dispersión lateral de las raíces y la plasticidad de estos procesos, en respuesta a la disponibilidad del fósforo, que contribuyen a una eficiente absorción del mismo, y favorecen una mejor exploración y explotación de las capas superficiales del suelo donde la disponibilidad del fósforo es alta en diversos tipos de suelos (Lynch y Brown, 2001). Aparte de la exploración de la capa superficial del suelo, las raíces adventicias tienen un bajo costo metabólico en comparación con otros tipos de raíces (Miller *et al.*, 2003), por lo que son un componente importante en la planta para su adaptación a condiciones ambientales de suelo con un bajo contenido de fosforo (Lynch y Ho, 2005; Miller *et al.*, 2003).

Respecto a las características estudiadas y explicadas anteriormente (longitud de radícula, biomasa de radícula y número de raíces secundarias), se puede decir con seguridad que el carácter que se puede considerar como un indicador relacionado con la resistencia a la sequía es la longitud de la radícula, la cual tuvo mayor expresión en la variedad de frijol Pinto Villa en los diferentes Ψ_A en que se desarrolló, siendo superior a la variedad susceptible, Bayo Madero.

5.5.3. Acumulación y distribución de biomasa (g) en las semillas germinadas de Pinto Villa y Bayo Madero

En el Cuadro 6 (Anexo 4) sólo se observaron diferencias significativas en la biomasa de las semillas germinadas que comprende las estructuras cotiledón más plúmula (cot + plum), radícula y testa entre las variedades Pinto Villa y Bayo Madero, así como entre los cuatro Ψ_A evaluados, mientras que en las interacciones de las variedades por tiempo de muestreo (Var*Tm) y variedades por potenciales de agua (Var* Ψ_A) no hubo significancia estadística.

Cuadro 6. Valores de significancia de los factores de variación en la acumulación de biomasa de las semillas germinadas de dos variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Factor de variación	gl	F tablas α	F calculada	Significancia
Variedad	1	108.37	<.0001	**
Tiempo de muestreo	3	2.03	0.1123	NS
Ψ_A	3	6.12	0.0006	*
Var*Tm	3	1.21	0.3077	NS
Var* Ψ_A	3	0.96	0.4122	NS
Tm* Ψ_A	9	0.53	0.8524	NS
Var*Tm* Ψ_A	9	0.64	0.7651	NS

Var = Variedad, Ψ_A = Potencial de agua, Tm = Tiempo de muestreo * Significativo, **Altamente significativo, NS = No significativo.

Las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero mostraron diferencias significativas en la biomasa inicial de la semilla 450 mg y 510 mg respectivamente, de la cual se partió para estudiar la distribución de la biomasa a las estructuras de las semillas germinadas. En el Cuadro 7 se muestra el promedio de la acumulación (mg) (Anexos 5 y 6) y la proporción (%) (Anexos 23 y 24) de la biomasa en cada una de las estructuras de la semilla con respecto a la biomasa inicial de la misma en ambas variedades, a las 144 h después de aplicados los tratamientos de humedad (Ψ_A). En la variedad Bayo Madero se observa que los valores absolutos de la acumulación de biomasa en cada una de las estructuras de la semilla (C + P, radícula y testa) así como la suma de toda ellas, junto con la pérdida de biomasa por respiración (PbxR), son mayores con respecto a lo observado en Pinto Villa.

Sin embargo, la proporción (%) de la biomasa de las estructuras en ambas variedades fueron similares, por lo que en Pinto Villa la biomasa correspondiente a las estructuras de la semilla fluctuó entre 80.44 % en el Ψ_A de menor estrés -0.16 MPa y 86.44 % en el de mayor estrés -2.07 MPa, mientras que la pérdida de biomasa causada por la respiración de la semilla varió de 19.56 a 13.56 %, mientras que en Bayo Madero las estructuras de la semilla conformaron entre un 84.70 y 85.29 % con respecto a la biomasa inicial, y por efecto de la respiración, la pérdida de biomasa fluctuó entre un 15.30 y 14.71 % con respecto a los Ψ_A antes mencionados. En base a lo anterior, se puede indicar que aunque Bayo Madero presente un tamaño de semilla mayor a Pinto Villa, la proporción de biomasa de las estructuras es similar entre las variedades.

Cuadro 7. Acumulación de biomasa (mg) y su relación en porcentajes en las estructuras de las semillas germinadas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes potenciales de agua (Ψ_A) a las 144 h.

Pinto Villa						
Ψ_A (MPa)	Bisemilla	Radícula	Testa	C+P	B estruct	PbxR
-0.16		25 (5.55)	32 (7.11)	305 (67.78)	362 (80.44)	88 (19.56)
-0.27	450 (100)	30 (6.67)	32 (7.11)	317 (70.44)	379 (84.22)	71 (15.78)
-0.52		22 (4.89)	32 (7.11)	318 (70.67)	372 (82.67)	78 (17.33)
-2.07		15 (3.33)	33 (7.33)	341 (75.78)	389 (86.44)	61 (13.56)
Bayo Madero						
Ψ_A (MPa)	Bisemilla	Radícula	Testa	C+P	B estruct	PbxR
-0.16		34 (6.67)	36 (7.05)	362 (70.98)	432 (84.70)	78 (15.30)
-0.27	510 (100)	36 (7.06)	38 (7.45)	365 (71.56)	439 (86.07)	71 (13.93)
-0.52		27 (5.30)	37 (7.25)	371 (72.74)	435 (85.29)	75 (14.71)
-2.07		25 (4.90)	36 (7.06)	374 (73.33)	435 (85.29)	75 (14.71)

Nota: los valores están calculados en base a la biomasa inicial de la semilla. Números entre paréntesis corresponden a porcentajes. Ψ_A = Potencial de agua. Bisemilla = Biomasa inicial de la semilla. C + P = cotiledón + plúmula. B estruct = biomasa de las estructuras. PbxR = pérdida de biomasa por respiración.

La composición química de las semillas entre especies es variable; así mismo la semilla madura almacena carbohidratos, proteínas y lípidos que se desdoblan para la germinación y con ello proveer de energía para la síntesis de sustratos para el desarrollo de la plántula, por lo que la señal visible de que la germinación se ha completado es la emergencia de la radícula (Bewley y Black, 1994). La composición química de las semillas está determinada genéticamente y puede variar en función de factores ambientales como la presencia de nutrientes minerales o el clima.

A su vez, los carbohidratos constituyen el principal componente de las reservas de las semillas, en frijol se almacenan en los cotiledones, e incluyen moléculas solubles de bajo peso molecular; oligosacáridos, polisacáridos de la pared celular y almidón (Kigel y Galili, 1995). Entre los compuestos químicos que se encuentran en el frijol el almidón representa un 31 % y la proteína un 37 % en base a la materia seca (Ortega y Rodríguez, 1979), estos compuestos posiblemente estén contribuyendo al peso que tuvieron los cotiledones de las variedades Pinto Villa y Bayo Madero.

5.6. Conclusiones

El Ψ_A de mayor estrés (-2.07 MPa) afectó la elongación de la radícula y se observaron valores de 5.28 y 5.09 cm en Pinto Villa y Bayo Madero respectivamente, en comparación con el de los Ψ_A intermedios -0.27 y -0.16 MPa en los cuales se tuvo 14.85 cm en Pinto Villa y 12.27 cm en Bayo Madero, esto

demuestra que la variedad Pinto Villa desarrolló mayor longitud de radícula en comparación con Bayo Madero, aún en condiciones limitantes de humedad.

No se observaron diferencias significativas en la acumulación de biomasa en la radícula de las dos variedades entre los Ψ_A intermedios -0.52 y -0.27 MPa, sin embargo las diferencias significativas se presentaron en los Ψ_A de mayor -2.07 y menor estrés -0.16 MPa en los que se observaron los valores más bajos de acumulación de biomasa, lo cual indica que la elongación de la radícula estuvo relacionada con la acumulación de biomasa en ambas variedades.

La proporción de la biomasa de las estructuras de las semillas germinadas con respecto al peso inicial de la semilla fue similar en ambas variedades, aun cuando el tamaño de la semilla de Bayo Madero es mayor a la de Pinto Villa.

De los resultados obtenidos en esta fase, se puede concluir que Pinto Villa mostró una mayor elongación de la radícula, y aún cuando la biomasa que se acumuló en dicha estructura no tuvo diferencias significativas en los Ψ_A de estrés intermedio entre las variedades, por lo que la longitud de la radícula se puede considerar como un indicador relacionado con el estrés de humedad.

FASE II

6. EFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO EN LA ACUMULACIÓN DE PROLINA Y CARBOHIDRATOS SOLUBLES EN LA RADÍCULA DE FRIJOL PINTO VILLA Y BAYO MADERO

6.1. Introducción

El ajuste osmótico es un mecanismo de las plantas para evitar el daño por el estrés a la sequía. La acumulación de prolina, de compuestos de amonio cuaternario y carbohidratos permiten a las células de los tejidos vegetales mantener la turgencia celular (Weinberg *et al.*, 1982; Huang *et al.*, 2000). Existen evidencias de que los solutos compatibles se acumulan en las células de los tejidos vegetales en concentraciones altas para contrarrestar la inactivación de las enzimas o la pérdida de la integridad de las membranas, debido a una deficiencia de agua (Schwab y Gaff 1990); tal es el caso de la prolina que se acumula con mayor frecuencia en las plantas cuando éstas se encuentran en condiciones de estrés de agua y/o de salinidad, por lo que se considera que está involucrada en uno de los mecanismos de resistencia al estrés (Lutts *et al.*, 1999). Algunos trabajos documentan que la mayor concentración de prolina en raíces en crecimiento a bajos potenciales de humedad, se presenta cerca del ápice que es la zona de mayor división celular y disminuye a medida que se tiene mayor distancia al ápice (Stewart y Lee, 1974) además, los azúcares solubles como la sacarosa participan en la estabilización de las membranas celulares y en el

mantenimiento de la turgencia (Mundree *et al.*, 2002). Por lo anterior, para la segunda fase del estudio se planteó el siguiente objetivo:

6.2. Objetivo

Evaluar el efecto del déficit hídrico sobre la concentración de prolina y carbohidratos solubles en la radícula de semillas germinadas de dos variedades de frijol: Pinto Villa resistente a la sequía y Bayo Madero susceptible, con el propósito de estudiar si estos indicadores son confiables para la selección de genotipos resistentes al estrés de humedad.

6.3. Hipótesis

La variedad Pinto Villa (resistente a la sequía) tendrá mayor acumulación de prolina que Bayo Madero (susceptible a la sequía) en condiciones limitantes de humedad.

Bajo la misma condición de humedad limitante, la concentración de los carbohidratos sacarosa y almidón será mayor en la variedad resistente que en la susceptible.

La degradación del almidón favorecerá la síntesis de glucosa, fructosa y sacarosa, y su concentración a niveles más altos en Pinto Villa, en relación a Bayo Madero.

6.4. Materiales y métodos

Para obtener el material vegetal necesario para la medición del aminoácido prolina y de los carbohidratos solubles glucosa, fructosa, sacarosa y almidón se utilizó el mismo procedimiento detallado en la fase I del presente escrito. Los niveles de humedad utilizados fueron tres: 6, 8 y 12 % que corresponden a un potencial de agua (Ψ_A) de -2.07, -1.29 y -0.27 MPa respectivamente, la humedad del 12 % se tomó como el tratamiento testigo, ya que con base en los resultados de la fase anterior, el Ψ_A de -0.16 MPa (100 % humedad), se eliminó, debido a que provocó la pudrición del cuello del hipocótilo en su unión al cotiledón.

6.4.1. Cuantificación de prolina

Para la determinación de la prolina se utilizó la metodología establecida por Bates (1973): las muestras de radícula de cada tratamiento se congelaron en nitrógeno líquido (-196 °C) y se conservaron en refrigeración a -38 °C hasta su procesamiento. Las determinaciones de prolina se hicieron utilizando 50 mg de material vegetal de cada una de las muestras, las cuales se molieron con 2.5 mL de ácido sulfosalicílico al 3 % y un poco de arena de mar y el compuesto se centrifugó a 11 000 g durante 5 minutos a 4 °C. Se tomaron 2 mL del sobrenadante que se colocaron en tubos de ensayo y se le adicionaron 2 mL de ninhidrina ácida y 2 mL de ácido acético glacial. El blanco, que no lleva extractos de la radícula, se preparó con 2 ml de ácido sulfosalicílico, 2 mL de ninhidrina

ácida y 2 mL de ácido acético glacial. Cada tubo se agitó en un vortex (Mistral Mixer Lab-Line Instruments, Inc.) hasta que se obtuvo una emulsión. Los tubos se cubrieron con papel aluminio y se colocaron en una gradilla en baño maría a ebullición durante 45 minutos. Los tubos se sacaron e inmediatamente se sumergieron en agua con hielo hasta que las muestras se enfriaron completamente (5 a 10 minutos). A cada tubo se le agregaron 4 mL de tolueno y se agitaron de nuevo en un vortex. La fase superior, de color rojo, que se formó después de la agitación se separó de las muestras en un tubo nuevo y se procedió a realizar la lectura de absorbancia a 520 nm en un espectrofotómetro UV/Visible (Evolution 300, Thermo Electron Corporation), con una curva de calibración utilizando L-prolina (Sigma). La cantidad de prolina se calculó con una curva estándar que se obtuvo con concentraciones conocidas de prolina y se utilizó como solvente el ácido sulfosalicílico al 3 %.

6.4.2. Cuantificación de carbohidratos solubles: glucosa, fructosa y sacarosa

Para la extracción de los carbohidratos solubles se pesaron 50 mg de radículas y se colocaron en tubos de ensayo en una gradilla con 3 mL de alcohol al 80 % en baño maría a una temperatura de 70 °C durante 10 minutos, después se recolectó el sobrenadante y enseguida se agregaron 3 mL de alcohol a cada tubo y se repitió el proceso para extraer nuevamente y recolectar el sobrenadante, el procedimiento se realizó 5 veces, hasta que el tejido quedó decolorado.

Al final, el sobrenadante que contenía alcohol al 80 % y los extractos de los azúcares, se depositó en frascos de vidrio que se colocaron en la estufa a 50 °C hasta que el alcohol se evaporó completamente, los extractos de los azúcares solubles se resuspendieron en 500 µL de agua destilada y se colocaron en tubos eppendorf que se mantuvieron a -38 °C, hasta la lectura de los mismos. Para la lectura de los azúcares, se hicieron diluciones de las extracciones de Pinto Villa y Bayo Madero, ya que si se utilizaban como tal, resultaban valores altos, que quedaban fuera de la curva de calibración por lo tanto, se utilizó la dilución 1:25 que corresponde a 20 µL de la extracción original y 480 µL de agua destilada, para tener un volumen final de 500 µL. Los azúcares se cuantificaron de manera secuencial glucosa, fructosa y sacarosa, mediante curvas estándares de calibración preparadas previamente (Scholes *et al.*, 1996).

La técnica descrita anteriormente se basa en una serie de reacciones enzimáticas secuenciales de la glucólisis para convertir todos los azúcares solubles a glucosa-6-fosfato, que es el sustrato para la reacción final que genera NADH, el cual tiene una absorbancia máxima a una longitud de onda (λ) de 340 nm. Para hacer la curva estándar de calibración se pesaron 15 mg de cada uno de los azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa) los cuales se mezclaron y se disolvieron en 6 mL de agua destilada para obtener una concentración de 2.5 mg·mL⁻¹. A partir de esta solución se hicieron diluciones de 1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/50, 1/60, 1/70, 1/90, 1/100 y 1/00, ésta última sin azúcar (solo agua destilada), la proporción 1/10 corresponde a 990 µL de agua destilada y 10 µL de la mezcla de los azúcares, así para cada una de las proporciones hasta llegar a 1/100 (900 µl de agua destilada y

100 μL de la mezcla de azúcares). Para estas lecturas se utilizó un espectrofotómetro lector de microplacas (Multiskan Ascent, Labsystem, marca Thermo, USA) y una microplaca de 72 orificios donde se colocó la curva estándar de calibración y la mezcla, por muestra se utilizaron 200 μL de Hepes 100 mM pH 7.5 (Roche), 10 μL NAD 40 mM (Sigma), 10 μL ATP 100 mM pH 7.0 (Sigma) y 10 μL glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 0.05 U por 1 μL de amortiguador Hepes (Roche). Para la determinación de la glucosa, se agregaron 10 μL de la enzima hexoquinasa (0.05 U por 1 μL de amortiguador) y se dejó actuar durante 20 minutos, posteriormente se tomó la lectura a una longitud de onda de 340 nm. Para la fructosa, se agregaron 10 μL de PPGI (fosfoglucoisomerasa) 0.06 U por 1 μL de amortiguador y 20 minutos después se tomó la lectura. En el caso de la sacarosa, se agregaron 10 μL de la enzima invertasa (0.8 U por 1 μL de amortiguador), que se dejó actuar durante 20 minutos y después se tomó la lectura. Con los datos obtenidos se calcularon las concentraciones en $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso fresco.

6.4.3. Cuantificación de almidón

Una vez extraídos los azúcares solubles de la radícula, cada uno de los residuos sólidos se congelaron y posteriormente se utilizaron para la determinación del contenido de almidón a través de la medición de glucosa. Los residuos sólidos se molieron por separado en un mortero con nitrógeno líquido, se le adicionó 1 mL (1000 μL) de agua destilada y se colocó en tubos eppendorf con tapa de doble seguridad, los cuales se metieron a la autoclave durante 30 minutos a una

temperatura de 121 °C; para la digestión del almidón se tomó una alícuota de 100 μ L de la muestra, a la que se le adicionó 100 μ L del amortiguador MES 500 mM con pH 4.5 (Sigma), 50 μ L de α -amilasa (0.5 U de α -amilasa Sigma), por 1 μ L de amortiguador MES y 50 μ L de amiloglucosidasa (0.28 U de amiloglucosidasa) por 1 μ L de amortiguador (MES); la mezcla se incubó durante 4.5 h a una temperatura de 37 °C y después se mantuvo en congelación a -20 °C hasta la determinación del almidón.

El almidón se cuantificó a través de la medición de glucosa como sustrato en un espectrofotómetro lector de microplacas (Multiskan Ascent, Labsystem, marca Thermo, USA) con una absorbancia de 340 nm, donde se usó glucosa como estándar. Por cada muestra se utilizaron 200 μ L de Hepes 100mM pH 7.5 (Roche), 10 μ L NAD 40 mM (Sigma), 10 μ L ATP 100 mM pH 7.0 (Sigma) y 10 μ L glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 0.05 U por 1 μ L de amortiguador Hepes (Roche), 10 μ L de la dilución de la muestra y finalmente se agregaron 10 μ L de la enzima hexoquinasa 0.05 U por 1 μ L de amortiguador Hepes (Roche) se dejó que la enzima actuara durante 20 minutos y se tomó la lectura. Para conocer si existían diferencias significativas para cada una de las variables medidas, se realizó un análisis de varianza mediante el paquete SAS[®] 8.0. Las fuentes de variación consideradas fueron variedades y potenciales de agua y la interacción de ambos, el error experimental y el total, y se utilizó la prueba de comparación de medias de Tukey con una $\alpha = 0.05$ en los casos en que la prueba de F mostró significancia.

6.5. Resultados y discusión

6.5.1. Concentración de prolina en la radícula de Pinto Villa y Bayo Madero

Se observaron diferencias significativas en la concentración de prolina en la radícula, entre las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero, así como entre los tiempos de muestreo (24, 48 y 72 h) y entre los potenciales de agua (Ψ_A) evaluados; también las interacciones entre variedades por tiempo de muestreo (Var*Tm) y variedades por potencial de agua (Var* Ψ_A) resultaron estadísticamente significantes (Cuadro 8, Anexo 7).

Cuadro 8. Valores de significancia en la concentración del aminoácido prolina en la radícula de dos variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Factor de variación	gl	F _{tablasα}	F _{calculada}	Significancia
Variedad	1	115.58	<.0001	**
Tiempo de muestreo	2	5.66	0.0052	*
Ψ_A	2	175.02	<.0001	**
Var*Tm	2	3.33	<.0001	**
Var* Ψ_A	2	72.74	0.041	*
Tm* Ψ_A	4	3.06	0.021	*
Var*Tm* Ψ_A	4	11.49	<.0001	**

Var = Variedad, Ψ_A = Potencial de agua, Tm = Tiempo de muestreo, *Significativo, ** Altamente significativo, NS = No significativo.

La interacción variedad por potencial de agua (Var* Ψ_A) fue significativa, lo que indica que la concentración de prolina entre las variedades estudiadas estuvo

influenciada por el efecto de los diferentes Ψ_A -2.07, -1.29 y -0.27 MPa. En el Cuadro 9 (Anexo 25), se observa que la concentración de prolina se incrementó conforme el Ψ_A fue de mayor estrés.

Cuadro 9. Concentración de prolina ($\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes potenciales de agua (Ψ_A).

Variedad	Ψ_A (MPa)			Media
	-2.07	-1.29	-0.27	
Pinto Villa	691.57 a	436.21 b	317.29 c	481.69
Bayo Madero	486.85 b	278.16 cd	205.63 d	323.54

DMS = 74.59

Medias con distinta letra entre columnas son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). Ψ_A = Potencial de agua.

En los tres Ψ_A las diferencias fueron estadísticamente significativas entre las dos variedades, y fue en el Ψ_A de -2.07 MPa donde se alcanzaron los valores máximos de 691.57 y 486.85 $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$ en Pinto Villa y Bayo Madero respectivamente; mientras que los valores mínimos para ambas variedades fueron de 317.29 y 205.63 $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$ en el Ψ_A de menor estrés (-0.27 MPa). La dinámica de concentración y síntesis de prolina tuvo una marcada diferencia entre las dos variedades, lo que permite sustentar el hecho de que este aminoácido se concentra en mayores cantidades en condiciones limitantes de humedad, por lo que se puede inferir que Pinto Villa es una variedad resistente a la sequía por las altas concentraciones de este aminoácido en la radícula, con relación a Bayo Madero. Estos resultados coinciden con lo que se observó en raíces de plántulas de maíz cultivadas en vermiculita con bajos Ψ_A , donde el incremento en la

concentración de prolina (120 mmolar) fue progresivo con la disminución del Ψ_A - 1.6 MPa (Voetberg y Sharp, 1991).

La prolina es uno de los solutos compatibles que se acumula en las plantas en mayor cantidad en condiciones de estrés, comparado con otros aminoácidos como la betaína, lo que indica que en estas condiciones la prolina es sintetizada en células fuente y transportada a células o tejidos de demanda que conforman la zona de elongación, usando energía proporcionada por compuestos orgánicos; mediante un método de trazado, se observó que la acumulación de prolina en condiciones de estrés no es por el incremento en la síntesis, ni por el catabolismo de la misma, sino por el aumento del transporte de prolina, previamente sintetizada en otras células de la planta (Verslues y Sharp, 1999).

Por otra parte, Frensch y Hsiao (1994) demostraron que en la raíz primaria de maíz (radícula), el movimiento de solutos hacia la epidermis provocó ajuste osmótico y el floema fue la primera fuente de estos solutos. Ogawa y Yamauchi (2006) observaron que la mayor concentración de prolina en la zona de elongación de la radícula se detectó en las primeras 24 h, en Ψ_A de -0.13 y -0.89 MPa, aunque concluyeron que en este caso la concentración de prolina no tuvo un papel significativo en el ajuste osmótico como soluto compatible.

El aumento en la acumulación de prolina se da en los primeros 2 mm del ápice de la raíz primaria de maíz (radícula) expuesta al estrés osmótico (Goring *et al.*, 1997). Existen evidencias de que la acumulación de prolina depende de los

niveles de carbohidratos como la sacarosa (Hare y Cress, 1997). Sharp *et al.* (1990), mostraron que el ajuste osmótico ocurre debido a un incremento en la acumulación de prolina en la raíz primaria (radícula) de plántulas de maíz y juega un papel importante en el mantenimiento de la elongación de la radícula a Ψ_A bajos.

6.5.2. Concentración de carbohidratos en la radícula de Pinto Villa y Bayo Madero

No se observaron diferencias significativas en la concentración de carbohidratos solubles (glucosa + fructosa + sacarosa), entre las variedades Pinto Villa y Bayo Madero, pero entre los tres tiempos de muestreo y entre los tres potenciales de agua (Ψ_A) las diferencias si fueron significativas; mientras que las interacciones entre variedades por tiempo de muestreo (Var*Tm) y variedades por potenciales de agua (Var* Ψ_A) resultaron significantes estadísticamente (Cuadro 10, Anexo 8).

Cuadro 10. Valores de significancia en la concentración de carbohidratos solubles en la radícula de Pinto Villa y Bayo Madero.

Factor de variación	gl	F _{tablasca}	F _{calculada}	Significancia
Variedad	1	1.99	0.1628	NS
Tiempo de muestreo	2	23.37	<.0001	**
Ψ_A	2	133.74	<.0001	**
Var*Tm	2	8.58	0.0005	*
Var* Ψ_A	2	77.09	<.0001	**
Tm* Ψ_A	4	3.09	0.0209	*
Var*Tm* Ψ_A	4	4.61	0.0023	*

Var = Variedad, Ψ_A = Potencial de agua, Tm = Tiempo de muestreo, *Significativo, ** Altamente significativo, NS = No significativo.

En el Cuadro 11 (Anexo 26) se observa que la concentración de los azúcares solubles aumentó entre las 24 y 48 h disminuyendo posteriormente; la mayor concentración en Pinto Villa fue de 12.78 mg·g⁻¹pf y en Bayo Madero de 11.21 mg·g⁻¹pf.

Cuadro 11. Concentración de carbohidratos solubles (glucosa + fructosa + sacarosa) (mg·g⁻¹pf) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en las primeras 72 h de desarrollo.

Variedad	Tiempo (h)			Media
	24	48	72	
Pinto Villa	7.95 c	12.78 a	12.74 a	11.15
Bayo Madero	9.78 bc	11.21 ab	10.72 ab	10.57

DMS = 2.10

Medias con distinta letra entre columnas son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

La interacción entre variedades por potenciales de agua ($\text{Var} \times \Psi_A$), también resultó significativa, lo que demuestra que la concentración de los carbohidratos solubles varió de acuerdo al nivel de humedad en que se desarrolló la radícula de Pinto Villa y Bayo Madero (Cuadro 12; Anexo 27).

En el Cuadro 12 se muestra una variación estadísticamente significativa en la concentración de carbohidratos entre los (Ψ_A) en la variedad Pinto Villa, ya que en el Ψ_A de menor estrés (-0.27 MPa) se concentraron $8.20 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ pf}$ de carbohidratos solubles, mientras que en el Ψ_A intermedio (-1.29 MPa) la concentración disminuyó ($6.77 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ pf}$).

Cuadro 12. Concentración de carbohidratos solubles (glucosa + fructosa + sacarosa) ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ pf}$) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes potenciales de agua (Ψ_A).

Variedad	Ψ_A (MPa)			Media
	-2.07	-1.29	-0.27	
Pinto Villa	18.49 a	6.77 c	8.20 c	11.15
Bayo Madero	12.33 b	13.03 b	6.35 c	10.57

DMS = 2.10

Medias con distinta letra entre columnas son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$), Ψ_A = Potencial de agua.

Sin embargo, la concentración más alta se presentó en el Ψ_A de mayor estrés con un total de $18.49 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ pf}$ el cual fue estadísticamente diferente y superior a Bayo Madero; ésta última variedad tuvo los valores más altos de carbohidratos en la

radícula en el Ψ_A de -1.29 MPa con un total de 13.03 mg·g⁻¹·pf, mientras que en el Ψ_A de -2.07 MPa los carbohidratos disminuyeron ligeramente (Cuadro 12).

En (Cuadro 13, Anexo 9) se observa que en la concentración de glucosa no hubo diferencias significativas entre las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero, pero sí entre los tiempos de muestreo (24, 28 y 72 h), entre los potenciales de agua (-2.07, -1.29 y -0.27 MPa); así como las interacciones entre variedades por tiempo de muestreo (Var*Tm) y variedades por potencial de agua (Var* Ψ_A) fueron significantes estadísticamente.

Cuadro 13. Valores de significancia en la concentración de glucosa en dos variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Factor de variación	gl	F _{tablasα}	F _{calculada}	Significancia
Variedad	1	0.02	0.9020	NS
Tiempo de muestreo	2	41.00	<.0001	**
Ψ_A	2	15.50	<.0001	**
Var*Tm	2	5.09	<.0001	**
Var* Ψ_A	2	15.10	0.0051	*
Tm* Ψ_A	4	5.49	0.0006	*
Var*Tm* Ψ_A	4	2.28	0.0691	NS

Var = Variedad, Ψ_A = Potencial de agua, Tm = Tiempo de muestreo, *Significativo, ** Altamente significativo, NS = No significativo.

En el Cuadro 14 (Anexo 28), se observa que la concentración de glucosa en Pinto Villa en el Ψ_A de menor estrés (-0.27 MPa) tuvo valores de 3.64 mg·g⁻¹·pf y fue disminuyendo conforme el Ψ_A disminuyó o correspondió a mayor estrés (-2.07 MPa) llegando a valores de 2.12 mg·g⁻¹·pf, comportamiento diferente a Bayo

Madero en donde la concentración más alta de este azúcar se tuvo en el Ψ_A intermedio (-1.29 MPa) con valores máximos de $3.30 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{pf}$, el cual no fue igual al de Pinto Villa en ese Ψ_A ; a su vez en el Ψ_A de -2.07 MPa la concentración de carbohidratos en Bayo Madero al igual que en Pinto Villa disminuyó teniendo un total de $2.76 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{pf}$.

Cuadro 14. Concentración de glucosa ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{pf}$) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes potenciales de agua (Ψ_A).

Variedad	Ψ_A (MPa)			Media
	-2.07	-1.29	-0.27	
Pinto Villa	2.12 c	3.30 ab	3.64 a	3.02
Bayo Madero	2.76 bc	3.30 ab	3.05 ab	3.03

DMS = 0.75

Medias con distinta letra entre columnas son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). Ψ_A = Potencial de agua.

En el Cuadro 15 (Anexo 29) se observa que la mayor concentración de glucosa en Pinto Villa y Bayo Madero se tuvo a las 24 h y fue estadísticamente diferente entre las dos variedades con valores de 4.36 y $3.56 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{pf}$ respectivamente, disminuyendo posteriormente conforme transcurrió el tiempo de muestreo.

Cuadro 15. Concentración de glucosa ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en las primeras 72 h de desarrollo.

Variedad	Tiempo (h)			Media
	24	48	72	
Pinto Villa	4.36 a	2.18 c	2.52 c	3.02
Bayo Madero	3.56 b	3.32 b	2.23 c	3.03

DMS = 0.75

Medias con distinta letra entre columnas son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

Entre las dos variedades estudiadas la concentración de fructosa en la radícula no mostró diferencias significativas, mientras que entre los tres tiempos de muestreo y entre los tres potenciales de agua resultaron significantes estadísticamente y en las interacciones entre variedad por tiempo de muestreo (Var*Tm) y variedad por potencial de agua (Var* Ψ_A) las diferencias sí fueron significativas (Cuadro 16, Anexo 10).

Cuadro 16. Valores de significancia en la concentración de fructosa en la radícula de dos variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Factores de variación	gl	F_{tablas}	$F_{\text{calculada}}$	Significancia
Variedad	1	0.16	0.6871	NS
Tiempo de muestreo	2	81.44	<.0001	**
Ψ_A	2	13.35	<.0001	**
Var*Tm	2	37.98	<.0001	**
Var* Ψ_A	2	3.88	0.0250	*
Tm* Ψ_A	4	6.88	<.0001	**
Var*Tm* Ψ_A	4	5.54	0.0006	*

Var = Variedad, Ψ_A = Potencial de agua, Tm = Tiempo de muestreo, *Significativo, ** Altamente significativo, NS = No significativo.

En el Cuadro 17 y en el Anexo 30, se observa que la concentración más baja de fructosa se presentó en ambas variedades en el Ψ_A de -2.07 MPa con valores de 2.90 y 3.39 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$ en Pinto Villa y Bayo Madero respectivamente; en el potencial de agua intermedio (-1.29 MPa) la concentración de fructosa aumentó en ambas variedades y en el potencial de -0.27 MPa los valores de concentración disminuyeron en ambas variedades.

Cuadro 17. Concentración de fructosa ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes potenciales de agua (Ψ_A).

Variedad	Ψ_A (MPa)			Media
	-2.07	-1.29	-0.27	
Pinto Villa	2.90 c	4.33 a	3.75 ab	3.66
Bayo Madero	3.39 bc	3.83 ab	3.58 abc	3.60

DMS = 0.74

Medias con distinta letra entre columnas son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). Ψ_A = Potencial de agua.

En el Cuadro 18 (Anexo 31) se observa que la mayor concentración de fructosa en las dos variedades se tuvo a las 24 h; Pinto Villa con 5.49 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$ y Bayo Madero con 4.36 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$, posteriormente la concentración de fructosa disminuyó conforme transcurrió el tiempo principalmente en Bayo Madero alcanzando hasta valores de 2.30 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$ a las 72 h; en cambio en Pinto Villa también disminuyó la concentración a las 48 h y a las 72 h mostró un ligero incremento.

Cuadro 18. Concentración de fructosa ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero durante las primeras 72 h de desarrollo.

Variedad	Tiempo (h)			Media
	24	48	72	
Pinto Villa	5.49 a	2.38 cd	3.11 c	3.66
Bayo Madero	4.36 b	4.13 b	2.30 d	3.60

DMS = 0.74

Medias con distinta letra entre columnas son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

La concentración de sacarosa en la radícula mostró diferencias significativas entre las variedades, entre los tres tiempos de muestreo y entre los tres potenciales de agua (Ψ_A), las interacciones entre variedad por tiempo de muestreo (Var*Tm) y variedad por potencial de agua (Var* Ψ_A) resultaron estadísticamente significantes (Cuadro 19, Anexo 11).

Cuadro 19. Valores de significancia en la concentración de sacarosa en la radícula de dos variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Factor de variación	gl	F_{tablas}	$F_{\text{calculada}}$	Significancia
Variedad	1	11.04	0.0014	*
Tiempo de muestreo	2	238.34	<.0001	**
Ψ_A	2	32.23	<.0001	**
Var*Tm	2	181.05	<.0001	**
Var* Ψ_A	2	14.48	<.0001	**
Tm* Ψ_A	4	5.73	0.0005	*
Var*Tm* Ψ_A	4	10.42	<.0001	**

Var = Variedad, Ψ_A = Potencial de agua, Tm = Tiempo de muestreo, *Significativo, ** Altamente significativo, NS = No significativo.

En el Cuadro 20 (Anexo 32) la concentración de sacarosa fue alta en el potencial de -0.27 MPa en Pinto Villa y Bayo Madero con valores de 5.34 y 4.09 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$ respectivamente, y disminuyó conforme el Ψ_A varió hacia mayor estrés (-1.29 y -2.07 MPa) en ambas variedades; también en el potencial de agua intermedio (-1.29 MPa) las diferencias en la concentración de sacarosa fueron significantes estadísticamente entre las dos variedades.

Cuadro 20. Concentración de sacarosa ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes potenciales de agua (Ψ_A).

Variedad	Ψ_A (MPa)			Media
	-2.07	-1.29	-0.27	
Pinto Villa	2.92 c	5.15 a	5.34 a	4.47
Bayo Madero	3.62 bc	4.07 b	4.09 b	3.92

DMS = 0.82

Medias con distinta letra entre columnas son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). Ψ_A = Potencial de agua.

La concentración de sacarosa mostró un comportamiento inconsistente a través de los tiempos de muestreo, en Pinto Villa la concentración fue alta a las 24 h (8.64 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) y disminuyó considerablemente a las 48 h, mostrando un ligero incremento a las 72 h, en tanto que en Bayo Madero, donde los valores más altos de la concentración se tuvieron a las 48 h (5.57 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) y disminuyó posteriormente hasta 1.81 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$ a las 72 h, las diferencias significativas de la concentración de sacarosa entre las variedades se observaron a las 24 y 48 h (Cuadro 21; Anexo 33).

Cuadro 21. Concentración de sacarosa ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero durante las primeras 72 h de desarrollo.

Variedad	Tiempo (h)			Media
	24	48	72	
Pinto Villa	8.64 a	2.21 d	2.56 d	4.47
Bayo Madero	4.40 c	5.57 b	1.81 d	3.92

DMS = 0.82

Medias con distinta letra entre columnas son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

La concentración del almidón en la radícula no mostró diferencias estadísticas entre las variedades y la interacción entre variedades por potenciales de agua ($\text{Var} \cdot \Psi_A$) no fue estadísticamente significativa, pero sí se observaron diferencias significativas entre los tiempos de muestreo y entre los potenciales de agua; y la interacción entre variedades por tiempo de muestreo ($\text{Var} \cdot \text{Tm}$) si fue significativa estadísticamente (Cuadro 22, Anexo 12).

Cuadro 22. Valores de significancia en la concentración de almidón en la radícula de dos variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Factor de variación	gl	F_{tablas}	$F_{\text{calculada}}$	Significancia
Variedad	1	0.12	0.7273	NS
Tiempo	2	39.53	<.0001	**
Ψ_A	2	4.35	0.0164	*
$\text{Var} \cdot \text{Tiem}$	2	40.82	<.0001	**
$\text{Var} \cdot \Psi_A$	2	0.94	0.3956	NS
$\text{Tiem} \cdot \Psi_A$	4	4.62	0.0022	*
$\text{Var} \cdot \text{Tiem} \cdot \Psi_A$	4	5.68	0.0005	*

Var = Variedad, Ψ_A = Potencial de agua, Tiem = Tiempo, *Significativo, ** Altamente significativo, NS = No significativo.

La concentración de almidón en la radícula de ambas variedades (Cuadro 23; Anexo 34) tuvo un comportamiento diferente entre ellas, ya que en Pinto Villa, la cantidad de almidón se incrementó conforme transcurrió el tiempo de muestreo; a las 72 h mostró la concentración más alta ($7.60 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$); sin embargo en Bayo Madero el valor más alto se tuvo a las 24 h ($7.55 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) y a las 48 h tuvo un decremento importante, pero volvió a aumentar a las 72 h alcanzando un valor similar a lo observado a las 24 h.

Cuadro 23. Concentración de almidón ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero durante las primeras 72 h de desarrollo.

Variedad	Tiempo (h)			Media
	24	48	72	
Pinto Villa	4.45 c	5.81 b	7.60 a	5.95
Bayo Madero	7.55 a	3.45 c	7.12 a	6.03

DMS = 1.27

Medias con distinta letra entre columnas son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

De los resultados anteriores, se evidencia que existe variación en el contenido de carbohidratos solubles así como de almidón entre variedades por potenciales de agua ($\text{Var}*\Psi_A$) y entre variedades por tiempos de muestreo ($\text{Var}*T_m$). El total de los carbohidratos solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) se concentraron en mayor cantidad en el Ψ_A de mayor estrés (-2.07 MPa) en Pinto Villa (Cuadro 12, Figura 1), mientras que en Bayo Madero fue en el Ψ_A intermedio (-1.29 MPa).

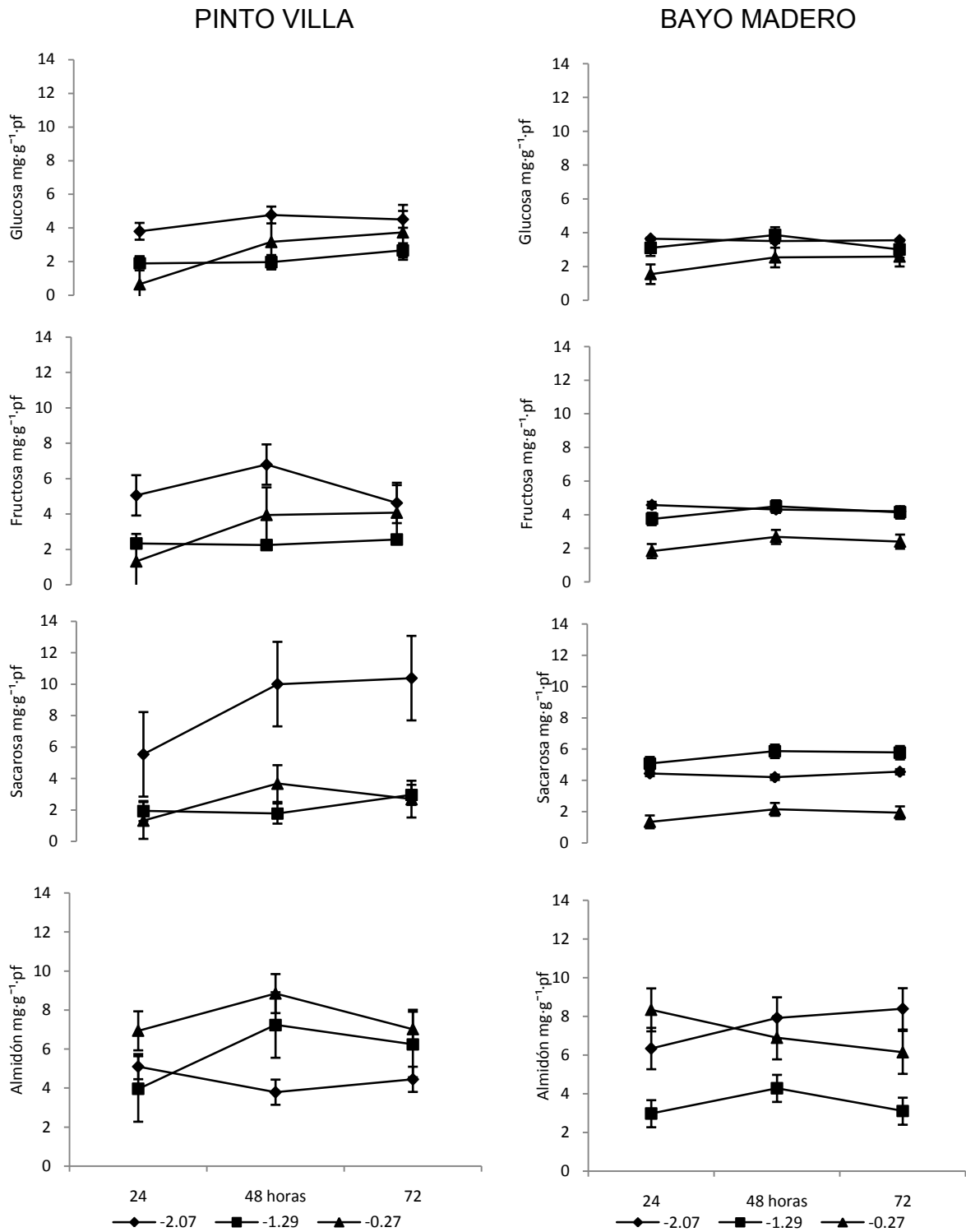


Figura 1. Concentración de carbohidratos solubles: glucosa, fructosa y sacarosa, y almidón ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{pf}$) en la radícula de Pinto Villa y Bayo Madero desarrollada en tres potenciales de agua (Ψ_A) (MPa), durante la primeras 72 h.

En la Figura 1, se observa que Pinto Villa tuvo valores numéricamente mayores que Bayo Madero en la concentración de glucosa, fructosa y sacarosa en el Ψ_A de -2.07 MPa, y en el caso de almidón Bayo Madero fue superior a Pinto Villa además, la sacarosa se concentró en mayor cantidad en Pinto Villa variedad de frijol considerada como resistente a la sequía, con respecto a Bayo Madero que es susceptible; los demás azúcares variaron en su concentración en los diversos Ψ_A estudiados. En general, en las dos variedades los tres azúcares solubles alcanzaron su concentración más alta a las 48 h después de aplicados los tratamientos de humedad y posteriormente tendió a estabilizarse y en algunos casos se incrementó a las 72 h. En Pinto Villa, la concentración de almidón y sacarosa fue alta en comparación con los demás azúcares. Lo anterior coincide con lo observado por Meier *et al.* (1982) quienes señalan que después de 48 h de iniciada la germinación los carbohidratos solubles aumentan en todas las estructuras de la plántula de “caupí” *Vigna sesquipedalis*. El comportamiento descrito, también coincide con lo observado por Nayer y Reza (2008) en dos variedades de maíz, donde la concentración de azúcares solubles se incrementó en la raíz y en el vástago cuando se tuvo un Ψ_A de -1.76 MPa, mientras que el almidón disminuyó, por lo que la alta concentración de azúcares puede ser el resultado del desdoblamiento del almidón a moléculas más simples, por lo que éste juega un papel muy importante en la acumulación de azúcares en la célula (Patakas y Noitsakis, 2001).

Los resultados de este trabajo coinciden con lo que reportan Hoesktra *et al.* (2001), quienes mencionan que la acumulación de azúcares solubles como la sacarosa, glucosa y fructosa, está relacionada con la tolerancia a sequía en las plantas. A este respecto, se sabe que la concentración de glucosa y fructosa en la pared celular de la hoja o vacuola en plantas de papas transgénicas, estuvo asociado con la acumulación de prolina y almidón, con la inhibición de la fotosíntesis y con el incremento de la respiración, respuestas que se relacionaron con síntomas del estrés de agua (Scholes *et al.*, 1996).

En una variedad de chícharo (*Pisum sativum*) parte del almidón almacenado en los cotiledones disminuyó gradualmente entre el cuarto y décimo días después de la siembra y, posteriormente disminuyó a un ritmo constante a partir del día 16; en ambos casos la actividad de la enzima α -amilasa empezó a manifestarse en forma significativa después del cuarto día (Monerri *et al.*, 1986). Sin embargo, existen indicios de que la actividad de la α -amilasa aparece primero en asociación con la degradación del almidón y es sintetizada nuevamente en algunos casos (Hirasawa, 1989). Kigel y Galili (1995) mencionan que la semilla madura almacena, además de carbohidratos, proteínas y lípidos que son desdoblados durante la germinación para proveer energía para la síntesis de sustratos y para el desarrollo y crecimiento de las plántulas. Los carbohidratos constituyen el principal componente del material de reserva de muchas semillas que además incluyen azúcares solubles de bajo peso molecular, oligosacáridos, polisacáridos y almidón de la pared celular.

Los azúcares solubles, especialmente la sacarosa, se depositan en semillas, polen y en los tejidos vegetativos en las variedades tolerantes a sequía; en hojas deshidratadas de *Crasterostigma plantagineum*, la 2-octulosa acumulada se convierte a sacarosa, la que comprende 40 % de la biomasa (Oliver y Bewley, 1997). El estrés de agua induce varias modificaciones tempranas en el metabolismo del carbono y carbohidratos. En cotiledones de haba (*Vicia faba*), la sacarosa es el principal carbohidrato importado durante el desarrollo de la semilla. En los cotiledones, para ayudar a la síntesis del almidón la sacarosa es hidrolizada por dos enzimas, la invertasa alcalina y la sacarosa sintasa (Ross y Davies, 1992).

En la germinación de la cebada se observó que el contenido de glucosa y fructosa aumentó considerablemente hasta los 6 días después de la germinación a 20 °C y posteriormente comenzó a disminuir. En *Phaseolus vulgaris*, la actividad de la sacarosa-fosfato sintetasa (SPS) es afectada por la deshidratación, en parte por el cierre estomatal que conduce a un ciclo de Benson-Calvin lento (Vassey *et al.*, 1991) y la proporción de carbono es modificada a favor de la sacarosa y a la disminución del almidón en la etapa vegetativa (Vassey y Sharkey, 1989). Por consiguiente, la concentración de sacarosa aumenta en plantas de girasol y espinaca en condiciones de estrés de humedad (Fredeen *et al.*, 1991).

En dos especies de árbol de judea (*Cercis canadiensis* var. *canadiensis* y var. *mexicana*) en plántulas de dos años de edad, se observó que en condiciones de sequía y alta humedad, la sacarosa fue el carbohidrato soluble que tuvo la mayor concentración en las hojas, con relación a glucosa y fructosa, aun cuando la

concentración haya disminuido en el tratamiento de sequía, además se acumularon otros osmolitos como mioinositol, ononitol y pinitol, lo cual indica que la acumulación de diferentes osmolitos en plantas desarrolladas en estrés de sequía es común (Griffin *et al.*, 2004). El incremento en la concentración de sacarosa y hexosa se puede deber al aumento en la hidrólisis del almidón, que consiste en el rompimiento de los enlaces glicosídicos por una molécula de agua, para producir glucosa que después es utilizada en la respiración celular para producir energía y a la síntesis de sacarosa; además, se menciona que la acumulación de sacarosa y hexosa tiene un papel importante en el ajuste osmótico en las especies vegetales (Westgate y Boyer, 1985).

La sacarosa, es el principal producto fotosintético de las plantas superiores, además de que es la forma principal en que los carbohidratos son traslocados de los órganos fuente al resto de la planta, aporta carbono y energía a los órganos en desarrollo y es el carbohidrato de mayor presencia en algunas plantas, en órganos como hojas, ramas, tubérculos y frutos (Kruger, 1999); también es importante por su participación en la aclimatación de las plantas a ambientes de estrés causados por frío, salinidad o sequía (Lunn y Furbank, 1999). En base a los resultados anteriores, se puede concluir que la acumulación de prolina y de azúcares solubles principalmente la sacarosa, por la degradación del almidón son expresados en mayor cantidad en la variedad resistente a la sequía Pinto Villa, con respecto a la susceptible Bayo Madero, lo que sugiere que estos indicadores bioquímicos son confiables y que potencialmente se pueden utilizar como criterios

de selección de plantas resistentes al estrés hídrico en las primeras 72 h de desarrollo de la radícula.

La concentración de los carbohidratos en Pinto Villa y Bayo Madero fue diferente en cada uno de los Ψ_A aplicados en la radícula. En Pinto Villa se observó que la mayor concentración de sacarosa se tuvo con el Ψ_A de -1.29 y -0.27 MPa, mientras que la cantidad de almidón disminuyó durante el periodo de exposición a dichos tratamientos de humedad, esta respuesta se respalda con lo mencionado en otras investigaciones (Pelleschi *et al.*, 1997; Vu *et al.*, 1998), de que el desdoblamiento de almidón favorece las altas concentraciones de sacarosa en condiciones limitantes de humedad. En los Ψ_A -1.29 y -0.27 MPa la cantidad de los carbohidratos determinados fue diferente y menor con respecto a lo observado en el Ψ_A de -2.07 MPa, esta respuesta permite comprobar la capacidad que presenta Pinto Villa ante estas condiciones de estrés. Caso contrario sucedió en Bayo Madero, donde también se observó un incremento y disminución de sacarosa y almidón respectivamente en el Ψ_A de -1.29 MPa, pero los valores cuantificados fueron menores que en Pinto Villa, lo que evidencia la susceptibilidad de Bayo Madero al estrés de humedad.

6.6. Conclusiones

La concentración de prolina en la variedad Pinto Villa fue de $691.57 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$ en el Ψ_A de mayor estrés -2.07 MPa , mientras que en Bayo Madero fue de $486.85 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$ en el mismo tratamiento de humedad, lo cual indica que la presencia de este aminoácido en cantidades elevadas en la radícula de Pinto Villa esta relacionada con la exposición a un déficit de humedad en el suelo y con la respuesta propio de la variedad que se considera resistente a la sequía.

La concentración de almidón en la radícula de Pinto Villa disminuyó por el proceso de degradación y dió lugar a la síntesis y acumulación de azúcares solubles (sacarosa, glucosa y fructosa), principalmente en el Ψ_A más severo (-2.07 MPa) que tuvo una acumulación de azúcares de $18.49 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$, mientras que Bayo Madero tuvo $13.03 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$ en el potencial de -1.29 MPa , en los otros Ψ_A también, pero a diferentes niveles.

Las conclusiones previas dan fundamento para aceptar la hipótesis de que la variedad de frijol Pinto Villa muestra mayor capacidad de acumular solutos que protegen a las células de los órganos de las plantas y de esta forma tolerar condiciones de déficit hídrico en el sustrato, lo que le permite en estas 72 h continuar con su metabolismo, en comparación con Bayo Madero.

FASE III

7. EFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO EN LA CONCENTRACIÓN DE PROLINA, CARBOHIDRATOS SOLUBLES, ÁCIDO ASCÓRBICO Y ANTIOXIDANTES EN LAS HOJAS DE FRIJOL PINTO VILLA Y BAYO MADERO

7.1. Introducción

Con el estrés hídrico, los tejidos vegetales generan una acumulación activa de solutos para asegurar la sobrevivencia de las plantas (Attipalli *et al.*, 2004), uno de los principales solutos es la prolina, cuya síntesis se ha asociado con el mantenimiento de la turgencia de los tejidos para continuar con la función celular (Ramanjulu y Sudhakar, 2000). Este mecanismo de tolerancia al déficit de agua puede estar asociado con la acumulación de osmoprotectores como la prolina y los azúcares solubles.

La acumulación de azúcares solubles está relacionada con la adquisición de tolerancia a la sequía en las plantas (Hoekstra y Buitink, 2001). Leopold *et al.* (1994) mencionan que durante la sequía los azúcares protegen a las células mediante dos mecanismos: 1) los grupos hidroxilo de azúcares pueden sustituir al agua para mantener la interacción hidrofílica en las membranas y sus proteínas durante la deshidratación, por lo tanto, interactúan a través de los puentes de hidrógeno, lo que evita una desnaturalización de aquellas; 2) los azúcares son los principales contribuyentes para la vitrificación del citoplasma de las células, que es la formación de un “vidrio biológico” en el citoplasma de la célula deshidratada

(Buitink *et al.*, 1998). Nayer y Reza (2008) mencionan que la disminución del almidón con la inducción de plasmólisis puede reducir el volumen del citoplasma pero la acumulación de azúcares solubles puede contrarrestar el estrés osmótico.

En estudios realizados sobre la respuesta estomática por efecto de la restricción del agua, se reporta que los carbohidratos y otros metabolitos como la prolina, se acumulan en las plantas. Se tienen evidencias de que en maíz expuesto al estrés de humedad el contenido de carbohidratos se incrementó hasta 42 %, debido a que un déficit de agua puede inducir un aumento en el contenido de sacarosa, glucosa y fructosa en la hoja y en algunos casos solamente se incrementa la sacarosa o la hexosa (Pelleschi *et al.*, 1997).

La sequía no solo afecta el contenido de agua en los tejidos, sino que también induce el cierre estomático y en consecuencia ocasiona una disminución de la concentración de CO₂, de la tasa fotosintética y del crecimiento, así como de la acumulación de NADPH. Cuando el NADP es un factor limitante, el oxígeno actúa como un aceptor alternativo de electrones de la cadena transportadora de electrones del tilacoide, originando la formación de radicales superóxido (O₂⁻) (Camarena, 2006). El radical superóxido y su producto reductor peróxido de hidrógeno (H₂O₂) son compuestos potencialmente tóxicos que al combinarse y forman un radical altamente tóxico conocido como radical hidroxilo (OH[·]) (Sairam *et al.*, 1998), estos radicales se conocen como especies reactivas de oxígeno (EROS).

Las EROS provocan la peroxidación de los lípidos y por consecuencia, daño a las membranas, degradación de proteínas e inactivación de enzimas (Sairam *et al.*, 2005), lo que induce al estrés oxidativo. Genotipos tolerantes a la sequía presentan un sistema activo eficiente para protegerse del daño oxidativo. Los tejidos de las plantas poseen algunas enzimas antioxidantes para contrarrestar el daño causado por las especies reactivas de oxígeno: superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1), ascorbato peroxidasa (APX, EC 1.11.1.11) y catalasa (CAT, EC 1.11.1.6) y antioxidantes no enzimáticos como pigmentos, carotenoides y ácido ascórbico. Durante las condiciones de estrés por sequía la actividad de los antioxidantes está relacionada con bajos niveles de peroxidación de lípidos (Bowler *et al.*, 1992).

Un aumento de la capacidad metabólica de las enzimas antioxidantes puede ser parte de un sistema antioxidativo en plantas con la regulación de proteínas o la expresión de genes (Scandalios, 1993). Con base en la información anterior se planteo el siguiente objetivo de la investigación.

7.2. Objetivo

Evaluar el efecto del déficit hídrico sobre la concentración de solutos: prolina, carbohidratos solubles, ácido ascórbico y la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa resistente a la sequía y Bayo Madero susceptible, con el propósito de identificar indicadores confiables para selección por resistencia a estrés de humedad en programas de fitomejoramiento.

7.3. Hipótesis

El estrés de humedad provocará mayor concentración de prolina en las hojas de Pinto Villa que en las de Bayo Madero, lo que demostrará las diferencias en tolerancia a la sequía entre las dos variedades.

La variedad resistente al estrés de humedad, Pinto Villa, tendrá mayor concentración de sacarosa en las hojas, causada por la degradación del almidón, con respecto a Bayo Madero.

Los niveles de ácido ascórbico y la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa, serán mayores en la variedad Pinto Villa que en Bayo Madero, en condiciones limitantes de humedad, lo que justificará las diferencias en la resistencia al estrés hídrico entre ambas variedades.

7.4. Materiales y métodos

Para la obtención del material vegetal (hojas) de las variedades Pinto Villa y Bayo Madero, se procedió de la siguiente manera. El experimento se estableció en un invernadero de vidrio del Programa de Botánica en el Colegio de Postgraduados, en el periodo de Julio a Octubre del 2007, con temperatura promedio de 24 y 16 °C (día y noche) y humedad relativa de 54 y 76 % (día y noche). Se usaron recipientes de unicel con capacidad de 0.5 y 1 kg, el sustrato fue una mezcla de "Peat moss" y tierra negra (2:1) esterilizado. Los recipientes con capacidad de 0.5 kg se utilizaron para la siembra y desarrollo de las plantas hasta el periodo en que se presentaron las hojas simples, mientras que los recipientes de 1 kg se utilizaron para desarrollar plantas hasta el periodo en el que se presentaron la 1ª y 2ª hojas trifolioladas.

Para establecer los tratamientos de humedad a las plantas de frijol, previamente se obtuvo una curva de retención de humedad del sustrato, en el Laboratorio de Física de Suelos del Programa de Edafología, del Colegio de Posgraduados. Se determinaron las constantes de humedad: capacidad de campo (CC) mediante el método de la olla de presión y punto de marchitez permanente (PMP) por el método de la membrana; así, una humedad del sustrato de 50.7 % equivalió a un potencial de agua de -0.03 MPa y un 33.6 % de humedad del sustrato a -2.0 MPa.

Se aplicaron tres tratamientos de humedad: riego (humedad constante en el sustrato) (-0.03 MPa) durante el periodo de desarrollo de las hojas; sequía

(suspensión del riego) cuando las hojas de interés llegaron a su total expansión y se mantuvieron sin riego hasta que el sustrato llegó a PMP (-2.0 MPa), lo cual ocurrió a los 5 y 9 días en los recipientes de 0.5 y 1 kg respectivamente y el riego de recuperación (aplicación del riego, y 24 h después se realizó el muestreo); se consideraron cinco plantas para la obtención de material vegetal para cada una de las determinaciones bioquímicas, en los tres tipos de hojas analizadas (hojas simples, 1ª y 2ª hojas trifolioladas), en cada uno de los tratamientos de humedad.

Para las cuantificaciones de prolina, azúcares solubles y almidón en las hojas de ambas variedades, se siguió el mismo procedimiento descrito en la segunda fase del presente escrito; se realizaron cinco repeticiones de cada uno de los compuestos analizados.

El análisis estadístico consistió en un análisis de varianza mediante el paquete SAS® 8.0. Las fuentes de variación consideradas fueron variedades (Var), tratamientos de humedad (Trat Hum), la interacción Var x Trat Hum, el error experimental y el total. Se utilizó la prueba de comparación de medias de Tukey con una $\alpha = 0.05$, en los casos en que la prueba de F resultó significativa estadísticamente.

7.4.1. Cuantificación de la concentración de prolina y carbohidratos solubles: glucosa, fructosa, sacarosa y almidón

En todos los casos se consideró el mismo procedimiento utilizado para la determinación de estos compuestos en la radícula; aplicando el método de Bates (1973) para prolina y el de Scholes *et al.* (1996) para carbohidratos solubles.

7.4.2. Cuantificación de la concentración de ácido ascórbico

La cuantificación del contenido de ácido ascórbico se realizó con el método descrito por Foyer *et al.* (1983) con modificaciones basadas en el método de Kampfenkel *et al.* (1995). Para la determinación de ácido ascórbico, muestras de 100 mg de hojas previamente congeladas en nitrógeno líquido se maceraron en mortero con 1 mL de ácido perclórico (HClO_4) 1 M, el extracto se centrifugó a 11 000 g por 10 min. Para neutralizar la muestra, a 500 μL del sobrenadante se le agregó 100 μL del amortiguador de fosfato de sodio (120 mM) pH 7.6 y se ajustó el pH entre 4 y 5 con carbonato de potasio (K_2CO_2) 2.5 M. La mezcla neutralizada se centrifugó a 11 000 g por 10 min.

Para la cuantificación del ascorbato total, se tomaron 100 μL del sobrenadante de la mezcla neutralizada, 10 μL de DTT 50 mM y 140 μL del amortiguador de fosfato de sodio pH 7.6 (120 mM); la mezcla se dejó en oscuridad durante 30 min. La mezcla de reacción consistió de 200 μL de la solución anterior más 800 μL de

amortiguador de fosfato de sodio con pH 5.6. Posteriormente se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 265 nm antes y después de la adición de 20 μ L de ascorbato oxidasa 0.05 U (se monitoreó el decline hasta el final de la reacción) en un espectrofotómetro UV/Visible (Evolution 300, Thermo Electron Corporation). El blanco consistió en amortiguador de fosfato de sodio pH 5.6. La diferencia entre la absorbancia inicial (sin enzima) y la final (después de agregar la enzima) es el equivalente del contenido de ácido ascórbico multiplicado por el coeficiente de extinción del ácido ascórbico ($12.8 \text{ mm}\cdot\text{cm}^{-1}$).

7.4.3. Cuantificación de la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa

La cuantificación de la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa (APX: EC.1.11.1.11) se realizó por espectrofotometría siguiendo el método descrito por Nakano y Asada (1981) con modificaciones de Jiménez *et al.* (1997). Se maceraron 125 mg de muestra de tejido de hoja en nitrógeno líquido y se adicionaron 250 μ L del amortiguador de fosfato de sodio ($\text{NaHPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) 100 mM (pH 7.0), 1 mM de DTT y 5 mM de ácido ascórbico. Posteriormente se centrifugó a 11 000 g por 10 minutos a 4°C, el sobrenadante se utilizó para determinar la proteína soluble y para medir de forma inmediata la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa.

La actividad enzimática de la ascorbato peroxidasa se midió con la mezcla de reacción que contiene fosfato de potasio 50 mM (pH 7.0), ácido ascórbico 0.1 mM,

EDTA (1.72 mL) 0.1 mM, 60 μ L del extracto de la enzima y 220 μ L de H₂O₂ 2.7 mM de en un volumen final de 2 mL. El blanco consistió de 2 mL de amortiguador de fosfato de potasio 50 mM pH 7.0 sin ácido ascórbico ni EDTA, en un volumen final de 2 mL. La reacción se inició con la adición de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), se registró la reducción en la absorbancia por la oxidación del ácido ascórbico a 290 nm en un espectrofotómetro UV/Visible (Evolution 300, Thermo Electron Corporation), a intervalos de 20 segundos durante 5 minutos. Las soluciones amortiguadoras se mantuvieron en baño maría a una temperatura entre 25 - 30 °C. Para cuantificar la actividad de la ascorbato peroxidasa se usó el coeficiente de extinción de $\epsilon = 2.8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$. Se tomaron cinco repeticiones de cada tratamiento. Para conocer si existían diferencias estadísticas para cada una de las variables medidas, se hizo un análisis de varianza mediante el paquete SAS[®] 8.0. Las fuentes de variación consideradas fueron Variedades (Var), tratamientos de humedad (T hum), la interacción Var x T hum, el error experimental y el total. Se utilizó la prueba de comparación de medias de Tukey con una $\alpha = 0.05$.

7.5. Resultados y discusión

7.5.1. Concentración de prolina en las hojas de Pinto Villa y Bayo Madero

Se observaron diferencias estadísticas altamente significativas en la concentración de prolina entre las variedades Pinto Villa y Bayo Madero, entre los tratamientos de humedad (riego, sequía y riego de recuperación), entre las hojas analizadas (hojas simples, 1ª y 2ª hojas trifolioladas), así como también las interacciones entre variedad por tratamientos de humedad (Var*Thum) y variedad por tipo de hojas (Var*hojas) resultaron estadísticamente significativa (Cuadro 24, Anexo 13).

Cuadro 24. Valores de significancia de la concentración de prolina en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Factor de variación	gl	F _{tablasα}	F _{calculada}	Significancia
Variedad	1	46.06	<.0001	**
T hum	2	8.14	0.0006	*
Hojas	2	59.76	<.0001	**
Var*T hum	2	4.18	0.0192	*
Var*hojas	2	54.50	<.0001	**
T hum*hojas	4	3.12	0.0200	*
Var*T hum*hojas	4	4.57	0.0024	*

Var = Variedad, T hum = Tratamientos de humedad, *Significativo. ** Altamente significativo, NS = No significativo.

En el Cuadro 25, Anexo 35; se observa que la mayor concentración de prolina se tuvo en la 1ª hoja trifoliolada en ambas variedades; Pinto Villa tuvo una concentración mayor y superior a Bayo Madero con valores de 153.42 y 72.56

nmol·g⁻¹pf respectivamente; mientras que en la 2^a hoja trifoliolada la concentración de prolina en Pinto Villa disminuyó casi a la mitad de lo observado en la 1^a hoja; en Bayo Madero la concentración de prolina también disminuyó en la 2^a hoja trifoliolada, pero esta disminución fue menor que en Pinto Villa; en las hojas simples se tuvo en ambas variedades la concentración de prolina más baja.

Cuadro 25. Concentración de prolina (nmol·g⁻¹pf) en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Variedad	Hojas			Media
	Simples	1 ^a hoja trifoliolada	2 ^a hoja trifoliolada	
Pinto Villa	56.01 c	153.42 a	73.46 bc	94.29
Bayo Madero	56.70 c	77.56 b	66.24 b	66.83

DMS = 20.52

Medias con distinta letra entre columnas son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

En el Cuadro 26 (Anexo 36) se observa que en Pinto Villa la concentración más alta de prolina se presentó en el tratamiento de sequía con 109.02 nmol·g⁻¹pf, mientras que en el tratamiento riego de recuperación, ésta fue de 98.15 nmol·g⁻¹pf. En Bayo Madero el valor más alto de este aminoácido se tuvo en el tratamiento de riego de recuperación con 70.26 nmol·g⁻¹pf y en estos dos tratamientos de humedad la concentración de Prolina en Pinto Villa fue significativamente superior a la de Bayo Madero, en tanto que en el tratamiento testigo (riego) no se observaron diferencias estadísticas en la concentración de prolina entre las dos variedades.

Cuadro 26. Concentración de prolina ($\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes tratamientos de humedad.

Variedad	Tratamientos de humedad			Media
	Riego	Sequía	Rrecuperación	
Pinto Villa	75.72 b	109.02 a	98.15 a	94.29
Bayo Madero	62.79 b	67.45 b	70.26 b	66.83

DMS = 20.52

Medias con distinta letra entre columnas son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). Rrecuperación = Riego de recuperación.

Los resultados observados en la concentración de prolina en Pinto Villa indican, que esta variedad que es considerada como resistente al estrés hídrico, presenta una mayor acumulación de solutos en etapas más tempranas de desarrollo (primera hoja trifoliolada), con respecto a Bayo Madero (segunda hoja trifoliolada) lo cual se puede reflejar en la respuesta de tolerancia a la sequía de esa variedad.

Harsh (2003) menciona que la acumulación de prolina, en hojas de maíz en condiciones de estrés por humedad, actúa como agente osmótico para proteger a la planta de la desecación; además de que actúa como reserva de nitrógeno, que se utiliza posteriormente durante la rehidratación (Ramanjulu y Sudhakar, 2000). Lo mismo sucede en la radícula del maíz, donde la concentración de prolina se incrementa, especialmente cuando se desarrolla en sustratos con bajos potenciales de agua, ocasionando la mayor elongación de la radícula en condición de estrés hídrico lo que propicia una mayor exploración del sustrato (Bajji *et al.*, 2000); por lo que altas concentraciones de prolina en plántulas desarrolladas en estrés hídrico han sido consideradas como un buen indicador y un adecuado

criterio de selección de materiales tolerantes a la sequía (Ober y Sharp, 1994, Verslues y Sharp, 1999).

La concentración de prolina en las hojas a bajos potenciales de agua es causada por el incremento de la biosíntesis de este aminoácido aunado a su lenta oxidación en las mitocondrias (Rhodes *et al.*, 1986; Samaras *et al.*, 1995). En hojas de girasol (*Helianthus annuus*) de un mes de desarrollo en condiciones de estrés de humedad a las cuales se les aplicó ácido abscísico (ABA), se hizo una determinación de prolina, bajo estas condiciones las hojas alcanzaron concentraciones de $92 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$ de prolina mientras que en las hojas del tratamiento testigo y en las de las plantas a las que se les aplicó riego de recuperación las concentraciones fueron menores con $71.4 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$ (Nieves *et al.*, 2001; Unyayar *et al.*, 2004) resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo en las hojas de frijol Pinto Villa en condiciones de sequía y en la primera hoja trifoliolada. Sin embargo, es importante mencionar que las concentraciones de éste aminoácido varían entre y dentro de especies, tal como se observó en la variedad susceptible al estrés hídrico Bayo Madero, donde la acumulación de prolina fue menor con respecto a Pinto Villa. Schellenberg *et al.* (1990) indican que la prolina ha sido asociada con la resistencia a sequía en cebada, así como Blum y Ebercon (1976) reportan que este aminoácido se acumula en hojas de sorgo en condiciones de estrés de humedad y está relacionado positivamente con la “resistencia de recuperación”, posiblemente porque sirve como una fuente de energía respiratoria en la recuperación de la planta. En hojas de mijo africano (*Eleusine coracana*) se observó un incremento de prolina en condiciones de estrés

de humedad y un aumento de la actividad de las enzimas ornitina aminotransferasa y pirrolina-5-carboxilasa reductasa, lo que indica que la síntesis de prolina ocurre debido al aumento de estas enzimas en condiciones de estrés por agua; por otra parte, la actividad de las enzimas responsables de la degradación de la prolina: prolina oxidasa y pirrolina-5-carboxilasa dehidrogenasa disminuyó marcadamente (Rajendra *et al.*, 1981). En plántulas de dos cultivares de maíz (704 y 301) de seis días de desarrollo en diferentes potenciales de agua, se determinó la concentración de prolina en la raíz y en el vástago, observándose un incremento en la concentración de este aminoácido conforme el estrés de humedad fue mayor, el cultivar 704 tuvo mayor acumulación que el cultivar 301, lo cual se atribuye a la regulación de la enzima degradante de la prolina (prolina dehidrogenasa PDH) en las plántulas en condiciones de estrés de humedad, así como a la regulación de la biosíntesis de la misma (Nayer y Reza, 2008).

La magnitud de la síntesis y acumulación de prolina depende de la presencia de carbohidratos, ya que éstos proporcionan el carbono precursor y el hidrógeno necesario para dicha síntesis en hojas de cebada (Stewart, 1978); aunado a lo anterior, Larher *et al.* (1993) mencionan que la sacarosa tiene efecto positivo en la acumulación de la prolina. En tres cultivares de frijol, “Dobrudjanski, Plovdid y Prelom”, se estudio el efecto del estrés de humedad en las hojas simples y primera hoja trifoliolada y se observó que los valores más bajos de la acumulación de prolina se dieron en el Ψ_A de -0.29 MPa en la hojas simples y en la primera hoja trifoliolada en un Ψ_A de -0.42 MPa en el cultivar “Dobrudjanski”, mientras que la mayor concentración de prolina se presentó en los otros dos cultivares, lo que

demuestra que el ajuste osmótico es un mecanismo adaptativo importante de *Phaseolus* como respuesta al estrés de humedad a éste respecto Zlatev (2006) menciona que las diferencias entre cultivares se debieron al mantenimiento de la turgencia que representa el estado fisiológico de los mismos.

La concentración de prolina tuvo una dinámica diferente en las hojas de Pinto Villa y Bayo Madero. En Pinto Villa la cantidad mayor se encontró en la primera hoja trifoliolada con el tratamiento de sequía, mientras que en la segunda hoja trifoliolada y hojas simples, fue menor. La respuesta de esta variedad es respaldada por lo que se ha mencionado a lo largo del presente escrito, de que Pinto Villa es una variedad resistente al estrés de humedad, aunque es importante mencionar que la concentración de este aminoácido en las hojas, fue menor que lo observado en la radícula de esta variedad. En Bayo Madero, el aumento de la síntesis y concentración de la prolina fue bajo, en comparación con Pinto Villa y la mayor cantidad se concentró en la segunda hoja trifoliolada, en los tres tratamientos de humedad y en particular en los tratamientos de riego y sequía se tuvieron concentraciones similares de prolina y fueron mas altos que el testigo (riego), también se comprueba de que ésta es una variedad susceptible al estrés hídrico por su lenta capacidad de respuesta ante estas condiciones.

7.5.2. Concentración de carbohidratos solubles y almidón en Pinto Villa y Bayo Madero

Se observaron diferencias significativas en la concentración de carbohidratos solubles (glucosa + fructosa + sacarosa) entre las variedades Pinto Villa y Bayo Madero y entre los tipos de hojas; la interacción entre variedades por tipo de hojas resultó significativa estadísticamente (Var*hojas) (Cuadro 27, Anexo 14).

Cuadro 27. Valores de significancia en la concentración de carbohidratos solubles en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Factor de variación	gl	F _{tablasα}	F _{calculada}	Significancia
Variedad	1	12.04	0.0009	*
T hum	2	2.38	0.0995	NS
Hojas	2	43.82	<.0001	**
Var*T hum	2	2.44	0.0946	NS
Var*hojas	2	0.69	0.5072	*
T hum*hojas	4	6.95	<.0001	**
Var*T hum*hojas	4	9.00	<.0001	**

Var = Variedad, T hum = Tratamientos de humedad, *Significativo. ** Altamente significativo, NS = No significativo.

La interacción variedad por tipo de hoja (Var*hojas) Cuadro 28 (Anexo 37), indica que la concentración de carbohidratos solubles varió entre los tres tipos de hojas en cada variedad; así la mayor concentración de carbohidratos solubles se presentó en la variedad Bayo Madero (2.57 mg·g⁻¹pf) en la primera hoja trifoliolada, la cual no mostró diferencias significativas con la de la variedad Pinto Villa (2.34 mg·g⁻¹pf); las concentraciones de carbohidratos disminuyeron en la

segunda hoja trifoliolada en ambas variedades teniéndose 2.25 mg·g⁻¹pf en Bayo Madero y 1.67 mg·g⁻¹pf en Pinto Villa; por otra parte, en las hojas simples se tuvieron las concentraciones más bajas de carbohidratos en las dos variedades estudiadas, sin que hubieran diferencias significativas entre ellas.

Cuadro 28. Concentración de carbohidratos solubles (glucosa + fructosa + sacarosa) (mg·g⁻¹pf) en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Variedad	Hojas			Media
	Simples	1ª hoja trifoliolada	2ª hoja trifoliolada	
Pinto Villa	0.86 d	2.34 a	1.67 bc	1.62
Bayo Madero	1.30 d	2.57 a	2.25 ab	2.04

DMS = 0.61

Medias con distinta letra entre columnas son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

Con respecto a la concentración de glucosa entre las variedades Pinto Villa y Bayo Madero se observaron diferencias significativas (Cuadro 29, Anexo 15), al igual que entre los tratamientos de humedad y entre el tipo de hojas estudiados; por otra parte las interacciones entre variedades por tratamientos de humedad (Var*Thum) y variedades por tipo de hojas (Var*hojas) no fueron significativas estadísticamente. De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis de varianza se observó que Bayo Madero tiene la capacidad de concentrar mayor cantidad de glucosa ya que mostró un valor medio de 0.94 mg·g⁻¹pf, mientras que en Pinto Villa solo fue de 0.66 mg·g⁻¹pf, es decir, que la concentración de este azúcar en Bayo Madero fue 1.5 veces mayor a Pinto Villa.

Cuadro 29. Valores de significancia de la concentración de glucosa en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Factor de variación	gl	F _{tablasca}	F _{calculada}	Significancia
Variedad	1	25.24	<.0001	**
T hum	2	3.14	0.0491	*
Hojas	2	54.71	<.0001	**
Var*T hum	2	2.81	0.0670	NS
Var*hojas	2	2.71	0.0731	NS
T hum*hojas	4	8.15	<.0001	**
Var*T hum*hojas	4	6.65	0.0001	*

Var = Variedad, T hum = Tratamientos de humedad, *Significativo. ** Altamente significativo, NS = No significativo.

En cuanto a la concentración de fructosa, solamente se observaron diferencias significativas entre el tipo de hojas y únicamente la interacción entre tratamiento de humedad por tipo de hoja resultó significativa, lo anterior significa que tanto Pinto Villa como Bayo Madero no mostraron cambios en la síntesis y concentración de este azúcar por efecto de los tratamientos de humedad en los tres tipos de hojas analizadas (Cuadro 30, Anexo 16).

Cuadro 30. Valores de significancia en la concentración de fructosa en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Factor de variación	gl	F _{tablas}	F _{calculada}	Significancia
Variedad	1	1.13	0.2906	NS
T hum	2	0.97	0.3558	NS
Hojas	2	33.98	<.0001	**
Var*T hum	2	1.64	0.2020	NS
Var*hojas	2	0.79	0.4595	NS
T hum*hojas	4	4.49	0.0027	*
Var*T hum*hojas	4	7.76	<.0001	**

Var = Variedad, T hum = Tratamientos de humedad, *Significativo. ** Altamente significativo, NS = No significativo.

La concentración de sacarosa por otra parte, mostró diferencias significantes entre las variedades estudiadas Pinto Villa y Bayo Madero, así como también la interacción entre las variedades por el tipo de hojas (Var*hojas) (Cuadro 31, Anexo 17) resultó estadísticamente significativa.

Cuadro 31. Valores de significancia en la concentración de sacarosa en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Factor de variación	gl	F _{tablas}	F _{calculada}	Significancia
Variedad	1	8.11	0.0057	*
T hum	2	2.50	0.0895	NS
Hojas	2	23.34	<.0001	**
Var*T hum	2	2.40	0.0975	NS
Var*hojas	2	7.60	0.0010	*
T hum*hojas	4	7.46	<.0001	**
Var*T hum*hojas	4	10.97	<.0001	**

Var = Variedad, T hum = Tratamientos de humedad, *Significativo. ** Altamente significativo, NS = No significativo.

En el Cuadro 32, Anexo 38; se puede observar que la concentración de sacarosa se presentó en la primera hoja trifoliolada en Pinto Villa (0.65 mg·g⁻¹pf) y disminuyó en la 2^a hoja trifoliolada; en Bayo Madero la mayor concentración de este azúcar soluble se tuvo en la segunda hoja trifoliolada (0.62 mg·g⁻¹pf); esta respuesta indica que las especies vegetales tienen una respuesta diferente en cuanto a la concentración de diversos metabolitos, aun cuando las condiciones ambientales de desarrollo sean similares.

Cuadro 32. Concentración de sacarosa (mg·g⁻¹pf) en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Variedad	Hojas			Media
	Simples	1 ^a hoja trifoliolada	2 ^a hoja trifoliolada	
Pinto Villa	0.23 c	0.65 a	0.49 ab	0.45
Bayo Madero	0.46 b	0.57 ab	0.62 ab	0.55
DMS = 0.16				

Medias con distinta letra entre columnas son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

En las variedades Pinto Villa y Bayo Madero se observaron diferencias estadísticas significativas en la concentración de almidón, entre los tipos de hojas y las interacciones variedad por hojas (Var*hojas) y variedad por tratamiento de humedad (Var*Thum) resultaron significantes (Cuadro 33, Anexo 18).

Cuadro 33. Valores de significancia de la concentración de almidón en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Factor de variación	gl	F _{tablas}	F _{calculada}	Significancia
Variedad	1	27.92	<.0001	**
T hum	2	2.33	0.1050	NS
Hojas	2	94.43	<.0001	**
Var*T hum	2	7.47	0.0011	*
Var*hojas	2	14.18	<.0001	**
T hum*hojas	4	23.33	<.0001	**
Var*T hum*hojas	4	5.82	0.0004	*

Var = Variedad, T hum = Tratamientos de humedad, *Significativo. ** Altamente significativo, NS = No significativo.

En el Cuadro 34 (Anexo 39), se observa que la concentración más alta de almidón se tuvo en la variedad Bayo Madero en los tratamientos de riego de recuperación y sequía con valores de 0.88 y 0.76 mg·g⁻¹·pf respectivamente, los cuales fueron significativamente diferentes y superiores a los valores obtenidos en Pinto Villa con valores de 0.53 y 0.42 mg·g⁻¹·pf en los mismos tratamientos de humedad ya que la concentración más alta de almidón en esta última variedad se mostró en el tratamiento testigo (riego) 0.67 mg·g⁻¹·pf.

Cuadro 34. Concentración de almidón ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes tratamientos de humedad.

Variedad	Tratamientos de humedad			Media
	Riego	Sequía	Rrecuperación	
Pinto Villa	0.67 abc	0.42 d	0.53 cd	0.54
Bayo Madero	0.66 bc	0.76 ab	0.88 a	0.76

DMS = 0.22

Medias con distinta letra entre columnas son estadísticamente diferentes (Tukey, $p\leq 0.05$). Rrecuperación = Riego de recuperación.

A su vez la concentración de almidón fue aumentando conforme se desarrolló la planta, por lo que los valores mas altos se tuvieron en la 2ª hoja trifoliolada en donde Bayo Madero tuvo $1.18 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$, mientras que Pinto Villa solo alcanzó a tener $0.69 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$ y en las hojas simples se tuvieron los valores más bajos en ambas variedades (Cuadro 35; Anexo 40).

Cuadro 35. Concentración de almidón ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Variedad	Hojas			Media
	Simple	1ª hoja trifoliolada	2ª hoja trifoliolada	
Pinto Villa	0.28 d	0.65 c	0.69 c	0.54
Bayo Madero	0.20 d	0.92 b	1.18 a	0.76

DMS = 0.22

Medias con distinta letra entre columnas son estadísticamente diferentes (Tukey, $p\leq 0.05$).

Fischer y Holl (1991) mencionan que el aumento en la concentración de azúcares puede ser resultado de la degradación del almidón almacenado, lo que tiene una función muy importante en la acumulación de azúcares solubles en las células; por

su parte, Patakas y Noistsakis (2001) indican que la degradación del almidón en hojas de vid fue notoria en respuesta al estrés de humedad. Sánchez *et al.* (2005) observaron altas concentraciones de glucosa y fructosa en la raíz y el vástago de plántulas de frijol desarrolladas en altas concentraciones de Nitrógeno (N). Medrano y Flexas (2001) mencionan que las triosas fosfato que no son usadas para la síntesis de sacarosa son utilizadas para producir almidón, que actúa como una sustancia de reserva de carbono. En trigo sensible a la sequía se han observado altas concentraciones de fructosa (Martin *et al.*, 1993), mientras que Kerepesi y Galiba (2000) observaron concentraciones similares de glucosa y fructosa en plántulas de trigo.

Estudios realizados en cultivares de manzana demuestran que el estrés por humedad induce la conversión de hexosas (monosacáridos: glucosa, galactosa y fructosa) y otros carbohidratos como sacarosa y almidón, en azúcares alcohol (polioles) y prolina (Wang *et al.*, 1996). En relación a la dinámica de concentración de los azúcares, Wang *et al.* (1995) señalan que una deficiencia de agua induce un incremento en el contenido de glucosa, fructosa y sacarosa en las hojas.

Por su parte Zinselmeier *et al.* (1995) mencionan que en algunos casos solo puede ser sacarosa o solo hexosas (glucosa y fructosa) como lo indican Keller y Ludlow (1993). Además de que el estrés de humedad generalmente induce cambios en la relación hexosa/sacarosa, que frecuentemente está relacionada con la degradación del almidón, por lo que este cambio de proporciones puede contribuir a la osmorregulación (Morgan, 1984). Nayer y Reza (2008) mencionan

que en dos genotipos de maíz (cultivar 704 y 301) se observó una alta concentración de azúcares solubles, al mismo tiempo que decreció la cantidad de almidón, esto significa que el aumento de azúcares solubles estuvo acompañada por un drástica disminución en la cantidad de almidón así como el bajo potencial de agua, dichos cambios favorecieron el aumento de la relación azúcares solubles/almidón en la raíz y el vástago de ambos cultivares, el cual sucedió en un Ψ_A de -1.71 MPa.

En hojas de plantas de maíz en condiciones de estrés de humedad se observó una disminución de la síntesis de sacarosa y aumento de la síntesis de degradación, lo que probablemente ocurrió por una inhibición parcial de la enzima sacarosa fosfato sintetasa (SPS) y la estimulación de la actividad de la enzima invertasa ácida (Pelleshi *et al.*, 1997).

7.5.3. Concentración de ácido ascórbico: antioxidante no enzimático en Pinto Villa y Bayo Madero

Se observaron diferencias significativas en la concentración de ácido ascórbico entre las variedades, entre los tratamientos de humedad, entre los tipos de hojas y las interacciones entre variedad por tratamientos de humedad (Var*Thum) y variedad por tipo de hoja (Var*hoja) fueron estadísticamente significantes (Cuadro 36, Anexo 19).

Cuadro 36. Valores de significancia de la concentración de ácido ascórbico en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Factor de variación	gl	F _{tablasα}	F _{calculada}	Significancia
Variedad	1	30.42	<.0001	**
T hum	2	7.12	0.0015	*
Hojas	2	47.12	<.0001	**
Var*T hum	2	7.50	0.0011	*
Var*hojas	2	28.08	<.0001	**
T hum*hojas	4	3.51	0.0112	*
Var*T hum*hojas	4	2.16	0.0516	NS

Var = Variedad, T hum = Tratamientos de humedad, *Significativo. ** Altamente significativo, NS = No significativo.

En el Cuadro 37 (Anexo 41) se observa que la menor concentración de ácido ascórbico en Pinto Villa se tuvo en el tratamiento testigo (riego) (369.94 $\mu\text{moles}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) y se incrementó en el tratamiento de sequía, pero la concentración más alta se tuvo en el tratamiento de riego de recuperación (601.95 $\mu\text{moles}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$); en relación a Bayo Madero el comportamiento fue diferente ya que la

concentración más alta se presentó con el tratamiento de sequía (393.08 $\text{mmoles}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) y en el riego de recuperación el contenido disminuyó a 330.42 $\text{mmoles}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$; las diferencias en concentración de ácido ascórbico entre las dos variedades fueron significantes en los tratamientos de sequía y riego de recuperación, siendo Pinto Villa superior a Bayo Madero.

Cuadro 37. Concentración de ácido ascórbico total ($\text{mmoles}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes tratamientos de humedad.

Variedad	Tratamientos de humedad			Media
	Riego	Sequía	Rrecuperación	
Pinto Villa	369.64 b	591.95 a	601.95 a	521.18
Bayo Madero	362.80 b	393.08 b	330.42 b	362.10
DMS=146.26				

Medias con distinta letra entre columnas son estadísticamente diferentes (Tukey, $p\leq 0.05$). Rrecuperación = Riego de recuperación.

En Pinto Villa el contenido de ácido ascórbico tuvo un incremento en los tratamientos de sequía y riego de recuperación de 60 y 62 % respectivamente en relación al testigo (riego), mientras que la variedad Bayo Madero solo tuvo un incremento del 8 % en el tratamiento de sequía con respecto al testigo y en el riego de recuperación no hubo respuesta.

En la interacción de variedades por tipo de hoja (Var*hojas) la concentración más alta de ácido ascórbico en Pinto Villa se presentó en la primera hoja trifoliolada (683.91 $\text{mmoles}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) la cual fue mayor y estadísticamente diferente a Bayo

Madero (229.34 $\text{mmoles}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$), en la segunda hoja trifoliolada la concentración de ácido ascórbico disminuyó ligeramente en Pinto Villa, pero también fue mayor y estadísticamente diferente a Bayo Madero la cual tuvo la concentración más alta en la segunda hoja trifoliolada de 565.54 $\text{mmoles}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$ (Cuadro 38; Anexo 42).

Cuadro 38. Concentración de ácido ascórbico total ($\text{mmoles}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Variedad	Hojas			Media
	Simples	1ª hoja trifoliolada	2ª hoja trifoliolada	
Pinto Villa	234.94 b	683.91 a	644.69 a	521.18
Bayo Madero	291.43 b	229.34 b	565.54 a	362.10

DMS = 146.26

Medias con distinta letra entre columnas son estadísticamente diferentes (Tukey, $p\leq 0.05$).

En la presente investigación las hojas simples tuvieron las concentraciones más bajas de ácido ascórbico en las dos variedades, entre las cuales no se observaron diferencias significativas, mientras que las concentraciones de la segunda hoja trifoliolada ocuparon un lugar intermedio entre las de las hojas simples y la 1ª hoja trifoliolada en la variedad Pinto Villa. Las concentraciones menores de ácido ascórbico se observaron en el tratamiento de riego en las dos variedades, mientras que en el caso del tratamiento de sequía y en el de riego de recuperación las concentraciones del antioxidante fueron mayores. Estos resultados son similares a los obtenidos por Bartoli *et al.* (1999) quienes encontraron diferencias significativas en la concentración de ácido ascórbico en hojas de trigo en un suelo con Ψ_A de -2.0 MPa, en el que los tratamientos de sequía y riego de recuperación

fueron superiores al testigo con 1990 y 2700 $\text{mmoles}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$, respectivamente. En una especie del mediterráneo (*Arbustus unedo* L.) “árbol de fresa” se observó que el contenido de ácido ascórbico se incrementó hasta en un 50% (17 a 32 $\text{mmoles}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en condiciones de estrés de humedad con respecto al control (Munné y Peñuelas, 2004).

En contraste, Bartoli *et al.* (2005), mencionan que en hojas de dos cultivares de trigo “Bug Chambergo (BCH)” y “Cooperativa Maipún (CM)” la mayor concentración de ácido ascórbico se mostró en condiciones de riego con valores promedio de 0.014 $\text{mmoles}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$, mientras que en sequía, las concentraciones de ácido ascórbico fueron menos de la mitad de las mostradas en el tratamiento de riego en ambos cultivares; lo que demuestra la capacidad de las plantas para acumular ácido ascórbico tanto en condiciones óptimas de humedad como de estrés. Este comportamiento estuvo influenciado por la actividad de la enzima L-galactona-1,4-lactona dehidrogenasa (GalLDH). A los 28 días de desarrollo de plantas de papa cultivadas *in vitro* (Atlantic y Alpha) con aplicaciones de ABA y a bajas temperaturas, se observó una concentración máxima de ácido ascórbico total en la variedad Atlantic de 0.3 y en Alpha de 0.2 $\text{mmoles}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$, con respecto a la concentración obtenida en plantas sin aplicación de ABA (Mora, 2007). Una de las funciones del ácido ascórbico es proteger a las células de las plantas del daño oxidativo, a través de la degradación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), esto mediado por la enzima ascorbato peroxidasa, que tiene una mayor afinidad con el

peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que la catalasa (CAT) o la peroxidasa (PX) Wang *et al.* (1999).

El ácido ascórbico participa en la remoción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como sustrato de la enzima ascorbato peroxidasa directamente reducido a radicales superóxido (O_2^-) y oxígeno (O_2) Foyer (1993). En Pinto Villa la mayor concentración de ácido ascórbico se mostró en la primera hoja trifoliolada mientras que en Bayo Madero fue en la segunda, lo que demuestra que las respuestas de las plantas a diversas condiciones de estrés varían aún dentro de la misma especie y en condiciones ambientales de desarrollo similares. Con base en lo anterior, se puede señalar que Pinto Villa que se considera una variedad resistente a la sequía, bajo condiciones de estrés severo tiene la capacidad de estimular la síntesis o concentración de ácido ascórbico en etapas más tempranas de desarrollo que Bayo Madero, que es una variedad susceptible.

7.5.4. Medición de la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa: antioxidante enzimático en Pinto Villa y Bayo Madero

La actividad de la enzima ascorbato peroxidasa, mostró diferencias significativas entre las variedades, entre los tratamientos de humedad, entre los tipos de hojas y significancia en las interacciones entre variedades por tipo de hoja (Var*hoja) y variedades por tratamientos de humedad (Var*Thum) (Cuadro 39, Anexo 20).

Cuadro 39. Valores de significancia de la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Factor de variación	gl	F _{tablas}	F _{calculada}	Significancia
Variedad	1	15.75	0.0002	*
T hum	2	59.33	<.0001	**
Hojas	2	6.01	0.0039	*
Var*T hum	2	2.99	0.0564	*
Var*hojas	2	5.71	0.0050	*
T hum*hojas	4	4.01	0.0054	*
Var*T hum*hojas	4	11.35	<.0001	**

Var = Variedad, T hum = Tratamientos de humedad, *Significativo. ** Altamente significativo, NS = No significativo.

En el Cuadro 40 (Anexo 43) que corresponde a la interacción de variedades por tratamientos de humedad (Var*T hum) se puede observar que la mayor actividad de esta enzima se observó en el tratamiento de sequía, en el que Pinto Villa tuvo una actividad superior estadísticamente a la observada en Bayo Madero (0.48 y 0.35 $\text{mmoles}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}\cdot\text{min}$ respectivamente, mientras que en los otros dos tratamientos de humedad la actividad enzimática fue menor en ambas variedades.

Cuadro 40. Actividad de la enzima ascorbato peroxidasa ($\text{mmoles}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}\cdot\text{min}$) en las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes tratamientos de humedad.

Variedad	Tratamientos de humedad			Media
	Riego	Sequía	Rrecuperación	
Pinto Villa	0.44 ab	0.48 a	0.31 c	0.41
Bayo Madero	0.30 c	0.35 bc	0.33 c	0.32

DMS = 0.10

Medias con distinta letra entre columnas son estadísticamente diferentes (Tukey, $p\leq 0.05$). Rrecuperación = Riego de recuperación.

Con respecto a la interacción de las variedades con el tipo de hojas (Cuadro 41; Anexo 44), la mayor actividad de la enzima ascorbato peroxidasa se observó en la segunda hoja trifoliolada la cual tuvo diferencias significativas entre las variedades estudiadas con valores de 0.55 y 0.51 $\text{mmoles}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}\cdot\text{min}$ en Pinto Villa y Bayo Madero, respectivamente, mientras que en la 1ª hoja trifoliolada y en las hojas simples la actividad de la enzima fue baja en ambas variedades.

Cuadro 41. Actividad de la enzima ascorbato peroxidasa ($\text{mmoles}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}\cdot\text{min}$) en las hojas de as variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Variedad	Hojas			Media
	Simples	1ª hoja trifoliolada	2ª hoja trifoliolada	
Pinto Villa	0.33 b	0.35 b	0.55 a	0.41
Bayo Madero	0.27 bc	0.19 c	0.51 b	0.32

DMS = 0.10

Medias con distinta letra entre columnas son estadísticamente diferentes (Tukey, $p\leq 0.05$).

Zlatev *et al.* (2006), mencionan que en tres cultivares de frijol, la actividad de las enzimas ascorbato peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa están involucradas en el escape de las plantas al daño por estrés oxidativo, confiriendo estabilidad a la membrana bajo condiciones de estrés de humedad, y que de acuerdo a este criterio dos de esos cultivares (Plovdiv 10 y Prelom) mostraron tolerancia y uno resultó sensible (Dobrudjanski). A su vez la actividad de la ascorbato peroxidasa en plantas de arroz fue similar en los tratamientos de humedad (riego y sequía) y se identificaron seis diferentes isoformas de APX no desnaturalizadas en geles de acrilamida, las cuales se expresaron dependiendo del nivel de estrés en que se encontraban las plantas (Srivalli *et al.*, 2003). Hojas de trigo de plantas expuestas a diferentes tratamientos de humedad riego, sequía y riego de recuperación, no se mostraron cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa y superóxido dismutasa, lo que indica que éstas enzimas pueden no estar involucradas en el control del daño de los radicales libres, sin embargo, la actividad de la ascorbato peroxidasa fue superior y estadísticamente significativa en el tratamiento de riego de recuperación en comparación con la de los otros dos tratamientos de humedad (Bartoli *et al.*, 1999).

Por otro lado, la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa en las hojas en dos cultivares de trigo “Bug Chambergo (BCH)” y “Cooperativa Maipún (CM)” fue mayor en condiciones de riego en el cv BCH ($0.729 \mu\text{moles}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{pf}\cdot\text{min}$) durante la etapa vegetativa (Bartoli *et al.*, 2005); así como en plántulas de dos cultivares de papa de 28 días de desarrollo, cultivadas *in vitro* con valores de 250 y 200 $\text{mmoles}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína en los cultivares Alpha y Atlantic respectivamente, ésto

en ambientes con bajas temperaturas y aplicaciones de ácido abscísico (ABA) (Mora, 2007). En cebada este comportamiento lo relacionan con la tolerancia a bajas temperaturas (Bravo *et al.*, 1998). Asada (1992) menciona que la enzima ascorbato peroxidasa (APX) es la principal enzima limpiadora de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en los cloroplastos y el citosol de las células de plantas bajo estrés. Ciertas modificaciones en los sistemas de degradación de las especies reactivas de oxígeno (EROS) en los cloroplastos se traducen en tolerancia al estrés oxidativo impuesto por diversos factores bióticos y abióticos (Pastori y Foyer, 2002). Diferentes isoformas de varias enzimas antioxidantes responden a diferentes condiciones de estrés y algunas de ellas solo se expresan cuando son necesarias para proteger algún compartimento de la célula (Tsang *et al.*, 1991).

En base a los resultados observados, se puede decir que existe variación entre la concentración de ácido ascórbico y la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa entre las variedades Pinto Villa y Bayo Madero en condiciones de estrés de humedad, por lo que se considera que la concentración y actividad de estos compuestos antioxidantes están influenciadas en gran medida por la duración y el tipo de estrés en que se estén desarrollando.

Se encontró una correlación alta entre el contenido de ácido ascórbico y la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa en la variedad de frijol Pinto Villa con $r = 0.81$, y en Bayo Madero de $r = 0.93$. Esta alta correlación indica que los dos

compuestos antioxidantes se incrementan a la par, los cuales son independientes uno de otro, y puede tener una explicación bioquímica, en el sentido de que el ácido ascórbico sirve como sustrato de la enzima ascorbato peroxidasa para degradar las especies reactivas de oxígeno, por lo tanto como se pudo observar en los resultados, la concentración del ácido ascórbico fue mayor que la actividad de la enzima lo que puede estar relacionado con las etapas tempranas de desarrollo de las hojas, en las que se cuantificaron estos antioxidantes, por lo tanto, la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa en las hojas fue baja con relación a la concentración de ácido ascórbico.

7.6. Conclusiones

La concentración mas alta del aminoácido prolina se tuvo en la primera hoja trifoliolada en la variedad Pinto Villa en el tratamiento de sequía, mientras que en Bayo Madero las concentraciones de prolina fueron menores, lo que puede significar que Pinto Villa tiene la capacidad de sintetizar prolina más temprano en el desarrollo de la planta y probablemente a tasas más altas que Bayo Madero y así contrarrestar el efecto de la sequía.

La concentración de carbohidratos solubles glucosa, fructosa, sacarosa y almidón, fue mayor en la variedad Bayo Madero que en Pinto Villa en la primera hoja trifoliolada, sin embargo las cantidades de cada uno de ellos variaron entre las variedades.

El carbohidrato que se concentró en mayor cantidad en ambas variedades fue la glucosa, posiblemente debido al desdoblamiento de la sacarosa a hexosas como la glucosa, lo que causó menores concentraciones de sacarosa en las hojas tanto de Pinto Villa como de Bayo Madero.

Pinto Villa sintetizó y concentró mayor cantidad de ácido ascórbico en la primera hoja trifoliolada en los tratamientos de sequía y riego de recuperación con respecto a Bayo Madero, lo que también puede estar relacionado con su respuesta de resistencia a la sequía.

La actividad de la enzima ascorbato peroxidasa en general tuvo valores similares en las dos variedades de frijol, pero en la variedad Pinto Villa la actividad fue mayor en la segunda hoja trifoliolada en los tratamientos de riego y sequía, mientras que en Bayo Madero la mayor concentración de la enzima se observó en los tratamientos de sequía y riego de recuperación.

Se observa que Pinto Villa mostró una respuesta de tolerancia al estrés de humedad relacionada con: las altas concentraciones de prolina, de ácido ascórbico y la mayor actividad de la enzima ascorbato peroxidasa, ésta última en el tratamiento de sequía con respecto a la variedad susceptible a la sequía Bayo Madero.

Bayo Madero fue estadísticamente diferente y superior a Pinto Villa, en la cantidad de carbohidratos solubles, lo cual puede significar que éstos eventualmente podrían estar siendo utilizados por la planta para sintetizar otros compuestos, ya que en algunas investigaciones se menciona que los carbohidratos también son utilizados como sustrato para sintetizar prolina en plantas bajo condiciones de estrés de humedad.

9. DISCUSION GENERAL

En el mejoramiento de la resistencia a la sequía en frijol el sistema radical juega un papel importante, sin embargo este órgano es poco estudiado en condiciones de campo por las dificultades intrínsecas de su estudio. De acuerdo con los resultados obtenidos en esta investigación, se puede señalar que la capacidad de elongación de la radícula en condiciones de estrés, podría servir como un indicador de la tolerancia de variedades de frijol a esta condición de humedad limitante. En este sentido la respuesta de Pinto Villa puede fundamentar la consideración de que es una variedad resistente al estrés hídrico en comparación con Bayo Madero. Al respecto, Subbaro *et al.* (1995) mencionan que una adecuada densidad de la raíz a través de los perfiles del suelo puede mejorar la absorción y disponibilidad del agua y nutrientes; Sponchiado *et al.* (1989) por su parte indican que la resistencia a la sequía de dos cultivares de frijol estuvo asociada con la profundidad de la raíz.

Una raíz profunda permitirá explorar capas del suelo más inferiores conforme la humedad de las capas superiores disminuye, mientras que variedades de raíz profusa con abundantes raíces secundarias y terciarias, como las del frijol indeterminado postrado (tipo III), permitirán explorar mayor volumen en suelos poco profundos como los que abundan en las principales regiones productoras en el altiplano semiárido (Acosta, 1994). Existe controversia en cuanto a que raíces profundas, que son ventajosas en condiciones de sequía terminal y suelos profundos, pudieran ser de bajo valor en suelos pobres en nutrientes y de poca

profundidad en donde raíces cortas y abundantes se consideran adecuadas (Ho *et al.*, 2005). Por otra parte, bajo condiciones de temporal y en áreas en las que el frijol se ha convertido en un monocultivo, como lo es en los estados de Zacatecas y Durango, el sistema radical debe ser resistente a los patógenos del suelo que causan las pudriciones de raíz, características que poseen ambos genotipos incluidos en este estudio (³Acosta, 2008). Además de las características de la raíz, la identificación de caracteres bioquímicos que estén relacionados a la respuesta de las especies vegetales que se desarrollan en condiciones de estrés (sequía, salinidad, altas y bajas temperaturas) es importante, ya que éstos podrían ser utilizados como criterios de selección en programas de fitomejoramiento.

El ajuste osmótico es el mecanismo principal que mantiene la turgencia de las células de las plantas bajo estrés por déficit de agua y es el resultado de la acumulación activa de compuestos que funcionan como osmorreguladores en la vacuola de las células, conocidos también como solutos compatibles dentro de los cuales se encuentran la prolina y los carbohidratos (Morgan, 1984). En algunas investigaciones se ha señalado que la acumulación de solutos favorece la absorción de agua; así como la turgencia de los tejidos, y por lo tanto el desarrollo de las plantas (Ludlow y Muchow, 1990; Turner, 1997). Voetberg y Sharp (1991) demostraron que en el ápice de la raíz del maíz y en el de frijol silvestre y domesticado se concentró mayor cantidad de prolina cuando las plántulas se mantuvieron en sustrato con Ψ_A de hasta -2.35 MPa (Sánchez *et al.*, 2003). En la presente investigación la concentración de prolina en la radícula de Pinto Villa fue

³ Comunicación personal

mayor y mostró diferencias estadísticamente significativas a la cuantificada en Bayo Madero en el Ψ_A de mayor estrés de -2.07 MPa; por lo que el incremento de éste aminoácido en Pinto Villa posiblemente dependa del aumento de la tasa de biosíntesis y disminución de la oxidación de la prolina en la mitocondria (Raymond y Smirnoff, 2002). Por otra parte, Lazcano y Lovatt (1999) mencionan que la acumulación de prolina puede ser un indicador del estado hídrico, pero no de la tolerancia o sensibilidad al déficit de agua. Investigaciones realizadas por (Bajji *et al.*, 2000) demuestran que el aumento de la concentración de prolina en maíz se lleva a cabo en gran medida en la raíz primaria, sobre todo cuando crece en sustratos con bajos Ψ_A , lo que provoca un incremento en su elongación y favorece una mayor exploración del suelo, por lo que concentraciones altas de prolina en plantas bajo estrés hídrico han sido consideradas como un criterio de selección de materiales tolerantes a la sequía (Ober y Sharp, 1994; Verslues y Sharp, 1999).

Respecto a los carbohidratos analizados en esta investigación (glucosa, fructosa, sacarosa y almidón) en la radícula, se observó que la sacarosa se concentró en cantidades mayores en comparación con los otros azúcares, y la concentración más alta correspondió con una menor cantidad de almidón, en los Ψ_A de -1.29 MPa y -0.27 en la variedad Pinto Villa con respecto a Bayo Madero, por tanto estos resultados concuerdan con los de otras investigaciones, en los que se ha observado que la concentración alta de sacarosa está relacionada con la disminución del almidón, ya que éste al desdoblarse a moléculas más sencillas da origen a la sacarosa (Pelleschi, 1997); Ramírez *et al.* (2005) mencionan que en la

raíz de plantas de jitomate en condiciones de estrés de humedad la concentración de azúcares solubles tuvo un aumento en glucosa, fructosa y sacarosa, siendo ésta última la que tuvo los valores más altos. En esta investigación también se observó que la prolina y los carbohidratos tuvieron mayor concentración en la primera hoja trifoliolada, así como en el tratamiento de estrés de humedad (sequía). La concentración de prolina entre las variedades fue significativamente diferente siendo Pinto Villa superior a Bayo Madero lo cual se pudo deber al transporte; tal como lo mencionan Tully y Hanson (1979), (Tully *et al.*, 1979) de que en hojas de cebada el contenido de prolina se incrementó considerablemente en la savia del floema en respuesta al estrés de humedad lo que podría representar una fuente de nitrógeno en las hojas; y Girousse *et al.* (1996) observaron en hojas de plantas de alfalfa en condiciones de estrés, un incremento en la concentración de prolina en la savia del floema hasta de 60 %. Uno de los principales solutos cuantificados durante el estrés de humedad es la prolina, cuya función ha sido asociada con el mantenimiento de la turgencia de los tejidos y con ello continuar con la función celular (Ramanjulu y Sudhakar, 2000).

Respecto a lo anterior varios investigadores indican que el incremento en el contenido de prolina es notorio cuando las plantas se encuentran en condiciones limitantes de humedad (Tully y Hanson, 1979), por lo que la concentración de prolina se inicia como respuesta a la adaptación de las plantas cuando son sometidas a estrés hídrico, además de que la acumulación de prolina tiene una importante contribución al ajuste osmótico en los cultivares de frijol que son resistentes a la sequía (Aspinall y Paleg, 1981; Andrade *et al.* 1995). Se ha

reportado que la concentración de prolina en hojas de plantas desarrolladas en estrés de humedad actúa como agente osmótico, protegiendo a la planta contra la desecación (Harsh, 2003) y también actúa como almacén de nitrógeno que posteriormente será utilizado durante la rehidratación (Ramanjulu y Sudhakar, 2000). En las hojas de las variedades estudiadas el azúcar que se concentró en cantidades mayores fue la glucosa, debido posiblemente a la acumulación de almidón en la planta que al desdoblarse a moléculas más sencillas como sacarosa, también se transformó a hexosas (glucosa y fructosa); otra explicación, sería que la sacarosa al ser el principal producto de la fotosíntesis, al estarse produciendo y no haber una fuerza de la demanda alta en la planta, se desdobra a las hexosas glucosa y fructosa. Otros autores (Pelleschi, 1997; Vu *et al.*, 1998) también mencionan que cuando las plantas se desarrollan en condiciones limitantes, las hexosas como la glucosa se concentran en las hojas.

Ramírez *et al.* (2005), mencionan que el aumento en la concentración de glucosa se puede explicar por un incremento en la movilización de las reservas como almidón y sacarosa, sin embargo, el aumento en los primeros días de transcurrido el estrés de humedad podría deberse solo a la hidrólisis del almidón, ya que los contenidos de fructosa no se modifican en las hojas de jitomate. En maíz se encontró que durante la sequía la actividad de la ADP-glucosa pirofosforilasa (enzima encargada de la hidrólisis del almidón) y de la invertasa ácida aumentan, lo que lleva a un incremento en las hexosas pero no en la sacarosa (Pelleschi, 1997). Por otra parte el ácido ascórbico y la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa son antioxidantes y tienen como función principal desintegrar las

especies reactivas de oxígeno que causan daño a las proteínas y a los lípidos de las membranas de las células en condiciones de estrés hídrico. La variedad Pinto Villa (resistente a la sequía) mostró la mayor concentración de ácido ascórbico en la primera hoja trifoliolada con respecto a Bayo Madero, mientras que la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa fue baja en las dos variedades con respecto a la concentración de ácido ascórbico; también se observó una correlación alta y positiva entre el contenido de ácido ascórbico y la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa en la variedad Pinto Villa ($r = 0.81$) en comparación con Bayo Madero ($r = 0.93$). Existen evidencias de que el ácido ascórbico es utilizado como sustrato de la enzima para así contrarrestar los efectos negativos de las especies reactivas de oxígeno, por lo tanto, se puede decir que las altas concentraciones de ácido ascórbico en la primera hoja trifoliolada, tiene efecto en la respuesta posterior de la planta en cuanto a la resistencia al estrés hídrico.

El ácido ascórbico como agente detoxificador puede actuar independientemente eliminando directamente al O_2^- , radicales hidroxilo y oxígeno simple (Noctor y Foyer, 1998). El ácido ascórbico también actúa como cofactor enzimático y donante de electrones para la regeneración de otros antioxidantes (Thomas *et al.*, 1992). En estudios realizados sobre el ajuste osmótico en leguminosas como el frijol común y el frijol tépari, se observó que éste último fue más tolerante a la sequía que el frijol común, ya que presentó un ajuste osmótico alto, por lo que recomiendan la transferencia de los genes de frijol tépari al frijol común con el fin de mejorar la resistencia a la sequía en éste último (Parsons y Howe, 1984). Por su parte Amede (1998) menciona que el ajuste osmótico es un importante

mecanismo de resistencia a sequía en las leguminosas. A su vez, Amede y Shurber (2003) mencionan que en leguminosas como el frijol común (*Phaseolus vulgaris*), haba (*Vicia faba*), chícharo (*Pisum sativum*) y garbanzo (*Cicer arietinum*) desarrolladas en suelos con un Ψ_A de -0.64 MPa se observó un incremento en la concentración de solutos principalmente azúcares y alcoholes de azúcar que contribuyeron un 50 % y algunos aminoácidos hasta 20% en todas las especies estudiadas, excepto en garbanzo. Es probable que en diversas regiones y con la utilización de diferentes tipos de frijol, las características que contribuyen a la adaptación a la sequía sean diferentes. Así, los materiales de la raza Durango como Pinto Villa han demostrado poseer características ventajosas bajo sequía (Rosales *et al.*, 2000) pero su sensibilidad al fotoperiodo lo hace inadecuado en regiones de latitud alta o en regiones tropicales.

En las regiones tropicales las variedades de la raza Mesoamericana son de mayor adaptación y ha sido posible su mejoramiento de la resistencia a la sequía en términos de producción (Beebe *et al.*, 2008). Por lo anterior, las condiciones ambientales de producción son importantes así como los genotipos y ambos deben tomarse en consideración al desarrollar nuevas variedades para condiciones ambientales particulares; así, variedades como Pinto Villa, de hábito indeterminado tipo III, muestran excelente adaptación en la región semiárida de altura de México (Acosta *et al.*, 1995) donde la lluvia es escasa y los suelos son poco profundos y pobres en contenido de materia orgánica.

10. CONCLUSIONES FINALES

La elongación de la radícula en plántulas de Pinto Villa fue mayor en relación a Bayo Madero, mientras que esta variedad resultó superior en la acumulación de biomasa, característica relacionada con su mayor tamaño de semilla y no con la adaptación a sequía. Con respecto a la acumulación de biomasa en la radícula solamente se observaron diferencias significativas entre Pinto Villa y Bayo Madero en los (Ψ_A) de -2.07 MPa y -0.16 MPa, en donde Bayo Madero fue superior a Pinto Villa. En cuanto a la concentración de prolina, Pinto Villa tuvo valores de 691.57 nmol·g⁻¹pf, los cuales fueron diferentes significativamente a los de Bayo Madero 486.85 nmol·g⁻¹pf en el (Ψ_A) de mayor estrés de -2.07 MPa.

En relación a los carbohidratos solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) la sacarosa tuvo una concentración alta en Pinto Villa en los (Ψ_A) de -1.29 y -0.27 MPa, la cual difirió estadísticamente de la concentración observada en Bayo Madero en los mismo potenciales. Se puede concluir que Pinto Villa mostró una mayor elongación de la radícula con respecto a Bayo Madero, así como una mayor concentración de solutos compatibles como prolina y carbohidratos solubles en el Ψ_A más bajo que corresponde a -2.07 MPa; de los carbohidratos el que se cuantificó en mayor cantidad fue la sacarosa, por lo tanto la variedad Pinto Villa tiene mayor capacidad de acumular solutos compatibles que protegen a las células de los órganos de las plantas y de esta forma tolerar condiciones de déficit hídrico en el sustrato.

La concentración de prolina fue mayor en el tratamiento de sequía y en la primera hoja trifoliolada en la variedad Pinto Villa, mostrando diferencias significativas con respecto a Bayo Madero; así como la concentración de ácido ascórbico en el tratamiento de sequía y en la primera hoja trifoliolada que también fue mayor en Pinto Villa y diferente significativamente a Bayo Madero. Lo que significa que Pinto Villa tiene la capacidad de sintetizar estos solutos compatibles en etapas más tempranas del desarrollo de la planta y probablemente a tasas más altas en comparación con la variedad de frijol Bayo Madero. A su vez, la mayor actividad de la enzima ascorbato peroxidasa fue mayor en el tratamiento de sequía y en la segunda hoja trifoliolada en Pinto Villa, difiriendo significativamente de Bayo Madero.

La concentración de los carbohidratos solubles (glucosa, fructosa, sacarosa) y almidón fue mayor en Bayo Madero y diferente significativamente a Pinto Villa en la primera hoja trifoliolada; sin embargo, las cantidades de cada uno de los azúcares cuantificados variaron entre ellos, por lo que se puede decir que en Bayo Madero, la glucosa se concentró en cantidades altas, posiblemente por el desdoblamiento de la sacarosa a hexosas como la glucosa, mientras que en Pinto Villa la sacarosa fue el azúcar que se concentró en mayor cantidad. El hecho de que la concentración de carbohidratos en las hojas de Pinto Villa hayan sido menores a los cuantificados en Bayo Madero y, que la concentración de prolina fue mayor en las hojas de Pinto Villa, se puede explicar considerando lo que mencionan (Hare y Cress, 1997) de que los carbohidratos son utilizados por la planta para sintetizar prolina bajo condiciones de estrés de humedad.

En base a todo lo anterior, se concluye que la variedad de frijol Pinto Villa que es considerada resistente a la sequía mostró niveles de expresión de algunos caracteres bioquímicos y fisiológicos relacionados con la respuesta a esas condiciones de desarrollo, con respecto a Bayo Madero que se considera susceptible, por lo tanto los caracteres que tuvieron una mejor expresión en Pinto Villa podrían ser utilizados como criterios de selección de variedades de frijol en programas de mejoramiento al estrés hídrico.

11. LITERATURA CITADA

- Acosta, G. J. A. 1982. Bayo Madero y Bayo Los Llanos. Nuevas variedades de frijol para el Norte Centro de México. Folleto Técnico Núm. 1. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Campo Experimental Valle del Guadiana. Durango, Dgo. México. 8 p.
- Acosta, G. J. A. 1994. Challenges in common bean research for biotechnology approaches. Perspectives from national programs: Mexico, In: Roca, W.M., J.E. Mayer, M.A. PastorCorrales & J. Tohme (Eds.), Proceedings of the Second International Scientific Meeting '*Phaseolus*' Bean Advanced Biotechnology Research Network, p.p. 12–24, CIAT, Cali, Colombia.
- Acosta G. J. A., I. Sánchez V., R. Ochoa M., A. Pajarito R., y F. Ibarra P. 1993. Pinto Villa, nueva variedad de frijol de temporal para el estado de Durango. Folleto Técnico Num. 3. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP). Centro de Investigación Regional del Norte y Centro. Campo Experimental Valle del Guadiana. Durango, Dgo. 16 p.
- Acosta J., R. Ochoa, M. Arrieta, F. Ibarra, A. Pajarito and I. Sánchez. 1995. Registration of Pinto Villa common bean. *Crop Science*. 35:1211.
- Ahmed S., E. Nawata, M. Hosokawa, Y. Domae and T. Sakuratani. 2002. Alterations in photosynthesis and some antioxidant enzymatic activities of mungbean subjected to waterlogging. *Plant Science*.163:117-123.
- Akmal M., and T. Hirasawa. 2004. Growth responses of seminal roots of wheat seedlings to a reduction in the water potential of vermiculite. *Plant and Soil*. 267:319-328.
- Al-Karaki G. N., R. B. Clark and C. V. Sullivan. 1995. Effects of phosphorus and water stress levels on growth and phosphorus uptake of bean and sorghum cultivars. *Journal of Plant Nutrition*. 18:563-578.
- Alscher R. G., N. Ertuk and L. S. Heath. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*. 53(372):1331-1341.
- Amede, T. 1998. Analysis of drought resistance in grain legumes. The case of *Vicia faba*, *Pisum sativum*, *Phaseolus vulgaris* and *Cicer arietinum*, Ulrich E. Grauer Publishing, Stuttgart, Germany.
- Amede T., and S. Schubert. 2003. Mechanisms of drought resistance in grain legumes I: Osmotic adjustment. *Ethiopian Journal of Science*. 26(1): 37-46.

- Ames B. N., M. K. Shigena and T. M. Hegen. 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative disease of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90:7915-7922.
- Anderson M. D., T. K. Prasad and C. R. Stewart. 1995. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiology*. 109:1247-1257.
- Andrade J.L., A. Larqué S., C. Trejo L. 1995. Proline accumulation in leaves of four cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. with different drought resistance. *Fyton*. 57(2):149-157.
- Arora A., R. K. Sairam and C. R. Stewart. 2002. Oxidative stress and antioxidant system in plants. *Current Science*. 82(10):1227-1238.
- Asada, K. 1992. Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxidase scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*. 85:235-241.
- Ashraf, M. 2001. Salt tolerance of cotton: some new advances. *Critical Review Plant Science*. 21:1-30.
- Aspinall D., and L. G. Paleg. 1981 Proline accumulation: Physiological aspects. *In: Paleg, L.G. and Aspinall, D. Edrs. The physiology and biochemistry of drought resistance in plants. Academic Press. Australia. pp. 206-240.*
- Attipalli R. R., V. C. Kolluru and V. Munusamy. 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*. 161:1189-1202.
- Avendaño C. H., C. Trejo, C. López, J. D. Molina, A. Santacruz y F. Castillo. 2005. Comparación de la tolerancia a la sequía de cuatro variedades de maíz (*Zea mays* L.) y su relación con la acumulación de prolina. *INCI 9*: 560-564.
- Bacanamwo M., and L. C. Purcell. 1999. Soybean root morphological and anatomical traits associated with acclimation to flooding. *Crop Science*. 39:143-149.
- Bajji M., S. Lutts and J. M. Kinet. 2000. Physiological changes after exposure to and recovery from polyethylene glycol-induced water deficit in roots and leaves of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars differing in drought resistance. *Journal of Plant Physiology*. 157:100-108.
- Bartoli G. C., M. Simontacchi, E. Tambussi, J. Beltrano, E. Montaldi and S. Punturulo. 1999. Drought and watering-dependent oxidative stress: effect on antioxidant content in *Triticum aestivum* L. leaves. *Journal of Experimental Botany*. 50(322):375-383.

- Bartoli G. C., J. J. Guiamet, G. Kiddle, G. M. Pastori, R. Di Cagno, F. L. Theodoulou and C. H. Foyer. 2005. Ascorbate content of wheat leaves is not determinate by maximal L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH) activity under drought stress. *Plant, Cell and Environment*. 28:1073-1081.
- Bates, L. S. 1973. Rapid determination of free proline for waterstress studies. *Plant Soil*. 39: 205–207.
- Beebe S. E., M. R. Idupulapati, C. Cajiao and M. Grajales. 2008. Selection for Drought Resistance in Common Bean Also Improves Yield in Phosphorus Limited and Favorable Environments. *Crop Science*. 48:582-592.
- Bewley J. D., and M. Black. 1994. *Seeds: Physiology of Development and Germination*. (New York: Plenum Press). 445 p.
- Bewley, J. D. 1997. Seed Germination and dormancy. *The Plant Cell*. 9: 1055-1066.
- Blum A., and A. Ebercon. 1976. Genotypic responses in sorghum to drought stress. III. Free proline accumulation and drought resistance. *Crop Science*. 16:428-431.
- Bohnert H. J., D. E. Nelson and R. G. Jensen. 1995. Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell*. 7:1099-1111.
- Bowler C., M. V. Montague and D. Inze. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 43:83-116.
- Bravo L. A., G. E. Zúñiga, M. Alberdi and L. J. Corcuera. 1998. The role of ABA in freezing tolerance and cold acclimation in barley. *Physiologia Plantarum*. 103:17-23.
- Brugière N., F. Dubois, A. M. Limami, M. Lelandais, Y. Roux, R. S. Sangwan and B. Hirel. 1999. Glutamine synthetase in the phloem plays a major role in controlling proline production. *Plant Cell*. 11: 1995–2011.
- Buitink J., M. M. A. E. Laessens, M. A. Hermings and F. A. Hoskstra. 1998. Influence of water content and temperature on molecular mobility and intracellular glasses in seeds and pollen. *Plant Physiology*. 118:531-541.
- Burssens S., K. Himanen, B. van de Cote, T. Beeckman, M. Van Montagu, D. Inze and N. Verbruggen. 2000. Expression of cell cycle regulatory genes and morphological alterations in response to salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. 211:632-640.

- Camarena, G. G. 2006. Las especies reactivas de oxígeno en defensa de las plantas contra patógenos. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo México.* 12(001):25-35.
- Carvalho L. C., and S. Amancio. 1992. Water stress, CO₂ and climate chang. *Journal Experimental Botany.*43:715-717.
- Chowdhury S., and M. A. Choudhuri. 1985. Hydrogen peroxide metabolism as an index of water stress tolerance in jute. *Physiologia Plantarum.* 65:503-507.
- Chu T. M., D. Aspinall and L. G. Paleg. 1976. Stress metabolism. VII. Salinity and proline accumulation in barley. *Australian Journal of Plant Physiology.* 3:219-228.
- CIAT. Centro Internacional de Agricultura Tropical. 1982. Morfología de la planta de frijol común *Phaseolus vulgaris* L. Cali, Colombia. 50 p.
- Cooper K., and J. M. Farrant. 2002. Recovery of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* from desiccation: protection versus repair. *Journal of Experimental Botany.* 53:1805-1813.
- Costa F. M. G., A. T. Pham-Thi, C. Pimentel, R. O. Pereyra R., Y. Zuily F., and D. Laffray 2000. Differences in growth and water relations among *Phaseolus vulgaris* cultivars in response to induced drought stress. *Environmental and Experimental Botany.* 43(3):227-237.
- Crowe J. H., J. F. Carpenter, L. M. Crowe and T. J. Anchordoguy. 1990. Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiology.* 27: 219-231.
- Delauney A. J., and D. P. S. Verma. 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant Journal.* 4: 215–223.
- Drosopoulos J. B., A. J. Karamanos and C. A. Niavis. 1985. Changes in free amino compounds during the development of two wheat cultivars subjected to different degrees of water stress. *Annual Botany.* 56:291-305.
- Ervin E., and A. Kosky. 1998. Drought avoidance aspects and crop coefficients of Kentucky bluegrass and tall fescue turfs in the semiarid west. *Crop Science.* 38:788-795.
- Eskling M., P. Arvidsson and H. E. Akerlund. 1997. The xanthophylls cycle, its regulation and components. *Physiologia Plantarum.* 100:806-816.

- Farrant J. M., C. Bailly, J. Leymarie, B. Hamman, D. Come and F. Corbineau. 2004. Wheat seedlings as a model to understand desiccation and sensitivity. *Physiologia Plantarum*. 120:563-574.
- Fischer C., and W. Holl. 1991. Food reserves in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) I. Seasonal changes in the carbohydrate and fat reserves of pine needles. *Tress*. 5:187-195.
- Foyer C. H., J. Rowell and D. A. Walker. 1983. Measurement of the ascorbate content of spinach leaf protoplasts and chloroplasts during illumination. *Planta*. (157)239-244.
- Foyer, C. H. 1993. Ascorbic Acid. In: Alscher R. G., Hess J. L., eds. Antioxidants in higher plants. Boca Raton: CRC Press. 34-58.
- Foyer C. H., M. Lelandais and K. J. Kunert. 1994. Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum*. 92:696-717.
- Foyer C. H., P. Descourvieres and K. J. Kunert. 1994b. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell and Environment*. 17:507-523.
- Fredeen A. L., J. A. Gamon and C. B. Field. 1991. Responses of photosynthesis and carbohydrate partitioning to limitations in nitrogen and water availability in field-grown sunflower. *Plant Cell and Environment*. 14:963-970.
- Frensch J., and T. C. Hsiao. 1994. Transient responses of cell turgor and growth of maize roots as affected by changes in water potential. *Plant Physiology*. 104:246-254.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koppen. Para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana. 4^a Edición. 217 p.
- Gepts, S. P. 1988. Phaseolin as an evolutionary marker. In: Genetic Resources of *Phaseolus* Beans. P. Gepts (ed.) Kluwer Dordrechr, the Netherlands. pp. 215-241.
- Girousse C., R. Bournoville and J. L. Bonnemain. 1996. Water deficit induced changes in concentrations in proline and some other amino acids in the phloem sap of alfalfa. *Plant Physiology*. 111: 109-113.
- Gnanasiri S. P., D. T. Hahn, D. Rhodes and R. J. Joly. 1995. Leaf water relations and solute accumulation in two grain sorghum lines exhibiting contrasting drought tolerance. *Journal of Experimental Botany*. 46:1833-1841.

- González E. A., J. A. Acosta G., I. Sánchez V., R. Ochoa M., A. Pajarito R., F. J. Ibarra P., F. J. Compeán G., R. Martínez P. y S. Word. 2003. Impacto económico del mejoramiento del frijol en México: variedad Pinto Villa. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agrícolas y Pecuarias. Serie: Estudios de Evaluación de Impacto Económico de Productos del INIFAP. Publicación Técnica No. 1. 56 p.
- Göring V. H., W. Dreier and F. Heink. 1977. Zytoplasmische osmoregulation durch prolin bei wurzeln von *Zea mays* L. Biol Rundsch. 15:377-380.
- Grant J. J., and G. J. Loake. 2000. Role of active oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. Plant Physiology. 124:21-29.
- Griffin J. J., T. G. Ranney and D. M. Pharr. 2004. Heat and drought influence photosynthesis, water relations, and soluble carbohydrates of two ecotypes of redbud (*Cercis Canadensis*). Journal of the American Society Horticulturæ Science. 129:497-402.
- Halliwell B., and J. M. C. Cutleridge. 1990. Free radicals and catalytic metal ions. Methods enzymes. 186:1-6.
- Hare P. D., and W. A. Cress 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. Plant Growth Regulation 21: 79-102.
- Hare P. D., W. A. Cress and L. Van Ataden 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. Plant Cell and Environment. 21: 535-553.
- Harsh, N. 2003. Accumulation of osmolytes and osmotic adjustment in water-stressed wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) as affected by calcium and its antagonists. Environmental and Experimental Botany 50: 253-264.
- Harinasut P., D. Poonsopa, K. Roengmongkol and R. Charoensataporn. 2003. Salinity effects on antioxidant enzymes in mulberry cultivar. Science Asia. 29:109-113.
- Hendry, G. A. F. 1993. Evolutionary origins and natural functions of fructans - a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. New Phytologist 123: 3-14.
- Hieng B., K. Ugrinovic J. Sustar V., and M. Kidric 2004. Different classes of proteases are involved in the response to drought of *Phaseolus vulgaris* L. cultivars differing in sensitivity. Journal of Plant Physiology. 161(5):519-30.
- Hirasawa, E. 1989. Auxins induce α -amylase activity in pea cotyledons. Plant Physiology. 91: 484-486.

- Ho M. D., J. C. Rosas, K. M. Brown and J. P. Lynch. 2005. Root architectural tradeoffs for water and phosphorus acquisition. *Functional Plant Biology*. 32:737-748.
- Hoekstra F. A., E. A. Golovina and J. Butinik. 2001. Mechanism of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science*. 6:431-438.
- Hoekstra F. A., and J. Buitink. 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science*. 8:431-438.
- Horemans N., C. H. Foyer and H. Asard. 2000. Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. *Trends in Plant Science*. 5:263-267.
- Huang J., R. Hirji, L. Adam, K. L. Rozwadowski, J. K. Hammerlindl, W. A. Keller and G. Selvaraj. 2000. Genetic engineering of glycinebetaine production toward enhancing stress tolerance in plants: metabolic limitations. *Plant Physiology*. 122: 747–756.
- Huang B., and J. Fry. 1998. Root anatomical, physiological and morphological responses to drought stress of tall fescue cultivars. *Crop Science*. 38:1017-1022.
- Huang B., and H. Gao. 2000. Root physiological characteristics associated with drought resistance in tall fescue cultivars. *Crop Science*. 40:196-203.
- Iyer S., and A. Caplan 1998. Products of proline catabolism can induce osmotically regulated genes. *Plant Physiology*. 116: 203-211.
- Jiménez A., J. A. Hernández, L. A. del Río and F. Sevilla. 1997. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology*. 114:275-284.
- Jiménez J. F., A. Becerra F., E. Hernández L., M. Rodríguez K., J. A. Acosta G. and J. G. Ramírez P. 2006. Proline accumulation in two bean cultivars under salt stress and the effect of polyamines and ornithine. *Biologia Plantarum*. 50: 763-766.
- Kampfenkel K., V. Montagu M., and D. Inzé. 1995. Effects of iron excess on *Nicotiana plumbaginifolia* plants. Implications to oxidative stress. *Plant Physiology*. 107:725-735.
- Kang H. M., and M. E. Saltveit. 2002. Reduced chilling tolerance in elongating cucumber seedling radicles is related to their reduced antioxidant enzyme and DPPH-radical scavenging activity. *Physiologia Plantarum*. 115:244-250.

- Karsten H. O., and J. W. MacAdam. 2001. Effect of drought on growth, carbohydrates and soil water use by perennial ryegrass, tall fescue and white clover. *Crop Science*. 49:156-166.
- Kavi K. P. B., Z. Hong, G. H. Miao, C. A. A. Hu and D. P. S. Verma. 1995. Overexpression of Δ^1 - pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology*. 108: 1387–1394.
- Kawakami S., Y. Matsumoto, A. Matsunaga, S. Mayama and M. Mizuno. 2002. Molecular cloning of ascorbate peroxidase in potato tubers and its response during storage at low temperature. *Plant Science*. 163(4):829-836.
- Keller F., and M. M. Ludlow. 1993. Carbohydrate metabolism in drought-stressed leaves of pigeonpeas (*Cajanus cajan*). *Journal of Experimental Botany*. 44: 1351-1359.
- Kerepesi I., and G. Galiba. 2000. Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. *Crop Science*. 40: 482-487.
- Kigel J., and G. Galili. 1995. Seed development and germination. New York: Marcel Dekker Inc. 853p.
- Kiyosue T., Y. Yoshiba, K. Yamaguchi S., and K. Shinozaki. 1996. A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase. An enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*, *Plant Cell*. 8:1325-1335.
- Konstantinova T., D. Parvanova, A. Atanassov and D. Djilianov. 2002. Freezing tolerant tobacco, transformed to accumulate osmoprotectants. *Plant Science*. 163: 157-164.
- Koster K. L., and A. C. Leopold. 1988. Sugars and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiology*. 96: 302-304.
- Kruger, N. J. 1999. Carbohydrate synthesis and degradation. In: *Plant Metabolism*. D.T. Denis, D.H. Turpin, D.D. Lefebvre, D.B. Layzell (eds) 2nd Edition. Longman England. pp: 83-104.
- Kuann R. L., W. Chia Ch., F. Hasio L. and T. Jen Ch. 2004. Study of the root antioxidative system of tomatoes and eggplants under waterlogged conditions. *Plant Science*. 167:355-365.
- Kurup S. S., U. G. Nalwadi, P. W. Basarkar, M. Geibel and D. Treutter. 1994. Phenolic biosynthesis in relation to moisture stress in marigold (*Tagetes erecta* L.). *Acta Horticulturae*. 381:488-493.

- Lamb C., and R. A. Dixon. 1997. The oxidative burst in plant disease response. *Annual Review of Plant Physiology and Plan Molecular Biology*. 78:251-275.
- Larher F., L. Leport, M. Petrivalsky and M. Chappart. 1993. Effectors for the osmoinduced proline response in higher plants. *Plant Physiology Biochemistry*. 31:911-922.
- Lazcano F. I, and C. J. L. 1999. Relationship 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.
- Leopold A. C., W. Q. Sun and L. Bernal L. 1994. The glassy state in seeds: analysis and function. *Seed Science Research*. 4: 267-274.
- Lin J. H. R., C. Weng, H. F. Lo and J. T. Chen. 2004. Study of the root antioxidative system of tomatoes and eggplants under waterlogged conditions. *Plant Science*. 167:355-366.
- Ludlow M. M., and R. C. Muchow. 1990. A critical evaluation of traits for improving crop yields in water-limited environments. *Advanced Agronomy*. 43: 107-120
- Lunn H. E., and R. T. Furbank. 1999. Sucrose biosynthesis in C₄ plants. *New Phytology*. 143:221-237.
- Lutts S., V. Majerus and J. M. Kinet. 1999. NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oriza sativa*) seedlings. *Physiology Plantarum*. 105:450-458.
- Lynch J. P., and M. D. Ho. 2005. Rhizoeconomics: Carbon costs of phosphorus acquisition. *Plant Soil*. 269:45–56.
- Lynch J. P., and K. M. Brown. 2001. Topsoil foraging – an architectural adaptation of plants to low phosphorus availability. *Plant and Soil*. 237(2):225-237.
- Mano Y., M. Muraki, M. Fujimori, T. Takamizo and B. Kindiger. 2005. Identification of QTL controlling adventitious root formation during flooding conditions in teosintle (*Zea mays* ssp *huehuetenangensis*) seedlings. *Euphytica* 142:33–42.
- Martin M., F. Miceli, J. A. Morgan, M. Scalet and G. Zerbi. 1993. Synthesis of osmotically active substrates in winter wheat leaves as related to drought resistance of different genotypes. *Journal Agricultural of Crop Research*. 171:176-184.
- McNamara S. T., and C. A. Mitchell. 1990. Adaptive stem and adventitious root responses of two tomato genotypes to flooding. *Horticultural Science*. 25:100–103.

- Medrano H., and J. Flexas. 2001. Fijación del dióxido de carbono y biosíntesis de fotoasimilados. In: Fundamentos de Fisiología Vegetal. J. Azcón-Bieto, M. Talón (eds). McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España. 173-185.
- Meier H., and J. S. G. Reid. 1982. Reserve polysaccharides other than starch in higher plants. In: Encyclopedia of Plant Physiol, New series. Loewus, F.A. and W. Tanner (Eds.). Springer - Verlag, Berlin. 13: 418-471.
- Meyre D., A. Leonardi, G. Brisson and N. Vartanian. 2001. Drought-adaptive mechanisms involved in the escape/tolerance strategies of *Arabidopsis Landsberg erecta* and *Columbia* ecotypes and their F1 reciprocal progeny. *Journal of Plant Physiology*. 158 (9): 1145-1152.
- Miller C. R., I. Ochoa, K. L. Nielsen, D. Beck and J. P. Lynch. 2003. Genetic variation for adventitious rooting in response to low phosphorus availability: Potential utility for phosphorus acquisition from stratified soils. *Functional Plant Biology*. 30:973-985.
- Monerri C., A. Garcia L., and J. L. Guardiola. 1986. Sugar and starch changes in pea cotyledons during germination. *Physiologia Plantarum*. 67: 49-54.
- Monk L. S., K. V. Fagersted and R. M. M. Crawford. 1989. Oxygen toxicity and superoxide dismutase as an antioxidant in physiological stress. *Physiologia Plantarum*. 76:456-459.
- Morell M., and L. Copeland. 1985. Sucrose synthase of soybean nodules. *Plant Physiology*. 78:149-164.
- Morgan, J. M. 1984. Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 35:299-319.
- Mora, H. M. E. 2007. Estrés oxidativo, respuesta antioxidante y tolerancia a baja temperatura en microplantas de *Solanum tuberosum* L. Tesis de Doctora en Ciencias. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 142 p.
- Mundree S. G., B. Baker, S. Mowla, S. Peters, S. Marais, C. V. Wilingen, K. Govender, A. Maredza, S. Muyanga, J. M. Farrant and J. A. Thomson. 2002. Physiological and molecular insights into drought tolerance. *African Journal Biotechnology*. 1: 28-38.
- Munné B. S., and J. Peñuelas. 2004. Drought-induced oxidative stress in strawberry tree (*Arbustus unedo* L.) growing in Mediterranean field conditions. *Plant Science*. 166:1105-1110.
- Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environment*. 25:239-250.

- Nakano Y., and K. Asada. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. *Plant and Cell Physiology*. 22(5):867-880.
- Nakashima K., R. Satoh, T. Kiyosue, L. Yamaguchi S., and K. Shinozaki. 1998. A gene encoding proline dehydrogenase is not only induced by proline and hypoosmolarity, but is also developmentally regulated in the reproductive organs of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 118:1233-1241.
- Navarrete R. y Acosta G. J. A. 1999. Reacción de variedades de frijol común a *Fusarium sp* y *Rhizoctonia solani* en el Altiplano de México. *Agronomía Mesoamericana*. 10:37-46.
- Nayer M., and H. Reza. 2008. Drought-induced accumulation of soluble sugars and proline in two maize varieties. *World Applied Sciences Journal*. 3(3):448-453.
- Nieves N., M. Martínez E., R. Castillo, M. Blanco A., and J. L. González O. 2001. Effect of abscisic acid and jasmonic acid on partial desiccation of encapsulated somatic embryos of sugarcane. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 65:15-21.
- Noctor G., and C. H. Foyer. 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 49:249-279.
- Norwood M., M. R. Truesdale, A. Richter and P. Scott. 1999. Metabolic changes in leaves and roots during dehydration of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* (Hochst). *South African Journal of Botany*. 65: 421-427.
- Nuccio M. L., D. Rhodes, S. McNeil and A. Hanson. 1999. Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Current Opinion in Plant Biology*. 2: 128-134.
- Ober E. S., and R. E. Sharp. 1994. Proline accumulation in maize (*Zea mays* L.) primary roots at low water potentials. I. Requirement for increased levels of abscisic acid. *Plant Physiology*. 105:981-987.
- Ogawa A., and A. Yamauchi. 2006. Root osmotic adjustment under osmotic stress in maize seedlings. 2. Mode of accumulation of several solutes for osmotic adjustment in the root. *Plant Production Science*. 9(1):39-46.
- Oliver M. J., and J. Bewley. 1997. Desiccation-tolerance of plants tissues: a mechanistic overview. *Horticultural Reviews*. 18: 171-214.
- Ortega D. M. L., y C. Rodríguez C. 1979. Estudio de azúcares solubles en semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agrociencia*. 37:17-24.

- Osborne D. J., and I. I. Boubriak. 1994. DNA and desiccation tolerance. *Seed Science research*. 4(2)175-185.
- Padh, H. 1990. Cellular functions of ascorbic acid. *Biochemistry and Cell Biology*. 68:1166-1173.
- Parsons L. R., and T. K. Howe. 1984. Effects of water stress on the water relationships of *Phaseolus vulgaris* and the drought resistant *Phaseolus accutifolius*. *Physiologia Plantarum*. 60:197-202.
- Pastori G. M., and V. S. Trippi. 1993. Antioxidative protection in a drought-resistant maize strain during leaf senescence. *Physiologia Plantarum*. 87:227-231.
- Pastori G. M., and C. H. Foyer. 2002. Common components, networks, and Pathways of cross-tolerance to stress. The central role of "Redox" and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiology*. 129:460-468.
- Patakas A., and B. Noitsakis. 2001. Leaf age effects on solute accumulation in water-stressed grapevine. *Plant Physiology*. 158:63-64.
- Payton P., R. Webb, D. Korniyev, R. Allen and A. S. Holaday. 2001. Protecting cotton photosynthesis during moderate chilling at high light intensity by increasing chloroplastic antioxidant enzyme activity. *Journal of Experimental Botany*. 52(365):2345-2354.
- Pelleschi S., J. P. Rocher and J. L. Prioul. 1997. *Plant, Cell and Environment*. 20:493-503.
- Peng Z., Q. Lu and D. P. S. Verm. 1996. Reciprocal regulation of Δ^1 - pyrroline - 5 - carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants. *Molecular and General Genetics*. 253:334-341.
- Pilon E. A. H., M. H. Ebskamp, M. J. Paul, M. J. W. Jeuken, P. H. Weisbeek and S. C. M. Smeekens. 1995. Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiology*. 107: 125-130.
- Pollock C. J., and A. J. Cairns. 1991. Fructan metabolism in grasses and cereals. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 42: 77-101.
- Pontis, H. G. 1989. Fructans and cold stress. *Plant Physiology* 134: 148-150.
- Prabhjot K. G., A. D. Sharma, P. Singh and S. S. Bhullar. 2002. Osmotic stress-induced changes in germination, growth and soluble sugar content of *Sorghum bicolor* (L.) Moench seeds. *Bulgarian Journal Physiology*. 28(3-4):12-25.

- Rajendra P. K., C. S. Vaidyanathan, M. Udaya K., K. S. Krishna S., and N. Appaji Rao. 1981. Alterations in the activities of the enzymes of proline metabolism in Ragi (*Eleusine coracana*) leaves during water stress. *Journal Bioscience*. 3(4). 361-370.
- Ramanjulu S., and C. Sudhakar. 2000. Proline metabolism during dehydration in two mulberry genotypes with contrasting drought tolerance. *Journal of Plant Physiology*. 157:81-85.
- Ramírez P. T. A., I. Hernández L., R. Cruz O., S. Sánchez N. 2005. Efecto del déficit hídrico en la expresión de los transportadores de sacarosa en plantas de jitomate. *Memorias del XIV Congreso de Bioenergética y Biomembranas. Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C. 13 al 18 noviembre 2005; Oaxaca, Oaxaca.*
- Rautenkranz A. A. F., Li L. Machler F., E. Martinoia and J. J. Oertli. 1994. Transport of ascorbic and dehydroascorbic acids across protoplast and vacuole membranes isolated from barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Gerbel) leaves. *Plant Physiology*. 106:187-193.
- Raymond M. J., and N. Smirnov. 2002. Proline metabolism and transport in maize seedlings at low water potential. *Annual Botany*. 89: 813-823.
- Rentsch D., B. Hirner, E. Schmeizer and W. B. Frommer. 1996. Salt stress-induced proline transporters and salt-repressed broad specificity amino acid permeases identified by suppression of a yeast amino acid permease-targeting mutant. *Plant Cell*. 8:1437-1446.
- Rhodes D., S. Handa and R. A. Bressan. 1986. Metabolic changes associate with adaptation of plant cells to water stress. *Plant Physiology*. 82:890-903.
- Rojas B. J. A., F. Dejaeghere, M. Abd Alla Kotb and P. Du Jardin. 2000. Expression and activity of antioxidant enzymes during potato tuber dormancy. *Potato Research*. 43:383-393.
- Rosales S. R., J. A. Acosta G., J. S. Muruaga M., J. M. Hernández C., G. Esquivel E. y P. Pérez H. 2004. Variedades mejoradas de frijol del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Libro Técnico No. 6. 148 p.
- Rosales S. R., P. Ramírez V., J. A. Acosta G., F. Castillo G. y J. D. Kelly. 2000. Rendimiento de grano y tolerancia a la sequía de frijol común en condiciones de campo. *Agrociencia*. 34(2):153-165.
- Ross H. A., and H. V. Davies. 1992. Purification and characterization of sucrose synthase from the cotyledons of *Vicia faba* L. *Plant Physiology*. 100:1008-1013.

- SAGARPA. 2000. Situación actual y perspectiva de la producción de frijol en México, 1990-2000. (Página visitada 3 de noviembre 2008).
<http://www.siea.sagarpa.gob.mx/Publicaciones/Archivos/Frijol90-00.pdf>
- Sairam R. K., P. S. Deshmukh and D. C. Saxena. 1998. Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerance to water stress. *Biologia Plantarum*. 41:387-394.
- Sairam R. K., G. C. Srivastava, S. Agarwal and R. C. Meena. 2005. Differences in antioxidant activity in response to salinity stress in tolerant and susceptible wheat genotypes wheat genotypes. *Biologia Plantarum*. 49:85-91.
- Salin, M. L. 1987. Toxic oxygen species and protective system of the chloroplast. *Physiologia Plantarum*. 72:681-689.
- Salisbury F. B., and C. W. Ross. 2000. Fisiología de las plantas. Parte 2. Bioquímica Vegetal. Editorial Paraninfo S. A. 523 p.
- Sánchez E., J. M. Soto, A. Núñez, J. M. Ruiz and L. Romero. 2005. Biosynthesis of non-structural carbohydrates and their distribution in green bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv Strike): deficiency vs toxicity of nitrogen. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 28(1):55-61.
- Sánchez U. A. B., C. B. Peña V., C. Trejo, J. Aguirre J. R., E. Cárdenas, A. B. Galicia. 2003. Efectos del potencial de agua en el crecimiento de la raíz de plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) silvestre y domesticado. *Acta Científica Potosina* (en prensa).
- Samaras Y., R. A. Bressan, L. N. Csonka, M. García R., M. Paino D'Urzo and D. Rhodes. 1995. Proline accumulation during water deficit. In: Smirnov N. Ed. Environment and plant metabolism. Flexibility and acclimation. Oxford: Bios Scientific Publishers.
- Scandalios, J. G. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiology*. 101:7-12.
- Scandalios, J. G. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 38:995-1014.
- Scholes J., N. Bundock, R. Wilde and S. Rolfe. 1996. The impact of reduced vacuolar invertase activity on the photosynthetic and carbohydrate metabolism of tomato. *Planta*. 200:265-272.
- Schoonhoven A. V., P. Corrales y A. Marcial. 1987. Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol. Centro internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali. Colombia. 56p.

- Schopfer P., and C. Placy. 1985. Control of seed germination by abscisic acid. III. Effect of embryo growth potential (minimum turgor pressure) and growth coefficient (cell wall extensibility) in *Brassica napus* L. *Plant Physiology*. 77: 676-686.
- Schwab K. B., and D. F. Gaff. 1990. Influence of compatible solutes on soluble enzymes from desiccation-tolerant *Sporobolus stapfianus* and desiccation-sensitive *Sporobolus pyramidalis*. *Journal of Plant Physiology*. 137:208–215.
- Schwacke R., S. Grallath, K. E. Breitzkreuz, E. Stransky, H. Stransky, W. B. Frommer and D. Rentsch. 1999. LeProt1, a transporter for proline, glycine, betaine and γ -amino butyric acid in tomato pollen. *Plant Cell*. 11:377-391.
- Serrano, C. L. M. 2004. Análisis del caso frijol. CIESTAAM. Universidad Autónoma Chapingo. México. 37 p.
- Shao H. B., Z. S. Liang, M. A. Shao and Q. Sun. 2005. Dynamic changes of anti-oxidant enzymes of 10 wheat genotypes at soil water deficit. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 42(3-4):187-195.
- Sharp R. E., T. C. Hsiao and W. K. Silk. 1990. Growth of the maize primary root at low water potentials. II. The role of growth and deposition of hexose and potassium in osmotic adjustment. *Plant Physiology*. 93:1337-1346.
- Schellenberg M., P. Matile and H. Thoma. 1993. Production of a presumptive chlorophyll catabolite in vitro: requirement for reduced ferredoxin. *191(3):417-420*.
- Shigeoka S., T. Ishikawa, M. Tamoi, Y. Miyagawa, T. Takeda, Y. Yabuta and K. Yoshimura. 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*. 53(372)1305-1319.
- Shimazaki Y., T. Ookawa and T. Hirasawa. 2005. The root tip and accelerating region suppress elongation of the decelerating region without any effects on cell turgor in primary roots of maize under water stress. *Plant Physiology*. 139:458-465.
- Silveira J. A. G., R. A. Viégas, I. M. A. Rocha, A. C. O. Monteiro M., R. M. Moreira and J. T. A. Oliveira. 2002. Proline accumulation and glutamine synthetase are increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves. *Journal of Plant Physiology*. 11:21-28.
- Singh S. P., P. Gepts and D. G. Debouck. 1991. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Economic Botany*. 45(3):379-396.
- Singh S. P., R. Nodari and P. Gepts. 1991a. Genetic diversity in cultivated common bean: I. Allozymes. *Crop Science*. 31:19-23.

- Smirnoff, N. 2000. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany*. 78:661-669.
- Sponchiado B. N., J. W. White, J. A. Castillo and P. J. Jones. 1989. Root growth of four common bean cultivars in relation to drought tolerance in environments with contrasting soil types. *Experimental Agriculture*. 25:249-257.
- Srivalli B., G. Sharma and R. Khanna C. 2003. Antioxidative defense system in an upland rice cultivar subjected to increasing intensity of water stress followed by recovery. *Physiologia Plantarum*. 119:503-512.
- Stewart C. R., and J. A. Lee. 1974. The role of proline accumulation in halophytes. *Planta*. 120:279-289.
- Stewart, C. R. 1978. Role of carbohydrates in proline accumulation in wilted barley leaves. *Plant Physiology*. 61:775-778.
- Subbaro G. V., C. Johansen, A. E. Slinkard, R. C. Nageswara, R. N. P. Saxena and Y. S. Chauhan. 1995. Strategies for improving drought resistance in grain legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 14(6):469-523.
- Sun W. Q., and A. C. Leopold. 1997. Cytoplasmic vitrification and survival of anhydrobiotic organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology* 117A: 327-333.
- Tajdoost S., T. Farboodnia and R. Heidari. 2007. Salt pretreatment enhance salt tolerance in *Zea mays* L. seedlings. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 10 (12): 2086-2090.
- Taiz L., and E. Zeiger. 2002. *Plant physiology*. Ed. 3. Sinauer Associates. Sunderland. M.A. pp 591-623.
- Taiz L., and E. Zeiger. 2006. *Plant physiology*. Ed. 4. Sinauer Associates. Sunderland. M. A. 764 p.
- Teixeira F. K., L. Menezes B., R. Margis and M. Margis P. 2004. Analysis of the molecular evolutionary history of the ascorbate peroxidase gene family: inferences from the rice genome. *Journal of Molecular Evolution*. 59:761–770.
- Thomas C. E., L. R. McLean, R. A. Parker and D. F. Ohlweiler. 1992. Ascorbate and phenolic antioxidant interactions in prevention liposomal oxidation. *Lipids*. 27:543-550.
- Thomas C. E., and G. Ganji. 2006. Integration of genomic and metabonomic data in systems biology – are we ‘there’ yet? *Current Opinion in Drug Discovery and Development*. 9:92–100.

- Tsang E. W. T., C. Bowler, D. Hérouart, V. Camp W., R. Villarroel, C. Genetello, V. Montagu M., and D. Inzé. 1991. Differential regulation of superoxide dismutase in plants exposed to environmental stress. *Plant Cell*. 3:783-792.
- Tully R. E., and A. D. Hanson. 1979. Amino acids translocated from turgid and water-stressed barley leaves. I. Phloem exudation studies. *Plant Physiology*.64: 460–466.
- Tully R. E., A. D. Hanson and C. E. Nelsen. 1979. Proline accumulation in water-stressed barley leaves in relation to translocation and the nitrogen budget. *Plant Physiology*.63: 518–523.
- Turner, N. C. 1997. Further progress in crop water relations. *Advanced Agronomy*. 58: 293-338.
- Unyayar S., Y. keles and E. Unal. 2004. Proline and levels in two sunflower genotypes subjected to water stress. *Bulgarian journal Plant Physiology*. 30(3-4):34-47.
- Vassey T. L., and T. D. Sharkey. 1989. Mild water stress of *Phaseolus vulgaris* plants leads to reduce starch synthesis and extractable sucrose phosphate synthase activity. *Plant Physiology*. 89:1066-1070.
- Vassey T. L., W. P. Quick, T. D. Sharkey and M. Stitt. 1991. Water stress, carbon dioxide and light effects on sucrose-phosphate synthase activity in *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum*. 81:37-44.
- Végas R. A., and J. A. G. Silveira. 1999. Ammonia assimilation and proline accumulation in young cashew plants during long-term exposure to NaCl-salinity. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 11:153-159.
- Verslues P. E., and R. E. Sharp. 1999. Proline accumulation in maize (*Zea mays* L.) primary roots at low water potentials. II. Metabolic source of increases proline deposition in the elongation zone. *Plant Physiology*. 119:1349-1360.
- Vertucci C. W., and J. M. Farrant. 1995. Acquisition and loss of desiccation-tolerance. *Seed Development and Germination*. J. a. G. Kigel, G. (eds) Marcel Dekker, New York. pp. 237-271.
- Visser E. J. W., C. Blom and L. Voesenek. 1996. Flooding-induced adventitious rooting in Rumex: Morphology and development in an ecological perspective. *Acta Botanica Neerlandica*. 45:17–28.
- Voetberg G. S., and R. E. Sharp. 1991. Growth of the maize primary root at low water potentials. Role of increased proline deposition in osmotic adjustment. *Plant Physiology*. 96:1125-1130.

- Vu J. C. V., J. T. Baker, A. H. Pennanen, A. L. H. Jr., G. Bowes and K. J. Boote. 1998. Elevated CO₂ and water deficit effects on photosynthesis, ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase, and carbohydrate metabolism in rice. *Physiologia Plantarum*. 103: 327-339.
- Wang Z., B. Quebedeaux and G. W. Stutte. 1995. Osmotic adjustment: effect of water stress on carbohydrates in leaves, stems and roots of apple. *Australian Journal of Plant Physiology*. 22:747-754.
- Wang Z., B. Quebedeaux and G. W. Stutte. 1996. Partitioning of (¹⁴C) glucose into sorbitol and other carbohydrates in apple under water stress. *Australian Journal of Plant Physiology*. 23:245-251.
- Wang J., H. Zhang and R. D. Allen. 1999. Overexpression of an Arabidopsis peroxisomal ascorbate peroxidase gene in tobacco increases protection against oxidative stress. *Plant Cell Physiology*. 40:725-732.
- Weinberg R., H. R. Lerner and A. Poljakoff M. 1982. A relationship between potassium and proline accumulation in salt-stressed *Sorghum bicolor*. *Physiologia Plantarum*. 55: 5-10.
- Westgate M. E., and J. S. Boyer. 1985. Osmotic adjustment and the inhibition of leaf, root, stem and silk growth at low water potentials in maize. *Planta*. 164:540-549.
- Whittaker A., A. Bochicchio, C. Vazzana, G. Lindsey and J. M. Farrant. 2001. Changes in leaf hexokinase activity and metabolite levels in response to drying in the desiccation-tolerant species *Sporobolus stapfianus* and *Xerophyta viscosa*. *Journal of Experimental Botany* 52:(358) 961-969.
- Williams R. J., and A. C. Leopold. 1989. The glassy state in corn embryos. *Plant Physiology* 89: 977-981.
- Wilson, J. B. 1988. A review of evidence on the control of shoot: root ratio, in relation to models. *Annals of Botany*. 61:433-449.
- Winicov, I. 1998. New molecular approaches to improving salt tolerance in crop plants. *Annual Botany*. 82:703-710.
- Wu Y., W. G. Spollen, R. E. Sharp, P. R. Hetherington and S. D. C. Fry. 1994. Root growth maintenance at low water potentials. Increased activity of xyloglucan endotransglycosylase and its possible regulation by abscisic acid. *Plant Physiology*. 106: 607-615.
- Yakushiji H., H. Nonami, T. Fukuyama, S. Ono, N. Takagi and Y. Hashimoto. 1996. Sugar accumulation enhanced by osmoregulation in *Saluma mandarin* fruit. *Journal American Society Horticulturæ Science*. 121:466-472.

- Yancey P. H., M. E. Clark, S. C. Hand, R. D. Bowlis, and G. N. Somero. 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte system. *Science*. 217:1214-1222.
- Yeo, A. R. 1994. Physiological criteria in screening and breeding, in: A. R. Yeo, T. J. Flowers (Eds.). *Soil Mineral Stresses, Approaches to Crop Improvement*. Springer-Verlag, Berlin. pp 37-60.
- Yoshida Y., T. Kiyosue, T. Tatagiri, H. Ueda, T. Mizoguchi, K. Yamaguchi S., K. Wada, Y. Harada and K. Shinozaki. 1995. Correlation between the induction of a gene for Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *Plant Journal*. 7:751-760.
- Yoshida Y. T., K. Kiyosue, K. Nakashima, S. Yamaguchi and K. Shinozaki. 1997. Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant Cell and Physiology* 38: 1095–1102.
- Zheng Y. Z., and Y. H. Han. 1997. Effect of high temperature and/or drought stress on the activities of SOD and POD of intact leaves in two soybean cultivars. *Soybean Genet. Newslett.* 24:30-40.
- Zinselmeier C., M. E. Wesgate, J. R. Schussler and R. J. Jones. 1995. Low water potential disrupts carbohydrate metabolism in maize (*Zea mays* L.) ovaries. *Plant Physiology*. 107:385-391.
- Zlatev, Z. S. 2006. Effects of water stress on leaf water relations of young bean plants. *Journal of Center European Agriculture*. 6(1):5-14.
- Zrenner R., and M. Stitt. 1991. Comparison of the effect of rapidly and gradually developing water-stress on carbohydrate metabolism in spinach leaves. *Plant Cell and Environment*. 14:939-946.

12. ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza de la longitud de radícula de dos variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Factor de variación	gl	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F _{tablasα}	F _{calculada}	Significancia
Variedad	1	55.814	55.814	23.17	<.0001	**
Tm	3	834.821	278.273	115.53	<.0001	**
Ψ_A	3	1621.654	540.551	224.42	<.0001	**
Var*Tm	3	2.4151	0.805	0.33	0.8006	NS
Var* Ψ_A	3	41.849	13.949	5.79	0.0010	*
Tm* Ψ_A	9	539.590	59.954	24.89	<.0001	**
Var*Tiem* Ψ_A	9	17.838	1.982	0.82	0.5961	NS
Error	128	308.304	2.408			
Total	159	3422.287				

Var = Variedad, Ψ_A = Potencial de agua, Tm = Tiempo de muestreo, *Significativo, ** Altamente significativo, NS = No significativo.

Anexo 2. Análisis de varianza de la acumulación de biomasa de dos variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Factor de variación	gl	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F _{tablasα}	F _{calculada}	Significancia
Variedad	1	0.00036	0.00036	9.32	0.0028	*
Tm	3	0.00427	0.00142	36.29	<.0001	**
Ψ_A	3	0.00609	0.00203	51.74	<.0001	**
Var*Tm	3	0.00001	0.000004	0.12	0.9467	NS
Var* Ψ_A	3	0.00032	0.0001	2.76	0.0450	*
Tm* Ψ_A	9	0.00733	0.00081	20.76	<.0001	**
Var*Tm* Ψ_A	9	0.00046	0.00005	1.32	0.2332	NS
Error	128	0.00502	0.00003			
Total	159	0.02390				

Var = Variedad, Ψ_A = Potencial de agua, Tm = Tiempo de muestreo, *Significativo, ** Altamente significativo, NS = No significativo.

Anexo 3. Análisis de varianza del número de raíces secundarias de dos variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Factor de variación	gl	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F _{tablasα}	F _{calculada}	Significancia
Variedad	1	3.306	3.306	0.21	0.6452	NS
Tm	3	4248.618	1416.2062	91.26	<.0001	**
Ψ _A	3	2121.2187	707.0729	45.56	<.0001	**
Var*Tm	3	28.568	9.5229	0.61	0.6074	NS
Var*Ψ _A	3	95.468	31.8229	2.05	0.1101	NS
Tm*Ψ _A	9	1084.6062	120.5118	7.77	<.0001	**
Var*Tm*Ψ _A	9	121.556	13.506	0.87	0.5536	NS
Error	128	1986.400	15.518			
Total	159	9698.7437				

Var = Variedad, Ψ_A = Potencial de agua, Tm = Tiempo de muestreo, *Significativo, ** Altamente significativo, NS = No significativo.

Anexo 4. Análisis de varianza de la acumulación de biomasa de las semillas germinadas de dos variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Factor de variación	gl	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F _{tablasα}	F _{calculada}	Significancia
Variedad	1	0.1568	0.1568	108.37	<.0001	**
Tm	3	0.0088	0.0029	2.03	0.1123	NS
Ψ _A	3	0.0265	0.0088	6.12	0.0006	*
Var*Tm	3	0.0052	0.0017	1.21	0.3077	NS
Var*Ψ _A	3	0.0041	0.0013	0.96	0.4122	NS
Tm*Ψ _A	9	0.0068	0.0007	0.53	0.8524	NS
Var*Tm*Ψ _A	9	0.0082	0.0009	0.64	0.7651	NS
Error	128	0.1853	0.0014			
Total	159	0.4022				

Var = Variedad, Ψ_A = Potencial de agua, Tm = Tiempo de muestreo, *Significativo, ** Altamente significativo, NS = No significativo.

Anexo 5. Acumulación de biomasa (mg) en las estructuras de las semillas germinadas de Pinto Villa, en cuatro potenciales de agua (Ψ_A) durante las 144 h.

Estructuras							
Ψ_A (MPa)	T (h)	Bis	Radícula	Testa	C+P	Bt	PbxR
-0.16	0		14	33	350	397	53
	24		21	32	317	369	81
	48	450	29	31	305	365	85
	72		39	33	278	349	101
	144		25	32	305	362	88
-0.27	0		14	33	350	397	53
	24		18	33	333	384	66
	48	450	26	32	315	373	77
	72		33	31	297	361	89
	144		30	32	317	379	71
-0.52	0		14	33	350	397	53
	24		18	32	331	382	69
	48	450	24	29	289	342	108
	72		25	31	317	374	76
	144		22	32	318	372	78
-2.07	0		14	33	350	397	53
	24		15	33	352	400	50
	48	450	17	33	348	398	52
	72		15	32	327	374	76
	144		15	33	341	389	61

Ψ_A (MPa) = Potencial de agua en Megapascales. T(h) = Tiempo en horas. Bis = Biomasa inicial de semilla. C + P = Cotiledón más plúmula. Bt = Biomasa total. PbxR = Pérdida de biomasa por respiración.

Anexo 6. Acumulación de biomasa (mg) en las estructuras de las semillas germinadas de Bayo Madero, en cuatro potenciales de agua (Ψ_A) durante las 144 h.

Estructuras							
Ψ_A (MPa)	T (h)	Bis	Radícula	Testa	C+P	Bt	PbxR
-0.16	0		40	35	369	444	66
	24		22	36	388	445	65
	48	510	36	38	364	438	72
	72		43	37	338	418	92
	144		34	36	362	432	78
-0.27	0		40	35	369	444	66
	24		21	39	412	473	37
	48	510	26	39	368	433	77
	72		35	36	354	425	85
	144		36	38	365	439	71
-0.52	0		40	35	369	444	66
	24		24	37	379	440	70
	48	510	22	37	386	445	65
	72		26	37	376	439	71
	144		27	37	371	435	75
-2.07	0		40	35	369	444	66
	24		17	38	412	467	43
	48	510	21	37	387	446	64
	72		25	37	359	420	90
	144		25	36	374	435	75

Ψ_A (MPa) = Potencial de agua en Megapascales. T(h) = Tiempo en horas. Bis= Biomasa inicial de semilla. C + P = Cotiledón más plúmula. Bt = Biomasa total. PbxR = Pérdida de biomasa por respiración.

Anexo 7. Análisis de varianza de la concentración del aminoácido prolina en la radícula de dos variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Factor de variación	gl	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F _{tablasα}	F _{calculada}	Significancia
Variedad	1	562682.678	562682.678	115.58	<.0001	**
Tm	2	55148.579	27574.289	5.66	0.0052	*
Ψ _A	2	1704179.004	852089.502	175.02	<.0001	**
Var*Tm	2	708272.137	354136.068	3.33	<.0001	**
Var*Ψ _A	2	32468.272	16234.136	72.74	0.041	*
Tm*Ψ _A	4	59615.522	14903.881	3.06	0.021	*
Var*Tm*Ψ _A	4	223803.479	55950.087	11.49	<.0001	**
Error	72	350528.009	4868.445			
Total	89	3696697.680				

Var = Variedad, Ψ_A = Potencial de agua, Tm = Tiempo de muestreo, *Significativo, ** Altamente significativo, NS = No significativo.

Anexo 8. Análisis de varianza de la concentración de carbohidratos solubles en la radícula de Pinto Villa y Bayo Madero

Factor de variación	gl	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F _{tablasα}	F _{calculada}	Significancia
Variedad	1	7.6901	7.6901	1.99	0.1628	NS
Tm	2	180.7006	90.3503	23.37	<.0001	**
Ψ _A	2	1034.2951	517.1475	133.37	<.0001	**
Var*Tm	2	66.3309	33.1654	8.58	0.0005	*
Var*Ψ _A	2	596.2185	298.1092	77.09	<.0001	**
Tm*Ψ _A	4	47.8020	11.9505	3.09	0.0209	*
Var*Tm*Ψ _A	4	71.3677	17.8419	4.61	0.0023	*
Error	72	278.4130	3.8668			
Total	89	2282.8183				

Var = Variedad, Ψ_A = Potencial de agua, Tm = Tiempo de muestreo, *Significativo, ** Altamente significativo, NS = No significativo.

Anexo 9. Análisis de varianza de la concentración de glucosa en dos variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Factor de variación	gl	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F _{tablas α}	F _{calculada}	Significancia
Variedad	1	0.0076	0.0076	0.02	0.9020	NS
Tm	2	41.1396	20.5698	41.00	<.0001	**
Ψ _A	2	15.55	7.7752	15.50	<.0001	**
Var*Tm	2	15.1536	7.5768	5.09	<.0001	**
Var*Ψ _A	2	5.7131	2.8565	15.10	0.0051	*
Tm*Ψ _A	4	11.0256	2.7564	5.49	0.0006	*
Var*Tm*Ψ _A	4	4.5722	1.1430	2.28	0.691	NS
Error	79	36.1227	0.5017			
Total	89	129.2850				

Var = Variedad, Ψ_A = Potencial de agua, Tm = Tiempo de muestreo, *Significativo, ** Altamente significativo, NS = No significativo.

Anexo 10. Análisis de varianza de la concentración de fructosa en la radícula de dos variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Factor de variación	gl	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F _{tablas α}	F _{calculada}	Significancia
Variedad	1	0.0804	0.0804	0.16	0.6871	NS
Tm	2	80.044	40.0221	81.44	<.0001	**
Ψ _A	2	13.121	6.5605	13.35	<.0001	**
Var*Tm	2	37.3302	18.6651	37.98	<.0001	**
Var*Ψ _A	2	3.8170	1.9085	3.88	0.0250	*
Tm*Ψ _A	4	13.5311	3.3827	6.88	<.0001	**
Var*Tm*Ψ _A	4	10.8988	2.7247	5.54	0.0006	*
Error	72	35.3839	0.4914			
Total	89	194.2070				

Var = Variedad, Ψ_A = Potencial de agua, Tm = Tiempo de muestreo, *Significativo, ** Altamente significativo, NS = No significativo.

Anexo 11. Análisis de varianza de la concentración de sacarosa en la radícula de dos variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Factor de variación	gl	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F _{tablasca}	F _{calculada}	Significancia
Variedad	1	6.6205	6.6205	11.04	0.0014	*
Tm	2	285.9355	142.9677	238.34	<.0001	**
Ψ_A	2	38.6602	19.3301	32.23	<.0001	**
Var*Tm	2	217.2060	108.6030	181.05	<.0001	**
Var* Ψ_A	2	17.3734	8.6867	14.48	<.0001	**
Tm* Ψ_A	4	13.7443	3.4360	5.73	0.0005	*
Var*Tm* Ψ_A	4	25.0096	6.2524	10.42	<.0001	**
Error	72	43.1888	0.5998			
Total	89	647.7386				

Var = Variedad, Ψ_A = Potencial de agua, Tm = Tiempo de muestreo, *Significativo, ** Altamente significativo, NS = No significativo.

Anexo 12. Análisis de varianza de la concentración de almidón en la radícula de dos variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Factor de variación	gl	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F _{tablasca}	F _{calculada}	Significancia
Variedad	1	0.1733	0.1733	0.12	0.7273	NS
Tm	2	111.8481	55.9207	39.53	<.0001	**
Ψ_A	2	12.3153	6.1576	4.35	0.0164	*
Var*Tm	2	115.5039	57.7519	40.82	<.0001	**
Var* Ψ_A	2	2.6576	1.3288	0.94	0.3956	NS
Tm* Ψ_A	4	26.1471	6.5367	4.62	0.0022	*
Var*Tm* Ψ_A	4	32.1446	8.0361	5.68	0.0005	*
Error	72	101.8578	1.4146			
Total	89	402.6481				

Var = Variedad, Ψ_A = Potencial de agua, Tm = Tiempo de muestreo, *Significativo, ** Altamente significativo, NS = No significativo.

Anexo 13. Análisis de varianza de la concentración de prolina en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Factor de variación	gl	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F _{tablasα}	F _{calculada}	Significancia
Variedad	1	16969.8171	16969.8271	46.06	<.0001	**
T hum	2	5998.2043	2999.1021	8.14	0.0006	*
Hojas	2	44035.4785	22017.7392	59.76	<.0001	**
Var*T hum	2	3076.4667	1538.2333	4.18	0.0192	*
Var*hojas	2	40115.6307	20077.8153	54.50	<.0001	**
T hum*hojas	4	4595.7386	1149.1846	3.12	0.0200	*
Var*Thum*hojas	4	6736.8076	1684.2019	4.57	0.0024	*
Error	72	26525.7879	368.4137			
Total	89	148094.9417				

Var = Variedad, T hum = Tratamientos de humedad, *Significativo. ** Altamente significativo, NS = No significativo.

Anexo 14. Análisis de varianza de la concentración de carbohidratos solubles en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Factor de variación	gl	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F _{tablasα}	F _{calculada}	Significancia
Variedad	1	3.9910	3.9910	12.04	0.0009	*
T hum	2	1.5804	0.7902	2.38	0.0995	NS
Hojas	2	29.0631	14.5315	43.82	<.0001	**
Var*T hum	2	1.6159	0.8079	2.44	0.0946	NS
Var*hojas	2	0.4544	0.2272	0.69	0.5072	*
T hum*hojas	4	9.2205	2.3051	6.95	<.0001	**
Var*Thum*hojas	4	11.9370	2.9842	9.00	<.0001	**
Error	72	23.8760	0.3316			
Total	89	81.7386				

Var = Variedad, T hum = Tratamientos de humedad, *Significativo. ** Altamente significativo, NS = No significativo.

Anexo 15. Análisis de varianza de la concentración de glucosa en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Factor de variación	gl	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F _{tablas}	F _{calculada}	Significancia
Variedad	1	1.8264	1.8264	25.24	<0.0001	**
T hum	2	0.4550	0.2275	3.14	0.0491	*
Hojas	2	7.9183	3.9591	54.71	<.0001	**
Var*T hum	2	0.4063	0.2031	2.81	0.0670	NS
Var*hojas	2	0.3926	0.1963	2.71	0.0731	NS
T hum*hojas	4	2.3603	0.5900	8.15	<.0001	**
Var*Thum*hojas	4	1.9252	0.4813	6.65	0.0001	*
Error	72	5.2100	0.0723			
Total	89	20.4936				

Var = Variedad, T hum = Tratamientos de humedad, *Significativo. ** Altamente significativo, NS = No significativo.

Anexo 16. Análisis de varianza de la concentración de fructosa en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Factor de variación	gl	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F _{tablas}	F _{calculada}	Significancia
Variedad	1	0.0387	0.0387	1.13	0.2906	NS
T hum	2	0.0666	0.0330	0.97	0.3558	NS
Hojas	2	2.3258	1.1629	33.98	<.0001	**
Var*T hum	2	0.1119	0.0559	1.64	0.2020	NS
Var*hojas	2	0.0536	0.0269	0.79	0.4595	NS
T hum*hojas	4	0.6151	0.1537	4.49	0.0027	*
Var*Thum*hojas	4	1.0625	0.2656	7.76	<.0001	**
Error	72	2.4643	0.0342			
Total	89	6.7385				

Var = Variedad, T hum = Tratamientos de humedad, *Significativo. ** Altamente significativo, NS = No significativo.

Anexo 17. Análisis de varianza de la concentración de sacarosa en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Factor de variación	gl	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F _{tablas}	F _{calculada}	Significancia
Variedad	1	0.2018	0.2018	8.11	0.0057	*
T hum	2	0.1243	0.0621	2.50	0.0895	NS
Hojas	2	1.1627	0.5813	23.34	<.0001	**
Var*T hum	2	0.1197	0.0598	2.40	0.0975	NS
Var*hojas	2	0.3785	0.1892	7.60	0.0010	*
T hum*hojas	4	0.7435	0.1858	7.46	<.0001	**
Var*Thum*hojas	4	1.0924	0.2731	10.97	<.0001	**
Error	72	1.7931	0.0249			
Total	89	5.6164				

Var = Variedad, T hum = Tratamientos de humedad, *Significativo. ** Altamente significativo, NS = No significativo.

Anexo 18. Análisis de varianza de la concentración del almidón en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Factores de variación	gl	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F _{tablas}	F _{calculada}	Significancia
Variedad	1	1.1935	1.1935	27.92	<.0001	**
T hum	2	0.1988	0.0994	2.33	0.1050	NS
Hojas	2	8.0723	4.0361	94.43	<.0001	**
Var*T hum	2	0.6382	0.3191	7.47	0.0011	*
Var*hojas	2	1.2121	0.6060	14.18	<.0001	**
T hum*hojas	4	3.9880	0.9970	23.33	<.0001	**
Var*Thum*hojas	4	0.9943	0.2485	5.82	0.0004	*
Error	72	3.0774	0.2485			
Total	89	19.3748				

Var = Variedad, T hum = Tratamientos de humedad, *Significativo. ** Altamente significativo, NS = No significativo.

Anexo 19. Análisis de varianza de la concentración de ácido ascórbico en las hojas de la variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

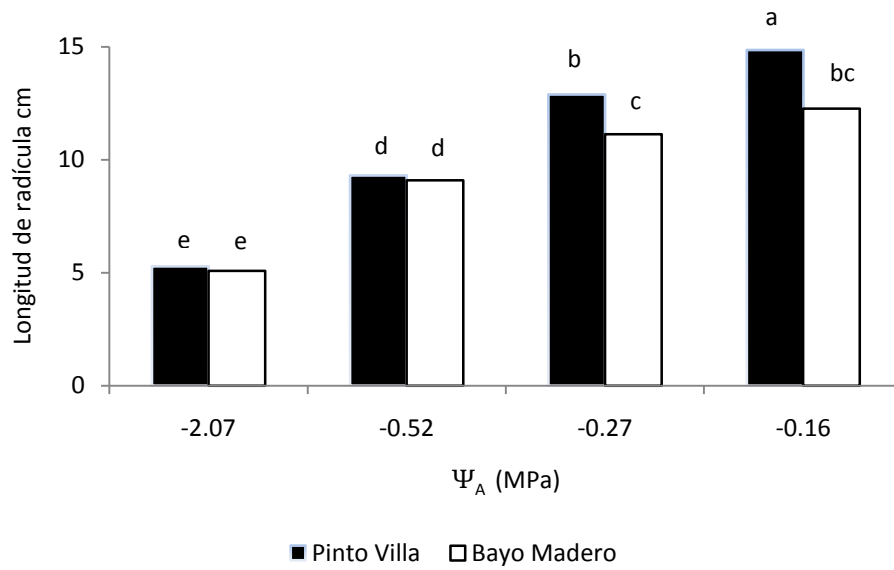
Factor de variación	gl	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F _{tablasα}	F _{calculada}	Significancia
Variedad	1	5693	5693	30.42	<.0001	**
T hum	2	2663	1331	7.12	0.0015	*
Hojas	2	1763	8819	47.12	<.0001	**
Var*T hum	2	2805	1402	7.50	0.0011	*
Var*hojas	2	1051	5256	28.08	<.0001	**
T hum*hojas	4	2630	6576	3.51	0.0112	*
Var*Thum*hojas	4	1620	4051	2.16	0.0516	NS
Error	72	1347	1871			
Total	89	5705				

Var = Variedad, T hum = Tratamientos de humedad, *Significativo. ** Altamente significativo, NS = No significativo.

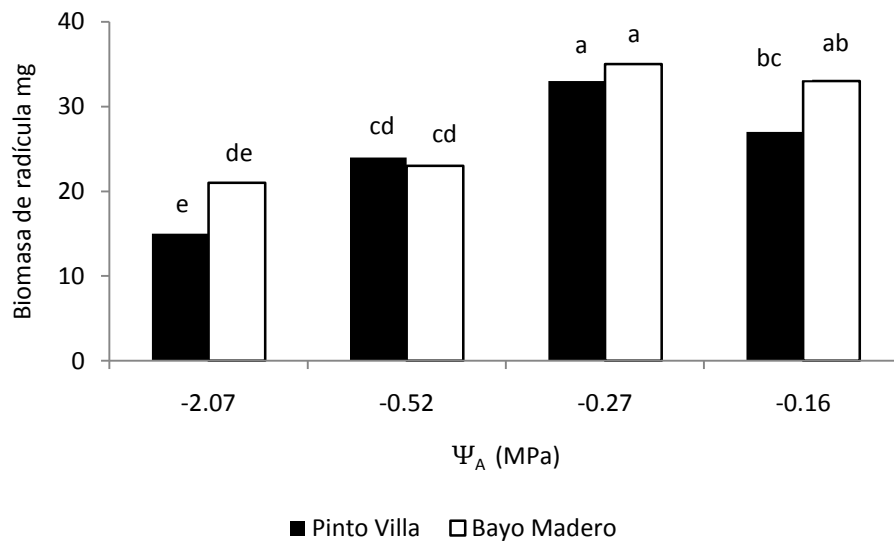
Anexo 20. Análisis de varianza de la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.

Factores de variación	gl	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F _{tablasα}	F _{calculada}	Significancia
Variedad	1	0.1624	0.1624	15.75	0.0002	*
T hum	2	1.2235	0.6117	59.33	<.0001	**
Hojas	2	0.1238	0.06192	6.01	0.0039	*
Var*T hum	2	0.0617	0.03086	2.99	0.0564	*
Var*hojas	2	0.1178	0.0589	5.71	0.0050	*
T hum*hojas	4	0.1653	0.0413	4.01	0.0054	*
Var*Thum*hojas	4	0.4682	0.1170	11.35	<.0001	**
Error	72	0.7424	0.0103			
Total	89	3.0653				

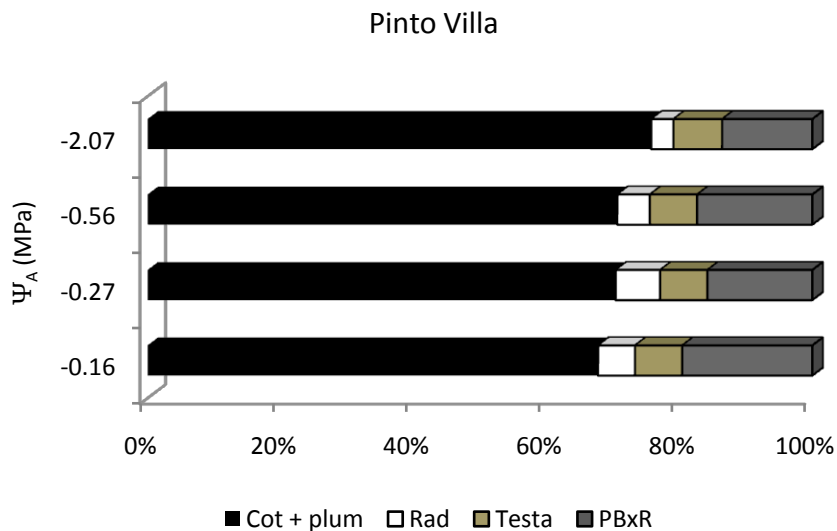
Var = Variedad, T hum = Tratamientos de humedad, *Significativo. ** Altamente significativo, NS = No significativo.



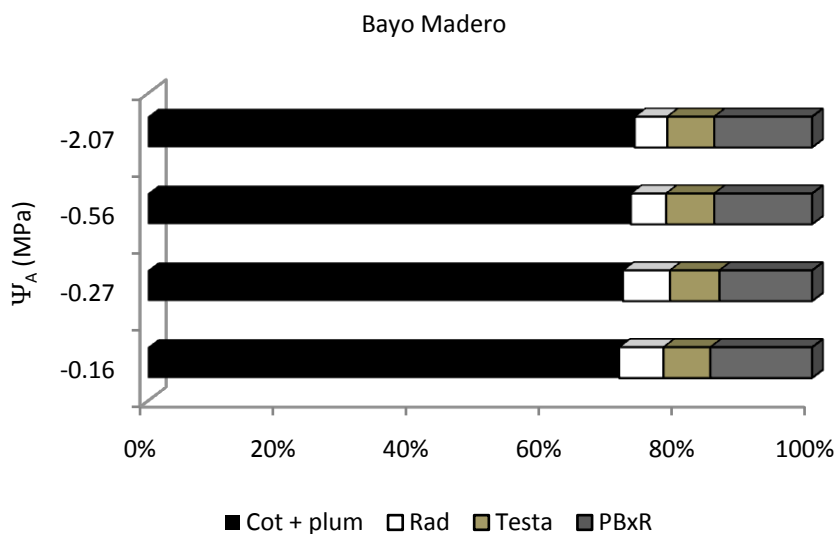
Anexo 21. Longitud de la raíz (cm) de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes potenciales de agua (Ψ_A).



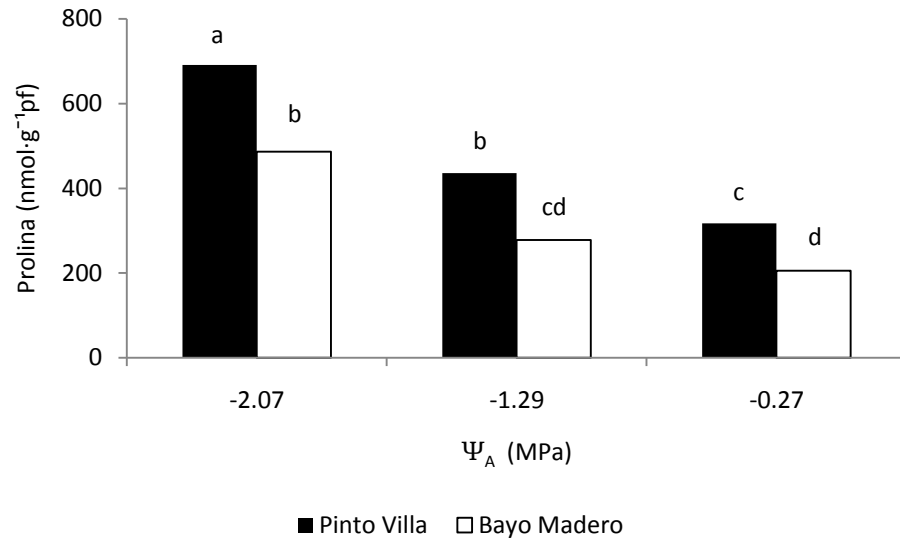
Anexo 22. Biomasa de la raíz (mg) de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes potenciales de agua (Ψ_A).



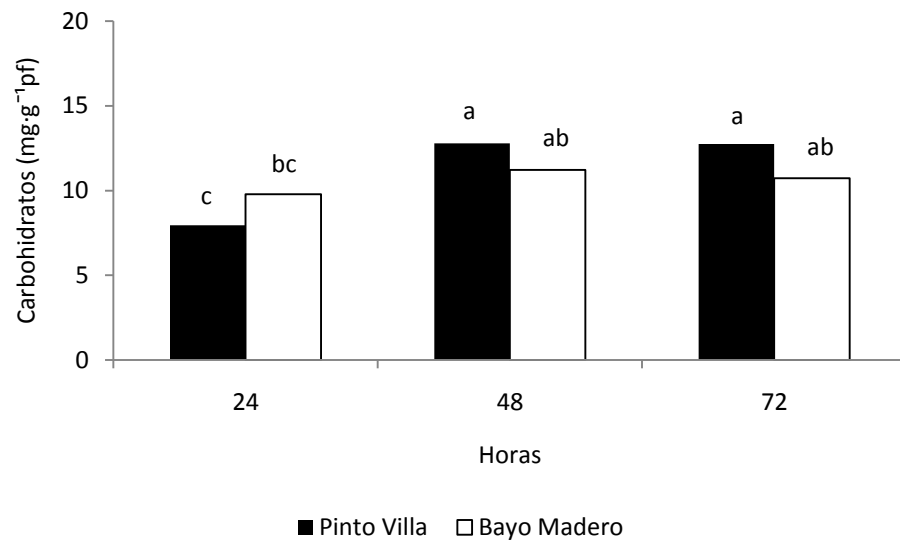
Anexo 23. Acumulación de biomasa en base a porcentajes en las estructuras de las semillas germinadas de las variedades de frijol Pinto Villa en diferentes potenciales de agua (Ψ_A) a las 144 h. Cot + plum = cotiledón más plúmula, Rad = radícula, PBxR = Pérdida de biomasa por respiración.



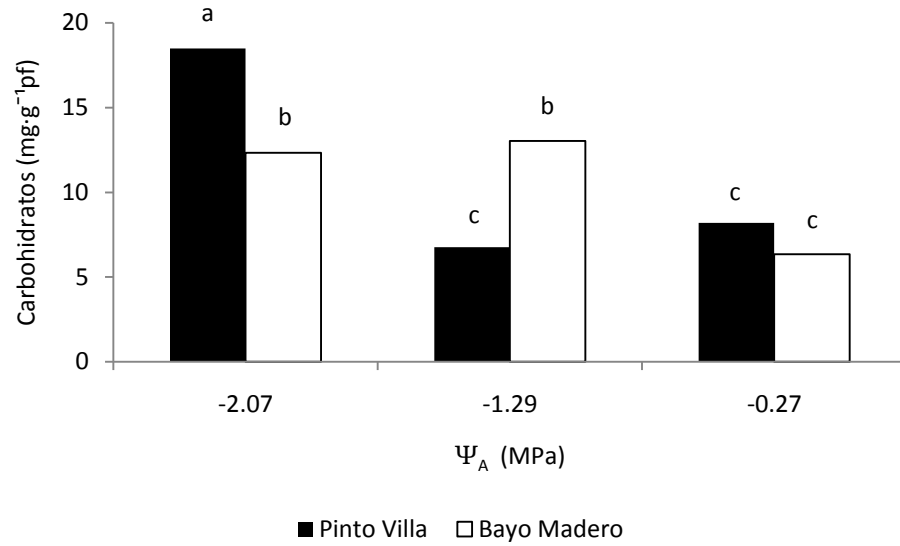
Anexo 24. Acumulación de biomasa en base a porcentaje en las estructuras de las semillas germinadas de las variedades de frijol Pinto Villa en diferentes potenciales de agua (Ψ_A) a las 144 h. Cot + plum = cotiledón más plúmula, Rad = radícula, PBxR = Pérdida de biomasa por respiración.



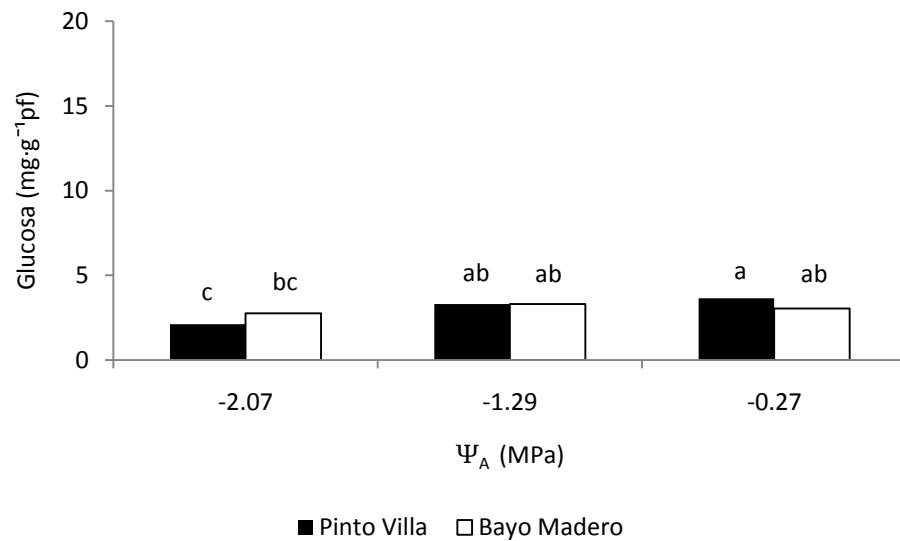
Anexo 25. Concentración de prolina (nmol·g⁻¹pf) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes potenciales de agua (Ψ_A).



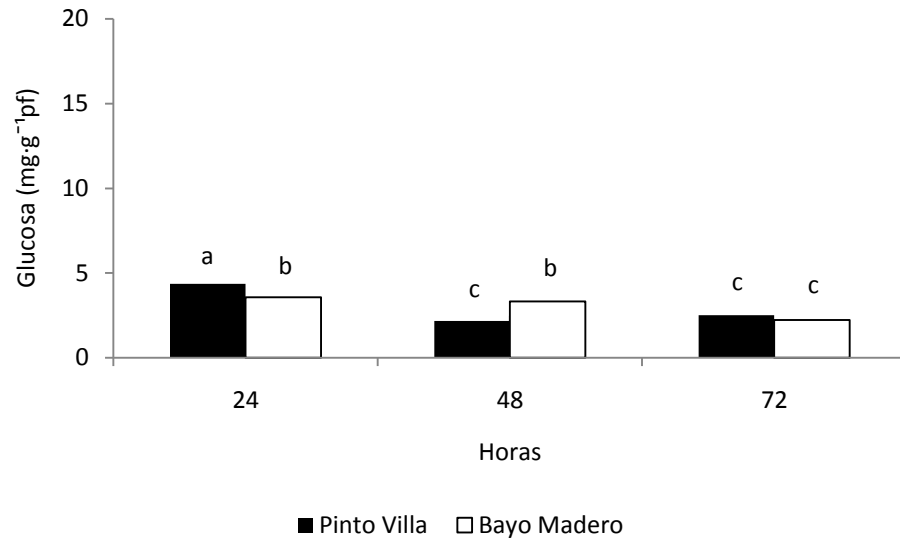
Anexo 26. Concentración de carbohidratos solubles (glucosa + fructosa + sacarosa) (mg·g⁻¹pf) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero durante las primeras 72 h de desarrollo.



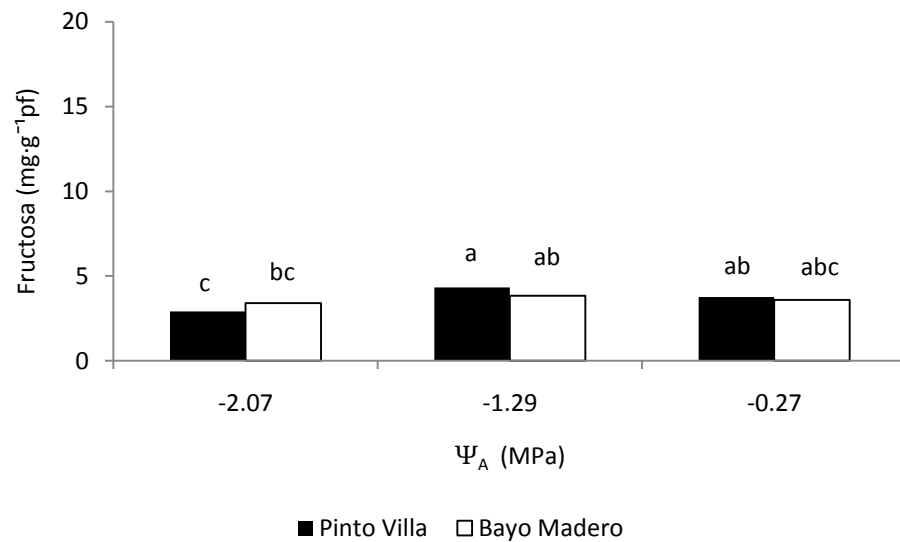
Anexo 27. Concentración de carbohidratos solubles (glucosa + fructosa + sacarosa) (mg·g⁻¹pf) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes potenciales de agua (Ψ_A).



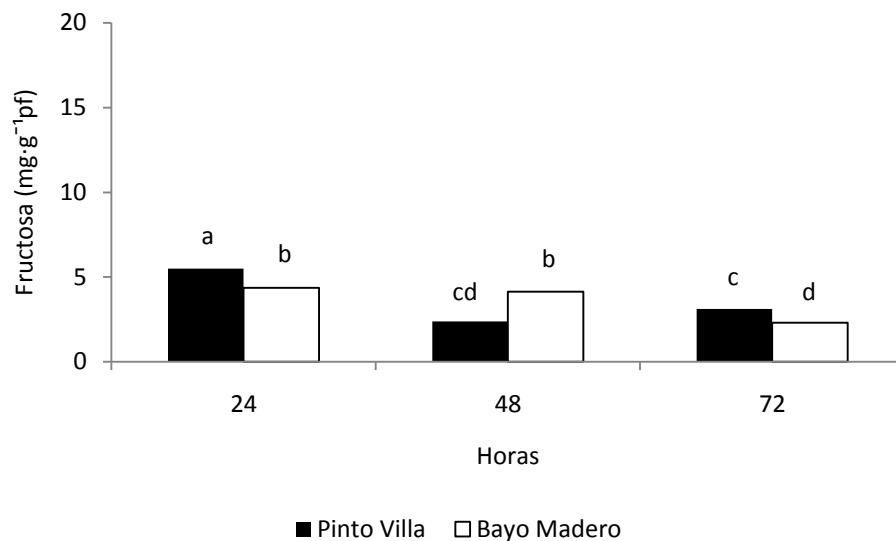
Anexo 28. Concentración de glucosa (mg·g⁻¹pf) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes potenciales de agua (Ψ_A).



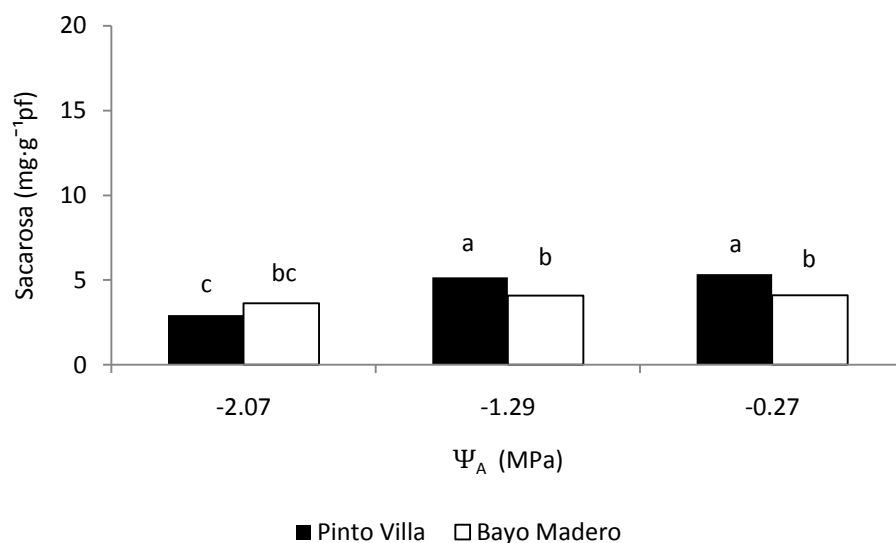
Anexo 29. Concentración de glucosa ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero durante las primeras 72 h de desarrollo.



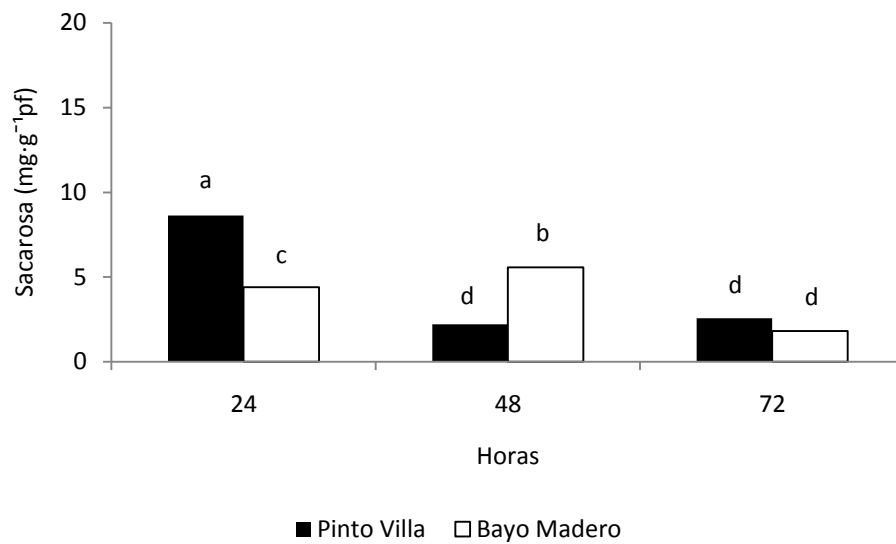
Anexo 30. Concentración de fructosa ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero con los potenciales de agua (Ψ_A).



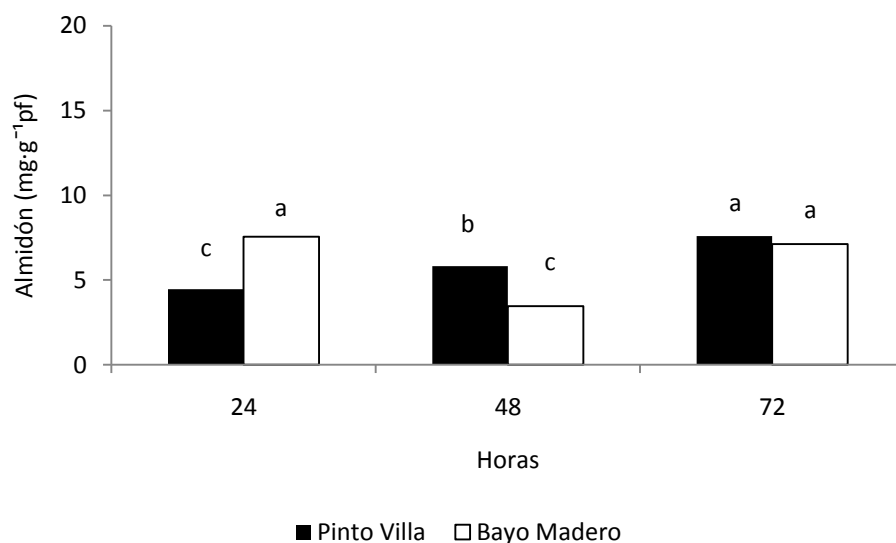
Anexo 31. Concentración de fructosa ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero durante las primeras 72 h de desarrollo.



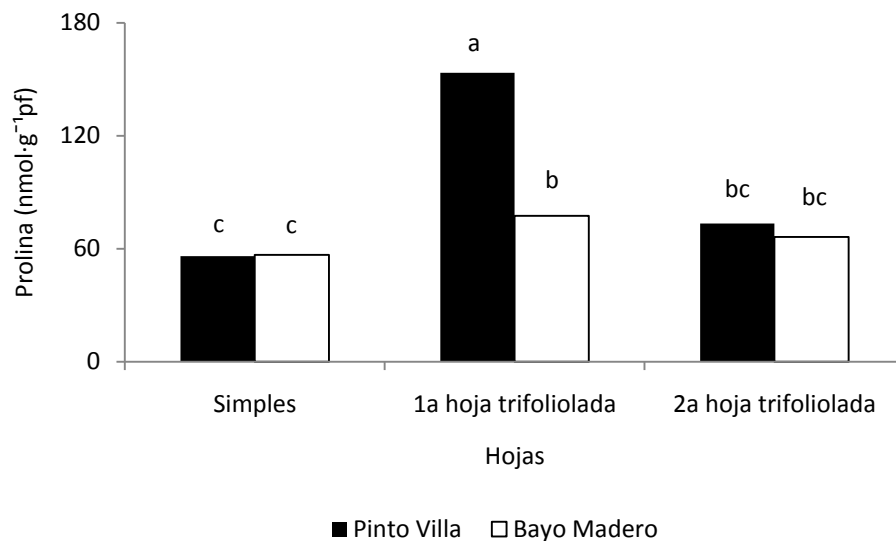
Anexo 32. Concentración de sacarosa ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes potenciales de agua (Ψ_A).



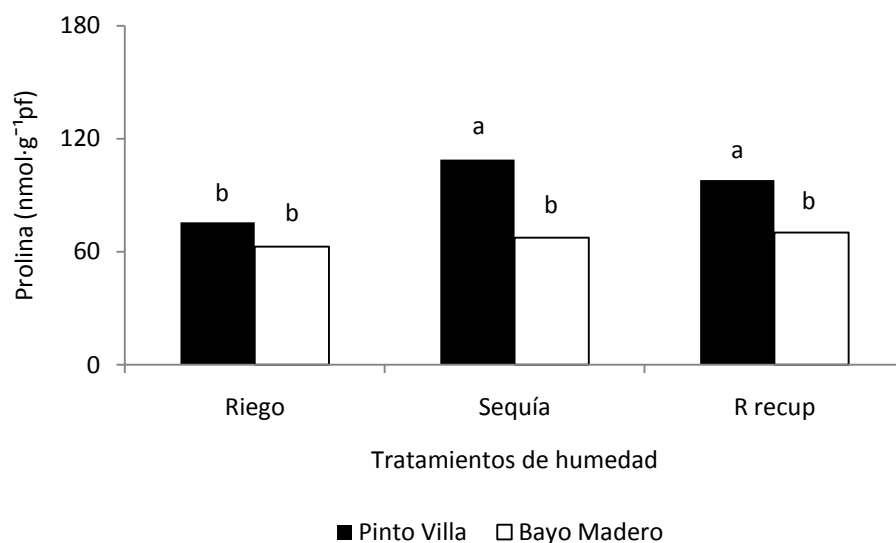
Anexo 33. Concentración de sacarosa ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero durante las primeras 72 h de desarrollo.



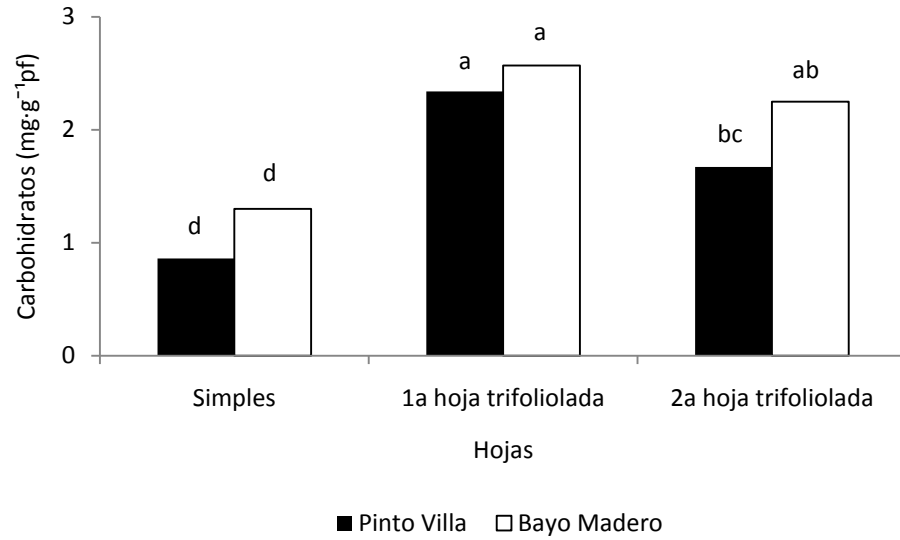
Anexo 34. Concentración de almidón ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero durante las primeras 72 h de desarrollo.



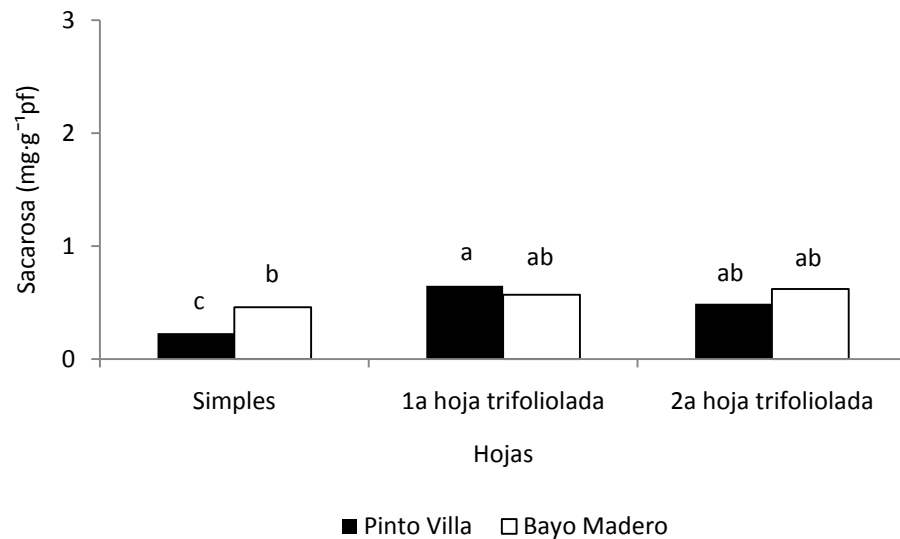
Anexo 35. Concentración de prolina (nmol·g⁻¹·pf) en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.



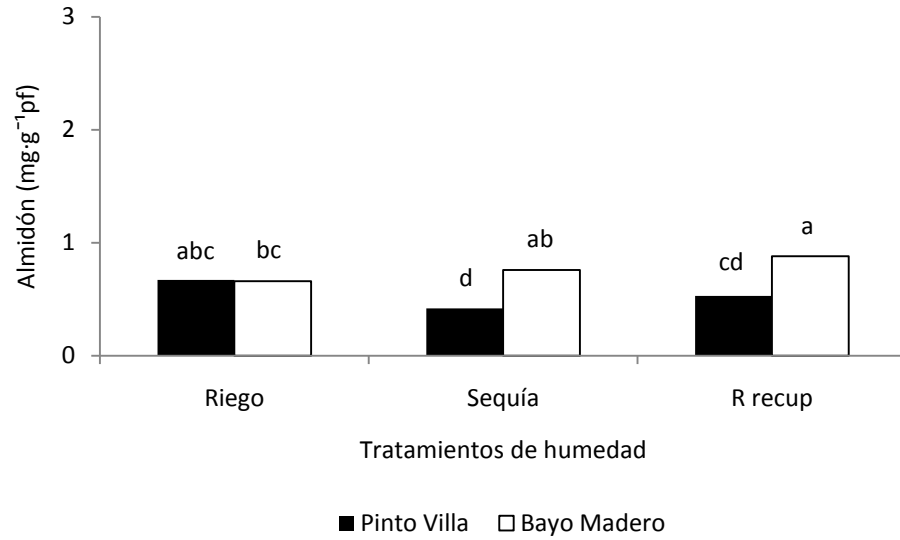
Anexo 36. Concentración de prolina (nmol·g⁻¹·pf) en las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero por efecto de los diferentes tratamientos de humedad.



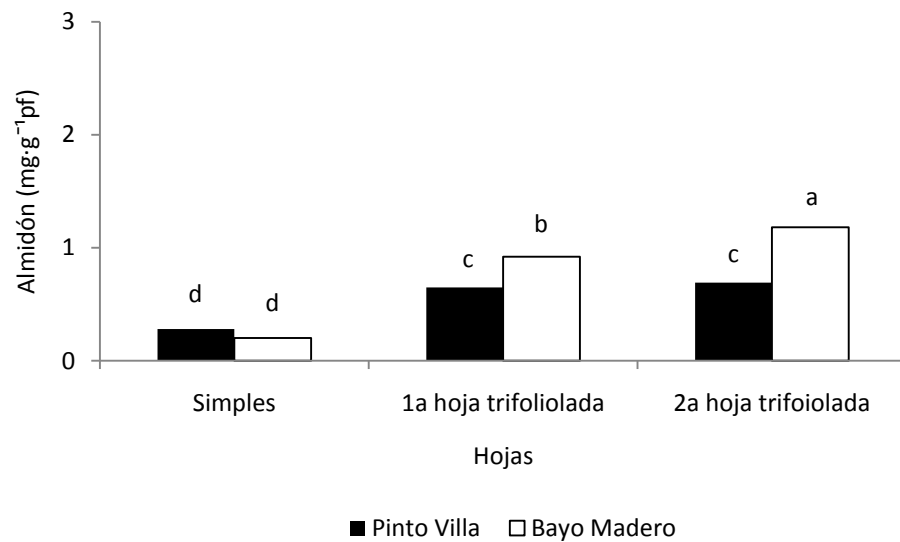
Anexo 37. Concentración de carbohidratos solubles (glucosa + fructosa + sacarosa) ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.



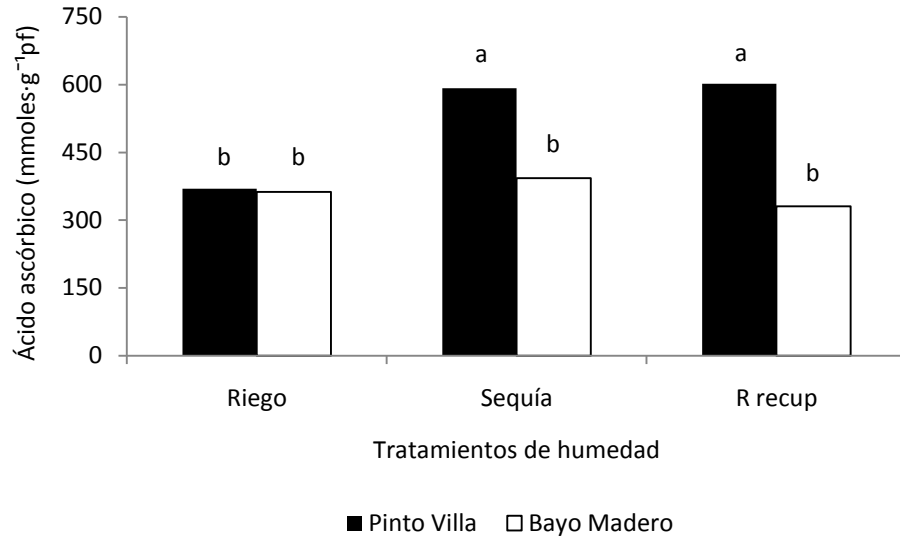
Anexo 38. Concentración de sacarosa ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$) en las hojas de las variedades de frijol Pinto Vila y Bayo Madero.



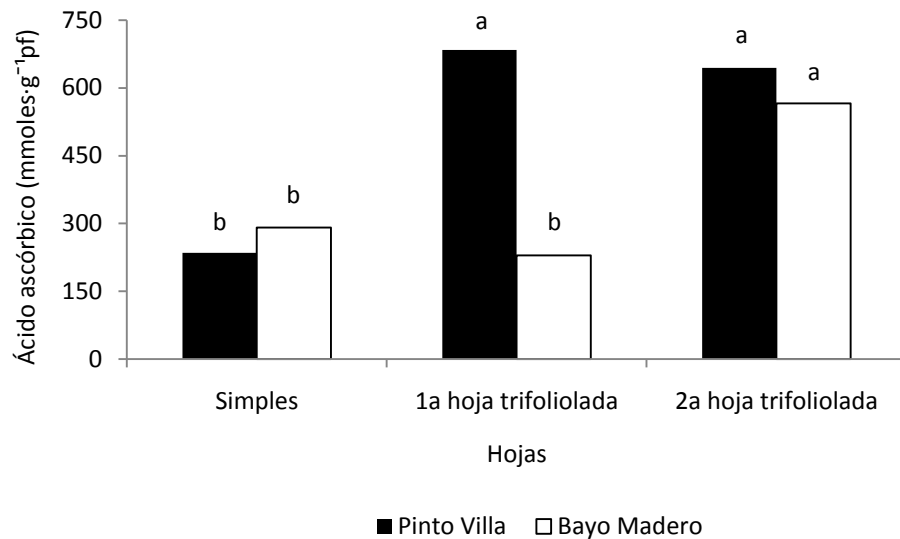
Anexo 39. Concentración de almidón (mg·g⁻¹pf) en las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero por efecto de los diferentes tratamientos de humedad.



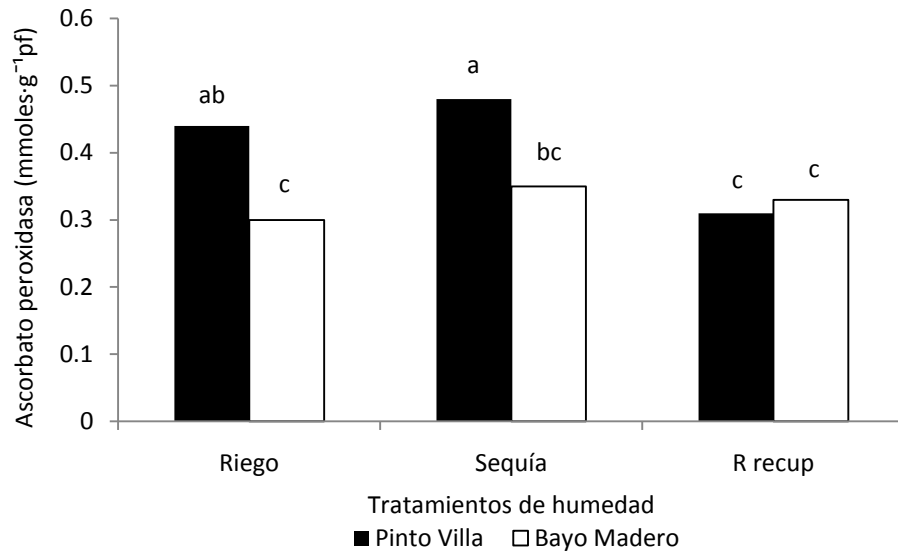
Anexo 40. Concentración de almidón (mg·g⁻¹pf) en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.



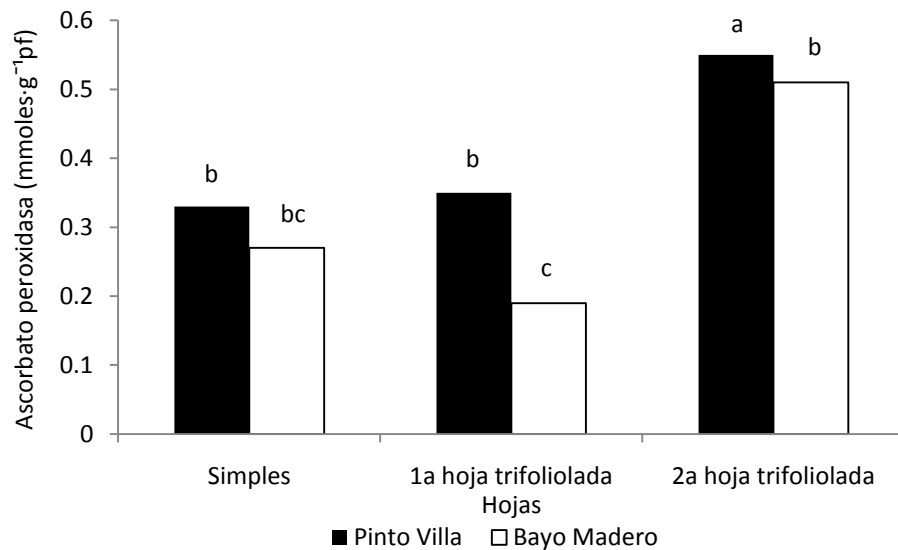
Anexo 41. Concentración de ácido ascórbico total (mmoles·g⁻¹pf) en las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Maderos por efecto de los tratamientos de humedad.



Anexo 42. Concentración de ácido ascórbico total (mmoles·g⁻¹pf) en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.



Anexo 43. Actividad de la enzima ascorbato peroxidasa (mmoles·g⁻¹·pf·min) en las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero por efecto de los tratamientos de humedad.



Anexo 44. Actividad de la enzima ascorbato peroxidasa (mmoles·g⁻¹·pf·min) en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.