



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO**

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUIMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DE
PLANTAS

***MECANISMOS DE RESISTENCIA A SEQUÍA PRESENTES
EN LA VARIEDAD DE FRIJOL COMÚN PINTO VILLA.
Participación de la movilidad de carbohidratos en la
resistencia a sequía de esta variedad.***

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

Sonia Marcela Cuéllar Ortiz

DIRECTOR DE TESIS: ALEJANDRA COVARRUBIAS ROBLES





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos y reconocimientos

La autora aprovecha el espacio para agradecer a: Mi mamá y mi papá por el amor que se siente pero no pesa y por respaldarme todo el tiempo de cerca y de lejos. A mis hermanos; Guille por ser referente de solidez, y por la comprensión con muy pocas palabras; y a Diego, por ser mi compañero de viaje, por mantenerme constante mente entrenada en la discusión crítica de las ideas políticas y por su disponibilidad inmediata para enseñarme estadística cada vez que es necesario. A mi cuñada Ana María, a Manu y a mis sobrinas Carlota y Antonia por los abrazos y los brinquitos sonrientes.

A mi familia extensa en Colombia, padres, hermanos, tíos, primos, abuelos y demás, por la confianza en las expectativas que este proceso del doctorado ha generado. A ellos y a mis maestros (Fernando Aguilar, Gabriel Henandez, Azu, Rubén, Pacho Murrillo, Ana Julia Sánchez, Eugenio Andrade, Indiana Bustos, Fabio Chaparro, José Gránez), por enseñarme desde siempre a valorar la razón como método, la ciencia como vocación, y el trabajo meticuloso y constante como estrategia.

A los amigos y compañeros durante la maestría: Isa, Gerardo, Lolita, Beto, Adriana y Mauricio, por ayudarme a llegar a México, y por permitirme ser tía de sus hijos.

Por supuesto, a mi familia en Cuernavaca: Odette, Alejandra, Gustavo, Liz, Erwin, Aura y Santiago, por la cotidianeidad, los abrazos, el amor, la risa, el llanto y por ayudarme a crecer cada día. A Pepe, Perla, Mafer y Aleu por el respaldo y el afecto brindados en palomitas de maíz y pláticas hasta la madrugada. A Geo Ponce por el Kinomishy, por acompañarme a entender y curar mis heridas, y por ayudarme a entender que la cabeza no lo soluciona todo.

A los miembros actuales y pasados del laboratorio de la Dra. Covarrubias y el Dr. Nieto: Emmanuel, Pancho, Ericka, Lucero, Bety, Fernando, Sergio, Luzma, JoseLuis, Chuy, y todos los demás; por el ambiente de trabajo grato y constructivo. En especial a: Marina, Rosy, Paz, Caty, Adriana, Yadira, Fernando

Ll. y Pepe, por el afecto y la ayuda crítica que me hizo mejor persona y mejoró mi trabajo.

A Ale, por su generosidad y afecto al enseñar, por su respaldo y consejo, por ser ejemplo de conocimiento, respeto., trabajo, espíritu científico y autocrítica, rigurosidad y ecuanimidad.

Al el Dr. Agustín López por permitirnos el uso del HPLC, y a Fernando González por ayudarme a usarlo.

A José Luis, María de Jesús, Adriana, y Citla, por su apoyo logístico en el laboratorio y el invernadero, que fue indispensable en el desarrollo del este trabajo.

Este trabajo se realizó con la financiación parcial del CONACyT (40603-Q y 50485-Q) y DGAPA-UNAM (IX-209704); y durante parte de su desarrollo la autora fue beneficiaria de la beca DGAPA-UNAM para estudios de postgrado y del auxilio de alimentación y hospedaje del IBT.

Resumen

Pinto Villa es una variedad mejorada resistente a sequía (INIFAP Mexico), en condiciones de sequía terminal presenta poca disminución de la productividad y alto índice de cosecha, contrario a lo que sucede en variedades como Canario 60. Estas dos variedades se usaron como modelo de resistencia/susceptibilidad para evaluar caracteres fenotípicos potencialmente relacionados con la resistencia a sequía en el frijol común. Los resultados sugieren que el contenido relativo de agua (CRA) y la conductividad estomática en las hojas, y el contenido de sacarosa y de almidón en vainas de dos semanas de desarrollo; son parámetros fenotípicos relacionados con la resistencia que ameritan ser validados para usarse en selección de líneas resistentes a sequía y/o en la identificación de marcadores moleculares de resistencia a esta limitante.

La distribución del carbono está relacionada con la resistencia a sequía en arroz, trigo y uva. Para indagar por este mecanismo en frijol común, se ejecutaron experimentos de pulso y caza con ^{14}C , sobre plantas de Pinto Villa y Canario 60 en condiciones de riego y de sequía. Los tratamientos de sequía indujeron incremento en el contenido de almidón en las vainas de la variedad resistente, y este incremento fue más evidente durante la etapa de establecimiento de las vainas. Consistente con lo anterior, las hojas de Pinto Villa mostraron una disminución del contenido de almidón durante la etapa de llenado del grano, en condiciones de sequía. Además, se observó que en condiciones de estrés hídrico las vainas de dos semanas de desarrollo de la variedad resistente acumulan grandes cantidades de sacarosa.

Los datos de este trabajo muestran que la distribución del carbono se afecta por la sequía favoreciendo el llenado del grano y que la modulación de este proceso es una estrategia adaptativa de la variedad resistente Pinto Villa. Nuestros datos indican que la resistencia en esta variedad está relacionada con la regulación del transporte de sacarosa en condiciones de sequía. Esta es la primera vez en que este tipo de estrategia se describe para leguminosas.

Abstract

In response to terminal drought, the drought resistant cultivar Pinto Villa (INIFAP Mexico) shows higher crop index when is compared to drought susceptible cultivars such as Canario 60. Those cultivars were used as model of resistance/susceptibility to test phenotypical markers related to drought resistance in common bean. Relative water content (RWC) and stomatal conductance in leaves are suggested for corroborate in other cultivars in order to use in selection and molecular marker identification. Also starch and sucrose contents in two-week-old pods reported differences in drought response between resistant and susceptible cultivar, and are suggested to use in molecular marker identification.

Carbon partition is related to drought tolerance in wheat, rice and grape. To test this mechanism in common bean, Pinto Villa (drought resistant) and Canario 60 (drought sensitive) plants grown with optimal irrigation or water deficit, were used in pulse and chase ^{14}C experiments. Starch and ^{14}C -starch were determined, both in leaves and pods, at different time points between pod initiation and pod maturation.

Water limitation treatment induces a larger increase of starch accumulation in the drought resistant cultivar pods than in pods of the drought sensitive cultivar. This increase is more evident in during the earlier stages of pod development in Pinto Villa plants under drought conditions. Consistently, a reduction in leaf starch was detected during the grain-filling phase in the drought resistant cultivar, when compared to the susceptible one. In addition, a sucrose accumulation occurs in young pods in the drought resistant cultivar under drought treatments.

The data in this work shows that carbohydrate partition is affected upon drought conditions in common bean, and that the modulation of this partition to favor grain filling has been a successful strategy in Pinto Villa a drought resistant cultivar. Furthermore our data suggest, that this drought resistance strategy is related to the modulation of sucrose transport. This is the first time that this kind of strategy is described for a legume.

Tabla de Contenido

	Pag
1.Introducción	1
1.1.El cultivo del frijol	2
1.1.1.El cultivo de frijol en el mundo	2
1.1.2.El cultivo del frijol en México	3
1.2.La planta de frijol	5
1.3.La sequía	6
1.3.1.Déficit hídrico y sequía	6
1.3.2.¿Qué le hace el déficit hídrico a las plantas?	7
1.3.3.Caracteres secundarios asociados con la resistencia a sequía.	9
1.4.La sequía y el frijol	12
1.4.1.Pinto Villa es una variedad de frijol común resistente a sequía,	14
1.5.La sequía y el metabolismo de carbohidratos	14
2.Hipótesis	19
3.Objetivos	19
3.1.Objetivos específicos	19
4.Materiales y métodos	21
4.1.Material vegetal	21
4.2.Condiciones de cultivo	21
4.2.1.En invernadero	21
4.2.2.En campo	22
4.3.Experimentos de sequía	23
4.3.1.En campo	23
4.3.2.En cámara de crecimiento	23
4.3.3.En invernadero	23

4.4.Determinación de parámetros potencialmente relacionados con la resistencia a sequía	25
4.4.1.Cobertura Foliar	25
4.4.2.Temperatura foliar	25
4.4.3.Contenido de clorofila	25
4.4.4.Conductividad estomática	26
4.4.5.Contenido Relativo de Agua	26
4.5.Contenido de almidón	26
4.6.Marca con $^{14}\text{CO}_2$	27
4.7.Actividades enzimáticas	27
4.7.1.Preparación del extracto:	27
4.7.2.Actividad de invertasa ácida.	28
4.7.3.Actividades de sacarosa sintasa e invertasa neutra	28
4.8.Detección de glucosa	29
4.8.1.Poder reductor medido mediante ácido di-nitrosalicílico (DNS)	29
4.8.2.Detección de glucosa mediante la formación de NADH	29
4.9.Determinación de azúcares por HPLC	29
4.10.Análisis estadísticos	30
5.Resultados	31
5.1.Búsqueda de parámetros relacionados con la resistencia a sequía en frijol	31
5.1.1.Contenido Relativo de Agua	33
5.1.2.Conductividad estomática	35
5.1.3.Parámetros relacionados con la productividad	39
5.2.Relación entre el metabolismo de carbohidratos y la resistencia a la sequía	40
5.2.1.Efecto de la sequía durante la etapa de llenado del grano, en la distribución de la biomasa.	40
5.2.2.La sequía afecta la partición del carbono en Pinto Villa	43

5.2.3.Efecto de la sequía durante la etapa de establecimiento de las vainas	48
- La sequía afectó la floración en la variedad Pinto Villa	49
- La sequía afecta el número y la biomas de las vainas de una y dos semanas en Pinto Villa.	50
- La sequía afecta el contenido de almidón por vaina, en las vainas jóvenes de la variedad Pinto Villa.	52
- La sequía afecta el contenido de marca incorporada en almidón en las vainas en etapa de establecimiento, de la variedad Pinto Villa	53
5.2.4.Efecto de sequía durante la etapa de establecimiento de las vainas, en el metabolismo de azúcares en la vaina.	55
6.Discusión	59
7.Conclusiones	70
8.Perspectivas	72
9.Bibliografía	73
Apéndices	83

Palabras Clave

Frijol (*Phaseolus vulgaris*), Sequía, Contenido Relativo de agua, Metabolismo de carbono, Almidón, Sacarosa, Transporte de sacarosa

1. Introducción

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es un cultivo de origen americano; se domesticó a partir de variedades silvestres de la misma especie, las cuales se distribuyen desde el norte de México hasta el norte de Argentina. Los reportes arqueológicos más antiguos de frijoles cultivados son de los Andes peruanos y datan de 8000 años antes de cristo (Singh, 1985).

Es ampliamente aceptado que la domesticación del frijol común ocurrió al menos en dos eventos independientes, los cuales dieron origen a dos acervos genéticos parcialmente aislados, uno mesoamericano y otro andino. Si bien los frijoles de origen mesoamericano, tanto silvestres como cultivados, se caracterizan por poseer semillas pequeñas respecto a las variedades andinas, al interior de ambos acervos existe una amplia diversidad en el color, el tamaño de la semilla y en el hábito de crecimiento (Gepts, 1998).

Al igual que en otras especies cultivadas, durante la domesticación del frijol se afectaron varias características de las plantas silvestres: se perdió la auto-dehiscencia dada por el enrollamiento de las vainas al secarse, disminuyó el número de semillas por vaina, creció el tamaño de las semillas y aumentó la variabilidad en los colores de la semilla (Singh, 1985). Otro factor importante en la domesticación del frijol fue la reducción de la polinización cruzada ya que en las variedades cultivadas es inferior al 6%, mientras que, dependiendo de las condiciones climáticas, algunas variedades silvestres que alcanzan hasta el 37% (Brunner & Beaver, 1989; Ferreira *et al.*, 2007).

A nivel fisiológico la domesticación introdujo dos cambios fundamentales: pérdida de la dormancia, que en las variedades silvestres es debida a la impermeabilidad de la testa; y relativa insensibilización al fotoperíodo, la cual le permite a las variedades cultivadas en los trópicos, florecer en días largos y llenar el grano antes de que empiece la estación seca al final del otoño (Gepts & Debouck, 1991).

1.1. El cultivo del frijol

El cultivo del frijol común es un cultivo diverso del cual se consumen las vainas verdes y las semillas secas. Esta diversidad le permite adaptarse a un amplio rango de ambientes, por lo cual se siembra en diversos territorios del mundo. De su centro de origen en América, en donde constituyó un alimento básico desde épocas precolombinas, el frijol fue llevado a Europa alrededor del año 1500 y de allí se dispersó a los otros continentes (Debouck, 1991)(Zeven, 1997). En la actualidad se siembra en los cinco continentes y la semilla seca de frijol es, después de la soya, la leguminosa de mayor comercialización en el mundo (Graham & Vance, 2003).

El frijol, como otras leguminosas, es particularmente importante en los países en desarrollo, ya que constituye un complemento proteico para alimentos como el maíz y el arroz, los cuales constituyen la fuente más importante de carbohidratos en estos países (Bressani, 1983).

1.1.1. El cultivo de frijol en el mundo

La producción total de frijol seco en el 2005 alcanzó 22.6 millones de toneladas métricas (ton), de las cuales el 36% se produjo en Asia (principalmente en India, Myanmar y China), América aportó el 31% (fundamentalmente Brasil, Estados Unidos y México), y en África se cosechó otro 31% (la mayor parte en Nigeria) (FAO, 2007). Hay que mencionar que independiente de la participación en la producción mundial, los mayores promedios de rendimiento se obtienen en Europa (que sólo participa con el 2% de la producción mundial) y en América desarrollada (USA y Canadá), en donde en el 2005 se alcanzaron rendimientos de 2,02 y 1.89 ton/Ha respectivamente. Esta situación contrasta con lo observado en Asia que en el mismo año llegó a 1,2 ton/Ha y con lo sucedido en América Latina y África que mostraron promedios de rendimiento inferiores a 1 ton/Ha en el mismo periodo (0.9 ton/Ha y 0.82 ton/Ha, respectivamente) (FAO, 2007).

El mejoramiento de la productividad de diferentes leguminosas ha sido considerado un elemento importante para incrementar la calidad de la nutrición y

por lo tanto la salud, de millones de consumidores particularmente en países en vías de desarrollo (FAO, 2000). En particular, el frijol se considera un cultivo clave en América Latina y África, ya que constituye una fuente importante de proteína en la dieta de las personas pobres en estas regiones (Graham & Vance, 2003).

1.1.2. El cultivo del frijol en México

El cultivo del frijol, junto con el cultivo del maíz, constituyen en México una tradición productiva y de consumo que cumple con diversas funciones de carácter alimentario y socioeconómico. Esta tradición se inició antes de la conquista lo cual se documenta en el Códice Mendocino escrito en 1540. En él se registran los tributos que recibía el emperador Moctezuma Xocoyotzin, entre los que se encontraban 500 toneladas de frijol al año (Figura 1) (Gepts & Debouck, 1991).



Figura 1. Folio 37r del Códice Mendoza 1540, en el que se indican los tributos que se entregaban al emperador Moctezuma Xocoyotzin, entre ellos 500 ton de frijol.

Aparte de su arraigo cultural, el frijol es uno de los cultivos de mayor importancia en México, ya que representa para la economía de los productores nacionales una fuente importante de ocupación e ingreso, a la vez que es una garantía de seguridad alimenticia (SIAP, 2002).

El frijol se cultiva en todas las regiones del país; los principales estados productores, en orden de importancia son: Zacatecas, Durango, Sinaloa, Chihuahua, Chiapas y Nayarit (Figura 2). En México se siembran alrededor de 1.8 millones de hectáreas al año de frijol y se logra una productividad promedio de 1.02 ton/Ha (SAGARPA, 2007). Este promedio de rendimiento es ligeramente superior a la media latinoamericana (0.90 ton/Ha), pero es considerablemente inferior al promedio de productividad del resto de Norte América (USA y Canadá) que, como ya se mencionó, es de 1.89 ton/Ha (FAO, 2007).

La producción de este grano en el ámbito nacional es muy vulnerable a las condiciones climatológicas que se presentan durante el ciclo de cultivo. Esto se debe a que más del 85% de la superficie sembrada con frijol en México carece de infraestructura de riego, de ahí que el principal factor limitante de la producción es, sin duda, la escasa e irregular disponibilidad de agua. Este fenómeno se agudiza en regiones con bajo régimen pluvial como en la meseta central mexicana, en la que se concentra más del 70% de la producción nacional (SAGARPA, 2007).

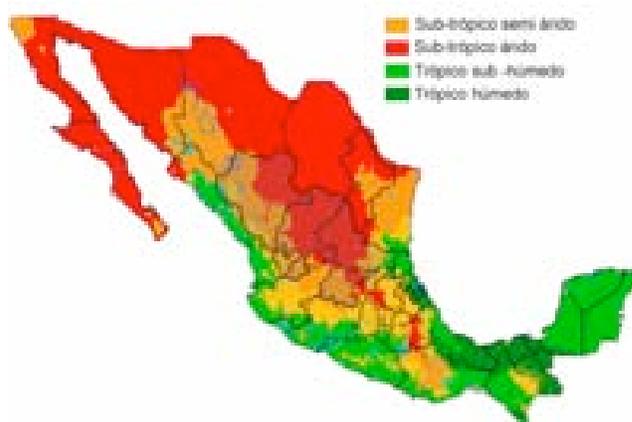


Figura 2. Mapa climático de México. En sombreado los estados de Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, y Guanajuato, en los que se siembra el 80% de la producción nacional de frijol. Fuente INIFAP.

En México, después de maíz, el frijol es el cultivo de mayor consumo y más del 90% de la producción se dedica al mercado interno. Adicionalmente se importan alrededor de 95 mil ton de frijol seco al año para satisfacer la demanda interna (7.6% del consumo interno) (FAO, 2007). Estas importaciones se explican porque la producción de este grano, prácticamente, no ha aumentado en los últimos 10 años (FAO, 2007), mientras que la población y el consumo sí lo han hecho.

1.2. La planta de frijol

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una especie diversa que incluye variabilidad en cuanto al tipo de semilla, al hábito de crecimiento, los potenciales de productividad y la tolerancia o susceptibilidad a diferentes tipos de estrés (Kelly *et al.*, 1998).

En relación con el hábito de crecimiento las variedades de frijol se clasifican en: (1) arbustivas de crecimiento determinado (hábito Tipo I), (2) arbustivas de crecimiento indeterminado (hábito Tipo II), (3) postradas de crecimiento indeterminado (hábito Tipo III) y (4) trepadoras de crecimiento indeterminado (hábito Tipo V). Las variedades arbustivas presentan un ciclo corto porque su floración es rápida, y las vainas maduran todas al tiempo lo que facilita su cosecha (FENALCE, 2007). Al contrario, en las variedades de hábito de crecimiento indefinido, el crecimiento vegetativo continúa después de la floración, y eso hace que en la misma planta coincidan vainas de diferentes etapas de desarrollo (Dawo *et al.*, 2007). Sin embargo, las variedades de hábito indefinido presentan plasticidad fenológica que les permite cierto grado de adaptabilidad a los cambios de las condiciones climáticas (Acosta-Gallegos & White, 1995). Dicha adaptabilidad consiste en acortar el período reproductivo si las condiciones climáticas son adversas. En condiciones óptimas estas variedades continúan acumulando biomasa después de iniciada la etapa reproductiva, por esta razón las variedades de hábito indeterminado acumulan más biomasa que las variedades de hábito determinado (Acosta-Gallegos & Kohasashi-Shibata, 1989; Dawo *et al.*, 2007).

El desarrollo de las vainas en el frijol como en otras leguminosas se divide en tres etapas dependiendo de los procesos fisiológicos del embrión:

1. *Establecimiento de la vaina*, la cual corresponde a la formación del embrión. Durante esta etapa las células de los cotiledones se encuentran en división y se alimentan vía apoplasto con hexosas provenientes del endospermo o de la cubierta de la semilla.
2. *Llenado del grano*, que corresponde a la fase de almacenamiento en la semilla. Durante esta etapa las células del cotiledón se expanden y almacenan almidón y proteínas.
3. *Madurez de las vainas*, que corresponde al proceso de desecación de las semillas. Durante esta etapa, la semilla acumula proteínas y otras moléculas necesarias para confrontar la desecación y la posterior germinación (Oliker *et al.*, 1978; Weber *et al.*, 1995; Dejardin *et al.*, 1997; Abirached-Darmency *et al.*, 2005).

Como cualquier cultivo no perenne, durante y después de la maduración de las vainas, la planta pierde las hojas y entra en un programa de senescencia. En frijoles cultivados, los agricultores sincronizan el ciclo de cultivo de forma que la senescencia comúnmente coincide con los periodos de sequía.

1.3. La sequía

1.3.1. Déficit hídrico y sequía

Se define como déficit hídrico para las plantas, la condición en la cual la transpiración a través de las hojas excede la absorción de agua por parte de la raíz. El déficit hídrico se presenta en situaciones ambientales tales como: déficit de agua (por falta de lluvia o irrigación), por un incremento en la concentración de sales en el suelo (típicamente, la alta salinidad), o por bajas temperaturas que provocan que el agua del apoplasto se congele y, por lo tanto, disminuya la cantidad de agua disponible. Cuando el déficit hídrico persiste por periodos prolongados, genera una situación de estrés. Se llama sequía a una condición en

la que las plantas sufren déficit hídrico por periodos de tiempo prolongados causados por falta de agua.

El déficit hídrico afecta el crecimiento y la reproducción de las plantas, y por lo tanto afecta la productividad de los cultivos. Se ha estimado que diferentes cultivos reducen su producción en un promedio de 69% cuando se someten a condiciones de limitación de agua (Bray, 2001).

En las últimas décadas el estudio de las respuesta de las plantas al déficit hídrico, tomó relevancia por la ampliación de la frontera agrícola a territorios en donde la lluvia es escasa y por la creciente desertificación de zonas agrícolas debido al desgaste de los suelos y al cambio climático (UNESCO-WWAP, 2003). A esta situación se suma la presión que ejerce el incremento en la demanda de bio-combustibles, mucho de los cuales actualmente se obtienen de cultivos que consumen altas cantidades de agua, como el maíz o la caña de azúcar (Fraiture *et al.*, 2008; Schnoor *et al.*, 2008).

Ante este panorama; considerando que la agricultura consume el 80% del agua dulce que se utiliza en el mundo, y frente al conflicto que plantea la insuficiencia de agua para consumo humano, y la demanda de este liquido para la producción de alimentos y de energía; el estudio del efecto del déficit hídrico en las plantas, en particular las de uso humano, resulta especialmente relevante (Jury & Henry Vaux, 2005).

1.3.2. ¿Qué le hace el déficit hídrico a las plantas?

El contenido de agua en una planta depende de la proporción entre agua traspirada por las hojas y agua absorbida por la raíz. Cuando la disponibilidad de agua en el suelo disminuye, y consecuentemente baja la absorción de la misma, las plantas limitan la transpiración cerrando sus estomas. Con esta medida la planta evita exponer a sus células a estrés osmótico, el cual implicaría la pérdida de turgencia y en casos severos muerte celular. Sin embargo, si el cierre de los estomas se prolonga se reduce la captura de CO₂ y la planta pierde el abasto de moléculas carbonadas; lo cual a la larga afectará su crecimiento, desarrollo y productividad en el caso de los cultivos (Bray, 2001).

El déficit hídrico afecta la distribución de la biomasa, afecta directamente a la fotosíntesis, aumenta la tasa de foto-respiración, disminuye el contenido de clorofila, daña a los cloroplastos por foto-inhibición, afecta la permeabilidad de la membrana y, en casos de sequía severa, produce daño en los cloroplastos y envejecimiento prematuro de las hojas. El estrés hídrico además, abate la síntesis de proteínas, afecta la actividad de múltiples enzimas, induce desnaturalización de proteínas y promueve la acumulación de especies reactivas de oxígeno que dañan por oxidación a diferentes componentes celulares (Munné-Bosch *et al.*, 2001; Noctor *et al.*, 2002; Parry *et al.*, 2002; Tezara *et al.*, 2002; Luna *et al.*, 2005).

El efecto combinado de todo lo anterior hace que la limitación de agua afecte el crecimiento y la producción de las plantas. El grado de afección depende del genotipo y de la etapa de desarrollo en la que se encuentra la planta en el momento de la imposición de la restricción hídrica. Por ejemplo, las semillas y otras estructuras reproductivas como el polen o las esporas, que incluyen en su maduración etapas de deshidratación severa, son mucho más tolerantes al estrés osmótico que las flores o las plántulas (Bänziger *et al.*, 1996; Acosta-Díaz *et al.*, 1997; Andersen *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2006).

En las plantas, el déficit hídrico da lugar a un conjunto de respuestas que comienzan con la percepción del estrés y se manifiestan en cambios a nivel celular y fisiológico como los que se mencionan arriba; así como cambios en los patrones de desarrollo. A la fecha, no está totalmente claro cuál es el mecanismo de percepción de la sequía, pero se ha supuesto que este se relaciona con la pérdida de la turgencia (Bray, 1997; Bray, 2001). En muchos de los fenómenos involucrados en la respuesta al déficit hídrico, como el cierre de estomas y la reducción del crecimiento, se ha probado que la fitohormona ácido absícico (ABA) actúa como un mediador (Leung & Giraudat, 1998).

Después de que se ha percibido el estímulo, directamente o mediante la acumulación de ABA, en la planta se desencadena una cascada de señales. Las respuestas a estas señales son el resultado de modificaciones en la expresión genética, regulación de la síntesis de proteínas y modificaciones en la actividad de

algunas enzimas. Dependiendo de la severidad y duración del estrés, estos cambios dan lugar a respuestas a corto y largo plazo. La conjugación de estos factores determina si una planta resiste o no, a la condición estresante (Bray, 2001; Zhu, 2002; Bray, 2004).

La resistencia a la sequía es la habilidad de completar el ciclo reproductivo en condiciones de falta de agua. En términos agronómicos, se considera resistencia a la capacidad, de una línea o variedad, de mantener adecuados niveles de productividad en condiciones de sequía (Bray, 1997). La resistencia a la sequía proviene de: la habilidad: para evadir el efecto del déficit de agua y/o para tolerar la deshidratación.

Dentro de las estrategias que procuran evadir el estrés osmótico se encuentran: la regulación del cierre de estomas, la disminución de la transpiración mediante el ajuste de la fotosíntesis (C4 y CAM), el ajuste del ciclo reproductivo a los periodos de lluvias, y el desarrollo de modificaciones anatómicas que permiten reducir la transpiración, acumular agua o aumentar la captura de agua (Bray, 2001; Chaves *et al.*, 2002).

El otro tipo de estrategias para confrontar la sequía se relacionan con disminuir los efectos de la falta de agua. A esta categoría pertenecen: la regulación del potencial osmótico, que permite retener el agua y facilitar su absorción en condiciones de baja disponibilidad en el suelo (Babu *et al.*, 1999); la inducción de la síntesis de proteínas protectoras como las chaperonas o las proteínas LEA (Reyes *et al.*, 2005); la activación de mecanismos para reparar los daños causados por la escasez de agua; como la activación de enzimas que eliminan las especies reactivas de oxígeno evitando con ello la oxidación de componentes celulares, entre otros (Munne-Bosch & Alegre, 2003; Hernandez *et al.*, 2004; Luna *et al.*, 2005; Reyes *et al.*, 2005)

1.3.3. Caracteres secundarios asociados con la resistencia a sequía.

La resistencia a la sequía de una planta o cultivo depende de la combinación de los mecanismos mencionados y es diferente en cada especie. Como se mencionó, la resistencia se define y evalúa mediante la reducción de la biomasa cultivable en

una condición de estrés particular. Es decir, la resistencia a sequía sólo se puede evaluar comparando la producción en déficit de agua con la producción en condiciones óptimas. Esta evaluación, en la mayoría de cultivos sólo se puede hacer al final del ciclo reproductivo de las plantas, lo cual implica grandes costos en tiempo y dinero que dificultan el desarrollo de nuevas variedades resistentes. Por esta razón, en diferentes cultivos especialmente en cereales, se han estudiado algunos caracteres secundarios y se ha mostrado que presentan alta correlación con la resistencia a la sequía, lo cual los constituye en una herramienta valiosa como marcadores en la selección de nuevos genotipos y en el establecimiento de marcadores moleculares (Beaver *et al.*, 2003; Graham & Vance, 2003; Jiménez-Bremont *et al.*, 2006).

Cuando se pretende establecer caracteres secundarios para usarlos como marcadores de resistencia a algún estrés, se busca que estos caracteres presenten reproducibilidad, detección precoz y facilidad de medición; de ahí que se buscan parámetros que se puedan medir en estados tempranos del desarrollo de las plantas, tal es el caso de algunos indicadores de vigor como el tamaño o la biomasa en estadios juveniles (Lafitte *et al.*, 2003).

Otro tipo de caracteres asociados con la resistencia a sequía se relacionan con el efecto del déficit de agua sobre la tasa fotosintética y sobre la transpiración; entre ellos se han sugerido: la temperatura foliar, el contenido de clorofila y la tasa de transpiración.

Temperatura foliar. Se refiere a la temperatura de las hojas y del micro-ambiente de la planta. Depende de la tasa de transpiración y es, por lo tanto, un indicador indirecto de la conductividad estomática. En arroz se ha encontrado que, genotipos que en condiciones de sequía mantienen la temperatura foliar baja durante la etapa previa a la floración, presentan mayor productividad en esta condición estresante (Lafitte *et al.*, 2003; Reynolds *et al.*, 2007).

El contenido de clorofila. Es un indicador indirecto de la actividad fotosintética y de la habilidad para mantener la tasa fotosintética en condiciones de estrés

(Araus *et al.*, 1997). Se le ha considerado como un carácter asociado con la resistencia por ser un parámetro altamente reproducible y que no depende de las condiciones climáticas al momento de tomar la lectura (Lafitte *et al.*, 2003).

Tasa de transpiración o conductividad estomática. Se ha mostrado que correlaciona con la fotosíntesis neta y con el contenido de CO₂ en el mesófilo en *Arabidopsis* y arroz (Juenger *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2008). En casos como el del girasol, se ha observado que correlaciona con el potencial de agua en las hojas (Hervé *et al.*, 2001). Se ha reportado que existe variabilidad genética en este carácter y se han identificado QTLs relacionados con la conductividad estomática en *Arabidopsis thaliana* (Juenger *et al.*, 2004) y en girasol (Hervé *et al.*, 2001). En el frijol común se ha estudiado la tasa de transpiración en condiciones de sequía, pero no se ha encontrado una relación clara con la resistencia (Sánchez-Blanco *et al.*, 1998; Aguirre *et al.*, 1999).

Un tercer grupo de parámetros asociados con la resistencia a sequía se relaciona con el uso del agua, y la habilidad para hacer ajuste osmótico, como el desarrollo de la raíz y el contenido relativo de agua.

Contenido Relativo de Agua (CRA). Desde la década de los cincuenta se mostró que el CRA o RWC (por sus siglas en inglés: 'Relative Water Content'), calculado de diferentes formas, se relaciona con el potencial osmótico de las hojas (Wearherley, 1950; Jordan & Ritchie, 1971; Sánchez-Díaz & Aguirreola, 1993) y con otros parámetros indicadores del contenido de agua en las hojas (Price *et al.*, 2002). Se ha demostrado que los cambios en el potencial osmótico de las hojas en condiciones de estrés reflejan la capacidad de algunas plantas de hacer ajuste osmótico; esto es, de acumular solutos compatibles en condiciones de sequía para disminuir el potencial osmótico citoplasmático y, con ello, evitar la pérdida de agua y facilitar su

captación por parte de la raíz (Babu *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999; Lafitte *et al.*, 2003).

Finamente el cuarto grupo de caracteres secundarios asociados con la resistencia a sequía, se relacionan con el efecto del déficit hídrico sobre el vigor de las plantas adultas; el parámetro más usado en este grupo es la cobertura foliar

La cobertura foliar es un parámetro ampliamente usado en agronomía ya que se relaciona directamente con la biomasa de la planta y permite hacer muestreos no destructivos (Casa *et al.*, 2007). Además, la cobertura foliar es un indicador de la arquitectura de la planta y, por lo tanto, refleja su estado general y su habilidad para interceptar la radiación solar. Se le ha usado para medir el efecto de condiciones limitantes como el déficit hídrico y para evaluar el efecto de las mismas sobre diferentes genotipos (Martínez, 2001).

1.4. La sequía y el frijol

El 60% de la producción mundial de frijol se siembra bajo condiciones de temporal, esto es, utilizando el agua que se obtiene de la lluvia (FAO, 2005). En América Latina, el 73% de la producción se da en microregiones en donde se presentan condiciones de déficit hídrico, desde moderado hasta severo a lo largo del ciclo de crecimiento de la planta, lo cual hace que este cultivo sea muy vulnerable a las condiciones ambientales (CIAT, 2001). Esta vulnerabilidad implica que diferentes formas de sequía pueden reducir la productividad del cultivo de frijol en más del 80% (Acosta-Gallegos & Kohasashi-Shibata, 1989), lo cual ha llevado a considerar al déficit hídrico como una de las limitantes más importantes para el rendimiento de este cultivo (Singh, 1995; Beaver *et al.*, 2003; Miklas *et al.*, 2006). Debido a esta problemática, en México como en otros países, se han implementando programas de mejoramiento que han conducido a obtener variedades de frijol común resistentes a sequía. Estas importantes contribuciones se han conseguido superando diferentes limitaciones que enfrenta el mejoramiento para sequía tales como: (a) la complejidad de la respuesta de la

planta a esta condición ambiental adversa, (b) la variabilidad en las condiciones para efectuar la selección y (c) la interferencia de las interacciones genotipo-ambiente que dificultan la definición de caracteres asociados a la resistencia a sequía (Ramírez-Vallejo & Kelly, 1998; Miklas *et al.*, 2006). Estas restricciones hacen que la obtención de nuevas variedades resistentes a sequía sea un proceso largo, difícil y costoso (Singh, 1995).

En frijol no se han identificado caracteres secundarios claramente asociados con la respuesta a sequía. Tampoco se ha establecido a nivel molecular cuales son los componentes de la resistencia a sequía en este cultivo (Schneider *et al.*, 1997a; Kelly *et al.*, 1998; Graham & Vance, 2003; Miklas *et al.*, 2006).

En relación con la respuesta a sequía del frijol, a la fecha se sabe que:

1. Las flores y las vainas en las etapas de establecimiento son los órganos más susceptibles a sequía, ya que la limitación de agua durante estas etapas promueve el aborto de flores y vainas reduciendo así la productividad. El estrés aplicado durante el llenado del grano no promueve el aborto de las vainas; sin embargo, afecta la productividad porque reduce drásticamente al número de semillas por vaina (Acosta-Díaz *et al.*, 1997).
2. Las variedades de hábito indefinido que presentan plasticidad fenológica muestran mejores rendimientos frente a la sequía, debido a su adaptabilidad y mayor potencial para acumular biomasa (Acosta-Gallegos & Kohasashi-Shibata, 1989).
3. Las raíces de mayor longitud o mayor biomasa, tienen la habilidad de responder adecuadamente a la limitación de agua, por lo que ayudan a mantener la productividad en condiciones de sequía (Subbarao *et al.*, 1995; Miklas *et al.*, 2006).
4. También se ha propuesto que la anatomía de la hoja y la frecuencia de estomas, la concentración de prolina y la actividad de proteasas foliares son caracteres secundarios asociados con la resistencia a sequía en frijol (Jager & Meyer, 1977; Cruz-de-Carvalho *et al.*, 2001; Navea *et al.*, 2002; Jiménez-Bremont *et al.*, 2006); sin embargo, ninguno de ellos se ha validado claramente.

Existen caracteres secundarios asociados con la resistencia a sequía que se han usado en otras especies y que no se han explorado a fondo en frijol, en este trabajo se abordaron algunos de estos parámetros, como el contenido relativo de agua, la temperatura foliar, la cobertura foliar, la conductividad estomática y el contenido de clorofila.

1.4.1. Pinto Villa es una variedad de frijol común resistente a sequía,

Liberada por el INIFAP en 1995, Pinto Villa es una variedad de hábito de crecimiento indeterminado, ampliamente usada en la meseta central mexicana porque su productividad no disminuye tan drásticamente en condiciones de sequía, en comparación con otras variedades susceptibles a sequía, incluso frente a algunas variedades consideradas resistentes (Acosta-Gallegos *et al.*, 1995; Acosta-Gallegos *et al.*, 1997; Rosales-Serna *et al.*, 2000; Terán & Singh, 2002; Beaver *et al.*, 2003; Graham & Vance, 2003).

En estudios de campo se ha observado que la variedad Pinto Villa en condiciones de sequía no disminuye su índice de cosecha, y se ha sugerido que en ésta variedad la movilidad del carbono es un elemento clave de la resistencia a sequía (Rosales-Serna *et al.*, 2000; Rosales-Serna *et al.*, 2003).

1.5. La sequía y el metabolismo de carbohidratos

Existe un vínculo entre el metabolismo de carbono y el efecto de la sequía, que se ha documentado en cereales como maíz, arroz y trigo (Yang *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2003; Trouverie & Prioul, 2006) en uva (Bota *et al.*, 2004), y en solanáceas como la papa (Geigenberger *et al.*, 1997) y el chile (Marcelis *et al.*, 2004).

El almidón es el polisacárido de almacenamiento más usado por las plantas, y constituye una reserva de carbono tanto a corto como a largo plazo. El carbono que las plantas incorporan mediante la fotosíntesis se almacena temporalmente en las hojas en forma de almidón. En las hojas, que son el “órgano fuente” por excelencia, el almidón se degrada para sintetizar sacarosa que se transporta por el floema hacia los órganos heterotróficos y/o hacia los órganos especializados para el almacenamiento, a ambos se les considera “órganos vertedero”. Uno de

estos vertederos es la semilla. En la semilla la sacarosa se degrada a hexosas que se consumen en el metabolismo del embrión o se almacenan de nuevo en forma de almidón, el cual servirá de reserva para la nueva plántula.

En diferentes especies e incluso en diferentes variedades dentro de la misma especie, la sequía afecta de forma diferente al metabolismo de carbono y la relación fuente/vertedero.

En algunas especies los cambios que promueve el déficit de agua en la relación fuente/vertedero, causan pérdidas en los cultivos. Este es el caso del maíz y el chile, en donde se ha observado que esta condición de estrés promueve el aborto de estructuras reproductivas, debido al desabastecimiento de fotosintatos (Boyer & Westgate, 2004; Marcelis *et al.*, 2004). El suplemento de sacarosa aplicado a tallos de plantas de maíz sometidas a déficit hídrico, contrarresta parcialmente la pérdida de embriones causada por sequía. Esto indica que el aborto de embriones causado por déficit hídrico se debe a la falta de fotoasimilados (Zinselmeier *et al.*, 1999); o bien, está relacionado con una señal que se desencadena por ausencia de sacarosa o de las hexosas que se producen al degradar la sacarosa (Boyer & Westgate, 2004).

En el mismo sentido, en discos de tubérculo de papa se observó que tratamientos con manitol afectan la distribución del carbono (también llamada partición del carbono), favoreciendo la síntesis de sacarosa en lugar de la síntesis de almidón. Esto se atribuye a la activación de la enzima sacarosa fosfato sintasa (SPS), responsable de la síntesis de sacarosa, y a la inactivación de la ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa) que es la enzima determinante de la síntesis de almidón (Geigenberger *et al.*, 1997).

En células de papa en cultivo también se ha observado que el estrés osmótico induce un aumento en la actividad de SPS, al tiempo que aumenta la actividad de enzimas relacionadas con la degradación de sacarosa, como las invertasas y la sacarosa sintasa, promoviendo así lo que se ha llamado el ciclo fútil de la sacarosa (Wang *et al.*, 2000).

En cereales como en leguminosas, se sabe que el abasto de hexosas para el establecimiento del embrión depende, al menos en alguna etapa de su desarrollo, de la degradación de sacarosa por actividad de invertasas (Dejardin *et al.*, 1997; Zinselmeier *et al.*, 1999). En embriones de maíz se ha sugerido que el efecto del déficit hídrico sobre, una invertasa vacuolar (*Ivr2*), es el responsable del aborto de embriones jóvenes, ya que tanto el RNA mensajero, como la actividad de esta enzima disminuyen por efecto de la limitación de agua en las semillas inmaduras. De esta forma, el estrés por déficit hídrico podría afectar la disponibilidad de hexosas en el embrión y el transporte de sacarosa al interior de la semilla (Andersen *et al.*, 2002). También en relación con la degradación de sacarosa, se reportó que en semillas de *Lupinus albus*, la actividad de invertasa citosólica disminuye cinco veces por efecto de una condición de sequía moderada (Pinheiro *et al.*, 2005). En hojas de maíz se observó que la expresión del gen *Ivr2* se induce por sequía y por tratamientos con ABA, al tiempo que aumenta la actividad de la enzima, lo cual conduce a la acumulación de glucosa y fructosa en hojas de plantas sometidas a sequía. Se ha sugerido que este resultado tiene como consecuencia una disminución en la disponibilidad de sacarosa para ser transportada hacia los granos (Kim *et al.*, 2000; Trouverie *et al.*, 2003; Trouverie *et al.*, 2004). Estas observaciones concuerdan con los resultados obtenidos en hojas de *Lupinus* sometidas a déficit hídrico, en donde la actividad de invertasa vacuolar aumenta en respuesta a la limitación de agua (Pinheiro *et al.*, 2001).

Todos estos efectos del déficit hídrico sobre la relación fuente/vertedero podrían ser la causa de pérdidas en los cultivos por deficiencias en la acumulación de almidón, y/o en la provisión de sacarosa o hexosas, lo que causaría el aborto de las estructuras reproductivas.

A diferencia de los efectos negativos observados en maíz papa y *Lupinus* que se presentaron hasta ahora, en otros cultivos como el trigo, arroz y uva se ha establecido que la acumulación y la movilización de carbohidratos no estructurales, entre órganos fuente y vertedero, está relacionada con la resistencia a sequía (Schnyder, 1993; Bota *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2004a). Particularmente,

en trigo y arroz se ha mostrado que la sequía, y la hormona ABA, activan la degradación de carbohidratos de almacenamiento en el tallo, que en estos cereales es un órgano de reserva temporal. Al tiempo, tratamientos de sequía y aplicaciones exógenas de ABA inducen la acumulación de almidón en el grano, acelerando el proceso de llenado del mismo (Yang *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2004b).

En cuanto a los mecanismos reguladores de este proceso, en cereales se ha mostrado que la actividad de la sacarosa sintasa (Susy) (enzima encargada de la degradación de sacarosa) y la actividad de la ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa) (enzima determinante en la síntesis de almidón) aumentan en el grano de trigo en formación por efecto del déficit hídrico (Muller-Rober *et al.*, 1992). Adicionalmente, Yang y colaboradores demostraron que la tasa de acumulación de almidón en el grano correlaciona con la acumulación del ABA Y que la aplicación de fluridona, un inhibidor de la síntesis de ABA, induce una reducción en la actividad de las enzimas relacionadas con la síntesis de almidón como son: la sacarosa sintasa (SuSy), la AGPasa, la sintasa de almidón y la enzima ramificante (Yang *et al.*, 2004b). Los mismos autores han observado que enzimas relacionadas con la degradación de almidón como son las α y β amilasas, así como las enzimas relacionadas con la síntesis de sacarosa, como la SPS, se activan en tallos de arroz en respuesta al déficit hídrico (Yang *et al.*, 2001), y que la activación de la SPS se correlaciona con la acumulación del ABA (Yang *et al.*, 2002).

Dado que el efecto de la sequía sobre el índice de cosecha en la variedad de frijol Pinto Villa es reducido comparado con el que se produce en otras variedades, se ha propuesto que en frijol, una eficiente removilización de los fotoasimilados podría estar involucrada en la resistencia a sequía en esta variedad y posiblemente en otras relacionadas (Rosales-Serna *et al.*, 2003; Miklas *et al.*, 2006).

Con el objetivo de verificar tal propuesta y tratar de relacionar algunos procesos y mecanismos metabólicos con la resistencia a sequía en el cultivo de frijol, en este trabajo se abordó la pregunta de si existe en frijol un mecanismo por el cual la movilidad de fotoasimilados hacia las semillas se induce o favorece a causa del déficit hídrico y, de ser el caso si este mecanismo se relaciona con la resistencia a sequía.

2. Hipótesis

- Es posible identificar caracteres fenotípicos que se relacionen con la resistencia a sequía en la variedad Pinto Villa.
- Uno de los mecanismos de resistencia a sequía en frijol está relacionado con una mayor eficiencia en la translocación de carbohidratos hacia la vaina

3. Objetivos

Evaluar la utilidad en frijol de parámetros fenotípicos y fisiológicos relacionados con resistencia a sequía en otros cultivos.

Establecer si la regulación del metabolismo de carbohidratos y/o su translocación a la semilla, cambia por efecto del déficit hídrico, en la variedad resistente a sequía Pinto Villa.

3.1. Objetivos específicos

- ♦ Comparar el comportamiento de diferentes caracteres asociados con resistencia a sequía, en las variedades Pinto Villa y Canario 60 (resistente y susceptible a sequía, respectivamente) sometidas a restricción hídrica.
- ♦ Comparar el contenido de almidón en órganos vertedero y fuente de plantas sometidas a déficit hídrico, con respecto a plantas mantenidas en condiciones de irrigación óptima, tanto en la variedad Pinto Villa, como en Canario 60.
- ♦ Identificar el destino de los carbohidratos generados en plantas de Pinto Villa y Canario 60 sometidas a déficit hídrico o a condiciones de irrigación óptima. .
- ♦ Determinar la actividad de invertasa acida y neutra, y sacarosa sintaza, en vainas de plantas de Pinto Villa y Canario 60 sometidas a déficit hídrico o a condiciones de irrigación óptima.

- ♦ Comparar el contenido de azúcares solubles en vainas y hojas de plantas de Pinto Villa y Canario 60 sometidas a déficit hídrico o a condiciones de irrigación óptima

4. Materiales y métodos

4.1. Material vegetal

Se usaron dos variedades de frijol: la variedad mejorada Pinto Villa que pertenece a la raza Durango, acervo genético mezoamericano, tiene hábito de crecimiento indeterminado (tipo III) y se caracteriza porque en condiciones de sequía presenta una baja disminución de la productividad en comparación con otras variedades susceptibles a sequía e incluso en comparación con algunas variedades catalogadas como resistentes (Acosta-Gallegos *et al.*, 1995; Acosta-Gallegos *et al.*, 1997; Rosales-Serna *et al.*, 2000; Terán & Singh, 2002); y la variedad Canario 60 que pertenece a la raza Nueva Granada, acervo genético andino, la cual tiene un hábito de crecimiento determinado, y cuya productividad disminuye hasta en un 70% en condiciones de sequía. Por esto último se usa como control susceptible en estudios relacionados con déficit hídrico (Jiménez-Bremont *et al.*, 2006).

4.2. Condiciones de cultivo

4.2.1. En invernadero

Plantas de ambas variedades se crecieron en invernadero a una temperatura de 24 °C +/- 4 °C y a una humedad relativa del 70% +/- 20%, con luz natural en ciclo de 12/12 horas luz/oscuridad, oscureciendo el invernadero con cortinas cuando fue necesario. Las semillas fueron escarificadas para homogeneizar la germinación y se sembraron directamente en macetas de dos kilos usando como sustrato una mezcla de Vermiculita:Metromix 200 (70:30) (Hummert S. A., México). Las plantas, una en cada maceta, se regaron cada tercer día de acuerdo con los requerimientos de cada maceta en cada tratamiento. Dos veces por semana se aplicó la siguiente solución nutritiva: KNO₃ 5 mM, KH₂PO₄ 2.5 mM, MgSO₄ 2mM, Ca(NO₃)₂ 2mM, Fe(EDTA) 0.5 mM, , H₃BO₃ 0.07 mM, MnCl₂ 0.014 mM, CuSO₄ 0.005 mM, ZnSO₄ 0.001 mM, Na₂MoO₄ 0.2 μM, NaCl 10 μM, CoCl₂0.01 μM .

En cada maceta se sembraron tres o cuatro semillas, a las dos semanas de la siembra se escogió una planta por maceta y se seleccionaron macetas con plantas en buen estado y homogéneas entre si. En esta fecha las macetas seleccionadas se distribuyeron en el invernadero de acuerdo con el diseño experimental. Se usó un diseño experimental de bloques al azar (ver Apéndice 1); ya que se usó un diseño de bloques completos, cada bloque contenía una maceta de cada tratamiento. En cada ocasión, los bloques a muestrear o cosechar se seleccionaron mediante números aleatorios. En todos los experimentos se dejaron al menos dos bloques completos de macetas en cada extremo de las mesas para que actuaran de borde del experimento.

4.2.2. En campo

Los experimentos de campo se llevaron a cabo en el Campo Experimental Bajío del INIFAP, Celaya, Guanajuato. Se sembró el 19 de junio del 2002 de forma que el establecimiento de las plantas y la etapa vegetativa del cultivo ocurriera al final de la temporada de lluvias, de acuerdo con la pluviosidad histórica de la zona. Las semillas se sembraron directamente en el suelo y recibieron la fertilización y los cuidados culturales usuales en este campo experimental. A las parcelas se les aplicó riego por escurrimiento dependiendo de los requerimientos de cada tratamiento. Se usó un diseño experimental de parcelas al azar, con 3 repeticiones para cada tratamiento y parcelas de borde entre y entorno a cada tratamiento (ver Apéndice 2). Para los muestreos de contenido relativo de agua y conductividad estomática se seleccionó al azar una o dos plantas de la porción intermedia de cada parcela en cada tratamiento, hasta completar cuatro plantas por tratamiento. Para establecer los parámetros de productividad se seleccionaron tres o cuatro plantas de la porción interna de cada parcela en cada tratamiento, hasta completar 10 plantas.

4.3. Experimentos de sequía

4.3.1. En campo

Se usaron tres regímenes de riego: 1. *Temporal*, en el que las plantas obtuvieron el agua de la lluvia.; 2. *Riego*, en el que dependiendo de los requerimientos, se aplicaron tres o cuatro riegos por escurrimiento para mantener el suelo a capacidad de campo durante todo el experimento; 3. *Sequía*, en donde, dado que se presentaron lluvias inesperadas, se cubrieron los surcos con plástico para evitar que la tierra se mojara. Para verificar la restricción hídrica, se midió el contenido de agua en el suelo a 20 cm de profundidad el día que se hicieron las mediciones, para lo cual, se tomaron muestras de suelo de volumen constante; las cuales se pesaron antes y después de secado en horno (los resultados se incluyen en el Apéndice 2).

4.3.2. En cámara de crecimiento

Las semillas de Pinto Villa y Canario 60 se sembraron sobre papel humedecido en charolas cubiertas para lograr una cámara húmeda, y se mantuvieron en cuarto de crecimiento oscuro a 28 °C, durante cuatro días. En este punto se seleccionaron aquellas plántulas que presentaran una longitud aproximada de alrededor de 4 cm y se transplantaron a vermiculita. Para el tratamiento de sequía, la vermiculita se hidrató con 1/12 de la cantidad de agua necesaria para estar en capacidad de campo ($0.42 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$); para el control, la vermiculita se hidrató a capacidad de campo ($5 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$).

Después de cuatro días en este tratamiento, las plántulas se retiraron de la vermiculita y se midió la longitud de la raíz primaria y el grosor del hipocotilo.

4.3.3. En invernadero

Se aplicó un tratamiento de sequía intermedia y dos tratamientos de sequía terminal. En todos los casos las plantas se regaron hasta capacidad de campo durante la etapa de establecimiento de las plántulas y durante su desarrollo vegetativo.

En el tratamiento de Sequía Intermedia (SI) las macetas se regaron a capacidad de campo hasta la 4^{ta} semana después de la siembra (DS), a partir de la 5^{ta} semana se restringió el riego hasta el 60% de la cantidad de agua necesaria para estar en capacidad de campo. Después de 3 semanas de restricción se reestableció el riego a capacidad de campo.

Se usaron dos tratamientos de sequía terminal: Sequía Severa (SS), en el cual a partir de la fecha de inicio del tratamiento, cada maceta se regó hasta alcanzar el 30% del peso que tendría en capacidad de campo; y un tratamiento de Sequía Moderada (SM), en el cual a partir del inicio del tratamiento, cada maceta se regó hasta 60% del agua que tendría en capacidad de campo. Todos los tratamientos se compararon con una condición Control (C), en la que las macetas se regaron con el agua necesaria para estar a capacidad de campo durante todo el ciclo.

Los experimentos de sequía terminal para evaluar el efecto de la restricción hídrica se llevaron a cabo en plantas que se encontraban en dos etapas diferentes del desarrollo de las vainas:

1. Sequía que afecta la etapa de llenado del grano. Se inició la restricción del riego en el día 42 DS, cuatro días después del inicio de la floración. La parte aérea de las plantas se cosechó en los días: 56, 60 y 64 DS. En el día 56 DS, la mayoría de las vainas se encontraban en el inicio de la etapa del llenado del grano. En el día 60 DS, la mayoría de las vainas se encontraban en fase intermedia del llenado del grano y, en el día 64 DS, la mayoría de las vainas se encontraban en fase final del llenado del grano. Estas cosechas corresponden a las etapas R5, R6 y R7 establecidas en *Colorado State University web page* (CSU, 2007).

2. Sequía que afecta la etapa de establecimiento de las vainas. En este caso se inició la restricción del riego en el día 31 DS, dos días antes del inicio de la floración. Para establecer la edad exacta de cada vaina, las flores se marcaron individualmente en el momento de la antétesis, y se cosecharon vainas de una y dos semanas en los días 38 y 44 DS, las cuales se encontraban en la etapa de establecimiento (éstos días corresponden a las etapas R2 y R3 que se describen en *Colorado State University web page* (CSU, 2007)).

Para medir el contenido de almidón y el $^{14}\text{CO}_2$ incorporado en almidón, se colectó la porción aérea de cada planta y se secó durante 4 horas a $80\text{ }^\circ\text{C}$ para detener la actividad enzimática. Luego, las plantas se mantuvieron a $60\text{ }^\circ\text{C}$ durante tres días o hasta que ya no perdieron más peso. Se estableció la biomasa de toda la planta y la biomasa de hojas, vainas y tallos.

Para la determinación de las actividades enzimáticas y el contenido de azúcares, se colectaron en nitrógeno líquido hojas del 4to o 5to nudo y vainas en diferentes etapas de desarrollo y se almacenaron a $-70\text{ }^\circ\text{C}$ hasta el momento de las mediciones.

4.4. Determinación de parámetros potencialmente relacionados con la resistencia a sequía

4.4.1. Cobertura Foliar

En plantas de 4, 6 y 8 semanas, se calculó el volumen del prisma descrito por la altura de la primera hoja completamente abierta y el área del cuadrado que inscribe a la proyección vertical de la planta sobre el sustrato. Se usó una escuadra graduada en centímetros y milímetros.

4.4.2. Temperatura foliar

La temperatura foliar se determinó por dos métodos: utilizando un termómetro infrarrojo (Raytek ST8XB) o la termocupla asociada a un porómetro (Licor LI-1600 Steady State Porometer). Para ello, se usó la hoja del 4to o 5to nudo en plantas de 4, 5, y 6 semanas, siguiendo en ambos casos las indicaciones del fabricante.

4.4.3. Contenido de clorofila

Se usó un medidor de clorofila SPAD 502 (Minolta) que, mediante colorimetría, establece el contenido de clorofila en unidades SPAD. La medición se hizo en hojas del 4to y/o 5to nudo de plantas de 6 semanas en condiciones de sequía y en condiciones de riego, siguiendo las indicaciones del fabricante.

4.4.4. Conductividad estomática

Se midió la conductividad estomática entre las 12 pm y las 2 pm y entre las 7 am y las 9 am, en hojas del 4to y/o 5to nudo de plantas adultas que fueron mantenidas en condiciones de sequía o en condiciones de riego. Para ello se usó un porómetro (Licor LI-1600 Steady State Porometer), siguiendo las indicaciones del fabricante.

4.4.5. Contenido Relativo de Agua

Hojas maduras (hojas del 4to o 5to nudo) se cosecharon en bolsas plásticas y se mantuvieron en hielo y protegidas de la luz hasta el momento en que se procesaron (en ningún caso más de 40 minutos). Usando un sacabocados de 1cm de diámetro, se cortaron tres discos por hoja (uno de cada foliolo) y se estableció el peso fresco de cada disco (cada disco es una repetición de cada planta y se usaron cuatro plantas en cada tratamiento).

Los discos se incubaron en agua destilada durante 4 horas con luz del laboratorio, después de lo cual se secaron para retirar el exceso de agua y se pesaron de nuevo. Finalmente, los discos se secaron en bolsas de papel durante tres días a 60 °C (o hasta que no perdieron más peso) y se pesaron de nuevo.

El contenido relativo de agua se calculó con la fórmula:

$$CRA = (\text{peso hidratado} - \text{peso fresco}) \cdot (\text{peso fresco} - \text{peso seco})^{-1}$$
 (Sánchez-Díaz & Aguirreola, 1993)

4.5. Contenido de almidón

Para estimar el contenido de almidón, 200 mg de tejido seco y molido de los diferentes órganos se incubaron con 2 ml de etanol al 80% por 30 minutos a 80 °C bajo agitación. Se centrifugó por 10 minutos a 2000 g y el sedimentado se lavó con 1 ml de etanol al 80% dos veces, después de lo cual se le añadió 1 ml de agua y se incubó en baño de agua hirviendo por 15 minutos. Del gel que se formó, se tomaron 100 μ l que se incubaron toda la noche con 25 U de gluco-amilasa (Glucozymba L400 ENMEX SA.) a 30 °C en buffer acetato de sodio-acético pH 4.5

50 mM. El contenido de glucosa solubilizada se estableció mediante reacción con ácido di-nitro salicílico (DNS) (Sengupta *et al.*, 2000), usando una curva de calibración con glucosa. El contenido de almidón se reporta como μg de glucosa solubilizada.

4.6. Marca con $^{14}\text{CO}_2$

Plantas adultas (de 5 ó 7 semanas) fueron incubadas con 50 μCi de $^{14}\text{CO}_2$ (Amersham) por planta ($1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ aire), durante 4 horas, con luz natural (aprox. 130 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Después de la marca, las plantas continuaron su desarrollo en el invernadero por algunas semanas hasta el momento de la cosecha programada para cada experimento. Una vez cosechados, hojas, tallos y vainas se secaron, se molieron por separado, y se cuantificó el almidón como ya se describió. En los solubilizados del almidón, se cuantificó el contenido de radioactividad en cuentas por minuto (CPM) usando un contador de centelleo β (Beckman LS 6000 Liquid Scintillation Counter). Se estableció el contenido de CPM incorporadas en almidón por cada mg de tejido seco ($\text{CPM}\cdot\text{mg}^{-1}$). Para saber el contenido de ^{14}C en cada órgano y cada planta; $\text{CPM}\cdot\text{mg}^{-1}$ se multiplicaron por la biomasa de: hojas, tallos y vainas, y por la biomasa total de la planta. Y estos valores se usaron para calcular la relación de la marca presente en los órganos fuente con respecto a la marca presente en los órganos vertedero.

(fuente/vertedero).

4.7. Actividades enzimáticas

4.7.1. Preparación del extracto:

Salvo modificaciones que se especifican en cada caso, los extractos se prepararon a partir de 200 mg de tejido congelado y molido en mortero, el cual se agitó durante 20 minutos en 4 volúmenes de *Buffer* de Extracción (BE) que contenía: MOPS-KOH pH 7.5 50 mM, MgCl_2 10 mM, Polivinil pirrolidona (PVP)10000 $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, Tritón 0.1%, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, Ácido ϵ -aminocaprónico 1 mM, Benzamidina 1 mM, PMSF 1.5 mM. El extracto se centrifugó y el

sobrenadante se filtró en columna de Sephadex G50 equilibrada con BE sin PVP ni Tritón. Todo el procedimiento se realizó sobre hielo o en cuarto frío.

El contenido de proteína de los extractos se determinó mediante el método de Bradford, usando una curva de calibración con albúmina de suero fetal bovino (BSA)

4.7.2. Actividad de invertasa ácida.

La actividad de invertasa ácida se midió de acuerdo con el método descrito por (Trouverie *et al.*, 2003). Para ello 40 μl de extracto desalado, ($\pm 20 \mu\text{g}$ de proteína) se incubaron a 30 °C durante 20 minutos con 10 μl de *buffer* de actividad que contenía: Acetato de Na pH 4.5 500 mM, MgCl_2 100 mM; más sacarosa 150 mM como sustrato, en un volumen de reacción de 100 μl . La reacción se detuvo hirviendo durante 5 minutos y se congeló para la posterior determinación de la glucosa obtenida mediante una reacción con hexoquinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (ver detalles adelante), previa neutralización del pH del *buffer*, añadiendo a 100 μl de la muestra, 100 μl de MOPS-KOH pH 7.5 400 mM, Como controles se usaron la reacción sin extracto, una reacción sin sustrato y una reacción a tiempo cero para cada extracto.

4.7.3. Actividades de sacarosa sintasa e invertasa neutra

La actividad de sacarosa sintasa se midió en la dirección de la hidrólisis de acuerdo con el protocolo descrito por Huber (Huber, 1989). Para ello, 30 μl de extracto desalado ($\pm 15 \mu\text{g}$ de proteína) se incubaron a 30 °C durante una hora, con 10 μl de *buffer* de actividad que contenía: MOPS-KOH pH 7.5 500 mM, MgCl_2 100 mM, KCl 150 mM, NAD 20 mM, ATP 20 mM, hexoquinasa 20 $\mu\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ (de *E. Coli* ; Sigma-Aldrich), Fosfogluco-isomerasa 20 $\mu\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ (purificada de músculo de ratón; Sigma-Aldrich), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 20 $\mu\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ (de *Leuconostoc mesenteroides*; Sigma-Aldrich), más sacarosa 10 mM y UDP 10 mM como sustratos, en un volumen de reacción de 100 μl . Se detectó la formación de NADH, mediante absorbancia a 340 nm. La actividad obtenida sin UDP corresponde a la invertasa neutra. Para determinar la actividad sacarosa sintasa, a

la actividad obtenida con UDP, se le restó la actividad independiente de UDP (invertasa neutra).

Para hacer un seguimiento de la reacción se hicieron lecturas cada 10 minutos en espectro para placas de Elisa. Se usó una curva de calibración con fructosa (sin extracto) en cada placa de Elisa. Como controles se usaron la reacción sin extracto y la reacción sin sustratos para cada extracto.

4.8. Detección de glucosa

4.8.1. Poder reductor medido mediante ácido di-nitrosalicílico (DNS)

Se midió el contenido de glucosa a partir de su poder reductor usando el reactivo DNS. Para ello, a 10 μ l de muestra se le añadieron 100 μ l de agua y 100 μ l de reactivo de DNS (300 g de tartrato de Na y K, 16 g NaOH, 10 g de ácido di-nitrosalicílico en 1 litro de agua, conservar en oscuridad por encima de 23°C). Se incubó en baño de agua hirviendo por 10 minutos y luego se enfrió por 10 minutos sobre hielo. Se les añadió 1 ml de agua destilada y se leyó la absorbancia a 540 nm (Sengupta *et al.*, 2000).

4.8.2. Detección de glucosa mediante la formación de NADH

Sesenta μ l de la reacción de invertasa ácida neutralizada se incubaron a 30 °C durante una hora con 40 μ l de *buffer* NAD que contenía: MOPS-KOH pH 7.5 250 mM, MgCl₂ 5 mM, NAD 7.5 mM, ATP 5 mM, hexoquinasa 3.5 μ U $\cdot\mu$ l⁻¹ (de *E. coli*; Sigma-Aldrich) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 2 μ U $\cdot\mu$ l⁻¹; en un volumen de reacción de 200 μ l. Se detectó el NADH que se forma mediante absorbancia a 340 nm. Para hacer un seguimiento de la reacción se hicieron lecturas cada 10 minutos, utilizando placas de Elisa. En cada placa se usó una curva de calibración con glucosa, y reacciones sin sustrato como control.

4.9. Determinación de azúcares por HPLC

Los azúcares se extrajeron de 100 ó 200 mg de tejido congelado de hojas o vainas a los cuales se les agregó 1 ml de etanol al 80% y se agitó a 80 °C durante 10 minutos, se centrifugó durante 10 minutos a 12000 g. Con el decantado se repitió

la extracción con 1 ml de etanol al 80% a 80 °C. Los 2 ml de sobrenadante se evaporaron en centrifuga desecadora (Savant), y las pastillas se resuspendieron en 600 μ l de agua. Este extracto se analizó por HPLC en un equipo con detector del índice de refracción (Waters-600E system controller. Waters 410 refractive index detector Water Corp, Milford MA) usando una columna de sílica aminada para análisis de carbohidratos (Waters, WAT044355). La temperatura de la columna se mantuvo a 35 °C, como fase móvil se usó acetonitrilo:agua (75 : 25) con un flujo de 1.2 mL \cdot min⁻¹. Se usaron soluciones estándar de fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa (Sigma-Aldrich).

4.10. Análisis estadísticos

Para comparar el efecto de los tratamientos se usó una prueba de ANOVA a Dos Vías, excepto en el experimento de sequía que afecta el llenado del grano, para el cual el análisis de ANOVA rechazó la hipótesis de normalidad de los residuos. En ese caso se usaron las pruebas no paramétricas de Man Whitney y Kruscal Wallis (Sheskin, 2004). El total de repeticiones biológicas se muestra en cada figura.

5. Resultados

5.1. **Búsqueda de parámetros relacionados con la resistencia a sequía en frijol**

Hasta ahora las variedades de frijol resistentes a sequía se han obtenido mediante programas de mejoramiento tradicional, usando para la selección parámetros directamente relacionados con la productividad en condiciones de sequía. Esto se debe a que, como se dijo en la Introducción, en frijol no se han establecido caracteres secundarios relacionados con la resistencia a este tipo de estrés y se sabe muy poco de los mecanismos fisiológicos que usan las variedades resistentes a sequía de este cultivo (Miklas *et al.*, 2006).

Considerando que en varios cultivos se ha mostrado que algunos caracteres secundarios asociados con la respuesta a sequía son una herramienta valiosa en la selección de nuevos genotipos y en el establecimiento de marcadores moleculares (Beaver *et al.*, 2003; Graham & Vance, 2003; Jiménez-Bremont *et al.*, 2006) en la etapa inicial de este proyecto se buscó identificar caracteres secundarios relacionados con la resistencia a la sequía en frijol. Para ello se seleccionó a la variedad resistente a sequía Pinto Villa en contraste con la variedad susceptible Canario 60 (Beaver *et al.*, 2003; Graham & Vance, 2003; Jiménez-Bremont *et al.*, 2006).

En esa exploración inicial se evaluaron caracteres secundarios que se han relacionado con la resistencia a sequía en otras especies, entre ellos:

1. *Cobertura foliar*. Medida en plantas adultas con 2 semanas de tratamiento de estrés, no permitió diferenciar el efecto de la sequía sobre las variedades susceptible y resistente (ver resultados en Apéndice 3).
2. *Temperatura foliar*. Ni la temperatura foliar tomada con termómetro infrarrojo, ni la tomada con termocupla permitió detectar diferencias entre

las respuestas al déficit de agua de la variedad resistente Pinto Villa y de la variedad susceptible Canario 60 (ver resultados en Apéndice 5).

Aunque la temperatura foliar se ha usado con éxito en cereales; su uso ha sido discutido porque es susceptible a la temperatura y a la movilidad del aire al momento de hacer la lectura, lo cual baja la reproducibilidad de estas medidas (Lafitte *et al.*, 2003).

- 3 *Contenido de clorofila.* Este se determinó usando el medidor colorimétrico SPAD 502 que permite lecturas sencillas baratas y altamente reproducibles (Zhao *et al.*, 2008). Sin embargo, los resultados mostraron que éste no es un parámetro adecuado para comparar las variedades en estudio; ya que, Pinto Villa y Canario 60 presentan patrones de senescencia diferentes y no es posible separar el efecto de la senescencia del efecto de la sequía, sobre el contenido de clorofila. Además, dado que la valoración colorimétrica de la clorofila se hace comparando una o varias hojas de una planta con las hojas correspondientes en la otra planta, las diferencias en el hábito de crecimiento de las variedades estudiadas impiden el uso de este parámetro (ver resultados en Apéndice 4).
- 4 Para indagar si el vigor de las plántulas presentaba alguna relación con la resistencia a sequía, se midió la longitud y grosor del hipocotilo, y la longitud de la raíz primaria, en plántulas de 8 días. Los resultados indicaron que estos parámetros no reflejan diferencias en la respuesta a sequía de estas variedades (ver resultados en Apéndice 6).

Puesto que ninguno de estos parámetros permitió diferenciar la respuesta de Pinto Villa y Canario 60 a la sequía, no se muestran los datos y no se recomienda su uso en frijol; al menos no en la evaluación de variedades del mismo tipo de las consideradas en este estudio.

También se evaluaron, el contenido relativo de agua (CRA) y la conductividad estomática. Estos parámetros permitieron diferenciar el comportamiento de las variedades usadas en este estudio, a continuación se presentan los resultados.

5.1.1. Contenido Relativo de Agua

Se evaluó el CRA en hojas de plantas adultas de frijol sometidas a condiciones de déficit hídrico. Las mediciones se hicieron tanto en experimentos de campo como en experimentos de invernadero.

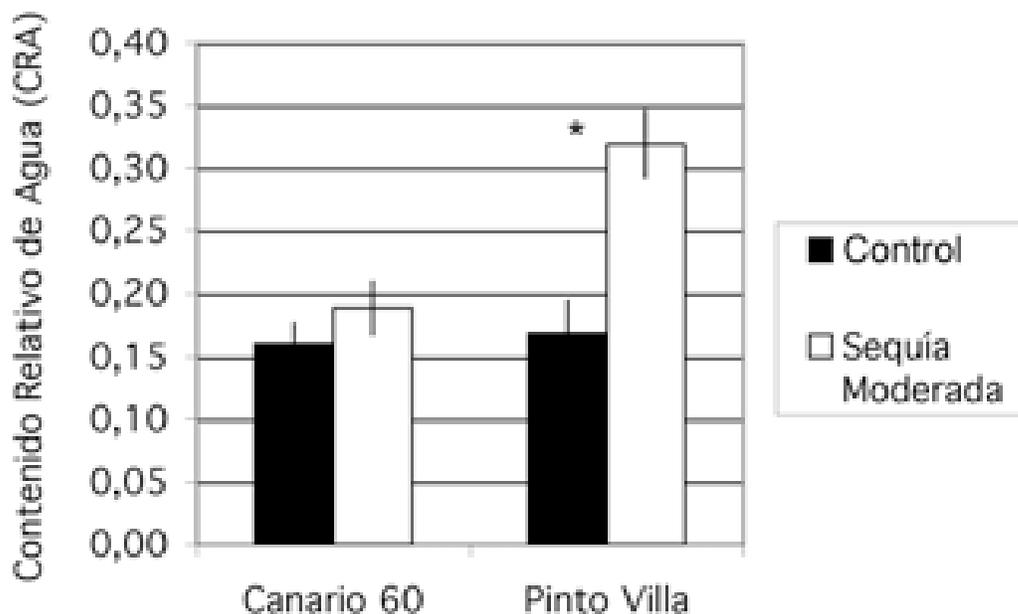


Figura 3. Contenido Relativo de Agua en un experimento de Invernadero. Para determinar el CRA, se obtuvieron discos de 1 cm de diámetro de hojas de plantas de 6 semanas sometidas a sequía terminal por 2 semanas. Las hojas se cosecharon a las 2 pm. Las columnas indican el promedio de cuatro plantas por tratamiento en cada condición (tres discos por planta). Las barras muestra el error estándar. El asterisco indica diferencias significativas al 5% de error.

En la metodología de Sánchez-Díaz & Aguirreola, cuando se detecta un incremento en el CRA es indicativo de que los tejidos analizados, la hoja en este

caso, son capaces de absorber más agua de la que contienen en una determinada condición, lo cual refleja que el tejido ha acumulado osmolitos.

En la Figura 3 se muestra el resultado de la evaluación del CRA en las variedades Pinto Villa y Canario 60 en un experimento de invernadero. Si bien en condiciones control ambas variedades presentaron el mismo CRA; en sequía, la variedad Pinto Villa presentó valores de CRA 1.8 veces más altos ella misma en control. Al contrario, la variedad Canario 60 no modificó significativamente su CRA por efecto del tratamiento de sequía.

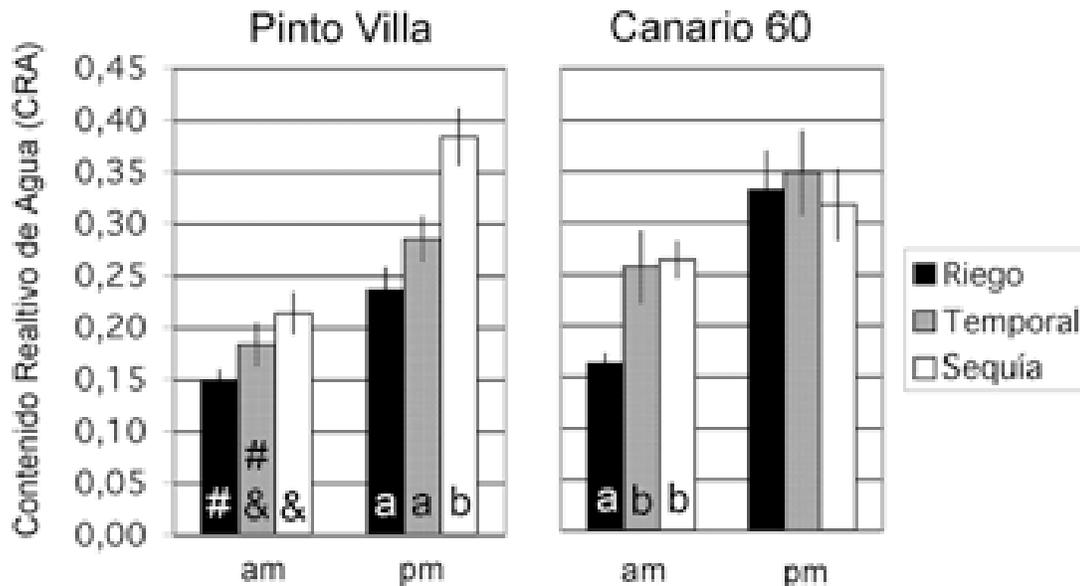


Figura 4. Contenido relativo de Agua en un experimento de campo. El CRA se determinó a partir de discos de 1 cm de diámetro de hojas de plantas de 8 semanas sometidas a los tratamientos de riego, temporal y sequía. Las cosechas se llevaron a cabo a las 8 am y a las 3 pm. Las columnas indican el promedio de cuatro plantas por tratamiento en cada condición (tres discos por planta). Las barras muestran el error estándar. Letras diferentes indican diferencias entre los tratamientos significativas al 5% de error. Símbolos diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos al 10% de error.

Para validar la utilidad del CRA como parámetro de selección de plantas resistentes a sequía, se le evaluó también en el campo y se tomaron muestras a diferentes horas del día (Figura 4). Al igual que se observó en el invernadero, los resultados de medir el CRA en horas de la tarde mostraron que en Pinto Villa el CRA aumentó en respuesta a la sequía con respecto las plantas control, en tanto que en Canario 60 este parámetro no se vio afectado por el tratamiento. Sin embargo, el CRA de la variedad Canario 60 en control resultó más alto que el CRA en Pinto Villa en la misma condición. Considerando que en el campo la humedad relativa del ambiente no está controlada como en el invernadero, es posible considerar que en campo, la sequedad del ambiente durante el día produjo un estrés que elevó el CRA de Canario 60 incluso en condiciones control. A pesar de ello, tanto en campo como en el invernadero, se mantiene el hecho de que bajo condiciones de sequía el CRA aumentó en Pinto Villa con respecto al control y no cambió en Canario 60.

Paralelamente se hicieron mediciones de este parámetro a las 9 am para evaluar el efecto de la recuperación nocturna de la turgencia sobre el CRA (Figura 4). Los resultados muestran que en condiciones control, ambas variedades recuperaron la turgencia durante la noche ya que su CRA es menor con respecto al CRA medido en la tarde. En condiciones de sequía, Pinto Villa recuperó parcialmente la turgencia durante la noche, mientras que Canario 60 no lo hizo.

Estos resultados tanto en campo como en el invernadero sugieren que la variedad Pinto Villa es capaz de llevar a cabo un ajuste osmótico más eficiente que el detectado para la variedad susceptible Canario 60.

5.1.2. Conductividad estomática

La conductividad estomática es una medida directa de la tasa de transpiración e indirecta de la tasa fotosintética. Dado que la condición general de las plantas depende de ambos procesos fisiológicos, la regulación de la conductividad estomática se ha relacionado con la resistencia a sequía (Zhao *et al.*, 2008). Con

el objeto de evaluar la relación de este parámetro con la resistencia a sequía en frijol, medimos el efecto de la sequía sobre la conductividad estomática a la hora de mayor exposición solar, tanto en experimentos de invernadero (Figura 5), como en experimentos de campo (Figura 6).

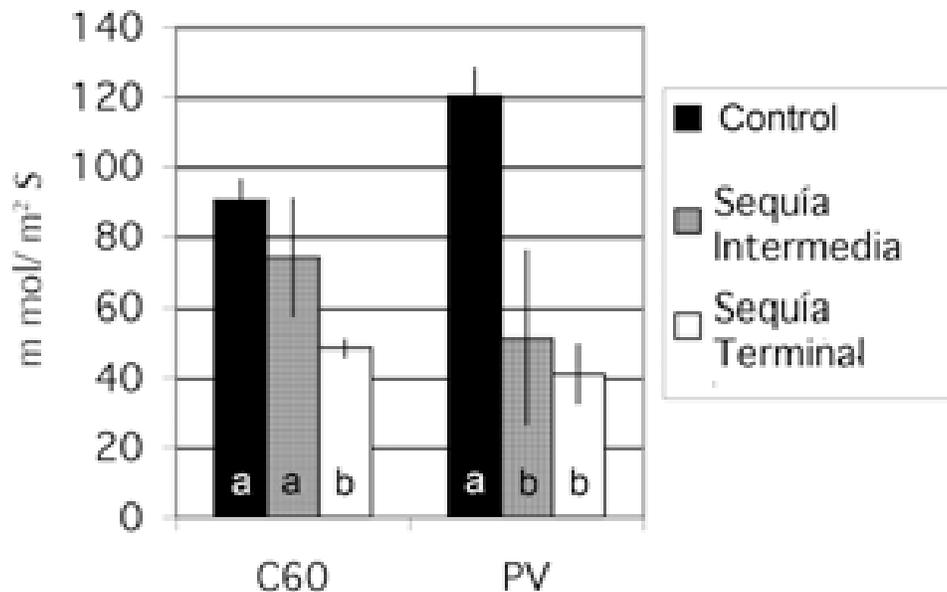


Figura 5. Conductividad estomática en el invernadero. A plantas de 8 semanas, sometidas a sequía terminal por 3 semanas o a sequía intermedia por dos semanas, se les midió la conductividad estomática. Las mediciones se realizaron entre las 12 pm y las 2 pm, en días soleados. Las columnas indican el promedio de tres plantas por tratamiento en cada condición (dos lecturas por planta). Las barras muestra el error estándar. Letras diferentes indica diferencias significativas entre los tratamientos al 10% de error.

La conductividad estomática se determinó en plantas sometidas a diferentes tipos de sequía: en el invernadero se indujo sequía terminal o sequía intermitente, y en el campo se evaluaron condiciones de riego, temporal y sequía (ver detalles en Materiales y métodos). Como se esperaba, en general la sequía produjo una reducción en la conductividad estomática, lo cual refleja el cerrado de estomas. Cabe hacer notar que en el invernadero, bajo condiciones control, las plantas de

Pinto Villa presentaron mayor conductividad estomática que las plantas de Canario 60 (120 y 90 $\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{S}^{-1}$ respectivamente), lo cual sugiere que en condiciones óptimas las plantas de Pinto Villa, son capaces de captar mejor el CO_2 disponible. En contraste, tanto la sequía terminal como la sequía intermedia promovieron un significativo cierre estomático en esta variedad resistente. Comparativamente, en Canario 60, sólo la sequía terminal causó una disminución significativa de la conductividad estomática (Figura 5), y las plantas de Canario 60 que se sometieron a sequía intermedia no mostraron diferencias respecto a las plantas control.

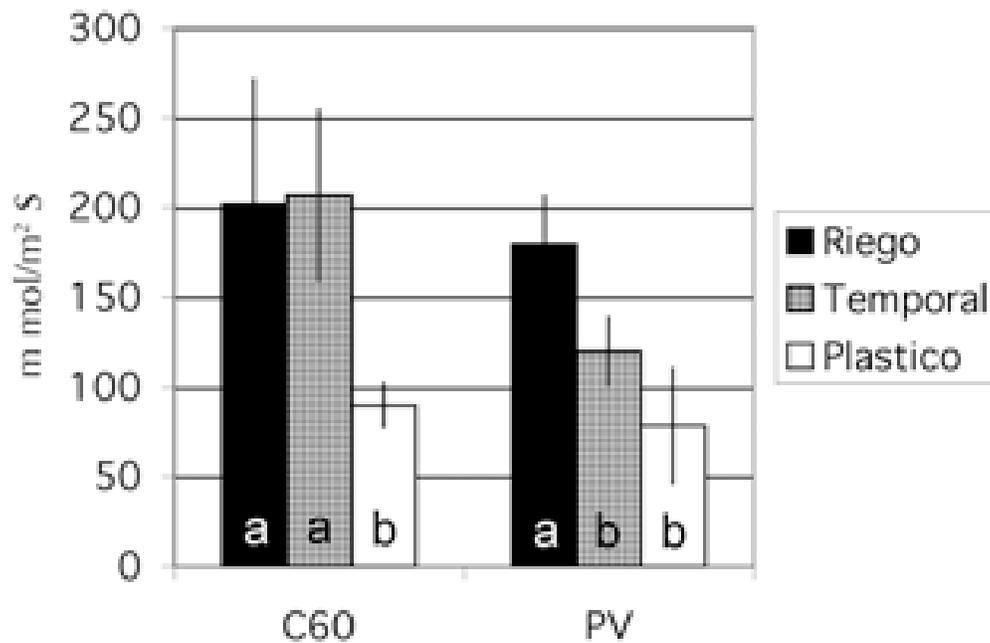


Figura 6. Conductividad estomática en un experimento de campo. La conductividad estomática se determinó en plantas de 7 semanas sometidas a los tratamientos de riego, temporal y sequía. Las mediciones se realizaron entre las 12 pm y las 2 pm, en días soleados. Las columnas indican el promedio de cuatro plantas por tratamiento en cada condición (dos lecturas por planta). Las barras muestra el error estándar. Letras diferentes indica diferencias significativas entre los tratamientos al 10% de error.

En los experimentos que se llevaron a cabo bajo condiciones de campo, no se presentaron diferencias en la conductividad estomática entre las plantas de Pinto Villa y de Canario 60 en condiciones de riego (Figura 6). En cuanto al efecto de los tratamientos de sequía, se observó que éstos promovieron una disminución significativa de la conductividad estomática en ambas variedades. En cambio en el tratamiento Temporal se presentó cerrado de estomas a la hora de mayor exposición solar en las plantas de Pinto Villa pero no en las plantas de Canario 60.

En la Figura 7 se muestra el potencial hídrico del suelo en el momento del muestreo, y se puede ver que los tratamientos temporal y sequía no se diferencian. Sin embargo, se encontraron diferencias en la tasa de transpiración en Pinto Villa entre el tratamiento de sequía y el tratamiento de temporal. Estas diferencias se pueden explicar considerando que se habían registrado lluvias en la semana anterior, es decir que las plantas en condiciones de temporal estuvieron sometidas a sequía intermedia.

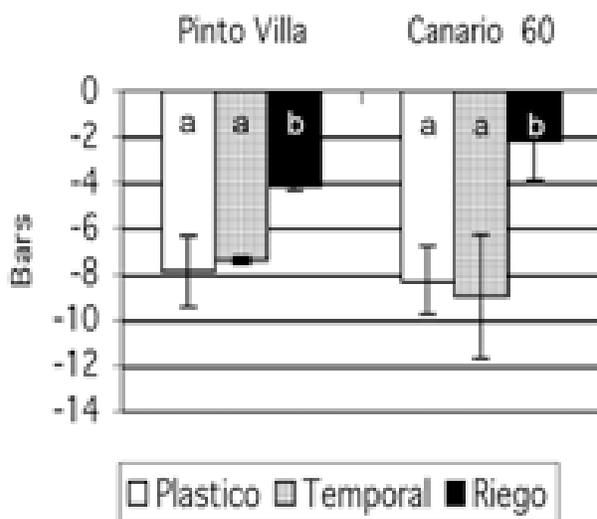


Figura 7. Potencial hídrico del suelo a 15 cm de profundidad. Medido con una termocopla acoplada a un microvoltímetro. Las columnas indican el promedio de tres lecturas en cada surco, las barras indican el error estándar. Letras diferentes señalan diferencias significativas entre los tratamientos al 5% de error.

Este resultado sugiere que las plantas de Pinto Villa que habían estado expuestas a sequía y que se recuperaron por el riego a capacidad de campo en el invernadero; así como, las plantas que estuvieron sometidas a sequía intermedia

debido a las lluvias ligeras que ocurrieron en el campo, presentaron una especie de preacondicionamiento, que provocó que cerraran los estomas a la hora de mayor riesgo de deshidratación. Esto no ocurrió en el caso de Canario 60.

5.1.3. Parámetros relacionados con la productividad

Paralelamente a la evaluación de parámetros fisiológicos, se evaluaron parámetros relacionados con la productividad y sus componentes. El índice de cosecha es un parámetro que relaciona la biomasa cosechable de una planta con su biomasa total y se usa como criterio de resistencia ante diferentes condiciones adversas. En experimentos de campo y de invernadero (Figura 8) se estableció que, en nuestras condiciones, la sequía no disminuye significativamente el índice de cosecha en la variedad Pinto Villa, más aun, en algunas condiciones, los tratamientos de sequía promovieron un aumento significativo en el índice de cosecha en esta variedad.

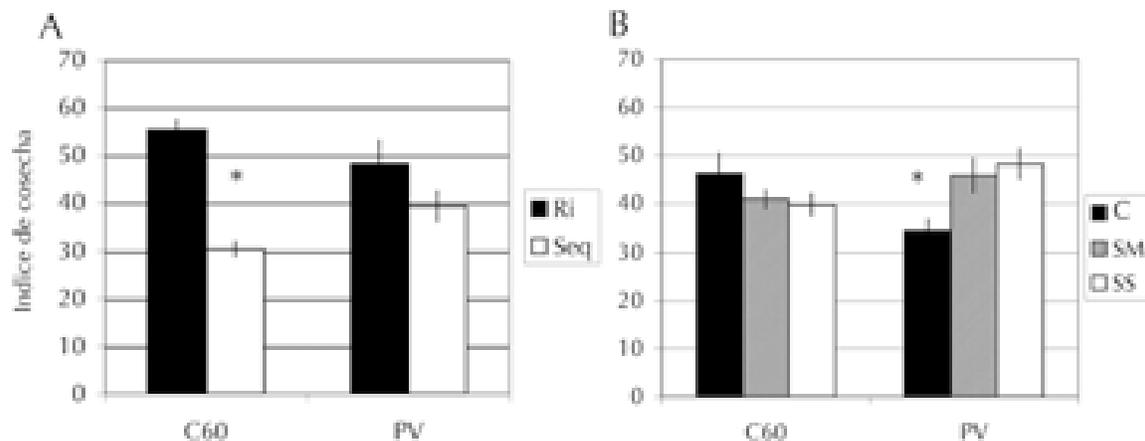


Figura 8. Efecto del diferentes tratamientos de sequía sobre el índice de cosecha. Se determinó el índice de cosecha ($(\text{biomasa vainas} \cdot \text{biomasa total}^{-1}) \cdot 100$) en plantas maduras de Canario 60 (C60) y Pinto Villa (PV). **A.** Experimentos de campo. (Ri) Riego, (Seq) Sequía terminal. Se muestra el promedio de diez plantas por tratamiento. **B.** Experimento en invernadero. (C) Control, (SM) sequía moderada, (SS) sequía severa. Se muestra el promedio de cinco plantas por tratamiento y el error estándar. El asterisco indica diferencias significativas al 5% entre los tratamientos.

En cambio en Canario 60, los tratamientos de sequía en ningún caso tuvieron un efecto positivo sobre el índice de cosecha.

Estos resultados son consistentes con los reportados previamente por Rosales-Serna y colaboradores quienes consideraron que era indicativo de que la variedad Pinto Villa es capaz de favorecer el transporte de fotoasimilados hacia las vainas cuando se encuentra en condiciones de sequía. (Rosales-Serna *et al.*, 2000; Rosales-Serna *et al.*, 2003)

5.2. Relación entre el metabolismo de carbohidratos y la resistencia a la sequía

5.2.1. Efecto de la sequía durante la etapa de llenado del grano, en la distribución de la biomasa.

Con el objeto de evaluar el efecto de la sequía sobre la movilidad de carbohidratos en plantas de la variedad Pinto Villa, se llevaron a cabo experimentos de pulso y caza con ^{14}C , sobre plantas sometidas a sequía terminal en el invernadero, usando a Canario 60 como variedad control por su susceptibilidad a este tipo de estrés. Como se describe en Materiales y métodos, las plantas crecieron con riego a capacidad de campo hasta una semana después de iniciada la floración.

En el experimento que se presenta en la Figura 9, se inició la restricción del riego el día 42 después de la siembra (DS). Como se observa, la restricción del riego afectó rápidamente el contenido de agua en las macetas. En todos los experimentos asumimos que las plantas estaban en sequía moderada cuando el contenido de agua por gramo de sustrato en las macetas estaba entre 1.0 y 1.7 $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$. En el experimento que se muestra en la Figura 9, esta condición se alcanzó a los cuatro días de haber iniciado el tratamiento. Adicionalmente, se asumió que las plantas estaban en sequía severa cuando el contenido de agua por gramo de sustrato en las macetas se encontraba por debajo de 0.8 $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$. En

el experimento descrito en la Figura 9 esta condición se alcanzó a los doce días de iniciado el tratamiento.

Las plantas se incubaron con $^{14}\text{CO}_2$ en los días 51, 52 o 53 DS. Después del marcaje, las plantas continuaron su desarrollo normal en el invernadero hasta que se cosechó la parte aérea de las plantas, con la cual se hizo el análisis de biomasa, contenido de almidón y la cuantificación de las CPM incorporadas por mg de tejido.

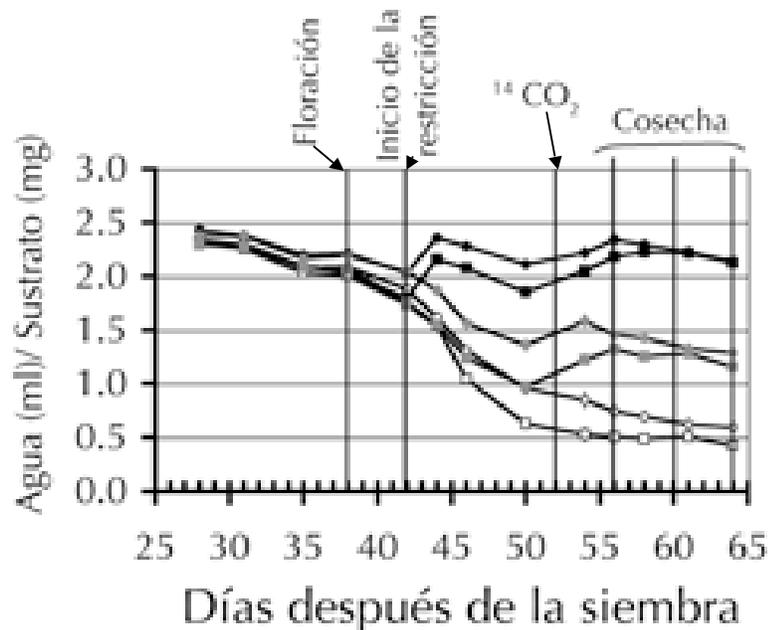


Figura 9. Evolución del contenido de agua en el sustrato en un experimento típico de sequía impuesta después de la floración. Las macetas Control se regaron con la cantidad de agua necesaria para estar en capacidad de campo (figuras negras), las macetas en Sequía Moderada se regaron con agua necesaria para estar al 60% de capacidad de campo (figuras grises) y la macetas en Sequía Severa se regaron con agua necesaria para estar al 30% de capacidad de campo (figuras blancas). Círculos = Canario 60, cuadrados = Pinto Villa. Se grafica el promedio de 16 macetas en cada tratamiento y las barras indican el error estándar.

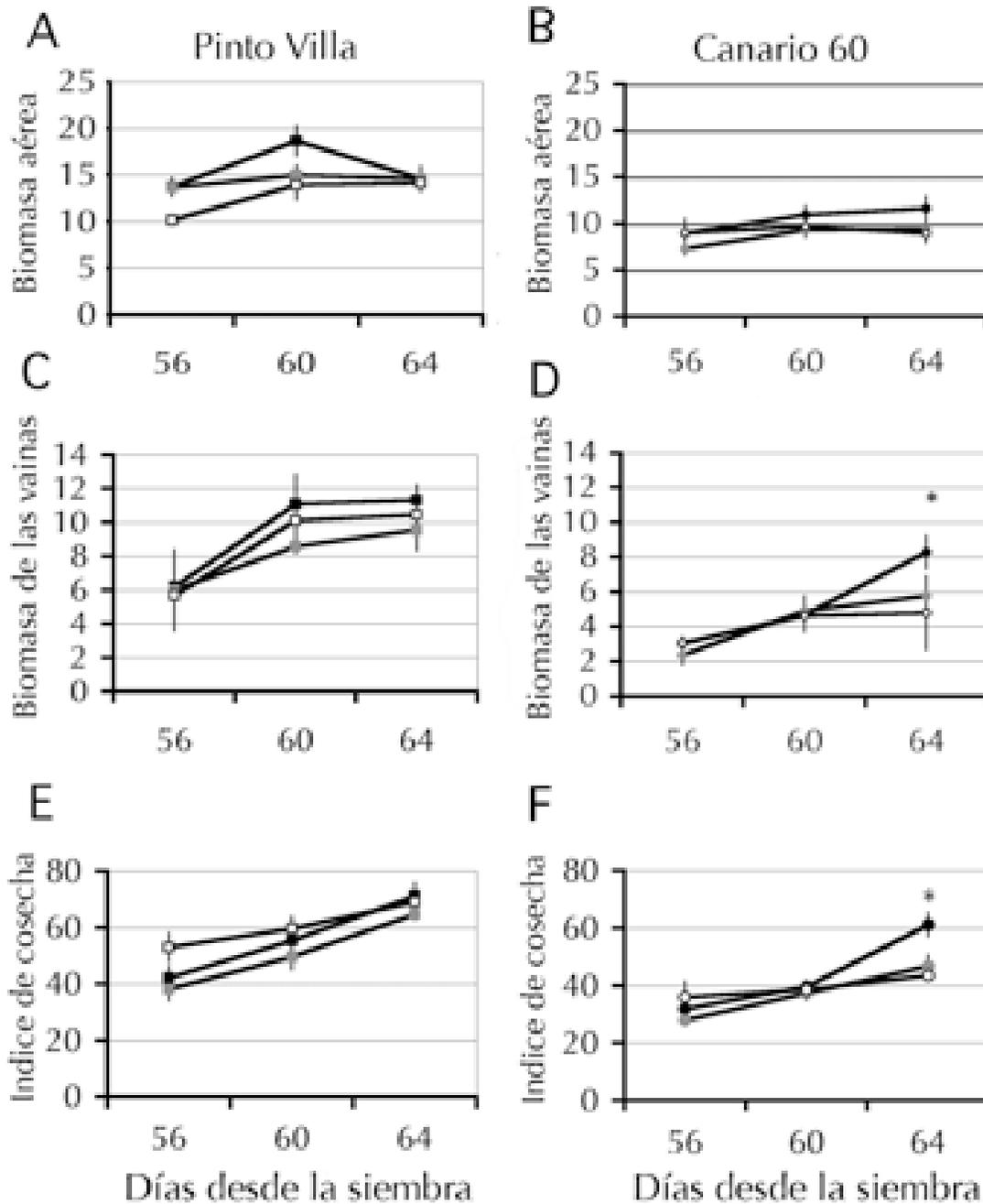


Figura 10. Evolución de la biomasa y sus componentes. En el experimento descrito en la Figura 9 se midió el efecto los tratamientos: sequía severa (figuras blancas) sequía moderada (figuras grises) y control (figuras negras). **A** y **B** Biomasa de la porción aérea de cada planta. **C** y **D** Biomasa de las vainas de cada planta. **E** y **F**. Índice de Cosecha $[\frac{\text{biomasa de las vainas}}{\text{biomasa total}} \cdot 100]$. Se grafica el promedio de 5 plantas en cada tratamiento y las barras indican el error estándar. El asterisco indica diferencias significativas entre los tratamientos al 10% de error.

Para determinar el efecto de la sequía sobre el llenado de las vainas, se hicieron tres cosechas en diferentes momentos: día 56 DS (cuando la mayoría de las vainas se encontraban al principio de la etapa de llenado del grano), día 60 DS (cuando las plantas se encontraban en la mitad de la etapa de llenado del grano), y día 64 DS (cuando las vainas iniciaban la madurez) (ver Figura 9).

Como ya se mencionó, las variedades de frijol Canario 60 y Pinto Villa presentan diferencias en su respuesta a la sequía que se reflejaron en el análisis de los componentes de la biomasa. Los tratamientos de sequía no causaron disminución ni aumento significativo en la biomasa aérea de ninguna de las dos variedades (Figura 10A y B); sin embargo, se detectaron diferencias en la distribución de la biomasa en las dos variedades en respuesta a la sequía (Figura 10C y D). En tanto que la biomasa de las vainas de Canario 60 disminuyó en ambos tratamientos de sequía con respecto ella misma en las plantas control, la biomasa de las vainas de Pinto Villa no se vio significativamente afectada por ninguno de los tratamientos.

Lo anterior se refleja en el índice de cosecha; en las Figuras 10E y F se observa que, consistente con los resultados antes descritos, los tratamientos de sequía afectaron el índice de cosecha en la variedad Canario 60 pero no así en Pinto Villa.

5.2.2. La sequía afecta la partición del carbono en Pinto Villa

Con el objeto de estudiar el efecto de la sequía sobre la partición del carbono se efectuaron experimentos de pulso y caza con ^{14}C . Para ello, plantas de 7 semanas (dos semanas después del inicio de la floración) fueron incubadas con $^{14}\text{CO}_2$ durante 4 horas, después de las cuales continuaron su desarrollo en invernadero. Se determinó el contenido de marca incorporada en almidón y se calculó la fracción de la marca que se encontraba presente en hojas, vainas y tallos durante diferentes fases del llenado del grano (día 56, 60 y 64 DS); (ver detalles en Materiales y métodos).

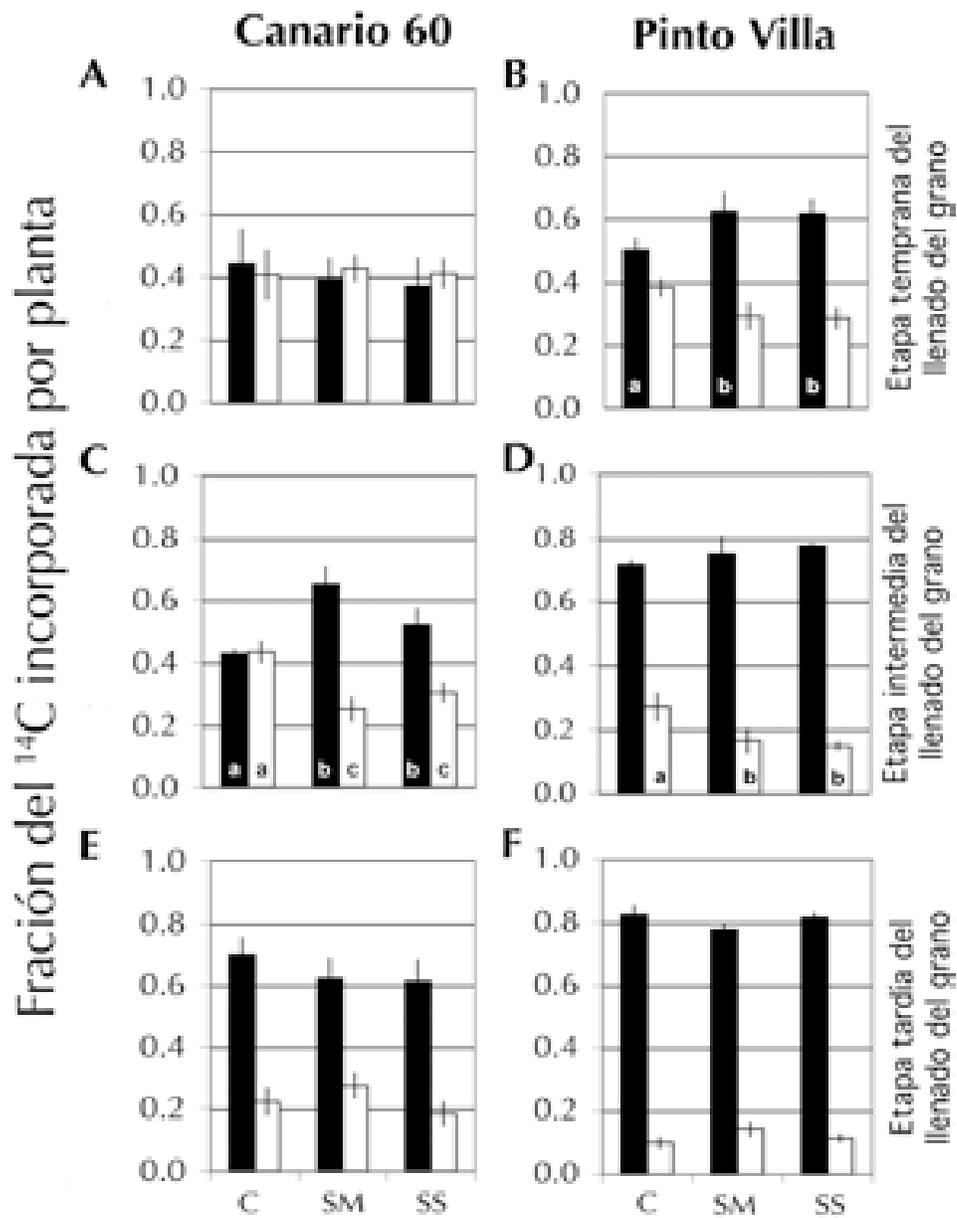


Figura 11. Efecto de la sequía sobre la partición del ^{14}C que se localiza en almidón. Fracción del ^{14}C acumulado en almidón, que se localizó en vainas (columnas negras) y en hojas (columnas blancas). Se comparan los tratamientos: sequía moderada (SM), sequía severa (SS) y control (C). A y B, cosecha el día 56 DS. C y D cosecha el día 60 DS. E y F Cosecha el día 64 DS. Las columnas muestran el promedio de 5 plantas por tratamiento y las barras indican el error estándar. Símbolos diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos al 10% de error.

En la Figura 11 se presenta la fracción de ^{14}C incorporada en almidón que se localizó en hojas y vainas de plantas de Canario 60 y Pinto Villa, tanto en condiciones de sequía moderada y severa, como en condiciones control.

Durante la etapa temprana del llenado del grano (cosecha el día 56 DS) se observa que en la variedad Canario 60 el ^{14}C se distribuyó equitativamente entre las vainas y las hojas en todos los tratamientos; mientras que en la variedad Pinto Villa una mayor fracción de la marca incorporada en almidón se localizó en las vainas y esta fracción se incrementó significativamente por efecto de los tratamientos de sequía (Figura 11 A y B).

En la etapa intermedia del llenado del grano (día 60 DS), más del 70% del ^{14}C incorporado por las plantas de la variedad Pinto Villa se localizó en las vainas, consecuentemente, menos del 30% del ^{14}C se localizó en las hojas y este porcentaje disminuyó significativamente por efecto de los tratamientos de sequía. Durante esta etapa, en Canario 60 la proporción del almidón- ^{14}C localizado en las vainas aumentó significativamente por efecto de los tratamientos de sequía (Figura 11 C y D).

Finalmente, en la etapa tardía del llenado del grano cuando las vainas inician la madurez (cosecha el día 64 DS), la fracción de ^{14}C incorporado en almidón en las vainas de Pinto Villa alcanzó el 80%, tanto en las plantas control como en las plantas que estuvieron sometidas a sequía. De manera similar, en esta etapa, las vainas de Canario 60 presentaron la mayor fracción del ^{14}C acumulado en almidón (alcanzando hasta el 70%) y no se detectó efecto por los tratamientos de sequía.

En este experimento también se evaluó la fracción de $^{14}\text{CO}_2$ incorporado en almidón que se localizó en los tallos. Como se muestra en la Figura 12, esta fracción resultó ser menos del 25% del total del ^{14}C localizado en almidón en la planta. Además, la fracción del ^{14}C que se localizó en almidón en los tallos, no presentó ninguna variación significativa por efecto de los tratamientos.

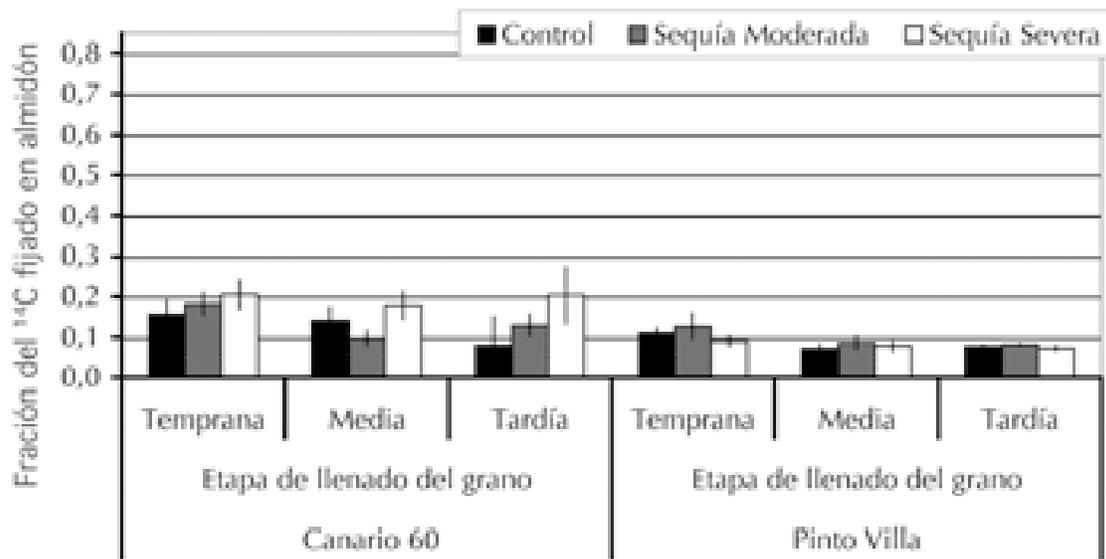


Figura 12. Fracción de la marca incorporada en almidón que se localiza en los tallos. Se compara el efecto de los tratamientos: sequía moderada, sequía severa y control, sobre el contenido de ^{14}C localizado en almidón en los tallos; en el experimento descrito en la Figura 9. Las columnas muestran el promedio de 5 plantas por tratamiento, y las barras indican el error estándar.

Cabe resaltar que ^{14}C incorporado en almidón que se localizó en las vainas de Pinto Villa alcanzó el 80% al final de la etapa de llenado del grano; en tanto que, en la misma etapa, la fracción la marca que se localizó en las vainas de Canario 60 no superó el 70%. Esto implica que en todas las condiciones en este estudio, Pinto Villa resultó ser más eficiente en la movilización de carbohidratos hacia la vaina (ver Figura 11).

Puesto que el valor de la marca acumulada en vainas con respecto a la marca acumulada en hojas en cada planta es indicativo de la relación entre el vertedero y la fuente, también se analizó este parámetro.

En la Figura 13 se observa que en la variedad Pinto Villa este índice aumentó significativamente por los tratamientos de sequía en todos los muestreos. Por otra parte, en la variedad Canario 60 los tratamientos de sequía no afectaron

significativamente la proporción vertedero/fuente en ninguna etapa (los Apéndices 7 y 8 incluyen resultados similares a estos, obtenidos en experimentos comparables) .

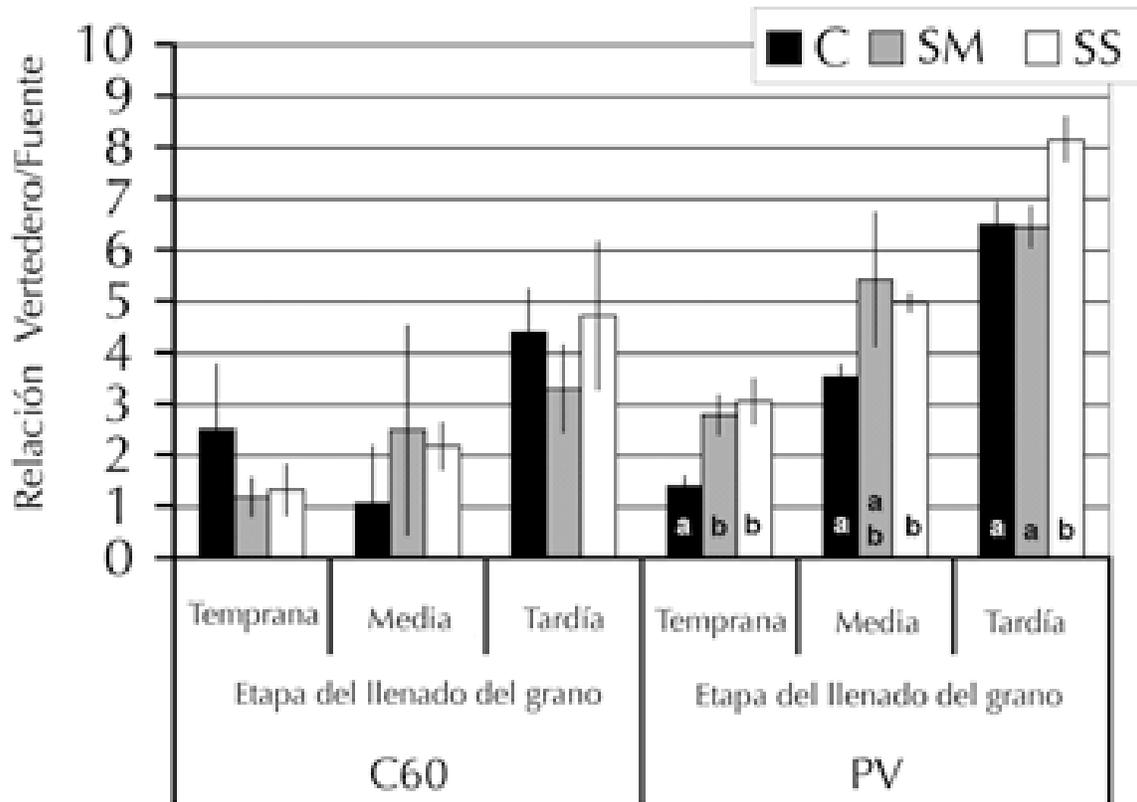


Figura 13. Efecto de la sequía sobre relación vertero/fuente. Evolución de la relación entre la marca presente en vainas y la marca presente en hojas (vertedero/fuente), en el experimento descrito en la Figura 9. Se compara el efecto de los tratamientos: sequía moderada (SM), sequía severa (SS) y control (C). Las columnas muestran el promedio de 5 plantas por tratamiento, y las barras indican el error estándar. Símbolos diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos al 10% de error.

Estos datos sugieren que la variedad Pinto Villa, considerada resistente a sequía, es más eficiente en la translocación de carbono hacia la vaina (vertedero) bajo restricción de agua, lo cual favorece el llenado del grano bajo estas condiciones de

estrés, en comparación con la variedad Canario 60, susceptible a sequía. Una respuesta similar se ha mostrado en cereales y en uva (Bota *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2004a).

5.2.3. Efecto de la sequía durante la etapa de establecimiento de las vainas

El hecho de que en la etapa inicial de llenado del grano, las vainas de la variedad Pinto Villa ya contengan la mayor parte del almidón marcado con ^{14}C de la planta, y que este efecto se enfatice en sequía (ver Figura 11), sugirió que esta variedad no sólo es capaz de movilizar el carbono hacia las vainas de forma más eficiente que Canario 60, sino que además inicia este proceso en etapas previas al llenado del grano.

Para evaluar esta posibilidad, se realizaron experimentos en los que se midió el efecto de la sequía sobre la movilidad del ^{14}C hacia las vainas durante la etapa previa al llenado del grano; es decir, durante la etapa de establecimiento de las vainas (Oliker *et al.*, 1978; Dejardin *et al.*, 1997; Borisjuk *et al.*, 2003).

En la Figura 14A se muestra la evolución del contenido de agua en las macetas, en un experimento en el que la sequía se impuso a las plantas antes de la floración. Igual que en los demás experimentos, las plantas crecieron en invernadero con riego a capacidad de campo durante el desarrollo vegetativo y la restricción hídrica se inició el día 30 después de la siembra. Un grupo de plantas se regaron con el 30% del agua necesaria para estar en capacidad de campo (Sequía Severa, SS) y el grupo control se mantuvo a capacidad de campo todo el tiempo. Como se observa en la Figura 14A, la SS se alcanzó en el día 38 DS, ocho días después de iniciado el tratamiento. En este experimento se analizó el contenido de almidón y las CPM incorporadas en almidón, en vainas de una semana de desarrollo (día 38 DS), y en vainas de una y dos semanas de desarrollo (día 44 DS).

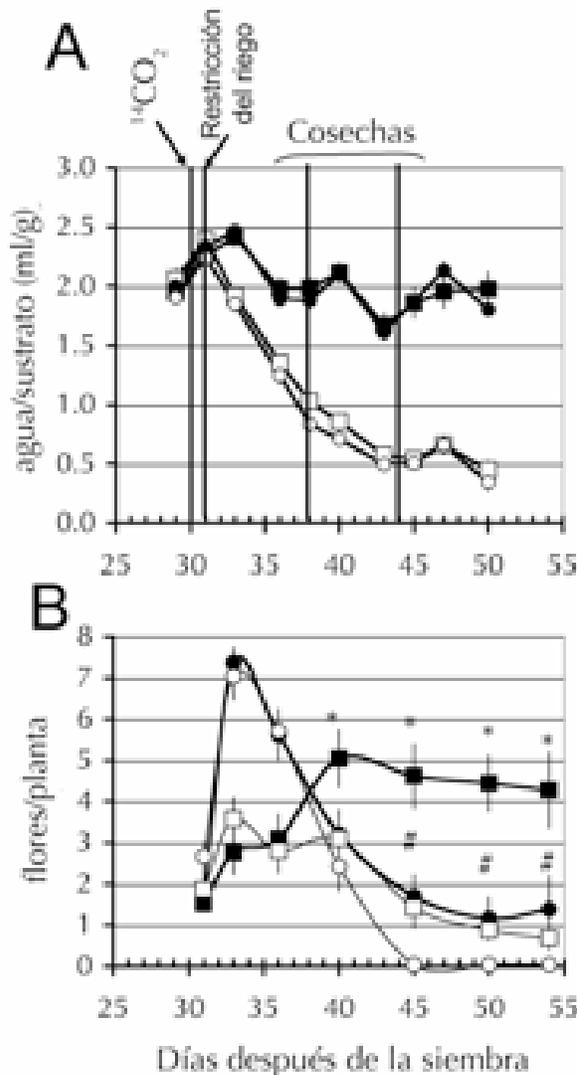


Figura 14. Descripción de un experimento de invernadero en el que la sequía se aplica antes de la floración. Plantas de Pinto Villa (cuadrados), y de Canario 60 (círculos), se sometieron a los tratamientos Sequía Severa (figuras blancas), y Control (figuras negras). **A** . Evolución del contenido de agua en el sustrato. **B**. Efecto de los tratamientos sobre el número de flores por planta. Los puntos muestran el promedio de 10 plantas en cada tratamiento y las barras indican el error estándar. Los símbolos indican diferencias significativas en el número de flores entre los tratamientos al 5% de error. (*) diferencias en Pinto Villa, (#) diferencias en Canario 60.

La sequía afectó la floración en la variedad Pinto Villa

Las dos variedades usadas en este estudio presentan diferencias en cuanto a la distribución de su floración debido a sus diferencias en el hábito de crecimiento. Para evaluar el efecto de la sequía sobre la floración, se contaron el número de flores abiertas por planta en los días 31, 33, 36, 40, 45, 50 y 55 DS. Como se muestra en la Figura 14B, las plantas de la variedad Canario 60 presentaron un patrón de floración concentrado en un pico, en torno al día 33 DS, lo cual corresponde con el comportamiento esperado de una variedad de este hábito de crecimiento (FENALCE, 2007). Este pico de floración se presentó antes que las

plantas estuviesen en condiciones de sequía, ya que sólo entre el día 34 DS y el día 40 DS las macetas estuvieron en la condición de sequía moderada, y por esta razón la sequía no afectó el número de flores por planta en Canario 60 (Figura 14B). A partir del día 40 DS, las plantas en restricción del riego estuvieron en sequía severa y eso redujo a cero el número de flores por planta. En esta etapa, las plantas en condiciones control de esta variedad produjeron en promedio una flor cada 5 días.

A diferencia de Canario 60, Pinto Villa en condiciones control aumentó el número de flores por planta de forma escalonada, y la apertura de flores se mantuvo alrededor de cuatro flores por planta hasta el final del experimento. En el tratamiento de sequía, las plantas de Pinto Villa iniciaron la floración al mismo tiempo que las plantas control, pero se observó una disminución en el número de flores por planta en el día 40 DS cuando las plantas se encontraban en sequía moderada. Esta reducción en el número de flores se acentuó después del día 41 DS cuando las plantas estuvieron en sequía severa (Figura 14B).

De la descripción anterior se puede deducir que en Canario 60 el tratamiento de sequía no afectó el proceso de floración, ya que las condiciones deletéreas de la limitación de agua se presentaron después que la floración hubiese sucedido. En tanto que a la variedad Pinto Villa, la restricción hídrica le afectó justo en el período de floración, por lo que se produjo un efecto significativo sobre el número de flores por planta.

La sequía afecta el número y la biomasa de las vainas de una y dos semanas en Pinto Villa.

Concordante con la reducción en el número de flores observada en Pinto Villa (Figura 14B), el número de vainas en etapa de establecimiento se redujo significativamente por efecto de la sequía en esta variedad, lo cual se observa en la Figura 15A. En cambio en Canario 60, el número de vainas en esta etapa no se afectó con la sequía.

La reducción de la floración total en Pinto Villa alcanzó el 48.4% y la reducción del número de vainas en etapa de establecimiento en Pinto Villa fue del 51.9%. Esto

concuera con reportes previos en el sentido que cuando la sequía se presenta en la etapa de floración y de establecimiento de las vainas, su principal efecto es el aborto de flores (Acosta-Gallegos *et al.*, 1997)

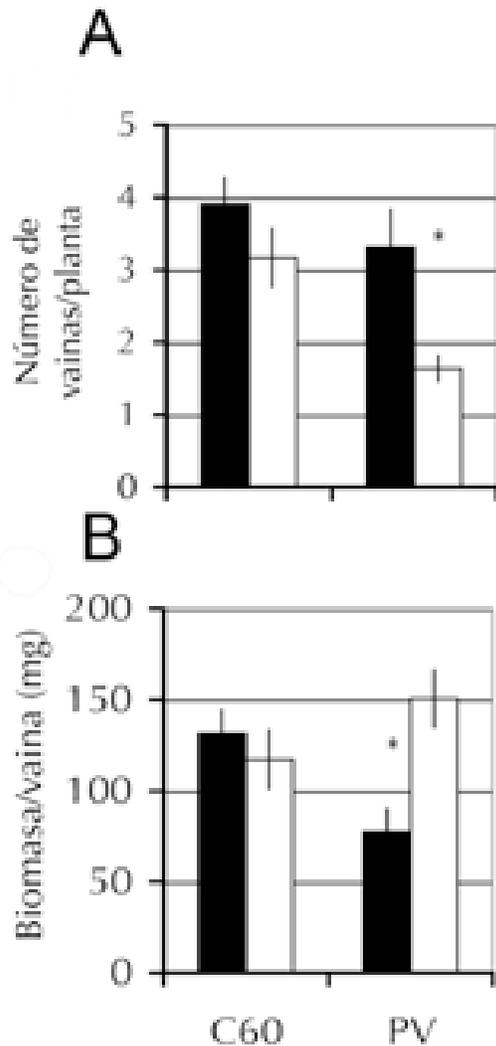


Figura 15. Efecto de la sequía sobre el número y la biomasa de las vainas durante su establecimiento.

En el experimento descrito en Figura 14 se midió el efecto de los tratamientos: Sequía severa (columnas blancas) y Control (columnas negras), sobre vainas de dos semanas de Canario 60 (C60) y Pinto Villa (PV). **A.** Número de vainas por planta. **B.** Biomasa de cada vaina. Las columnas muestran el promedio de 10 plantas en cada tratamiento y las barras indican el error estándar. El asterisco indica diferencias significativas entre los tratamientos al 5% de error.

El análisis de la biomasa por vaina en la variedad Pinto Villa mostró que las vainas en establecimiento incrementaron su biomasa al doble por efecto del tratamiento de sequía (Figura 15B); mientras que no se observó ningún efecto sobre la biomasa de las vainas de Canario 60 en esta etapa. Esta observación sugiere que la estrategia adaptativa seleccionada en Pinto Villa frente a la sequía, implica el

percibir el déficit de agua más rápidamente, y tiene como consecuencia el aborto de parte de sus vainas lo cual posteriormente es compensado al acelerar el llenado de las vainas sobrevivientes.

La sequía afecta el contenido de almidón por vaina, en las vainas jóvenes de la variedad Pinto Villa.

Para examinar el transporte de carbono hacia las vainas en la etapa de establecimiento de las mismas, se evaluó el efecto de la sequía sobre la acumulación de almidón en vainas de una y dos semanas. En la Figura 16 se muestra que el contenido de almidón por vaina aumentó con el desarrollo de las vainas en ambas variedades. Considerando que las vainas de una y dos semanas se encuentran en etapa de prealmacenamiento, ya que los cotiledones todavía no se han desarrollado (Oliker *et al.*, 1978; Borisjuk *et al.*, 2003), esta acumulación creciente de almidón en las vainas hace suponer que algún tejido materno de la vaina (observaciones preliminares usando lugol para observar los granos de almidón, indican que es el parénquima del mesocarpo) actúa como reservorio temporal de almidón, como sucede en otras leguminosas (Abirached-Darmency *et al.*, 2005).

En cuanto al efecto del estrés hídrico sobre las vainas de Canario 60 no se detectaron cambios en el contenido de almidón. Al contrario, en la Figura 16 se muestra que la sequía promovió la acumulación de almidón en las vainas de Pinto Villa y, que esta acumulación es estadísticamente significativa en las vainas cosechadas en el día 44 DS. En las vainas cosechadas el día 38 DS, cuando las plantas no se encontraban todavía en sequía severa, se observa el mismo patrón de respuesta descrito, aunque las diferencias no alcanzan a ser significativas.

También se puede ver en la Figura 16 que las vainas de Canario 60 en esta etapa contienen más almidón por vaina que las vainas de Pinto Villa bajo condiciones control, y que no responden al estrés. Como ya se mostró en las Figura 8 y 10 este mayor contenido de almidón en Canario 60, a la larga, no implica más biomasa de las vainas en el momento de la cosecha. Estas observaciones indican

que además de la posibilidad de almacenar almidón en algún tejido materno de la vaina en condiciones de sequía, Pinto Villa moviliza más eficientemente el carbono acumulado en la vaina para convertirlo en biomasa en las semillas; habilidad que no fue evidente en Canario 60.

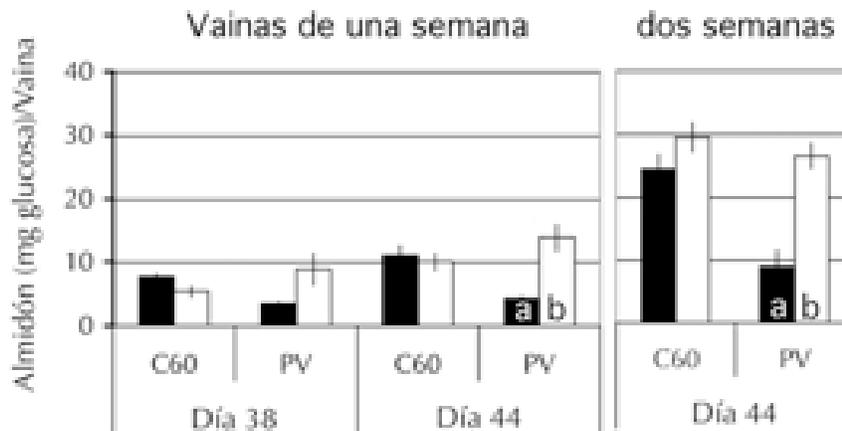


Figura 16. Contenido de almidón por vaina En el experimento descrito en la Figura 14 se midió el efecto de los tratamientos: Sequía severa (columnas blancas) y control (columnas negras), sobre el contenido de almidón en vainas de 1 y 2 semanas de desarrollo de Canario 60 (C60) y Pinto Villa (PV). Las vainitas, etiquetadas al momento de la antésis, se cosecharon en los días 38 y 44 después de la siembra. Las columnas muestran el promedio de 5 plantas en cada tratamiento y las barras indican el error estándar. Letras diferentes indica diferencias significativas entre los tratamientos al 5% de error.

La sequía afecta el contenido de marca incorporada en almidón en las vainas en etapa de establecimiento, de la variedad Pinto Villa

Se determinó el efecto de la sequía sobre la movilidad de carbono hacia las vainas en la etapa de establecimiento. Para esto, como se describe en la Figura 14, se aplicó un pulso de $^{14}\text{CO}_2$, y se cuantificó la marca en almidón por vaina, en vainas de una y dos semanas de desarrollo. En la Figura 17 se muestra que la marca

incorporada en almidón aumentó significativamente por efecto de la sequía en Pinto Villa, en tanto que Canario 60 no se detectó algún efecto significativo.

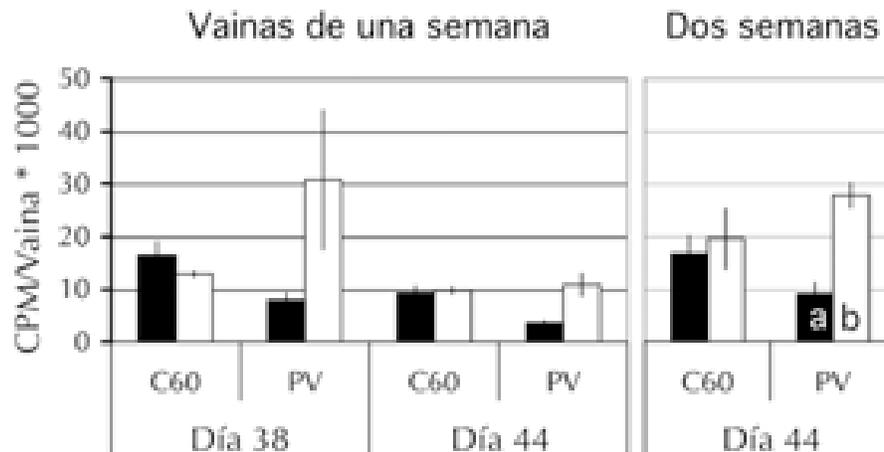


Figura 17. Efecto de la sequía sobre el contenido de marca incorporada en almidón en las vainas en establecimiento En el experimento descrito en la Figura 14, se midió el efecto de los tratamientos: Sequía severa (columnas blancas) y control (columnas negras), sobre la acumulación de ^{14}C incorporado en almidón, en vainas de 1 y 2 semanas de desarrollo de Canario 60 (C60) y Pinto Villa (PV). Las vainitas etiquetadas al momento de la antésis se cosecharon en los días 38 y 44 después de la siembra. Las columnas muestran el promedio de 5 plantas en cada tratamiento y las barras indican el error estándar. Letras diferentes indica diferencias significativas entre los tratamientos al 5% de error.

Es de resaltar que este resultado y el que se muestra en la Figura 11 son consistentes con el hecho que Pinto Villa transporta más carbono (C^{14}) hacia las vainas por efecto de la sequía, independientemente de cuando se incubaron las plantas con la marca, o de cuando se impuso la sequía, antes o después del inicio de la floración. Estas observaciones refuerzan la idea que la sequía induce en Pinto Villa una eficiente translocación del carbono hacia las vainas, lo que se podría considerar como la estrategia adaptativa que le permite comportarse como una variedad resistente a sequía.

5.2.4. Efecto de sequía durante la etapa de establecimiento de las vainas, en el metabolismo de azúcares en la vaina.

Generalmente se acepta la idea que el llenado de los frutos depende de lo que se llama “la fortaleza o fuerza del vertedero”; esto es, la capacidad de los tejidos del fruto para procesar rápidamente los azúcares transportados hacia él, generando y sosteniendo un gradiente de transporte de fotoasimilados entre los órganos fuente y vertedero. De hecho se ha probado que este modelo regula la respuesta a sequía en trigo (Yang *et al.*, 2004a; Yang *et al.*, 2004b).

Considerando que el efecto de mayor acumulación de almidón en Pinto Villa se nota desde las vainas en etapa de establecimiento cuando los cotiledones, que son los órganos de reserva por excelencia en la semilla, todavía no tiene establecida su fortaleza como vertedero; surge la pregunta de si esta aceleración en la translocación de carbono se debe a: el establecimiento temporal de un tejido con gran fortaleza de vertedero en la vaina, o a la regulación positiva del transporte de sacarosa, como se ha sugerido para la respuesta a sequía en maíz (Trouverie & Prioul, 2006).

Con el objeto de indagar cuál de estas dos hipótesis explicaría el incremento en la translocación de ^{14}C hacia las vainas de Pinto Villa en condiciones de sequía, se determinó el contenido de azúcares solubles en las vainas en etapa de establecimiento y se cuantificó la actividad de las enzimas que participan en la degradación de sacarosa en las vainas.

La cuantificación de los azúcares mostró que glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa son los mono y di sacáridos más abundantes en las vainas de una y dos semanas de desarrollo, en ambas variedades (ver detalles en Materiales y métodos).

La determinación de los niveles de estos azúcares en vainas de plantas que fueron sometidas a sequía mostró que en Canario 60, el tratamiento de sequía no afectó el contenido de azúcares solubles por vaina, con respecto la condición control (ver Figura 18)

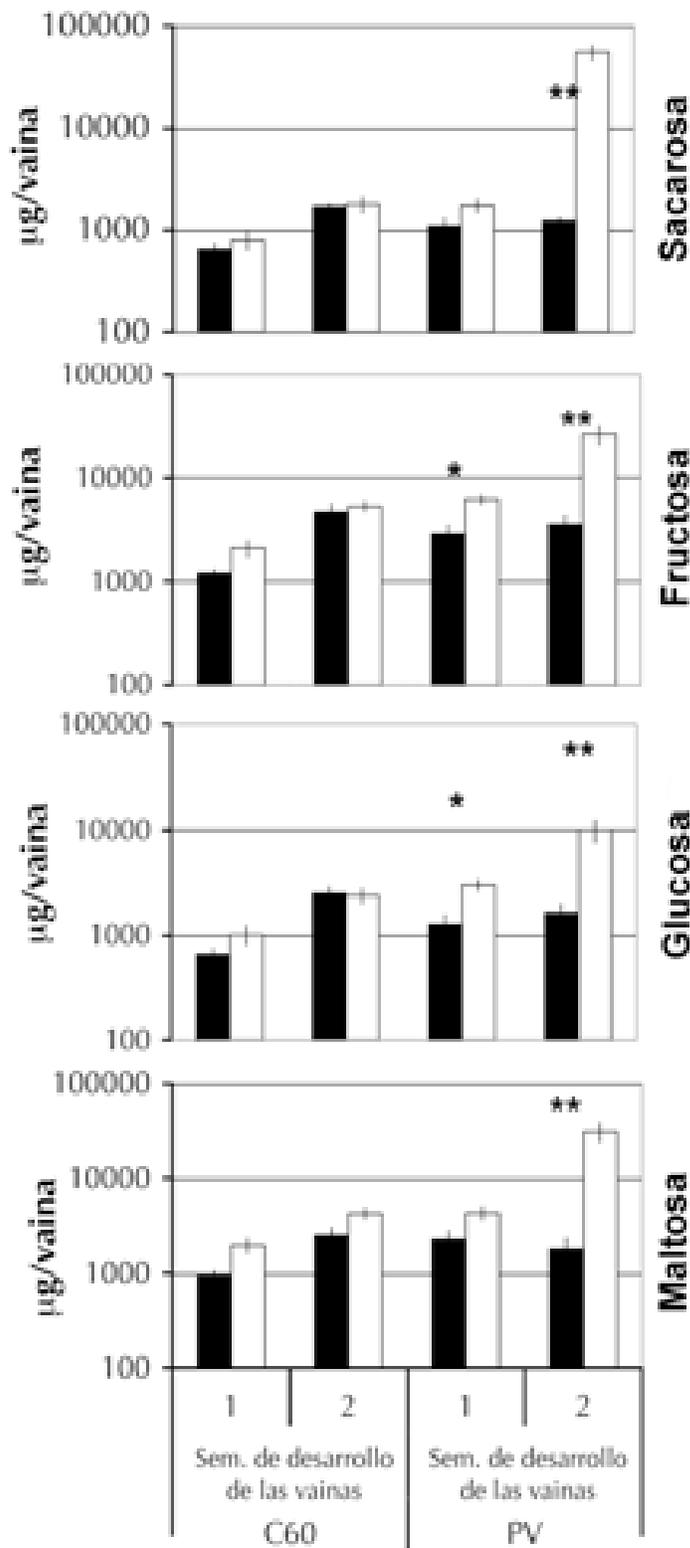


Figura 18. Efecto de la sequía sobre los azúcares solubles, durante el establecimiento de las vainas. En un experimento como el descrito en la Figura 14, se midió el efecto de los tratamientos: Sequía severa (columnas blancas) y control (columnas negras), sobre el contenido de azúcares solubles en vainas de 1 y 2 semanas de desarrollo de: Canario 60 (C60) y Pinto Villa (PV). Las columnas muestran el promedio de 6 plantas en cada tratamiento y las barras indican el error estándar. (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos al 10% de error (**) diferencias significativas entre los tratamientos al 5%.

Al contrario, el contenido de hexosas por vaina fue significativamente mayor en las plantas de Pinto Villa comparado con los valores obtenidos bajo condiciones control. Adicionalmente, el contenido de sacarosa por vaina en Pinto Villa también aumentó por efecto de la sequía, y este aumento es estadísticamente significativo en las vainas de dos semanas de desarrollo. Nótese que las gráficas en la Figura 18 se presentan en escala logarítmica para visualizar mejor el contenido de sacarosa en las vainas de Pinto Villa en sequía, que es 44 veces mayor que el contenido del mismo azúcar en las vainas control.

Con el objeto de evaluar el establecimiento de las vainas como órganos vertedero, se determinaron las actividades enzimáticas que degradan sacarosa; (la actividad de invertasas (ácida y neutra) y de sacarosa sintasa (Susy)), en vainas de una semana de desarrollo. Como se muestra en la Tabla 1, la actividad de ninguna de las tres enzimas se vio afectada por la sequía en el caso de las vainas de Canario 60. En cambio, en las vainas de Pinto Villa, la actividad de invertasa neutra disminuyó y la actividad de sacarosa sintasa aumentó ligeramente. Este ligero incremento en la actividad de Susy podría estar relacionado con el incremento en las hexosas que se observa en las vainas de Pinto Villa en sequía (Figura 18), pero no es suficiente para explicar el incremento en la translocación de carbono hacia las vainas en esta variedad, por un fortalecimiento de la función de estos órganos como vertedero.

En Figura 18 se observa también que en Pinto Villa aumenta el contenido de maltosa en las vainas de dos semana de desarrollo en sequía. El contenido de maltosa no se afecta por la sequía en las vainas de una semana de Pinto Villa ni en ninguna de las vainas de Canario 60. La matosa proviene de la degradación del almidón por efecto de β -amilasas y se ha reportado que en plantas de Arabidopsis, ciertas condiciones de estrés activan una β -amilasa (Kaplan & Guy, 2005). Aunque la acumulación de maltosa es indicativo de que hay degradación de almidón, esto no necesariamente es contradictorio con la acumulación de almidón que se observa bajo estas condiciones; ya que, se ha mostrado que la biogénesis de los

granos de almidón requiere de un recambio activo del mismo (degradación parcial y síntesis) (Smith *et al.*, 2003) .

Tabla 1. Efecto de la sequía sobre la actividad enzimática degradadora de sacarosa en vainas durante su etapa de establecimiento. Se midió la actividad de invertasa neutra, invertasa ácida y sacarosa sintasa (en sentido de la degradación de sacarosa) en vainas de una semana de plantas en sequía severa y en condiciones control. En la actividad de invertasas la hexosa cuantificada fue glucosa, y en la actividad de sacarosa sintasa la hexosa cuantificada fue fructosa.

Actividad	Variedad	Control			Sequía severa		
		hexosa (μg) \cdot proteína (μg) ⁻¹ \cdot hora ⁻¹					
Invertasa ácida	Canario 60	36.970	(+/-14.8)	n=4	29.131	(+/-7.1)	n=4
	Pinto Villa	34.135	(+/-16.7)	n=4	55.049	(+/-14.1)	n=4
Invertasa neutra	Canario 60	45.386	(+/- 7.3)	n=4	46.538	(+/-2.4)	n=4
	Pinto Villa (*)	92.424	(+/- 2.5)	n=4	45.504	(+/-16.5)	n=4
Sacarosa sintasa	Canario 60	93.303	(+/-15.0)	n=4	73.174	(+/-17.0)	n=4
	Pinto Villa (*)	71.087	(+/-10.7)	n=4	100.930	(+/-16.4)	n=4

(*) diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos al 10% de error

6. Discusión

En este trabajo abordamos dos preguntas sobre el frijol común: Primero indagamos por la existencia de marcadores fenotípicos relacionados con la resistencia a sequía y luego nos preguntamos por los mecanismos que le permiten a la variedad Pinto Villa ser resistente a sequía, y la relación de estos mecanismos con la movilidad de fotoasimilados entre los órganos fuente y vertedero. En relación con la primera pregunta, encontramos que el contenido relativo de agua (CRA) en las hojas, la conductividad estomática, y el cambio en el contenido de almidón y de sacarosa en las vainas de dos semanas de desarrollo, son caracteres fenotípicos relacionados con la resistencia a sequía, que podrían ser usados en selección y/o en el establecimiento de marcadores moleculares asociados con la resistencia a sequía.

La importancia de identificar caracteres fenotípicos relacionados con la resistencia a sequía se ha mostrado en cultivos como el arroz y el maíz en los que se han obtenido líneas mejoradas para enfrentar la sequía seleccionando por este tipo de caracteres (Ribaut *et al.*, 2000; Lafitte *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2008). En el frijol se ha sugerido que identificar marcadores fenotípicos relacionados con la respuesta al déficit hídrico es un objetivo prioritario, ya que estos marcadores harían más corta la selección de nuevas variedades resistentes a este tipo de estrés. En la actualidad el proceso de selección de nuevas líneas resistentes a sequía es muy largo y costoso (Schneider *et al.*, 1997b; Miklas *et al.*, 2006). Dado que el frijol es una de las leguminosas que más se consume en el mundo (Graham & Vance, 2003), que en México constituye el segundo cultivo en consumo después del maíz, y que el 84% de la producción mexicana, y de otros países, está sujeta a riesgo de sequía (SIAP, 2003); el desarrollo de nuevas variedades resistentes a esta condición limitante y el establecimiento de herramientas que contribuyan al desarrollo de nuevas variedades, se consideran materias prioritarias.

Usando a las variedades 'Pinto Villa' y 'Canario 60' como modelos de una variedad resistente y otra susceptible a sequía, respectivamente; se midió el CRA, el cual refleja la relación entre el agua que puede absorber un tejido y el agua que contiene en una condición determinada. Altos valores del CRA en hojas, como los que se presentan en Pinto Villa en condiciones de sequía, indican que estas hojas pueden absorber más agua que las mismas hojas en condiciones control y, dado que las células vegetales no pueden cambiar su tamaño, este resultado sugiere que los tejidos foliares de Pinto Villa en déficit hídrico acumularon solutos que les permitieron absorber más agua que las hojas de la misma variedad en condiciones control. Esto no ocurre en la variedad sensible, Canario 60 (ver Figuras 3 y 4).

Las mediciones del CRA en campo en horas de la tarde son consistentes con lo anterior y reflejan que en condiciones de campo hay una mayor deshidratación de las hojas en ambas variedades debido a la menor humedad relativa del ambiente la cual afecta por igual a las plantas en todos los tratamientos (ver Figura 4).

Si bien es cierto que el CRA no es una medición directa del ajuste osmótico (Babu *et al.*, 1999), múltiples reportes muestran la relación entre diferentes formas de estimar el contenido relativo de agua y el ajuste osmótico (Boyer & Meyer, 1979; Dichio *et al.*, 2006; Verslues & Bray, 2006). Una consideración importante para hablar de ajuste osmótico es poder diferenciar el incremento en la concentración de solutos debido a la deshidratación, del incremento activo de solutos para incrementar el potencial osmótico; que es a lo que se llama ajuste osmótico propiamente dicho (Boyer & Meyer, 1979). El estado de hidratación de una planta depende de tres factores: (1) la disponibilidad de agua en el sustrato, (2) la tasa de transpiración y (3) la habilidad de la planta para tomar el agua por la raíz. En cuanto al primer factor; en este trabajo la disponibilidad de agua del sustrato fue controlada en el invernadero y medida en el campo, lo que garantiza que las plantas de ambas variedades se encontraban sometidas a condiciones de disponibilidad de agua en el sustrato comparables en cada experimento, tanto en los tratamientos control como en los tratamientos de estrés. La tasa de transpiración en una condición dada depende de la permeabilidad estomática. En

este trabajo mostramos que en condiciones de sequía terminal en el invernadero y en el campo (ver Figuras 5 y 6), ambas variedades cierran sus estomas al mismo nivel, con lo cual se iguala el efecto del segundo factor sobre ambas variedades. La única posibilidad de que el incremento en el CRA observado en Pinto Villa bajo sequía severa dependa de un mayor estado de deshidratación en sus tejidos, sería que esta variedad presentara una disminución en su habilidad para absorber el agua del sustrato, lo cual se habría observado en la evolución del peso de las macetas. Este análisis permite deducir que la diferencia en el comportamiento del CRA entre Pinto Villa y Canario 60, no depende de diferencias en el estado de hidratación de los tejidos foliares, y sugiere que Pinto Villa en sequía acumula solutos de forma activa en sus hojas, al menos, bajo condiciones de sequía severa en campo y bajo sequía moderada en el invernadero.

Los mayores valores del CRA detectados por la tarde, comparados con los obtenidos por la mañana, sugieren que la acumulación de solutos en las plantas de Pinto Villa, sometidas a restricción de agua, le permite a esta variedad aprovechar la condensación de agua que se presenta durante la noche para recuperar la turgencia de sus tejidos foliares a niveles más cercanos a los de las plantas control que los observados en Canario 60 (ver Figura 4).

En la variedad de frijol común 'Carlos Favorit', que no es una variedad particularmente resistente a sequía, se midió la presión osmótica en hojas de plantas crecidas en hidroponía y tratadas con polietilen-glicol (PEG) para inducir estrés osmótico (Jensen, 1981), al contrario que Pinto Villa, en ese trabajo se encontró que la variedad 'Carlos Favorit' no hace ajuste osmótico. Ese reporte, y nuestros resultados, indican que existe variabilidad genética entre las variedades de frijol en cuanto al ajuste osmótico y el CRA lo cual sugiere que este parámetro en combinación con otros, puede ser un carácter fenotípico útil en la selección de variedades de frijol resistentes a la sequía.

En los últimos años se ha cuestionado la utilidad del ajuste osmótico como mecanismo para evitar el efecto del déficit de agua sobre los cultivos, y la duda es razonable por dos hechos. Primero, una década de investigación usando plantas transgénicas que sobreexpresan enzimas implicadas en la síntesis de osmolitos no ha conducido necesariamente a una mayor resistencia a sequía (Serraj & Sinclair, 2002). Esto sólo refleja que el fenómeno del ajuste osmótico, como muchos otros fenómenos relacionados con la sequía, es complejo y está fuertemente regulado en las plantas. Otras aproximaciones podrían conducir a mejores resultados como lo sugiere la identificación de QTLs asociados al ajuste osmótico y el contenido relativo de agua en girasol (Teulat *et al.*, 1998). El segundo argumento que se ha usado para desvirtuar el ajuste osmótico como mecanismo de respuesta a sequía, útil para el mejoramiento de cultivos, es que los efectos positivos de la acumulación de osmolitos se han observado sólo en condiciones de sequía muy severa, en las cuales, la productividad se ve reducida de todas formas (Serraj & Sinclair, 2002). En este trabajo se observó que Pinto Villa es capaz de realizar un ajuste osmótico bajo condiciones de sequía moderada en el invernadero y, con valores no significativos pero consistentes, también mostró ajuste osmótico bajo condiciones de temporal en el campo (ver Figuras 3 y 4). El hecho de que el ajuste osmótico de una variedad no sea condición suficiente para obtener niveles adecuados de productividad en condiciones reales de cultivo, no lo descarta como un dispositivo que pueda contribuir, en conjunción con otros mecanismos, a incrementar la resistencia a sequía.

En el mismo sentido, los autores que critican el uso del ajuste osmótico como parámetro para la selección de resistencia a sequía, sugieren que los esfuerzos en la selección de resistencia deben orientarse más directamente hacia la optimización de la biomasa cosechable, en lugar de dirigirse a la protección de la biomasa global de la planta, que es el renglón en el que actúa el ajuste osmótico. Sin embargo, considerando como centrales los mecanismos relacionados con la biomasa cosechable (de los cuales nos ocuparemos más adelante en esta

discusión), la protección de la biomasa total de la planta puede implicar un incremento pequeño pero considerable de la protección de la producción en condiciones de sequía.

Usando el mismo modelo de variedades resistente y susceptible, en este trabajo también se demostró que Pinto Villa en condiciones óptimas de crecimiento, mantiene alta permeabilidad estomática en sus hojas (ver Figura 5). En cambio, las plantas de esta variedad que pasaron por restricción hídrica intermedia, tanto en el campo como en el invernadero, disminuyeron su conductividad estomática con respecto a la condición control, lo cual les permite protegerse de la deshidratación. Canario 60 no mostró este efecto en sequía intermedia (ver Figuras 5 y 6).

En leguminosas se ha estudiado la tasa de transpiración en condiciones de sequía y se ha documentado la disminución de la tasa de transpiración en diferentes variedades (Sánchez-Blanco *et al.*, 1998; Aguirre *et al.*, 1999). Sin embargo, en este trabajo, por primera vez se presenta una posible relación entre las diferencias en el comportamiento de la transpiración, evaluada a través de la conductividad estomática y la resistencia a sequía.

En este estudio se encontró que dos de los parámetros propuestos: la conductividad estomática y el CRA en las hojas, reportan diferencias en la respuesta a sequía de las variedades modelo que se usaron. Además, se encontró que el contenido de almidón y de sacarosa en vainas de dos semanas reportaron amplias diferencias, en la respuesta a sequía de las mismas variedades. Todo lo anterior sugiere que estos cuatro parámetros se podrían usar como caracteres fenotípicos asociados con la sequía en frijol. Para validarlos hace falta probarlos en otras variedades susceptibles y resistentes a sequía, preferiblemente abarcando la variabilidad presente en el frijol en cuanto a tipo de semilla y hábito de crecimiento. Y en el caso de la conductividad estomática y el CRA es conveniente evaluar su uso en etapas más precoces del desarrollo vegetativo.

Considerando que la determinación del CRA y la conductividad estomática es barata y reproducible es posible sugerir el uso de estos dos parámetros como caracteres fenotípicos útiles en la selección de líneas resistentes a sequía. En cambio, el contenido de sacarosa y de almidón en vainas de dos semanas no son parámetros tan precoces ni tan baratos de determinar como los anteriores; pero podrían usarse para el establecimiento de marcadores moleculares los cuales a su vez serían útiles en la selección de nuevas líneas resistentes a sequía .

Los resultados discutidos hasta ahora indican que las hojas de Pinto Villa responden a la sequía mediante ajuste osmótico y cerrado de estomas. Estas respuestas ciertamente pueden proteger a los tejidos de la deshidratación, evadir el efecto de la misma sobre la fotosíntesis y ayudan a mantener la biomasa vegetativa de la planta. Sin embargo, en el frijol como en otros cultivos lo que importa en términos de la producción es la biomasa del grano. Eso significa que, aunque el efecto del cambio en el CRA y del cerrado de estomas en respuesta a sequía pueda ser relevante en la resistencia, el mecanismo determinante de la resistencia observada en Pinto Villa, debe estar relacionado con el hecho de que en esta variedad el índice de cosecha se mantiene alto en condiciones de sequía. Esto nos lleva a la segunda pregunta de este trabajo, en relación con la participación de la distribución de fotosintatos durante la resistencia a sequía.

Mediante experimentos de pulso y caza con ^{14}C demostramos que el déficit de agua estimula la movilización eficiente de compuestos carbonados hacia las vainas en la variedad Pinto Villa, lo que le permite mantener su productividad en condiciones de sequía (ver Figuras 8, 10, 12,13,16 y 17).

Este resultado está en concordancia con los reportes previos, a partir de experimentos de campo, en los que se observó que Pinto Villa presenta índices de cosecha altos y mantiene la biomasa del grano en niveles mayores al compararse con variedades susceptibles (Acosta-Gallegos *et al.*, 1997; Rosales-Serna *et al.*, 2000; Terán & Singh, 2002; Beaver *et al.*, 2003; Graham & Vance, 2003). En esos

trabajos se sugiere que la resistencia de Pinto Villa se relaciona con la distribución de fotoasimilados y, que esta distribución podría estar afectada por cambios en la metabolismo del carbono en los órganos fuente y/o vertedero o por cambios en la movilidad del carbono, en respuesta a la restricción de agua.

En este trabajo demostramos que, en plantas que se encuentran en etapa del llenado del grano, la fracción del almidón marcado con ^{14}C (que en adelante llamaré: almidón- ^{14}C) que se localiza en las vainas aumenta cuando la variedad Pinto Villa es sometida a tratamientos de sequía terminal, con respecto a la fracción de almidón marcado que se localiza en vainas de la misma variedad crecida bajo condiciones control. La fracción del almidón- ^{14}C en las vainas de Pinto Villa en sequía y control, también fue mayor que la fracción de almidón- ^{14}C que se localiza en las vainas de Canario 60 sometidas a los mismos tratamientos (ver Figura 11). Los resultados mostrados indican que en esta variedad resistente, hay una mayor eficiencia en la translocación de carbono hacia las vainas en condiciones de sequía, por lo que se propone que éste es uno de los mecanismos seleccionados responsables de la resistencia a sequía en el cultivar Pinto Villa.

Los resultados obtenidos en este trabajo también demuestran que el incremento en la eficiencia de translocación de C por efecto de la sequía, se observa en Pinto Villa desde estados tempranos del desarrollo de las vainas, cuando se encuentran en etapa previa a la etapa de almacenamiento (ver Figuras 16 y 17). Esta respuesta rápida permite que las vainas de Pinto Villa en déficit hídrico alcancen, al final de la etapa de llenado del grano, niveles de acumulación de almidón- ^{14}C similares a los encontrados en las vainas de plantas en condiciones control. Adicionalmente, los niveles de marca incorporada en almidón, encontrados en las vainas de Pinto Villa al final de la etapa de llenado del grano, son mayores que los niveles de almidón- ^{14}C encontrados en las vainas del cultivar susceptible Canario 60 (ver Figura 11).

Los cambios en la movilidad del almidón- ^{14}C también se detectaron a través del análisis de la distribución entre las vainas y las hojas (fracción vertedero/fuente, ver Figura 13). En este análisis se observa que; por efecto de la sequía en Pinto

Villa, el almidón-¹⁴C se localiza preferiblemente en las vainas, lo cual no sucede en Canario 60. Estos datos, junto con el hecho de que los tallos no participaron en la economía del almidón (ver Figura 12), y que es posible recuperar marca de las vainas aún cuando el marcaje se llevó a cabo en plantas que no habían florecido, permiten concluir que las hojas son la principal fuente del carbono que posteriormente se acumula en las vainas, como lo había sugerido Rosales-Serna y colaboradores a partir del análisis de la distribución de la biomasa en esta variedad (Rosales-Serna *et al.*, 2003).

El hecho de que, durante la etapa intermedia del llenado del grano, Canario 60 también acumulara almidón marcado por efecto de la sequía sugiere que en esta variedad existen algunos de los elementos del mecanismo de respuesta al déficit de agua observado en Pinto Villa. Sin embargo, esta respuesta sólo se observa en la etapa intermedia del llenado del grano y no en etapas anteriores ni posteriores, por lo que no es suficiente para sobreponerse al efecto de la sequía (ver Figura 11), lo cual es evidente porque al final del llenado del grano las vainas de Canario 60 sometidas a sequía contienen menos almidón marcado y menos biomasa (ver Figuras 10 y 11). En el análisis vertedero/fuente también resultó evidente que la respuesta de Canario 60 a la sequía es insuficiente, ya que no se detectaron cambios en esta relación en ninguna de las etapas del llenado del grano (ver Figura 13).

En su conjunto, estos datos sugieren que el incremento en la eficiencia de translocación de compuestos carbonados hacia las vainas es una estrategia efectiva usada por Pinto Villa durante la sequía para mantener su productividad.

Los resultados de los experimentos en los que se analizó el efecto de la sequía sobre las vainas en establecimiento, que corresponde a una etapa previa a la de almacenamiento, mostraron que el contenido de almidón en las vainas de Pinto Villa aumenta por efecto de la sequía y, que este tratamiento no tiene efecto sobre el contenido de almidón en las vainas de Canario 60. Este último resultado puede deberse a que las vainas de Canario 60 mostraron un alto contenido de almidón

en condiciones de riego, lo que se podría interpretar como que las vainas de esta variedad no necesitan activar la acumulación de este polisacárido para sobreponerse a la sequía. Sin embargo, como se demuestra en este trabajo, esta variedad susceptible no se sobrepone a la sequía, lo que implica que tener mucho almidón en sus vainas prealmacenativas no redunde en mayor biomasa de sus semillas al final del ciclo de cultivo (ver Figuras 10, 16 y 17).

En haba se estableció mediante microscopia y marcadores del desarrollo, que en las vainas de dos semanas los cotiledones no están en etapa de almacenamiento (Borisjuk *et al.*, 2003) y esto concuerda con lo que se asume comúnmente para el frijol y por lo cual se clasifican las etapas de desarrollo de las vainas (CSU, 2007). Considerando que, Canario 60 tiene altos contenidos de almidón en sus vainas de dos semanas, pero ese contenido de almidón no redunde necesariamente en mayor biomasa de sus semillas, y que en las vainas en esta etapa los cotiledones no están en fase de almacenamiento; es presumible que el carbono que se encontró en las vainas de dos semanas de Pinto Villa y Canario 60 se encuentra en un compartimiento de almacenamiento temporal del cual debe transportarse hacia las semillas. Ya que la sequía disminuye el paso del carbono de la vaina a la semilla en Canario 60, es posible que este transporte entre el compartimiento de almacenamiento temporal y la semilla, esté afectado por la sequía en esta variedad susceptible. Datos preliminares indican que este almacenamiento temporal de almidón ocurre en el exocarpo al igual que se detectó mediante análisis microscópicos en vainas de chícharo en condiciones control (Abirached-Darmency *et al.*, 2005)

Los altos niveles de glucosa y fructosa que se detectaron en vainas en etapa prealmacenativa, de plantas bajo condiciones de sequía, sugieren que en estas vainas hay una activa degradación de sacarosa que, presumiblemente, se utilizará en la síntesis de almidón, el cual, se acumula en las mismas vainas (ver Figura 18). Este resultado concuerda con el incremento observado en la actividad de sacarosa sintasa bajo condiciones de estrés y, con reportes previos que indican

que el transcrito de esta enzima se acumula en respuesta a esta condición estresante en plantas de *Arabidopsis* y de *Phaseolus* (Dejardin *et al.*, 1999; Micheletto *et al.*, 2007). Adicionalmente, la acumulación de mayores cantidades de fructosa que de glucosa en las vainas prealmacenativas de Pinto Villa en condiciones de sequía, sugiere que en estas vainas la degradación de sacarosa ocurre preferencialmente por la vía de la sacarosa sintasa y no por la vía de las invertasas, como se ha reportado que ocurre en *Vicia faba* en condiciones óptimas de crecimiento (Weber *et al.*, 1995; Weber *et al.*, 1996a). En leguminosas no se ha estudiado el papel de la sacarosa sintasa y las invertasas de la vaina y el embrión en condiciones de sequía; sin embargo, se sabe que en condiciones óptimas ambas enzimas participan en el establecimiento de la fuerza del vertedero en diferentes estados de desarrollo de la vaina y de la semilla (Weber *et al.*, 1996a; Weber *et al.*, 1996b).

En cuanto a la síntesis de almidón, los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los reportes que señalan que la actividad de AGPasa se incrementa en respuesta al estrés hídrico en arroz (Yang *et al.*, 2004b). Por otro lado, estos resultados contrastan con los obtenidos en tubérculo de papa en donde se encontró que la actividad de AGPasa y el contenido de almidón disminuyen por efecto de los tratamientos de sequía (Geigenberger *et al.*, 1999). Sin embargo, es de esperarse que los procesos fisiológicos de las semillas sean diferentes a los que se observan en un órgano especializado en almacenamiento que se caracteriza por su gran fuerza como vertedero, como es el tubérculo de papa.

El contenido de maltosa también aumentó por efecto de la sequía en las vainas prealmacenativas de Pinto Villa (ver Figura 18), y dado que la síntesis de almidón requiere de la degradación del mismo (Smith *et al.*, 2003); esta observación refuerza la hipótesis de que esta variedad es capaz de acelerar el desarrollo de la semillas y el llenado del grano en sequía (Rosales-Serna *et al.*, 2003). Además, este resultado concuerda con observaciones hechas en *Arabidopsis* que muestran

que se la acumulación activa de almidón en respuesta a estrés coincide con acumulación de maltosa (Kaplan & Guy, 2005).

Nuestras observaciones (Figura 15) y otros reportes (Acosta-Díaz *et al.*, 1997), que muestran que la sequía induce el aborto de flores y vainas en Pinto Villa, sugieren que para contrarrestar este efecto en esta variedad se inducen cambios en la relación fuente/vertedero que permiten el desarrollo de algunas vainas con semillas de buena calidad, garantizando así la sobrevivencia de su progenie. En cambio la variedad Canario 60 parece ignorar la condición limitante e intenta llenar todas sus semillas, lo que se interrumpe ante condiciones más severas y finalmente resulta en una mayor pérdida de biomasa en las vainas.

La integración de estos resultados sugiere fuertemente que en la variedad resistente a sequía Pinto Villa, la baja disponibilidad de agua induce el transporte eficiente de sacarosa de las hojas hacia las vainas, lo cual favorece la síntesis y acumulación de almidón en las vainas y, posteriormente, en las semillas. Aunque los datos en este trabajo no demuestran de forma directa que la fuerza del vertedero en las vainas de Pinto Villa no juega un papel importante en la distribución del carbono, sin duda constituyen evidencia indicativa de que el transporte de sacarosa y su regulación son el mecanismo que le permite a esta variedad soportar la condición adversa de la sequía y mantener su productividad.

La sequía, como muchas otras condiciones estresantes, impone a las plantas un estrés metabólico porque afecta la fotosíntesis, reduciendo el abasto de azúcares y, por lo tanto, de energía. Por eso no es extraño que la resistencia a sequía en muchos cultivos se relacione con la selección de alelos que implican una eficiente modulación de la transpiración, la fotosíntesis y el metabolismo de carbohidratos. Nuestras conclusiones concuerdan con el número creciente de reportes que vinculan la respuesta a diferentes condiciones de estrés con la modulación del metabolismo de azúcares en *Arabidopsis* y otras especies vegetales (Baena-Gonzalez *et al.*, 2007; Dauwe *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007).

En general, los resultados de este trabajo indican que la resistencia a sequía del frijol común está asociada a la regulación del cerrado de estomas y del ajuste osmótico, y demuestran por primera vez, que esta resistencia está relacionada con modificaciones en la distribución del carbón presumiblemente, a través de modular su transporte, lo cual se había descrito antes para dos especies de cereales y en uva, pero no para leguminosas (Yang *et al.*, 2001; Bota *et al.*, 2004; Trouverie & Prioul, 2006).

7. Conclusiones

- Los parámetros: temperatura foliar, contenido de clorofila, cobertura foliar, longitud y grosor del hipocótilo, y longitud de la raíz primaria no permitieron diferenciar el comportamiento frente a la sequía de las variedades de frijol común Pinto Villa y Canario 60.
- El Contenido Relativo de Agua y la conductividad estomática en hojas adultas y, el contenido de almidón y de sacarosa en vainas de dos semanas de desarrollo, permitieron diferenciar el comportamiento frente a la sequía de las variedades Canario 60 y Pinto Villa.
- En la variedad resistente Pinto Villa, la sequía promueve acumulación de almidón en vainas jóvenes. En la variedad Canario 60 la sequía no afecta la cantidad de almidón en las vainas.
- Los tratamientos de sequía promueven la acumulación de almidón en las vainas de la variedad Pinto Villa. Esto sucede independientemente de si la sequía se aplica antes o después de la floración y, sucede en vainas desde 1 y 2 semanas de desarrollo hasta antes de la madurez. En la variedad Canario 60 este fenómeno no se observa en vainas jóvenes, aunque sucede ligeramente cuando las vainas inician la madurez.
- La fracción del almidón que se localiza en las vainas en la etapa de llenado de la variedad Pinto Villa, aumenta por efecto de los tratamientos de sequía; y es mayor que la del almidón que se localiza en las vainas en plantas de la misma edad de la variedad Canario 60.

- La movilidad del carbono se afecta por la sequía en la variedad Pinto Villa favoreciendo a la vaina como órgano vertedero. Este mecanismo es, al menos en parte, responsable de la resistencia a sequía observada en esta variedad.
- El contenido de sacarosa, glucosa y fructosa aumenta drásticamente en las vainas de dos semanas de Pinto Villa sugiriendo que el transporte de sacarosa se activa en respuesta a sequía en esta variedad.

8. Perspectivas

- Validar el uso de los parámetros conductividad estomática y contenido relativo de agua en hojas de plantas de diferentes etapas del crecimiento vegetativo; como caracteres fenotípicos asociados con la resistencia a sequía, midiéndolos en otras variedades de frijol resistentes y susceptibles a déficit de agua.
- También validar el uso de el contenido de almidón y de sacarosa en vainas de dos semanas; como caracteres fenotípicos asociados con la resistencia a sequía, midiéndolos en otras variedades de frijol resistentes y susceptibles a déficit de agua.
- Medir la actividad de las enzimas AGPasa y sacarosa fosfato sintasa en las vainas, para confirmar si el incremento en la translocación de carbono en respuesta a la sequía se relaciona con el fortalecimiento del vertedero o con el transporte de sacarosa.
- Identificar si existe en frijol algún transportador de sacarosa adicional a los conocidos en soya, chícharo, Medicago y Lotus.
- Identificar, clonar y secuenciar los genes de frijol que codifican para transportadores de sacarosa. Buscar polimorfismos en estos genes, que se puedan asociar con la resistencia a sequía en este cultivo.
- Estudiar los patrones de expresión de los genes de los transportadores bajo las condiciones de interés y en las variedades en estudio, para indagar la posible participación de estos transportadores en la resistencia a sequía.
- Elaborar anticuerpos contra los transportadores de sacarosa, y usarlos en plantas sometidas a sequía y a condiciones control, para caracterizar los patrones de expresión de estas proteínas, contrastarlos con los patrones de expresión de sus transcritos, y para conocer su abundancia y/o localización, bajo condiciones de sequía en las variedades de interés.

9. Bibliografía

- Abirached-Darmency M., Abdel-gawwad M.R., Conejero G., Verdeil J.L. & Thompson R. (2005) In situ expression of two storage protein genes in relation to histo-differentiation at mid-embryogenesis in *Medicago truncatula* and *Pisum sativum* seeds. *J Exp Bot*, **56**, 2019-2028.
- Acosta-Díaz E., Acosta-Gallegos J.A. & Serna R.R. (1997) *Abscission of reproductive structures in common bean under drought stress*. Bean Improvement Cooperative BIC **40**, 65-66.
- Acosta-Gallegos J. & Kohasashi-Shibata J. (1989) Effect of water stress on growth and yield of indeterminate dry-beans (*Phaseolus vulgaris*) cultivar. *Field Crops Research*, **20**, 81-93.
- Acosta-Gallegos J.A., Acosta-Díaz E., Rosales-Serna R., Padilla-Ramírez S., López-Salinas E. & Kelly J.D. (1997) *Yield response of dry bean cultivars from different races under drought stress*. Bean Improvement Cooperative BIC **40**, 75-76.
- Acosta-Gallegos J.A., Ochoa-Márquez R., Arrieta-Montiel M.P., Ibarra-Pérez F., Pajarito-Ravelero A. & Sánchez-Valdez I. (1995) Registration of 'Pinto Villa' Common Bean. *Crop Science*, **35**, 1211.
- Acosta-Gallegos J.A. & White J.W. (1995) Phenological plasticity as an adaptation by common bean to rainfed environments. *Crop Science*, **35**, 199-204.
- Aguirre J.F., Kohashi-Shibata J., Trejo C.L. & Acosta-Gallegos J. (1999) Respuesta fisiológica del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a la sequía, en un sistema de raíz dividida. *Agronomía Mesoamericana*, **10**, 31-36.
- Andersen M.N., Asch F., Wu Y., Jensen C.R., Naested H., Mogensen V.O. & Koch K.E. (2002) Soluble invertase expression is an early target of drought stress during the critical, abortion-sensitive phase of young ovary development in maize. *Plant Physiology*, **130**, 591-604.
- Araus J.L., Amaro T., Zuhair Y. & Nachit M.M. (1997) Effect of leaf structure and water status on carbon isotope discrimination in field-grown durum wheat. *Plant Cell and Environment*, **20**, 1484-1494.
- Babu R.C., Pathan M.S., Blum A. & Nguyen H.T. (1999) Comparison of measurement methods of osmotic adjustment in rice cultivars. *Crop Science*, **39**, 150-158.
- Baena-Gonzalez E., Rolland F., Thevelein J.M. & Sheen J. (2007) A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature*, **448**, 938-942.
- Bänziger M., Edmeades G.O. & Quarrie S. (1996) *Drought stress at seedling stage. Are there genetic solutions?* Paper presented at the Developing drought-and low Nitrogen- tolerant maize., Texcoco, México.
- Beaver J.S., Rosas J.C., Myers J., Acosta J., Kelly J.D., Nchimbi-Msolla S., Misangu R., Bokosi J., Temple S., Arnaud-Santana E. & Coyne D.P. (2003) Contributions of the Bean/Cowpea CRSP to cultivar and germplasm development in common bean. *Field Crops Research*, **82**, 87-102.

- Borisjuk L., Rolletschek H., Wobus U. & Weber H. (2003) Differentiation of legume cotyledons as related to metabolic gradients and assimilate transport into seeds. *Journal of Experimental Botany*, **54**, 503-512.
- Bota J., Stasyk O., Flexas J. & Medrano H. (2004) Effect of water stress on partitioning of ¹⁴C-labelled photosynthates in *Vitis vinifera*. *Functional Plant Biology*, **31**, 697-708.
- Boyer J.S. & Meyer R.F. (1979) Osmoregulation in plants during drought. *Basic Life Sci*, **14**, 199-202.
- Boyer J.S. & Westgate M.E. (2004) Grain yields with limited water. *Journal of Experimental Botany*, **55**, 2385-2394.
- Bray E.A. (1997) Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*, **2**, 48-54.
- Bray E.A. (2001) Plant Response to Water-deficit Stress. In: *Encyclopedia of life sciences*. Nature Publishing Group, www.els.net.
- Bray E.A. (2004) Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*, **55**, 2331-2341.
- Bressani R. (1983) Research needs to upgrade the nutritional quality of common beans (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Foods Human Nutr.*, **32**, 101-110.
- Brunner B.R. & Beaver J.S. (1989) Estimation of outcrossing of the common bean in Puerto Rico. *HortScience*, **24**, 669-671.
- Casa A.d.I., Ovando G., Bressanini L., Rodríguez Á. & Martínez J. (2007) Uso del índice de área foliar y del porcentaje de cobertura del suelo para estimar la radiación interceptada en papa. *Agricultura Técnica (Chile)*, **67**, 78-85.
- Chaves M.M., Pereira J.S., Maroco J., Rodriguez M.L., Ricardo C.P.P., Osório M.L., Carvaho I., Faria T. & Pinheiro C. (2002) How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and growth. *Ann Bot (Lond)*, **89 Spec No**, 907-916.
- CIAT (2001) Centro Internacional de Agricultura Tropical "Frijol en América Central y el Caribe". <http://www.ciat.cgiar.org/beans/>. Last update: Julio 2005. Access: Septiembre 2005.
- Cruz-de-Carvalho M.H., d'Arcy-Lameta A., Roy-Macauley H., Gareil M., Maarouf H.E., Pham-Thi A.-T. & Zuli-Fodil Y. (2001) Aspartic protease in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp): enzymatic activity, gene expression and relation to drought susceptibility. *FEBS Letters*, **492**, 242-246.
- CSU (2007) Colorado State University. Dry bean growth stages. <http://www.colostate.edu/Orgs/VegNet/vegnet/dbgs.html>. Last update: Access: abril 28 2008.
- Dauwe R., Morreel K., Goeminne G., Gielen B., Rohde A., Beeumen J.V., Ralph J., Boudet A.-M., Kopka J., Rochange S.F., Halpin C., Messens E. & Boerjan W. (2007) Molecular phenotyping of lignin-modified tobacco reveals associated changes in cell-wall metabolism, primary metabolism, stress metabolism and photorespiration. *Plant Journal*, **52**, 263-285.
- Dawo M.I., Sanders F.E. & Pilbeam D.J. (2007) Yield, yield components and plant architecture in the F3 generation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)

- derived from a cross between the determinate cultivar 'Prelude' and an indeterminate landrace. *Euphytica*, **156**, 77–87.
- Debouck D. (1991) Systematics and morphology. In: *Common bean. Research for Crop Improvement* (eds A.v. Schoonhoven & O. Voysest), pp. 75-118. CIAT, Cali, Colombia.
- Dejardin A., Rochat C., Willeme S. & Boutin J.P. (1997) Contribution of sucrose synthase, ADP-glucose pyrophosphorylase and starch synthase to starch synthesis in developing pea seeds. *Plant Cell and Environment*, **20**, 1421-1430.
- Dejardin A., Sokolov L.N. & Kleczkowski L.A. (1999) Sugar/osmoticum levels modulate differential abscisic acid-independent expression of two stress-responsive sucrose synthase genes in Arabidopsis. *Biochemical Journal*, **344**, 503-509.
- Dichio B., Xiloyannis C., Sofo A. & Montanaro G. (2006) Osmotic regulation in leaves and roots of olive trees during a water deficit and rewatering. *Tree Physiol*, **26**, 179-185.
- FAO (2000) DROUGHT IMPACT MITIGATION AND PREVENTION: LONG-TERM PERSPECTIVE. <http://www.fao.org/docrep/meeting/X4158E.htm#4>. Last update: Access: Septiembre 21 2004.
- FAO (2005) Portal de Waicent, Estadísticas. http://www.fao.org/waicent/portal/statistics_es.asp. Last update: Access: Mayo 2005.
- FAO (2007) FAOSTAT Todos los datos. <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=336&lang=es>. Last update: 2007. Access: 12 octubre 2007.
- FENALCE (2007) Frijol. http://fenalce.net/pagina.php?p_a=51. Last update: Access: 1 agosto 2008.
- Ferreira J.L., Souza-Carneiro J.E.d., Teixeira A.L., Lanes F.F.d., Cecon P.R. & Borém A. (2007) Gene flow in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Euphytica*, **153**, 165-170.
- Fraiture C.d., Giordano M. & Liao Y. (2008) Biofuels and implications for agricultural water use: blue impacts of green energy. *Water Policy*, **10**, 67-81.
- Geigenberger P., Muller-Rober B. & Stitt M. (1999) Contribution of adenosine 5'-diphosphoglucose pyrophosphorylase to the control of starch synthesis is decreased by water stress in growing potato tubers. *Planta*, **209**, 338-345.
- Geigenberger P., Reimholz R., Geiger M., Merlo L., Canale V. & Stitt M. (1997) Regulation of sucrose and starch metabolism in potato tubers in response to short-term water deficit. *Planta*, **201**, 502-5118.
- Gepts P. (1998) Origin and evolution of common bean: past events and recent trends. *Hort Science*, **33**, 1124-1130.
- Gepts P. & Debouck D. (1991) Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: *Common bean. Research for Crop Improvement* (eds A.v. Schoonhoven & O. Voysest), pp. 7-53. CIAT, Cali, Colombia.

- Graham P.H. & Vance C.P. (2003) Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*, **131**, 872-877.
- Hernandez I., Alegre L. & Munne-Bosch S. (2004) Drought-induced changes in flavonoids and other low molecular weight antioxidants in *Cistus clusii* grown under Mediterranean field conditions. *Tree Physiol*, **24**, 1303-1311.
- Hervé D., Fabre F., Berrios E.F., Leroux N., Chaarani G.A., Planchon C., Sarrafi A. & Gentzbittel L. (2001) QTL analysis of photosynthesis and water status traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under greenhouse conditions. *J Exp Bot*, **52**, 1857-1864.
- Huber S.C. (1989) Biochemical Mechanism for Regulation of Sucrose Accumulation in Leaves during Photosynthesis. *Plant Physiol*, **91**, 656-662.
- Jager H.J. & Meyer H.R. (1977) Effect of water stress on growth and proline metabolism of *Phaseolus vulgaris* L. *Oecologia*, **30**, 83-96.
- Jensen C.R. (1981) Influence of water and salt stress on water relationships and carbon dioxide exchange of top and roots in beans. *New Phytol*, **87**, 285-295.
- Jiménez-Bremont J.F., Becerra-Flora A., Hernández-Lucero E., Rodríguez-Kessler M., Acosta-Gallegos J.A. & Ramírez-Pimentel J.G. (2006) Proline accumulation in two bean cultivars under salt stress and the effect of polyamines and ornithine. *Biologia Plantarum*, **50**, 763-766.
- Jordan W.R. & Ritchie J.T. (1971) Influence of Soil Water Stress on Evaporation, Root Absorption, and Internal Water Status of Cotton1. *Plant Physiology*, **48**, 783-788.
- Juenger T.E., McKay J., Keurentjes J. & Richards J. (2004) *Characterization of QTL underlying whole-plant physiology in Arabidopsis: delta C13, stomatal conductance, and transpiration efficiency*. Paper presented at the 15th International Conference on Arabidopsis Research, Berlin.
- Jury W.A. & Henry Vaux J. (2005) The role of science in solving the world's emerging water problems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 15715-15720.
- Kaplan F. & Guy C.L. (2005) RNA interference of Arabidopsis beta-amylase prevents maltose accumulation upon cold shock and increases sensitivity of PSII photochemical efficiency to freezing stress. *Plant Journal*, **44**, 730-743.
- Kelly J.D., Kolkman J.M. & Schneider K. (1998) Breeding for yield in dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Euphytica*, **102**, 343-356.
- Kim J.-Y., Mahe A., Brangeon J. & Prioul J.-L. (2000) A maize vacuolar invertase, IVR2, is induced by water stress. Organ/tissue specificity and diurnal modulation of expression. *Plant Physiology*, **124**, 71-84.
- Lafitte R., Blum A. & Atlin G. (2003) Using secondary traits to help identify drought-tolerant genotypes. In: *Breeding rice for drought-prone environments* (ed B. Hardy), pp. 37-48. International Rice Research Institute (IRRI), Los Baños (Filipinas).
- Leung J. & Giraudat J. (1998) Abscisic Acid Signal Transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **49**, 199-222.
- Li Y., Smith C., Corke F., Zheng L., Merali Z., Ryden P., Derbyshire P., Waldron K. & Bevana M.W. (2007) Signaling from an altered cell wall to the nucleus

- mediates sugar-responsive growth and development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **19**, 2500-2515.
- Luna C.M., Pastori G.M., Driscoll S., Groten K., Bernard S. & Foyer C.H. (2005) Drought controls on H₂O₂ accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. *J Exp Bot*, **56**, 417-423.
- Marcelis L.F., Heuvelink E., Hofman-Eijer L.R., Bakker J.D. & Xue L.B. (2004) Flower and fruit abortion in sweet pepper in relation to source and sink strength. *Journal of Experimental Botany*, **55**, 2261-2268.
- Martínez E.A.F. (2001) Efecto del déficit de humedad del suelo sobre el desarrollo del ajonjolí (*Sesamum indicum* L.). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. **18**, 1-12.
- Micheletto S., Rodriguez-Uribe L., Hernandez R., Richins R.D., Curry J. & O'Connell M.A. (2007) Comparative transcript profiling in roots of *Phaseolus acutifolius* and *P. vulgaris* under water deficit stress. *Plant Science*, **173**, 510-520.
- Miklas P.N., Kelly J.D., Beebe S.E. & Blair M.W. (2006) Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. *Euphytica*, **147**, 105-131.
- Muller-Rober B., Sonnewald U. & Willmitzer L. (1992) Inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. *Embo J*, **11**, 1229-1238.
- Munne-Bosch S. & Alegre L. (2003) Drought-induced changes in the redox state of alpha-tocopherol, ascorbate, and the diterpene carnosic acid in chloroplasts of Labiatae species differing in carnosic acid contents. *Plant Physiol*, **131**, 1816-1825.
- Munné-Bosch S., Jubany-Marí T. & Alegre L. (2001) Drought-induced senescence is characterized by loss of antioxidant defense in chloroplast. *Plant Cell and Environment*, **24**, 1319-1327.
- Navea C., Terrazas T., Delgado-Salinas A. & Ramírez-Vallejos P. (2002) Foliar response of wild and domesticated *Phaseolus vulgaris* L. to water stress. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **00**, 1-8.
- Noctor G., Veljovic-Jovanovic S., Driscoll S., Novitskaya L. & Foyer C.H. (2002) Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: a predominant role for photorespiration? *Ann Bot (Lond)*, **89**, 841-850.
- Oliker M., Poljakoff-Mayber A. & Mayer M. (1978) Changes in weight, nitrogen accumulation, respiration and photosynthesis during growth and development of seeds and pods of *Phaseolus vulgaris*. *American Journal of Botany*, **65**, 366-371.
- Parry M.A.J., Andralojc P.J., Khan S., Lea P.J. & Keys A.J. (2002) Rubisco activity: effects of drought stress. *Ann Bot (Lond)*, **89**, 833-839.
- Pinheiro C., Chaves M.M. & Ricardo C.P. (2001) Alterations in carbon and nitrogen metabolism induced by water deficit in the stems and leaves of *Lupinus albus* L. *Journal of Experimental Botany*, **52**, 1063-1070.

- Pinheiro C., Rodrigues A.P., de Carvalho I.S., Chaves M.M. & Ricardo C.P. (2005) Sugar metabolism in developing lupin seeds is affected by a short-term water deficit. *Journal of Experimental Botany*, **56**, 2705-2712.
- Price A.H., Townend J., Jones M.P., Audebert A. & Courtois B. (2002) Mapping QTLs associated with drought avoidance in upland rice grown in the Philippines and West Africa. *Plant Mol Biol*, **48**, 683-695.
- Ramírez-Vallejo P. & Kelly J.D. (1998) Traits related to drought resistance in common bean. *Euphytica*, **99**, 127-136.
- Reyes J.L., Rodrigo M.J., Colmenero-Flores J.M., Gil J.V., Garay-Arroyo A., Campos F., Salamini F., Bartels D. & Covarrubias A.A. (2005) Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro. *Plant, Cell and Environment*, **28**, 709-718.
- Reynolds M., Dreccer F. & Trethowan R. (2007) Drought-adaptive traits derived from wheat wild relatives and landraces. *J Exp Bot*, **58**, 177-186.
- Ribaut J.M., Williams H.M., Khairallah M., Worland A.J. & Hoisington D. (2000) *Genetic basis of physiological traits*. CIMMYT, México DF.
- Rosales-Serna R., Hohashi-Shibata J. & Acosta-Gallegos J.A. (2003) Biomass distribution, maturity acceleration and yield in drought-stressed common bean cultivars. *Field Crops Research*, **85**, 203-211.
- Rosales-Serna R., Ramírez-Vallejo P., Acosta-Gallegos J.A., Castillo-Gonzalez F. & Kelly J.D. (2000) Rendimiento del grano y tolerancia a la sequía del frijol común en condiciones de campo. *Agrociencia*, **34**, 153-165.
- SAGARPA (2007) Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) Anuario estadístico de la producción agrícola. <http://www.siea.sagarpa.gob.mx/InfOMer/default.htm>. Last update: Access: 15 Octubre 2007.
- Sánchez-Blanco M.J., Morales M.A., Torrecillas A. & Alarcón J.J. (1998) Diurnal and seasonal osmotic potential changes in *Lotus creticus creticus* plants grown under saline stress. *Plant Science*, **136**, 1-10.
- Sánchez-Díaz M. & Aguirreola J. (1993) Relaciones Hídricas. In: *Fisiología y bioquímica vegetal* (eds J. Azcon-Bieto & M. Talon), pp. 49-90. McGraw-Hill Interamericana, Madrid.
- Schneider K.A., Brothers M.E. & Kelly J.D. (1997a) Marker-assisted selection to improve drought resistance in common bean. *Crop Science*, **37**, 51-60.
- Schneider K.A., Rosales-Serna R., Ibarra-Perez F., Cazares-Enriquez B., Acosta-Gallegos J.A., Ramirez-Vallejo P., Wassimi N. & Kelly J.D. (1997b) Improving common bean performance under drought stress. *Crop Science*, **37**, 43-50.
- Schnoor J.L., Doering-III O.C., Entekhabi D., Hiler E.A., Hullar T.L. & Tilman G.D. (2008) *Water implications of biofuels production in The United States*. National Academy of Sciences, Washintong, D.C.
- Schnyder H. (1993) The role of carbohydrate storage and redistribution in the source-sink relations of wheat and barley during grain filling - a review. *New Phytologist*, **123**, 233-245.

- Sengupta S., Jana M.L., Sengupta D. & Naskar A.K. (2000) A note on the estimation of microbial glycosidase activities by dinitrosalicylic acid reagent. *Appl Microbiol Biotechnol*, **53**, 732-735.
- Serraj R. & Sinclair T.R. (2002) Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? *Plant, Cell and Environment*, **25**, 333-341.
- Sheskin D.J. (2004) *Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures*. (Third ed.). Chapman & Hall/CRC, Boca Raton, Florida.
- SIAP (2002) Sistema Integral de Información Agroalimentaria y Pesquera. Last update: agosto 2002. Access: 9 de Octubre 2002.
- SIAP (2003) Anuario estadístico de la producción agrícola. http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar_comagri.html. Last update: Access: Mayo 2005.
- Singh S.P. (1985) Conceptos básicos para el mejoramiento de frijol por hibridación. In: *Frijol: Investigación y Producción* (eds M. Lopez, F. Fernandez, & A.v. Schoonhoven), pp. 109-112. CIAT, Cali, Colombia.
- Singh S.P. (1995) Selection for water-stress tolerance in interracial populations of common bean. *Crop Science*, **35**, 118-124.
- Smith A.M., Zeeman S.C., Torneycroft D. & Smith S.M. (2003) Starch mobilization in leaves. *Journal of Experimental Botany*, **54**, 577-583.
- Subbarao G.V., Johansen C., Slinkard A.E., Rao R.C.N., Saxena N.P. & Chauhan Y.S. (1995) Strategies for improving drought resistance in grain legumes. *Critical reviews in plant sciences*, **14**, 469-523.
- Terán H. & Singh S.P. (2002) Comparison of sources and lines selected for drought tolerance in Common Bean. *Crop Science*, **42**, 64-70.
- Teulat B., This D., Khairallah M., Borries C., Ragot C., Sourdille P., Leroy P., Monneveux P. & Charrier A. (1998) Several QTLs involved in osmotic-adjustment trait variation in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, **96**, 688-698.
- Tezara W., Mitchell V., Driscoll S.P. & Lawlor D.W. (2002) Effects of water deficit and its interaction with CO₂ supply on the biochemistry and physiology of photosynthesis in sunflower. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 1781-1791.
- Trouverie J., Chateau-Joubert S., Thevenot C., Jacquemot M.-P. & Prioul J.-L. (2004) Regulation of vacuolar invertase by abscisic acid or glucose in leaves and roots from maize plantlets. *Planta*, **219**, 894-905.
- Trouverie J. & Prioul J.-L. (2006) Increasing leaf export and grain import capacities in maize plants under water stress. *Functional Plant Biology*, **33**, 209-218.
- Trouverie J., Thévenot C., Rocher J.-P., Sotta B. & Prioul J.-L. (2003) The role of abscisic acid in the response of a specific vacuolar invertase to water stress in the adult maize leaf. *Journal of Experimental Botany*, **54**, 2177-2186.
- UNESCO-WWAP (2003) *Agua para todos, Agua para la vida. Resumen del Informe de la ONU sobre desarrollo de los recursos hidricos del mundo* (UNESCO, trans.). UNESCO/Mundi Prensa-Libros, Paris.

- Verslues P.E. & Bray E.A. (2006) Role of abscisic acid (ABA) and Arabidopsis thaliana ABA-insensitive loci in low water potential-induced ABA and proline accumulation. *J Exp Bot*, **57**, 201-212.
- Wang H.-L., Lee P.-D., Chen W.-L., Huang D.-J. & Su J.-C. (2000) Osmotic stress-induced changes of sucrose metabolism in cultured sweet potato cells. *Journal of Experimental Botany*, **51**, 1991-1999.
- Wearherley P.E. (1950) Studies in the water relations of the cotton plant. I. The field measurement of water deficit in leaves. *New Phytologist*, **49**, 81-97.
- Weber H., Borisjuk L., Heim U., Buchner P. & Wobus U. (1995) Seed coat-associated invertases of fava bean control both unloading and storage functions: cloning of cDNAs and cell type-specific expression. *Plant Cell*, **7**, 1835-1846.
- Weber H., Borisjuk L. & Wobus U. (1996a) Controlling seed development and seed size in *Vicia faba*: a role for seed coat-associated invertases and carbohydrate state. *The Plant Journal*, **10**, 823-834.
- Weber H., Buchner P., Borisjuk L. & Wobus U. (1996b) Sucrose metabolism during cotyledon development of *Vicia faba* L. is controlled by the concerted action of both sucrose-phosphate synthase and sucrose synthase: expression patterns, metabolic regulation and implications for seed development. *Plant J*, **9**, 841-850.
- Yang J., Zang J., Wang Z., Zhu Q. & Liu L. (2002) Abscisic acid and cytokinins in the root exudates and leaves and their relationship to senescence and remobilization of carbon reserves in rice subjected to water stress during grain filling. *Planta*, **215**, 645-652.
- Yang J., Zang J., Wang Z., Zhu Q. & Liu L. (2004a) Activities of fructan- and sucrose-metabolizing enzymes in wheat stems subjected to water stress during grain filling. *Planta*, **220**, 331-343.
- Yang J., Zhang J., Wang Z., Xu G. & Zhu Q. (2004b) Activities of key enzymes in sucrose-to-starch conversion in wheat grains subjected to water deficit during grain filling. *Plant Physiology*, **135**, 1621-1629.
- Yang J., Zhang J., Wang Z. & Zhu Q. (2001) Activities of starch hydrolytic enzymes and sucrose-phosphate synthase in the stems of rice subjected to water stress during grain filling. *Journal of Experimental Botany*, **52**, 2169-2179.
- Yang J., Zhang J., Liu K., Wang Z. & Liu L. (2006) Abscisic acid and ethylene interact in wheat grains in response to soil drying during grain filling. *New Phytol*, **171**, 293-303.
- Yang J., Zhang J., Wang Z., Liu L. & Zhu Q. (2003) Postanthesis water deficit enhance grain filling in two-line hybrid. *Crop Science*, **43**, 2099-2108.
- Zeven A.C. (1997) The introduction of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) into Western Europe and the phenotypic variation of dry beans collected in The Netherlands in 1946. *Euphytica*, **94**, 319-328.
- Zhang J., Nguyen H.T. & Blum A. (1999) Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. *Journal of Experimental Botany*, **50**, 291-302.
- Zhao X.-Q., Xu J.-L., Zhao M., Lafitte R., Zhu L.-H., Fu B.-Y., Gao Y.-M. & Li Z.-K. (2008) QTLs affecting morph-physiological traits related to drought tolerance

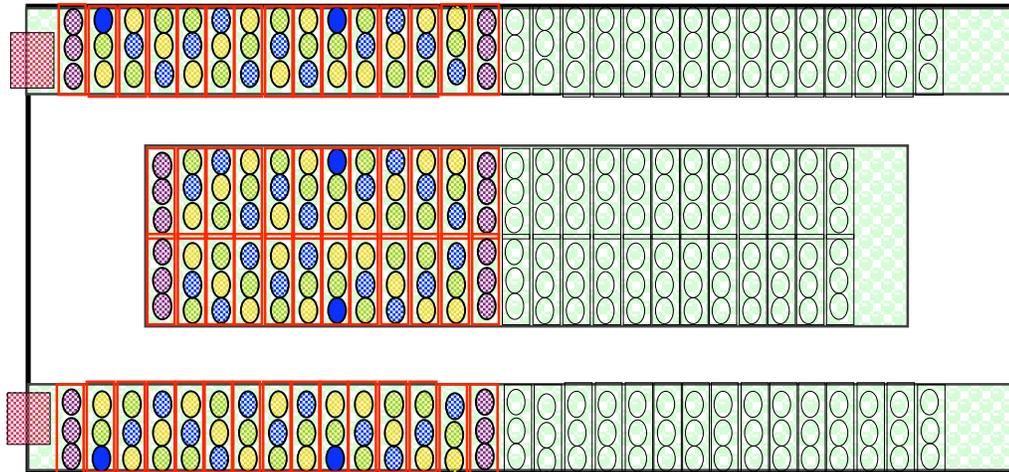
detected in overlapping introgression lines of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science*, **174**, 618–625.

Zhu J.-K. (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol*, **53**, 247-273.

Zinselmeier C., Jeong B.-R. & Boyer J.S. (1999) Starch and the control of kernel number in maize at low water potentials. *Plant Physiology*, **121**, 25-35.

10. Apéndices

Apéndice 1. Representación esquemática de la distribución de las macetas en el invernadero.



Aire acondicionado

Bloque de borde

Bloque de experimental

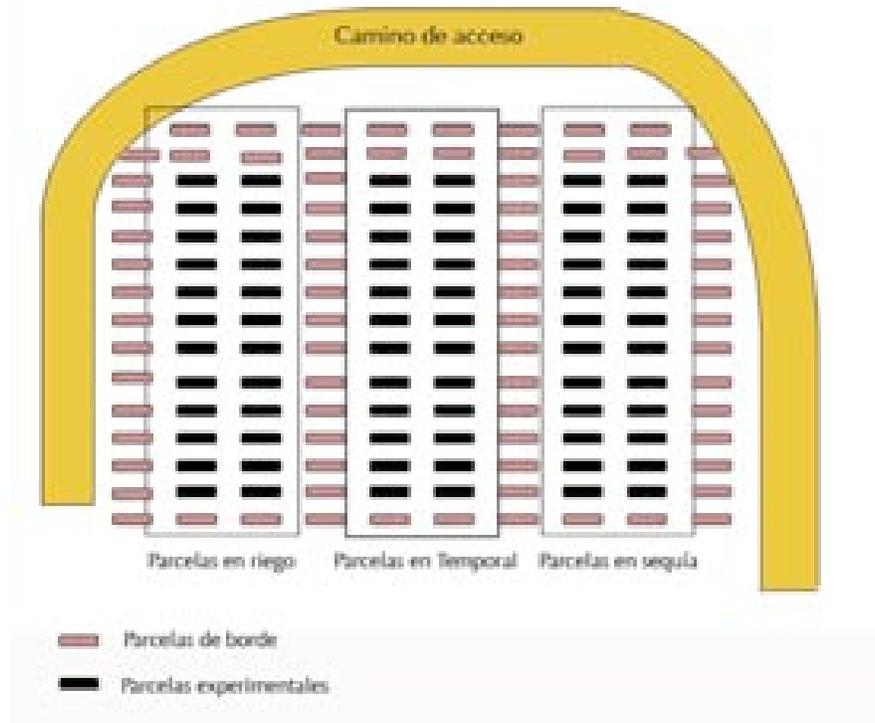
Maceta en sequía

Maceta control

Maceta en sequía

Apéndice 2. Experimento de Campo.

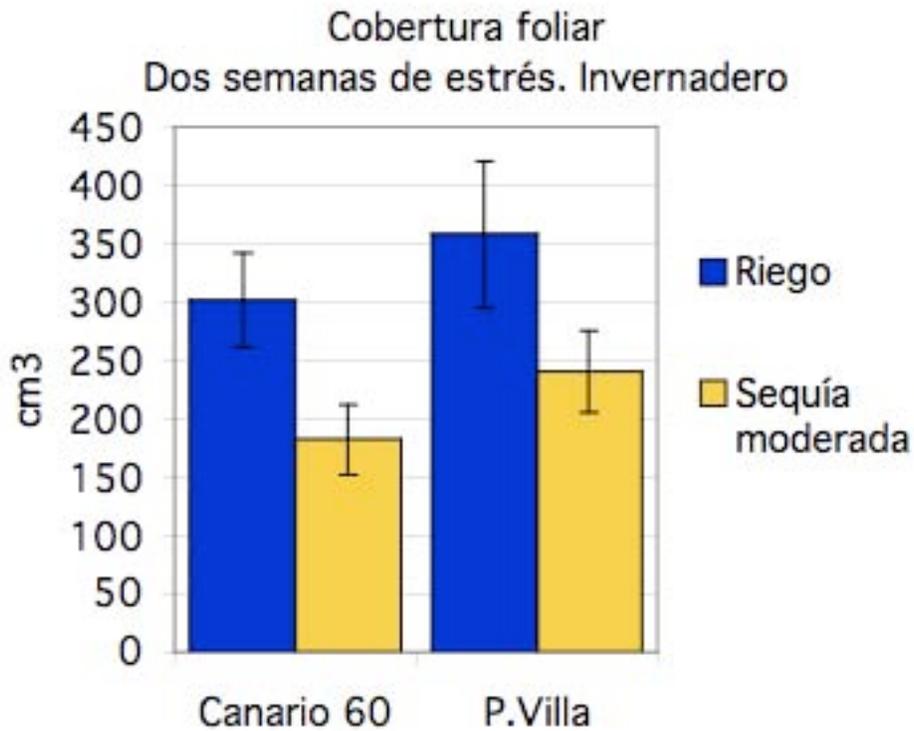
1. Representación esquemática de la distribución de las parcelas en el campo



2. Contenido de agua en el suelo al momento del muestreo

Tratamiento	Agua/ mg sustrato (ml)/(g)	Potencial hídrico (Bars)
Riego	0,58 +/- 0,05	-3,19 +/- 1,9
Temporal	0,33 +/- 0,08	-8,35 +/- 1,5
Sequía	0,31 +/- 0,07	-8,11 +/- 1,3

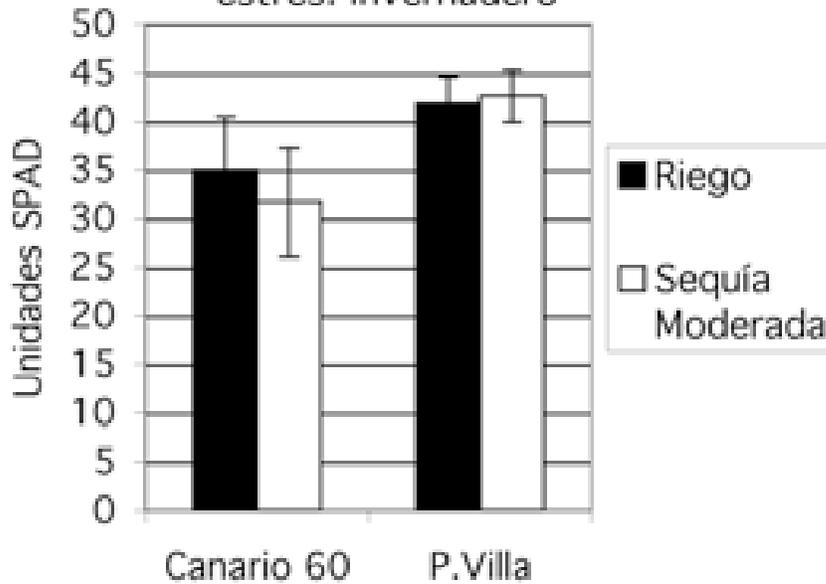
Apéndice 3. Resultados de medir el efecto de la sequía sobre la cobertura foliar



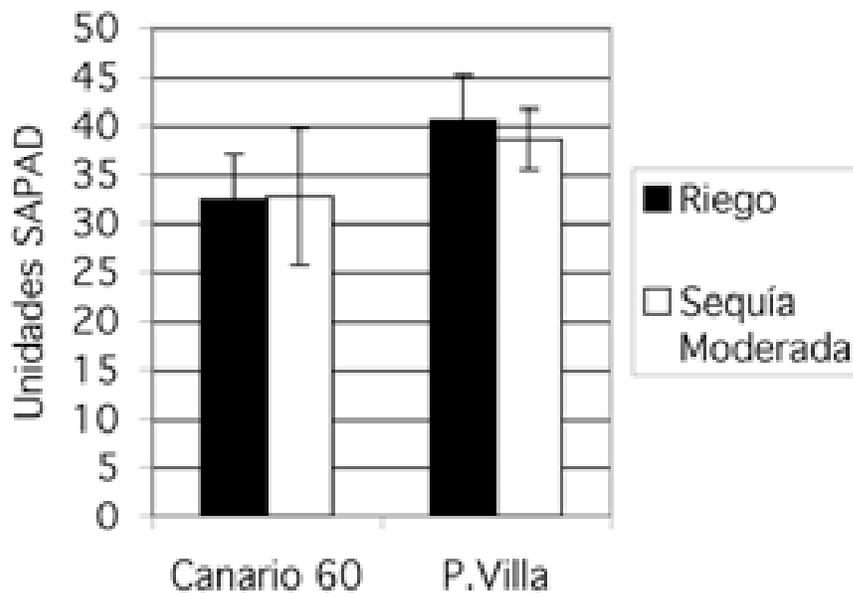
El tratamiento afecta a ambas variedades promoviendo una disminución del 1.6 y 1,5 veces en Canario 60 y en Pinto Villa respectivamente, las cuales no son estadísticamente diferentes entre si.

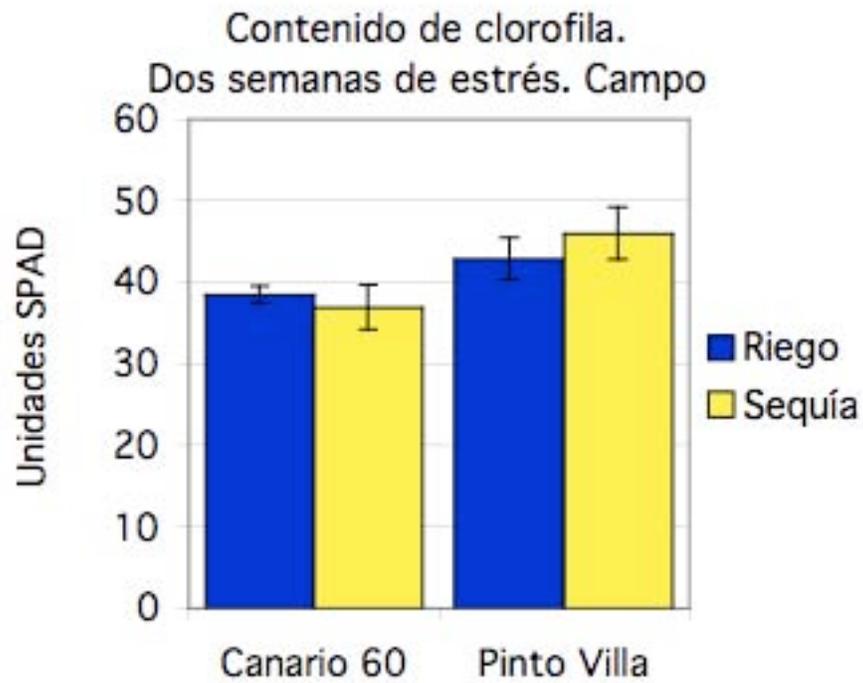
Apéndice 4. Resultados de medir el efecto de la sequía sobre el contenido de clorofila

Contenido de clorofila dos semanas de estrés. Invernadero



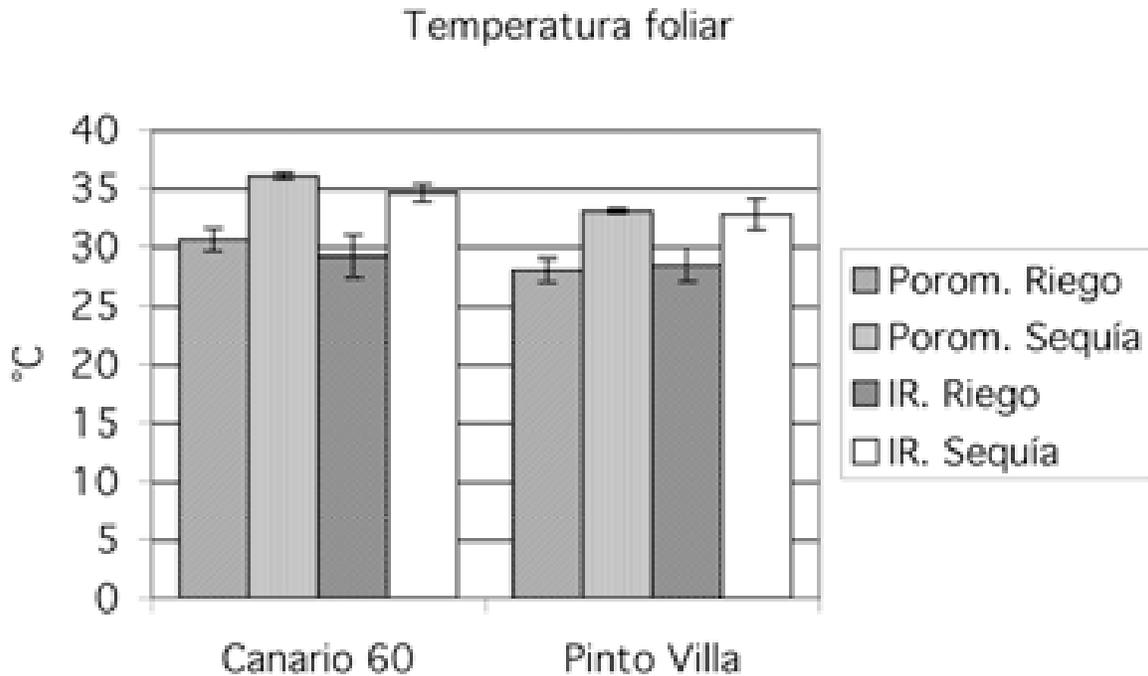
Contenido de clorofila tres semanas de estrés. Invernadero





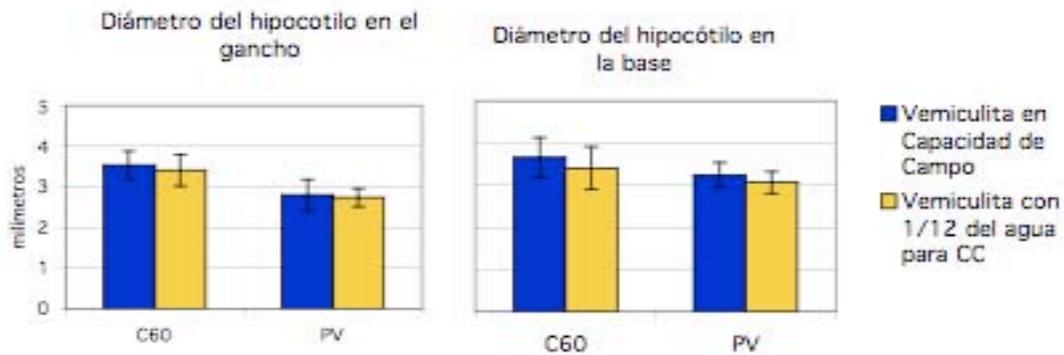
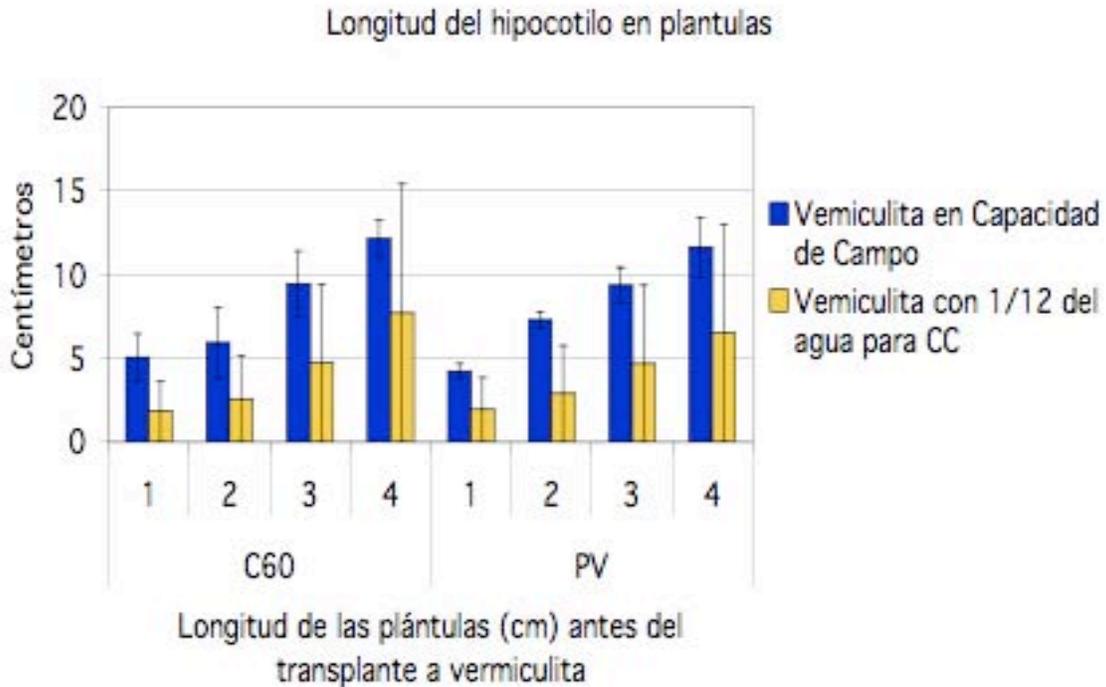
No hay efecto del tratamiento en el contenido de clorofila evaluado en hojas del 5to nudo

Apéndice 5. Resultados de medir el efecto de la sequía sobre la temperatura foliar



Se usaron dos métodos para medir la temperatura foliar: mediciones usando la termocupla de un porómetro marca Licor (Porom) y mediciones usando un termómetro infrarrojo (IR); mostraron que la sequía incrementa la temperatura foliar, sin embargo, el incremento estuvo en torno a 1.1 veces en ambas variedades, lo que indica que este parámetro no nos permite diferenciar el efecto de la sequía sobre las dos variedades

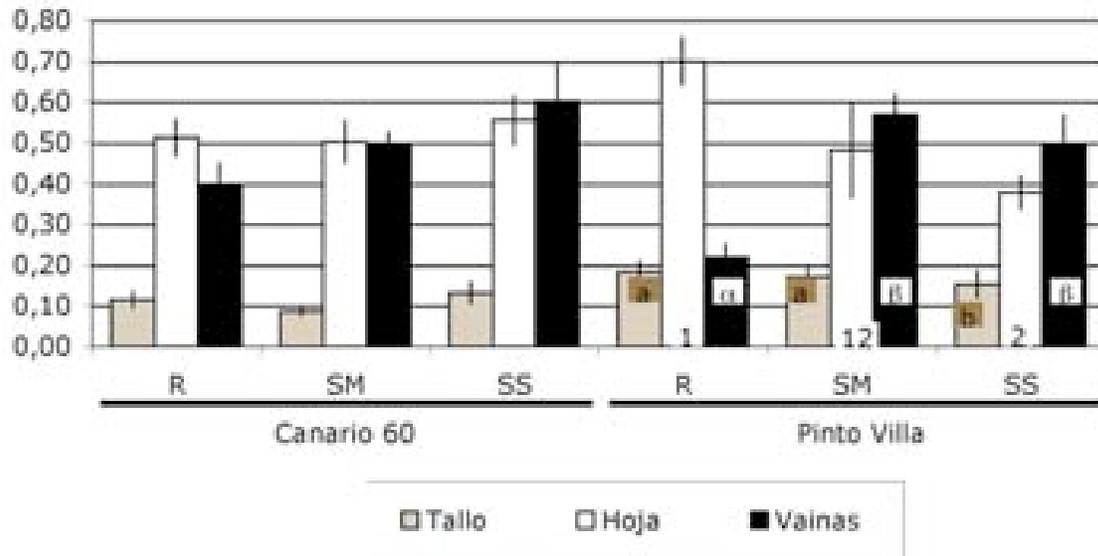
Apéndice 6. Resultados de medir el efecto de la sequía sobre la longitud y el diámetro del hipocótilo en plántulas de cuatro días, sometidas a cuatro días de estrés



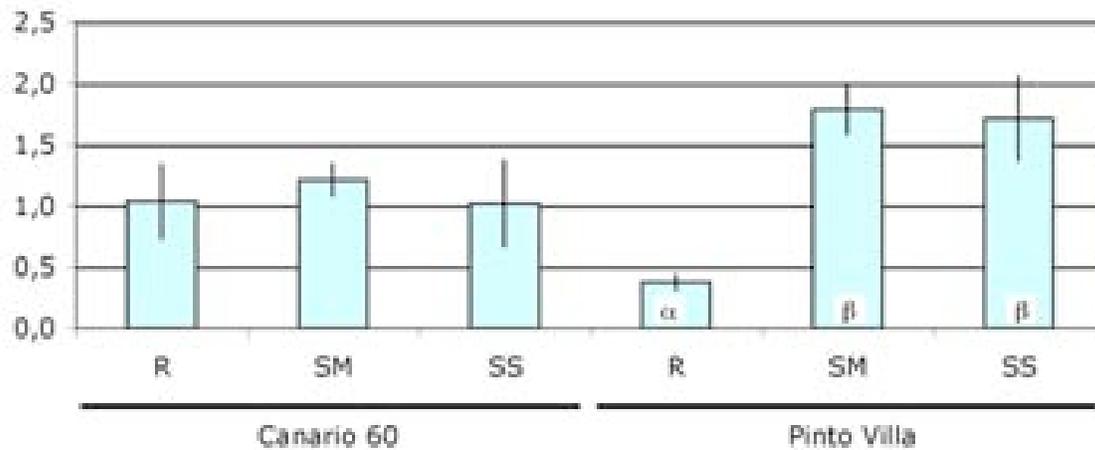
Hay efectos significativos del tratamiento de sequía sobre la longitud de las plántulas cuando estas tienen 1 o 2 cm de largo al momento de imponer la sequía; sin embargo, el incremento que produce la sequía en la longitud de las plántulas está alrededor de 2 veces y no presenta diferencias significativas entre las variedades.

Apéndice 7. Efecto de la sequía sobre la distribución de la marca incorporada en almidón en plantas que se encuentran en etapa de llenado del grano.

Partición de la marca acumulada en almidón



Relación Vertedero/Fuente



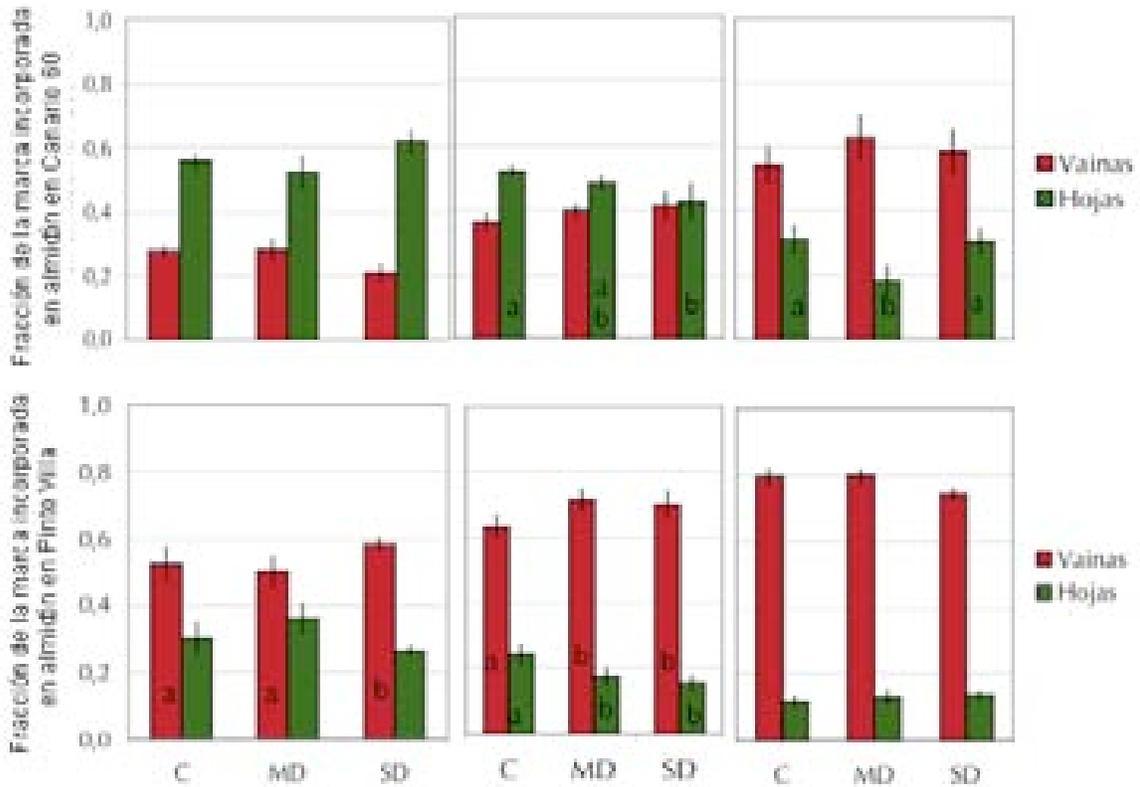
Se muestran los resultados de un experimento preeliminar a los experimentos con ^{14}C que se muestran en la tesis. Al igual que en experimento presentado en las figuras 9 a 13, las plantas se expusieron a $^{14}\text{CO}_2$ después de la floración y

después del inicio de la restricción hídrica; y se cosecharon durante la etapa de llenado del grano.

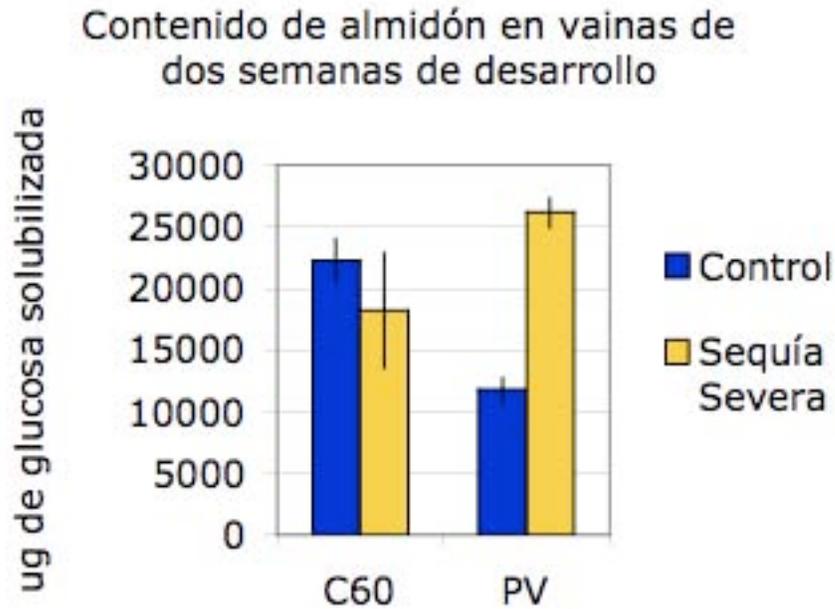
Como se puede ver: tal como se dijo la sequía promueve la acumulación de marca en las vainas y la salida de marca de la hojas sólo en la variedad Pinto Villa.

Apéndice 8. Efecto de la sequía sobre la distribución de la marca incorporada en almidón en plantas que se encuentran en etapa de llenado del grano.

Estos resultados pertenecen a un experimento homólogo al que se muestra en las figuras 10, 11 y 12.



Apéndice 9. Efecto de la sequía sobre el contenido de almidón en vainas que se encuentran en etapa de establecimiento.



Se muestran los resultados de medir el contenido de almidón por vaina en vainitas de dos semanas de desarrollo de Canario 60 y Pinto Villa. Esta medición se hizo en el mismo experimento que se usó para medir los contenidos de azúcares solubles.