UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

BASES BIOQUIMICAS Y ULTRAESTRUCTURALES DE RESPUESTA AL ESTRES NUTRIMENTAL EN FRIJOL *Phaseolus vulgaris L.* A NIVEL DE PLANTULA.

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLOGICAS
CON ESPECIALIDAD EN BOTANICA

PRESENTA:

MARIA ADRIANA NUÑEZ GONZALEZ

CD. UNIVERSITARIA JUNIO 2001

M.A.N.O.

BASES BIOQUIMICAS Y ULTRAESTRUCTURALES DE RESPUES
AL ESTRES NUTRIMENTAL EN FRIJOL *Phaseolus vulgaris L.*
A NIVEL DE PLANTULA.

TD
SB327
.N85
2001
c.1

2001

1080124463

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

BASES BIOQUIMICAS Y ULTRAESTRUCTURALES DE RESPUESTA AL ESTRES NUTRIMENTAL EN FRIJOL *Phaseolus vulgaris L.* A NIVEL DE PLANTULA.

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLOGICAS
CON ESPECIALIDAD EN BOTANICA

PRESENTA:

MARIA ADRIANA NUÑEZ GONZALEZ

CD. UNIVERSITARIA JUNIO 2001

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

BASES BIOQUÍMICAS Y ULTRAESTRUCTURALES DE RESPUESTA AL ESTRÉS NUTRIMENTAL EN FRIJOL *Phaseolus vulgaris* L. A NIVEL DE PLÁNTULA.

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

CON ESPECIALIDAD EN BOTÁNICA

P R E S E N T A

MARIA ADRIANA NÚÑEZ GONZÁLEZ

CD. UNIVERSITARIA N. L. JUNIO 2001.

UANL
FONDO
TESIS DOCTORADO

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

BASES BIOQUÍMICAS Y ULTRAESTRUCTURALES DE RESPUESTA AL ESTRÉS NUTRIMENTAL EN FRIJOL *Phaseolus vulgaris* L. A NIVEL DE PLÁNTULA.

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS CON ESPECIALIDAD EN BOTÁNICA

PRESENTA

MARIA ADRIANA NÚÑEZ GONZÁLEZ

COMISION DE TESIS:

DRA. MARIA JULIA VERDE STAR
PRESIDENTE (DIRECTOR)

DRA. GRACIELA GARCIA DIAZ
ASESOR (SECRETARIO)

DR. RAHIM FOROUGHBAKHCH
ASESOR (PRIMER VOCAL)

DR. SALOMÓN MARTINEZ LOZANO
ASESOR (SEGUNDO VOCAL)

DRA. NORMA LAURA HEREDIA ROJAS
ASESOR (TERCER VOCAL)

CIUDAD UNIVERSITARIA, N. L. JUNIO 2001.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

BASES BIOQUÍMICAS Y ULTRAESTRUCTURALES DE RESPUESTA AL ESTRÉS NUTRIMENTAL EN FRIJOL *Phaseolus vulgaris* L. A NIVEL DE PLÁNTULA.

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS CON ESPECIALIDAD EN BOTÁNICA

PRESENTA

MARIA ADRIANA NÚNEZ GONZÁLEZ

DRA. MARIA JULIA VERDE STAR
DIRECTOR INTERNO

DR. RATIKANTA MAITI
DIRECTOR EXTERNO

CIUDAD UNIVERSITARIA, N. L. JUNIO 2001.

LA PRESENTE INVESTIGACIÓN SE REALIZÓ EN LOS LABORATORIOS DE QUÍMICA ANALÍTICA, CIENCIA DE ALIMENTOS, FISIOLOGÍA VEGETAL, GENÉTICA MICROBIANA Y UNIDAD DE MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN.

BAJO LA DIRECCIÓN INTERNA DE:

Dra. María Julia Verde Star

Y LA DIRECCIÓN EXTERNA DE:

Dr. Ratikanta Maiti

AGRADECIMIENTOS

Dra. Ma. Julia Verde Star, por la acertada asesoría en la dirección de esta tesis y por todo el apoyo, estímulo y confianza recibidos.

Dr. Ratikanta Maiti, por su valiosa asesoría y constancia para la finalización de este trabajo.

Dr. Rahim Foroughbakhch P. por su imprescindible asesoría en la parte estadística y en general de todo el trabajo.

Dra. Norma Laura Heredia Rojas por su invaluable asesoría durante el desarrollo de este trabajo, principalmente en la parte bioquímica.

Dr. Salomón Martínez Lozano porque su asesoría y apoyo fueron vitales para la realización de este trabajo.

Dra. Graciela García Díaz por su experta asesoría durante el desarrollo de esta investigación, sobre todo en la parte analítica.

Dr. Sergio Moreno Limón por su incondicional ayuda en todo momento para la revisión, redacción y desarrollo en general del presente trabajo.

Dra. Ma. Guadalupe Alanis Guzmán responsable del Laboratorio de Ciencia de los alimentos por su colaboración para la cuantificación de proteína total y por su apoyo profesional y personal.

MC María Concepción Valades Cerda, por la oportuna y desinteresada ayuda que recibí durante mi preparación para el examen de admisión y durante todo el trabajo.

MC María Luisa Cárdenas Ávila Y MC Jorge Luis Hernández Piñero, por su asesoría, consejos y ayuda en la realización de esta tesis. Pero sobre todo por su amistad y confianza.

A todos mis compañeros de Bioquímica y Química Analítica, por darme el apoyo en mi trabajo para hacerme posible cumplir con este compromiso.

A CONACYT, por el apoyo recibido para la realización del Doctorado.

A TODOS Y CADA UNO de los que de alguna u otra manera contribuyeron en la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

♥ **A DIOS ...**

♥ **A MIS PADRES**

Sr. Juan Antonio Núñez González

Sra. Martha Celina González de Núñez

Que son los seres mas maravillosos que he conocido, mis mejores amigos, mis mejores maestros, mi mejor ejemplo. ¡Mil Gracias !, por darme tanto a cambio de nada . ¡LOS AMO!

♥ **A MI FAMILIA**

QBP José Rodríguez Rodríguez

José Antonio Rodríguez Núñez

Alejandro Rodríguez Núñez

Por ser el motor de mi existir, mi razón de ser. ¡Gracias! Porque ha sido de ustedes el sacrificio para lograr juntos esta meta. ¡Perdón! Por haberles robado el tiempo que les pertenecía. ¡LOS AMO!

♥ **A MIS HERMANOS, CUÑADOS Y SOBRINOS.**

Maria Isabel	**Raúl**	**Celina, Rulito e Itzel.**
Juan Antonio	**Geno**	**Diana e Itzel.**
Laura Teresa	**Andrés**	
Maria De Lourdes	**Jaime**	**Pamela**
Verónica Selene	**Federico**	**Maryfer**

Por los maravillosos momentos de la infancia y que paso cada vez que estamos juntos, son de las mejores cosas que me han sucedido en la vida, ¡Gracias! Por todo su cariño, confianza, apoyo y porras.

♥ **A MI SUEGRA FAVORITA**

Doña Socorro Rodríguez de Rodríguez

Por ser una de mis mejores amigas, y en general a toda mi familia politica, por ayudarme a sobrevivir lejos de mi origen.

♥ **A TODOS MIS MAESTROS**

Con gratitud y respeto.

♥ **A GLORIA Y CONCHIS**

Por ser las responsables directas de esta realidad.

♥ **A TODOS MIS AMIGOS**

No los menciono por temor de omitir a alguno. ¡Por los buenos momentos!

INDICE GENERAL

TEMA	PÁGINA
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
I. INTRODUCCIÓN	5
II. HIPÓTESIS	8
III. OBJETIVOS	8
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	10
V. MATERIAL Y MÉTODOS	45
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
VII. CONCLUSIONES	91
VIII. LITERATURA CONSULTADA	94

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
Tabla 1.	Análisis de varianza para macroelementos en semilla.	56
Tabla 2.	Prueba de Tukey para macroelementos en semilla.	57
Tabla 3.	Análisis de varianza para microelementos en semilla.	58
Tabla 4.	Prueba de Tukey microelementos en semilla.	59
Tabla 5.	Análisis de varianza para análisis de proteína total.	61
Tabla 6.	Prueba de Tukey para proteina total.	61
Tabla 7.	Análisis de varianza para prolina libre.	65
Tabla 8.	Prueba de Tukey para prolina libre.	65
Tabla 9.	Análisis de varianza para clorofila α.	66
Tabla 10.	Prueba de Tukey para clorofila α.	66
Tabla 11.	Análisis de varianza para clorofila β.	68
Tabla 12.	Prueba de Tukey clorofila β.	68
Tabla 13.	Análisis de varianza para clorofila Total.	69
Tabla 14.	Prueba de Tukey clorofila Total.	69
Tabla 15.	Análisis de varianza para de potasio.	71
Tabla 16.	Prueba de Tukey para potasio.	72
Tabla 17.	Análisis de varianza para sodio.	73
Tabla 18.	Comparación de medias de Tukey para sodio.	74
Tabla 19.	Análisis de varianza para magnesio.	75
Tabla 20.	Comparación de medias de Tukey para magnesio.	76

Tabla 21. Análisis de varianza para calcio. 77

Tabla 22. Comparación de medias de Tukey para calcio. 78

Tabla 23. Análisis de varianza para manganeso. 79

Tabla 24. Prueba de Tukey para manganeso. 80

Tabla 25. Análisis de varianza para molibdeno. 81

Tabla 26. Prueba de Tukey para molibdeno. 82

Tabla 27. Análisis de varianza para fierro. 83

Tabla 28. Prueba de medias de Tukey para fierro. 83

Tabla 29. Análisis de varianza para cobre. 85

Tabla 30. Prueba Tukey para cobre. 85

Tabla 31. Análisis de varianza para zinc. 87

Tabla 32. Prueba Tukey para zinc. 87

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
Figura 1.	Anatomía de testa (a) y endospermo (b) de frijol variedad Laguna mediante Microscopía Electrónica de Barrido.	55
Figura 2.	Anatomía de testa (a) y endospermo (b) de frijol variedad Flor de mayo mediante Microscopía Electrónica de Barrido.	56
Figura 3.	Contenido de Potasio en semilla de cuatro variedades de frijol.	**57**
Figura 4.	Contenido de Sodio en semilla de cuatro variedades de frijol.	57
Figura 5.	Contenido de Magnesio en semilla de cuatro variedades de frijol.	57 57
Figura 6.	Contenido de Calcio en semilla de cuatro variedades de frijol.	57
Figura 7.	Contenido de Manganeso en semilla de cuatro variedades de frijol.	59
Figura 8.	Contenido de Fierro en semilla de cuatro variedades de frijol.	59
Figura 9.	Contenido de Cobre en semilla de cuatro variedades de frijol.	60
Figura 10.	Contenido de Zinc en semilla de cuatro variedades de frijol.	60

Figura 11. Contenido de Proteína total en cultivares de frijol comerciales (Flor de Mayo, Garbancillo) y mejorados (Laguna y Pinamerpa). 62

Figura 12. Plántulas de 20 días de edad crecidas bajo condiciones controladas a diferentes concentraciones de solución nutritiva de Hoagland pH 5.5 usando perlita como soporte. 63

Figura 13. Plántulas de 20 días de variedades de frijol sometidas a Estrés Nutrimental L: Laguna FM: Flor de Mayo G: Garbancillo P: Pinamerpa C: Control E:Estrés. 64

Figura 14a: Contenido de prolina libre en cuatro variedades de frijol bajo condiciones de estrés nutrimental. 65

Figura 14b. Efecto del estrés nutrimental en el contenido de prolina libre en frijol. 65

Figura 14c. Efecto del estrés nutrimental en el contenido de prolina libre en hoja y raíz de frijol. 65

Figura 15a: Contenido de clorofila α en cuatro variedades de frijol bajo condiciones de estrés nutrimental. 67

Figura 15b. Efecto del estrés nutrimental en el contenido de clorofila α en frijol. 67

Figura 16a: Contenido de clorofila β en cuatro variedades de frijol bajo condiciones de estrés nutrimental. 68

Figura 16b: Efecto del estrés nutrimental en el contenido de clorofila β en frijol. 68

Figura 17a. Contenido de Clorofila total en cuatro variedades de frijol bajo condiciones de estrés nutrimental. 70

Figura 17b. Efecto del estrés nutrimental en el contenido de Clorofila total en frijol. 70

Figura 18a. Contenido de potasio en variedades de frijol bajo estrés nutrimental. 72

Figura 18b. Efecto del estrés nutrimental en el contenido de potasio en frijol. 72

Figura 18c. Contenido de potasio en parte aérea y raíz de frijol bajo Estrés nutrimental. 72

Figura 19a. Contenido de sodio en variedades de frijol bajo estrés nutrimental. 74

Figura 19b. Efecto del estrés nutrimental en el contenido de sodio en parte aérea y raíz de frijol. 74

Figura 19c. Efecto del estrés nutrimental en el contenido de sodio en frijol. 74

Figura 20a. Contenido de magnesio en cuatro variedades de frijol bajo condiciones de estrés nutrimental. 76

Figura 20b. Efecto del estrés nutrimental en el contenido de magnesio en frijol. 76

Figura 20c. Efecto del estrés nutrimental en el contenido de magnesio en frijol. 76

Figura 21a. Contenido de calcio en Variedades de frijol bajo estrés 78

nutrimental.

Figura 21b. Efecto del estrés nutrimental en el contenido de calcio en frijol. 78

Figura 21c. Contenido de calcio en parte aérea y raíz de frijol bajo estrés nutrimental. 78

Figura 22a. Contenido de manganeso en cuatro variedades de frijol bajo condiciones de estrés nutrimental. 80

Figura 22b. Efecto del estrés nutrimental en el contenido de manganeso en frijol. 80

Figura 22c. Contenido de manganeso en tallo y raíz de frijol bajo estrés nutrimental. 80

Figura 23a. Contenido de molibdeno en cuatro variedades de frijol bajo condiciones de estrés nutrimental. 82

Figura 23b. Efecto del estrés nutrimental en el contenido de molibdeno en frijol. 82

Figura 23c. Contenido de molibdeno en parte aérea y raíz de frijol bajo estrés Nutrimental. 82

Figura 24 a. Contenido de fierro en cuatro variedades de frijol bajo condiciones de estrés nutrimental. 84

Figura 24b. Efecto del estrés nutrimental en el contenido de fierro en frijol. 84

Figura 24c. Contenido de fierro en parte aérea y raíz de frijol bajo estrés nutrimental. 84

Figura 25a. Contenido de cobre en cuatro Variedades de frijol bajo condiciones de estrés nutrimental. 86

Figura 25b. Efecto del estrés nutrimental en el contenido de cobre en frijol. 86

Figura 25c. Contenido de cobre en parte aérea y raíz de frijol bajo Estrés Nutrimental. 86

Figura 26a. Contenido de zinc en cuatro variedades de frijol bajo condiciones de estrés nutrimental. 87

Figura 26b. Efecto del estrés nutrimental en el contenido de zinc en frijol. 88

Figura 26c. Contenido de zinc en parte aérea y raíz de frijol bajo estrés nutrimental. 88

Figura 27 Perfil de proteínas por Electroforesis en gel de poliacrilamida de hojas de plántula de frijol de 20 días estresada a bajos niveles de nutrimento con su respectivo control. 89

Fig. 28a. Ultraestructura de hoja de frijol variedad Laguna Control. 90

Fig. 28b. Ultraestructura de hoja de frijol variedad Laguna. Estrés. 90

Fig. 29a. Ultraestructura de hoja de frijol variedad Pinamerpa. Control. 90

Fig. 29b. Ultraestructura de hoja de frijol variedad Pinamerpa. Estrés. 90

RESUMEN

A medida que la producción mundial de alimentos se ha expandido para satisfacer la creciente demanda, los suelos se han ido deteriorando, estos efectos que traen consigo problemas de cantidad y calidad de nutrimentos no siempre se pueden compensar ni aún con la aplicación de fertilizantes, por lo que la investigación en temas relacionados con el manejo de cultivos, suelos, agua y nutrimentos se hace necesaria para contribuir a lograr una agricultura sostenible en suelos semiáridos con el fin de aprovechar las grandes extensiones de suelo potencialmente fértil con el uso de tecnologías económicamente viables, socialmente aceptables y ambientalmente sensibles. El frijol común es importante en la dieta de más de 500 millones de personas por su alto valor nutritivo, sin embargo la disponibilidad de nutrimentos juega un papel muy importante en la producción del mismo, por lo que en la presente investigación se estudiaron las bases bioquímicas y ultraestructurales de respuesta de dicho cultivo a bajos niveles de nutrimentos con el propósito de proponer índices de tolerancia para la selección de variedades capaces de adaptarse y producir bajo un ambiente marginal. Para lo cual se realizó un estudio anatómico y contenido de nutrimentos del germoplasma y la caracterización de respuestas bioquímicas y ultraestructurales dicho factor de estrés. Las variedades Flor de mayo y Laguna presentaron mayor porcentaje de proteína total. El perfil de proteínas mostró la presencia de un polipéptido de 38 kDa que se expresa a mayores concentraciones en estos mismos. El estrés nutrimental estimuló significativamente la acumulación de prolina libre en hoja y

raiz. Se presentó amplia variabilidad en la absorción de macro y micronutrimentos y el análisis ultraestructural mostró alteraciones en la variedad Pinamerpa, no así en Laguna. Con base a nuestros resultados se sugiere como tolerantes al estrés nutrimental a las variedades Flor de mayo y Laguna.

ABSTRACT

As the food world production has expanded to satisfy the growing demand soils in turn have been deteriorating in quality. These effects raise problems with the quantity and quality of nutriments which not always may be compensated not even with the application of fertilizers. For this reason, it becomes necessary to develop investigations related to cultivars, soil, water and nutriments management in order to obtain a sustentable agricultural practices in semiarid regions aimed to take advantage of these wide extensions of potentially fertil soils with the use of feasible and economical technologies that are environmentally safe and friendly accepted by communities.

Bean is an important part of the dietary intake for more than 500 million people owed to its high nutritional value. However, the availability of nutriments plays an important role in its production. So in the preent investigation the basis of the biochemical and ultrastructural responses of bean cultivars to low levels of nutriments were studied with the object to propose tolerance indexes for the selection of varieties capable to adapt and get acceptable yields in marginal environments. For this reason, an study on the anatomy and the nutriment contents of the germplasm and the characterization of biochemical and ultrastructural responses to the stress factor was carried out. The varieties Flor de Mayo and Laguna presented the highest percentage of total protein. The protein profile showed the presence of a 38 kDa polipeptide which is expressed at the higher concentration in these varieties. The nutrimental stress significantly stimulated the accumulation of free proline in leaves and roots. A wide variation

in the absorption of macro and micronutriments was observed and although the ultrastructural analysis showed alterations in the variety Pinamerpa those were not present in the Laguna variety. Based in our results it is suggested that the varieties Flor de mayo and Laguna may be considered as tolerant to the nutrimental stress.

I. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia, la producción agraria y sus prácticas han estado muy ligadas al desarrollo de la humanidad sirviendo a una finalidad muy concreta, la de proveer suficiente alimento para mantener el crecimiento de la población mundial que actualmente alcanza los 6 000 millones de personas. Como resultado del incremento de la actividad industrial y humana, la proporción de suelos arables va disminuyendo en un 0.1% anual. Actualmente, existe una demanda de producción agrícola sin precedentes, a medida en que dicha producción mundial de alimentos se ha expandido, los suelos tanto fértiles como marginales se han ido deteriorando; estos efectos, que traen consigo problemas de cantidad y calidad de nutrimentos no siempre se pueden compensar ni aún con la aplicación de fertilizantes. Tomando en cuenta la importancia de mantener y conservar la fertilidad natural del suelo, se hace necesario un mayor énfasis de investigación en temas relacionados con el manejo de cultivos, suelos, agua y nutrimentos para lograr una agricultura sostenible en suelos fértiles y marginales (CIAT, 2001).

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es importante en la dieta de más de 500 millones de personas, para ellas constituye el componente principal del régimen alimenticio diario. Este alimento básico es, sin duda, la leguminosa alimenticia más importante del mundo, mucho más que el garbanzo, el haba y la lenteja pero la disponibilidad de nutrimentos juega un papel muy importante en la producción de este cultivo.

Hoy día, debido principalmente a la pobreza y el desempleo, existen alrededor de 800 millones de personas (18% de la población del mundo en vías de desarrollo) que no tienen acceso a la cantidad de alimentos suficiente para satisfacer sus necesidades (Pinstrup-Anderson y Pandya-Lorch 2000; Pinstrup-Anderson *et al.*,1999). La desnutrición es un factor importante en la mitad de los casi 12 millones de muertes de niños menores de cinco años que se registran anualmente en los países en vías de desarrollo (UNICEF 1998), aparte de la falta de alimento, la deficiencia de micronutrimentos (yodo, hierro y sobre todo de vitamina A) están generalizadas. Por si fuera poco las fluctuaciones de los patrones climáticos mundiales y los cambios de uso de la tierra, irán agudizando los problemas de producción y la demanda regional de alimentos. Para atender esas necesidades, es imprescindible lograr avances muy importantes en cuanto a producción de alimentos. La agricultura moderna lo ha hecho, pero introdujo también el uso intensivo de plaguicidas y fertilizantes que son muy costosos y pueden afectar la salud humana o dañar los ecosistemas. Existe suficiente información sobre la respuesta de este cultivo a diversos factores de estrés, salinidad, sequía, altas temperaturas (Maiti, 1997, Moreno,1988), pero no hay reportes sobre el estudio sistemático del efecto de la deficiencia de nutrimentos, específicamente para *P. vulgaris*.

En base a lo anterior, en la presente investigación se pretende estudiar los índices de tolerancia para la selección de cultivares que se adapten al ambiente marginal de nutrimentos con el fin de colaborar con un equipo multidisciplinario a la selección de líneas tolerantes capaces de producir en ambientes adversos y así aprovechar las grandes extensiones de suelo potencialmente fértiles en la

producción de alimentos con el uso de tecnologías ambientalmente sensibles, económicamente viables y socialmente aceptables, sin agotar aún más los recursos no renovables, ni provocar daños ambientales.

II. HIPÓTESIS

Existe variabilidad en las respuestas bioquímicas y ultraestructurales al estrés nutrimental en cuatro variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y es posible correlacionarla con su adaptación bajo condiciones controladas para la identificación de índices de tolerancia, tomando en cuenta como único factor limitante la insuficiencia de nutrimentos.

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar las bases bioquímicas y ultraestructurales de respuesta al estrés nutrimental en cuatro variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*) a nivel de plántula.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Caracterización del germoplasma:

1. Realizar el estudio anatómico de la semilla por microscopía electrónica de barrido.
2. Analizar el contenido de minerales de las semillas y cuantificar proteína total.
3. Seleccionar la concentración mínima de respuesta para el estrés nutrimental

Estudio del efecto del estrés nutrimental a nivel de plántula.

1. Detectar síntomas de deficiencia en las plántulas de las cuatro variedades sometidas al estrés.

2. Analizar la acumulación de prolina libre.
3. Determinar el contenido de clorofila α, β y total.
4. Cuantificar la absorción de macro y micronutrimentos.
5. Determinar la presencia proteína específica.
6. Estudiar a nivel ultraestructural la respuesta al ambiente marginal de nutrimentos.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

I. GENERALIDADES

Jerarquía botánica

El término leguminosa-grano engloba especies muy diferentes entre si, solo unidas en cuanto a su utilización agrícola. Dentro de la leguminosa-grano distinguimos dos subfamilias, divididas a su vez en tribus y estas en géneros. A la subfamilia *Papilionoideae* pertenecen casi todas las especies de leguminosas de grano. La otra subfamilia, la *Cesalpinoideae* solo es interesante por su tribu Cassicas a la que pertenece el algarrobo. A pesar de que las **Papilonaceas** son una de las familias mas ricas en especies, solo cinco tribus tienen interés como leguminosas-grano, Cuellar *et al.*, (1999):

Tribu Aeschynomeneae.- Género *Arachis* (ej.: cacahuate).

Tribu Cicereae.- Garbanzos.

Tribu Genisteae.- Género *lupinus* (ej.: altramuz).

Tribu Phaseoleae.- Dentro de esta tribu, en el género **Phaseolus** (uno de los diez de esta tribu) se encuentra nuestro frijol común: ***Phaseolus vulgaris***.

Tribu Viciease.- Género Vicia (ej.: habas). Género *Lathyrus* (ej.: almortas). Género *Pisum* (ej.: guisantes). Género *Lens* (ej.: lentejas).

Nombre cientifico de la planta

Phaseolus vulgaris, que le fue asignado por el botánico Carlos Linneo en 1753. El género *Phaseolus* incluye alrededor de 50 especies, de las cuales solamente cuatro son consideradas de importancia por ser cultivadas: Frijol común, (*Phaseolus vulgaris*); Frijol lima, (*Phaseolus lunatus*); Frijol petaco, (*Phaseolus coccineus)* y Frijol tepari,

(*Phaseolus acutifolius*), Delgado Salinas, 1985; Debouck, 1991.

Clasificación taxonómica:

Reino	Vegetal
Subreino	Fanerogamas
División	Angiospermae
Clase	Dicotiledóneas
Orden	Rosales
Familia	Leguminosae
Subfamilia	Papilionoidae
Tribu	*Phaseolae*
Subtribu	Phaseolinae
Género	*Phaseolus*
Especie	*vulgaris*

Paredes, *et al.*, (1989).

También se le conoce con los siguientes nombres: Frijol de campo, frijoles, habichuelas, judías verdes (la etapa inmadura), tapiramo (la etapa inmadura), poroto, frejol, frisol, frixol, vainita, fluña y caraota, entre otros, Van Herpen, (1984) .

Origen y distribución de la planta

El frijol es una de las plantas de más amplia distribución en el mundo. El lugar de origen más probable, de acuerdo con hallazgos arqueológicos, se ubica en Tehuacán (México), aunque hay evidencias de similar antigüedad en Ancash (Perú). Pachico, (1982).

Tipos de frijol

Las variedades de frijol se pueden clasificar según tres características básicas - Color de la semilla, hábito de crecimiento y duración del periodo de crecimiento:

Color de la Semilla: La mayoria son negros o rojos, y casi siempre hay preferencias locales relativo al color.

Hábito de crecimiento. Las variedades pueden ser de arbusto parado, de vid parcial, o de vid completa: el último tiene la capacidad de enredarse y requiere rodrigones o un cultivo compañero de apoyo como el maíz. Las variedades de arbusto florecen en una etapa corta sin continuación de producción de tallo y

hoja; éstos son los de "inflorescencia limitada". Los tipos de vid florecen durante un periodo más largo y continúan la producción de hojas y tallos; éstos se llaman los indeterminados. Las variedades de vid parcial pueden ser de ambos tipos. Dado su periodo más largo de floración, la mayoría de los indeterminados muestran una maduración desigual de las vainas, con la cosecha durando varias semanas.

Periodo de Crecimiento: En temperaturas calientes, las variedades precoces pueden producir vainas maduras dentro de 70 días, después de la emergencia de la planta, mientras las variedades medianas y tardías demoran 90 días, o más. El tiempo para la primera floración dura entre 30 y 55 días, Con algunas excepciones, los tipos parados y prolíficos se maduran antes que los tipos de vid indeterminados. Los criadores de plantas están desarrollando variedades indeterminadas con períodos de crecimiento más cortos y de maduración más consolidada, Pachico, (1982).

Según Acosta *et al.,* (1997) el frijol tiene los siguientes requerimientos climáticos:

Lluvia: Los frijoles comunes no están bien adaptados a las áreas de lluvias copiosas (como las zonas húmedas de la selva pluvial del África tropical) a causa del aumento de problemas de enfermedades e insectos. Idealmente, la

siembra se debe planear para que las últimas etapas de crecimiento y cosecha ocurran durante la época seca.

Temperatura: En comparación con el sorgo y el mijo, el frijol no tiene buena tolerancia al calor extremo o a la escasez de agua. Las temperaturas óptimas para la floración y el desarrollo de la vaina es un alto diurno de 29.5°C y un bajo nocturno de 21°C. La pérdida de flores es un problema serio después de 36°C y también es amplificado por lluvias copiosas.

Suelo: Las plantas son muy susceptibles a las enfermedades fungoides que causan la pudrición de las raíces, y el desagüe bueno es muy importante. Por lo general crecen poco en suelos ácidos (menor de 5.0), puesto que son especialmente sensibles a los niveles altos del manganeso soluble y el aluminio que ocurren con frecuencia a niveles bajos de pH.

Fotoperiodo: En contraste a algunos sorgos y mijos, la mayoría de los frijoles muestran poca reacción a las variaciones en la duración de la luz.

Morfología

La morfología estudia las características visibles de las plantas, de manera que se incluyan aquellas estructuras que son constantes y permanentes en los individuos representativos de la especie, y aquellas que son variables o se

expresan de manera diferente según las condiciones del ambiente donde se encuentre la planta. A continuación se describen brevemente las características morfológicas de la planta de frijol, Acosta, (1997).

Raíz: En general, las plantas de frijol presentan raíces de tipo pivotante, con una raíz principal y un complejo de raíces secundarias que se ubican superficialmente en los primeros 20 cm de profundidad del suelo.

Tallo: El tallo de la planta es herbáceo, y en el mismo se distinguen los nudos, que son los puntos donde se insertan las hojas. El primer nudo corresponde a los cotiledones, y posteriormente se presentan nuevos nudos donde se ubican las hojas compuestas. En los nudos se originan las ramas secundarias y las inflorescencias. Las características de desarrollo del tallo determinan el hábito de crecimiento de la planta de frijol.

Hojas: Las hojas son simples y compuestas y se insertan en los nudos del tallo y de las ramas. Las hojas primarias son simples y se ubican en el segundo nudo del tallo, mientras las demás hojas son trifoliadas. Existe gran variación en cuanto al tamaño, color y presencia de vellosidades en las hojas, relacionada con la variedad.

Inflorescencias: Botánicamente, las inflorescencias del frijol son racimos de racimos, que se pueden formar en la yema terminal del tallo principal y de las

ramas, o en las axilas, en el punto de inserción de las ramas en el tallo. Durante la formación de la flor se distinguen el estado de botón y de flor abierta, con cáliz campanulado y corola de cinco pétalos de simetría bilateral. La disposición de los estambres y el ovario favorecen la autopolinización.

Fruto y Semillas: El fruto es una vaina lisa o con pequeñas vellosidades y epidermis cerosa. Puede ser de diversos colores o con pigmentaciones que varían según el estado de madurez y con la variedad. La vaina contiene las semillas, que pueden ser de distintas formas: esféricas, cilíndricas, arriñonadas, con amplia variación en color, desde blanco hasta negro, pasando por tonos crema, café, rojos o con combinaciones y pigmentaciones

De acuerdo a Kornegay *et al.*, (1993), una de las características más importantes en la planta de frijol, es su hábito de crecimiento, el cual depende del tipo de desarrollo que presenta la parte terminal del tallo, del número y longitud de los entrenudos y de la distribución de las ramificaciones a lo largo del tallo. Los hábitos de crecimiento se agrupan en cuatro tipos principales:

Tipo Determinado Arbustivo: Son plantas de porte bajo, de 25 a 50 cm de altura, con un tallo principal fuerte y de 5 a 10 entrenudos; tanto el tallo principal como las ramificaciones cesan en su crecimiento una vez se han diferenciado y formado las inflorescencias; la floración y el período de llenado de los granos

son de corta duración, mientras, la madurez de las vainas ocurre de manera simultánea.

Tipo Indeterminado Arbustivo: También son plantas de porte bajo, con tallo erecto, pero que termina en una guía corta, aunque las ramas generalmente no producen guías. El tallo presenta un mayor número de nudos, pero tiene menos ramificaciones que el tipo determinado, la floración se presenta en forma de racimos axilares, de tal modo que durante el llenado de las vainas las ramas y la guía terminal continúan creciendo aunque más lentamente. La floración, llenado y madurez de los granos ocurren de manera simultánea.

Tipo Indeterminado postrado: Son plantas de mayor altura, generalmente mas de 80 cm, con ramificaciones bien desarrolladas, que crecen postradas o semipostradas; el número de nudos y la longitud de los entrenudos es mayor que en los tipos arbustivos y se presenta la formación de guías terminales tanto en el tallo principal, como en las ramas. Se presentan algunas variaciones ocasionales a través del desarrollo de la planta, como el crecimiento erecto inicial y luego postrado, o completamente postrado y algunos tipos pueden tener tendencia trepadora. La floración ocurre en racimos axilares y en periodos más largos debido al número de nudos, por lo cual se presentan en un mismo momento flores, vainas en formación, llenado y maduración.

Tipo Indeterminado Trepador: Las plantas de frijol de este tipo pueden tener un tallo de longitud superior a los 2 m con 20 a 30 nudos, el cual termina en una guía dominante. Aunque son plantas ramificadas, el desarrollo de las ramas es menor que en las de tipo postrado. La floración se presenta en racimos axilares que se distribuyen en toda la planta o se concentran hacia la parte terminal. La duración de la floración es más prolongada que en los tipos anteriores y también se presentan a un mismo tiempo, flores, vainas en formación, llenado y madurez del grano.

Valor Nutritivo y Usos

El frijol común contiene en promedio 22 % de proteína en las semillas secas. Provee una calidad y cantidad de proteína adecuada para niños mayores y adultos si se comen en las proporciones apropiadas con cereales (como una tasa de 2:1 grano: leguminosa). En la forma de judía verde, proveen poca proteína, pero son una buena fuente de la vitamina A. Las hojas se pueden comer como la espinaca y también se usan de forraje para el ganado, Cuéllar *et al.*, (1999).

Para más de 300 millones de personas del mundo, un plato de frijoles, que vale poco, constituye el componente principal del régimen alimenticio diario. Este alimento básico es, sin duda, la leguminosa alimenticia más importante

del mundo, mucho más que el garbanzo, el haba, la lenteja y el caupí, Robinson, (1987).

Los nutricionistas consideran el frijol común como un alimento casi perfecto en vista de su alto contenido proteínico, de la gran cantidad de fibra que tiene, de los hidratos de carbono complejos y de otros principios alimenticios que contiene. Una sola ración (1 taza) de frijol proporciona al menos la mitad de la necesidad diaria de ácido fólico –una vitamina del grupo B que es muy importante para las mujeres embarazadas y que fue recomendada por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos-. También suministra de 25 a 30 por ciento del nivel recomendado de hierro y satisface el 25 % del requerimiento diario de magnesio y de cobre, así como el 15 del potasio y zinc necesarios en la dieta humana, Paredes, *et al.*, (1989).

El frijol es la cuarta fuente de proteína más importante en América tropical y sobrepasa a dos cultivos de tuberosas en la región –la papa y la yuca– como fuente de calorías. En toda la región, el frijol común se conoce como "la carne de los pobres". Puesto que no hay ninguna fuente más económica de proteína, el consumo *per cápita* de frijol es alto en los países muy pobres, como Nicaragua (con 22.5 kilogramos por año) y en las regiones más pobres de los países de ingresos más altos, como el nordeste de Brasil (con 18.5 kilogramos por año). El frijol fue introducido en África al Sur del Sahara hace varios siglos

por los comerciantes portugueses. Hoy, el cultivo es un alimento básico importante en ese continente y constituye la principal fuente de proteína alimenticia para más de 70 millones de personas. Este grano es cultivado por mujeres, principalmente, en más de 3.5 millones de hectáreas en ese continente, tanto para subsistencia como para la venta en el mercado. Esta producción representa un cuarto del total mundial, la cual se concentra en África Oriental, una región densamente poblada; en la región de los lagos, y en los altiplanos del sur del continente (Teixeira, 1990).

González de Mejía (1996), menciona que el frijol es un alimento básico en México, América Central y otras regiones del mundo en vías de desarrollo. Provee una gran proporción de los requerimientos proteicos para un alto porcentaje de la población y es un complemento para los cereales.

El siguiente cuadro muestra la contribución del frijol a la nutrición humana calculada en base al promedio de consumo anual *per cápita* .

Cuadro 1.- Contribución del frijol a la nutrición humana asumiendo un consumo anual *per cápita* de 15 kg.

Nutrimento	**Contenido de la ración diaria, en promedio (125 g cocido, ó 15 kg/año de grano)**		**Requerimiento de un hombre adulto (mg)**
Sodio	0	mg	2200
Potasio	475	mg	3900
Calcio	65	mg	800
Fósforo	161	mg	800
Magnesio	56	mg	350
Hierro	2.78	mg	10
Zinc	1.24	mg	15
Cobre	0.307	mg	2.5
Manganeso	0.668	mg	3.75
Selenio	0.002	mg	0.05-0.2
Yodo	0.032	mg	150
Almidón	22.1	g	570 g
Proteína	8.5	g	69 g

Adaptado de Pennington and Young (1990 a,b) y Robinson, (1987).

II. FACTORES DE ESTRES

Más del 30% del globo está ocupado por desiertos. En México el 45% de su territorio es árido o semiárido con una precipitación pluvial de menos de 750 milímetros anuales. La deforestación, el sobrepastoreo, la agricultura extensiva y la erosión en general, provoca que los desiertos estén creciendo en todos los continentes. Por otro lado, se pronostica que los períodos de sequía serán más frecuentes y de mayor duración a causa del calentamiento progresivo que está sufriendo la Tierra por el efecto invernadero debido a la contaminación atmosférica Cook, (2000).

La disponibilidad de agua y nutrimentos son de los factores más limitantes en la producción agrícola, especialmente en los países subdesarrollados. Durante varias décadas se han hecho considerables esfuerzos en la obtención de nuevas variedades de plantas tolerantes a la sequía sin haberse logrado resultados sustanciales. La biología molecular permite la posibilidad de analizar la respuesta al estrés ambiental a nivel de la expresión genética, así como el aislamiento de genes relacionados con la tolerancia a la falta de agua y su trasplante a especies de importancia económica. La ingeniería genética en combinación con estrategias clásicas de mejoramiento genético, constituyen una herramienta con gran potencial para la obtención de plantas tolerantes a la

sequía y a otros factores ambientales, White-Izquierdo, (1991) y White –Shing, (1991).

Al describir el grado de tolerancia al estrés salino de numerosos cultivos, las leguminosas se encuentran entre las más sensibles, pudiendo establecerse, según su resistencia o tolerancia, distintos grupos de respuestas. Las leguminosas son consideradas actualmente cultivos de gran importancia para la "agricultura sostenible", tanto en el sistema de rotación como su menor dependencia de la fertilización nitrogenada, dada su capacidad de formar simbiosis fijadoras de nitrógeno con bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. Por todo ello, es necesaria la identificación de combinaciones de estrés salino González, (1996).

III. CARACTERISTICAS MORFOFISIOLOGICAS Y BIOQUIMICAS RELACIONADAS CON LA RESISTENCIA A ESTRÉS BIÓTICO Y ABIÓTICO.

La variabilidad en las condiciones bióticas y abióticas afectan considerablemente la producción y el rendimiento de las especies cultivadas, razón por la cual un gran numero de investigadores trabajan conjuntamente para el conocimiento de los mecanismos de tolerancia a dichos factores de estrés. Las investigaciones incluyen el estudio del efecto de la sequía y otros factores abióticos que merman la productividad del frijol, evaluación y selección de especies silvestres para su

resistencia a diferentes factores de estrés y la incorporación de resistencia a los cultivos (Popa y Dinca, 1985; Yonts *et al.*, 1985; Vlad y Pretorian, 1986).

Existen dos etapas en las que se puede dividir el establecimiento del cultivo:

a) Eventos y condiciones que existan en la zona de la semilla desde la siembra hasta la emergencia entre estos el contenido de nutrimentos (minerales y proteínas) de la semilla y la distribución de macro y microesclereidas en la testa.

b) Problemas y factores que afectan a las plántulas desde la emergencia hasta su establecimiento final. Observaciones en campo en el noreste de México mostraron que existen diversos factores bióticos y abióticos que afectan el establecimiento inicial de maíz, frijol y otros cultivos (Maiti, 1997).

Terán *et al.*, (1994), estudiaron la relación que existe entre la ultraestructura de la semilla y el potencial de germinación reportando que el acomodo en las macro y microesclereidas tiene relación directa con dicho proceso, las especies con un acomodo más laxo fueron la que presentaron mayor porcentaje de germinación.

La adaptación de las plantas a los cambios ambientales depende de una serie de ajustes moleculares, fisiológicos y morfológicos que se presentan como respuesta a las modificaciones de la irradiación, la calidad espectral, el fotoperíodo y la temperatura, entre otras. Los ajustes mencionados se integran, a través de mecanismos aún no bien comprendidos, con los patrones globales

de desarrollo genéticamente programados (Smith, 1982; Kuhlemeir *et al.*, 1987; Quail, 1991; Thompson y White, 1991).

Características morfofisiológicas.

Las características relacionadas con las adaptaciones de frijol en condiciones de semiaridéz en Kenya fueron estudiados por Itulya, *et al.*, (1986), quienes seleccionaron varios cultivares adaptados a tales condiciones, se ha encontrado que el color de la semilla, su tamaño, brillantez, hábito de crecimiento, días a floración, madurez, adaptación vegetativa y reproductiva, nodulación, daño por factores bióticos, resistencia a la sequía y tolerancia a los factores de suelo son considerados para la evaluación de los cultivares de frijol para su adaptación a tales condiciones . Los investigadores de CIAT, (1988) continuando con el estudio de los mecanismos de adaptación a las sequía de *Phaseolus vulgaris* evaluaron, longitud de hipocotilo, persistencia de raíz principal, fibrosis general y abundancia de raíz secundaria en 100 cultivares; el crecimiento de la raíz fué mayor en todas las etapas en las líneas resistentes a la sequía comparado con las líneas susceptibles, observando que el cruzamiento entre especies mexicanas y colombianas produce poblaciones con mejores característica para su adaptación a condiciones de estrés comparados con los progenitores de la misma región.

El estrés de humedad reduce severamente el índice del área foliar, peso seco, número de granos y rendimiento de frijol, pero las especies muestran alta recuperación en crecimiento y producción de vaina cuando se riegan después del tratamiento de sequía. (Peña-Ramos y Muñoz-Orozco, 1988).

Características Bioquímicas

La percepción de un estímulo, por medio de un receptor adecuado, desencadena una cascada de señales que originan la síntesis de ciertos compuestos, la modificación en la concentración de otros y cambios en las propiedades de las membranas, entre otros procesos. Es decir, la señal ambiental es traducida a una señal bioquímica o fisicoquímica por la acción de diferentes transductores, Serger, (1986).

Vasquez-Tello *et al* , (1990) demostraron que la salida de electrolitos, fosfatos y azúcares solubles son pruebas fisiológicas para evaluar la resistencia a factores abióticos en especies como *Phaseolus* y *Vignia*; las variedades "Fundulea 332" se reportaron en Rumania como un cultivo promotedor para su adaptación a las condiciones de sequía, dadas sus características de etapa vegetativa corta, el crecimiento limitado y el alto contenido de proteína (Vlad y Pretorian, 1986). Esta última está relacionada con la resistencia a la sequía, *P. acutifolius* se ha reportado como una especie resistente a la alta temperatura

y sequía debido a que contiene un alto porcentaje de la misma (Frederici *et al.*, 1990).

Proteína Específica

Los organismos vivos responden a las diferentes condiciones ambientales como la temperatura, la luz o el agua alterando el patrón de expresión génica y como resultado, la síntesis de proteínas. A nivel molecular una de las respuestas mejor caracterizadas es la producción de proteínas que se inducen por choque de calor (HSPs). En las plantas superiores las proteínas de choque de calor de bajo peso molecular (smHSPs) (15-30 kDa) son las mayoritariamente sintetizadas durante el estrés por calor. Si bien, la función de las smHSPs es aún desconocida se ha sugerido que in vivo actúan como "chaperonas" y que su expresión puede ser crítica para la supervivencia de la planta. Un mayor conocimiento del patrón de expresión de las smHSPs permitirá avanzar en el estudio de su función. (Verdaguer *et al*, 1999).

Existen diversas investigaciones acerca de la presencia de proteínas que intervienen en la tolerancia a factores de estrés en diferentes cultivos (Hurkman y Tanaka, 1987; Singh *et al.*, 1985, Ramagopal, 1986; Ben-Hayyim *et al.*, 1989, Pei-Ying Zhong, 1997).

Las líneas tolerantes poseían una proteína de 28 kDa en el vástago y ausente en las líneas susceptibles, la presencia de esta proteína se relacionó con la tolerancia del arroz a la salinidad (Rani, 1988).

En tomate y en *Citrus sinensis* L. se demuestra la variabilidad que puede existir en la síntesis de las proteínas al ser reportada una disminución de la síntesis en *C. sinensis* y por el contrario en el tomate un aumento de ésta, el factor importante a mencionar es que en él se sintetiza una proteína de 25 kDa relacionada con líneas resistentes a la salinidad (Ben-Hayyim *et al* , 1989).

Prolina libre

Se ha visto en muchas investigaciones que las plantas sujetas al estrés por agua o salino acumulan prolina y se piensa que la enzima prolina oxidasa es un punto importante para dilucidar el mecanismo de la acumulación de este aminoácido (Hanson *et al*., 1979. Hanson y Hitz, 1982).

La prolina es uno de los aminoácidos contenidos en las proteínas de todos los organismos y de los tejidos de las plantas, es con frecuencia acumulada en respuesta a varios tipos de estrés ambiental, como sequía (Naidu *et al*., 1992; Stewart y Lee., 1974, Shing *et al*., 1985.), salinidad (Treichel, 1975), bajas temperaturas (Benko, 1986, Chu et al., 1974, Gates *et al* , 1987) y altas temperaturas (Oshanina 1972).

El incremento en niveles de prolina durante estrés de sequia es único comparado con otros aminoácidos libres en el mismo tejido, pero similar a otros solutos de bajo peso molecular, como azúcares y ácidos orgánicos. El incremento en prolina libre está relacionado con un decremento en el potencial hídrico de la hoja y con otras medidas hídricas, como el contenido relativo de agua. (Sivaramakrishnan, *et al.*, 1988 citado por Maiti *et al*, 2000).

El frijol tépari utiliza mecanismos bioquímicos alternos para poder desarrollarse satisfactoriamente con niveles de agua muy bajos, entre ellos el acúmulo de prolina, lo que lo hace sumamente atractivo, al constituir un material genético muy valioso para ser transferido por técnicas de ingeniería genética, al frijol común (González, 1996).

Clorofila

El contenido en clorofila juega un papel importante en las plantas cultivadas ya que está positivamente correlacionado con la fotosíntesis. La reducción en el contenido en clorofilas puede ser una respuesta de las plantas al estrés. Esta reducción de la clorofila puede perjudicar el proceso fotosintético conduciendo a una reducción en la fijación del carbono. de ahí la importancia de conocer el contenido en clorofilas de las plantas cuando las condiciones medioambientales no son óptimas (Valencia *et al.*, 1997).

González y Ayerbe (2000), estudiando la relación entre fotosíntesis y contenido en clorofilas con el rendimiento en distintos genotipos de cebada sometidos a estrés hídrico terminal encontraron que el contenido de clorofila total (α+β) es muy similar para todos los genotipos evaluados, similar a lo reportado por Kanechi *et al.*, (1991) quienes no encontraron diferencias significativas en su contenido incluso en plantas de *C. arabica* cv. típica sometidas a estrés hídrico. La disminución en el valor total ha sido considerado como un buen indicador del grado de estrés hídrico en plantas de maíz Castrillo y Fernández, (1990).

Ultraestructura Del Cloroplasto

El déficit de humedad es un factor que en plantas de maíz afecta el grosor de la lámina media, tamaño, número de células y cloroplastos (Tretyakov *et al.*, 1985).

El estrés salino ocasiona que la membrana que envuelve al cloroplasto se rompa, los tilacoides se dilatan y el cloroplasto se distorsione (Roth *et al.*, 1996).

Pastenes y Horton (1996), concluyeron que la desorganización de los tilacoides en frijol, observada a 30-35 °C es debida al incremento en la excitación de electrones, induciendo a la vez un aumento en el transporte cíclico de

electrones y una disminución en el suministro de la NADPH, limitando la asimilación de carbón.

Las altas temperaturas alteran entre otros procesos y componentes, la *organización estructural del cloroplasto. Previamente se ha reportado que las* altas temperaturas son responsables de cambios en la membrana tilacoidal, alterando no solo las propiedades fisicoquímicas, sino también su organización funcional (Berry y Bjorkman, 1980).

El PSII responde a un rango de bajas temperaturas causando inhibición o destrucción del complejo con consecuencias en el funcionamiento y organización tilacoidal, así como un desordenamiento de la grana (Gounaris *et al.*, 1984). En general el calor afecta la estructura del cloroplasto, rompiendo la membrana del mismo y dilatando a muchos de los tilacoides (Ristic *et al.*, 1992). Moreno Limón, (1998) evaluando las respuestas ultraestructurales al estrès de salinidad, reportó una pérdida en la organización de los tilacoides en los cloroplastos, que involucró un hinchamiento de los organelos, y acúmulo de gránulos de almidón en los cultivares susceptibles, mientras que en las tolerantes *no se presentaron estos cambios.*

La microscopía electrónica de cloroplastos obtenidos de hojas de espinacas demuestran que la ausencia de manganeso provoca una desorganización de

las membranas tilacoidales pero tiene escaso efecto sobre la estructura de núcleos y mitocondrias (Uren, 1981) .

Nutrimentos

Las plantas superiores necesitan elementos para vivir y mantener su crecimiento, desarrollo y productividad, estos elementos son requeridos para sintetizar todas las sustancias que le son necesarias. Los requerimientos minerales de las leguminosas no son los mismos que para otros cultivos, como los cereales; éstas tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico: pero, aún así, el frijol no puede crecer bien y tener altos rendimientos sin un balance y una fuente adecuada de minerales Maiti, (1997).

Moreno Limón *et al.*, (1996) estudiando la relación entre el contenido de minerales en semilla y desarrollo de plántula de 5 especies silvestres una semicultivada y una cultivada de frijol (*Phaseolus* spp.) reportó que aquellos cultivares con mayor contenido de nutrimentos presentaron mayor porcentaje de germinación y mejor desarrollo de la plántula.

Los problemas del suelo debidos a la toxicidad o a la carencia de nutrimentos limitan frecuentemente la productividad del frijol en América Latina. Este cultivo se produce generalmente en suelos ácidos caracterizados por su baja disponibilidad de P. Los cálculos de la base de datos del CIAT, (2001) indican

que más del 50% del área productora de frijol de América Latina presenta suelos sumamente deficientes en P. Estos tienen muchas veces un alto contenido de Al, y los cálculos indican que alrededor del 40% del área total sembrada con frijol en América Latina está afectada por la toxicidad del Al. Un 12% de la zona frijolera es afectada por la toxicidad del Mn (Brasil central, América Central, zonas volcánicas en México y el sur de Chile). Además, cerca del 40% de la zona frijolera sufre el efecto de la baja disponibilidad de N en el suelo. Aunque muy poco se sabe acerca de la importancia del equilibrio de micronutrientes y de su extensión en los sistemas de producción de frijol, las observaciones preliminares tienden a apoyar estos criterios; lo mismo puede decirse del K (en 15% del área total) en el caso de algunas asociaciones de cultivos en que se halla el frijol. El siguiente cuadro presenta los detalles de las zonas productoras de frijol de América Latina que son afectadas por la deficiencia de P y la toxicidad del Al.

Cuadro 2. Porcentaje del área total de producción de frijol en América Latina, potencialmente afectada por deficiencia de P y toxicidad del Al, en algunos países y regiones de América Latina. (CIAT 2001).

	Porcentaje del área total de frijol afectada	
Región o país	**Deficiencia de P**	**Toxicidad de Al**
Brasil	51	61
México	55	2
América Central	62	19
Cono Sur	22	13
Zona Andina	66	28

Los requerimientos minerales de las leguminosas no son los mismos que para otros cultivos, como los cereales; éstas tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, pero, aún así, el frijol no puede crecer bien y tener altos rendimientos sin un balance y una fuente adecuada de minerales, Maiti. (1997).

De los noventa y dos elementos químicos naturales existentes en la tierra, dieciséis de ellos se consideran esenciales para el crecimiento y la productividad de los cultivos, Clark *et al.*, (1990).

El potasio es activador de muchas enzimas que son esenciales en la fotosíntesis y la respiración, además de que activa enzimas necesarias para formar almidón y proteínas, Bhandal y Malik, (1988).

El magnesio casi nunca es un factor limitante del suelo para el crecimiento vegetal. Además de su presencia en la clorofila este elemento es esencial porque se combina con el ATP (permitiendo así que participe en muchas reacciones) y porque activa muchas enzimas necesarias es fotosintesis respiración y formación de DNA y RNA, (Clarkson y Hanson, 1980).

El calcio es esencial para las funciones normales de la membrana en todas las células, probablemente como un enlazador de fosfolipidos entre si o a proteinas de membrana (Allan *et al.*, 1987).

El hierro es esencial debido a que forma parte de ciertas enzimas y numerosas proteina que acarrean electrones durante la fotosintesis y la respiración experimentando oxidac ones y reducciones alternas cuando actúa como portador de electrones, (Sandman y Borguer 1983).

El manganeso tiene una función estructural en el sistema de membranas del cloroplasto y también activa numerosas enzimas, Uren, (1991). El papel del manganeso en el metabolismo de las plantas fue revisado por Mukhopadhyay y Sharma en 1991, ellos discuberon la ocurrencia y naturaleza quimica del manganeso, se estudió la relevancia dc este elemento en el metabolismo celular incluyendo su asimilación, el transporte a través de la planta, acumulación y la actividad en los cloroplastos. enzimas, sintesis de proteinas, carbohidratos y lipidos la división celular y crecimiento. También se discutió la relación entre

manganeso con el rendimiento y las enfermedades por hongos en suelo, enfermedades bacterianas, etc.

Muchas enzimas contienen zinc fuertemente unido, esencial para su adecuado funcionamiento. (Vallee,1976).

El cobre está presente en diversas enzimas implicadas en los procesos redox como la citocromo oxidasa (mitocondrias) y la plastocianina (cloroplastos). (Arnon citado por Salibury, 1994).

El molibdeno forma parte de la nitrato reductasa, pero también puede participar en la degradación de purinas (adenina y guanina) debido a su esencialidad como parte de la enzima xantina deshidrogenasa, (Pérez *et al.*, 1988), una tercera función es como parte estructural de una oxidasa que convierte el aldehído del ácido abcísico en la hormona ABA , (Walker, *et al.*, 1989).

Para el estudio de la asimilación de elementos minerales, Lynch *et al.* (1990) utilizaron el cultivo en arena que es el mas económico y sencillo a regímenes controlados de nutrimentos, de esta manera se ha encontrado que las sales minerales en frijol se encuentran en el orden del 2 al 5 %.

Coughlan y Winjones, (1980) observaron que al someter a la espinaca (*Spinacea oleracea*) a la salinidad se incrementaba el contenido de sodio y cloro, pero el potasio se mantuvo estable en todas las concentraciones salinas estudiadas. Sin

embargo He *et al.*, (1993), reportaron un incremento en la acumulación de potasio (K^+) en la raíz de sorgo al estudiar el efecto de estrés osmótico.

De la Rosa (1993), después de haber evaluado 17 líneas de sorgo "glossy" sometidas a diferentes niveles salinos (0.05, 0.10, 0.15, 0.20 y 0.25 M) reportó que cuatro de ellas acumularon más sodio principalmente en la vaina y menos cantidad en la lámina foliar.

Khair, (1986) trabajando con variedades de sorgo reporta una relación directa entre la acumulación de calcio (Ca^{++}) en la hoja y la tolerancia a la salinidad.

En estudios de *Phaseolus vulgaris* cultivar Sato Processor con solución nutritiva Hoagland, el suministro de potasio y nitrógeno afectó la apertura de los estomas con 8 y 16 horas fotoperiodo. La correlación entre el suministro de potasio y el área del poro estomático fue negativa: los poros estomáticos fueron cerrados en las plantas con mayor contenido de potasio, mientras que en las plantas con bajo contenido de potasio los poros estomáticos fueron más grandes. Esto se interpretó como una reacción de la planta para obtener mas iones por un incremento de la transpiración. Al probar diferentes concentraciones de nitrógeno en la solución nutritiva se encontraron efectos similares Hudler y Burian, (1991).

Guiller *et al.*, (1992) encontraron que los excesos de hierro y manganeso provocan toxicidad en plantas de frijol. Una muestra colectada de las hojas de

frijol mostraron bronceado severo cuando contiene niveles de Fe mayores de 3,080 mg/kg y Mn mayores de 760 mg/kg los cuales son muy tóxicos para el frijol. El calcio juega un papel muy importante en el crecimiento de la planta y en la resistencia al estrés de salinidad, en un experimento en invernadero, Akhavan-Kharazian *et al.*, (1991) sometieron plantas de frijol a estrés de salinidad (NaCl 0 - 132mM) combinado con soluciones de sulfato de calcio o cloruro de calcio (0, 5 y 8 mM). En ausencia de calcio, el incremento en la concentración de NaCl desde 0 a 4 mM provocó una disminución más drástica en el peso seco de tallo y de raíz, contenido de clorofila, la proporción de potasio:nitrógeno que cuando aumentó la concentración aumenta de 44 a 88 mM. Contrariamente, la adición de calcio incrementó el peso seco de tallo y raíz y la concentración de clorofila en todos los niveles de NaCl. El contenido de potasio, sodio, calcio y magnesio foliar se incrementaron y la proporción de K:N disminuyó con el aumento en la salinidad, sin embargo, la adición de calcio no modificó el contenido de estos nutrimentos en la hoja. El contenido de calcio foliar se incrementó significativamente con el aumento de la concentración de sulfato de calcio o cloruro de calcio.

En otro experimento Nuwamanya, (1984) evaluó el efecto del pH sobre la producción de materia seca de los nódulos en plantas de *Phaseolus vulgaris* y concluyó que la producción de materia seca incrementa significativamente

cuando el pH del limo ($CaCO_3$) es inferior a 6.0, pero se presenta una disminución progresiva al incrementarse sobre este valor. El pH óptimo para el crecimiento y nodulación en frijol se estimó entre 5.5 y 6.0.

El siguiente cuadro muestra los síntomas de deficiencia en nutrición vegetal.

CUADRO 3. SÍNTOMAS DE DEFICIENCIA EN NUTRICIÓN VEGETAL (Clark, 1990).

SINTOMAS	Las hojas más viejas o más bajas son las más afectadas.	Los efectos casi cubren totalmente a la planta; marchitamiento de las hojas bajas más o menos marcado.	Planta de color verde claro; las hojas amarillas más bajas toman un color castaño claro cuando se marchitan			**Nitrógeno**
			Planta de color verde oscuro; frecuentemente se presenta una coloración verde o purpúrea; las hojas amarillas más bajas toman un color verde oscuro o negro cuando se marchitan.			**Fósforo**
		Efectos usualmente localizados; moteado o clorosis; pobre o ningún brote de las hojas bajas.	Las hojas manchadas o cloróticas pueden enrojecer típicamente; en ocasiones, con áreas muertas; el ápice torcido y los márgenes foliares con concavidad hacia arriba; tallos delgados.			**Magnesio**
			Clorosis marginal, con áreas grandes o pequeñas de tejido muerto.	Áreas pequeñas de tejido muerto, normalmente en el ápice y entre las nervaduras, mucho más marcado en el margen de la hoja; tallos delgados.		**Potasio**
				Manchas extendidas que se propagan rápido, normalmente ocupando el espacio entre las nervaduras; hojas gruesas, tallos con entrenudos acortados.		**Zinc**
TOMAS	Las más afectadas son las hojas jóvenes o las del brote; síntomas localizados.	El meristemo terminal muere y aparecen deformaciones en el ápice o en la base de las hojas jóvenes.	Hojas jóvenes del brote terminal, típicamente curvadas desde el nacimiento, finalmente muertas por el ápice y los márgenes; el crecimiento subsecuente se caracteriza por discontinuidad en estos puntos. Finalmente, el tallo muere por el brote terminal.			**Calcio**
			Las hojas verdes del brote terminal se vuelven de color verde claro en la base, finalmente se libran de esta parte; en el crecimiento subsecuente, las hojas se tuercen; finalmente el tallo muere junto con el brote terminal.			**Boro**
		El meristemo terminal permanece vivo; clorosis o marchitamiento de las hojas jóvenes.	Hojas jóvenes permanentemente marchitas sin manchas o clorosis marcada; el brote terminal así como las ramas y el tallo son usualmente incapaces de permanecer enraizadas en las fases avanzadas en las que la deficiencia del elemento empeora.			**Cobre**
			Las hojas jóvenes no se marchitan; clorosis presente.	Las áreas de tejido muerto se extienden sobre la hoja; las nervaduras más finas tienden a mantener un color verde, ofreciendo un aspecto enrejado o reticulado.		**Manganeso**
				En general, ninguna hoja muerta.	Hojas jóvenes con las nervaduras y tejido intervenoso de color verde claro.	**Azufre**
					Hojas jóvenes cloróticas; nervios principales de color verde oscuro; tallos cortos y delgados.	**Hierro**

IV. PROBLEMÁTICA MUNDIAL DE ALIMENTACIÓN

Hoy día, debido principalmente a la pobreza y el desempleo, existen alrededor de 800 millones de personas (18% de la población del mundo en vías de desarrollo) que no tienen acceso a la cantidad de alimentos suficiente para satisfacer sus necesidades (Pinstrup-Anderson y Pandya-Lorch, 2000; Pinstrup-Anderson *et al.*, 1999). La desnutrición es un factor importante en la mitad de los casi 12 millones de muertes de niños menores de cinco años que se registran anualmente en los países en vías de desarrollo (UNICEF 1998). Aparte de la falta de alimento, las deficiencias de micronutrientes (sobre todo de vitamina A, yodo y hierro) están generalizadas. Por si fuera poco, las fluctuaciones de los patrones climáticos mundiales y los cambios de uso de la tierra, irán agudizando los problemas de producción y la demanda regional de alimentos.

En la actualidad México y otros países de la región, no son autosuficientes en la producción de frijol, esto se debe, en parte, al aumento de zonas áridas y semi-áridas (cerca del 63% de la superficie territorial), donde no existen sistemas de irrigación. Una alternativa a este problema podría ser la introducción de variedades de frijol que pudieran cultivarse bajo este tipo de condiciones ambientales tales como suelos pobres, baja disponibilidad de agua, González de Mejía, (1996).

V. ¿POR QUÉ MANEJO DE RECURSOS NATURALES?

En el marco estratégico global de la FAO hacia 2015 una de sus metas es la conservación, el mejoramiento y la utilización sostenible de los recursos naturales, con inclusión de los suelos, el agua, los bosques, las pesquerías y los recursos genéticos para la alimentación y la agricultura. La finalidad principal es alcanzar objetivos tanto de conservación como de desarrollo. En una región como América Latina y el Caribe que posee una gran dotación de recursos naturales y una población originaria que vive la estrecha relación con su ambiente natural, el desafío consiste en determinar y promover sistemas integrados de gestión de los recursos que sean a la vez económicamente viables, ecológicamente sostenibles y social y culturalmente apropiados, para así satisfacer las necesidades de una población en aumento y cada vez más urbanizada (http://www.rlc.fao.org/prior/recnat/default.htm).

La agricultura moderna es intrínsecamente destructora del ambiente. En particular, devasta la diversidad biológica sobre todo cuando se practica de manera ineficiente en cuanto al uso de los recursos o cuando significa la aplicación de tecnologías que no están adaptadas a las características ambientales (suelos, laderas o zonas climáticas) de cierta región, y esto ocurre por igual en la agricultura pequeña y de gran escala. La aplicación generalizada de tecnologías agrícolas ordinarias como herbicidas, plaguicidas,

fertilizantes y labores de labranza inadecuadas ha dado como resultado graves daños ambientales en muchas partes del mundo. Sin embargo, ciertas prácticas agrícolas que se utilizan en algunas partes del mundo en vías de desarrollo tienden a conservar la diversidad biológica. Esto se logra sembrando simultáneamente un conjunto de variedades del mismo cultivo y mezclándolas con cultivos secundarios, de modo que se mantenga una comunidad vegetal muy diversa (Pinstrup *et al.*, 2000).

La agricultura moderna ha incrementado la producción de alimentos, pero introdujo también el uso intensivo de plaguicidas y fertilizantes que son muy costosos y pueden afectar la salud humana o dañar los ecosistemas Cook, (2000).

V. MATERIAL Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en los Laboratorios de Química Analítica, Ciencia de alimentos, Fisiología Vegetal, Genética Microbiana y Unidad de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

El material biológico se obtuvo de dos fuentes:

1. Variedades comerciales Garbancillo (G) y *Flor de Mayo* (FM).

2. Variedades mejoradas Laguna (L) y Pinamenpa (P) proporcionados por el Banco de Germoplasma de la Facultad de Agronomía U.A.N.L.

CARACTERIZACION DEL GERMOPLASMA

ANATOMIA DE SEMILLA POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (Terán, 1994).

Las semillas de frijol de las variedades a estudiar, fueron fracturadas con la ayuda de una navaja para exponer las partes internas de la testa y el endospermo. El material fue entonces desecado al aire, colocado en bases de aluminio para su observación y recubiertas con una fina capa de oro en un recubridor iónico Balzers. La observación se realizó en un microscopio electrónico de barrido Mini-SEM ISI-5 a 15 KV de energía de aceleración. Se fotografiaron diversas áreas de los cotiledones, testa y de las capas de esclereidas, generalmente a aumentos de 400 y 1000X.

CONTENIDO DE MINERALES DE LAS SEMILLAS POR ESPECTROSCOPIA DE EMISION POR PLASMA (AOAC,1991).

Las semillas fueron secadas en una estufa HS-33 RIOS ROCHA a una temperatura de 60 °C hasta peso constante, muestras trituradas de aproximadamente 1 g se carbonizaron completamente en crisoles sobre un tripié con triángulo de porcelana a fuego lento con la llama azul hasta ausencia total de humo y se calcinaron en una mufla THERMOLYNE 1500 a 500 °C durante 3 h. Las cenizas se disolvieron con 5 mL de HCl 20% pasando la solución a través de un embudo de filtración rápida provisto de un papel filtro Whatman # 41. El filtrado se colectó en matraces de aforación de 25 mL Se preparó un blanco reactivo consistente en 5 mL de HCl 20% aforado a 25 mL con agua bidestilada. Las muestras tratadas se analizaron en un espectrofotómetro de emisión por plasma ICAP 61E TRACE ANALYZER THERMO JARRELL ASH bajo condiciones ya optimizadas.

DETERMINACION CONTENIDO DE PROTEINA TOTAL POR EL MÉTODO KJELDAHL (AOAC, 1991).

Se trituró la muestra en un molino y se secó la harina obtenida a una temperatura de 60-70 °C hasta peso constante, posteriormente se tomaron 0.4 g de la muestra y fueron colocados en el matraz Kjeldahl agregando luego 1 g de $CuSO_4$ y 6 g de K_2SO_4. Inmediatamente se inició el proceso de digestión (hidrólisis de la muestra) agregando al matraz 25 mL de HCl concentrado y 6 perlas de vidrio. El matraz fue colocado en el digestor Kjeldah y digerir por 1 hora

rotando los matraces cada 15 minutos. Luego se inició el proceso de destilación (recolección del amonio) enfriando el matraz y agregando 350 mL de agua destilada lavando con ella las paredes del matraz. Por separado, en un matraz erlen meyer de 500 mL fueron colocados 100 mL de ácido bórico al 4 % y y 6 gotas de indicador mixto (rojo de metilo y verde de bromofenol). Se agitó y colocó en la pared inferior del destilador sumergiendo la manguera del refrigerante en la mezcla. Se agregaron al matraz Kjeldah lentamente y por la pared 100 mL de NaOH al 40 % p/v y 5 lentejas de zinc e inmediatamente se continó con la destilación recogiendo luego 150 mL del destilado. Para la valoración, el destilado se tituló con HCl 0.1N estandarizado. Finalmente se calculo el % de Nitrógeno con la siguiente fórmula.

% de Nitrógeno = (mL de HCl gastados)(Normalidad del HCl)/Gramos de muestra

% de Proteína (% de Nitrógeno)(Factor de conversión específico*)

* Para frijol específicamente es de 6.25

SELECCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA DE RESPUESTA A ESTABLECER COMO ESTRÉS NUTRIMENTAL

Para este paso, 8 semillas del cultivar Pinto americano se sembraron en vasos de poliuretano usando perlita como soporte, los vasos fueron dispuestos completamente al azar en una cámara bioclimática Biotronette Mark III, bajo condiciones de 14 h de fotoperiodo a 26 ± 2 °C por 20 días, iniciando con un

riego a capacidad de campo y después de la emergencia se aplicaron cada tercer día los tratamientos que fueron:

1 Agua destilada

2 Dilución 1:10 de la solución nutritiva de Hoagland para cultivo de vegetales pH 5.5.

3 Dilución 3:10 de la solución nutritiva de Hoagland para cultivo de vegetales pH 5.5.

4 Dilución 5:10 de solución nutritiva de Hoagland para cultivo de vegetales pH 5.5.

5 Dilución 7:10 de solución nutritiva de Hoagland para cultivo de vegetales pH 5.5.

6 Solución nutritiva de Hoagland para cultivo de vegetales pH 5.5 completa.

A los siete dias se realizó un aclareo para deja solo tres plántulas por maceta. Finalmente se buscaron en cada una de las plantas crecidas bajo los diferentes tratamientos síntomas de deficiencia y vigor de la plántula.

CARACTERIZACION DE LAS BASES BIOQUÍMICAS Y ULTRAESTRUCTURALES DE RESPUESTA EL ESTRÉS NUTRIMENTAL

OBTENCION DEL MATERIAL FRESCO

Para el análisis de prolina libre, proteina específica, clorofilas α, β y total, macro y micronutrimentos y ultraestructura, 12 semillas de cada uno de las variedades se sembraron en vasos de poliuretano de 1000 cc usando perlita como soporte los cuales fueron dispuestos completamente al azar con un arreglo factonal 4X2 con tres repeticiones en una cámara bioclimática Biotronette Mark III bajo

condiciones de 14 h de fotoperíodo a 26 ± 2 °C por 20 días, iniciando con un riego con agua destilada a capacidad de campo y después de la emergencia se aplicaron cada tercer día las soluciones de riego que para el control fue solución nutritiva de Hoagland completa y para el tratamiento de escasez de nutrimentos ésta misma fue diluida 3:10, a los 20 días se obtuvo el material vegetal fresco.

DETERMINACION DE PROLINA LIBRE (Zuñiga *et al.* 1989 y Bates, 1973)

Medio gramo de hoja o raiz fueron macerados en 10 mL en una solución acuosa de *ácido sulfosalicílico al* 3 % p/v, posteriormente se sonicaron por 5 minutos y se filtró la solución en un embudo de filtración rápida utilizando papel Whatman No. 2. Una alicuota (2 mL) se colocó en un tubo de ensaye al que se le agregó 2 mL de ácido ninhidrinico y 2 mL de ácido acético glacial para después colocar el tubo a una temperatura de 100°C durante una hora. Finalmente la *reacción se completó en un baño* de hielo. Se agregaron 4 mL de tolueno y el contenido del tubo se mezcló vigorosamente durante 20 segundos. Posteriormente se aspiró la parte de tolueno con una pipeta, se estabilizó a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 520 nm en un espectrofotómetro SEQUOIA-TURNER-690. Se usó un tubo con tolueno como blanco para calibrar el aparato. La concentración de prolina se determinó a partir de una curva de calibración y se calculó en base a peso fresco de la siguiente manera:

$$\frac{\text{ppm prolina de la curva}}{\text{g de material peso fresco}} \times \text{volumen de aforación} = \text{ppm de prolina}$$

PERFILES DE PROTEINAS (Pei-Ying Zhong 1997 y Hames, 1981)

Obtención del extracto.

El extracto de proteínas se obtuvo de tejido vegetal fresco de hoja de frijol de 20 días de edad. La muestra se colocó en un congelador durante 24 horas. Posteriormente se pesaron 0.5 g de lamina foliar la cual fue macerada en un mortero con diez volúmenes de buffer de fosfatos pH 7.2 en baño de hielo. La lisis de las células se completó aplicando siete pulsos de ultrasonido (40 ciclos) de 30 segundos cada uno con un periodo intermedio de 30 segundos en baño frío para evitar el calentamiento de la muestra. El extracto obtenido se centrifugó a 7 000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue colocado en tubos eppendorff los cuales se congelaron hasta su procesamiento.

Con el fin de precipitar las proteínas, al sobrenadante obtenido se le agregó gota a gota un volumen igual de sulfato de amonio saturado con agitación continua en baño de hielo y se continuó con la agitación en frío por 12 h, luego se centrifugó a 7 000 rpm y se obtuvo el pellet que se resuspendió en 5 mL de agua destilada estéril y fría para eliminar la sal por diálisis en membrana contra agua bidestilada estéril hasta ausencia de conductividad con cambios de agua cada 12 h, todo esto en refrigeración y con agitación continua. Una vez que el extracto estuvo libre de sulfato de amonio se procedió a liofilizar con el fin de concentrar y preservar la muestra hasta su análisis.

Electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes.

La muestra de proteína (1 mg/mL) se colocó en una solución desnaturalizante (10 % de ß-mercaptoetanol, SDS al 5 % (p/v), 0.01 % de azul de bromofenol, glicerol al 20 % (p/v) y Tris al 1.5 % con un pH de 6.8) en proporción 1:1. Después la suspensión se mantuvo en un baño de agua hirviendo por 2 o 3 minutos. Esta solución se centrifugó a 6,000 rpm para eliminar el material insoluble. Una alícuota (20 a 40 µL) se sometió a electroforesis en un gel separador de poliacrilamida al 10 % de 3 mm de grueso con un gel concentrador al 2.5 %. Se aplicaron 130 volts para la concentración de las proteínas y después 150 volts para la separación, utilizando ventilación para mantener fresco el gel. Después de la electroforesis, el gel se colocó, se lavó con agua y se mantuvo en una solución colorante (azul Coomassie R-250 al 0.1 % (p/v), metanol al 50 % y ácido acético al 10%) durante 12 a 14 horas con agitación continua. Para eliminar el exceso de colorante, el gel se coloca en ácido acético al 10 % con agitación continua y con varios cambios de la solución. Como marcadores se peso molecular se utilizaron estándares Sigma Chemical Co., todos los materiales utilizados son grado reactivo. Realizado esto se procedió a la tinción y revelado del gel. Una vez obtenido el perfil de proteínas se calculó els frente relativo (Rf) para cada uno de los marcadores y se determinó el peso molecular de la o las bandas de interés.

ANÁLISIS DE CLOROFILA α, β y TOTAL Goodwin, (1976)

Para el análisis de clorofila se siguió el método de espectrofotometría visible, el cual consiste en lo siguiente: Un gramo de lámina foliar sin nervaduras se maceró en una solución de acetona-agua al 80% v/v filtrando luego a través de un embudo buchner con papel filtro Whatman No. 1. El filtrado se aforó a 25 mL con la misma solución y se leyó la absorbancia con un espectrofotómetro SEQUOIA-TURNER 690 a una longitud de onda de 648 y 663 nm. La cuantificación de clorofila α, β y total se realizó de acuerdo a las siguientes ecuaciones.

mg/g peso fresco de CLOROFILA TOTAL = (20.2) (A 648) + (8.02) (A 663)

mg/g peso fresco de CLOROFILA α = (12.7) (A 663) + (2.69) (A 648)

mg/g peso fresco de CLOROFILA β = (22.9) (A 648) - (4.68) (A 663)

A= Absorbancia a 648 y 663 nm según corresponda.

DETERMINACIÓN DE MACRO Y MICRO NUTRIMENTOS (AOAC, 1991)

Muestras de raíz y parte aérea fueron secadas en una estufa HS-33 RIOS ROCHA a 60 °C hasta peso constante. Aproximadamente 1 g de cada una de las muestras se carbonizaron completamente en crisoles de porcelana sobre un tripié con triángulo de porcelana y a fuego lento con la llama azul hasta ausencia total de humo y se calcinaron en una mufla a 500 °C TERMOLYNE 1500 durante 3 h Las cenizas se disolvieron con 5 mL de HCl 20% pasando la solución a

través de un embudo de filtración rápida provisto de un papel filtro Whatman # 41. El filtrado se colectó en matraces de aforación de 25 mL. Se preparó un blanco reactivo consistente en 5 mL de HCL 20% aforando a 25 mL con agua bidestilada. Las muestras tratadas se analizaron en un espectrofotómetro de emisión por plasma de en el instrumento ICAP 61E TRACE ANALYZER THERMO JARRELL ASH bajo condiciones ya optimizadas.

ULTRAESTRUCTURA POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISION

Secciones de hoja de los genotipos a estudiar (testigo y bajo ambiente marginal de nutrimentos) se fijaron en una solución de glutaraldehido (5%) preparada con Buffer fosfatos 0.1M, pH 7.2, por un lapso de 24 a 48 hrs. Las muestras se extrajeron y se lavaron con una solución de Buffer de fosfatos de 0.15 M para eliminar el exceso de glutaraldehido, luego se colocaron en una solución de tetraóxido de osmio preparada en un Buffer fosfatos 0.1 M durante 2 a 3 horas. Posteriormente las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de acetona (50 -100 %). La acetona presente en el tejido se sustituyó por de Oxido de Propileno y se infiltraron las muestras con la mezcla de resina Spurr/Oxido de propileno (2:1, 1:1, 1:2). Finalmente se obtuvieron cortes ultrafinos de 600 a 800 nm con un ultramicrotomo Porter Blum MT-1 equipado cuchilla de diamante, los cuales se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Los cortes obtenidos se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM-9 (Moreno, 1998).

DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Para la determinación de macro y micro nutrimentos, asimismo prolina libre y clorofila α, β y total, se aplicó un diseño factorial 2^r con cuatro repeticiones para cada nivel del factor. Todos los datos cuantitativos se sometieron a un análisis con el paquete Statgraphics versión 7.0. Para verificar la existencia de diferencias significativas entre las variedades y los componentes se aplicó el análisis de varianza múltiple. Los valores promedio fueron analizados mediante la prueba de Comparación Múltiple de Tukey (Zar, 1996).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CARACTERIZACIÓN DEL GERMOPLASMA

ANATOMÍA DE SEMILLA POR MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Las imágenes anatómicas mostraron variabilidad en el acomodo de macro y microesclereidas de la testa (ver figura 1a y 2a), presentándose menos compactas las del cultivar Laguna, lo que de acuerdo a Terán (1994) y Maiti (1997), representa una ventaja en la etapa de germinación, ya que mas fácilmente embebe el líquido del suelo dándole mayor posibilidad de sobrevivir en ambientes tanto fértiles como marginales, además a nivel de endospermo se presenta mayor proporción de proteína que de almidón en Laguna (ver figura1b), y Flor de mayo (ver figura 2b), a diferencia de Garbancillo y Pinamerpa en donde se presenta lo contrario.

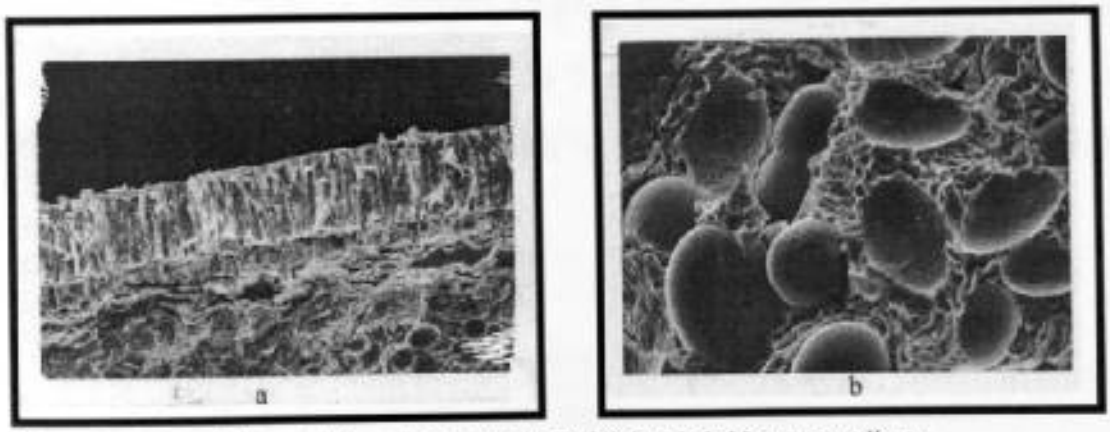

Figura 1. Anatomía de testa (a) y endospermo (b) de frijol variedad Laguna mediante Microscopía Electrónica de Barrido.

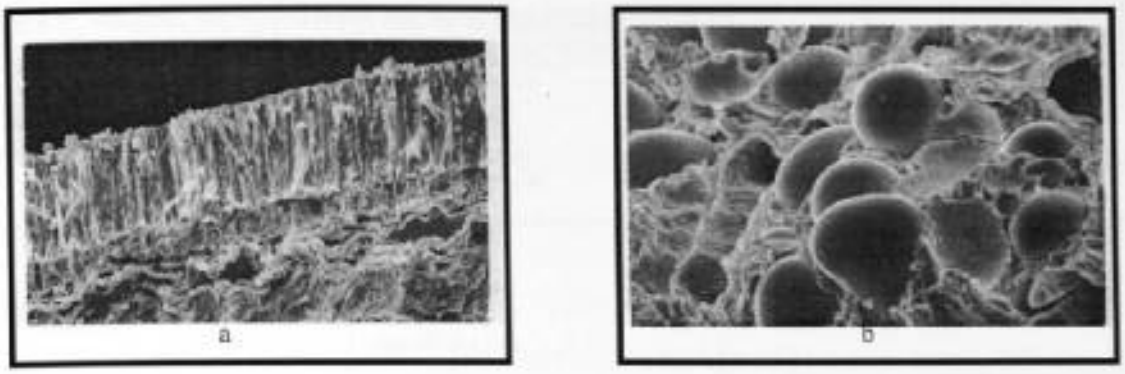

Figura 2. Anatomía de testa (a) y endospermo (b) de frijol variedad Flor de mayo mediante Microscopía Electrónica de Barrido.

CONTENIDO DE MINERALES DE LA SEMILLA

Macronutrimentos

La tabla 1 muestra en análisis de varianza para el contenido de macroelementos en las cuatro variedades de frijol a estudiar, en la cual se aprecia que existieron diferencias altamente significativas ($P<0.01$) entre las variedades para todos los elementos analizados. La prueba de Tukey (ver tabla 2) mostró que la variedad Laguna presenta el mayor contenido de Potasio, Magnesio y Calcio (ver figura 3, 5 y 6), mientras que para sodio fue Pinamerpa (ver figura 4), aunque éste no se considera un elemento esencial (Clark,1990).

TABLA 1. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA MACRONUTRIMENTOS EN SEMILLA

ELEMENTO	FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	PROBABILIDAD
POTASIO	VARIEDAD	3020746.60	3	1006915.50	375.98**	P < 0.01
SODIO	VARIEDAD	38024.56	3	12684.52	3951.38**	P < 0.01
MAGNESIO	VARIEDAD	8469.05	3	2823.02	78.95**	P < 0.01
CALCIO	VARIEDAD	317.07	3	105.69	18.97**	P < 0.01

** VALORES ALTAMENTE SIGNIFICATIVOS (P < 0.01) * VALORES SIGNIFICATIVOS (P < 0.05) NS = VALOR NO SIGNIFICATIVO (P >0.05)

TABLA 2. PRUEBA DE TUKEY PARA MACROELEMENTOS EN SEMILLA

ELEMENTO	NIVEL	PROMEDIO ± ERROR ESTANDAR	LIMITE DE CONFIANZA PARA LA MEDIA
POTASIO	VARIEDAD	1 13892.03 ± 57.02 a 2 13562.97 ± 17.82 b 3 13256.40 ± 0.83 c 4 12534.57 ± 0.98 d **Total 13311.49 ± 14.94**	13823.11 13960.95 13494.05 13631.88 13187.48 13325.32 12465.65 12603.49
SODIO	VARIEDAD	1 643.53 ± 1.56 d 2 597.90 ± 0.85 c 3 475.24 ± 6.20 b 4 958.30 ± 1.11 a **Total 668.74 ± 1.64**	635.98 651.08 590.35 605.45 467.69 482.79 950.75 965.85
MAGNESIO	VARIEDAD	1 577.49 ± 6.17 a 2 527.45 ± 1.78 c 3 544.84 ± 2.02 b 4 504.72 ± 1.55 c **Total 538.62 ± 1.73**	559.52 585.45 519.49 535.41 536.87 552.80 496.76 512.69
CALCIO	VARIEDAD	1 471.47 ± 1.90 a 2 457.03 ± 1.44 c 3 465.73 ± 0.74 b 4 465.03 ± 1.09 b **Total** 24.56 ± 0.68	468.32 474.61 453.89 460.18 462.59 468.88 461.89 468.18

* Letras diferentes indican diferencia significativa ($p<0.05$). VARIEDAD: 1 FLOR DE MAYO, 2 GARBANCILLO, 3 LAGUNA Y 4 PINAMERPA.

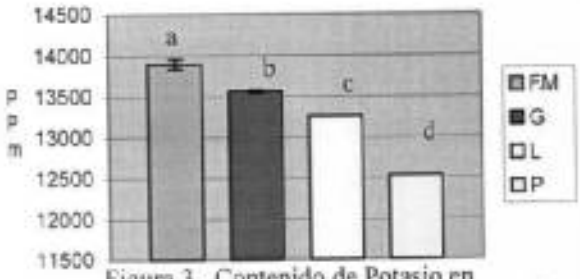

Figura 3. Contenido de Potasio en semilla de cuatro variedades de frijol

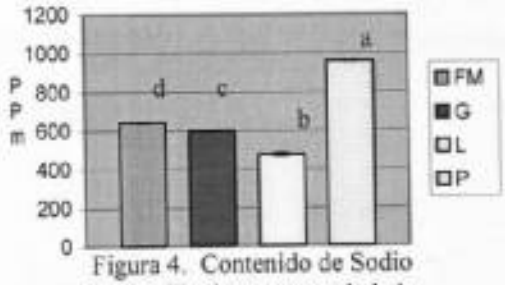

Figura 4. Contenido de Sodio en semilla de cuatro variedades de frijol

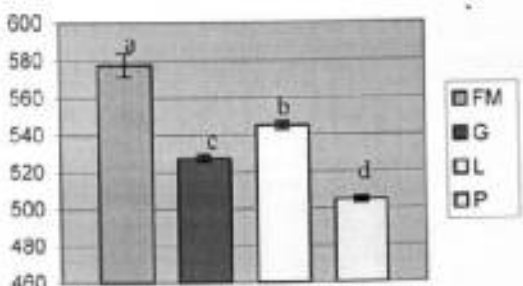

Figura 5. Contenido de Magnesio en semilla de cuatro variedades de frijol

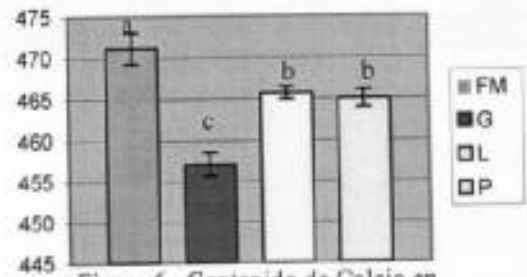

Figura 6. Contenido de Calcio en semilla de cuatro variedades de frijol

MICRONUTRIMENTOS

Los resultados del análisis de varianza para estos elementos se muestran en la tabla 3 en la cual se aprecia que existieron diferencias altamente significativas ($P<0.01$) entre las variedades para todos los elementos analizados. La prueba de Tukey (ver tabla 4) mostró que la variedad Laguna presenta el mayor contenido de cobre (ver figura 9), Flor de mayo el de zinc (ver figura 10) y Pinamerpa de Manganeso y Fierro (ver figuras 7 y 8).

Integrando los resultados para macro y micronutrimentos podemos asumir a la variedad Laguna y Pinamerpa como las de mayor contenido de éstos; en base a lo reportado por Moreno, (1996) en su estudio de la relación ente el contenido de minerales en semilla y desarrollo de plántula de especies de frijol, estas pueden se consideradas como tolerantes ya que éstas presentan un mayor porcentaje de germinación y mejor desarrollo de la plántula.

TABLA 3. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA MICROELEMENTOS EN SEMILLA

ELEMENTO	FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	PROBABILIDAD
MANGANESO	VARIEDAD	6.87	3	1.96	32.09**	P < 0.01
FIERRO	VARIEDAD	46.62	3	15.54	43.41**	P < 0.01
COBRE	VARIEDAD	16.45	3	61.15	27.40**	P < 0.01
ZINC	VARIEDAD	14033.91	3	4677.97	19600.17**	P < 0.01

** VALORES ALTAMENTE SIGNIFICATIVOS (P < 0.01) * VALORES SIGNIFICATIVOS (P < 0.05) NS = VALOR NO SIGNIFICATIVO (P > 0.05)

TABLA 4. PRUEBA DE TUKEY MICROELEMENTOS EN SEMILLA

ELEMENTO	NIVEL	PROMEDIO ± ERROR ESTANDAR	LIMITE DE CONFIANZA PARA LA MEDIA
MANGANESO	VARIEDAD	1 15.09 ± 0.12 c 2 16.48 ± 0.05 b 3 15.45 ± 0.25 c 4 17.23 ± 0.06a **Total 16.21 ± 0.07**	15.36 16.02 16.15 16.81 15.12 15.78 16.90 17.55
FIERRO	VARIEDAD	1 28.46 ± 0.42 b 2 26.18 ± 0.12 c 3 29.00 ± 0.25 b 4 31.72 ± 0.47 a **Total 28.84 ± 0.17**	27.67 29.26 25.38 26.96 28.21 29.80 30.92 32.52
COBRE	VARIEDAD	1 11.61 ± 0.21 a 2 8.46 ± 0.26 ab 3 10.29 ± 0.25 b 4 10.56 ± 0.28 c **Total 10.23 ± 0.13**	11.03 12.19 7.88 9.04 9.71 10.87 9.98 11.14
ZINC	VARIEDAD	1 53.44 ± 0.01 d 2 62.71 ± 0.31 c 3 140.68 ± 0.37 a 4 96.32 ± 0.32 b **Total 88.29 ± 0.14**	52.79 54.11 62.04 63.38 140.02 141.35 95.65 96.99

* Letras diferentes indican diferencia significativa ($p<0.05$). VARIEDAD: 1 FLOR DE MAYO, 2 GARBANCILLO, 3 LAGUNA Y 4 PINAMERPA.

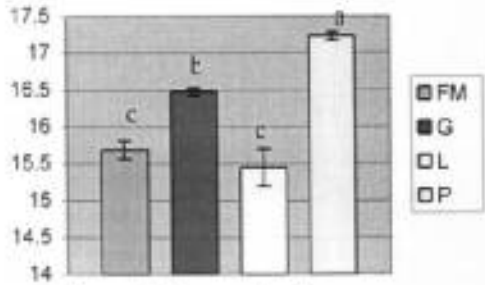

Figura 7. Contenido de Manganeso en semilla de cuatro variedades de frijol

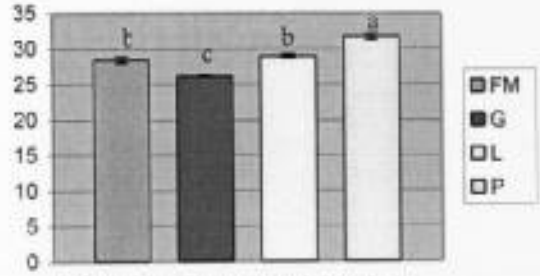

Figura 8. Contenido de Fierro en semilla de cuatro variedades de frijol

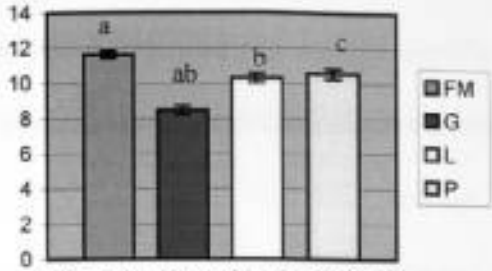

Figura 9. Contenido de Cobre en semilla de cuatro variedades de frijol

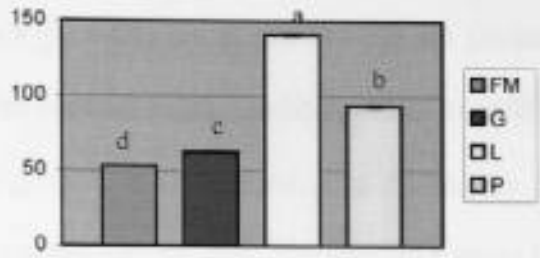

Figura 10. Contenido de Zinc en semilla de cuatro variedades de frijol

DETERMINACION DEL CONTENIDO DE PROTEINA TOTAL

Existió diferencia altamente significativa ($p<0.01$) en el porcentaje de proteína Total de las cuatro variedades a estudiar (ver tabla 5). La comparación múltiple de medias mostró la formación de tres grupos estadísticamente diferentes (ver tabla 6). Los cultivares con mayor concentración de este nutrimento fueron Flor de mayo con 21.72 % y Laguna con 20.92 % (ver figura 11). lo que indica la posibilidad de que sean los que mas toleren el estrés nutrimental ya que según Vlad y Pretorian, (1986), el contenido de *proteína está relacionado* con la resistencia a la sequia, *P. acutifolia* se ha reportado como una especie resistente a la alta temperatura y sequía debido a que contiene un alto porcertaje de ésta (Frederici *et al.*, 1990).

TABLA 5. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA ANÁLISIS DE PROTEINA TOTAL

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	PROBABILIDAD
VARIEDAD	8.96	3	2.66	209.39**	P < 0.01

** Valor Altamente significativo p < 0.01

TABLA 6. PRUEBA DE TUKEY PARA PROTEÍNA TOTAL

NIVEL	PROMEDIO ± ERROR ESTANDAR	LIMITE DE CONFIANZA PARA LA MEDIA	
VARIEDAD	1 21.72 ± 0.0503 a	21.63	21.84
	2 20.20 ± 0.0152 c	20.05	20.31
	3 20.92 ± 0.065 b	20.80	21.03
	4 20.13 ± 0.042 c	20.01	20.25

*Letras diferentes indican diferencia significativa (α=0.05). VARIEDAD: 1 FLOR DE MAYO, 2 GARRANCILLO, 3 LAGUNA Y 4 PINAMBRA.

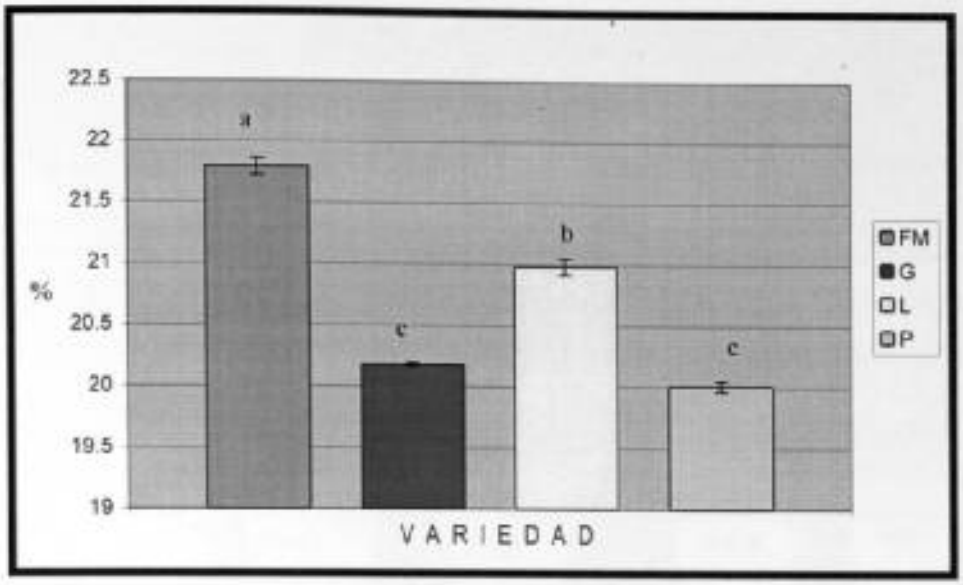

Figura 11. Contenido de Proteína total en cultivares de frijol comerciales (Flor de mayo, Garbancillo) y mejorados (Laguna y Pinamerpa).

SELECCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA DE RESPUESTA A ESTABLECER COMO ESTRÉS NUTRIMENTAL

Se eligió la dilución 3:10 solución nutritiva de Hoagland/agua bidestilada porque fue la dosis en la cual se presentó un vigor de la plántula similar al testigo (ver figura 12), además no se encontraron síntomas de deficiencia de nutrimentos a diferencia de la dilución 1:10 en donde se presenta clorosis marginal debido a los bajos niveles de Potasio y Zinc así como hojas jóvenes marchitas por insuficiencia de Cobre (Clark, 1990).

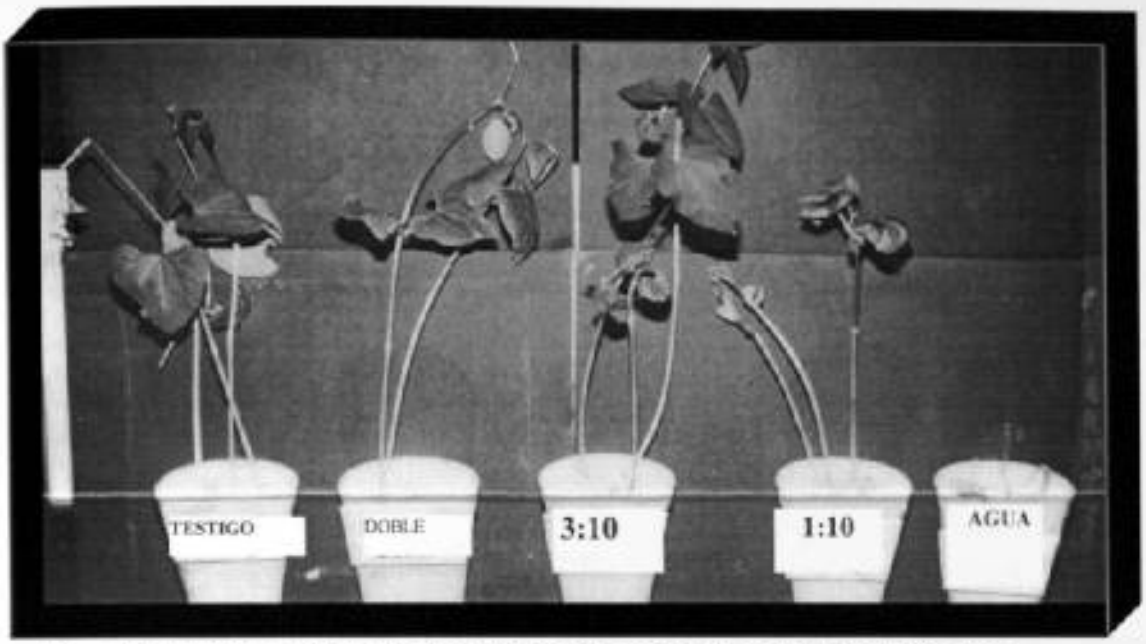

Figura 12. Plántulas de 20 días de edad crecidas bajo condiciones controladas a diferentes concentraciones de solución nutritiva de Hoagland pH 5.5 usando perlita como soporte.

OBTENCIÓN DEL MATERIAL FRESCO

La siembra bajo condiciones de estrés de las cuatro variedades de frijol a estudiar produjo plántulas de ente 50 y 60 cm de longitud sin síntomas de deficiencia en Laguna y Flor de mayo y con algunos en Garbancillo y Pinamerpa (ver figura 13), desde ese momento pudimos observar que estos últimos fueron mas sensibles al ambiente limitante en nutrimentos, ya que a nivel de raíz las plántulas de Laguna y Flor de mayo desarrollaron mayor longitud de raíz con mas cantidad de pelillos radiculares en comparación con su respectivo testigo para una mayor eficiencia en la absorción de minerales.

Figura 13. Plántulas de 20 días de variedades de frijol sometidas a estrés nutrimental
L: Laguna FM: Flor de mayo G: Garbancillo P: Pinamerpa
C: Control E:Estrés

DETERMINACION DE PROLINA LIBRE

El análisis de varianza demostró que existen diferencias altamente significativas ($p<0.01$) entre los tratamientos, pero no entre las variedades ni entre los componentes (ver tabla 7). La prueba de Tukey muestra diferencias estadisticamente significativas ($P<0.05$) entre los tratamientos (ver tabla 8), observándose que el control acumuló 0.1495 ppm de prolina, mientras que por efecto del estrés se presentaron 0.2487 ppm (ver figura 14 b). Esta diferencia representa cerca del 100% de incremento en la acumulación de este aminoácido, lo que coincide con lo reportado por Hanson *et. al.*, 1979 Hanson y Hitz, 1982., Naidu *et al.* 1992 para estrés hídrico y salino. No se encontraron diferencias estadisticamente significativas(P<0-05) entre hoja y raíz (ver figura 14 b). Finalmente entre las variedades observamos un rango de acumulación que va de 0.1742 ppm en la variedad Garbancillo a 0.2234 ppm en Laguna. Sin embargo de acuerdo a la comparación múltiple de medias las diferencias observadas no son significativas 8P<0.05) entre ellas (ver figura 14 a).

TABLA 7. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA PROLINA LIBRE

COMPUESTO	FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	PROBABILIDAD
PROLINA	VARIEDAD	0.0217	3	0.0072333	1.428 ^{NS}	P = 0.24
	COMPONENTE	0.0008	1	0.0008442	0.167 ^{NS}	P = 0.68
	TRATAMIENTO	0.1183	1	0.1182961	23.352 **	P < 0.01

** VALORES ALTAMENTE SIGNIFICATIVOS (P < 0.01) * VALORES SIGNIFICATIVOS (P < 0.05) NS = VALOR NO SIGNIFICATIVO (P >0.05)

TABLA 8. PRUEBA DE TUKEY PARA PROLINA LIBRE

COMPUESTO	NIVEL	PROMEDIO ± ERROR ESTANDAR	LIMITE DE CONFIANZA PARA LA MEDIA	
PROLINA	VARIEDAD	1 0.1821 ± 0.139 a	0.1406	0.2236
		2 0.1742 ± 0.0285 a	0.1328	0.2258
		3 0.2167 ± 0.0362 a	0.1753	0.2582
		4 0.2234 ± 0.0107 a	0.1819	0.2649
		Total 0.1991± 0.0125		
	COMPONENTE	1 0.1949 ± 0.0180 a	0.1656	0.2243
		2 0.2033 ± 0.0177 a	0.1740	0.2327
		Total 0.1991 ± 0.0126		
	TRATAMIENTO	1 0.1495 ± 0.0128 b	0.1202	0.1788
		2 0.2487 ± 0.0161 a	0.2195	0.2781
		Total 0.199 ± 0.0103		

* Letras diferentes indican diferencia significativa (p<0.05). VARIEDAD: 1 FLOR DE MAYO, 2 GARBANCILLO, 3 LAGUNA Y 4 PINAMERPA. COMPONENTE 1, HOJA Y 2 RAIZ. TRATAMIENTO 1, CONTROL Y 2, ESTRÉS.

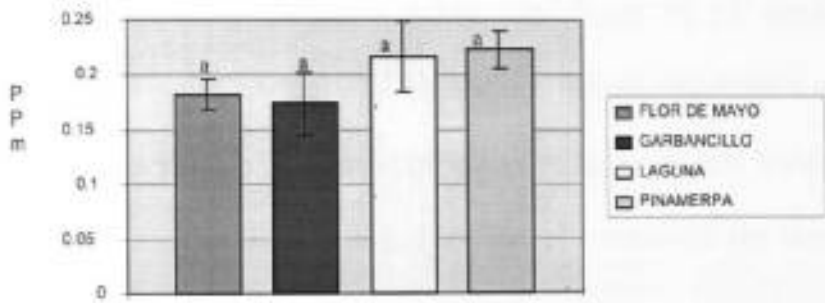

Figura 14a: Contenido de prolina libre en cuatro variedades de frijol bajo condiciones de estrés nutrimental.

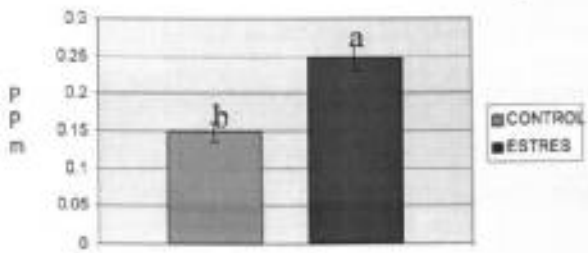

Figura 14b. Efecto del estrés nutrimental en el contenido de prolina libre en frijol

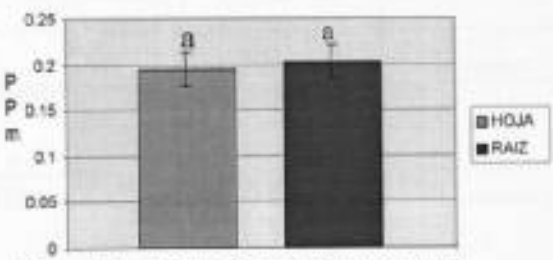

Figura 14c. Efecto del estrés nutrimental en el contenido de prolina libre en hoja y raíz de frijol

ANÁLISIS DE CLOROFILA α, β y TOTAL

Clorofila α

El análisis de varianza mostró que existen diferencias altamente significativas ($p<0.01$) entre las variedades y entre los tratamientos (ver tabla 9). La CMMT mostró la formación de tres grupos estadísticamente diferentes ($P<0.05$) entre las variedades incluyéndose en el primero a Laguna y Garbancillo, en el segundo flor de mayo y Laguna y en el tercero Flor de mayo y Garbancillo (Tabla 10). La mayor concentración de Clorofila α se presentó en la variedad P con 19.3 mg, mientras que la menor concentración se presentó en G con 14.19 mg (ver figura 15 a). En cuanto a los tratamientos hubo diferencias significativas ($P<0.05$) entre control y estrés (ver figura 15 b), presentándose mayor concentración en el control con 18.36 mg. Estos resultados coinciden y corroboran al mismo tiempo las aseveraciones realizadas por Valencia *et al.*, (1997) quienes mencionan que la reducción en el contenido de clorofilas esta relacionada con la respuesta a factores de estrés.

TABLA 9. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA CLOROFILA α

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	PROBABILIDAD
VARIEDAD	105.23	3	35.07	10.79 **	P < 0.01
TRATAMIENTO	29.17	1	29.17	8.72 **	P < 0.01

** VALORES ALTAMENTE SIGNIFICATIVOS ($P<0.01$) * VALORES SIGNIFICATIVOS ($P<0.05$) NS = VALOR NO SIGNIFICATIVO ($P>0.05$)

TABLA 10. PRUEBA DE TUKEY PARA CLOROFILA α

NIVEL	PROMEDIO ± ERROR ESTANDAR	LIMITE DE CONFIANZA PARA LA MEDIA	
VARIEDAD	1 15.35 ± 0.65 bc	14.19	17.91
	2 14.19 ± 1.61 c	12.63	15.75
	3 19.14 ± 0.22 ab	17.58	20.71
	4 19.32 ± 0.90 a	17.76	20.88
	Total 17.25 ± 0.44		
TRATAMIENTO	1 18.36 ± 0.17 a	17.25	19.46
	2 16.15 ± 1.13 b	15.04	17.25
	Total 17.25 ± 0.57		

* Letras diferentes indican diferencia significativa ($p\leq0.05$) VARIEDAD: 1 FLOR DE MAYO 2 GARBANCILLO, 3 LAGUNA Y 4 PINAMEXPA
TRATAMIENTO 1 CONTROL Y 2 ESTRÉS

ANÁLISIS DE CLOROFILA α, β y TOTAL (GOODWIN (1976)

Clorofila α

El análisis de varianza mostró que existen diferencias altamente significativas (p<0.01) entre las variedades y entre los tratamientos (ver tabla 9). La CMMT mostró la formación de tres grupos estadísticamente diferentes (P<0.05) entre las variedades incluyéndose en el primero a Laguna y Garbancillo, en el segundo flor de mayo y Laguna y en el tercero Flor de mayo y Garbancillo (Tabla 10). La mayor concentración de Clorofila α se presentó en la variedad P con 19.3 mg. mientras que la menor concentración se presentó en G con 14.19 mg (ver figura 15 a). En cuanto a los tratamientos hubo diferencias significativas (P<0.05) entre control y estrés (ver figura 15 b), presentándose mayor concentración en el control con 18.36 mg. Estos resultados coinciden y corroban al mismo tiempo las aseveraciones realizadas por Valencia *et al*, (1997) quienes mencionan que la reducción en el contenido de clorofilas esta relacionada con la respuesta a factores de estrés.

TABLA 9. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA CLOROFILA α

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	PROBABILIDAD
VARIEDAD	109.79	3	36.07	10.45 **	P < 0.01
TRATAMIENTO	29.17	1	29.17	9.72 **	P < 0.01

** VALORES ALTAMENTE SIGNIFICATIVOS (P < 0.01) * VALORES SIGNIFICATIVOS (P < 0.05) NS = VALOR NO SIGNIFICATIVO (P > 0.05)

TABLA 10. PRUEBA DE TUKEY PARA CLOROFILA α

NIVEL	PROMEDIO ± ERROR ESTANDAR	LIMITE DE CONFIANZA PARA LA MEDIA	
VARIEDAD	1 16.36 ± 0.65 ac	14.79	17.91
	2 14.19 ± 1.61 c	12.63	15.75
	3 19.14 ± 0.22 ab	17.58	20.71
	4 15.32 ± 0.30 a	17.76	20.56
	Total 17.75 ± 0.44		
TRATAMIENTO	1 18.36 ± 0.17 a	17.25	19.46
	2 16.15 ± 1.15 b	15.04	17.25
	Total 17.27 ± 0.57		

Los valores con la misma letra no son significativamente diferentes (p<0.05) 1 VARIEDAD 1 FLOR DE MAYO 2 GARBANCILLO 3 LAGUNA 4 PINTAMERPA TRATAMIENTO 1 CONTROL 2 ESTRÉS

figura 16 b). Nuevamente estos resultados se respaldan con las observaciones realizadas por Valencia *et al.*, 1997.

TABLA 11. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA CLOROFILA β

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	PROBABILIDAD
VARIEDAD	37.40	3	12.46	10.48 **	P < 0.01
TRATAMIENTO	4.19	1	4.19	3.52 NS	P = 0.07

** VALORES ALTAMENTE SIGNIFICATIVOS (P < 0.01) * VALORES SIGNIFICATIVOS (P < 0.05) NS = VALOR NO SIGNIFICATIVO (P >0.05)

TABLA 12. PRUEBA DE TUKEY CLOROFILA β

NIVEL	PROMEDIO ± ERROR ESTANDAR	LIMITE DE CONFIANZA PARA LA MEDIA	
VARIEDAD	1 6.51 ± 0.38 b		
	2 5.69 ± 0.81 b	24.76	7.44
	3 8.39 ± 0.23 a	24.79	6.62
	4 8.65 ± 0.22 a	24.80	9.32
	Total 7.31 ± 0.24	24.81	9.58
TRATAMIENTO	1 7.73 ± 0.09 a		
	2 6.89 ± 0.67 a	24.78	8.38
	Total 7.31 ± 0.34	6.23	7.55

* Letras diferentes indican diferencia significativa (p<0.05). VARIEDAD: 1 FLOR DE MAYO, 2 GARBANCILLO, 3 LAGUNA Y 4 PINAMERPA. TRATAMIENTO 1, CONTROL Y 2, ESTRÉS.

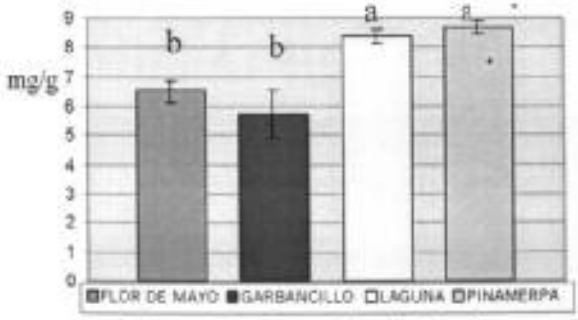

Figura 16a: Contenido de clorofila β en cuatro variedades de frijol bajo condiciones de estrés nutrimental.

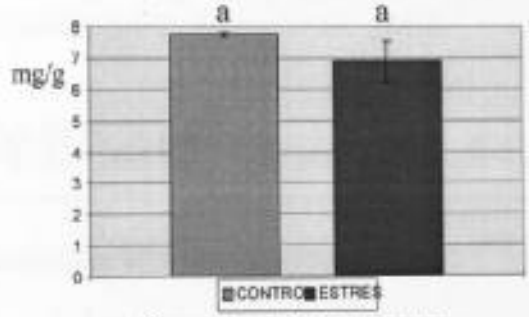

Figura 16b. Efecto del estrés nutrimental en el contenido de clorofila β en frijol

Clorofila Total

Los resultados obtenidos en el análisis de varianza mostraron que existen diferencias altamente significativas (P<0.01) entre las variedades y dicha diferencia fue significativa (P< 0.05) entre los tratamientos (ver tabla 13). La comparación múltiple de medias (ver tabla 14), mostró la formación de tres

grupos distintos entre ellos, incluyéndose en el primero a las variedades Laguna y Pinamerpa , en el segundo Flor de mayo y Laguna y en el tercero Flor de mayo y Garbancillo (figura 17a), resultando así que la mayor concentración de clorofila total se demostró en la variedad Pinamerpa con un valor de 28.01 mg; en contraste, la menor concentración (19.90 mg) se presentó en la variedad Garbancillo (ver tabla 14). Para los tratamientos la mayor concentración de clorofila total se registró en el control (26.07 mg), mientras que la mero concentración, por el efecto del estrés registró 23.05 mg (ver figura 17b). Estos resultados concuerdan con los reportandos por Castrillo y Fernández. (1990), quienes observaron que la disminución en el contenido de clorofila total puede ser considerada como un buen indicador del grado de estrés hídrico en plantas de maíz. Del mismo modo, la respuesta obtenida por el factor de estrés corrobora las observaciones de Valencia *et al.*, 1997.

TABLA 13. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA CLOROFILA TOTAL

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	PROBABILIDAD
VARIEDAD	264.94	3	88.13	6.54**	P < 0.01
TRATAMIENTO	54.8*	1	54.81	5.93*	P < 0.05

** VALORES ALTAMENTE SIGNIFICATIVOS (P < 0.01) * VALORES SIGNIFICATIVOS (P = 0.05) NS = VALOR NO SIGNIFICATIVO (P > 0.05)

TABLA 14. PRUEBA DE TUKEY CLOROFILA TOTAL

NIVEL	PROMEDIO ± ERROR ESTANDAR	LIMITE DE CONFIANZA PARA LA MEDIA	
VARIEDAD	1 22.35 ± 1.05 bc	24.78	25.85
	2 19.90 ± 2.43 c	24.70	22.50
	3 27.37 ± 0.54 ab	24.80	29.08
	4 28.06 ± 0.31 a	25.40	30.60
	Total 24.56 ± 0.32		
TRATAMIENTO	1 26.07 ± 0.25 a	24.23	27.90
	2 23.05 ± 1.81 b	21.20	24.88
	Total 24.56 ± 0.9		

* Letras diferentes indican diferencia significativa (p<0.05) VARIEDAD 1 FLOR DE MAYO 2 GARBANCILLO 3 LAGUNA Y 4 PINAMERPA
TRATAMIENTO 1 CONTROL Y 2 ESTRÉS

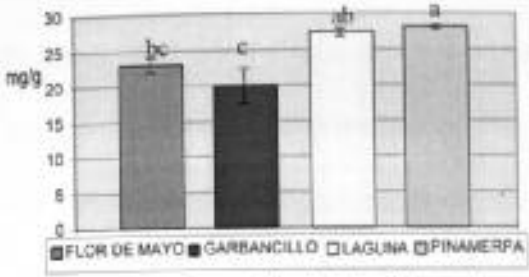

Figura 17a. Contenido de Clorofila total en cuatro variedades de frijol bajo condiciones de estrés nutrimental.

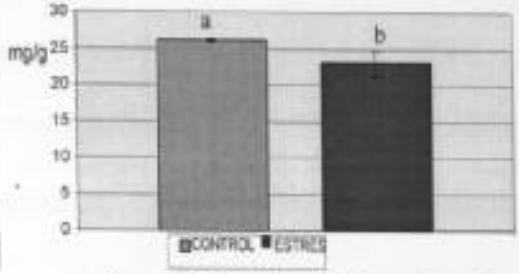

Figura 17b. Efecto del estrés nutrimental en el contenido de Clorofila total en frijol.

DETERMINACIÓN DE MACRO Y MICRO NUTRIMENTOS

POTASIO

El contenido de Potasio en los componentes fue muy variable de tal manera que se detectaron diferencias altamente significativas ($p<0.01$) entre ellos y los valores fueron significativos ($p<0.05$) para los tratamientos. Sin embargo no se detectó diferencia significativa ($P>0.05$) para las variedades (ver tabla 15).

La prueba de Tukey (ver tabla 16) presenta también diferencias significativas entre los tratamientos, de manera que con el tratamiento de estrés nutrimental existe una mayor acumulación de este elemento al registrarse 19116.86 ppm, en comparación con las 18 162.87 ppm que se registran en el control (ver figura 16b). Respecto a los componentes observamos que en parte aérea se acumularon 29 872.17 ppm, mientras que en raíz se absorben 7 407.56 ppm (ver figura 13c) lo que difiere con He y Tang (1993), que reportaron un incremento en la acumulación de potasio (K^+) en la raíz de sorgo al estudiar el efecto de estrés osmótico.

En las variedades, el rango de acumulación de este elemento fué desde 19 210.68 ppm en la variedad *Flor de Mayo* a 18 148.70 en Garbancillo (ver figura 18a); sin embargo, de acuerdo a la prueba de Tukey, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($P>0.05$).

TABLA 15. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA DE POTASIO

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	PROBABILIDAD
VARIEDAD	1.04	3	3.47	1.34 NS	P = 0.27
COMPONENTE	6.05	1	6.05	2333.00 **	P < 0.01
TRATAMIENTO	1.09	1	1.09	4.21 *	P = 0.04

** VALORES ALTAMENTE SIGNIFICATIVOS ($P<0.01$) * VALORES SIGNIFICATIVOS ($P<0.05$) NS = VALOR NO SIGNIFICATIVO ($P>0.05$)

TABLA 16. PRUEBA DE TUKEY PARA POTASIO

NIVEL	PROMEDIO ± ERROR ESTANDAR	LIMITE DE CONFIANZA PARA LA MEDIA
VARIEDAD	1 19210.68 ± 3164.11 a	16272.87 20148.49
	2 18148.71 ± 3387.20 a	17210.90 19086.51
	3 18213.32 ± 3948.61 a	17275.51 19151.13
	4 18986.76 ± 3115.86 a	18048.95 19924.57
	Total 18639.87 ± 1709.98	
COMPONENTE	1 29872.17 ± 350.32 a	29209.04 30535.30
	2 7407.56 ± 336.21 b	6744.43 8070.69
	Total 18639.86 ± 242.77	
TRATAMIENTO	1 18162.87 ± 2259.96 b	17499.74 18826.01
	2 19116.86 ± 2465.64 a	18453.72 19779.99
	Total 18639.86 ± 1672.33	

* Letras diferente indican diferencia significativa ($p<0.05$). VARIEDAD: 1 FLOR DE MAYO, 2 GARBANCILLO, 3 LAGUNA Y 4 PINAMERPA. COMPONENTE 1, PARTE AEREA Y 2 RAIZ. TRATAMIENTO 1, CONTROL Y 2, ESTRÉS.

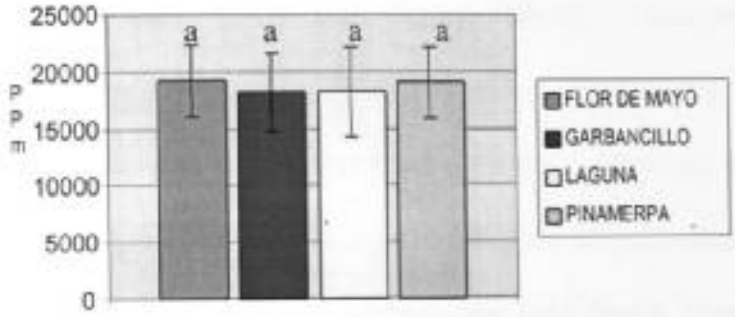

Figura 18a. Contenido de potasio en variedades de frijol bajo estrés nutrimental.

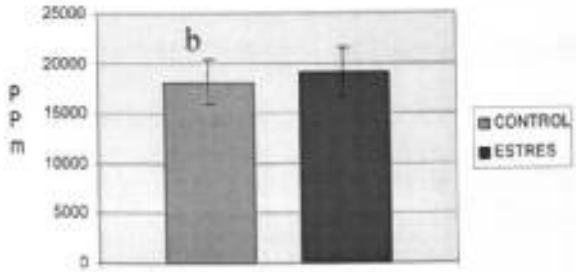

Figura 18b. Efecto del estrés nutrimental en el contenido de potasio.

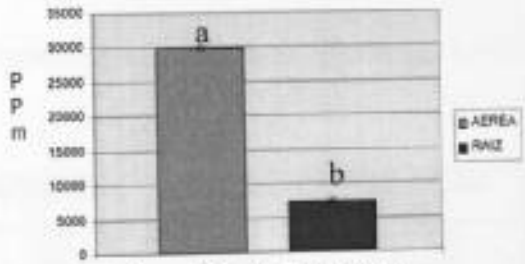

Figura 18c. Contenido de potasio en parte aérea y raiz de frijol bajo estrés nutrimental.

SODIO

De acuerdo al análisis de varianza (ver tabla 17) la concentración de sodio presentó diferencias altamente significativas ($p<0.01$) entre los componentes y los tratamientos, contrario a las variedades, donde no se observó diferencia significativa ($P>0.05$). Respecto a los tratamientos, en la prueba de Tukey (ver tabla 18) observamos que existen diferencias estadísticamente significativas ($P<0.05$), donde el control se alcanza una mayor acumulación de sodio al registrarse 9094.88 ppm, en comparación con las 7216.55 ppm acumuladas en el tratamiento estrés nutrimental (ver figura 19 c). Del mismo modo encontramos que entre parte aérea y raíz, existen diferencias significativas ($P<0.05$), acumulándose una mayor cantidad de este nutrimento en la raíz (13 876.25 ppm) en comparación con las 2435.18 ppm registradas en la parte aérea (Figura 19b). Respecto a las variedades (ver figura 19a)., se puede observar que la variedad Pinamerpa acumula una mayor cantidad de sodio (8 714.94 ppm) en comparación con la variedad Laguna (7 873.19 ppm). Sin embargo estas diferencias no son estadísticamente significativas ($P>0.05$)

TABLA 17. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA SODIO

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	PROBABILIDAD
VARIEDAD	5.17	3	1.72	1.19 NS	P = 0.33
COMPONENTE	1.57	1	1.57	1085.22 **	P < 0.01
TRATAMIENTO	4.23	1	4.23	28.45 **	P < 0.0

** VALORES ALTAMENTE SIGNIFICATIVOS ($P<0.01$) * VALORES SIGNIFICATIVOS ($P<0.05$) NS= VALOR NO SIGNIFICATIVO ($P>0.05$).

TABLA 18. COMPARACIÓN DE MEDIAS DE TUKEY PARA SODIO

NIVEL	PROMEDIO ± ERROR ESTANDAR	LIMITE DE CONFIANZA PARA LA MEDIA	
VARIEDAD	1 8016.43±1775.23 a	7305.70	8727.17
	2 8018.29±1538.30 a	7307.57	8729.03
	3 7873.19±1592.29 a	7162.47	8583.93
	4 8714.94±2079.18 a	8004.21	9425.68
	Total 8155.71±890.71		
COMPONENTE	1 2435.18±200.07 b	1932.62	2937.74
	2 13876.25±399.03 a	13373.69	14378.82
	Total 8155.72±223.19		
TRATAMIENTO	1 7216.55±1138.24 a	6713.99	7719.12
	2 9094.88±1292.84 b	8592.32	9597.44
	Total 8155.72±861.41		

* Letras diferente indican diferencia significativa ($p<0.05$). VARIEDAD: 1 FLOR DE MAYO, 2 GARBANCILLO, 3 LAGUNA Y 4 PINAMERPA. COMPONENTE 1, PARTE AEREA Y 2 RAIZ. TRATAMIENTO 1, CONTROL Y 2, ESTRÉS.

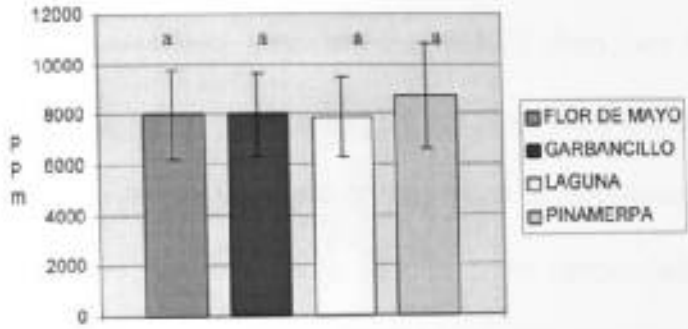

Figura 19a. Contenido de sodio en variedades de frijol bajo estrés nutrimental.

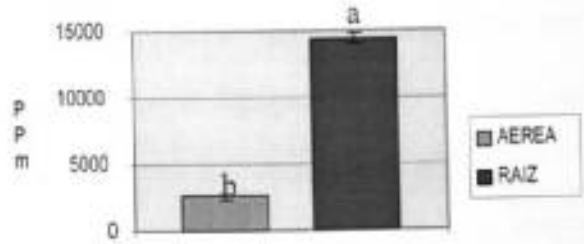

Figura 19b. Efecto del estrés nutrimental en el contenido de sodio en parte aérea y raíz de frijol

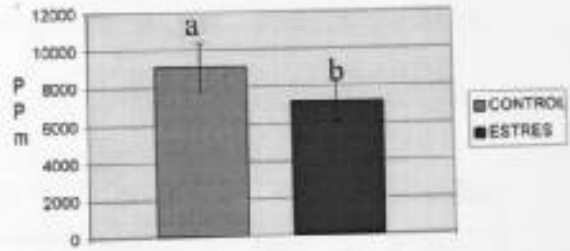

Figura 19c. Efecto del estrés nutrimental en el contenido de sodio en frijol

MAGNESIO

De acuerdo a los resultados sobre el contenido de este magnesio, hemos constatado la existencia de diferencias ($P<0.01$) entre los tratamientos, ($P<0.05$) en las variedades y ($P>0.05$) entre los componentes (ver tabla 19). La Prueba de Tukey (ver tabla 20) mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, resultando que el control presentó una mayor acumulación de magnesio (1 069.59 ppm) mientras que bajo condiciones de estrés nutrimental se absorben únicamente 869.23 ppm (ver figura 21b). Respecto a los componentes, la comparación de medias no mostró diferencias significativas entre la parte aérea y la raíz en cuanto a la acumulación de este elemento cuyos valores fueron 989.14 y 949.69 ppm respectivamente (ver figura 20c). En las variedades (ver figura 20a), se puede observar un "amplio" rango de acumulación de magnesio que va desde 1 056.87 ppm en la variedad Garbancillo hasta 878.56 ppm en Flor de Mayo, sin embargo, de acuerdo a la prueba de Tukey estas diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas (ver figura 20a).

TABLA 19. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA MAGNESIO

ELEMENTO	FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	PROBABILIDAD
MAGNESIO	VARIEDAD	314255.76	3	104765.26	2.861 *	P > 0.04
	COMPONENTE	18673.26	1	18673.26	0.513 ns	P > 0.48
	TRATAMIENTO	431703.56	1	431703.56	12.247 **	P < 0.01

** VALORES ALTAMENTE SIGNIFICATIVOS (P < 0.01) * VALORES SIGNIFICATIVOS (P < 0.05) NS = VALOR NO SIGNIFICATIVO (P > 0.05)

TABLA 20. COMPARACIÓN DE MEDIAS DE TUKEY PARA MAGNESIO

NIVEL	PROMEDIO ± ERROR ESTANDAR	LIMITE DE CONFIANZA PARA LA MEDIA	
VARIEDAD	1 878.56 ± 31.63 a	767.44	989.98
	2 1056.87 ± 69.83 a	945.75	1167.9
	3 899.41 ± 94.37 a	788.29	1010.53
	4 1042.81 ± 23.74 a	931.70	1153.94
	Total 969.41 ± 30.98		
COMPONENTE	1 989.14 ± 47.99 a	910.56	1067.71
	2 949.69 ± 43.65 a	871.12	1028.27
	Total 969.41 ± 32.43		
TRATAMIENTO	1 1009.59 ± 45.43 a	871.12	1148.17
	2 869.23 ± 36.13 b	790.56	947.61
	Total 969.41 ± 29.02		

* Letras diferentes indican diferencia significativa (p<0.05). VARIEDAD: 1 FLOR DE MAYO, 2 GARBANCILLO, 3 LAGUNA Y 4 PINAMERPA. COMPONENTE 1, PARTE AÉREA Y 2 RAIZ. TRATAMIENTO 1, CONTROL Y 2, ESTRÉS.

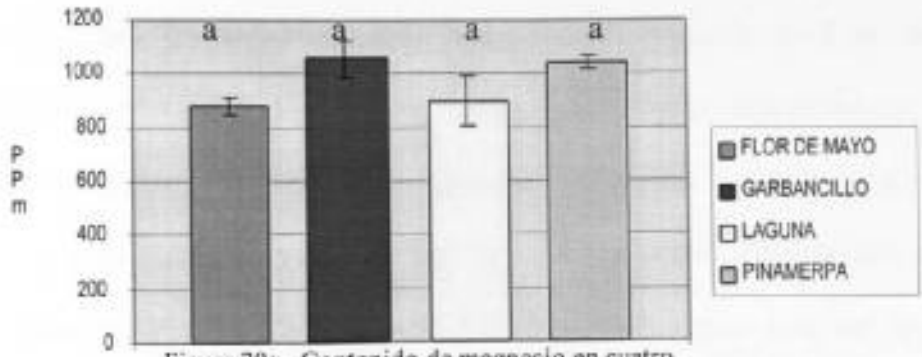

Figura 20a. Contenido de magnesio en cuatro variedades de frijol bajo condiciones de estrés nutrimental.

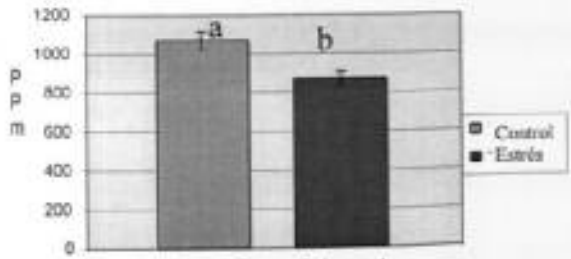

Figura 20b. Efecto del estrés nutrimental en el contenido de magnesio en frijol.

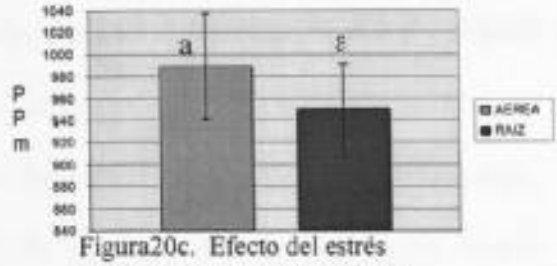

Figura20c. Efecto del estrés nutrimental en el contenido de magnesio en parte aérea y raiz de frijol.

CALCIO

Los resultados obtenidos del ANOVA (ver tabla 21) mostraron que existen diferencias altamente significativas ($p<0.01$) entre las variedades y entre los componentes pero no entre los tratamientos ($P>0.05$). Respecto a los componentes, la prueba de Tukey (ver tabla 22), registró que en la raíz se alcanza una acumulación de 3182.98 ppm, mientras que en la parte aérea fueron solo 1600 ppm (ver figura 21c). Para variedades mostró la formación de dos grupos, teniéndose en el primero las variedades Flor de Mayo, Pinamerpa y Garbancillo, en el segundo las variedades Laguna y Flor de Mayo, mostrándose entonces diferencias estadísticamente significativas ($P<0.05$) entre las variedades Garbancillo y Laguna, y Laguna y Pinamerpa (ver figura 21a). De esta manera observamos que la variedad Garbancillo reporta la mayor acumulación de Calcio (624.18 ppm), mientras que en la variedad Laguna se registra la menor cantidad de este elemento (2 017.23 ppm). De acuerdo a los resultados obtenidos podemos observar que existe concordancia con lo reportado por otros investigadores ya que al respecto Khair (1986) establece que existe una relación positiva entre la acumulación de calcio y la tolerancia a la salinidad; además, según Akhavan Kharazian *et al.*, (1991) este nutrimento juega un papel muy importante en la resistencia a dicho factor adverso.

TABLA 21. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA CALCIO

ELEMENTO	FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	PROBABILIDAD
CALCIO	VARIEDAD	2055753.00	5	685244.00	5.55 **	P < 0.01
	COMPONENTE	30038311.00	1	30038311.00	188.57 **	P < 0.01
	TRATAMIENTO	442166.00	1	442166.00	2.77 NS	P = 0.1

** VALORES ALTAMENTE SIGNIFICATIVOS ($P<0.01$) * VALORES SIGNIFICATIVOS ($P<0.05$) NS = VALOR NO SIGNIFICATIVO ($P>0.05$)

TABLA 22. COMPARACIÓN DE MEDIAS DE TUKEY PARA CALCIO

NIVEL	PROMEDIO ± ERROR ESTANDAR	LIMITE DE CONFIANZA PARA LA MEDIA	
VARIEDAD	1 2371.56 ± 238.14 ab	2438.99	604.11
	2 2624.47 ± 254.92 a	2391.91	2857.02
	3 2017.23 ± 250.66 b	1784.67	2249.78
	4 2554.18 ± 311.53 a	2321.92	2787.03
	Total 2391.33 ± 132.66		
COMPONENTE	1 1600.88 ± 62.87 b	1436.44	1765.33
	2 3182.96 ± 117.38 a	3018.53	3347.42
	Total 239.93 ± 66.58		
TRATAMIENTO	1 2487.91 ± 168.75 a	2223.47	2652.35
	2 2295.95 ± 207.04 a	2131.51	2460.40
	Total 2391.93 ± 133.55		

* Letras diferentes indican diferencia significativa (p<0.05). VARIEDAD: 1 FLOR DE MAYO, 2 GARBANCILLO, 3 LAGUNA Y 4 PINAMERPA. COMPONENTE 1, PARTE AÉREA Y 2 RAIZ. TRATAMIENTO 1, CONTROL Y 2, ESTRÉS.

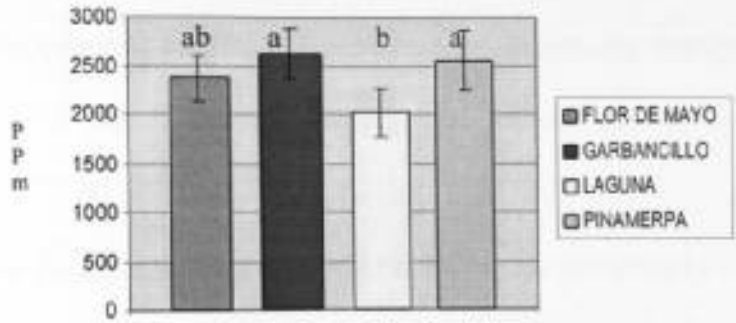

Figura 21a. Contenido de calcio en Variedades de frijol bajo estrés nutrimental.

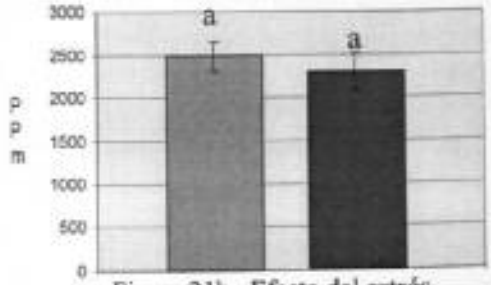

Figura 21b. Efecto del estrés nutrimental en el contenido de calcio en frijol bajo estrés nutrimental

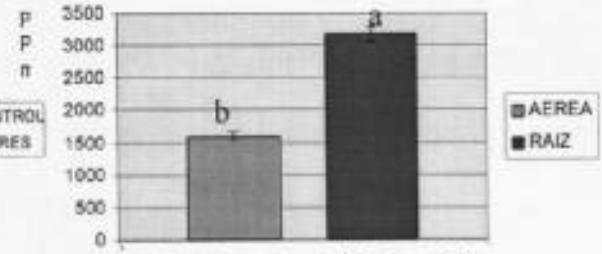

Figura 21c. Contenido de calcio en parte aérea y raiz de frijol bajo estrés nutrimental.

MANGANESO

De acuerdo a los resultados obtenidos (ver tabla 23) existen diferencias altamente significativas ($p<0.01$) entre los componentes y entre los tratamientos, mientras que entre las variedades existen diferencias significativas ($p<0.05$). prueba de Tukey (ver tabla 24) mostró que con el tratamiento de estrés nutrimental hubo una mayor acumulación de este elemento, alcanzando las 2 465.17 ppm. en contraste con las 1 802.76 ppm acumuladas en el control (ver figura 22b). Por otro lado, también se observaron diferencias ($P<0.05$) entre los componentes, siendo mayor la acumulación de manganeso en la raíz con un valor de 3 192.63 ppm, mientras que en el parte aérea se acumularon únicamente 1 075.30 ppm (ver figura 22c)

Respecto a las variedades, en prueba de Tukey se observa la formación de dos grupos, teniéndose en el primero a las variedades Garbancillo y Pinamerpa; y en el grupo dos a las variedades Flor de mayo, Garbancillo y Pinamerpa. Se observaron diferencias significativas entre las variedades Flor de Mayo y Laguna. Siendo la variedad Laguna la que acumula una mayor cantidad de manganeso, al registrar 2 477.42 ppm, mientras que Flor de Mayo con la menor acumulación registra únicamente 1623.80 ppm (ver figura 22a).

TABLA 23. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA MANGANESO

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	PROBABILIDAD
VARIEDAD	469477.0781	3	156492.36	3.407 *	P = 0.02
COMPONENTE	5373657.00	1	5373657.00	111.722**	P < 0.01
TRATAMIENTO	526561.00	1	526561.00	10.945 **	P < 0.01

** VALORES ALTAMENTE SIGNIFICATIVOS ($P < 0.01$) * VALORES SIGNIFICATIVOS ($P < 0.05$) NS = VALOR NO SIGNIFICATIVO ($P > 0.05$)

TABLA 24. PRUEBA DE TUKEY PARA MANGANESO

NIVEL	PROMEDIO ± ERROR ESTANDAR	LIMITE DE CONFIANZA PARA LA MEDIA
VARIEDAD	1 1623.80 ± 324.30 b	1219.45 2028.15
	2 2327.01 ± 462.01 ab	1922.66 2731.36
	3 2477.42 ± 375.15 a	2073.07 2881.77
	4 2107.62 ± 375.087 ab	1703.28 2511.98
	Total 2133.96 ± 193.75	
COMPONENTE	1 1075.30 ± 79.97 b	769.39 1361.22
	2 3192.63 ± 220.97 a	2906.70 3478.54
	Total 2133.97 ± 117.50	
TRATAMIENTO	1 1802.76 ± 189.17 b	1516.84 2088.68
	2 2465.17 ± 274.01 a	2179.25 2751.09
	Total 2133.97 ± 189.17	

* Letras diferentes indican diferencia significativa ($p<0.05$). VARIEDAD: 1 FLOR DE MAYO, 2 GARBANCILLO, 3 LAGUNA Y 4 PINAMERPA. COMPONENTE 1, PARTE AÉREA Y 2 RAIZ. TRATAMIENTO 1, CONTROL Y 2, ESTRÉS.

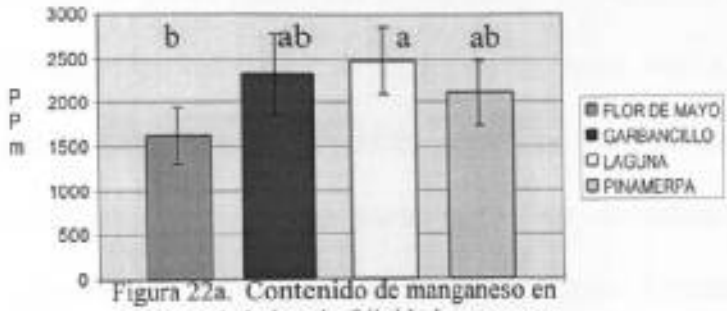

Figura 22a. Contenido de manganeso en cuatro variedades de frijol bajo condiciones de estrés nutrimental.

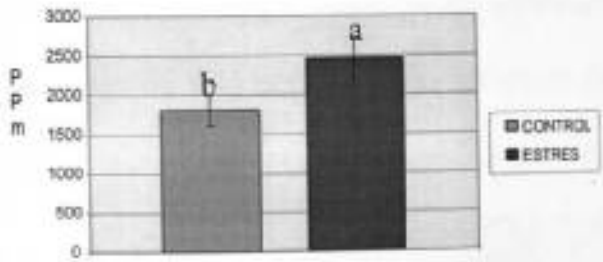

Figura 22b. Efecto del estrés nutrimental en el contenido de manganeso en frijol.

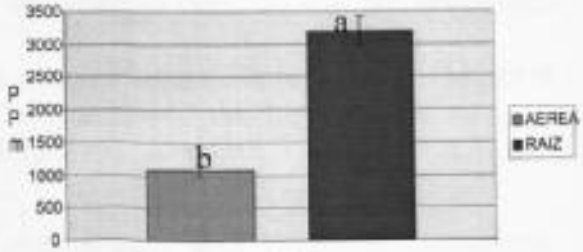

Figura 22c. Contenido de manganeso en parte aérea y raíz de frijol bajo estrés nutrimental.

MOLIBDENO

Los resultados correspondientes a molibdeno mostraron que existen diferencias altamente significativas ($p<0.01$) entre los componentes y entre los tratamientos, pero no se detectó diferencia ($P>0.05$) entre las variedades (ver tabla 25). De acuerdo con la prueba de Tukey, los tratamientos muestran diferencias estadísticamente significativas (ver tabla 26), teniendo que en el control se captaron 13.62 ppm de este elemento, mientras que con el estrés nutrimental se alcanzan 26.43 ppm (ver figura 23b), incrementándose así a casi el 100% la asimilación de este elemento. Por otra parte, dicha prueba mostró también diferencias estadísticas ($P<0.05$) entre los componentes (ver figura 23c), observándose que a nivel de parte aérea se absorbieron 11.91 ppm, mientras que en raíz la captación fue de 28.13 ppm. Finalmente entre las variedades observamos un rango de captación que va desde 15.83 ppm en la variedad Pinamerpa hasta 24.55 ppm en la variedad Garbancillo. Sin embargo, de acuerdo a la comparación múltiple de medias estas diferencias no llegan a ser estadísticamente significativas (ver figura 23a).

TABLA 25. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA MOLIBDENO

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	PROBABILIDAD
VARIEDAD	557.29	3	185.7528	1.526 NS	P = 0.22
COMPONENTE	3158.85	1	3158.8453	25.940 **	P < 0.01
TRATAMIENTO	1971.8442	1	1971.8442	16.196 **	P < 0.01

** VALORES ALTAMENTE SIGNIFICATIVOS ($P < 0.01$) * VALORES SIGNIFICATIVOS ($P < 0.05$) NS = VALOR NO SIGNIFICATIVO ($P > 0.05$)

TABLA 26. PRUEBA DE TUKEY PARA MOLIBDENO

NIVEL	PROMEDIO ± ERROR ESTANDAR	LIMITE DE CONFIANZA PARA LA MEDIA
VARIEDAD	1 21.90 ± 3.22 a	15.46 28.32
	2 24.56 ± 7.80 a	18.13 30.99
	3 17.82 ± 0.86 a	11.40 24.26
	4 15.83 ± 2.45 a	9.40 22.26
	Total 20.03 ± 2.20	
COMPONENTE	1 11.91 ± 1.12 b	7.37 16.46
	2 28.14 ± 3.55 a	23.59 32.69
	Total 20.03 ± 1.86	
TRATAMIENTO	1 13.62 ± 1.26 b	9.07 18.16
	2 26.44 ± 3.79 a	21.89 30.98
	Total 20.02 ± 1.99	

* Letras diferentes indican diferencia significativa (p<0.05). VARIEDAD: 1 FLOR DE MAYO, 2 GARBANCILLO, 3 LAGUNA Y 4 PINAMERPA. COMPONENTE 1, PARTE AÉREA Y 2 RAIZ. TRATAMIENTO 1, CONTROL Y 2, ESTRÉS.

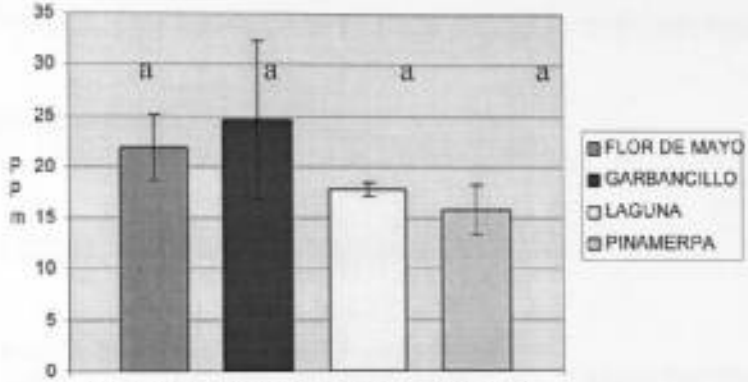

Figura 23a. Contenido de molibdeno en cuatro variedades de frijol bajo condiciones de estrés nutrimental.

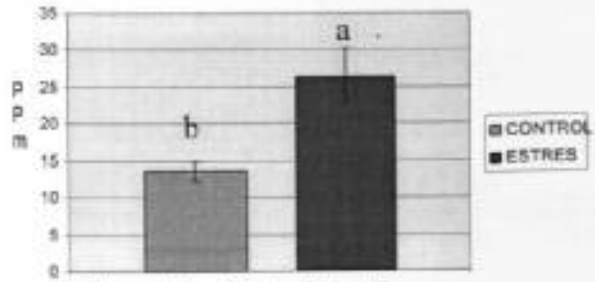

Figura 23b. Efecto del estrés nutrimental en el contenido de molibdeno en frijol.

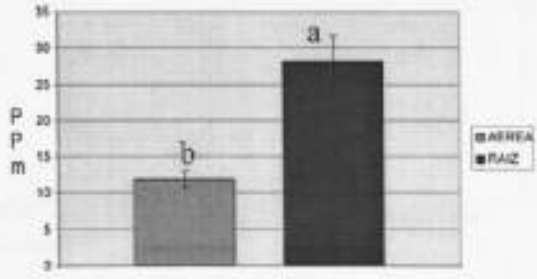

Figura 23c. Contenido de molibdeno en parte aérea y raíz de frijol bajo estrés nutrimental.

FIERRO

El contenido de fierro mostró que para este elemento no existen diferencias significativas (P>0.05) entre las variedades, entre los componentes, ni entre los tratamientos (ver tabla 27). Respecto a las variedades el rango de captación va desde 164.51 ppm en Pinamerpa hasta 114.41 ppm en Laguna, sin embargo, de acuerdo a la comparación múltiple de medias (ver tabla 28), estas diferencias no son estadísticamente significativas (ver figura 24a). Asimismo reveló también que entre los componentes (parte aérea y raíz) no existieron diferencias (P>0.05), (ver figura 24c) ni para tratamientos (ver figura 24b)

TABLA 27. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA FIERRO

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	PROBABILIDAD
VARIEDAD	20650.11	3	6883.37	0.389 NS	P = 0.76
COMPONENTE	3682.17	1	3682.17	0.208 NS	P = 0.65
TRATAMIENTO	13173.48	1	13173.48	0.745 NS	P = 0.40

** VALORES ALTAMENTE SIGNIFICATIVOS (P < 0.01) * VALORES SIGNIFICATIVOS (P < 0.05) NS = VALORES NO SIGNIFICATIVO (P > 0.05).

TABLA 28. COMPARACIÓN DE MEDIAS DE TUKEY PARA FIERRO

ELEMENTO	NIVEL	PROMEDIO ± ERROR ESTANDAR	LIMITE DE CONFIANZA PARA LA MEDIA	
FIERRO	VARIEDAD	1 116.15 ± 48.59 a	40.65	196.65
		2 117.62 ± 13.58 a	40.12	195.12
		3 114.41 ± 11.51 a	38.91	191.91
		4 164.51 ± 61.32 a	87.02	242.01
		Total 128.67 ± 18.97		
	COMPONENTE	1 137.43 ± 36.38 a	82.83	192.23
		2 119.92 ± 9.96 a	85.12	174.72
		Total 128.67 ± 18.76		
	TRATAMIENTO	1 145.24 ± 36.62 a	90.44	200.04
		2 112.11 ± 6.07 a	57.31	166.91
		Total 128.67 ± 18.64		

* Letras diferentes indican diferencia significativa (p<0.05). VARIEDAD: 1 FLOR DE MAYO, 2 GARBANCILLO, 3 LAGUNA Y 4 PINAMERPA. COMPONENTE 1, PARTE AÉREA Y 2 RAÍZ. TRATAMIENTO 1, CONTROL Y 2, ESTRÉS.

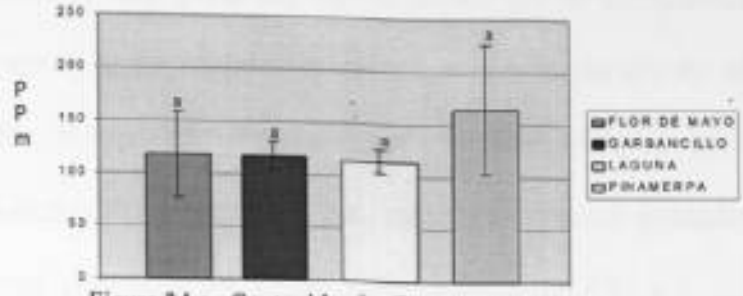

Figura 24 a. Contenido de fierro en cuatro variedades de frijol bajo condiciones de estrés nutrimental.

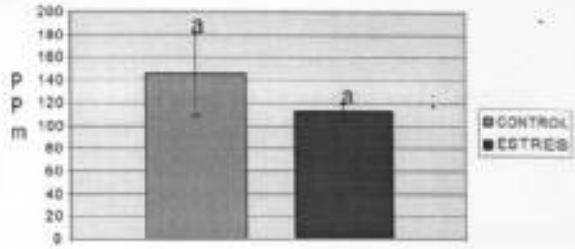

Figura 24b. Efecto del estrés nutrimental en el contenido de fierro en frijol.

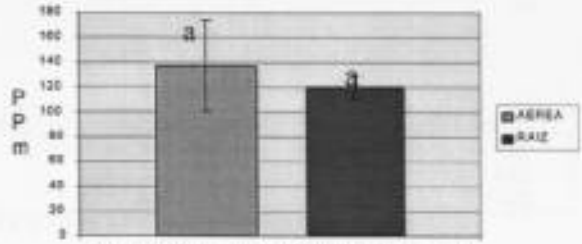

Figura 24c. Contenido de fierro en parte aérea y raíz de frijol bajo estrés nutrimental.

COBRE

Para este elemento el análisis de varianza mostró que existen diferencias altamente significativas ($p<0.01$) entre las variedades y entre los tratamientos, pero no entre los componentes ($P>0.05$) como indica la tabla29.

Con base en los resultados de la comparación múltiple de medias (ver tabla 30), en control se captaron 10.98 ppm, mientras que bajo condiciones de estrés nutrimental se alcanzan 14.35 ppm (ver figura 25b).

Respecto a los componentes, la comparación múltiple de medias no mostró diferencias significativas entre las 12.23 ppm que se acumulan en parte aérea y las 13.11 ppm que se acumulan en raíz (ver figura 25 c).

Finalmente tenemos que para las variedades en la comparación múltiple de medias se observa la formación de dos grupos teniendo en el primero a las variedades Flor de mayo, Pinamerpa y Garbancillo y en el segundo a Pinamerpa, Garbancillo y Laguna. De esta manera se establecen diferencias estadisticamente significativas entre las variedades FM y L cuyos valores de captación de este elemento son 10.12 ppm y 14.49 ppm respectivamente (ver figura 25a).

TABLA 29. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA COBRE

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	PROBABILIDAD
VARIEDAD	126.35	3	42.11526	5.356 *	P = 0.02
COMPONENTE	9.25	1	9.24885	0.737 NS	P = 0.40
TRATAMIENTO	136.32	1	136.21653	10.861 **	P < 0.00

** VALORES ALTAMENTE SIGNIFICATIVOS (P < 0.01) * VALORES SIGNIFICATIVOS (P < 0.05) NS = VALOR NO SIGNIFICATIVO (P > 0.05)

TABLA 30. PRUEBA TUKEY PARA COBRE

NIVEL	PROMEDIO ± ERROR ESTANDAR	LIMITE DE CONFIANZA PARA LA MEDIA	
VARIEDAD	1 10.12 ± 1.37 b	8.05	12.19
	2 13.50 ± 1.18 ab	11.43	15.57
	3 14.49 ± 1.21 a	12.62	16.36
	4 12.66 ± 0.63 ab	10.46	14.51
	Total 12.67 ± 0.56		
COMPONENTE	1 12.23 ± 0.76 a	10.77	13.69
	2 13.11 ± 0.92 a	11.64	14.58
	Total 12.67 ± 0.60		
TRATAMIENTO	1 10.98 ± 0.87 b	9.57	12.44
	2 14.35 ± 0.57 a	12.88	13.81
	Total 12.67 ± 0.56		

* Letras diferentes indican diferencia significativa (p<0.05). VARIEDAD: 1 FLOR DE MAYO, 2 GARBANCILLO, 3 LAGUNA Y 4 PINAMERPA. COMPONENTE 1, PARTE AÉREA Y 2 RAÍZ TRATAMIENTO 1, CONTROL Y 2, ESTRÉS

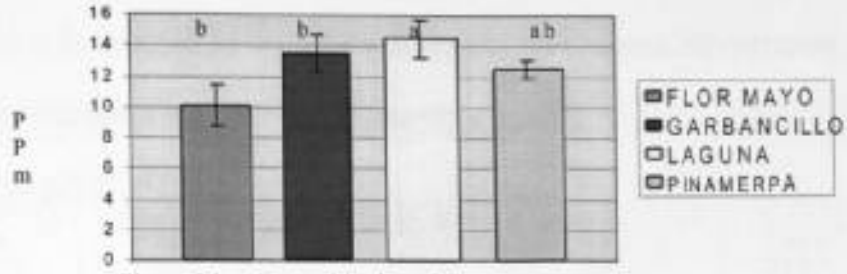

Figura 25a. Contenido de cobre en cuatro variedades de frijol bajo condiciones de estrés nutrimental.

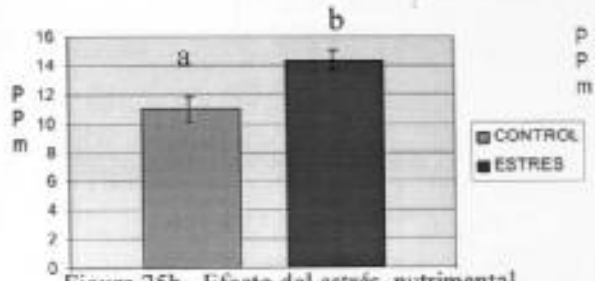

Figura 25b. Efecto del estrés nutrimental en el contenido de cobre en frijol.

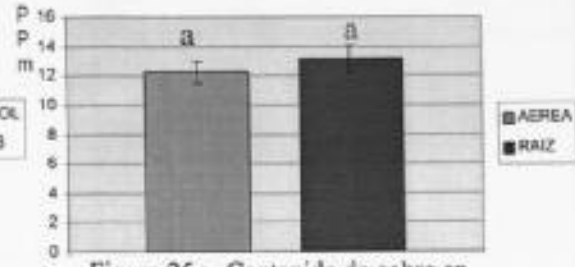

Figura 25c. Contenido de cobre en parte aérea y raíz de frijol bajo estrés nutrimental.

ZINC

Los resultados obtenidos por el ANOVA muestran diferencias altamente significativas ($p<0.01$) entre los componentes y entre los tratamientos, pero no entre las variedades (ver tabla 31). Respecto a los tratamientos, la comparación múltiple de medias (ver tabla 32), mostró diferencias estadísticas significativas entre ellos, mientras que el control captó 103.72 ppm, el estrés estimuló un incrementa a 159.03 ppm (ver figura 26b). Del mismo modo, la concentración múltiple de medias registró diferencias estadísticamente significativas entre los componentes, resultando así que el en parte aérea captan 87.26 ppm, incrementándose la absorción en raíz a 175.49 ppm (ver figura 26 c). Finalmente entre las variedades observamos un rango de captación que va

desde 102.31 ppm en Flor de mayo a 154.22 ppm en Pinamerpa, sin embargo, de acuerdo a la comparación múltiple de medias, estas diferencias no llegan a ser estadísticamente significativas (ver figura 26a).

TABLA 31. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA ZINC

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	PROBABILIDAD
VARIEDAD	16649.13	3	5549.710	1.244 NS	P = 0.30
COMPONENTE	93413.51	1	93413.513	20.945 **	P < 0.01
TRATAMIENTO	36719.76	1	36719.757	8.233 **	P < 0.01

** VALORES ALTAMENTE SIGNIFICATIVOS (P < 0.01) * VALORES SIGNIFICATIVOS (P < 0.05) NS = VALOR NO SIGNIFICATIVO (P > 0.05).

TABLA 32. PRUEBA DE TUKEY PARA ZINC

NIVEL	PROMEDIO ± ERROR ESTANDAR	LIMITE DE CONFIANZA PARA LA MEDIA
VARIEDAD	1 102.31 ± 20.13 a	63.39 141.22
	2 133.69 ± 31.24 a	94.77 172.60
	3 135.28 ± 21.75 a	96.36 174.19
	4 154.22 ± 23.46 a	115.30 193.13
	Total 131.37 ± 12.26	
COMPONENTE	1 87.26 ± 15.37 b	59.74 114.77
	2 175.49 ± 14.13 a	147.97 203.00
	Total 131.37 ± 10.44	
TRATAMIENTO	1 103.72 ± 16.72 b	71.20 131.23
	2 159.03 ± 16.10 a	131.51 186.55
	Total 131.37 ± 11.61	

* Letras diferente indican diferencia significativa (p<0.05). VARIEDAD: 1 FLOR DE MAYO, 2 GARBANCILLO, 3 LAGUNA Y 4 PINAMERPA. COMPONENTE 1, PARTE AÉREA Y 2 RAIZ. TRATAMIENTO 1, CONTROL Y 2, ESTRÉS.

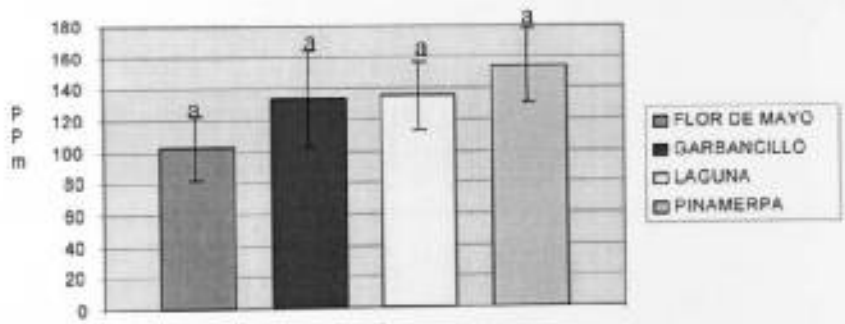

Figura 26a. Contenido de zinc en cuatro variedades de frijol bajo condiciones de estrés nutrimental.

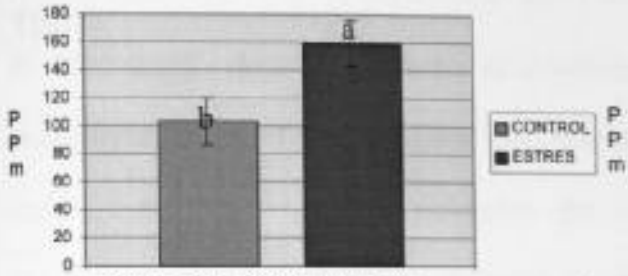

Figura 26b. Efecto del estrés nutrimental en el contenido de zinc en frijol.

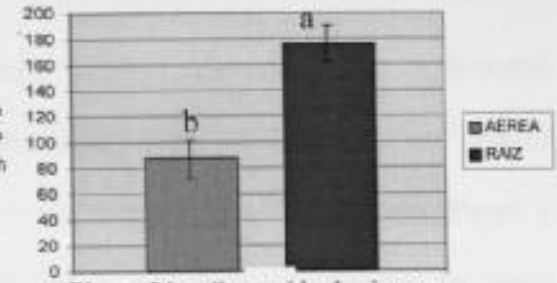

Figura 26c. Contenido de zinc en parte aérea y raíz de frijol bajo estrés nutrimental.

PERFILES DE PROTEINAS (PEI-YING ZHONG 1997 Y HAMES, 1981).

El corrimiento obtenido muestra la presencia de una proteína de 38 kDa como respuesta a los bajos niveles de nutrimentos, que se expresa en mayor concentración en hoja de plántulas de la variedad Laguna, Flor de Mayo y Garbancillo, crecidas bajo condiciones controladas donde el único factor limitante fue la baja concentración de nutrimentos, mientras que en Pinamerpa se observa muy baja concentración de dicho polipéptido (ver figura 27). Aún cuando no hemos localizado en la literatura una investigación que reporte una proteína especifica al estrés nutrimental en frijol, si existen estudios para otras especies y factores adversos como salinidad, sequia y altas temperaturas donde se reporta la presencia de polipéptidos de 15-30, 20, 28 , 25, 26 y 32 kDa, entre ellos podemos mencionar los trabajos de Hurkman y Tanaka, 1987; Singh *et al* ., 1985, Ramagopal, 1986; Ben-Hayyim *et al*., 1989 y Pei-Ying *et al*., 1997.

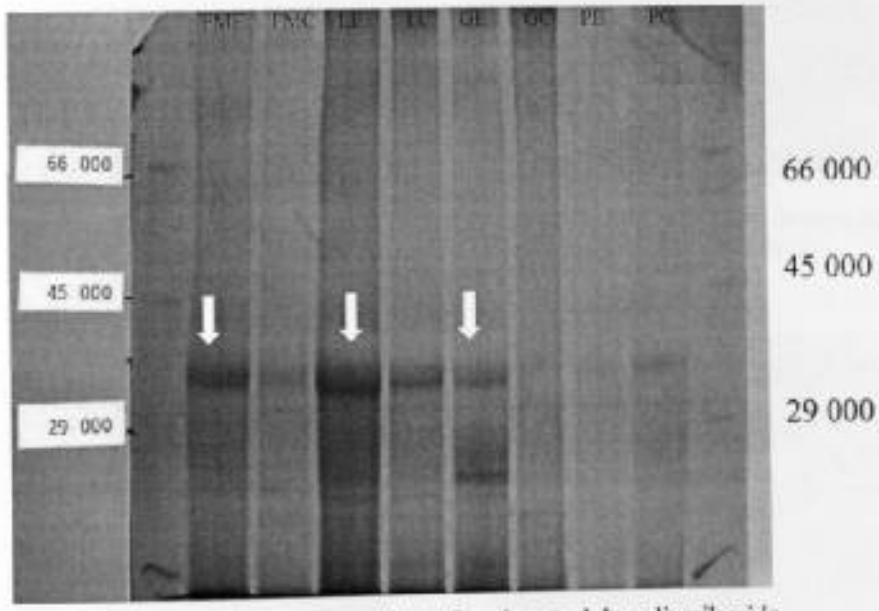

Figura 27. Perfil de proteínas por Electroforesis en gel de poliacrilamida de extractos de hojas de plántula de frijol de 20 días estresada a bajos niveles de nutrimento con su respectivo control.

RESPUESTAS ULTRESTRUCTURALES AL ESTRÉS NUTRIMENTAL

A nivel de cloroplasto se observó en la variedad Laguna una disminución en el numero de gránulos de almidón por efecto del estrés sin perdida de organización en los tilacoides (ver figura 28 a y b), a diferencia del cultivar Pinamerpa (ver figura 29 a y b) en donde conserva los gránulos de almidón y hubo desorganización éstos, pérdida de integridad en las membranas del cloroplasto y como consecuencia deformación del mismo como lo menciona Ristic *et al.*, (1992) por efecto del estrés de altas temperaturas. En este ultimo se cultivar presentó mayor número de mitocondrias. Moreno Limón, (1998) señala la relación del acúmulo de almidón y deformación de organelos con la susceptibilidad a salinidad.

Fig. 28a. Ultraestructura de hoja de frijol variedad Laguna. Control

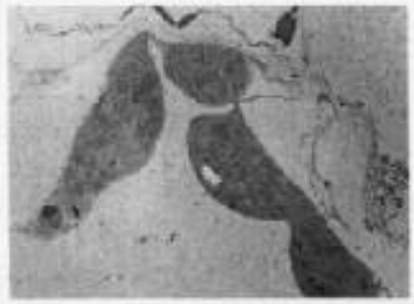

Fig. 28b. Ultraestructura de hoja de frijol variedad Laguna. Estrés

Fig. 29a. Ultraestructura de hoja de frijol variedad Pinamerpa. Control.

Fig. 29b. Ultraestructura de hoja de frijol variedad Pinamerpa. Estrés.

VII. CONCLUSIONES

Existe variabilidad en cuanto a características bioquímicas y anatómicas entre los cultivares estudiados, por lo cual, desde el inicio de la investigación pudimos clasificar a Laguna y Flor de Mayo como potencialmente tolerantes al estrés nutrimental por el acomodo de las microesclereidas y su contenido de nutrimentos (minerales y proteína total). Al evaluar de manera objetiva las bases bioquímicas, comprobamos que el acúmulo de prolina libre por efecto de los bajos niveles de nutrimentos se presentó por igual en las cuatro variedades estudiadas, lo que indica que es una respuesta general de las plántulas de frijol a esta condición, lo cual hace a este cultivo sumamente atractivo para adaptarse a este factor adverso.

En relación con la absorción de minerales, únicamente la variedad Laguna absorbió mayor concentración de Mn y Cu bajo condiciones de estrés, lo cual indica una capacidad de adaptación enorme, porque aún bajo ese ambiente marginal continua eficiente su mecanismo metabólico, lo cual le da ventaja con respecto a los demás cultivares estudiados.

En base a los resultados obtenidos en el perfil de proteínas podemos asumir que el péptido de 38 kDa que se expresa en mayor concentración en Laguna y Flor de Mayo es una respuesta o mecanismo de adaptación al estrés nutrimental, ya que las plantas crecieron bajo condiciones controladas de manera que el único factor limitante fue el mencionado.

A nivel ultraestructural se presentaron los mismos efectos ya reportados en otras investigaciones específicamente en *Phaseolus vulgaris* L. para otros ambientes adversos.

Es importante mencionar que los mecanismos de adaptación caracterizados en esta investigación son una valiosa aportación al estudio de las bases de respuesta de *Phaseolus vulgaris* L. a diferentes factores de estrés ya que no existían reportes enfocados al ambiente marginal de nutrimentos y ésta es una característica de los suelos semiáridos que representan mas del 50 % del territorio Nacional y como ya se mencionó anteriormente también de los suelos sobreexplotados y erosionados.

Al integrar los resultados de cada uno de los parámetros caracterizados a nivel de plántula, podemos sugerir como tolerantes al estrés nutrimental a las variedades Flor de mayo y Laguna en base a los siguientes índices:

- Acomodo de macro y microesclereidas.
- Mayor contenido de proteína total y minerales en semilla.
- Ausencia de síntomas de deficiencia.
- Acúmulo de prolina libre.
- Expresión de una proteína específica de 38 kDa.

Debemos recordar que el cuidado del suelo es esencial para la supervivencia, allí se producen de manera directa e indirecta los alimentos que necesitamos. En muchas partes del mundo el suelo está tan dañado por un manejo abusivo que nunca mas podrá producir, consideramos que estamos aún a tiempo de aplicar el conocimiento científico para un mejor aprovechamiento de los

recursos naturales con una conciencia ecológicamente sensible, lo que implica producir evitando al máximo el uso de agroquímicos que dañan severamente nuestro mundo, retomando ¿porque no? las técnicas tradicionales de siembra pero con el uso de cultivares tolerantes a los factores adversos que prevalecen en nuestra región, preparando la tierra con labores de campo adecuadas y manejo de cultivos; además, llevar el conocimiento a la gente del campo y crear conciencia de la importancia de propiciar y preservar la fertilidad natural del suelo.

VIII. LITERATURA CONSULTADA

AKHAVAN-KHARAZIAN, M., W. F. CAMPBELL, J. JURINAK, AND L. M. DUDLEY.1991, Calcium amielioration of NaCl effects on plant growth, chlorophyll, and ion concentration in *Phascolus vulgaris*. Arid Soil Rcs. And Rehabilitation, 5(1):9-19.

ACOSTA-GALLEGOS, J.A. AND J.W. WHITE. 1995. Phenological plasticity as an adaptation by common bean to drained environments. Crop Sci. 35:199-204.

ACOSTA-GALLEGOS, J.A. AND J.W. WHITE. 1997. Fenología y rendimiento del frijol de temporal en el Altiplano de México. Agricultura Técnica de México, 23:3-14.

AGUIRRE, J.A. AND H. MIRANDA, 1973. Bean production systems. In: Wall, D. Potentials of field beans and other food legumes in Latin America. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cali, Colombia, p. 161-187.

AOAC, 1991. Official Methods of Analysis of the AOAC. 4th Ed. ASSOCIATION OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, Washington, D. C.

BATES, L. 1973. Rapid determination of free proline of water stress studies. Plant Soil. 39:205-207.

BENKO, A. 1986. The content of some aminoacids in young apple shots in relation to frost resistance. Biologic Lo. 11:334-337.

BEN-HAYYIM, G., Y. VADDIA AND B.G. WILLIAMS. 1989. Protein associated with salt adaptation in citrus and cell tomatoes: Involvementr 26 kD

polypeptids. Physiology Plantarum, 77:332.

BERRY, J.A. AND O. BJORKMAN. 1980. Photosynthesis responses and adaptation to temperature in higher plants. Ann. Rev Plant. Physiol. 31:491-543

BHANDAL, I. S AND C. P. MALIK. 1988. Potassium estimation uptake, and its role in the physiology and metabolism of flowering plants. International Review of Citology 110 .205-210.

CLARKSON, D. T. AND J. B. HANSON. 1980. The mineral nutrition of higher plants. Annual Review of Plant Physiology 31:329-298.

CASTRILLO, M. AND FERNÁNDEZ. 1990. Ribulose Bisphosphate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxylase activities, Chlorophyll and protein contents of two maize hybrids under water stress. Maydica 35:67-72

CIAT, 2000, 2001. Bean program Annual. Centro Internacional de Agricultura Tropical Cali (Colombia).

CIAT, 1988. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. Abstracts on Field Beans. 16(1):90.

CLARK, R. B. D. P. COYNE, W. M. ROSS, and B. E. JOHNSON. 1990. Genetic aspects of plant resistance to iron deficiency. Proc. Intl. Congress of Plant Physiology, New Delhi, India, 15-20 Feb. 1988. (1990), 2:1096-1115.[Edited by K. Sinha, P. V. Sane, S.C. Bhargava, and P. K. Agrawual]. New Delhi, India: Society for Plant Physiology and Biochemistry.

CHU, M.T., D. ASPINALL AND G. L. PALEG. 1974. Stress metabolism. VI.- temperature stress and the accumulation of proline in barley and radish. Aust. Jour. Plant. Physiol.,1:87-97.

COOK, R.J. 2000. En: Agricultural Biotechnology and the Poor, Actas de una conferencia internacional, Washington, D.C., 21 a 22 de Octubre de 1999, pp. 123-130 (G.J. Persley y M.M. Lantin, eds). Washington, D.C. Consultative Group on International Agricultural Research.

COUGHLAN, S.J. AND R.G. WINJONES. 1980. Some response on *Spinacea Oleracea* to salt stress. Journal of Experimental Botany, 31:883-893.

CUÉLLAR R., E.I, A. RAMÍREZ A., AND F. IBARRA P. 1999. Preferencias de consumo de frijol en Durango. INIFAP, Durango, Mexico.

DEBOUCK, D. G. 1991. Systematics and morphology. In:Van Schoonhoven A., Voysest O. (eds.), Common beans; research for crop improvement. CAB. Wallingford . Oxon, UK. pp. 55-118.

DE LA ROSA, I.M. 1993. Contribución a la determinación del mecanismo morfofisiológico y bioquímico de resistencia a la salinidad de sorgo "Glossy". Tesis de Maestria., F.C.B., División de Estudios de Postgrado. U.A.N.L., Monterrey, Nuevo León.

DELGADO SALINAS A. 1985. Systematics the genus *Phaseolus* (Leguminosae) in North and Central America. Ph. D. Thesis. University of Texas. Austin.

ERICSON, M.C. AND S.H. ALFINITO. 1987. Proteins produced during salt stress in tobacco cell culture. Plant physiology, 74:506.

FREDERICI, C.T., B. EHDAIE AND J.G. WAINES.1990. Domesticated and wild tepary bean: field performance with and without drought-stress. Jorn. Agron. 82:896-900.

GATES, C.T., W. T. WILLIAMS AND R. D. COURT. ERICSON, M.C. AND S.H. ALFINITO. 1987. Proteins produced during salt stress in tobacco cell culture. Plant physiology, 74:506 stylo. Aust. J. Agric. Res. 22:369-381.

GONZALEZ DE MEJÍA, E. 1995. Reporte de logros obtenidos en el proyecto: Potencial agroalimentario y de conservación de genotipos de frijol tepari en zonas semi-áridas de México. Programa multinacional de alimentos y Biotecnología de alimentos de la organización de los estados americanos.

GONZÁLEZ A. y AYERBE L. 2000. Relación entre fotosíntesis y contenido en clorofilas con el rendimiento en distintos genotipos de cebada sometidos a estrés hídrico terminal. Boletín del Instituto Madrileño de Investigación Agraria y Alimentaria. C.A.M., Centro de Recursos Fitogenéticos-INIA.

GOODWIN, T.W. 1976. Chemistry and biochemistry of plant pigments. Vol. 1 & 2 Academic Press Inc. New York. U.S.A..

GOUNARIS, K., A.R.R. BRAIN, P.J.QUINN AND W.P.WILLIAMS. 1984.

Structural reorganization of chloroplast thylakoid membranes in response to heat stress. Biochim Biophys Acta 766:198-202.

GILLER, K.E., F. AMIJEE, S.J. BRODRICK, S.P. MCGRATH, C. MUSHI, O.T. EDJE, AND J.B. SMITHSON. 1992. Toxic concentrations of iron and manganese in leaves of Phaseolus vulgaris L. growing on freely-drained soils of pH 6.5 in northern Tanzania. *Comunications-in-Soil-Science-and-Plant-Analysis.* 23(15-16):1663-1669.

HAMES, B.D. 1981. An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. In Gel electrophoresis of proteins ed. Hames, B. D. AND Ricwood, D. Washington, DC:IRL Press. pp. 1-91.

HANSON, A.D., C.E. NELSEN, A.R. PETERSEN AND E.H. EVERSON (1979). Capacity for proline accumulation during water stress in barley and its implications for breeding for drought resistance. Crop Science, 19:489-493.

HANSON, A.D. AND W.D. HITZ (1982). Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. Ann. Rev. Plant Physiol., 33:163-182.

HE, Z.L., J. S. LI AND Z.C. TANG. 1993. Stimulative effect of smotic stress on K^+ accumulation in sorghum roots. Acta Phytophysiologica Sinica. 19(4):379-386.

http://www.rlc.fao.org/prior/recnat/default.htm

HUDLER, P. AND K. BURIAN. 1991. Effect of potassium and nitrogen nutrition

on stomatal aperture of *Phaseolus vulgaris*: Der Einfluss von Kalium-und Stickstoffversorgung auf die Spaltoffnungsbewegung von *Phaseolus vulgaris* L. in verschienddenen Tageslangen. Biologia Plantarum, 33(4):311-316.

HURKMAN, W. J. AND C. K. TANAKA. 1987. The effects of salt on the pattern of proteins synthesis in barley roots Plant physiology 83:517

ITULYA, F. M.; C.L. COULSON AND H. A. DSOURZA. 1986 Bean-cowpea CRSP (Collaborative search Support Programme) Progress Report 1985. Nairobi Univ. (Kenya). Dept. Of Crop Science.

KANECHI, M.; UCHIDA, N.; YASUDA, T. AND YAMAGUCHI, T. 1991. Photosynthetic responses of *Coffea arabica* L. to chronic dehydration during leaf development and after leaf maturation in unshaded and shaded conditions. Japanese Journal Tropical Agriculture 35(2):84-91.

KHAIR, M.A.M. 1986. Possible mechanisms for intraspecific variation in salt Tolerance in sorghum (*Sorghum bicolor*L. Moench) Dissertation Abstracts International, B. Sciences and Engineering. 46(10):3314.

KORNEGAY, J., J.W. WHITE, J.R. DOMINGUEZ, G. TEJADA AND C. CAJIAO. 1993 Inheritance of photoperiod response in Andean and Mesoamerican common bean. Crop Sci. 33:977-984. 1993. Inheritance of photoperiod response in Andean and Mesoamerican common bean. Crop Sci. 33.977-984.

KUHLEMEIR, C., P.J. GREEN AND N.H. CHUA. 1987. Regulation of Gene Expression in Higher Plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 38:221-257.

LYNCH, J., E. EPSTEIN, A. LAUCHLI, AND G. I. WEIGT. 1990. An automated greenhouse sand culture system suitable or studies of P nutrition. Plant, Cell and Environ., 13(6):547-554.

MAITI, R., 1997. Bean Science. First Edition. Science Publishers. USA. pp 15.

MAITI R.K., A. NÚÑEZ GONZÁLEZ, P. WESCHE EBELING, S. MORENO LIMÓN, M. L. CÁRDENAS ÁVILA, J.L. HERNÁNDEZ PIÑERO, J. AND VERDE STAR. 2000. Proline and protein profile as indicators of resistance to *biotic and abiotic stresses in bean (Phaseolus vulgaris* L.). Legume Research. En Prensa.

MORENO, S.L., RK MAITI, J.L. HERNÁNDEZ Y A. GONZÁLEZ NÚÑEZ. 1996. Morfología, ultraestructura y contenido de minerales en semilla y desarrollo de plántula de 5 especies silvestres una semicultivada y una cultivada de frijol (*Phaseolus* spp.). Phyton Int. J.Exp. Botany, Argentina. 55: 9-22

MORENO LIMÓN SERGIO . 1998. Respuestas morfofisiológicas, bioquímicas y ultraestructurales en frijol (*Phaseolus vulgaris* L). al estrés de salinidad, altas temperaturas y sequía. Tesis Doctoral, F.C.B., División es Estudios de Postgrado. U A N.L.,Monterrey, Nuevo León.

MUKHOPADHYAY, M. J. , AND A. SHARMA. 1991. Manganese in cell

PEÑA-RAMOS, A. Y A. MUNOZ OROZCO. 1986. Respuesta de tres especies cultivadas a condiciones deficientes de humedad edáfica. Agrociencia. 74:231-243.

PEI-YING ZHONG, TETSUTARO TANAKA, DAISUKE YAMAUCHI, AND TAKAO MINAMIKAWA. 1997. A 28-kilodalton Pod Storage Protein of French Bean Plants. Plant physiology, 112:479-485.

PENNINGTON, J.A.T. AND B. YOUNG. 1990a. Sodium, potassium, calcium, phosphorus, and magnesium in foods from the United States total diet study. Jour. of Food Comp. and Anal. 3: 145-165.

PENNINGTON, J.A.T. AND B. YOUNG. 1990b. Iron, zinc, copper, manganese, selenium, and iodine in foods from the United States total diet study. Jour. of Food Comp. And Anal. 3: 166-184.

PEREZ VICENTE, R., M. PINEDA, AND J. CARDENAS. 1988. Isolation and characterization of xanthine dehydrogenase from Chlamydomonas reinhardtii. Physiologia Plantarum 72:101-107.

PINSTRUP-ANDERSON, P. Y R. PANDYA-LORCH, 2000. Meeting food needs in the 21st century: how many and who will be at risk? presentado en la Reunión Anual de la AAAS, Febrero 2000.

Washington, D.C., EE.UU.

PINSTRUP-ANDERSON, P. Y R. PANDYA-LORCH 1999. World food prospects: critical issues for the early 21st Century. International Food Policy Research Institute, Washington, D.C., EE.UU.

POPA, G. AND DINCA. 1985. Bean cultivar Aversa. Soiul de farsole pentru boabe Aversa. Analele institutuili de cercetari pentru cereali si plante technice. 52:87-98.

QUAIL, P.H. 1991. Phytochrome: A Light-Activated Molecular Switch that Regulates Plant Gene Expression. Ann. Rev Genet. 25:389-409.

RAMAGOPAL, S. 1986. Protein synthesis in maize callus exposed to NaCl and manitol. Plant Cell Rep 5:430.

RANI, M. 1988. Influence of salinity on metabolic status of proteins and amino acid during germination and early seedling stages of rice. Ph. D. Thesis submitted to Banaras Hindu University, India, pp 180-199.

RISTIC, Z. AND D.D. CASS. 1992. Chloroplast structure after water and high temperature stress in two lines of maize that differ in endogenous levels of abscisic acid. International Journal of Plant Science. 153(2):186-196.

ROBINSON, D. 1987. Food – biochemistry and nutritional value. Longman

Scientific and Technical Press. Essex, UK. 258-283.

ROTH, R., L.M. HALL, T.P. BRUTNELL AND J.A. LANGDALE. 1996. Bundle sheath defective a mutation that disrupts the coordinated development of bundle sheath and mesophyll cell in maize leaf. Plant Cell. 8(5).915-927.

SALISBURY, FRANK B.; ROSS, CLEON W. 1994. Fisiología Vegetal. Grupo Editorial Iberoamérica, S.A de C.V México, D.F. pp 143-147.

SERGER, H. AND W. SCHMIDT. 1986. Diversity of Photoreceptors. En: R.E. Kendrick and G.H.M. Kronenberg (eds.). Photomorphogenesis in Plants. Martinus Nijhoff Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, The Netherlands P. 137-158.

SINGH, N.K., C.A. BRAKER, P.M. HASEGAWA, A.K. HANDA, S. BUCKEL, M.A. HERMODSON, E. PFACKOCH, F.E. REGNIER AND R.A. BRESSAN. 1987. Characterization of osmotin, a thoumatin-like protein associated with osmotic Adaptation in plant cells. Plant Physiology 85:529.

SHING, N.K., A.K. HANDA, P. M. HASEGAWA AND R.A. BRESSAN. 1985. Proteins associated with adaptation of cultured tobacco cells to NaCl. Plant Physiology 79:126.

SMITH, H. 1982. Light Quality, Photoreception and Plant Strategr. Ann. Rev. Plant Physiol. 33:481-516.

SANDMAN, G. AND G. BOGUER. 1983. The enzymological function of heavy

metals and their role in electron transfer processes of plants. 563-596.

STEWART, C. R. and J. A. Lee. 1974. The role of proline accumulation in halophytes.Plant Cell. 120:279-289.

TEIXEIRA, SONIA MILAGROS. 1990. Bean production in Brazil. Mich. Dry Bean Digest 14(4):2-9.

TERÁN, S.G., RK MAITI AND HERNÁNDEZ PIÑERO, JL. (1994). Seed ultrastructure of six horticultural species in relation to their germination capacity. Phyton Int. J. Exp. Botany, Argentina. 55: 123-128.

THOMPSON, W.F. AND M.J. WHITE. 1991. Physiological and Molecular Studies of Light-Regulated Nuclear Genes in Higher Plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42:423-466.

TREICHEL, 1975. The effect of NaCl on the concentration of proline in different halophytes. Z. Pflanzenphysiol 76:56-68

TRETYAKOV, N.N., E.I. KOSHKIN AND S.M. NESTEROVA. 1985. The mesostructural organization of leaves of two maize ecotypes under Moisture deficit. Izvestiya Timiryazevskoi Sel skokhozyaistve nnoi Akademii 6:94-101.

UNICEF. (1998). The state of the world's children 1998: focus on nutrition. Naciones Unidas:Nueva York, EE.UU, Oxford University Press.

UREN, N. C. 1981. Chemical reduction of an insoluble higher oxide of manganese by plant roots. Journal of Plant Nutriti 4:65-71.

VALENCIA J.,A.; RIAÑO H. AND SOTO A., J. D. 1997. Actividad de la ribulosa 1,5-difosfato carboxilasa y contenidos de clorofila y proteína foliar soluble en seis genotipos de Coffea sp. Cenicafé 48(1):5-11.

VALLE, B. L. 1976. Zinc biochemistry: A perspective. Trends in Biochemical Sciences 1:88-92.

VAN HERPEN, T.C. 1984. Commercialization of legumes in Medellin.

VASQUEZ-TELLO, A,; Y. ZUILY-FODIL; A.T. PHAM THI AND J. B. VIEIRA DA SILVA. 1990. Electrolyte and P leakages and soluble sugar content as physiological testa for screening resistance to water stress in *Phaseolus* and *Vigna* species. J. Exp. Botany. 41:827-832.

VERDAGUER D., I. FLEC, ARANDA X., PUIGDERRAJOLS P., FIGUERAS M., ROCHA O. Y MOLINAS M. 1999. Expresión de una proteína de choque de calor de bajo peso molecular en *Quercus ilex* en condiciones de campo. Memorias de XIII Reunión Nacional De La Sociedad Española De FisiologíaVegetal VI congreso hispano-luso de fisiología vegetal.

VLAD, D, AND Dd. Pretorian. 1986. The behaviour of the main grain haricot varieties and of some perspective lines in the Bumas Plain. Comportarea principalelor soiuri de fasole pentru boabe i a unor linii de perspectiva in cimpia Bumasului. Productia-vegetala.- Cereale-si-plante-echnice. 3;43-50.

WALKER-SIMMONS, M., D. A. KUDRNA, AND R. L. WARNER. 1989. Reduced accumulation of ABA during water stress in a molybdenum

cofactor mutant of barley. Plant Physiology 90:728-733.

WHITE, J.W. AND J. IZQUIERDO. 1991. Physiology of yield potential and stress tolerance. pp. 287-382. In A. van Schoonhoven and O. Voysest (eds.). Common beans: research for crop improvement. C.A.B. International, Wallingford, UK.

WHITE, J.W. AND S.P. SINGH. 1991. Breeding for adaptation to drought. In A. van Schoonhoven and O. Voysest (eds.). Common beans: research for crop improvement. C A.B. International, Wallingford, UK. p. 501-560.

YONTS, C. D.; D. S. NULAND AND L. A. NELSON. 1985. Dry bean response to water stress. 14p.(Agris 1986-1988) (87-072079).

ZAR, J. H. 1996. Biostatistical Analisis. Tercera edición, Prentice Hall Inc. N.Y. 718

ZUÑIGA, G. E. V. H. ARGANDONA AND L. J. CORCUERA, 1989. Distribution of glycine, betaine and proline in water stress and un stress barley leaves. Phytochemistry. 28(2).419-420.

Grados y Carreras:

1.- Licenciatura en QUIMICO BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO, QUIMICA (QUIMICA ANALITICA), "DETERMINACION INDIRECTA DE FOSFORO POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA", Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, México, 09/1989

2.- Maestría en MAESTRIA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BOTANICA, BIOLOGIA (BOTANICA), "RESPUESTA EN LA ASIMILACION DIFERENCIAL DE MINERALES DE LINEAS DE SORGO GLOSSY Y NO GLOSSY", Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, México, 07/1995

Artículos publicados y/o aprobados:

1.- S.L. MORENO,, RK MAITI, J.L. HERNANDEZ, A. GONZALEZ NUÑEZ, "MORFOLOGIA, ULTRAESTRUCTURA Y CONTENIDO DE MINERALES EN SEMILLA Y DESARROLLO DE PLATULA DE 5 ESPECIES SILVESTRES UNA SEMICULTIVADA Y UNA CULTIVADA DE FRIJOL (PHASEOLUS SPPP)", publicado en OYTON. INTERNATIONAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY, vol. 55, pág. 9 a 22, Argentina, 1996
Objetivo: Investigación
Documento: Sobretiro

Artículo: MAITI RK, ALMANZA JG. HERNANDEZ PIÑERO JL TERAN GE, "SEED COAR ULTRAESTRUCTURE AND A METHOD FOR INDUCING RAPID GERMINATION OF THE WILD CHILI "CHILE PIQUIN"", en JOURNAL PHYTON - INTERNATIONAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY, Pág. 73 a 78, Argentina, 1996

2.- RK MAITI, A. NUÑEZ GONZALEZ, E. S. GONZALEZ AND G. GARCIA DIAZ, "VARIABILITY IN UPTAKE OF MINERALS OS 21 GLOSSY SORGHUM GENOTYPES UNDER SEEDLING STRESS", publicado en INTERNATIONAL SORGHUM AND MILLETS NEWSLETTER, vol. 35, pág. 116 a 116, Estados Unidos, 1994
Objetivo: Investigación
Documento: Fotocopia

3.- RK MAITI, ADRIANA NUÑEZ GONZALEZ, ELVIRA SALDIVAR GONZALEZ, SERGIO MORENO LIMON Y GRACIELA GARCIA DIAZ, "VARIABILIDAD EN LA CAPTACION DE METALES DE 21 GENOTIPOS DE SORGO GLOSSY BAJO CONDICIONES DE SEQUIA EN ETAPA DE PLANTULA", publicado en UNIVERSIDAD Y CIENCIA, vol. 10, pág. 13 a 17, México, 1993
Objetivo: Difusión
Documento: Sobretiro

4.- ADRIANA NUÑEZ GONZALEZ, R.K. MAITI, JULIA VERDE SATR, MARIA LUISA CARDENAS AVILA, RAHIM FOROUGHBACKCH, J.L. HERNANDEZ PIÑERO, MORENO LIMON SERGIO .G. GARCIA DIAZ, "VARIABILITY IN MINERAL PROFILE IN SEVEN VARIETIES OF BEAN (PHASEOLUS VULGARIS L.)) ADAPTED IN NORTH EAST OF MEXICO", aprobado por LEGUME RESEARCH , India, 2000
Objetivo: Investigación
Documentos: Carta de aceptación y Manuscrito

5.- R. K. MAITI, MARIA LUISA CARDENAS AVILA. JULIA VERDE STAR, J. L. HERNANDEZ PIÑERO ,MA ADRIANA NUÑEZ GONZALEZ, "TISSUE CULTURE AND ITS APPLICATION IN CROP IMPORVMENT PROGRAMME IN PHASEOLUS BEAN", aprobado por REVIEWS RESEARCH, India, 2000
Objetivo: Investigación
Documentos: Carta de aceptación y Manuscrito

6.- CARDENAS AVILA ML., MJ VERDE SATR, RK MAITI, RAHIM FOROUGHBHAKCH, H. GAMEZ GONZALEZ, SJ MARTINEZ LOZANO, M A NUÑEZ GONZALEZ, J. L. HERNANDEZ PIÑERO, "VARIABILITY IN CALLUS INDUCTION IN VITRO OF FOUR VARIETIES OF PHASEOLUS VULGARIS L.", aprobado por OYTON. INTERNATIONAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY, Argentina, 2000
Objetivo: Investigación
Documentos: Carta de aceptación y Manuscrito

7.- ROQUE G. RAMIREZ LOZANO, GLAFIRO F. ALANIS GOMEZ, MA. ADRIANA NÚÑEZ GONZALEZ., "DINAMICA ESTACIONAL DE LA DIGESTION RUMINAL DE LA MATERIA SECA DEL NOPAL", publicado en CIENCIA UANL, vol. III, NO. 3. JUL-SEP, pág. 267 a 273, México, 2000
Objetivo: Investigación
Documento: Sobretiro

8.- R. G. RAMIREZ, G. F. W. HAENLEIN, M A NUÑEZ GONZALEZ, "SEASONAL VARIATION OF MACRO AND TRACE MINERAL CONTENTS IN 14 BROWSE SPECIES THAT GROW IN NORTHEASTERN MEXICO", publicado en SMALL RUMINANT RESEARCH, vol. 1997 (2000), pág. 1 a 7, Países Bajos (Holanda), 2000
Objetivo: Investigación
Documento: Fotocopia

9.- S. MORENO LIMON, RK MAITI, ADRIANA NUÑEZ GONZALEZ, F. FOROUGHBACKCH, JULIA VERDE SATR, HILDA GAMEZ GONZALEZ, GRACIELA GARCIA DIAZ, "DIFFERENTIAL RESPONSES OF TWO BEAN CULTIVARS (PHASEOLUS VULGARIS L.) RESISTANT AND SUSCEPTIBLES TO WATER STRESS IN SEEDLING GROWTH AND MINERAL UPTAKE", publicado en RESEARCH ON CROPS, vol. 1, APRIL , pág. 20 a 24, India, 2000
Objetivo: Investigación
Documento: Fotocopia

10.- S. MORENO LIMON, R.K. MAITI, ADRIANA NUÑEZ GONZALEZ, JULIA VERDE STAR, HILDA GAMEZ GONZALEZ, "BIOCHEMICAL MECHANISM IN BEAN CULTIVARS (PHASEOLUS VULGARIS L.) FOR RESISTANCE TO SALINITY STRESS AT THE GERMINATION STAGE", publicado en RESEARCH ON CROPS, vol. 1, APRIL, pág. 25 a 33, India, 2000
Objetivo: Investigación
Documento: Fotocopia

11.- S. MORENO LIMON, R.K. MAITI, ADRIANA NUÑEZ, JULIA VERDE STAR, RAHIM FOROUGHBAHCH AND HILGA GAMEZ GONZALEZ, "GENOTYPIC VARIABILITY IN BEAN CULTIVARS (PHASEOLUS VULGARIS L.) FOR RESISTANCE TO SALINITY AT THE SEEDLING STAGE", publicado en INDIAN AGRICULTURIST, vol. 44, O. 1 Y 2, pág. 1 a 12, India, 2000
Objetivo: Investigación
Documento: Sobretiro

12.- S. MORENO LIMON, RK MAITI, ADRIANA NUÑEZ GONZALEZ, JULIA VERDE STAR, FAHIM FOROUGHBAKHCH, "DIFFERENTIAL RESPONSES OF BEAN CULTIVARS (PHASEOLUS VULGARIS L.) TO CONTRASTING TEMPERATURES IN MINERAL ACQUISITION AND OTHER PHYSIOLOGICAL TRAITS", aprobado por CROP RESEARCH JOURNAL, India, 2000
Objetivo: Investigación
Documentos: Carta de aceptación y Manuscrito

13.- NUÑEZ GONZALEZ A., HEREDIA ROJAS N. L., MAITI R. K., VERDE STAR J., MORENO LIMON S. ALVAREZ OJEDA M. G., CARDENAS AVILA M. L., HERNANDES PIÑERO J. L., "COMPARISON OF THE PROTEIN PROFILES OF FOUR BEAN CULTIVARS (PHASEOLUS VULGARIS L.) SUBJECTED TO LOW NUTRIENT LEVEL: A PRELIMINARY STUDY", aprobado por LEGUME RESEARCH, India, 2000
Objetivo: Investigación
Documentos: Carta de aceptación y Manuscrito

14.- R.K. MAITI, ADRIANA NUÑEZ GONZALEZ, PEDRO WESCHE EBELING, S. L. MORENO LIMON, MARIA LUISA CARDENAS AVILA, J.L. HERNANDEZ PINERO, J. VERDE- STAR, "PROLINE AND PROTEIN PROFILE AS INDICATORS OF RESISTANCE TO BIOTIC AND ABIOTIC STRESSES IN BEAN (PHASEOLUS VULGARIS L.).", aprobado por LEGUME RESEARCH, India, 2000
Objetivo: Investigación
Documentos: Carta de aceptación y Manuscrito

15.- R.K. MAITI, ADRIANA NUÑEZ GONZALEZ, PEDRO WESCHE EBELING, S. L. MORENO LIMON J.L. HERNANDEZ PIÑERO, S. L. MORENO LIMON, "SOME RECENT CONTRIBUTIONS IN SEED STRUCTURE AND CHEMICAL COMPOSITION OF BEAN (PHASEOLUS VULGARIS L.).", enviado a LEGUME RESEARCH, India, 2000
Objetivo: Investigación
Documentos: Carta de recepción y Manuscrito

Capítulos de libros:

1.- A. BENAVIDES MENDOZA, R. K. MAITI, P. WESCHE EBELING, A. NUÑEZ GONZALEZ Y SALOMON MARTINEZ LOZANO, "BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION", en "ADVANCES IN CHICKPEA SCIENCE", publicado por SCIENCE PUBLISHERS INC., edición: 1, tiraje: 500 ejemplares, pág. 135 a 169, Estados Unidos, 2000
Objetivo Investigación, Documento: Otro

2.- RK MAITI Y A.NUÑEZ GONZALEZ, "PLANTAS TOXICAS", en "PLANTAS NATIVAS DE IMPORTANCIA ECONOMICA DE LAS ZONAS SEMIARIDAS MEXICANAS", publicado por CIENCIAS AGROPECUARIAS, edición: 1, tiraje: ejemplares, pág. 15 a 19, México, 1996
Objetivo Difusión, Documento: Fotocopia

Artículos in Extenso:

1.- ADA MARCELA ITA GARAY, MARIA ADRIANA NUÑEZ GONZALEZ, MAITI RATIKANTA Y JORGE L. HERNANDEZ PIÑERO, "PHASEOLUS VULGARIS L. VAR PINTO AMERICANO INDICATOR OF SITES CONTAMINATED WITH LEAD AND CADMIUM", en INTERTATIONAL SIMPOSIUM ON ENVIROMENTAL ENGINEERING AND HEALTH SCIENCES: A JOINT EFFORT FOR THE XXI CENTURY, ed. WATER RESOURCES PUBLICATIONS, LLC., pág. 425 a 433, México, 2000
Objetivo: Dilusión, Documento: Fotocopia

2.- ADRIANA NUÑEZ, R. K. MAITI, J. L. HERNANDEZ PIÑERO, ADA ITA GARAY MA LUISA CARDENAS , "SCANING ELECTRON MICROSCOPY OF PHASEOLUS BEAN AND ITS POSSIBLE RELATION TO FOOD QUALITY", en ELECTRON MICROSCOPY 1998, ed BIOLOGICAL SCIENCE, pág. 175 a 176, Mexico,
Objetivo: Investigación, Documento: Fotocopia

Tesis dirigidas:

1.- Licenciatura, ELVIRA SALDIVAR GONZALEZ , MARIA ADRIANA NUÑEZ GONZALEZ , CATALINA RIVAS MORALES Y GRACIELA GARCIA DIAZ, "EVALUACION Y SELECCION DE GENOTIPOS DE SORGO CLOSSY ALTAMENTE EFICIENTES EN CAPTACION DE METALES, BAJO CONDICIONES DE SEQUIA", Universidad Autonoma de Nuevo León- Facultad de Ciencias Biológicas, en México
Concluida: Si, obtención en 12/1991

2.- Licenciatura, MARICELA LUMBRERAS SUSTAITA, MARIA ADRIANA NUÑEZ GONZALEZ, GRACIELA GARCIA DIAZ Y JUAN ANTONIO RODRIGUEZ ARZAVE , "DETERMINACION DE CADMIO EN CIGARRILLOS MEXICANOS", Universidad Autónoma de Nuevo León- Facultad de Ciencias Biológicas, en México
Concluida: Si, obtención en 03/1994

3.- Licenciatura, JAIME EDGARDO RODRIGUEZ LOZANO , ROQUE RAMIREZ LOZANO, MARIA ADRIANA NUÑEZ GONZALEZ, JUAN JOSE ZARATE RAMOS Y JORGE RAMSEY KAWAS, "DINAMICA ESTACIONAL DEL CONTENIDO DE MINERALES EN EL FORRAJE DE DOCE ZACATES Y ONCE HIRBAS NATIVAS PALATABLES DEL ESTADO DE NUEVO LEON", Universidad Autónoma de Nuevo León- Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, en Mexico
Concluida: Si, obtención en 07/1995

4.- Licenciatura, CARLOS GUMARO GARCIA CASTILLO, ROQUE GONZALO RAMIREZ LOZANO, MARIA ADRIANA NUÑEZ GONZALEZ, RAFAEL RAMIREZ ROMERO Y JORGE A MARTINEZ SALAZAR, "COMPOSICION QUIMICA, PERFIL MINERAL, CONCENTRACION DE ACIDOS GRASOS VOLATILES Y DEGRADABILIDAD RUMINAL DE LA MATERIA SECA Y DE LA PROTEINA CRUDA DEL FORRAJE DE 9 ZACATES DEL ESTADO DE NL COLECTADOS DURANTE EL INVIERNO", Universidad Autónoma de Nuevo León- Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, en México
Concluida: Si, obtención en 07/1995

5.- Licenciatura, SANJUANA CANTU GONZALEZ, SALOMON MARTINEZ LOZANO, MARIA ADRIANA NUÑEZ GONZALEZ, RATIKANTA MAITI Y GRACIELA GARCIA DIAZ, "EVALUACION Y SELECCION DE GENOTIPOS DE SORGO GLOSSY ALTAMENTE EFIECIENTES EN CAPTACION DE METALES, BAJO CONDICIONES DE SEQUIA", Universidad Autónoma de Nuevo León- Facultad de Ciencias Biológicas, en México
Concluida: Si, obtención en 12/1991

6.- Licenciatura, MARIA MARGARITAGAYTAN MIRANDA, GRACIELA GARCIA DIAZ, MARIA ADRIANA NUÑEZ GONZALEZ Y JOSE GARZA CHAVEZ, "EVALUACION DE LOS PARAMETROS FISICOQUIMICOS E3N LAS AGUAS DE RIO PESQUERIA", Universidad Autónoma de Nuevo León- Facultad de Ciencias Biológicas, en México
Concluida: Si, obtención en 07/1993

7.- Licenciatura, ADA MARCELA ITA GARAY, RATIKANTA MAITI, MARIA ADRIANA NUÑEZ GONZALEZ E HILDA GAMEZ GONZALEZ, "PHASEOLUS VULGARIS L. VARIEDAD PINTO AMERICANO COMO REMEDIADOR BIOLOGICO DE SITIOS CONTAMINADOS CON PLOMO Y CADMIO", Universidad Autónoma de Nuevo León- Facultad de Ciencias Biológicas, en México
Concluida: Si, obtención en 12/1998

8.- Licenciatura, YANETH GAONA GUZMAN, MA GUADALUPE ALANIZ GUZMAN, MARIA ADRIANA NUÑEZ GONZALEZ Y LYLIA MIRANDA VELAZQUEZ, "VALOR NUTRICIO DE3 SUBPRODUCTOS DE FERMENTACION DRE PLEUROTUS OSTREARUS A BASE DE PAJA DE TRIGO PARA USO EN ALIMENTACION DE RUMIANTES", Universidad Autónoma de Nuevo León- Facultad de Ciencias Biológicas, en México
Concluida: Si, obtención en 01/1999

9.- Licenciatura, ERNESTO GRAJALES BLASCO, JUAN NTONIO RODRIGUEZ ARZAVE, MARIA ADRIANA NUÑEZ GONZALEZ, LYLIA MIRANDA VELAZQUEZ, "DESARROLLO DE MICROMETODOS PARA LA DETERMINACION DE AMINOACIDOS", Universidad Autónoma de Nuevo León- Facultad de Ciencias Biológicas, en México
Concluida: Si, obtención en 06/1999

10.- Licenciatura, GERARDO REYES SANCHEZ, SALOMON MARTINEZ LOZANO, MARIA ADRIANA NUÑEZ GONZALEZ E HILDA GAMEZ GONZALEZ, "PERFIL DE MINERALES DE 3 ESPECIES DE ALGAS MARINA Y SU COMPARACION CON EL PRODUCTO COMERCIAL ALGAENZIMS", Universidad Autónoma de Nuevo León- Facultad de Ciencias Biológicas, en México
Concluida: Si, obtención en 12/1999

11.- Licenciatura, SATURNINO CARVAJAL HERRERA, SALOMON MARTINEZ LOZANO, MARIA ADRIANA NUÑEZ GONZALEZ, I Y GRACIELA GARCIA DIAZ, "EFECTO DEL PRODUCTO COMERCIAL ALGAENZIMS SOBRE EL CRECIMIENTO Y SESARROLLO DE DOS VARIEDADES DE MAIZ ZEA MAYS L. EN ETAPA TEMPRANA", Universidad Autónoma de Nuevo León- Facultad de Ciencias Biológicas, en México
Concluida: Si, obtención en 12/1999

12.- Licenciatura, BEATRIZ PADRON MARQUEZ, AZUCENA ORANDAY CARDENAS, MARIA ADRIANA NUÑEZ GONZALEZ, CATALINA RIVAS MORALES, MARIA JULIA VERDE SATAR, "AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE COMPUESTO DE MELIA AZEDRACH, SYZYGIUM AROMATICUM Y CINAMONUN ZEYLANICUM CON EFECTO INHIBITORIO SOBRE BACTERIAS Y HONGOS", Universidad Autónoma de Nuevo León- Facultad de Ciencias Biológicas, en México
Concluida: Si, obtención en 12/1999

13.- Licenciatura, BLANCA ALICIA EGUIA QUINTANILLA, SALOMON MARTINEZ LOZANO, MARIA ADRIANA NUÑEZ GONZALEZ, I Y GRACIELA GARCIA DIAZ. "EFECTO DEL PRODUCTO COMERCIAL ALGAENZIMS SOBRE EL CRECIMIENTO DE DOS VARIEDADES DE SORGHUM VULGARE L. EN ETAPA TEMPRANA", Universidad Autónoma de Nuevo León- Facultad de Ciencias Biológicas, en México
Concluida: Si, obtención en 07/2000

14.- Licenciatura, FERNANDO ARCIVAR GONZALEZ; LETICIA HAVAD MARROQUIN, BALTAZAR CUEVAS HERNANDEZ, RAHIM FOROUGHBAKHCH P. Y MARIA ADRIANA NUÑEZ GONZALEZ, "OPTIMIZACIO DE MEZCLAS DE BIOSOLIDOS EN ENSAYO DE GERMINACION Y EVALUACION DEL PATRON DE COMPORTAMIENTO DE TRES GENEROS DE LA FAMILIA LEGUMINOSAE (LEUCAENA LEUCOCEPHALA, PITHECELLOBIUM EBANO Y PITHECELLOBIUM PALLENS).", Universidad Autónoma de Nuevo León- Facultad de Ciencias Biológicas, en México
Concluida: Si, obtención en 11/2000

15.- Licenciatura, SONIA CRISTINA IRIGOYEN ARANDA, MARIO MORALES VALLARTA, MARIA LUISA CARDENAS AVILA, ROBERTO MERCADO HERNANDEZ Y ADRIANA NUÑEZ GONZALEZ, "INDUCCION DE CALLO IN VITRO DE PHASEOLUS VULGARIS L. (FRIJOL) Y CUANTIFICACION DE PROLINA COMO RESPUESTA A ESTRES DE SEQUIA", Universidad Autónoma de Nuevo León- Facultad de Ciencias Biológicas, en México
Concluida: No

Formación de grupos:

1.- MARIA ADRIANA NUÑEZ GONZALEZ (RESPONSABLE)
SALDIVAR GONZALEZ ELVIRA, DAMAS BUENROSTRO LUIS CASTULO, GAMBOA VILLA VIRGINIA, GALLARDO ZAPATA EDGAR, TORRES CARRILLO GERARDO (COLABORADORES)
Universidad Autónoma de Nuevo León- Facultad de Ciencias Biológicas, México, 1991, permanencia: 4 AÑOS
Objetivo: PROGRAMA DE SERVICIO SOCIAL CUYO OBJETIVO ES LA FORMACION DE RECURSOS HUMANOS EN EL AREA DE LA QUIMICA ANALITICA Y PRESTAR SERVICIO AL PUBLICO A PRECIOS MODICOS.
Impacto: LOS EGRESADOS DEL PROGRAMA INMEDIATAMENTE LOGRARON COLOCARSE EN UN EMPLEO AL HABER ADQUIRIDO EXPERIENCIA EJERCIENDO LA PROFESION DESDE ESTUDIANTES ASI COMO LA OBTENCION DE RECURSOS PARA EL EQUIPAMIENTO DEL LABORATORIO DE QUIMICA ANALITICA Y LA PROYECCION DE LOS SERVICIOS DE LA FACULTAD A NIVEL LOCAL Y REGIONAL.

2.- MARIA ADRIANA NUÑEZ GONZALEZ, GRACIELA GARCIA DIAZ, JOSE GARZA CHAVEZ
Universidad Autónoma de Nuevo León- Facultad de Ciencias Biológicas, México, 1992, permanencia: 9 AÑOS
Objetivo: SERVICIO AL PUBLICO DE ANALISIS QUIMICOS VARIOS
Impacto: SERVICIO A LA COMUNIDAD, FORMACION DE RECURSOS HUMANOS Y OBTENCION DE RECURSOS PARA EL LABORATORIO DE QUIMICA ANALITICA

3.- MARIA ADRIANA NUÑEZ GONZALEZ, DR. RAHIM FOROUGHBAKHCH (SNI II 5263), DRA. JULIA VERDE STAR (SNI I 3556), DRA.NORMA LAURA HEREDIA ROJAS (SNI I 13123), DR. SERGIO MORENO LIMON (CAND. SNI), MC JORGE LUIS HERNANDEZ PIÑERO (CAND. SNI 15878).
Universidad Autónoma de Nuevo León- Facultad de Ciencias Biológicas, México, 1999, permanencia: 2 AÑOS
Objetivo: DETERMINAR LAS BASES FISIOLOGICAS, BIOQUIMICAS Y ULTRAESTRUCTURALES DE CULITVARES DE FRIJOL (PHASEOLUS VULGARIS L. EFICIENTES PARA LA ABSORCION DE NUTRIMENTOS BAJO CONDICIONES DE ESTRES NUTRIMENTAL.
Impacto: CARACTERIZAR CULTIVARES CAPACES DE ADAPTARSE Y PRODUCIR EN AMBIENTES MARGINALES CON EL USO DE TECNOLOGIAS AMBIENTAL MENTENTE SENSIBLES, ECONOMICAMENTE VIABLES Y SOCIALMENTE ACEPTABLES.

4.- DR. RATIKANTA MAITI, MC MARIA ADRIANA NUÑEZ GONZALEZ, DR. SERGIO MORENO LIMON
Universidad Autónoma de Nuevo León- Facultad de Ciencias Biológicas, México, 1999, permanencia: 2 AÑOS
Objetivo: EVALUACION DE LAS BASES FISIOLOGICAS DE LA PRODUCTIVIDAD EN SORGO TROPICAL DE FORRAJE Y GRANO EN LAS ZONAS SEMIARIDAS DEL NORESTE DE MEXICO
Impacto: LOGRAR EL APROVECHAMIENTO DE LAS GRANDES EXTENCIONES DE TERRENOS POTENCIALMENTE FERTILES CON VARIEDADES QUE SE ADAPTEN
A LOS FACTORES ADVERSOS DE LAS ZONAS SEMIARIDOS

5.- MC MARIA LUISA CARDENAS AVILA, MARIA ADRIANA NUÑEZ GONZALEZ, DR. RAHIM FOROUGHBAKHCH (SNI II 5263), DRA. JULIA VERDE STAR (SNI I 3556), DR. SERGIO MORENO LIMON (CAND. SNI), MC JORGE LUIS HERNANDEZ PIÑERO (CAND. SNI 15878).
Universidad Autónoma de Nuevo León- Facultad de Ciencias Biológicas, Mexico, 1990, permanencia: 2 AÑOS
Objetivo: ESTUDIAR LAS CARACTERISTICAS ULTRAESTRUCTURALES Y BIOQUIMICAS DE FRIJOL A NIVEL DE CALLO IN VITRO Y DETERMINAR SU POSIBLE RELACION CON LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA A ESTRES DE SALINIDAD Y SEQUIA
Impacto: ESTABLECIMIENTO DE LAS BASES TECNICAS, CIENTIFICA Y TECNOLOGICAS PARA EVALUAR LAS RESPUESTAS QUE PERMITAN EN UN FUTURO DETERMINAR LOS MECANISMOS DE RESPUESTA A LOS FACTORES DE ESTRES

6.- MC JORGE LUIS HERNANDEZ PIÑERO (CAND. SNI 15878). DR. RAHIM FOROUGHBAKHCH (SNI II 5263), DRA. JULIA VERDE STAR (SNI I 3556), MC MARIA ADRIANA NUÑEZ GONZALEZ, DR. SERGIO MORENO LIMON (CAND. SNI), MC MARIA LUISA CARDENAS AVILA
Universidad Autónoma de Nuevo León- Facultad de Ciencias Biológicas, Mexico, 2000, permanencia: 1 AÑO
Objetivo: SELECCIONAR ESPECIES VEGETALES TOLERANTES A LA EXPOSICION CONTINUA DE METALES PESADOS EN SI RIZOSFERA
Impacto: ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO DE FITORREMEDIACION DE SUELOS CONTAMINADOS CON METALES PESADOS.

Phone : (0184)-251060

कृषि अनुसंधान संचार केन्द्र, सदर, करनाल

Agricultural Research Communication Centre

Sadar Bazar, Post Office Marg,

KARNAL-132 001, Haryana, India

No. ARCC/ LR-1479 Dated 25.4.2000

Dear Sir/Madam,

I am glad to inform you that your article entitled Comparison of the protein profiles of four bean cultivars(Phaseolus vulgaris L) subjected to low nutrient levels:A preliminary study.

A.Nunez Gonzalez,N.L.Heredia Rojas,R.H.Maiti,J.Verde Star, by-by-A.-Nunez-Gonzalez,-N.L.-Heredia-Rojas,-R.H.-Maiti,-J.-Verde-Star,-M.-Alvarez-Ojeda,-M.-Carranco-Avila and J.L. Hernandez Pinaro.

has been accepted for publication in our journal entitled

Legume Research. It will be sent to press for printing in an early issue on receipt of your reply to the following para.

Due to some technical and printing difficulties, reprints will not be supplied free or on payment. The author may get photostat copies from his own copy of Journal, which will be supplied against his membership of the same. ~~Annual subscription of the Journal for authors' personal use is Rs. Dollars only to be paid by I.M.O. or Demand Draft or cheque.~~ xxx

~~An early reply is requested to take further action on your above article.~~

With kind regards and Season Greetings,

Yours sincerely

R.D. Goel

Managing Editor

To Dr. R.K.Maiti,

~~Departamento de Botanica y Biologia~~

Ap 391,Universidad De las

Americas,Santa Catarina Martir

Cholula,PUE.C.P 72820

MEXICO.

PRFILD-1.DOC (LR-1479)

Comparison of the protein profiles of four bean cultivaras (*Phaseolus vulgaris* L.) subjected to low nutrient level : A preliminary study.

NUÑEZ GONZALEZ, A., (*) HEREDIA ROJAS N.L, MAITI, R. K.,& VERDE STAR J., MORENO LIMON S., ALVAREZ OJEDA, M.G. , CARDENAS AVILA M. L., HERNANDEZ PIÑERO J. L.

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO, FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS, UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON. APARTADO POSTAL F-16, San Nicolás de los Garza, N. L. CP 66450.
(* Correspondence
& Department of Chemistry and Biology, Universidad de las Americas, Santa Catarina, Cholula, Puebla, 72820, Mexico).

Abstract

The protein profiles of four bean cultivars tolerant-Flor de mayo and Laguna; and susceptible-garbancillo and pinamerpa to low nutrient medium were determined with the help of polyacrilamide gel electrophoresis. The results obtained showed that a specific protein of 46 kDa was present in higher concentrations in tolerant cultivars.

Key words. Bean cultivars, low nutrients, tolerance, protein profile.

Introduction

Bean (*Phaseolus*) is an important source of dietic protein for more than 500 millions persons in Latin America and other countries. There was a great necessity to increase the production of bean under semiarid condition. A highly variable abiotic and biotic conditions affect the productivity of the bean crop. Research need to be directed to study the effect of these stress factors on bean productivity and to understand its mechanism of resistance to these stress factors . Among the abiotic factors that affect the bean production, salinity, drought, high temperature and low nutrient leves are important (Pena-Ramos and Munoz-Orozco, 1988; Schoonhoven et al. 1989; Maiti, 1997. Moreno Limon, 1998). Highly significant variability was observed among bean cultivars in their resistance to salinity, drought and high temperature and some physiological and biochemical mechanisms contribute to their resistance to different stress factors at the seedling stage (Maiti et al. 1996, Moreno Limon, 1998). Therefore, the selection of bean cultivars resistant to these factors is the goal of plant breeders (Maiti, 1997) Low nutrient level is one of the major yield reducing factors in bean in the semiarid tropics. The selection of bean cultivars adapted to low nutrient condition is the main goal of the breeder. The synthesis of specific proteins in plants subjected to stress factors is well known in the literature The synthesis of specifics proteins induced by different stress factors has been reported in various crops and these *novo* proteins are considered to contribute resistance to these stress factors (Dasgupta and Bewley, 1984; Singh *et al* ., 1985; Ramagopal, 1986; Singh et al. 1987; Hurkman and Tanaka, 1987;, Ben-Hayyim *et al*., 1989, Dubey, 1994; de la Rosa. 1996, Maiti et al. 1998). No studies are available in this respect in the case of bean.

In the context of the above literature it is assumed that the tolerance of bean cultivar to low nutrient medium may be related to the synthesis of specific protein. The objective of the present study was to locate differences in protein characteristics subjected to low nutrient at

in the genetic improvement of the crop.

Materials and methods.

The present research was conducted in the laboratory of Botany and Microbial Genetics, Biology Faculty, UANL, Mexico. The genetic materials (obtained from Ph.D. Thesis of Nuñez Gonzalez in progress) included two commercial (Garbancillo and Flor de mayo) and two improved cultivars ((Laguna and Pinamerpa) proportioned by Agronomy Faculty, U.A.N.L. For the analysis of protein profile twelve seeds each of four bean cultivars (one resistant and three susceptible were sown in perlite in 300 mL polyethylene plastic pots in a growth chamber maintained at 14 h photoperiod and 26 ± 2 °C in nutrient solutions for 20 days. The two treatments included in the experiment were complete Hoagland for the control and diluted solution (3:10) for the low nutrient treatment. The statistical design was completely randomized with a factorial arrangement 4 X 2. Water was given upto the field capacity with distilled water and after emergence we applied complete Hoagland,s nutritive solution was applied every third day in the control and scarse nutrient solution in the treatment. At 20 days after emergence, leaf samples from each cultivar from each treatment were collected for protein profile analysis (SDS-PAGE) according to the methods adopted (Pei-Ying Zhong 1997) as detailed below..

The protein extract was obtained from fresh leaf samples. The samples were kept in a freezing chamber for 24 h. Later 0.5 g leaf samples were macerated in a morter with ten volumes of phosphate buffer (pH 7.2) in an ice bath. The breakdown of cells were completed by applying seven ultrasonic strokes (40 cycles) of 30 seconds duration each one in an ice bath in order to avoid the heating of the samples. The extract obtained was centrifuged at 27 000 g during 10 minutes. The materials were processed for gel electrophporesis according to the standard procedure.. A new procedure was adopted for the concentration of protein. In order to precipitate the proteins and an equal volume of saturated ammonium was added with constant agitations over ice bath and this was continued in ice for 12 h. Then it was centrifuged at 27 000 g and the pellet was obtained which was suspended in 5 mL of sterile distill and cold water in order to eliminate salt by dialysis in a membrane against sterile distill water up to conductivity with changes of water every 12 h. Once the extract was free of ammonium sulphate, the material was processed in order to concentrate protein.

The polyacrylamide gel electrolysis was done under denaturalised control condition. The protein sample (1 mg/ml) was added in a denaturalised solution (10% B-mercaptoethanol or Ditriotreitol 0.05M, SDS at 5% (p/v), 0.01% bromophenol blue, glycerol at 20% (p/v) and Tris at 1.5% at pH 6.8) in 1:1. Then SDS-PAGE was conducted for protein profile as described by to Pei-Ying Zhong (1997). We used conjugates of heamoglobin (16, 32,48 and 64 kDa) as molecular weight markers. The gel was kept in 10% acetic acid with ontinuous shaking and several changes of the solution. Once the protein profile was obtained , Rf for each of the bands was calculated.

Results and Discussions

The four bean cultivars did not much varitations in the presence of specific protein. It was, however, observed that there existed the presence of a specific protein, 48 kDa which expressed in higher concentrations in the cultivars subjected to low nutrient concentration

Laguna, FAUANL) while it was in lower concentrations in the cultivar, Pinamerpa (FAUANL). It was observed that the cultivars studied expressed the presence of one protein of 48 kD in response to low levels of nutrients. No such information was available in the literature in case of *Phaseolus* bean, although the synthesis of specific proteins (28 y 38 kD) were reported in different crops when exposed to different stress factors like salinity, drought and high temperature ((Hurkman and Tanaka, 1987; Singh *et al* ., 1985, Ramagopal, 1986; Ben-Hayyim *et al*., 1989, Pei-Ying *et al*, 1997) .

It may be mentioned that the presence of this type of protein might be related to the mechanism of adaptation to different stress factors. Among the cultivars studied the cv. Laguna showed the presence of greater concentrations of 48 kDa under low nutrient medium and this cultivar showed greater seedling vigour under this stress situation. Therefore, this information gave a guide in understanding the physiological and biochemical basis of tolerance to the condition of sparse nutrients. particularly in bean

REFERENCES

BEN-HAYYIM, G., et al. (1989). Physiol. Plantarum, 77:332.

CIAT, , 1999. CIAT, Cali Colombia.

DASGUPTA, J. and Bewley, D, (1984). J. Exp. Bot. 35:1450.

DE LA ROSA-IBBARA, M. (1993).. Master Thesis, Biology Faculty, Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Monterrey, Mexico..

DUBEY, R.S. (1982). Biochem. Physiol. Pflanz. 127:523.

HURKMAN, W. J. AND C. K. TANAKA. (1987). Plant physiol. 83:517

MAITI, R.K. (1997). *Phaseolus* spp.: Bean Science. Science Publishers, Inc., U.S.A and Oxford & IBH Publishing Co. Pvt., New Delhi,

MAITI, R.K. et al. (1998). Intl. Sorghum and Pearl Millet Newsletter. 101-103.

Peña Rmos , A. and Muñoz-Orozco, A. (1988). Agrociencia 74:231-243.

Schoonhoven van A. et al. (1989). CIAT, Cali, 33-57.

S. MORENO-LIMON. (1998). Ph.D. Thesis. Biology Faculty, Universidad Autonoma de Nuevo n, Leon, Monterrey, Mexico. pp. 99.

PEI-YING ZHONG et al.(1997). Plant physiol. 112:479-485.

RAMAGOPAL, S. 1986. Protein synthesis in maize callus exposed to NaCl and manitol. Plant Cell Rep 5:430.

SINGh, N.K.. et al. (1985). Plant Physio. 79:126.

Agricultural Research Communication Centre
Sadar Bazar, Post Office Lane,
KARNAL-132001, Haryana, India.

No.ARCC/R-532 & LR-1602 Dated 5.6.2000

Dr.Adriana Nunez Gonzalez
Universidad Autonoma de Nuevo Leon
Facultad de Ciencias Biologicas
Division de Estudios de Postgrado
Apartado Postal F-16
66450 San Nicolas de Lost Garza NL
MEXICO.

Title of Articles:-(1)Tissue culture..in phaseolus bean
(2) Variability in mineral profile...North East of Mexico

Autnors:-1)R.K.Maiti, Maria luisa Cardenas-Avila Julia Verde-Star & J.L. Hernindez-Pinero, Ma Adriana Nunez Gzz.

(2)Andriana Nunez Gonzalez, R.K.Maiti, Julia Verde-Star Maria Luisa Cardenas Avila, Rahim Foroughbakch, J.L. Hernandez-Pinero, S.Moreno Limon and G.Garcia Diaz.

Dear sir,

1. It is to acknowledge the receipt of your above mentioned two articles for printing in our journals Agril. Reviews and Legume Research respectively.
2. For any correspondance, please quote Nos.R-532 and LR-1602 respectively for these articles.
3. Please remit U.S.Dollars 20-00 towards the processing charges for these articles @ U.S.$ 10-00 for each article.
4. The further necessary action on your above two articles will be taken by us on receipt of your reply of the above points.

With kind regards,

Yours sincerely

(R.D.Goel)
Managing Editor

P.S:-Please send one copy of each article. more.

VARIABILITY IN MINERAL PROFILE IN SEVEN VARIETIES OF BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.) ADAPTED IN NORTH EAST OF MEXICO.

Adriana Núñez González*, R.K. Maiti*, Julia Verde-Star, María Luisa Cárdenas Avila, Rahim Foroughbakch, J.L. Hernández-Piñero, S. Moreno Limon & G. García Díaz

Postgraduate Division, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Ciudad Universitaria, Apartado Postal F-16, C.P. 66450, N.L., Mexico.

ABSTRACT

The present study pretends to understand the nutritional profile of seven bean varieties (*Phaseolus vulgaris L.*) for the selection of lines adapted in semiarid conditions. The treated samples were analysed by Plasma Emission in order to determine the contents of Mg, Na, K, Ca, Mn, Cu and Zn. The results showed variability in nutritional contents among varieties. The variety Bayo presents a very high value of Mg, Na, K, Ca, Mn and Cu. This permits to consider that the variety has greater possibilities of adaptation to adverse condition in the semiarid regions.

Ky words. Beans, Phaseolus, mineral profile, variability, adaptation.

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a very important diet for more than 500 millions of persons and the second very important source of protein in Africa and fourth in Tropical America where the crop is domesticated. In these regions the crop offers an alternative of the low cost diet against meat and milk. In a study, traditional bean harvested from one hectare in Latin America produce 123 kg of protein compared with 3.4 kg of protein obtained from beef in the same quantity of area (CIAT, 1996). The nutritional value of food is basically a function of the quantity of nutrients, the digestibility and also the presence of toxic or antinutritional compounds (Guzman et al. 1997). The availability of nutrients play an important role in the production of bean. The wild species present higher quantity of minerals compared with the cultivated species (Moreno-Limon et al. 1994). The characteristics of wild species are related with its mechanism of adaptation in adverse conditions in the semiarid regions of Mexico in view of the facts that the wild species have high quantity of protein while cultivated species contain high carbohydrate and poor protein content (Moreno et al, 1994). It has been documented that bean cultivars tolerant to salinity and drought accumulated high mineral contents (Moreno-Limon, 1998-Ph D thesis) Besides its chemical composition also influences the seedling vigour and crop establishment (Maiti, 1992). It has been documented that iron deficiency in Phaseolus bean plants provoke an reduction in reductase enzyme in the root, this protein is localized in the cortex or epidermal cell (Bienfait et al. 1983). At the same time, iron deficiency in bean roots reduce the electron receptors as ferricianuro and metasulphite phenacine at an accelarated rate,

which indicates that the transplasmatic membrane transfer electrons for the reduction of Fe (Sijmons and Bienfait, 1983). On the other hand, calcium is very important for the plant growth and salinity resistance (Akhavan-Kharazian et al. 1991). The selection of lines with high mineral contents has a great advantage for the production in this region and also for the genetic improvement of the bean crop. The objective of the present research is to determine the genetic variability of protein profile of seven bean cultivars adapted in the semiarid regions and to select the cultivars with desirable combinations of minerals.

MATERIALS AND METHODS

Seven varieties of bean (Peruano, Flor de Mayo, Garncillo, Bayo, Norteno, Negro and Pinto Americano) were supplied by the seed producers. No informations are available on the growth habit of the varieties. The cultivars were harvested in a particular field in Durango. Two gm seed of variety were powdered , and then carbonized completely slowly in low flame of blue light in muffle furnace at 500 C for two hours. The ash was dissolved in 15 ml of HCL 20% V/V. filtered through a funnel through Whatman filter No. 41. The filtrate was collected in 25 ml volumetric flasks. The control- white reactive consists of 15 ml HCl 20% v/v filtered and made up to the same volume.

The samples were analysed in spectrophotometer of Plasma emision (Termo Jarrel Ash) modified under optimized instrumental condition.

RESULTS

The results of the mineral contents are shown in the Figures 1-6. The results reveal that there were large variability in the coments of different minerals among the varieties. The contents of different mineral vary widely (in ppm) (Mg 400-800; Na 300-1200; K 400-9000, Fe 20-80; Cu 2-8; Zn 10-55. The variety Bayo present very high contents of Mg (800ppm), K (3200 PPM), Ca (9000 ppm, Mn (13 ppm and Cu (8 ppm). On the contrary the variety Blanco present the very high quantity of Na and the variety Garbancillo of Fe (80 ppm) and Zn (55 ppm). The rest of the varieties showed intermediate values. The values of Cu and Zn being very small, these can not be represented in histograms.

DISCUSSIONS AND CONCLUSIONS

Great variation among the bean cultivars in the nutritional contents offers an opportunity of selection for high nutritional value as well as for its incorporation in the genetic improvement of the crop (Alaniz Guzman et al. 1997). The accumulations of a large amount of minerals may help in the osmotic adjustment of the crop under drought and salinity stress (Moreno-Limon et al.1994, Maiti, 1997).. It has been reported that the wild species besides high protein content contained high quantity of Zn, Fe, Mn, Cu, Ca and Mg compared to the cultivated species (Moreno-Limon et al 1994). These characteristics of wild species contribute to good crop establishment under saline and drought strees as has

been interpreted by Moreno-Limon (1998). He reported that the cultivars tolerant to salinity and drought accumulated high mineral contents compared to the susceptible ones thereby acting as osmoregulators under these stress situations. A very high levels of nutrients in a seed contributes to a better adaptive capacity in view of the consideration that this interact in a series of the biochemical processes like transport of electrons in respiration and other processes, such as formation of DNA and RNA and in accelerating the activity of some enzymes in the mobilization of sugars and proteins. All these could function in the osmotic adjustment under drought and salinity stress and also better crop establishment in the semiarid regions.

In conclusion it may be considered that the variety Bayo having high quantity of minerals might be considered and selected for higher nutritional quality and may be adapted under drought and salinity stress in the semiarid conditions in soil deficient in nutrients. This hypothesis may be verified in future studies in the growth of seedlings under limited nutrient and some adverse abiotic stresses. The response of cultivars in the accumulation of minerals is influenced by agroclimatic conditions and nutrient status of the soil.

REFERENCES

Akhavan-Kharazian, M. *Et al.*, (1991). *Arid Soil Res. and Rehabilitation* 5(1): 9-19.

Alanis Guzmán, M G *et al.*, (1997). In: Bean Science (ed. Maiti, R.K.) Science Publishers. 241p.

AOAC (1991). Official Methods of Análisis of the AOAC, 4th Ed. Asssociation Official Analytical Chemists, Washington, D.C.

Bienfait, H F R J. *et al.*, (1983) Physiologia Planterum 59 2): 196-202.

CIAT. (1996). Bean program Annual Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia

Maiti, R.K. (1992) Technologia de la semilla y el establecimiento de los cultivos Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León Bol. Bot. 1:1-117.

Maiti, R K. (1997). Bean Science. Science Publishers, N.H., U.S.A. 241p.

Moreno-Limón, *et al.* (1994). Phyton. Int J. Exp. Bot. 55(5): 9-22.

Sijmons, P.C. and Bienfait, H.F. (1983). Physiologia Planterum 59 (3): 409-415

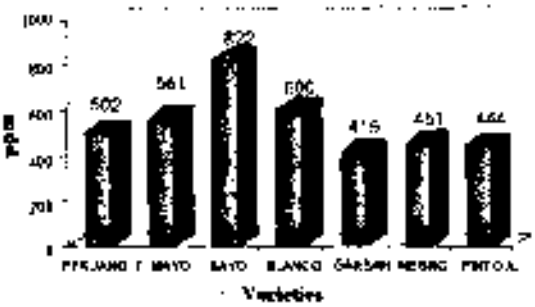

Fig. 1. Variability in the contents of magnesium of seven commercial bean varieties.

Fig. 2. Variability in the contents of calcium of seven commercial bean varieties.

Fig. 3. Variability in the contents of potassium of seven commercial bean varieties.

Fig. 4. Variability in the contents of calcium of seven commercial bean varieties.

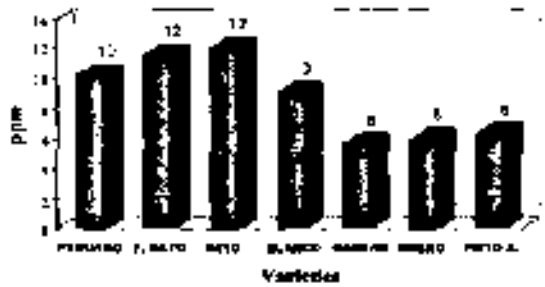

Fig. 5. Variability in the contents of magnesium of seven commercial bean varieties.

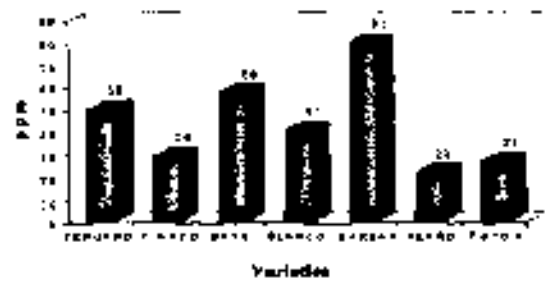

Fig. 6. Variability in the contents of iron of seven commercial bean varieties.

LITERATURE CITED

Akhavan-Kharazian, M , Campell, W.F., Jurinak, J.J. and Dudley, L.M. (1991).. Arid Soil Res and Rehabilitation 5(1):9-19.

Alanis Guzmán, M G., J.Verde-Star, Maiti, R K. and P. Wesche-Ebeling. 1997 Food Science and Feed Quality in Bean. In: Bean Science. Maiti, R.K. Science Publishers, 241p.

AOAC Official Methods of Análisis of the AOAC, 4th Ed Asssociation Official Analytical Chemists, Washington, D.C. 1991.

Bienfait, H F R J., Bino, A M , Blick van der, Duivenvoorden and Fontain, J M. 1983 Characterization of ferric reducing activity in roots of Fe deficient *Phaseolus vulgaris* Physiologia Plantarum 59(2): 196-202.

CIAT 1996 Bean program Annual Centro Internacional de Agricultura Tropical Cali, Colombia.

Maiti, R.K 1992. Technologia de la semilla y el establecimiento de los cultivos Facultad de Ciencias Biológicas, Universidada Autonoma de Nuevo Leon. Bol. Bot. 1 1-117.

Maiti, R.K. 1997. Bean Science. Science Publishers, N-H- U.S.A. 241 P

Moreno-Limon, Maiti. R.K., Hernandez-Pinero, J.L. and Gonzalez-Nunez, A. 1994. Utraestructura y contenido de minerales en semilla y desarrollo de la plantula de 5 especies silvestres, una semicultivada y una cultivada de Frijol (*Phaseolus* spp.). Pitón Intl J. Exp. Bot 55(5):9-22.

Sijmons, P.C and Bienfait, H.F. 1983. Source of electrons for extracellular Fe (III) reduction in iron-deficient bean roots. Physiologia Plantarum 59 (3).409-415.

कृषि अनुसंधान संचार केन्द्र, सदर, करनाल

Agricultural Research Communication Centre

Sadar Bazar, Post Office Marg,
KARNAL–132 001, Haryana, India

No. ARCC/... R-552 Date/ 26.12.2000

Dear Sir/Madam,

I am glad to inform you that your article entitled..... Some biotic & abiotic factors affecting chloroplast structure and chlorophyll content in bean(Phaseolus vulgaris L.)-A Review.

by R.K.Maiti, Pedro Wesche-Ebeling, Adriana Nunez-Gonzalez, S.L. Moreno-Limon, S.L. Hernandez-Piñero, Maria Luisa Cadena Avilai.

has been accepted for publication in our journal entitled..... Agricultural Reviews.

.....It will be sent to press for printing in an early issue on receipt of your reply to the following para.

Due to some technical and printing difficulties, reprints will not be supplied free or on payment. The author may get photostat copies from his own copy of Journal, which will be supplied against his membership of the same. Annual subscription of the Journal for authors' personal use is U.S. Dollars... 20-00 only to be paid by I.M.O. or Demand Draft or cheque.

An early reply is requested to take further action on your above article.

With kind regards and Season Greetings,

Yours sincerely

R.D. Goel
Managing Editor

To Dr.R.K.Maiti,
Universidad de Las Americas, Puebla
Departamento de Quimica y Biologia
Santa Catarina Martir, Cholula, A.P.78
C.P.72820, Puebla, Mexico

SOME BIOTIC AND ABIOTIC FACTORS AFFECTING CHLOROPLAST STRUCTURE AND CHLOROPHYLL CONTENT IN BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.). A Review.

R.K. Maiti 1, Pedro Wesche-Ebeling 1, Adriana-Núñez González 2, S. Moreno-Limón, J.L. Hernández-Piñero, María Luisa Cárdenas Ávila 2,

1. Universidad de las Américas, Departamento de Química y Biología, Santa Catarina Mártir, C.P. 72820, Puebla, México.
2. Postgraduate Division, Biology Faculty, Apartado Postal F 16, San Nicolás de los Garza, N.L., Mexico.

ABSTRACT

This paper discusses a brief account on the ontogeny and ultrastructure of chloroplast of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and the effects of some abiotic stress on the structural anomalies of the chloroplast. It is assessed that all these stresses cause disorganization of the chloroplast, such as dilation of the chloroplast, separation of grana and accumulation of starch granules. All these anomalies in the ultrastructure of chloroplast have direct impact on the photosynthetic capacity of chloroplast.

INTRODUCTION

Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is an important source of protein food in Latin America and other countries (Naiti, 1997).The productivity of a crop depends on the efficiency in the caption of Co2, absorption of radiant energy by the chlorophyl and finally its conversion in chemical energy in the chloroplast of the chlorophyll in the chloroplast.

The efficiency of chloroplast in the photosynthesis is affected by several biotic and abiotic factors.

ONTOGENEY AND DEVELOPMENT OF CHLOROPLAST

During development of primary leaves of Phaseolus vulgaris cv. Harzgruss only small, non-significant differences in the ultrastructure and dimensions were found between chloroplasts in their palisade and spongy parenchyma cells (Kutik, J. 1989).

McEwen et al. (1996) reported that after 7 days of irradiation of *Phaseolus vulgaris* cv. the primary leaf

contained about 300 times more chlorophyll per gram fresh weight than the lower hypocotyl section and about 20 times more than the epicotyl. Ultrastructural investigation of seedlings grown for 7 days in darkness and then irradiated for 24 h revealed a more developed inner membrane system with grana stacks in plastids of cells in the uppermost hypocotyl section compared with plastids of cells in lower hypocotyl sections. After flash irradiation of the different sections, fluorescence emission spectra with maxima at 680 and 690 nm, respectively, were observed, indicating the formation of short- and long-wavelength chlorophyll(ide) forms. However, after continuous irradiation long-wavelength chlorophyll(ide) was formed. In dark-grown roots, where only short-wavelength protochlorophyll forms were present, it was not possible to transform protochlorophyll to chlorophyll by flash irradiation..

Phaseolus cotyledons lost most of their reserve substances during the first few days of germination and turned green. In cotyledon mesophyll cells of one-week-old seedlings, plastids were represented predominantly by amyloplasts (starch grains) and chloroamyloplasts, and the cells appeared to be metabolically highly active. Only mesophyll cells near to the bundles were rich in plastids. In two-week-old intact bean plants, the cotyledons were yellow and shrunken, and their cells were nearly "empty". The plastids in them were represented by senescent plastids (gerontoplasts) only. In the gerontoplasts as well as freely in cytosol, fluorescent lipoid inclusions were accumulated. This cotyledon development was more or less independent of irradiance. In "decapitated" bean plants, senescence of mesophyll cells and plastids was slowed down considerably, and the life span of the cotyledons was prolonged.

Kutik et al. (1988) studied the ontogenetic changes of chloroplast structure of the primary and 1 st trifoliate leaf.. It was observed that max. relative partial volume of the system of thylakoid membranes in the chloroplasts occurred in the primary leaves, preceded and followed by a pronounced accumulation of starch, while max. relative proportion of plastoglobuli was achieved at the end of the chloroplast development. In the 1st trifoliate leaves, the development of chloroplast ultrastructure was shortened, with only one peak of relative proportion of the thylakoid system in the 2nd quarter and of starch inclusions at the end of the leaf life span, along with a max. relative proportion of plastoglobuli. Max. content of chlorophylls per leaf area

unit occurred in both types of leaves prior to reaching their max. leaf area

Khandakar and Bradbeer (1989) studied the developmental changes of plastid in *P. vulgaris* under dark period. Prior to dark inhibition, the mesophyll cells consisted of contained a large number of protein bodies, a few mitochondria and 2-3 proplastids. Starch grains were first detected in the proplastids from leaves. A peak number of starch grains per plastic section was noted after 36 h, after which this value fell. The number of protein bodies in the cell section declined accompanied by the development of starch grains in the proplastid section after 24 h of imbibition. Proplastids became spherical and most of the stroma in the mesophyll cells was covered with a number of starch grains after 36 h of imbibition. This stage is characterized by the occurrence of plastids as well as active cell division. During the next 2.4 d the number of starch grains per plastid section decreased. The increase in the number of plastids per cell section indicated that plastid divisions occurred more rapidly than cell divisions during the first 4 d of dark growth..

CHLOROPLAST

Darweesh (1992) reported that 4-Amino-5-hexynoic acid (AHA) inhibited the biosynthesis and accumulation of chlorophyll during the greening periods of *P. vulgaris* seedlings until the 4-5 leaf stage. This inhibition was reversed by the application of 5-aminolevulinic acid (ALA; the precursor of chlorophyll), but not by glutamate-1-semialdehyde (GSA). It is suggested that AHA had its inhibitory effect through a transamination step in the ALA-C5 pathway between GSA and ALA. AHA (0.05-10.0 mM) also had harmful effects on the ultrastructure of *P. vulgaris* leaf chloroplasts..

The ability of the detergents digitonin, Triton X-100, sodium dodecylsulphate, cetylpyridinium chloride, and Zwittergents 3-12, 3-14, and 3-16 to fragment unstacked thylakoid membranes was tested in French bean (*P. vulgaris*) cv. Membrane fragments obtained after the action of individual detergents on agranal thylakoids were separated on a Percoll gradient. Separated fractions were characterized by their chlorophyll (Chl) content, Chl a:b and Chl:protein ratios, position of absorption maximum (Amax) in red spectral region and ratios of intensities of fluorescence emission bands. Low concentrations of detergents fragmented agranal membranes in a pattern which changed during leaf development.

Only Zwittergents 3-16 had an increased capacity to extract proteins from membrane; this was probably promoted by the presence of the 16-C alkyl chain.(Wilhelmova, 1994).

The protochlorophyll(ide) forms and plastid ultrastructure were investigated in hypocotyls of dark-grown seedlings of *P. vulgaris* cv. By deconvolution of the fluorescence emission spectra into Gaussian components, 3 protochlorophyll(ide) forms were found with maxima at 633, 642 and 657 nm. Plastids in the upper parts of the hypocotyl contained prolamellar bodies typical of etiolated leaves while those in the lower parts contained only stroma lamellae. Immunological detection of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase on nitrocellulose membranes after SDS-PAGE indicated the occurrence of the enzyme in upper, middle and lower sections of hypocotyls and in the root tips.(McEwen et al. 1994).

FACTORS AFFECTING CHLOROPLAST STRUCTURE.

VIRUS

Appiano and Redolfi (1993 reported that tobacco necrosis necrovirus (TNV-W) caused wilting and non-self-limiting lesions in *P. vulgaris*. The main cell anomalies specific to TNV-W infection were ER proliferation and vesiculation, plasmolysis and plasmalemma proliferation. Finally this led to lysis of most cell membranes, formation of crystalline inclusions in the chloroplasts, development of fibrous structures in the cytoplasm and also large crystalline aggregates of virus particles. The chloroplast inclusions consist of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (RuBisCo). It is suggested that tissue wilting, and crystallization of the virus and RuBisCo, may have been caused by cell dehydration due to the loss of plasmalemma integrity..

Ziolinska et al. (1995) studied the effect of chitosan on leaf cell ultrastructure of *P. vulgaris* cv. treated with a 0.1% solution, and tobacco cv. Xanthi nc, treated with 0.1 and 0.01% solutions, and to further investigate the relationship between the changes in the ultrastructure and plant resistance induced by chitosan to viruses and other pathogens. Deformation of plasmalemma and tonoplast and destruction of chloroplast were observed in the chitosan-treated leaves. Other changes included cell wall appositions of fibrillar and amorphous material of unknown origin and aggregation of fibrillar material in the intercellular space.

FUNGUS

Field infection of *P. vulgaris* leaves with X. campestris pv. phaseoli resulted in the appearance of isolated flaccid areas in green leaf tissue adjacent to necrotic and chlorotic lesions. The flaccid areas had significantly higher ($P<0.01$) stomatal resistances than nearby turgid areas of the same leaf. The flaccid tissues also had significantly lower ($P<0.05$) relative water contents than turgid tissues on the same leaf. This demonstrated that pathogen-induced water stress was localized. Levels of free proline, another indicator of water stress, showed a moderate correlation ($r2=0.556$) with disease severity. This indicated that water stress increased in direct proportion with the amount of tissue infected. (Goodwin and Sopher, 1994)..

Ultrastructural observations were carried out in Phaseolus vulgaris Phaseolus vulgaris leaf tissue infiltrated with extracellular polysaccharides (EPS) from Pseudomonas syringae pv. Phaseolicola caused changes in the cell fine structure, especially in chloroplast organization. Within 24 24 h after EPS infiltration, alterations consisted of irregularly running thylakoids and distortions of stacked regions. Invaginations of the plastid envelope and appearance of cytoplasm pockets inside the stroma were also observed. The most severe alterations, consisting of stroma dilations and envelope infoldings, were noted 24 h after EPS infiltration, paralleling yellowing of the treated leaf areas; chloroplast shrinkage and collapse of the thylakoid system were also sometimes observed. Chloroplast ultrastructure generally recovered 48 h after treatment; at this time, local detachment of the plasma membrane and vesicle formation in the periplasmic space were observed, resembling a non-specific, localized cellular response. The permanent chlorosis and ultrastructural alterations observed thereby causing an interference of the EPS in the global metabolism of the P. vulgaris mesophyll cell.(Stefani et al. 1993).

In infected cells of Phaseolus vulgaris (cv. Jalo) and soyabean, bean angular mosaic virus [cowpea mild mottle carlavirus (CpMMV)] occurs in bundles of falcate or, more rarely, parallel particles. CMMV contains a single coat protein with MW of 32.6 kDa and 7% of nucleic acid. (Gaspar and Costa, 1993).

PHOTOPERIOD

Photoperiod affect chloroplast structure in *P. vulgaris*. Short photoperiod (SP) reduced total DM by 37%, flattened chloroplasts, reduced the size and area of starch grains and compacted the thylakoids and intrathylakoidal spaces compared

with long photoperiod (LP). The membranes and intrathylakoid space developed under LP (Takacs et al. 1987).

NICKEL ON ULTRASTRUCTURE

After treatment with 80 æg/ml NiSO4 for 4 days, in broad bean root tips caused disintegration of nuclear membrane, condensation of nucleus, severe separation of cell membrane and wall, and increased cytoplasm density were observed. It is concluded that broad beans are more sensitive to nickel-induced damage than winter wheat (Hao-SiCheng et al. 1996.).

EFFECT OF SALINITY, HIGH TEMPERATURE AND WATER STRESS ON CHLOROPLAST ULTRASTRUCTURE IN BEAN.

Salinity

Moreno-Limon (1998) reported that in the susceptible bean, line salinity caused disorganization of thylacoids in the chloroplast, dilation of organelles and wide separation of thylacoids associated with accumulation of large number of granules. While this type of anomalies did not occur in the tolerant line.

High temprature

Susceptible cultivar Flor de Mayo exposed to high temperature caused anomalies in the ultrastructure of chloroplast accompanied with an increase in the size and number of starch granules. This anomaly was not observed in the tolerant line (Moreno-Limon, 1998)..

Drought

According to Moreno-Limon (1998) water stress caused break down of the membrane of the chloroplast and dilation of thylacoids with grana not distinguishable..

SIMULATED ACID RAIN CHLOPLAST

Stoyanova and Velikova (1990) reported that simulated acid rain (pH 2.4, 2.7, 2.0 or 1.8),caused changes in chloroplast structure followed until complete destruction of organelles occurred. The chloroplasts of palisade parenchyma showed different degrees of expansion of thylakoids and conformational changes of the inner membrane system. The chloroplasts of the spongy parenchyma showed a significantly higher degree of structural resistance. The ultrastructural changes of chloroplasts confirmed relative resistance of P. vulgaris to acid rain until pH 2.0..

REFERENCES

McEwen-B. et al. (1996). Physiologia Plantarum 96: 51-58..

Gaspar, C.O. and Costa, A.S. (1993). Fitopatologia Brasileira 18: 534-540..

Zielinska, L. et al. (1995). Materialy Sesji Instytutu Ochrony Roslin 35: 231-234..

Goodwin, P.H. and Sopher, C.R. (1994). Journal of Phytopathology 140: 219-226..

Appiano, A. and Redolfi, P. (1993). Protoplasma 174:116-127.

Stofani, E. et al. (1993). Journal of Phytopathology 137: 195-206..

Khanoakar, K. and Bradbeer, J.W. (1989). Cytologia 54: 409-417..

Kutik, J. et al. (1988). Photosynthetica 22: 511-515.

Takacs, E. et al. (1987). Botanikai Kozlemenyek 74-75: 331-351.

Kutik, J. (1989). Photosynthetica 23: 676-681..

McEwen, B. et al. (1994). Physiologia Plantarum 90: 396-407.

Wilhelmova, N. (1994). Photosynthetica 30: 415-474..

Maiti, R.K. (1997). *Phaseolus* spp.Bean Science. Oxford IBH Book Publishing Co. PVT. Ltd. New Delhi, India.. 534 pp.

Darweesh, M.M. (1992). Bulletin of Faculty of Agriculture, University of Cairo 43: 797-815.

Hao-SiCheng et al. (1996). Acta Agriculturae Boreali-Sinica. 11: 14-19..

Kutik, J. et al. (1998). Photosynthetica 35: 361-367..

Stoyanova, D. And Velikova, V. (1998). Biologia-Plantarum. 1998, 40: 4, 589-595; 24 ref.

Phone :(0184)-255 080

कृषि अनुसंधान संचार केन्द्र, सदर, करनाल

Agricultural Research Communication Centre

Sadar Bazar, Post Office Marg,

KARNAL–132 001, Haryana, India

No. ARCC/ LR-1500,R-544,R-545 etc. Dated 4.9.2000

Dr. R.K.Maiti,
Deptt.De Quimica Y Biologia
AP 391,Universidad
Americas,Santa Catarina Martir
Cholula,PUEBLA CP 72820,Mexico

Dear Dr.Maiti,

This has a reference to your letter dated 15.8.2000 regarding your various paper under consideration for publication in our journals. The required information is given below:-

Art.No.R-479 is entitled"Tissue culture in pearl millet(pennisitum glaucum) crop improvement". Acceptance letter was sent to you on 15.11.99and pages 1,13to 16 were sent to you for revision and sending the revised manuscript on a mini floppy.A response is still awaited.

Art.No.R-544 entitled"Some recent contributions in seed structure and chemical composition of bean(P.V)" The processing charges have been received e now and the action is being taken separately.

Art.No.R-545. is entitled"Proline and protein profile as indicators of resistance to biotic and abiotic stresses in beans(P.V)" has been processed and sent to the Press for printing. ~~However, processing charges are waited. U.S.Dollers 200 may please be remitted for the purpose.~~

Art.No.R-497 is titled as"Some aspects on ethnobotany,botany and methods of domestication of wide chilli(Capsicum annuum L ver aviculare dieab D & E)".The article has been sent to referee for review and is awaiteddespite reminders.Therefore,in order to expedite the matter, you are advised to send one more copy of this article.

Art.No.A-2441(R) entitled"Desirable seed and seedling traits in relation to abiotic stress resistance of pearl millet (Pg.) for plant breeders & seed producers".The referee's comments on the article were sent to you on 6.3.2000 for revision on floppy. A response from you is still awaited. Kindly expedite.

PROLINE AND PROTEIN PROFILE AS INDICATORS OF RESISTANCE TO BIOTIC AND ABIOTIC STRESSES IN BEAN (Phaseolus vulgaris L.).

R.K. Maiti 1, Adriana Núnez-González 2, Pedro Wesche-Ebeling 1, , S.L. Moreno-Limón 2, Maria Luisa Cárdenas-Avila2, J.L. Hernández-Piñero 2 & M. J. Verde Star.

1. Universidad de las Americas, Departamento de Quimica y Biologia, Santa Catarina Martir, C.P. 72820, Puebla, Mexico.
2. Postgraduate Division, Biology Faculty, Apartado Postal F-16, San Nicolas de los Garza, N.L., Mexico.

ABSTRACT

Plant adaptations to several abiotic stresses are manifested in the synthesis and accumulation of biochemical components in the cytoplasm acting as osmoregulators. The paper makes a short review of recent researches on the contributions of proline and protein as indicators of resistance to several biotic (virus, fungus) and abiotic stresses (salinity, drought, heavy metals, mineral stress etc.). In all these stress situation there is an increase in the accumulation of proline in bean (*Phaseolus vulgaris* L). The contribution of protein to resistance to these stresses is not well established in bean.

Key words. Bean, Phaseolus vulgaris, proline, protein, abiotic, biotic stresses, osmotic adjustment

INTRODUCTION

The importance of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as food crop of high nutritional value in Latin America and other contries. The productivity of the crop is affected by several biotic and abiotic stress factors under semiarid conditions (Maiti, 1997).The response of plants to different environmental stresses are complex and involve several physiological and biochemical changes. Many reactions occur when plants are submitted to those stress factors and form diverse compounds for neutralizing these adverse effects depend on the genetic and biochemical characters of the plants (Dubey, 1994).Plants exposed to different abiotic factors such as salinity, drought, salinity, high temperatures express different mechanism of adaptation through the production of several biochemical components such as HCN, specific proteins. These chemiical components act as osmoregulators in the adjustment od osmolites in the

cytoplasm (Bidwell, 1976, de la Rosa and Maiti, 1995). An increase in proline and betain in the plants of barley occur with an increase in moisture stress (Zuniga et al 1989, while Kapoya et al (1985) observed a positive correlation between the accumulation of proteins and tolerance to drought in bean. A reduction in the synthesis of protein is the result of hydric stress and the resistance to water stress might be due to high proline content (Nir et al.1970, Tang and Wu, 1987, Lansac, 1990). Water stress increased the accumulation of proline in the germinated seeds of barley subjected to water stress (Sing et al1972). Water stress increased accumulation of prolein, the activity of nitrogenase and other related enzymes in the metabolism of nodules in soyabean (Kohl et al. 1991). Sorghum lines resistant to water stress accumulated high levels of proline while the susceptible line did not produce proline (Sivaramkrishnan et al. 1988).An increase in the accumulation of proline was also reported in different crops subjected to water stressand salinity , maize (Thakur, 1987, Voetberg and Sharp, 1991)

A synthesis of specific protein occur in plants exposed to different abiotic and biotic stress factors such as drought, high and low temperatures (Ericson and Alfinito, 1984, Hurkman and Tanaka, 1987, Singh et al. 1987, Ricard et al. 1991). The metabolic function of the majority of these proteins in their adaptation to these adverse stress factors is not yet established (Be-Hayyim et al. 1989). The production of heat shock proteins in different plant species subjected to high temperatures play a possible role in the protection of organism to high temperature stress (Vierling, 1991, Ristic et al. 1991). No such reports are available in beans. Under salinity, the production of new proteins along with amino acids and nitrogenous compounds function as the mechanism of tolerance to salinity (Greenway and Munns, 1980). Dubey and Rani (1989) consider that these proteins function as cytoplasmic osmolites capable in the osmotic adajustment under hydric stress. The role of protein synthesis under stressful conditions in different plant species have been documented by Dubey (1994).

Under condition of salinity different crops manifest different physiological and biochemical changes which might indicate the capacity of their tolerance to salinitylike osmoregulation , an increase in organic acids (Coughlan and Wynjones, 1980), mineral accumulation (Khair, 1986, He and Tang, 1993, de la Rosa, 1993, Moreno Limon, 1998) and soluble sugars (Coughlan and Wynjones, 1980).

The present paper gives a brief accounts of the metabolism and the role of proline and protein in resistance to different biotic and abiotic stresses in bean (*Phaseolus vulgaris* L.).

PROLINE

Application of aspartic acid, glutamic acid, asparagine, glutamine, lysine, arginine, tryptophan and proline increased root growth in *P. vulgaris* hypocotyl cuttings, among which asparagine was the most effective. Some other amino acids showed inhibitory or no effects (Kakkar and Rai, 1988)

Kohl et al. (1990) examined pentose phosphate pathway, pyrroline-5-carboxylate reductase and proline dehydrogenase activities in *P. vulgaris* and other plants. root nodules. During the process of nodulation nitrogenase and glutamine synthetase activities increased whilst pyrroline-5-carboxylate reductase and pentose phosphate pathway activities were rapidly induced and showed high activities. Proline dehydrogenase activity increased Other amide exporting nodules also showed high pyrroline 5 carboxylate reductase activity.

Sheng et al. (1993) investigated developmental and light regulation in seedling shoots of mRNAs encoding a putative cell wall proline-rich protein (PvPRP1), cell wall glycine-rich proteins (GRPs), and cell wall hydroxyproline-rich glycoproteins (HRGPs). Light increased the levels of these mRNAs substantially in highly regulated patterns during seedling development. Etiolated seedlings exposed to red light accumulated PvPRP1, GRP, and HRGP mRNAs in the hypocotyls. Far-red light inhibited red light induction of these mRNAs, exhibiting a phytochrome-mediated process. The authors suggested the possible roles of PRPs, GRPs, and HRGPs in cell differentiation and photomorphogenesis.
According to Hande and Jayabaskaran, (1997) the nucleotide sequence of a proline from bean chloroplasts shows 72% homology with bean mitochondrial tRNA^{Pro} (UGG).

Choi DongWoog et al. (1996) isolated a cDNA clone, encoding a proline-rich 14 kDa protein in developing cortical cells of the roots of bean (Phaseolus vulgaris) seedlings. This clone contains a 381 bp open reading frame encoding a polypeptide of 13.5 kDa, designated PvR5 (*P.vulgaris* root 5). Southern

blot analysis suggests that genomic DNA corresponding to PVR5 cDNA is encoded by a single gene or a small gene family. Nucleotide sequence data have been deposited to the EMBL/GenBank/DDBJ databases under the accession number U34333.

Different factors contribute to proline accumulation in bean

Water stress

Erdeli et al. (1989) reported that a growth retardant , sodium 2,3-dichlorisobutyrate (DCIB) at high concn inhibited water uptake in *P. vulgaris* cuttings, decreased transpiration and increased leaf water holding capacity and contents of free amino acids especially proline, alanine and gamma-aminobutyric acid. It is suggested that plant response to DCIB is similar to that to water stress.

Andrade et al.. (1995) reported that water stress decreased water potential and osmotic potential and increased free proline in all the P. vulgaris cvs. studied. The greatest increases in proline occurred in the drought-susceptible cultivars Flor de Mayo and Cacahuate 72.. The authors interpreted that proline accumulation may be a symptom of stress in the susceptible cultivars and may play an important role in the maintenance of turgor in the cultivars that are drought-resistant.

According to Al-Karadi, (1992) high proline concentrations occurred in water-stressed bean plants grown at the lowest P level; concentrations returned almost to nonstressed levels 5 d after alleviating water stress.

It was also reported by Upreti et al (1998=)that water stress increased osmotic potential (psios) and relative water content (RWC), ABA and proline in French bean although the degree of these indices varied among cultivars..Decrease in chlorophyll contents was evident in some cv. Water stress increased ethylene production in all the cultivars under 4 to 5 day stress which decreased later under 12-d stress..

Salinity

Shevyakova et al. (1994) suggested that the greater capacity in the resistant variety to salinity for inhibiting Na ions in the roots, caused a relatively low accumulation of Na ions in the leaves. Adverse degradation processes, such as reduction in bound proline and accumulation of free proline in the plants, occurred at higher external concentrations of

NaCl in the resistant than the susceptible variety. In another study, NaCl stress reduced relative growth and protein content but increased proline content and peroxidase activity (Broetto et al. 1995).

According to Sawires et al. (1997), callus growth was stimulated by 0.3% NaCl but decreased by higher salinity levels. Concentrations of sodium, carbohydrates and free proline generally increased with increasing salinity, whereas K concentration of callus decreased with NaCl level. Protein content generally increased due to salinity in pea callus, but decreased in *P. vulgaris* callus..

ABA

ABA is an indicator of drought stress in plants. ABA, amino acid and proline concn increased to reach a max. approx. after treatment with exogenous ABA. In uniconazole-treated plants leaf ABA, amino acid and proline concn followed a biphasic pattern. Uniconazole concn in uniconazole treated plants also followed a biphasic pattern. Stomatal resistance followed the same trends as ABA, amino acid and proline concn in both ABA and uniconazole treated plants (Mackay et al. 1990).

Younis et al.(1994) reported that under salinity ABA increased proline and P concentrations in the salinized plants whilst kinetin decreased them. ABA stimulated the translocation of K, Ca and Cl from root to shoot, and accumulation of these minerals in root cells but inhibited the Na translocation and Ca accumulation. Kinetin inhibited the translocation and accumulation of Na and Cl, K translocation, and stimulated the accumulation of K and Ca as well as Ca translocation. The biggest effect of both ABA and kinetin was generally observed with 120 mM NaCl in the medium.

In other study, the addition of exogenous ABA to plants under control conditions induced accumulation of proline and total sugar very similar to that observed in salinized plants. NaCl treatment decreased the stomatal conductance and transpiration rate of leaves as well as the osmotic and turgor potentials. The addition of exogenous ABA also simulated these responses. These results revealed the facts that an immediate increase in ABA upon exposure to NaCl coincides with the period of proline and total sugar accumulation, and that treatment of plants with exogenous ABA stimulates the cellular processes of osmotic adjustment in P. vulgaris (Cachorro et al. 1995).

Disease

A cDNA clone was isolated whose corresponding transcript encoded an apoprotein of a hydroxyproline-rich glycoprotein. Both infection of plants with *Colletotrichum lindemuthianum* spores and treatment of suspension-cultured bean cells with an elicitor preparation of the fungus caused a rapid decrease in the level of this mRNA. Wounding of tissue, however, led to a very rapid, transient induction of the transcript. In contrast, all bean hydroxyproline-rich glycoproteins described previously were induced both after infection with fungal spores and after mechanical damage. The protein encoded by this new clone contains a proline-rich domain of about 30 kDa. The gene was present at a single or low copy number in the haploid genome and exhibited an unusual codon usage bias for the amino acids proline and serine (Saur et al. 1990).

Sheng et al. (1991) reported that fungal elicitor and wounding caused negative and positive regulation of a novel proline-rich protein mRNA. The structure and expression of a cDNA clone (PvPRP1), isolated from a cDNA library prepared from *P. vulgaris* cells treated with fungal (*Colletotrichum lindemuthianum*) elicitor, were determined (EMBL Data Library accession number X60391). On the other hand, Bradley et al. (1992) reported that elicitor fungus (*Phytophthora*) - and wound-induced the accumulation of an oxidative proline-rich plant cell wall protein acting as rapid defense mechanism. It is concluded that stimulus-dependent oxidative cross-linking of wall structural proteins is a novel site of cellular regulation with potentially important functions in cell maturation and toughening of cell walls in the initial stages of plant defence.

Zhang and Mehdy (1994) reported binding of a 50-kD protein to a C-rich sequence in an mRNA encoding a proline-rich protein that is destabilized by fungal elicitor.

Wycoff et al. (1995) reported that the HRGP4.1 gene, which encodes a cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein, was isolated from a genomic library of bean (*P. vulgaris*). Two transcripts, one induced by wounding and one by elicitation, were transcribed from the same initiation site. The gene encodes a polypeptide of 580 amino acids with the amino terminal half consisting of repeats of the sequence serine-(proline)4-lysine-histidine-serine(proline)4-(tyrosine)3-histidine and the carboxyl-terminal half composed of repeats of the sequence serine-(proline)4-valine-tyrosine-

lysine-tyrosine-lysine. A 964 bp upstream promoter fragment was translationally fused to the beta-glucuronidase reporter gene (*Escherichia coli* uidA) and transferred into tobacco by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated leaf disc transformation. Analysis of beta-glucuronidase activity showed that wounding caused local activation of the HRGP4.1 promoter in the phloem. Stress induction was superimposed on tissue-specific developmental expression in stem nodes and root tips. This suggests that HRGP4.1 may have specific structural roles in development as well as protective functions in defence. Nucleotide sequence data have been submitted to the GenBank database under accession number U18791 (PRGP4.1).

Heavy metal

Chai TuanVac et al. (1996) reported that a cDNA clone encoding a proline-rich protein specifically expressed in green tissues of *P. vulgaris* was isolated by differential screening of plants sprayed with mercuric chloride. This clone contained an ORF of 288 nucleotides coding encoding a putative protein of 96 amino acids (~11 kDa). This protein, designated PvPRP2, contains several specific amino acid motifs, such as the repetitive proline-rich polypeptide PSVYK. Most of the abiotic stresses investigated (metals, wounding, drought, elevated temperature, UV, salt and abscisic acid) exhibited a strong response by increasing the expression of this gene.

Boron deficiency

Bonilla et al. (1997) reported that B-deficient bean (*P. vulgaris*) nodules caused dramatic anatomical anomalies , mainly in the parenchyma region. The aberrant cell walls of boron-deficient bean root nodules did not contain no covalently bound hydroxyproline-/proline-rich proteins.

Sulphite

According to Karolevski and Pronina (1993) sulfite reduced plant FW and leaf water content to a greater extent. In response to sulphite proline content increased to a maximum and then decreased at higher sulfite concentrations. Proline is supposed to play a protective role in the reaction of plants to sulfite varying in susceptible and resistant plant. This protection was exhibited by an increase in in plant growth and leaf turgor, and an increase in the intensity of dark respiration. High sulfite concentrations enhanced simultaneous proline accumulation, decline of leaf FW and water content and retardation of respiration

Herbicide

Payez and Kristen (1996) reported that herbicides (chlorsulfuron, norflurazon and tri-allate) caused in changes in root cap ultrastructure. Herbicide reaction is manifested in the destruction of the outermost cell layer of the secretory tissue and the separation of cells from the root cap periphery . Root growth was reduced by all 3 herbicides, mostly by chlorsulfuron which also damaged the amyloplasts in statocytes. This phenomenon is associated with an increase in proline content. It is suggested that the root caps of germinating pea and bean seedlings were highly sensitive to low concentrations of herbicides and that herbicide-induced growth reduction may be associated in part to root cap injuries.

P R O T E I N

Keller(1992) reported the ultrastructural localization of a bean glycine-rich protein in unlignified primary walls of protoxylem cells. A polyclonal antibody was used to localize a glycine-rich cell wall protein (GRP 1.8) in Phaseolus vulgaris hypocotyls with the indirect immunogold method. GRP 1.8 was localized mainly in the unlignified primary cell walls of the oldest protoxylem elements and also in cell corners of both proto- and metaxylem elements. In addition, GRP 1.8 was detected in phloem using tissue printing.

A major cell wall protein rich in proline, valine and glutamic acid/glutamine was isolated and characterized from cultured P. vulgaris cv. The protein was localized in the intercellular spaces of the cortical cells of P. vulgaris hypocotyls and the wall-plasmalemma interface of xylem vessels. Wounding altered the protein distribution so it was generally distributed in the wall of the epidermal and cortical cells of the hypocotyls. The 42 000-Da protein was cross reactive with antibodies raised to glycoproteins of the Rhizobium infection thread and the chitin-binding hydroxyproline-rich glycoprotein, potato lectin. The protein itself bound to the growing hyphal tips of the pathogen *Colletotrichum lindemuthianum* (Millar et al. 1992).
Zhang and Mehdy (1994) reported binding of a 50-kD protein to a U-rich sequence in an mRNA encoding a proline-rich protein that is destabilized by fungal elicitor.

Campos et al. (1995) reported isolation, characterization and gene expression of nodulin Npv30 from common bean. It has been reported previously that transcripts for a 30 kDa nodulin (Npv30) are very abundant in the nodule. In P. vulgaris, Npv30 is encoded by a small gene family that shares discrete sequence homolgies with another small gene family in soyabean. An antibody against a beta-galactosidase-Npv30 fusion protein detected two proteins of 28 and 30 kDa.

Ohtsuka et al (1990) concluded that isoprothiolane enhances adventitious root formation in association with specific protein synthesis for the initiation of root primordia..

Deshpande and Damodaran (1990) detected the 7S globulin storage proteins, phaseolin, vicilin, and beta-conglycinin, in *P.vulgaris*, field peas, and soyabeans resp.,which are highly homologous, and yet exhibit considerable differences in their susceptibility to various proteinases. The relative compactness of these 3 proteins based on these studies was related to the observed differences in their susceptibility to various proteinases.

Li-Congjun et al. (1996) isolated No protein amino acids N-Methylisoleucine, as a free amino acid from the seeds of *P. vulgaris* together with S-methylcysteine, pipecolic acid and a dipeptide, gamma-glutamyl-leucine.

A study in Hungary indicated that seed protein content decreased with harvesting later than the right stage. High temperature decreased the protein content of shelling seed in Flageolet beans in particular. Increasing proline levels in response to drought stress was obsereve in bean cvs. depending on the cv. (Nemeskeri et al. 1994).

In the secondary cell wall three major novel glycoproteins with relative molecular weights of 55 000, 86 000, and 90 000, was purified and characterized by means of WGA-Sepharose affinity chromatography. 90-kDa glycoprotein was present localized in secondary cell walls of xylem tracheary elements and in xylary and phloem fibres. (Wojtaszek and Bolwell, 1995).

Profilin from common bean (*P. vulgaris*) was purified to homogeneity by poly-L-proline affinity chromatography and gel filtration. The hypocotyl and symbiotic root nodule protein detected was a single isoform with a 14.4-kDa molecular mass and an isoelectric point of 5.3. Partial amino acid and DNA

sequencing of a full length cDNA clone (GenBank database accession number X81982) confirmed its identity as profilin. The strong identity of the sequence among the profilins in bean suggested that it may play an important role in the signal transduction mechanism of plant cells and plant-bacterial symbioses (Vidali et al. 1995).

Six cDNA clones from *P. vulgaris*, were induced by water deficit and ABA treatment (rsP cDNAs). The sequence analyses of the isolated clones indicates that they encode two types of late-embryogenesis abundant (LEA) proteins, a class-1 cytoplasmic low-molecular weight heat shock protein (lmw-HSP), a lipid transfer protein (LTP), and two different proline rich proteins (PRP). The results support the importance of these proteins during the plant response to water deficit. Nucleotide sequence data have been submitted to the GenBank/EMBL/DDBJ databases under accession numbers U72764 (PvPRP-12), U72765 (PvLTP-24), U72766 (PvHSP17-19), U72767 (PvLEA4-25), U72768 (PvPRP2-37) and U72769 (PvPrp-12). (Colmenero-Flores et al. 1997).

Wojtaszek et al. (1997) reported that oxidative cross-linking of threo (hydroxy)proline rich cell wall proteins, known to be immobilized during the elicitor-induced oxidative burst in *P. vulgaris* cells, was modelled using peroxidases with cysteine or H_2O_2. Ryser et al. (1997) reported the presence of structural cell-wall proteins in protoxylem development as evidence for a repair process mediated by a glycine-rich protein. Electron micrographs of these walls showed that they are composed of an amorphous material of moderate electron-density and of polysaccharide microfibrils. It is concluded that these walls are unusually rich in protein and therefore have special chemical and physical properties .

Removal of pod at early stages of poc development enhanced relative levels of a specific protein with a relative molecular weight of 28 000 Da in the young pods that formed later. The protein, designated pod storage protein (PSP), was purified from extracts of newly formed pods from plants. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis showed the presence of three forms (designated A, B, and C) of PSP with identical electrophoretic mobilities but different charges. The molecular weight of native PSP was 67 kDa.. Form B lacked the N-terminal alanine of forms A and C. Using the antiserum against form A, a full-length cDNA clone was isolated. The cDNA chain included 765 bp potentially encoding a polypeptide with 255 amino acid residues (and a

calculated molecular weight of 28 854 Da). Genomic Southern blot analysis suggested that PSP is derived from a single-copy gene. (Zhong-PeiYing et al. 1997).

CONCLUSIONS.

A revision of literature on the responses of various crops to several biotic and abiotic stress factors indicate that plants produce various chemical constituents such as proline, specific proteins acting as mechanism of plant resistance to such stresses. In bean (*Phaseolus vulgaris* L.) produce proline in response to various stress factors like salinity, osmotic stress, heat stress, mineral stress, heavy metals, herbicides and biotic stresses like virus, fungus. The resistance lines produce this amino acid in higher quantity which is absent in the susceptible ones. Under stresses although the synthesis of specific protein is well known in other crops, this is not well established in bean. Therefore, more research emphasis need to be directed in this direction in the case of bean. However, the evaluation of bean cultivars under various abiotic stresses may be strengthened in the selection of the cultivars with higher proline contents for resistance to these stress factors.

REFERENCE

Al-Karaki, G.N. (1992). Dissertation-Abstracts-International.-B, Sciences and Engineering 52 (11): 5585B-5586B; Abstract of Thesis, University of Nebraska, USA, 1991, 317 pp.

Andrade, J.L. et al.(1995). Phyton-Buenos-Aires. 1995, 57: 2, 149 157.

Ben-Hayyim, G. et al. (1989). Plant Physiol. 77:342.

Bidwell, R.G.S.(1976). Fisiologia Vegetal. AGT Editor, S.A. Mexicco, D.F. pp.690-692.

Bonilla, I. et al. (1997). Plant Physiology 115: 1329-1340.

Bradley, D.J. et al. (1992). Cell-Cambridge. 70: 21-30.

Broetto,F. et al. (1995). Scientia Agricola 52:164-166.

Cannoora, P. et al. (1995). Journal of Plant Growth Regulation 14:99-104.

Campos, F. Et al. (1995). Plant Physiology 108 (2): 643-650.

Chai-TianYao et al. (1998). Plant Science-Limerick 133: 47-56.

Choi-DongWook et al. (1996). Plant Molecular Biology 30: 973-982.

Carmenero-Flores, J.M. et al. (1997). Plant Molecular Biology 35 (4): 593-605.

Coughlan, S.J. and Winjones, R.G. (1980). J. Exp. Bot. 31:883-893.

De la Rosa Ibarra, M. 1994. Contribution a la determinacion del mecanismo morfologico y bioquimico de la resistencia a la salinidad de sprgo Glossy . Master Thesis, Facultad de Ciencias Biologicos, U.A.N.L., Mexico.

De la Rosa, M. and Maiti, R.K. 1995. J. Plant Physiol. 146:515-519.

Deshpande, S.S. and Damodaran, S. (1990). International Journal of Peptide and Protein Research 35(1):25-34.

Dubey, R.S. (1994). Protein synthesis by plants under stressful conditions. In: Handbook of plant and crop stress. M. Pessarakli Ed. Marcel Dekkar, Inc. New York, USA.

Dubey, R.S. and M. Rani. 1989. J.Agron. 162:97.
Erdei,,G.S. et al. (1989). Fiziologiya i Biokhimiya Kul'turnykh-Rastenii 21:75-80.

Ericson, M.C. and Alfinito, S.H. 1984. Plant Physiol. 74:566.
Fayez, K.A. and Kristen, U. (1996). Environmental and Experimental Botany 36: 71-81.

Greenway, H. and Munns, R. 1980. Ann. Rev. Plant Physiol. 31:149.

Hande, S. and Jayabaskaran, C. (1997). Journal of Biosciences 22: 143-147.

He , Z.L. et al. (1993). Acta Phytopathologia Sinica 19:379-386.

Burkman, W.J. and Tanaka, C.K. (1987). Plant Physiol. 46:281.

Kakkar, R.K. and Raj,V.K. (1988). Current Science 57: 82-84.

Kapoya, J.A. et al. (1995). Acta Bot. Neerl. 34:293-300.

Karolevski, P. and Pronina, N.D (1993). Sel'skokhozyaistvennaya-Biologiya, Seriya Biologiya Rastenii. No. 1: 84-88.

Keller, D (1992). Plant-Cell 4 (7): 773 783.

Khair, M.A.M. (1986). Pakistan J. Bot. 75-81.

Kohl, D.H. et al. 1987. J. Exp. 42:831-834.

Kohl,D.H. et al. (1990). Plant Physiology 94: 1258-1264.

Lansac, A.R. (1990). Effects of cold on proline accumulation in sorghum pollen. Dissert. Abs. Intl. B. Sciences and Engineering 51:11956.

Li-Cangjun et al. (1996). Phytochemistry 42 (2): 443 445.

Mackay,C D. et al. (1990). Biochemistry and Physiology 37: 74-82.

Maiti, R.K. (1997). Phaseolus spp.Bean Science. Oxford IBH Book Publishing Co. New Delhi, India and Science Publishers, NH, USA. 534 pp.

Miller, D.J. et al. (1992). Planta 187 (2): 176-184.

Moreno-Limon, S. 1998. Respuestas morfologicas bioquimicas y de ultraestructura en frijol (Phaseolus vulgaris L.) al estrés de salinidad, altas temperaturas y sequia en etapa de plantula. Ph.D Thesis. Biology Faculty, U.A.N.L., N.L., Mexico. pp.99.

Nemeskeri, C. et al.(1994). Proceedings of the third congress of the European Society for Agronomy, Padova University, Abano-Padova, Italy, 18-22 September 1994. 1994, 612-613; 4

Nir, I. et al. (1993). Israel J. Bot. 19:451-462.

Ricard, R.A. and Pasioura, J.B. (1981). Crop Sci.21:249-252.

Ristic, Z.D. et al. (1991). Intl. J. Plant Sci. 153:186-196.

Ryser, U. et al. (1997). Plant Journal 12 (1): 97-111.

Saur,N. et al. (1990). Plant, Cell and Environment 13: 257-266.

Sawires, E.S. et al. (1997).Egyptian Journal of Horticulture 24:161-173.

Sheng, J.S. et al. (1991). Plant Journal 1: 345-354.

Sheng, J.S. et al. (1993). Proc.National Academy of Sciences of the United States of America 90: 828-832.

Shevyakova, N.I. et al.(1994). Sel'skokhozyaistvennaya-Biologiya No. : 84-88.

Sing, T.N. et al. (1972). Nature 236:188-190.

Singh, N.K. et al. (1987). Plant Physiol. 85:529-539.

Sivaramkrishnan, S. et al. (1988). Physiologia Planterum 74:418-426.

Tang, Z.C. and Wu, Y.H. (1987). Plant Physiol. Comm. 1:29-31.

Thakur, P.S. (1987). Annals of Plant Physiology 1:10-18.

Upreti, K.K. et al. (1998). Biologia Plantarum 40:381-388.

Vidal, J. et al. (1995). Plant Physiology 108(1): 115-123.

Vierling, E. (1991). Ann. Rev. Plant Physiol 42:579

Voetberg, G.S. and Sharp, R.E. (1991). Plant Physiolog 96:1125-1130.

Wojtaszek, P. and Bolwell, G.P. (1995). Plant Physiology. 108 (3):1001-1012.

Wojtaszek, P. et al. (1997). FEBS-Letters 405(1):95-98.

Wycoff, K.L. et al. (1995). Plant Physiology 109: 41-52.

Younis, M.E. et al. (1994). Biologia Plantarum36: 83-89.

Zhang, S.@. and Mehdy, M.C. (1994). Plant Cell 6: 135-145.

Zhong-FeiYing et al. (1997).. Plant Physiology 113 (2): 479-485.

Zuniga, G.E. et al. (1989). Phytochemistry 28:419.420.

Phone : (0184)-255080

कृषि अनुसंधान संचार केन्द्र, सदर, करनाल

Agricultural Research Communication Centre

Sadar Bazar, Post Office Marg,

KARNAL-132 001, Haryana, India

No. ARCC/ R-552 Dated 26.12.2000

Dear Sir/Madam,

I am glad to inform you that your article entitled Some biotic & ec factors effecting chloroplast structure and chlorophyll content in bean(Phaseolus vulgaris L.)-A Review.

by R.K.Maiti, Pedro Wesche-Ebeling, Adriana Nunez-Gonzalez, Gricelda Moreno-Limon, Julio Hernandez-Piñero, Maria Luisa Lozano Avilai.

has been accepted for publication in our journal entitled Agricultural Reviews.

It will be sent to press for printing in an early issue on receipt of your reply to the following para.

Due to some technical and printing difficulties, reprints will not be supplied free or on payment. The author may get photostat copies from his own copy of Journal, which will be supplied against his membership of the same. Annual subscription of the Journal for authors' personal use is U.S. Dollars 20-00 only to be paid by I.M.O. or Demand Draft or cheque.

An early reply is requested to take further action on your above article.

With kind regards and Season Greetings,

Yours sincerely

R.D. Goel

Managing Editor

To Dr.R.K.Maiti,

Universidad de Las Americas,Puebla

Departamento de Quimica y Biologia

Santa Catarina Martir,Cholula,A.P.78

C.P.72820,Puebla,Mexico

SOME BIOTIC AND ABIOTIC FACTORS AFFECTING CHLOROPLAST STRUCTURE AND CHLOROPHYLL CONTENT IN BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.). A Review.

R.K. Maiti 1, Pedro Wesche-Ebeling 1, Adriana-Núñez González 2, S. Moreno-Limón 2, J.L. Hernández-Piñero 2, Maria Luisa Cárdenas Ávila 2,

1. Universidad de las Américas, Departamento de Química y Biología, Santa Catarina Mártir, C.P. 72820, Puebla, México.
2. Postgraduate Division, Biology Faculty, Apartado Postal F-16, San Nicolás de los Garza, N.L., Mexico.

ABSTRACT

This paper discusses a brief account on the ontogeny and ultrastructure of chloroplast of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and the effects of some abiotic stress on the structural anomalies of the chloroplast. It is assessed that all these stresses cause disorganization of the chloroplast, such as dilation of the chloroplast, separation of grana and accumulation of starch granules. All these anomalies in the ultrastructure of chloroplast have direct impact on the photosynthetic capacity of chloroplast.

INTRODUCTION

Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is an important source of protein food in Latin America and other countries (Maiti, 1997).The productivity of a crop depends on the efficiency in the caption of Co2, absorption of radiant energy by the chlorophyl and finally its conversion in chemical energy in the coloroplast of the chlorophyll in the chloroplast. The efficiency of chloroplast in the photosynthesis is affected by several biotic and abiotic factors.

ONTOGENEY AND DEVELOPMENT OF CHLOROPLAST

During development of primary leaves of Phaseolus vulgaris cv. harzgrass only small, non-significant differences in the ultrastructure and dimensions were found between chloroplasts in their palisade and spongy parenchyma cells (Kutik,-J. 1989).

McEwen et al. (1996) reported that after 7 days of irradiation of *Phaseolus vulgaris* cv. the primary leaf

contained about 300 times more chlorophyll per gram fresh weight than the same hypocotyl section and about 20 times more than the epicotyl. Ultrastructural investigation of seedlings grown for 7 days in darkness and then irradiated for 24 h revealed a more developed inner membrane system with grana stacks in plastids of cells in the uppermost hypocotyl section compared with plastids of cells in lower hypocotyl sections. After flash irradiation of the different sections, fluorescence emission spectra with maxima at 680 and 690 nm, respectively, were observed, indicating the formation of short- and long-wavelength chlorophyll(ide) forms. However, after continuous irradiation long-wavelength chlorophyll(ide) was formed. In dark-grown roots, where only short-wavelength protochlorophyll forms were present, it was not possible to transform protochlorophyll to chlorophyll by flash irradiation..

Phaseolus cotyledons lost most of their reserve substances during the first few days of germination and turned green. In cotyledon mesophyll cells of one-week-old seedlings, plastids were represented predominantly by amyloplasts (starch grains) and chloroamyloplasts, and the cells appeared to be metabolically highly active. Only mesophyll cells near to the bundles were rich in plastids. In two-week-old intact bean plants, the cotyledons were yellow and shrunken, and their cells were nearly "empty". The plastids in them were represented by senescent plastids (gerontoplast(s) only. In the gerontoplasts as well as freely in cytosol, fluorescent lipoid inclusions were accumulated. This cotyledon development was more or less independent of irradiance. In "decapitated" bean plants, senescence of mesophyll cells and plastids was slowed down considerably, and the life span of the cotyledons was prolonged.

Kutik et al. (1988) studied the ontogenetic changes of chloroplast structure of the primary and 1 st trifoliate leaf.. It was observed that max. relative partial volume of the system of thylakoid membranes in the chloroplasts occurred in the primary leaves, preceded and followed by a pronounced accumulation of starch, while max. relative proportion of plastoglobuli was achieved at the end of the chloroplast development. In the 1st trifoliate leaves, the deve opment of chloroplast ultrastructure was shortened, with only one peak of relative proportion of the thylakoid syster in the 2nd quarter and of starch inclusions at the end of the leaf life span, along with a max. relative proportion of plastoglobuli. Max. content of chlorophylls per leaf area

unit occutred in both types of leaves prior to reaching their max. leaf area

Khandakar and Bradheer (1989) studied the developmental changes of plastid in *P. vulgaris* under dark period. Prior to dark inhibition, the mesophyll cells consisted of contained a large number of protein bodies, a few mitochondria and 2-3 proplastids. Starch grains were first detected in the proplastids from leaves. A peak number of starch grains per plastic section was noted after 36 h, after which this value tell. The number of protein bodies in the cell section declined accompanied by the development of starch grains in the proplastid section after 24 h of imbibition. Proplastids became spherical and most of the stroma in the mesophyll cells was covered with a number of starch grains after 36 h of imbibition. This stage is characterized by the occurrence of plastids as well as active cell division. During the next 2.4 d the number of starch grains per plastid section decreased. The increase in the number of plastids per cell section indicated that plastid divisions occurred more rapidly than cell divisions during the first 4 d of dark growth..

CHLOROPLAST

Darweesh (1992) reported that 4-Amino-5-hexynoic acid (AHA) inhibited the biosynthesis and accumulation of chlorophyll during the greening periods of *P. vulgaris* seedlings until the 4-5 leaf stage. This inhibition was reversed by the application of 5-aminolevulinic acid (ALA; the precursor of chlorophyll), but not by glutamate 1-semialdehyde (GSA). It is suggested that AHA had its inhibitory effect through a transamination step in the ALA-C5 pathway between GSA and ALA. AHA (0.05-10.0 mM) also had harmful effects on the ultrastructure of *P. vulgaris* leaf chloroplasts..

The ability of the detergents digitonin, Triton X-100, sodium dodecylsulphate, cetylpyridinium chloride, and Zwittergents 3-12, 3-14, and 3-16 to fragment unstacked thylakoid membranes was tested in French bean (*P. vulgaris*) cv. Membrane fragments obtained after the action of individual detergents on agranal thylakoids were separated on a Percoll gradient. Separated fractions were characterized by their chlorophyll (Chl) content, Chl a/b and Chl:protein ratios, position of absorption maximum (Amax) in red spectral region and ratios of intensities of fluorescence emission bands. Low concentrations of detergents fragmented agranal membranes in a pattern which changed during leaf development.

Only Zwittergents 3-16 had an increased capacity to extract [illegible], this was probably promoted by the presence of the 16 C alkyl chain.(Wilhelmova, 1994).

The protochlorophyll(ide) forms and plastid ultrastructure were investigated in hypocotyls of dark-grown seedlings of *P. vulgaris* cv. By deconvolution of the fluorescence emission spectra into Gaussian components, 3 protochlorophyll(ide) forms were found with maxima at 633, 642 and 657 nm. Plastids in the upper parts of the hypocotyl contained prolamellar bodies typical of etiolated leaves while those in the lower parts contained only stroma lamellae. Immunological detection of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase on nitrocellulose membranes after SDS-PAGE indicated the occurrence of the enzyme in upper, middle and lower sections of hypocotyls and in the root tips.(McEwen et al. 1994).

FACTORS AFFECTING CHLOROPLAST STRUCTURE.

VIRUS

Applanc and Redolfi (1993 reported that tobacco necrosis necrovirus (TNV-W) caused wilting and non-self-limiting lesions in *P. vulgaris*. The main cell anomalies specific to TNV-W infection were ER proliferation and vesiculation, plasmolysis and plasmalemma proliferation. Finally this led to lysis of most cell membranes, formation of crystalline inclusions in the chloroplasts, development of fibrous structures in the cytoplasm and also large crystalline aggregates of virus particles. The chloroplast inclusions consist of ribulose-1,5 bisphosphate carboxylase (RuBisCo). It is suggested that tissue wilting, and crystallization of the virus and RuBisCo, may have been caused by cell dehydration due to the loss of plasmalemma integrity..

Zielinska et al. (1995) studied the effect of chitosan on leaf cell ultrastructure of *P. vulgaris* cv. treated with a 0.1% solution, and tobacco cv. Xanthi nc, treated with 0.1 and 0.01% solutions, and to further investigate the relationship between the changes in the ultrastructure and plant resistance induced by chitosan to viruses and other pathogens. Deformation of plasmalemma and tonoplast and destruction of chloroplast were observed in the chitosan treated leaves. Other changes included cell wall appositions of fibrillar and amorphous material of unknown origin and aggregation of fibrillar material in the intercellular space.

FUNGUS

field infection of *P. vulgaris* leaves with X. campestris pv. phaseoli resulted in the appearance of isolated flaccid areas in green leaf tissue adjacent to necrotic and chlorotic lesions. The flaccid areas had significantly higher ($P<0.01$) stomatal resistances than nearby turgid areas of the same leaf. The flaccid tissues also had significantly lower ($P<0.05$) relative water contents than turgid tissues on the same leaf. This demonstrated that pathogen-induced water stress was localized. Levels of free proline, another indicator of water stress, showed a moderate correlation ($r2=0.556$) with disease severity. This indicated that water stress increased in direct proportion with the amount of tissue infected. (Goodwin and Sopher, 1994)..

Ultrastructural observations were carried out in Phaseolus vulgaris Phaseolus vulgaris leaf tissue infiltrated with extracellular polysaccharides (EPS) from Pseudomonas syringae pv. Phaseolicola caused changes in the cell fine structure, especially in chloroplast organization. Within 24 24 h after EPS infiltration, alterations consisted of irregularly running thylakoids and distortions of stacked regions. Invaginations of the plastid envelope and appearance of cytoplasm pockets inside the stroma were also observed. The most severe alterations, consisting of stroma dilations and envelope infoldings, were noted 24 h after EPS infiltration, paralleling yellowing of the treated leaf areas: chloroplast shrinkage and collapse of the thylakoid system were also sometimes observed. Chloroplast ultrastructure generally recovered 48 h after treatment; at this time, local detachment of the plasma membrane and vesicle formation in the periplasmic space were observed, resembling a non-specific, localized cellular response. The permanent chlorosis and ultrastructural alterations observed thereby causing an interference of the EPS in the global metabolism of the P. vulgaris mesophyll cell.(Stefani et al. 1993).

In infected cells of Phaseolus vulgaris (cv. Jalo) and soyabean, bean angular mosaic virus (cowpea mild mottle carlavirus (CpMMV)) occurs in bundles of tubular or, more rarely, parallel particles. CpMMV contains a single coat protein with MW of 32.5 kDa and 4% of nucleic acid. (Gaspar and Costa, 1993).

PHOTOPERIOD

Photoperiod affect chloroplast structure in *P. vulgaris*. Short photoperiod (SP) reduced total DM by 37%, flattened chloroplasts, reduced the size and area of starch grains and compacted the thylakoids and intrathylakoidal spaces compared

with long-photoperiod (LP). The membranes and intrathylakoid space developed under LP (Takacs et al. 1987).

NICKEL ON ULTRASTRUCTURE

After treatment with 80 eq/ml $NiSO_4$ for 4 days, in broad bean root tips caused disintegration of nuclear membrane, condensation of nucleus, severe separation of cell membrane and wall, and increased cytoplasm density were observed. It is concluded that broad beans are more sensitive to nickel-induced damage than winter wheat (Hao-SiCheng et al. 1996.).

EFFECT OF SALINITY, HIGH TEMPERATURE AND WATER STRESS ON CHLOROPLAST ULTRASTRUCTURE IN BEAN.

Salinity

Moreno-Limon (1998) reported that in the susceptible bean, line salinity caused disorganization of thylacoids in the chloroplast, dilation of organelles and wide separation of thylacoids associated with accumulation of large number of granules. While this type of anomalies did not occur in the tolerant line.

High temprature

Susceptible cultivar Flor de Mayo exposed to high temperature caused anomalies in the ultrastructure of chloroplast accompanied with an increase in the size and number of starch granules. This anomaly was not observed in the tolerant line (Moreno Limon, 1998)..

Drought

According to Moreno-Limon (1998) water stress caused break down of the membrane of the chloroplast and dilation of thylacoids with grana not distinguishable..

SIMULATED ACID RAIN CHLOPLAST

Stoyanova and Velikova (1998) reported that simulated acid rain (pH 2.4, 2.2, 2.0 or 1.8).caused changes in chloroplast structure followed until complete destruction of organelles occurred. The chloroplasts of palisade parenchyma showed different degrees of expansion of thylakoids and conformational changes of the inner membrane system. The chloroplasts of the spongy parenchyma showed a significantly higher degree of structural resistance. The ultrastructural changes of chloroplasts confirmed relative resistance of P. vulgaris to acid rain until pH 2.0..

REFERENCES

McEwen-B. et al. (1996). Physiologia Plantarum 96: 51 58..

Gaspar, J.O. and Costa, A.S. (1993). Fitopatologia Brasileira 10: 534 540..

Zielinska, I. et al. (1995). Materialy Sesji Instytutu Ochrony Roslin 35: 231-234..

Goodwin, P.H. and Sopher, C.R. (1994). Journal of Phytopathology 140: 219 226..

Appiano, A. and Redolfi, P. (1993). Protoplasma 174:116-127.

Stefani, E. et al. (1993). Journal of Phytopathology 137: 195-206..

Khandakar, N. and Bradbeer, J.W. (1989). Cytologia 54: 409-417..

Kutik, J. et al. (1988). Photosynthetica 22: 511-515.

Takacs, E. et al. (1987). Botanikai Kozlemenyek 74-75: 331-341.

Kutik, J. (1989). Photosynthetica 23: 678-681..

McEwen, B. et al. (1994). Physiologia Plantarum 90: 396-407.

Wilhelmova, N. (1994). Photosynthetica 30: 415-424..

Maiti, R.K. (1997). *Phaseolus* spp.Bean Science. Oxford IBH Book Publishing Co. Pvt. Ltd. New Delhi, India.. 534 pp.

Darwesh, M.M. (1992). Bulletin of Faculty of Agriculture, University of Cairo 43: 797-815.

Hao-SiCheng et al. (1996). Acta Agriculturae Boreali-Sinica. 11: 14-18..

Kutik, J. et al.(1988). Photosynthetica 35: 361-367..

Stoyanova, D. And Velikova, V. (1998). Biologia-Plantarum. 1998, 40: 4, 585-595; 24 ref.

DE ADQUISICIÓN
DONATIVO