



RESUMEN

El rendimiento del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en México está afectado por diferentes factores de estrés bióticos y abióticos. Por lo que es necesario seleccionar variedades resistentes para tales factores, así como estudiar las respuestas de los diferentes mecanismos de tolerancia.

El objetivo del presente trabajo es conocer la variabilidad genotípica y las respuestas morfofisiológicas, bioquímicas y ultraestructurales de algunos cultivares de frijol sometidos a diferentes factores de estrés (salinidad, altas temperaturas y sequía) que afectan el establecimiento del cultivo y de esta manera poder establecer la posible relación con los mecanismos de tolerancia a tales factores. Para el cumplimiento de este objetivo se trabajó con diferentes grupos de cultivares (mejorados y comerciales) en condiciones controladas (en cámaras bioclimáticas) y bajo un diseño experimental de bloques al azar. Se realizaron una serie de experimentos con el propósito de evaluar las características morfofisiológicas (tasa de imbibición, porcentaje de germinación, crecimiento y desarrollo), Bioquímicas (contenido de azúcares solubles, absorción de minerales, proteína total, proteínas específicas, contenido de clorofila), Asimilación de CO₂ y Ultraestructura del cloroplasto.

Respecto a la tasa de imbibición se encontró que aunque no se presentan diferencias significativas si existe un ligero efecto de la salinidad sobre ésta. En el proceso de germinación tanto en las variedades mejoradas (Marín) como en las comerciales se observó un efecto muy marcado cuando los cultivares fueron sometidos a condiciones de salinidad y temperaturas de 35°C, presentándose diferencias significativas tanto entre las variedades como entre los tratamientos. Los resultados cromatográficos en semilla germinada bajo condiciones de salinidad revelaron la acumulación de azúcares solubles, los cuales se incrementan al aumentar la concentración de la solución salina siendo mayor en las variedades Pinto Americano y Pastilla consideradas como tolerantes en comparación a las susceptibles. La acumulación de estos azúcares se considera como una adaptación, ya que reducen el potencial osmótico, y por lo tanto, el potencial hídrico aumenta.

La tasa de crecimiento es influenciada por los diferentes factores observándose diferencias en la acumulación de peso seco tanto de la parte aérea como de la raíz, esta respuesta se manifiesta tanto en los tratamientos de salinidad como en los de altas temperaturas y sequía.

En este trabajo se describe la respuesta de asimilación de CO₂ durante la fotosíntesis, en hojas de dos variedades de frijol sometidas a salinidad, alta temperatura (38 ± 2 °C)



y sequía (7 días sin riego), encontrándose que ésta disminuye en cada uno de los factores, esta respuesta podría estar respaldada por las observaciones realizadas sobre la ultraestructura del cloroplasto, donde se encontraron modificaciones a nivel de organización tilacoidal, presencia de gránulos de almidón y afectación en la morfología general del cloroplasto.



ABSTRACT

The yield of the bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Mexico is affected by different biotic and abiotic stress factors. Therefore, it is necessary to select varieties resistant to such stress as well as to study the response of the different tolerance mechanisms.

The objective of the present work is to know the genotypic variability and the morphophysiological, biochemical and ultrastructural responses of some bean cultivars exposed to different stress factors (salinity, high temperature and drought) that affect the crop establishment and in this way to establish the possible relationship of the tolerance mechanisms to such factors. In order to fulfil this objective, work was undertaken with different groups of cultivars (improved and commercial) under controlled conditions in growth chambers, under a completely randomized experimental blocks design. A series of experiments were realized in order to evaluate the morphophysiological characteristics (rate of imbibición, percentage of germination, growth and development), biochemistry (soluble sugar content, mineral absorption, total protein, specific proteins, chlorophyll content), assimilation of CO₂ and chloroplast ultrastructure.

With respect to the rate of imbibition it was observed that although no significant differences were present, there existed a slight effect of the salinity on it. In the germination process both in the improved (Marín) as well as in the commercial varieties it was observed a very marked effect when the cultivares were submitted to the conditions of salinity and temperatures of 35°C, showing significant differences between the varieties as well as between the treatments. The chromatographic results of the germinated seeds under conditions of salinity revealed an accumulation of sugar, which increased with an increase in the concentration of the saline solution being greater in the varieties, Pinto Americano and Pastilla, considered as tolerant. The accumulation of these sugars is considered as an adaptation, since it reduces the osmotic potential, and therefore, the water potential increases.

The growth rate is influenced by the different factors observing differences in the dry weight accumulation both in the aerial part and in roots. This response is manifested in the salinity, high temperatures and drought treatments.

In this work it is described the response of CO₂ assimilation during photosynthesis (leaf) in the two varieties of bean exposed to salinity, high temperature (38 ± 2°C) and drought (7 days without irrigation), observing that this is reduced under each of the stress factors. This response would be supported by the observations realized on the chloroplast ultrastructure, where modifications at the level of thylacoidal organization, presence of starch granules and effects in the general morphology of the chloroplast were found.



I. INTRODUCCION

A pesar del desarrollo tecnológico en el área agrícola, actualmente un gran porcentaje de nuestra población sigue dependiendo del frijol como fuente importante de proteínas y carbohidratos. El frijol común es sin duda la especie económicamente más importante, ya que está cultivada en seis continentes, en mayor parte por su grano seco o por su vaina verde.

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), es uno de los cultivos principales de América Latina, África y muchos otros países, llegando a un límite su rendimiento óptimo gracias a la contribución de los mejoradores, sin embargo, la diversidad de ambientes prevalecientes en las regiones de crecimiento, afectan su rendimiento.

Los principales factores que limitan la producción de frijol en América Latina son sequía, plagas y enfermedades causadas por patógenos (Schoonhoven, *et al.*, 1989), mientras que en África son las prácticas agronómicas pobres, deficiencia de fertilidad del suelo, susceptibilidad a la sequía, competencia con malezas, enfermedades e insectos, así como virus, bacterias y hongos (Allen *et al.*, 1989). En México los problemas para los cultivos en general están en relación con el establecimiento del cultivo, alta y baja temperatura, salinidad, suelo pobre en nutrientes y factores bióticos principalmente (Maiti, 1986, 1996).

En relación a la superficie sembrada, México se sitúa en cuarto lugar a nivel mundial con respecto a su superficie cosechada, superado solo por la India, Brasil y China (INEGI, 1991; FAO, 1992), sin embargo, a pesar de su importancia, los rendimientos se han quedado muy bajos, se estima que el rendimiento promedio mundial está cerca de 650 Kg/ha, lo que es por debajo del rendimiento potencial de 4,500 a 5,000 Kg/ha (INEGI, 1991; FAO, 1992; Gepts, 1994). Las diferencias en rendimiento son quizás debido a que no se han aprovechado suficientemente los recursos genéticos de estas especies para aumentar el potencial de rendimiento de las variedades, así como incrementar su resistencia o tolerancia a factores bióticos o abióticos que impiden la expresión del rendimiento potencial, o bien las variedades seleccionadas para cada región no son adecuadas.

Es conveniente explorar diferentes metodologías para la caracterización de respuestas a factores adversos como salinidad, altas temperaturas y sequía, las cuales podrían utilizarse para el mejoramiento genético del cultivo y así incrementar la producción y el rendimiento en las regiones semiáridas.



II. ORIGINALIDAD

La productividad de frijol bajo condiciones de aridez es afectada grandemente por diferentes condiciones de estrés abióticos como sequía, salinidad y altas temperaturas afectando la emergencia y establecimiento inicial del cultivo. La mayoría de los trabajos de mejoramiento genético o selección de variedades están enfocados en la etapa adulta del cultivo, existiendo pocos trabajos en México sobre esta área aunque existen numerosos trabajos a nivel internacional dedicando la investigación a la selección de variedades o líneas resistentes en la fase inicial del cultivo y posteriormente el mejoramiento genético para su resistencia a tales factores. El presente trabajo se enfoca en los tres principales factores de estrés, permitiendo la selección y el estudio de diferentes respuestas relacionadas con algunos mecanismos, lo que puede servir en un futuro para el mejoramiento genético a nivel tradicional y biología molecular.



III. HIPOTESIS

Las variedades de frijol muestran diferentes respuestas morfofisiológicas, bioquímicas y de ultraestructura, las cuales están asociadas con el grado de adaptabilidad a condiciones adversas.

El grado de adaptabilidad bajo diferentes condiciones de estrés, podría estar relacionado con la acumulación de diferentes compuestos químicos con funciones osmorreguladoras.

IV. OBJETIVOS

Objetivo General

- Conocer el grado de respuesta de algunas variedades de frijol a condiciones de estrés (salinidad, altas temperaturas y sequía), a través de la posible relación que guardan algunas características (morfofisiológicas, bioquímicas y de ultraestructura) con su grado de adaptabilidad a condiciones adversas.

Objetivos Particulares

- Determinar los componentes morfofisiológicos relacionados con la tolerancia a diferentes factores de estrés en etapa de germinación y plántula.
- Evaluar algunos componentes bioquímicos (azúcares solubles, minerales, proteína total, proteínas específicas y contenido de clorofila) relacionados con la tolerancia a diferentes factores de estrés, en la etapa de germinación y plántula.
- Conocer, mediante microscopía electrónica de transmisión las modificaciones estructurales de cloroplastos, en hoja de plántulas de frijol sometidas a los diferentes factores de estrés.
- Determinar la asimilación de CO₂ en plántulas sometidas a salinidad, altas temperaturas y sequía.



V. REVISIÓN DE LITERATURA

Características Generales

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 irradiancia, la calidad espectral, el fotoperiodo 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; Kuhlemeier *et al.*, 1987; Quail, 1991; Thompson y White, 1991; Chamovitz y Deng, 1996).

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 y Schmidt, 1986).

La variabilidad en las condiciones abióticas afectan considerablemente la producción y el rendimiento de las especies cultivadas, razón por la cual un gran número de investigadores trabajan conjuntamente para el mejoramiento genético de los cultivos. Las investigaciones incluyen: 1) estudiar el efecto de la salinidad, sequía y otros factores abióticos sobre la producción de frijol; 2) evaluación y selección de especies silvestres para su resistencia a diferentes factores de estrés; 3) estudiar los mecanismos de resistencia a los diferentes factores de estrés; y 4) incorporación de resistencia a los factores de estrés a los cultivos (Popa y Dinca, 1985; Yonts *et al.*, 1985; CIAT, 1986-1988, Schoonhoven y Pastor-Corrales, 1987; Parjol-Savulescu *et al.*, 1985; Comic *et al.*, 1987 y Vlad y Pretorian, 1986).

Respuestas a la Salinidad

La salinidad es una de las causas más importantes en la pérdida de tierras agrícolas y de la productividad en muchas partes del mundo, la utilización de variedades resistentes es la solución económicamente viable (Flowers *et al.*, 1977; Yeo y Flowers, 1980).

En las regiones donde la precipitación pluvial es baja y las temperaturas son elevadas, existe la tendencia a la acumulación de sales solubles cerca de la superficie del suelo, en la época de lluvias las sales son arrastradas a estratos inferiores del suelo, pero el alto índice de evaporación de la época de sequía las retorna a las capas superiores (Sandoval, 1991).



Sin incluir los desiertos, hay 4,000,000 de Km² de tierras afectadas por la salinidad en el mundo y con una tendencia a incrementarse cada año. La presencia de las sales provocan un aumento en la presión osmótica que se añade a la presión del agua en el suelo, e incrementa el contenido hídrico del mismo en el punto de marchitamiento, la capacidad de campo no puede incrementarse y en consecuencia la capacidad de retención del agua es baja. En estas condiciones, la planta sufre de escasez de agua (Alvarado, 1990; Rojas, 1993).

Efectos sobre la Germinación

Dentro de los eventos que se relacionan con la semilla se encuentran los que modifican su viabilidad, la mayoría de los trabajos mencionan una reducción en la capacidad de germinación de la semilla sometida a estrés salino (Pan, 1984; Malibari *et al.*, 1993). Otro trabajo es el de More y Malewar (1988), quienes al sembrar sorgo y algodón en macetas encontraron que el suelo salino reducía el porcentaje de germinación y la acumulación de peso seco, mostrando variación ambos entre las variedades estudiadas. Maiti *et al.* (1985), en un estudio sobre germinación de 25 líneas de sorgo en soluciones de NaCl y CaCl₂, encontraron que el porcentaje de germinación puede ser usado como un indicador confiable de la resistencia a la salinidad.

Así mismo Verma *et al.*, (1985) realizaron un experimento con ocho variedades de sorgo y seis niveles de salinidad (rango de 0-200 meq/l), para evaluar la germinación de semillas y la tolerancia de la plántula a la salinidad. Ellos observaron que en las variedades IS-3383 y IS-3193-1 la germinación no se veía afectada en niveles de 40 meq/l, pero en niveles de concentración más altos el cultivar IS-3193 presentaba sensibilidad.

Además Igartua *et al.*, (1994) opinan que es necesario establecer la respuesta del maíz sometido a estrés salino en las primeras etapas de desarrollo y determinar la contribución relativa de los efectos de la salinidad durante la imbibición y después de iniciada la germinación a la fase final de la emergencia.

Efectos sobre el Crecimiento y Desarrollo

Algunos trabajos sobre el efecto de la salinidad en el crecimiento del maíz utilizando soluciones nutritivas para un mejor control de las concentraciones salinas, han demostrado, que incrementos en la salinidad reducen la altura y longitud de la raíz, el peso específico de la hoja, el área foliar y la producción de materia seca (Mishra *et al.*, 1994).

El crecimiento es afectado por la salinidad, siendo comprobado por Couglan y Wynjones (1980) quienes, al experimentar con espinaca, encontraron una disminución del peso fresco al ser sometida a la salinidad.

En un trabajo, bajo condiciones hidropónicas, con distintas líneas de sorgo provenientes



de distintos lugares y sometidas a salinidad, se encontró que el NaCl provocaba la disminución de la longitud del tallo y la raíz además de la disminución en el peso seco (Azhar y McNeilly, 1989), estos resultados concuerdan con los encontrados por Cramer *et al.*, (1988) y Venter y Van de Venter (1988) quienes además concluyen en que es más significativo el efecto de salinidad sobre el crecimiento de la plántula (reducción en la acumulación de materia seca, la altura de la planta y en el desarrollo de la raíz) en comparación con la tasa de germinación bajo las condiciones del experimento.

De acuerdo con Khan y Ashraf, (1988) las plántulas de ocho días de edad de cuatro cultivares de sorgo colocadas en solución Hogland durante 8 días y posteriormente sometidas a estrés de salinidad durante 16 días con NaCl, mostraron una disminución en el peso seco de las plántulas y la longitud de raíz. Los cuatro genotipos, de mayor a menor tolerancia a la salinidad fueron: IS-1347 (GIZA10); IS-18348; IS-E 35 y IS-4807.

La salinidad es un factor que inhibe el crecimiento, produce disminución de la fotosíntesis causada por la reducción de la apertura de los estomas en cultivos de maíz y frijol; pero la fertilización con O_2 tiende a restaurar el crecimiento normal, grosor de hoja, área foliar y la elongación de entrenudos (Schwarz, 1984 y Kayani, 1988). Se ha observado que el NaCl disminuye la fluidez de la membrana celular (Lynch, 1988), el crecimiento del tallo y las raíces (Soliman, 1988), el crecimiento de las yemas (Pan, 1988), disminuye la absorción del ion NO_3 (Kostyukovich, 1988), en el polen de las plantas cultivadas en medio salino afecta la actividad de la amilasa e invertasa (Dhingra, 1986). Se afecta además la diferencia de potencial entre embrión-endospermo, la plúmula y radícula (Rubtsova, 1984), se presenta reducción del área foliar y la proporción del peso de la hoja (Cramer *et al.*, 1994).

En general el crecimiento de las líneas de maíz disminuye, conforme aumenta la concentración de NaCl; siendo más notable en las líneas sensibles (Maliwal y Paliwal, 1984).

Efectos sobre la Fotosíntesis

La influencia de soluciones salinas de cloruro de sodio, cloruro de calcio o sulfato de sodio de 2.5×10 dS/m en los procesos fotosintéticos de *Phaseolus vulgaris* cv. Vaghya fueron estudiados. El contenido de clorofila se reduce en plantas sometidas a salinidad de cloruro, contrario a lo observado en plantas tratadas con sulfato. Los rangos de asimilación de CO_2 en la fotosíntesis son marcadamente afectados por la solución salina de cloruros. Un análisis de los productos fotosintéticos en un corto tiempo (1 h) revelan que la incorporación de radioactividad reduce la sacarosa, esta reducción es acompañada con un incremento en la asimilación de CO_2 en la fracción de fosfato y aminoácidos (Bhivare *et al.*, 1988).

Efectos sobre Componentes Bioquímicos

Bajo condiciones de salinidad se han realizado una serie de estudios bajo



diferentes cultivos y plantas en general, estableciendo que éstas sufren cambios que se manifiestan en diferentes aspectos fisiológicos y bioquímicos que pueden indicar la capacidad de tolerar los efectos de la salinidad. Al respecto Coughlan y Wynjones, (1980), Khair, (1986), (He y Tang (1993) y De La Rosa (1993), han demostrado en diferentes cultivos, que existe un incremento en la acumulación de minerales con funciones de osmorregulación. Se reportan también incrementos de diferentes compuestos orgánicos (Coughlan y Wynjones, 1980), y aumento en la producción de hormonas y diferentes compuestos bioquímicos y fitoreguladores (Amzallag *et al.*, 1990).

La síntesis de aminoácidos y proteínas totales se ve incrementada bajo condiciones de salinidad en las líneas tolerantes en comparación con las líneas susceptibles (Leigh *et al.*, 1981; Huber y Sankhla, 1980; Hanson y Nelsen, 1978; Coughlan y Wynjones, 1980; De La Rosa Ibarra, 1993).

Por otro lado se ha observado que una de las variaciones fenotípicas en las plantas no halófitas resistentes a la salinidad radica en la eficiencia de eliminar el exceso de sales de las hojas (Trough y Donaldson, 1972; Greenway y Munns, 1980).

Contenido de Azúcares Solubles: La osmorregulación se puede definir como la capacidad que tienen las plantas para poder mantener niveles osmóticos bajos (es decir con altas concentraciones de solutos) en el citoplasma. Algunos aminoácidos como las betainas, la prolina, algunos azúcares y azúcares alcohólicos capacitan a la planta para dicho fenómeno (Coughlan y WynJones, 1980).

Poffenroth *et al.*, (1992) mencionan que la sacarosa presente como osmorregulador tiene como origen el metabolismo fotosintético de la célula guarda o bien la descomposición de almidones en la célula inducida por algún factor externo.

Contenido de Minerales: Coughlan y Wynjones (1980) observaron que al someter a la espinaca (*Spinacea oleracea*) a salinidad se incrementaba el contenido de sodio y cloro, pero el potasio se mantuvo estable en todas las concentraciones salinas estudiadas. Sin embargo He y Tang (1993) reportaron un incremento en la acumulación de potasio (P^+) en la raíz de sorgo al estudiar el efecto de estrés osmótico.

Mientras que De la Rosa (1993), después de haber evaluado 17 líneas de sorgo "glossy" sometidas a 200 mM de NaCl reporta que cuatro líneas que se sometieron a diferentes niveles salinos (0.05, 0.10, 0.15, 0.20 y 0.25 M) acumularon más sodio principalmente en la vaina y menos cantidad en la lámina foliar.

Por otro lado Khair (1986) encontró una relación entre la acumulación de calcio (Ca^+) en la hoja y la tolerancia a la salinidad, cuando trabajó con seis variedades de sorgo. En ese estudio la variedad más resistente fue Abu-Sabeen.



Proteínas Específicas: Existen diversas investigaciones acerca de la presencia de proteínas que intervienen en la tolerancia a la salinidad en diferentes cultivos (Hurkman y Tanaka, 1987; Singh *et al.*, 1985, 1987; Ramagopal, 1986; Ben-Hayyim *et al.*, 1989) demostrando que la salinidad promueve la síntesis de proteínas específicas de estrés de salinidad (SSSP, salt stress specific-protein), provocando un aumento (Levitt, 1972) o una disminución (Dubey, 1982) en el contenido de proteína total según la especie. Los trabajos en este aspecto (Ericson y Alfinito, 1987; Singh *et al.*, 1985; Ben-Hayyim *et al.*, 1989) fueron realizados en cultivo de tejidos por la facilidad de controlar las variables y poder preservar una línea de células resistentes a la salinidad. Aunque está bien establecido que la tolerancia y la sensibilidad de los genotipos dependen de su constitución genética y bioquímica, ha sido muy difícil precisar el dominio genético responsable de la expresión de adaptabilidad a la salinidad que guía la síntesis de esas proteínas en las plantas adaptadas a la salinidad. Los mecanismos de acción de estas proteínas no se conocen con claridad.

De acuerdo con Singh *et al.*, (1985) en cultivo de células de tabaco, el proceso de adaptación celular al estrés osmótico (estrés salino) en el ambiente salino involucra una alteración específica en la expresión génica de las células adaptadas que induce la síntesis de proteínas *de novo*, incluyendo la predominancia de una proteína de 26 kD, llamada osmotina. Esta se considera como proteína única asociada a células de tabaco adaptadas a la salinidad (Singh *et al.*, 1987). Es interesante decir que la síntesis de la osmotina no es inducida por el choque osmótico porque comienza solo cuando las células son adaptadas a NaCl o PEG (Singh *et al.*, 1985). Se estima que el papel de la osmotina sea inducir en la célula el ajuste osmótico al facilitar la acumulación de solutos o al permitir alguna alteración metabólica en la célula.

Ericson y Alfinito (1987) encontraron la presencia de 2 polipéptidos (20 y 32 kD) en forma más abundante en células de tabaco adaptadas a la salinidad que en células no adaptadas. En variedades resistentes de maíz se encontró un polipéptido con peso molecular de 26 kD (Ramagopal, 1986). En otros estudios se han encontrado resultados similares, generalmente proteínas de bajo peso molecular.

En arroz se encontró que los patrones de proteínas de las líneas susceptibles y tolerantes, mostraron diferencias creciendo en presencia y ausencia de NaCl. Las líneas tolerantes poseían una proteína de 28 kD 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. Osbeck, 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 kD relacionada con líneas resistentes a la salinidad (Ben-Hayyim *et al.*, 1989).



Efectos sobre la Ultraestructura del Cloroplasto

Este factor en plantas de maíz afecta el grosor de la lámina media, tamaño, número de células y cloroplastos (Tretyakov *et al.*, 1985).

La membrana que envuelve al cloroplasto se rompe, los tilacoides se dilatan, hay distorsión de cloroplasto (Roth *et al.*, 1996).

Los grana no se distinguen fácilmente y hay mucha acumulación de lípidos (Ristic y Cass, 1992).

Respuestas a las Altas Temperaturas

La temperatura influye directamente en los procesos fisiológicos relacionados con la producción de grano. En los trópicos semiáridos, la presencia de temperaturas subletales y letales para los cultivos es constante. Este factor puede presentarse en dos facetas: a) altas temperaturas en el suelo (etapa germinativa), la cual reduce el porcentaje de emergencia y b) altas temperaturas en el ambiente, (Maiti, 1996).

Estudios sobre el efecto de la temperatura del suelo sobre el crecimiento de la raíz y el vástago del frijol, han demostrado que el mayor crecimiento se presenta entre los 20 y 30°C, mientras que a 5, 10 y 35°C se produce poco crecimiento, atribuyéndose esto a la tensión hídrica causada por la absorción del agua, tanto a temperaturas bajas como altas (Brower, citado por Kramer, 1974).

Para el maíz las temperaturas subletales y letales van desde los 40 y 45°C donde se presenta gran variabilidad en el crecimiento y la acumulación de materia seca en plántulas sometidas a altas temperaturas (Martiniello y Lorenzoni, 1985; Bonham-Smith *et al.*, 1988; Maiti *et al.*, 1996).

Efectos sobre la Fotosíntesis

Las altas temperaturas afectan las funciones fotosintéticas de las plantas, modificando la proporción de las reacciones químicas y la organización estructural. El PSII, particularmente, es el componente más sensible del sistema fotosintético (Berry y Bjorkman, 1980). Las altas temperaturas extremas afectan el funcionamiento del sistema de producción de O₂ (Yamashita y Butler, 1968), resultando en la liberación de iones de Mn funcional del complejo (Nash *et al.*, 1985). El PSII también responde a un rango de bajas temperaturas causando inhibición o destrucción del complejo con consecuencias en el funcionamiento y organización tilacoidal. La separación de los grupos antena (LHCII) induce la formación de almidón en la grana (Gounaris *et al.*, 1984).

La información disponible sobre el efecto de las altas temperaturas en la fotosíntesis está relacionada con la respuesta a largos períodos en los cuales las plantas son capaces de modificar sus funciones fotosintéticas, incrementando su tolerancia y



capacidad térmica óptima para la asimilación de CO₂, o con pasos individuales hacia el proceso y partes aisladas de la maquinaria fotosintética. Sin embargo consideraciones fluctuables de temperatura ocurren en un rango de tiempo de pocos minutos a horas y el proceso fotosintético por consiguiente tiene que ser ajustado.

Pastenes y Horton, (1996) evaluaron el efecto de las altas temperaturas en la asimilación de CO₂, contenido de metabolitos y capacidad para reducir el poder de producción en condiciones de no fotorrespiración, en dos variedades de frijol (BL y BA). La variedad BA mantiene sus funciones fotosintéticas por más largos períodos de tiempo bajo temperaturas extremas comparadas con la variedad BL. La proporción de asimilación de CO₂ se incrementa por aumento de temperatura, con una disminución en la proporción de sus valores a diferentes temperaturas de 10 °C, esto sugiere que las limitaciones en la asimilación de CO₂ son causadas por restricciones metabólicas que pueden diferenciarse entre los que ocurren en un rango de 20 a 30 °C y 30 a 35 °C.

Las respuestas sobre el metabolismo de carbón han sido casi exclusivamente interpretadas como el efecto sobre la disponibilidad de CO₂. Ha sido demostrado que la difusión de CO₂ y O₂ así como la afinidad para la carboxilación de la enzima Rubisco se afecta por incrementos en la temperatura (Hall y Keys, 1983; Jordan y Ogren, 1984; Brooks y Farquhar, 1985), pero se ha discutido o argumentado que en la estimulación de la fotorrespiración no puede explicarse completamente el efecto de alta temperatura, sugiriéndose que la restricción en el transporte de electrones puede ser limitado por el suministro de la RuBP (Berry y Bjorkman, 1980).

También se ha considerado que cambios en la temperatura inducen variaciones en la actividad de las enzimas, y que a causa de estas diferencias en valores de Q₁₀ (Pollock y Rees, 1975) tales variaciones no son las mismas para todas las enzimas funcionales en un camino particular. En fotosíntesis, particularmente en las reacciones que involucran directamente la asimilación de CO₂ y la síntesis de sacarosa y almidón.

Efectos sobre Componentes Bioquímicos

Se presentan variaciones en los niveles de aminoácidos en plántulas de maíz de tres días de edad (glutamina libre, lisina y arginina total, entre otros) cuando eran sometidas a una temperatura de 45 °C por 12 horas (Tadic, 1982). Otra respuesta es la producción de hormonas vegetales (Rojas, 1993). Bonham-Smith *et al.*, (1998) demostraron que la aplicación de ABA aumenta la capacidad del maíz a soportar temperaturas superiores a los 40 °C.

Proteínas Específicas (Choque Térmico): A nivel molecular una de las mejores caracterizaciones a las condiciones ambientales es la respuesta a las altas temperaturas. Hace más de 10 años se demostró en organismos que van desde bacterias hasta humanos que responden a temperaturas elevadas reprimiendo la síntesis normal de proteínas y mRNAs, e iniciando la transcripción y transducción de un pequeño



grupo de proteínas, denominado proteínas de choque térmico (HSPs) (Arrigo y Welch, 1987; Neumann, *et al.*, 1989; Nover *et al.*, 1984; Lindquist, 1986; Morimoto *et al.*, 1990 y Nover, 1990; Kimperl y Key, 1985; Lindquist y Craig, 1988).

Algunas de estas proteínas tienen pesos moleculares relativamente elevados (por ejemplo, es común que las HSPs de 70 kilodaltones aparezcan en muchos organismos, incluyendo plantas), pero el grupo que oscila de 20 a 30 HSPs con pesos moleculares bajos (15 a 27 kD) es exclusivo de las plantas. Las HSPs aparecen con rapidez, pues, por lo general se convierten en una porción considerable del total de proteínas en los 30 minutos siguientes a una variación comprendida entre 28 °C y 41 °C. Su síntesis continúa realizándose durante las siguientes 3 o 4 h, pero después de 8 h, el patrón de síntesis es esencialmente el mismo que tenía con la temperatura baja inicial. Las HSPs también aparecen cuando es gradual el incremento en la temperatura, como ocurre en condiciones naturales. Tres o cuatro horas después de regresar a la temperatura normal ya no se producen HSPs, aunque muchas de ellas aun están presentes, lo cual indica que son muy estables.

La síntesis de proteínas de choque térmico (HSPs Heat Shock Proteins) ocurre en tejidos transcripcionalmente activos y se expresan cuando las plantas sufren de manera natural un incremento gradual de la temperatura. El grado de estrés de diferentes genes varía entre las especies y aún dentro de un mismo organismo (Voelmy, 1994; Vierling, 1991). Las HSPs tienen un papel en la estabilización de las proteínas, ensamblaje, transporte a través de la membrana y la modulación de los receptores (Vierling, 1991). Generalmente los niveles de HSPs (*de novo* y preexistentes, como las HSPs60 HSPs70) aumentan a partir de los 33 °C intensificando su síntesis al aumentar la temperatura (Heikkila *et al.*, 1984; Cooper *et al.*, 1984 y Cooper y Ho, 1987). La producción de proteínas en respuesta a temperaturas altas fue estudiada por Heikkila *et al.*, (1984), quienes encontraron en mesocotilos de plántulas de maíz la intensificación de dos tipos de proteína con peso molecular de aproximadamente 70,000 Daltones. Cooper *et al.*, (1984), encontraron que la intensidad y duración de la síntesis de proteínas HSPs en respuesta a un tratamiento de 40 °C fue diferente entre varios tejidos de maíz. Dos líneas de maíz, una resistente y la otra susceptible, fueron sometidas a estrés de sequía y de alta temperatura, no encontrando diferencias en sus patrones de proteínas, sintetizando proteínas de 43-45 kD, evento poco común para maíz, sin embargo el daño de ambos factores a la membrana tilacoidal y plasmática fue similar (Ristic *et al.*, 1991).

Se ha encontrado que las HSPs participan en la inducción de tolerancia al calor, lo cual probablemente se lleve a cabo protegiendo a las enzimas esenciales y los ácidos nucleicos de la desnaturalización provocada por el calor. Sin esta protección, los ácidos nucleicos podrían ser fragmentados por los iones metálicos específicos que desde el exterior (o desde la vacuola) entran al citoplasma a medida que las membranas se hacen más permeables a las temperaturas elevadas (Vierling, 1991).



Se ha establecido que algunas de las HSPs y en general las proteínas del estrés son también sintetizadas en otras condiciones adversas tales como anoxia, adición de azida de sodio, cambios en el pH (Heyde y Portalier, 1990), condiciones adversas de oxígeno (Begonia y Salin, 1991), cambios de presión (Qoronfleh y Streips, 1987), exposición a luz ultravioleta, infección viral, transformaciones malignas, inflamación (Kaufmann, *et al.*, 1990), presencia de 2,4-dinitrofenol (Heyde y Portalier, 1990), de agentes oxidantes (Farr y Kogoma, 1991).

Las principales HSPs han sido clasificadas en cuatro familias de acuerdo a los pesos moleculares que presentan: a) HSPs de alto peso molecular, variando entre 83 y 90 kD; b) HSPs 70, cuyos pesos varían entre 66 y 78 kD; c) HSPs 60, que han sido encontrados en bacterias, mitocondrias y cloroplastos y a las que se les ha llamado "chaperoninas" (Hemmingsen, *et al.*, 1988) y d) HSPs de bajo peso molecular, la cual comprende un diverso grupo cuyos pesos varían entre 15 a 30 kD.

Está bien establecido que en condiciones normales no estresantes la mayoría de las HSPs están presentes en bajas concentraciones en las células, lo que sugiere que en todo tiempo tienen funciones indispensables, sin embargo, durante la situación de estrés su síntesis se incrementa hasta 100 veces, disminuyendo posteriormente cuando cesa la condición tensionante (Palter *et al.*, 1986).

Efectos sobre la Ultraestructura del Cloroplasto

Pastenes y Horton (1996), concluyeron que la organización de los tilacoides en frijol, observada a 30-35 °C incrementa la excitación de electrones, induciendo a la vez un incremento 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, 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 también 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.*, 1991).

Las altas temperaturas afectan la fotosíntesis alterando la distribución de energía por cambios en la estructura de los tilacoides (Berry y Bjorkman, 1980; Weis y Berry, 1988) y por cambios en la actividad del ciclo de Calvin y otros procesos metabólicos tales como la fotorrespiración y síntesis de productos. Mucha de la atención ha sido enfocada al



aspecto anterior, donde los tilacoides son altamente sensibles al calor.

Respuestas a la Sequía

Existe una creciente necesidad de incrementar la producción en las zonas áridas y semiáridas del mundo. En estas zonas la sequía afecta grandemente el establecimiento de los cultivos y su rendimiento. La sequía es un factor muy complejo que no implica solamente bajas precipitaciones, ya que conjuntamente se presentan otros problemas como las altas temperaturas ambientales y del suelo, formación de costra y bajas condiciones de resistencia de humedad (Jordán, 1983 y Maiti, 1981, 1986).

En las zonas subtropicales la sequía periódica originada por una distribución irregular de las lluvias, causa severas reducciones en los rendimientos de los cultivos como el maíz y el sorgo (Wolf *et al.*, 1974). Algunas estimaciones revelan que la sequía causa en promedio un 15% de pérdida en la producción de los cultivos; sin embargo, es necesario considerar que ésta también implica el uso de fertilizantes, insecticidas y otros insumos, por lo que seguramente éste factor sea responsable de mayores pérdidas económicas (Wolf *et al.*, 1974 y Jordán, 1983).

La resistencia a la sequía se refiere a la capacidad de una planta para sobrevivir, reproducirse y rendir su producto económico con una disponibilidad limitada de agua. Al parecer, los mecanismos responsables de la sobrevivencia de una especie son diferentes de aquellos que proporcionan una máxima producción económica en plantas bajo estrés (Qualset, 1979).

Efectos sobre la Germinación

Se ha demostrado que existen diferencias en los requerimientos de humedad del suelo para la germinación de semillas de distintas especies (Adebona y Ayisire, 1979). La sequía es un factor que inhibe marcadamente la germinación, pero para que se presenten diferencias aparentes entre los híbridos de maíz es necesario aplicar un grado de sequía severa. Un método para seleccionar genotipos, resistentes a la sequía es la capacidad de germinación en un medio hiperosmótico. Las líneas seleccionadas mediante este método manifiestan ventaja sobre la población original en condiciones tanto de humedad como desfavorables en etapa de plántula (Castellanos, 1992). Trabajando bajo este concepto, López-Nuño (1994), demostró que el incremento en la presión osmótica causada por soluciones de manitol, entre otros efectos, provocan una disminución en el porcentaje de germinación.

Efectos sobre el Crecimiento y Desarrollo

Diferentes investigaciones han demostrado que los genotipos de frijol responden de manera diferente al estrés de sequía. Acosta-Gallegos, *et al.*, (1988) y Kohashi-Shibata y Uscanga-Martera (1989) encontraron diferencia entre el rendimiento de grano en variedades sometidas a sequía en diferentes etapas de desarrollo. Sponchiado



et al., (1989) menciona que el potencial de profundidad de la raíz está determinado genéticamente. Se ha demostrado que el número de raíces secundarias en genotipos sin riego en comparación con el testigo es mayor.

Las características relacionadas con las adaptaciones de frijol en condiciones de semiaridez en Kenya fueron estudiadas por Itulya, *et al.*, (1986) seleccionando 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 del suelo son considerados para la evaluación de los cultivares de frijol para su adaptación a tales condiciones (CIAT, 1987).

Los mecanismos de adaptación a la sequía fueron estudiados en CIAT (1988), evaluando longitud de hipocotilo, persistencia de raíz principal, fibrosis general y abundancia de raíz secundaria en 100 genotipos de frijol. El crecimiento de la raíz es 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 características para su adaptación a condiciones de estrés comparado con los progenitores de la misma región.

El estrés de humedad reduce severamente el índice de 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).

Los efectos fenotípicos y ambientales sobre las características de 18 cultivares de *P. vulgaris* fueron estudiadas por Acosta-Gallegos *et al.*, (1988) en 11 características morfológicas y fenológicas. Se muestra que el efecto en la variación ambiental y la interacción cultivar-ambiente fue significativa. La variación de los componentes en los cultivares fue importante para el número de días a floración y grosor de tallo. La presencia de mayor variación ambiental sugiere la posibilidad de incrementar el rendimiento a través de prácticas culturales que permitan una máxima captación y utilización de la precipitación. En este proceso se pueden obtener cultivares con una amplia adaptación y tolerancia a la sequía.

El efecto relativo del tallo y la raíz de diferentes genotipos de frijol sobre el rendimiento bajo condiciones de sequía fueron reportados por White y Castillo (1989) mostrando que los genotipos con abundante raíz tienen un efecto significativo sobre rendimiento de semilla, pero los genotipos de tallo ancho no tienen efecto. No hay interacción entre el tallo y la raíz, demostrando que las características de tallo son de menor importancia. Así mismo Sponchiado *et al.*, (1989) demostraron en un estudio que el crecimiento de la raíz de cuatro cultivares de frijol está relacionado con la tolerancia a la sequía en diferentes ambientes y en diferentes tipos de suelo. Por su parte Maiti *et al.*, (1996) en



19 cultivares de maíz sometidos a sequía, encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y cultivares en el peso seco de tallo y la altura en etapa de plántula. Ellos demostraron que existen cultivares que pueden ser resistentes a más de un factor de estrés.

El estrés de humedad afecta el crecimiento del foliolo central de la hoja de *P. vulgaris* (Kohasi-Shibata y Uscanga-Mortera, 1989). Del mismo modo, se ha encontrado que los índices morfofisiológicos están relacionados con el crecimiento y productividad de plantas bajo condiciones de sequía, donde los cultivares resistentes muestran una alta actividad metabólica (Parjol-Savulescu *et al.*, 1985).

De acuerdo con Cumpa Reyes *et al.*, (1988) existe una relación lineal entre la producción de materia seca y la evapotranspiración, ellos desarrollaron un modelo logístico que explica el efecto de niveles de humedad relacionados con la tasa de producción de materia seca y evapotranspiración.

El número de granos, tasa de crecimiento y acumulación de biomasa es menor (Lorens, 1987). Existen plantas de maíz tolerantes a este estrés debido al aumento de prolina en las raíces (Thakur, 1987), también se encontró incremento de esta sustancia en las hojas (Niemi y Hasan 1988), y a la baja tasa de evapotranspiración (Wang y Hu, 1988).

Tanguling y Otoole (1987), demostraron que el potencial de agua en las hojas inferiores, la elongación y el rango de transpiración en plantas de arroz sujetas a estrés hídrico declinaron más rápidamente que en el maíz y en la soya.

La respuesta y tolerancia de los tejidos de plantas a la reducción del potencial del agua en la hoja, pueden involucrar varios procesos fisiológicos y metabólicos. El mantenimiento del crecimiento bajo agotamiento de la humedad del suelo puede servir como una medida de la tolerancia de la planta bajo estrés. La medida del crecimiento y la interpretación de los resultados son difíciles de evaluar debido a las interacciones complejas en tamaño entre los órganos (Thomas *et al.*, 1976; Begg y Turner, 1976).

Ajustes osmóticos diurnos y estacionales en respuesta al estrés de humedad se han encontrado en sorgo por Jones y Turner (1978) y las diferencias genóticas para estos aspectos fueron estudiados por Stout y Simpson (1978). Bajo condiciones de una alta evaporación, se demostró que existe una disminución en el potencial osmótico y que contribuye a la expansión foliar en el sorgo (Acevedo *et al.*, 1971).

En consecuencia se encuentra que existen diferentes mecanismos en las plantas para soportar la sequía y los genotipos muestran un amplio rango de variabilidad (Blum, 1974; Seetharama, 1980).

Las variedades Fundelea 332 se reportan en Rumania como un cultivo prometedor 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).

Efectos sobre la Fotosíntesis

Uprety (1989) estudió la capacidad fotosintética de *P. radiatus* encontrando que se reduce bajo la influencia de estrés de humedad.

Mientras que Sharkey y Seemann, (1989) estudiaron el efecto del estrés hídrico sobre los intermediarios del ciclo de carbono, la actividad de la carboxilasa de ribulosa bifosfato y la homogeneidad espacial de la fotosíntesis en las hojas de *P. vulgaris*. La tasa de actividad y la concentración de ribulosa bifosfato antes y después de la incubación con CO_2 y Mg^{2+} fueron poco reducidos por la sequía severa, pero no por la sequía ligera, la concentración de fosfoglicéridos fue reducida por ambas condiciones de sequía.

Por otro lado Li y Walton (1990) reportaron que la ciclohexamida bloquea la biosíntesis de ácido abscísico y provoca un aumento de la apertura estomática en plantas bajo condiciones sin y con estrés.

Efectos sobre Componentes Bioquímicos

Existe gran variedad de condiciones ambientales (físicas, químicas o biológicas) a las cuales los organismos deben adaptarse y que provocan en la mayoría de los casos estados de estrés para las células. Morimoto, *et al.*, (1990) establecieron que casi todos los organismos responden a estas condiciones induciendo la síntesis de proteínas conocidas como proteínas del estrés, las cuales probablemente funcionan protegiendo a las células del cambio adverso, el cual podría ser letal.

Contenido de azúcares solubles: Las plantas en condiciones de sequía experimentan cambios en el contenido de sus carbohidratos como un reflejo de las alteraciones en su metabolismo (Maiti, 1986).

Ijin (1957) señaló que en las hojas marchitas, el almidón desaparece y los azúcares se acumulan simultáneamente. En tres especies de *Rumex* después de perder un 20% de agua, reportan incrementos en el contenido de azúcares de un 49 a un 96%, después de algunas horas; cuando *Inula viscosa* fue sometida durante 36 horas a diferentes condiciones de humedad, las hojas mostraron una concentración de azúcares de 0.015, 0.021, 0.042 y 0.053 m., estos resultados demuestran que es posible modificar significativamente el contenido de azúcares en las especies vegetales manipulando la humedad de su hábitat.

Así mismo Saucedo (1986) reporta que el contenido de carbohidratos aumenta con el incremento del estrés de humedad.



Por otro lado dentro de las respuestas que manifiesta el maíz está la acumulación de prolina en las hojas, factor que se puede usar como indicador de resistencia a la sequía (Grzesiak, 1991).

Mientras que Vasquez-Tello *et al.*, (1990) demostraron que la salida de electrolitos, fosfatos y azúcares solubles son pruebas fisiológicas para evaluar la resistencia a la sequía de especies como *Phaseolus* y *Vigna*, al trabajar con trozos de hojas de frijol tratadas con polietilenglicol (PEG) 600 (-1.13 Mpa) durante cuatro horas y estudiando la cinética de electrolitos, azúcares solubles y el contenido de almidón durante un período de 24 horas de rehidratación de las porciones de hojas. Estas pruebas son indicadores de la integridad de la membrana de cloroplastos y células, actividad fotosintética y capacidad de movilización de azúcar. En base a estas pruebas se puede clasificar a las especies de acuerdo a la sensibilidad de las células al déficit de agua, resultando *P. vulgaris* sensitivo, *P. acutifolius* y *Vigna radiata* moderadamente tolerantes y *Vigna unguiculata* tolerante.

Contenido de Minerales: La capacidad de absorción de minerales ha sido estudiada en diferentes cultivos, siendo el sorgo el que más atención ha recibido a este respecto. Ramani 1980 (citado por Saldivar, 1991) examinó la absorción y el transporte de zinc en variedades de sorgo, resistentes y susceptibles a la sequía, observando que no existe deficiencia en la absorción de ambas variedades. Se ha observado además que las líneas glossy son más eficientes en la captación de fosfatos en comparación con las líneas no glossy (Raju, 1980) citado por Saldivar (1991). Se ha concluido que los factores ambientales influyen negativamente sobre la tasa de crecimiento y la asimilación de nutrientes (calcio y magnesio) en plantas de sorgo (Jacques *et al.*, 1975).

Algunos experimentos muestran la acumulación de diferentes minerales que intervienen en el factor de tolerancia a la salinidad como lo demuestra He *et al.*, (1993) al observar la acumulación de potasio en raíces de sorgo bajo estrés osmótico inducido por PEG y reducirse los niveles de potasio al añadir ciclohexamida.

Proteínas Específicas (Choque Térmico): La sequía induce la síntesis de pequeños grupos de proteínas específicas de estrés, promotores principales de la modificación de la expresión genética. Existen trabajos dirigidos a conocer la forma en que las plantas sintetizan las proteínas en condiciones de sequía (Bewley *et al.*, 1983; Heikkilä *et al.*, 1983; Dasgupta y Bewley, 1984).

La respuesta del estrés de sequía sobre algunas características agronómicas de especies domesticadas y silvestres fueron estudiadas por Frederici, *et al.*, (1990), mostrando diferencias significativas en el contenido de proteínas de la semilla, peso de semilla y rendimiento.



Se ha establecido que esta proteína no solamente presenta un alto grado de conservación estructural, sino también funcional. Se ha encontrado que es indispensable para el crecimiento a diferentes factores de estrés y que probablemente tenga un papel importante en los procesos de replicación del DNA y en la transcripción. Además de que facilita el plegamiento post-transcripcional, el ensamblaje y en algunos casos el transporte de proteínas oligoméricas a través de la membrana (Khandekar, *et al.*, 1993).



VI. MATERIAL Y METODOS

Ubicación del Experimento

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Fisiología Vegetal, del Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Material Biológico

El material genético utilizado para el desarrollo de la presente investigación se describe en la Tabla (1).

El material genético fue evaluado inicialmente, determinando los parámetros peso, longitud, ancho y grosor, de la semilla.

Para la determinación del peso seco inicial se seleccionaron al azar 400 semillas, las cuales fueron distribuidas en cuatro repeticiones y se pesaron en una balanza analítica Sartorius, Modelo AC2105.

La longitud, ancho y grosor se evaluaron en un total de 100 semillas, distribuidas en cuatro repeticiones para cada una de las variedades, utilizando para esto una escala Vernier.

Las evaluaciones posteriores para el desarrollo integral de este estudio fueron realizadas en diferentes fases, las cuales serán descritas a continuación, siendo importante mencionar que la semilla utilizada para cada uno de los experimentos fue previamente desinfectada con una solución de hipoclorito de sodio al 5%, durante 10 minutos y posteriormente se enjuagó tres veces con agua bidestilada.

Tabla 1. Relación de cultivares y variedades de frijol proporcionados para la realización de los diferentes experimentos en que se desarrolló el presente estudio.

Cultivares Mejorados		Variedades Comerciales
Anáhuac	Marín	
P-114	Anzalduas	Negro
40-2-2	Sel na. 4	Flor de Junio
389-4	Pinto 114	Flor de Mayo
Anzalduas	Pinamerpa	Pinto Mexicano
P-24	Marco Vinicio	Pinto Americano
P-395	Laguna	Pastilla
P-4		
P-10		
389-2		
P-373		
P-55		
P-15		



Descripción de los Tratamientos

Estrés de Salinidad

Fase 1. Variabilidad Genotípica en Etapa de Germinación

Para conocer la variabilidad genotípica de los cultivares de frijol (mejorados y comerciales) a diferentes niveles de estrés de salinidad en etapa de germinación se realizaron las siguientes determinaciones:

Tasa de Imbibición

Consiste en determinar la ganancia en peso de la semilla bajo condiciones de estrés de salinidad. Con base a los resultados en los experimentos de germinación se seleccionaron las variedades comerciales; Pinto Americano y Flor de Junio.

Primeramente se registró el peso inicial de 25 semillas de cada cultivar por triplicado y posteriormente se colocaron en cajas Petri. Se aplicaron tres tratamientos, los cuales consistieron en 15 ml de agua bidestilada para el control y 15 ml de cloruro de sodio a una concentración de 150 y 200 mM, respectivamente para los dos tratamientos, manteniéndose en una cámara bioclimática a 16 h de fotoperíodo y 26 ± 2 °C de temperatura, durante 28 h., obteniéndose el peso de la semilla aproximadamente cada cuatro horas; finalmente se registra la ganancia en peso con respecto al peso inicial, en base a la siguiente fórmula:

$$\text{Ganancia en peso} = \frac{\text{Peso Final} - \text{Peso Inicial}}{\text{Peso Inicial}} \times 100$$

Germinación

La evaluación de esta característica se realizó en diferentes etapas manteniéndose en cámaras de crecimiento en condiciones de 16 h de fotoperíodo a una temperatura de 26 ± 2 °C. El porcentaje de germinación en todos los experimentos se evaluó a las 96 h, después de iniciado el experimento.

Primeramente 60 semillas de cada una de las doce variedades mejoradas (Anáhuac, Tabla 1) fueron distribuidas en cuatro tratamientos con tres repeticiones y se colocaron en cajas Petri conteniendo papel secante previamente humedecido, posteriormente se aplicaron los tratamientos que consistieron de 15 ml de solución salina (NaCl) a concentraciones de 50, 100 y 150 mM, respectivamente, mientras que el control consistió en agua bidestilada.

Posteriormente 45 semillas del grupo de cultivares mejorados (Marín, Tabla 1) y 300 de cada una de las variedades comerciales, fueron distribuidas en tres tratamientos con tres repeticiones en cajas Petri con papel secante, aplicándoseles posteriormente 15 ml



de solución salina (NaCl) a 150 y 200 mM, y agua bidestilada para el control.

Fase 2. Respuestas Bioquímicas en Etapa de Germinación

La determinación de los diferentes componentes bioquímicos se realizó en muestras de semilla germinada, obtenidas de los experimentos realizados en la etapa de germinación. La determinación de azúcares solubles y proteína total se realizó únicamente para los cultivares comerciales, en tanto que el perfil de minerales fue realizado en los tres grupos de cultivares.

Azúcares Solubles

Se pesaron aproximadamente 2 g de cada una de las muestras secas y se molieron. La harina obtenida fue pasada por una malla No. 40, se hicieron extractos en etanol caliente al 80% v/v, los cuales se concentraron al vacío y se recogieron en un volumen de 10 ml de agua bidestilada. La separación de los azúcares solubles se hizo por cromatografía de partición en método descendente, utilizando hojas de papel Whatman grade 3 mm. Las hojas se dividieron en secciones de 6 cm, para cada uno de los reveladores, dejando una sección central de 10 cm para la recuperación cuantitativa, la cual no se asperjó. En cada sección de 6 cm se aplicó una alícuota de 25 microlitros y en la sección central de 10 cm se aplicó un volumen de 150 microlitros. El solvente de desarrollo fue: isopropanol-agua 4:1 v/v, con un corrimiento de 3 horas. Mediante los R_f se realizó la identificación de los azúcares.

Después del desarrollo, se secaron los cromatogramas a 80 °C en una estufa de secado Modelo felisa 131 y se separaron en secciones para detectar las manchas con el revelador de reacción ftalato de anilina que determina azúcares y sus derivados, excepto cetosas (Patridge, 1949).

Una vez identificados los problemas, se trazan líneas enmarcando la región de la parte central que no ha sido asperjada, se recorta el área de la mancha y se pesa, tanto para las muestras como para los estándares.

Para la determinación cuantitativa de los extractos se usó el método gravimétrico.

Proteína Total

Se pesaron aproximadamente 3 g de cada una de las muestras. La determinación de la proteína total se realizó por duplicado, mediante un análisis bromatológico, siguiendo las técnicas recomendadas por el A.O.A.C. (1980). Además de la proteína se incluyeron los componentes que se pueden determinar mediante este análisis, tales como extracto etéreo, fibra cruda, extracto libre de nitrógeno (E.L.N.) y Ceniza.

Perfil de Minerales

Se pesaron aproximadamente 2 g de cada una de las muestras, se carbonizaron



completamente sobre un tripié con triángulo de porcelana a fuego lento con llama azul hasta ausencia de humo, se calcinaron en una mufla Thermolyne 1500, a una temperatura de 500 °C durante 3 h. Las cenizas se disolvieron con 5 ml de ácido clorhídrico-agua al 20% v/v y se aforaron a 25 ml con agua bidestilada, pasando la solución a través de un embudo de filtración rápida con papel filtro Whatman No. 1.

Se preparó un blanco reactivo consistente de 5 ml de ácido clorhídrico-agua al 20% v/v y aforado a 25 ml con agua bidestilada, y filtrado de la misma manera que las muestras.

Los minerales analizados fueron: magnesio (Mg), sodio (Na), potasio (K), calcio (Ca), molibdeno (Mo), manganeso (Mn), fierro (Fe) y zinc (Zn), utilizando un espectrofotómetro de emisión por plasma inductivamente acoplado, Marca Thermo Jarrell Ash, Modelo ICAP 61E Trace Analyzer.

Fase 3. Variabilidad Genotípica en Etapa de Plántula

Crecimiento y Desarrollo

Las variables morfofisiológicas: porcentaje de emergencia, altura de la plántula, longitud de raíz, peso seco aéreo y peso seco de raíz, fueron evaluadas en una serie de experimentos, tanto para cultivares mejorados como para comerciales.

En una primera etapa se seleccionaron 12 cultivares, sembrándose 10 semillas de cada uno en vasos de poliuretano de 300 ml de capacidad, utilizándose perlita como sustrato y una vez sembradas las semillas, al testigo se le regó con suficiente agua bidestilada para provocar la germinación y emergencia de las plántulas, en tanto que los tratamientos fueron de 120 ml. de solución salina a 100 y 150 mM. Los vasos fueron dispuestos en un diseño completamente al azar con arreglo factorial de 5x3, procurándose mantener a capacidad de campo hasta el término del experimento, a los 25 dds. Se evaluaron el peso fresco y peso seco total.

Treinta semillas de cada una de las variedades comerciales (Tabla 1) fueron sembradas en vasos de poliuretano de 300 ml de capacidad, utilizando perlita como sustrato, una vez sembradas las semillas se aplicaron los tratamientos, que consistieron en 120 ml de cloruro de sodio (NaCl) a una concentración de 150 y 200 mM, a los testigos se les aplicó agua bidestilada. Los vasos fueron dispuestos en un diseño completamente al azar con arreglo factorial 6x3, manteniéndose en una cámara bioclimática en condiciones de luz y temperatura controladas, procurando mantener a capacidad de campo cada uno de los tratamientos. Este experimento concluyó a los 25 dds. Adicionalmente se evaluó el porcentaje de emergencia, sembrándose 8 semillas por vaso en tres repeticiones y con tratamientos de 150 y 200 mM de NaCl.



Fase 4. Respuestas Bioquímicas en Etapa de Plántula

Para la evaluación de los componentes bioquímicos fue necesario desarrollar un experimento en los cultivares Pinto Americano y Flor de Junio que como resultado de las evaluaciones anteriores fueron identificados como moderadamente tolerante y susceptible, respectivamente bajo condiciones de salinidad.

12 semillas de cada uno de los cultivares fueron sembradas en vasos de poliuretano de 1000 ml de capacidad, utilizando perlita como sustrato. Una vez sembradas las semillas se regaron los vasos con suficiente agua bidestilada procurando mantener a capacidad de campo. Los vasos fueron dispuestos en un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial de 2x2 y colocados en una cámara bioclimática bajo condiciones de 14 h de fotoperiodo a 26 ± 2 °C. A los seis y a los nueve días de iniciado el experimento se aplicaron 60 ml de solución nutritiva de Shive'n y simultáneamente se realizó un aclareo, dejando nueve plántulas por maceta. Posteriormente a los 10 días y durante los siguientes seis, al 50 % del material se le aplicaron 60 ml de solución de NaCl a una concentración de 200 mM (tratamiento) y al resto del material se le continuó aplicando agua bidestilada (control). El experimento finalizó a los 16 dds, realizándose las siguientes determinaciones:

Perfil de Minerales

Se pesaron aproximadamente 2 g de cada una de las muestras (tallo y raíz), previamente tratadas, los minerales determinados corresponden a los que se incluyeron en la germinación, siguiéndose la metodología descrita anteriormente.

Perfil de Proteínas (Proteínas Específicas)

Obtención del Extracto.

El extracto de proteínas se obtuvo de tejido vegetal fresco de hoja de frijol de 16 dds de crecimiento. La muestra se colocó en un congelador durante 24 h. Posteriormente se pesaron 0.5 g de hoja, la cual fue triturada en un mortero con amortiguador Tris-HCl pH 6.8, 0.002 M, este procedimiento se lleva a cabo a una temperatura de 4 °C la cual se obtuvo colocando el mortero en un baño de agua fría con hielo. La lisis de la células se completó aplicando cuatro impulsos de ultrasonido (40 ciclos) de 30 segundos cada uno, con un período intermedio de 30 segundos en baño frío para evitar el calentamiento de la muestra. El extracto obtenido fue centrifugado a 2000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue colocado en tubos Eppendorf y se congeló hasta su procesamiento.

Electroforesis en gel de Poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

Para este experimento se siguió la metodología descrita por Hames (1981) con ligeras modificaciones. La muestra de proteína (1 mg/ml) se colocó en una solución desnaturalizante (10% de b-mercaptoetanol o Ditiotreitito 1 0.05 M, 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, posteriormente la suspensión se mantuvo en un baño de agua hirviendo



durante 2 ó 3 minutos.

Esta solución se centrifugó a 6,000 x g para eliminar el material insoluble. Una alícuota (20 a 40 ml) se sometió a electroforesis en un gel separador de policrilamida 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 en ácido tricloroacético al 12.5% durante 30 minutos, 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 h con agitación continua. Para eliminar el exceso de colorante, el gel se colocó en ácido acético al 10% con agitación continua y con varios cambios de la solución. Como marcadores de peso molecular se utilizaron 4 conjugados de hemoglobina con un rango de 16,000 a 64,000 daltons (16, 32, 48 y 64 kD, Sigma Chemical Co).

Contenido de Clorofila

Para el análisis de clorofila se siguió el método de Goodwin (1976), en el cual 2 g de tejido foliar fueron macerados en 100 ml de acetona 80% y luego filtrados a través de un embudo Buchner. El filtrado fue leído directamente en un espectrofotómetro SEQUOIA-TURNER Mod. 690, a una longitud de onda de 648 y 663 nm. La cuantificación de la clorofila a, b, y total, se realizó de acuerdo con las ecuaciones propuestas por Arnon (1949):

$$\begin{aligned}\text{Clorofila Total} &= (20.2) (A_{648}) + (8.02) (A_{663}) \\ \text{Clorofila a} &= (12.7) (A_{663}) - (2.69) (A_{648}) \\ \text{Clorofila b} &= (22.9) (A_{648}) - (4.68) (A_{663})\end{aligned}$$

En las que la A seguida por un subíndice indican la absorbancia a 648 y 663 nm, respectivamente.

Fase 5. Asimilación de CO₂

Las lecturas para determinar la tasa de asimilación de CO₂ fueron realizadas en hoja de plántulas de 16 dds. Se seleccionó una hoja al azar, de cada una de las dos repeticiones, en cada uno de los tratamientos a los que fueron sometidas. Estas lecturas se realizaron mediante un Infrared Gas Analyser (IRGA), en el cual la hoja fue introducida en una cámara. Se realizaron tres lecturas por repetición obteniendo de esta manera seis lecturas para cada uno de los tratamientos, las cuales se registraron cada 10 segundos. Adicionalmente se tomaron datos de temperatura de la hoja, temperatura ambiente y humedad relativa.



Fase 6. Respuestas de Ultraestructura

Muestras de hoja de plántulas de 16 dds de crecimiento son lavadas y fijadas en una solución de glutaraldehído 5%, la cual es preparada en una solución amortiguadora (Buffer de Fosfato pH 7.2), posteriormente se realizó una doble fijación con Tetróxido de osmio, estabilizando con esto las estructuras lipídicas, se lava con agua para eliminar el exceso de osmio, siguiendo una deshidratación con acetona en concentraciones graduales de 30 a 100%. La infiltración se realiza en resina Spurr con combinaciones de acetona-resina crecientes hasta llegar a resina pura. Finalmente la inclusión se realiza en resina más un catalizador que acelera su polimerización, colocándose en bloques para su posterior procesamiento. Se obtienen secciones de 90 nm y la coloración se realiza con metales pesados para dar un contraste a la muestra, utilizando primeramente acetato de uranilo y posteriormente citrato de plomo. Las observaciones se realizan en un microscopio electrónico de transmisión, Zeiss En-9. Las características observadas correspondieron principalmente a la estructura y organización de cloroplastos, tilacoides, mitocondrias y gránulos de almidón.

Estrés de Altas Temperaturas

Fase 1. Variabilidad Genotípica en Etapa de Germinación

Para conocer la variabilidad genotípica de los cultivares de frijol (mejorados y comerciales) a diferentes niveles de altas temperaturas en etapa de germinación y plántula se plantearon una serie de experimentos los cuales se describen a continuación:

Germinación

Se distribuyeron 45 semillas de cada variedad (Anzaldúa, SEL. # 4, Pinto 114, Pinamerpa, Marco Vinicio y Laguna) en cuatro repeticiones en cajas Petri con papel secante, aplicándoseles 15 ml de agua bidestilada. Posteriormente se aplicaron dos tratamientos que consistieron en exponer a temperaturas de 35 y 38 ± 2 °C, en tanto que el control se mantuvo a 26 ± 2 °C. El porcentaje de germinación se evaluó a las 96 h después de iniciado el experimento.

Se distribuyeron 100 semillas de cada variedad (Flor de Junio y Pinto Americano) en cuatro repeticiones en cajas Petri con papel secante, aplicándoseles 15 ml de agua bidestilada. Posteriormente se aplicaron tres tratamientos de temperatura que consistieron en exponer a temperaturas de 35 y 38 ± 2 °C, en tanto que el control se mantuvo a 26 ± 2 °C. El porcentaje de germinación se evaluó a las 96 h después de iniciado el experimento.

Fase 2. Respuestas Bioquímicas en Etapa de Germinación

La evaluación de los componentes bioquímicos bajo el factor de altas temperaturas



fue realizada únicamente en el perfil de minerales, siguiéndose para esto la metodología descrita en el estrés de salinidad.

Fase 3. Variabilidad Genotípica en Etapa de Plántula

Para conocer las respuestas de los cultivares sometidos a altas temperaturas se realizaron los experimentos descritos a continuación:

Crecimiento y Desarrollo

Se sembraron 60 semillas de cada variedad comercial en vasos de poliuretano de 300 ml de capacidad, utilizando perlita como sustrato, las semillas se dividieron en tres repeticiones por tratamiento una vez sembradas las semillas, los vasos fueron regados con agua bidestilada hasta capacidad de campo, procurando mantener esta condición permanentemente. Posteriormente una parte del material se mantuvo en una cámara bioclimática en condiciones de 14 h de fotoperíodo y a una temperatura de 26 ± 2 °C (control), y la otra parte se colocó en otra cámara con 14 h de fotoperíodo pero a una temperatura de 38 ± 2 °C (tratamiento). En ambas cámaras los vasos fueron dispuestos en un diseño completamente al azar. Este experimento concluyó a los 25 dds. Al finalizar éste se evaluaron la altura de la plántula, longitud de la raíz, peso seco de tallo y peso seco de raíz.

Fase 4. Respuestas Bioquímicas en Etapa de Plántula

Al igual que en el estrés de salinidad, fue necesario diseñar un experimento para la obtención de las muestras, en dos cultivares comerciales de frijol, bajo condiciones de alta temperatura.

La diferencia en este experimento con respecto al establecido para salinidad es únicamente el tratamiento, ya que tanto el diseño experimental como las variables evaluadas y el análisis estadístico fueron los mismos.

El tratamiento en este experimento consistió en que a los 16 dds, en el cual al material se le estuvieron aplicando riegos de agua bidestilada y solución nutritiva de Shive'n, manteniéndose a capacidad de campo. Al 50% del material, es decir cuatro repeticiones de cada variedad, se sometió a una exposición de alta temperatura 38 ± 2 °C en cámara bioclimática durante 12 horas, mientras que el control se mantuvo también en cámara bioclimática a 26 ± 2 °C. Al final del experimento el material fue colectado para la posterior evaluación de las distintas variables.

Para las determinaciones bioquímicas de perfil de minerales, perfil de proteínas (proteínas específicas) y contenido de clorofila, se siguió la metodología descrita en el estrés de salinidad.



Fase 5. Asimilación de CO₂

Las lecturas para determinar la tasa de asimilación de CO₂ se realizaron de la misma manera que en el estrés de salinidad. Utilizándose hojas de plántula de 16 dds.

Fase 6. Respuestas de Ultraestructura

El material obtenido para analizar estas características consistió de hojas de plántulas de 16 dds, de las variedades, Flor de Junio y Pinto Americano. De igual manera la metodología utilizada ya ha sido descrita en el estrés de salinidad.

Estrés de Sequía

Fase 1. Variabilidad Genotípica en Etapa de Plántula

Para conocer la variabilidad genotípica de los cultivares comerciales de frijol a diferentes niveles de sequía en etapa de plántula.

Grecimiento y Desarrollo

Las semillas de cada una de las variedades fueron desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 5% durante 10 minutos, posteriormente se enjuagaron tres veces con agua bidestilada y se sembraron.

Se sembraron 60 semillas de cada variedad comercial, en vasos de poliuretano de 300 ml de capacidad utilizando una mezcla de suelo-perlita en una proporción de 3:1 como sustrato, las semillas se dividieron en tres repeticiones por tratamiento. Una vez sembradas las semillas, los vasos fueron dispuestos en un diseño completamente al azar, manteniéndose en una cámara bioclimática, con un fotoperíodo de 14 h luz y a una temperatura de 26 ± 2 °C y se regaron con agua bidestilada hasta capacidad de campo, procurando mantener esta condición hasta los 15 días, posteriormente a la mitad del material se le suspendió el riego constituyendo de esta manera el tratamiento y al resto del material se le continuó regando (control). Este experimento concluyó a los 25 dds. Se evaluaron la altura de la plántula, longitud de la raíz, peso seco de tallo y peso seco de raíz.

Fase 2. Respuestas Bioquímicas en Etapa de Plántula

Se estableció un experimento de manera similar al de salinidad y altas temperaturas, utilizando el mismo diseño experimental, diferenciándose únicamente los tratamientos aplicados, siendo estos de la siguiente manera: a los diez días y durante los siguientes seis se suspendió completamente el riego al 50% del material (tratamiento) y al resto se le continuó aplicando agua bidestilada (control). Finalizando el experimento a los 16 días. Las variables evaluadas así como el análisis de los datos fueron similares a



los de salinidad y altas temperaturas.

Para el estrés de sequía también se determinaron el perfil de minerales, perfil de proteínas (proteínas específicas) y contenido de clorofila, siguiéndose la metodología descrita en el factor de salinidad.

Fase 3. Asimilación de CO₂

Las lecturas para determinar la tasa de asimilación de CO₂ se realizaron de la misma manera que en el estrés de salinidad. Utilizándose hojas de plántula de 16 dds.

Fase 4. Respuestas de Ultraestructura

El material obtenido para analizar estas características, consistió de hojas de plántulas de 16 dds de las variedades Flor de Junio y Pinto Americano. De igual manera la metodología utilizada ya ha sido descrita en el estrés de salinidad.

Análisis de Datos

Los resultados obtenidos de las diferentes variables fueron analizados estadísticamente mediante el paquete estadístico SPSS, aplicando primeramente un análisis de varianza, para de esta manera detectar el efecto de la salinidad, alta temperatura y sequía, sobre diferentes componentes en plántulas de frijol. Los valores promedio fueron analizados mediante una comparación múltiple de medias de Tukey (Zar, 1974).



VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características de la Semilla

Las características de la semilla mostraron que existe variabilidad entre las variedades. En el análisis de varianza (Tabla 2) se presentaron diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) entre las variedades comerciales así como en los cultivares mejorados (Marín).

La comparación múltiple de medias (Tabla 2) nos muestra también la variabilidad existente, al formamos cuatro grupos estadísticamente diferentes para las variables largo, ancho y peso de la semilla en las variedades comerciales, y en el largo de la semilla de los cultivares mejorados. En la variable grosor de la semilla se formaron tres grupos en ambos (comerciales y mejorados) y en el ancho de la semilla de los mejorados únicamente dos grupos.

Tabla 2. Comparación múltiple de medias (Tukey), desviación estándar y valores de F calculada para diferentes características de la semilla en seis variedades comerciales y seis cultivares mejorados.

Variedades	Características de la Semilla			
	Largo	Ancho	Grosor	Peso
Variedades Comerciales				
Negro	1.12 ± 0.08 c	0.66 ± 0.05 c	0.49 ± 0.05 c	31.89 ± 0.93 d
Flor de Junio	1.25 ± 0.12 d	0.73 ± 0.07 d	0.48 ± 0.06 c	37.25 ± 1.26 e
Flor de Mayo	1.02 ± 0.08 b	0.62 ± 0.05 b	0.46 ± 0.06 b	25.84 ± 0.48 b
Pinto Mexicano	0.92 ± 0.07 a	0.56 ± 0.04 a	0.45 ± 0.05 b	21.74 ± 0.21 a
Pinto Americano	1.04 ± 0.07 b	0.71 ± 0.06 d	0.50 ± 0.06 c	31.25 ± 0.37 d
Pastilla	1.10 ± 0.14 c	0.65 ± 0.07 c	0.42 ± 0.05 a	28.77 ± 1.22 c
Valores de F	128.89 **	103.55 **	33.22 **	157.81 **
Cultivares Mejorados				
Anzalduas	1.18 ± 0.08 d	0.61 ± 0.04 a	0.42 ± 0.04 b	-- --
Sel no. 4	0.99 ± 0.15 b	0.54 ± 0.04 a	0.41 ± 0.05 b	-- --
Pinto 114	1.14 ± 0.13 c	0.67 ± 0.06 b	0.47 ± 0.05 c	-- --
Pinamerpa	1.11 ± 0.11 c	0.64 ± 0.07 a	0.45 ± 0.06 c	-- --
Marco Vinicio	0.94 ± 0.08 a	0.51 ± 0.04 a	0.38 ± 0.04 a	-- --
Laguna	1.15 ± 0.07 c	0.67 ± 0.05 b	0.49 ± 0.05 c	-- --
Valores de F	78.80 **	160.61 **	75.37 **	

NOTA: Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

** Valores altamente significativos ($P < 0.01$).



Estrés de Salinidad

Fase I. Variabilidad Genotípica en Etapa de Germinación

Tasa de Imbibición

La tasa de imbibición, reportada en porcentaje con respecto a la ganancia en peso, nos mostró (Tabla 4) que en las primeras cuatro horas de imbibición la variedad Flor de Junio incrementa un 54% su peso, el cual al aplicar los niveles de salinidad de 150 y 200 mM disminuye ligeramente, alcanzando un 49 y 51% respectivamente. La variedad Pinto Americano presentó una mayor tasa de imbibición alcanzando un 72% sobre el peso inicial, la cual se incrementa a un 74% al aplicar la solución salina a una concentración de 150 mM, en tanto que con 200 mM disminuye, alcanzando un 70%. La ganancia en peso, en ambas variedades disminuye progresivamente conforme aumenta el tiempo, lo que indica el grado de hidratación de la semilla.

Los resultados obtenidos en el análisis de varianza (Tabla 3) para la tasa de imbibición de las variedades Flor de Junio y Pinto Americano, demostraron que existen diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) entre las variedades, siendo estas diferencias en las primeras cuatro y 12 horas, cuando son sometidas a salinidad. Por otro lado se muestra también que a las ocho horas de tratamiento se presentan diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las variedades. Los tratamientos y la interacción de las diferentes fuentes de variación no mostraron diferencias significativas.

Tabla 3. Valores de F calculada, obtenidos en el análisis de varianza para la tasa de imbibición (%), de las variedades comerciales Flor de Junio y Pinto Americano, sometidas a niveles de salinidad (NaCl), en diferentes tiempos.

Fuente de Variación	Gl	4 hrs	8 hrs	12 hrs	16 hrs	28 hrs
Efectos Medidos	3	37.68 **	1.99 NS	3.94 *	0.75 NS	1.72 NS
Variedades	1	112.03 **	5.39 *	11.52 **	0.42 NS	1.54 NS
Tratamientos	2	0.51 NS	0.29 NS	0.15 NS	0.91 NS	1.81 NS
Interacción	2	1.48 NS	0.61 NS	0.18 NS	0.31 NS	1.19 NS
Explicado	5	23.20 **	1.44 NS	2.43 NS	0.57 NS	1.51 NS
Total	23					

** Valores altamente significativos ($P < 0.01$).

* Valores significativos ($P < 0.05$).

NS Valores no significativos ($P > 0.05$).



Al analizar los resultados mediante una comparación múltiple de medias (Tabla 4) podemos observar que dentro de cada una de las variedades, únicamente se forma un grupo de medias, lo que indica que estos valores son estadísticamente iguales.

Tabla 4. Comparación múltiple de medias (Tukey) y desviación estándar de la tasa de imbibición (%), en las variedades comerciales Flor de Junio y Pinto Americano sometidas a niveles de salinidad (NaCl), en diferentes tiempos.

Variedades	Tratamientos	Tiempos				
		4 hrs	8 hrs	12 hrs	16 hrs	28 hrs
Flor de Junio	Control	54.35 ± 5.15 α	23.80 ± 0.55 α	28.30 ± 4.20 α	2.03 ± 1.69 α	108.47 ± 1.49 b
	150 mM	49.49 ± 3.97 α	24.24 ± 6.11 α	23.87 ± 2.21 α	1.73 ± 0.61 α	99.33 ± 6.38 α
	200 mM	51.42 ± 2.83 α	26.72 ± 1.64 α	24.78 ± 1.48 α	0.91 ± 0.74 α	103.84 ± 3.26 b
Pinto Americano	Control	71.77 ± 3.49 α	22.07 ± 3.57 α	14.38 ± 9.05 α	2.11 ± 1.26 α	110.33 ± 2.81 α
	150 mM	74.41 ± 2.63 α	18.14 ± 8.21 α	14.48 ± 15.14 α	1.74 ± 0.55 α	108.78 ± 11.07 α
	200 mM	69.95 ± 7.93 α	19.32 ± 7.19 α	14.61 ± 7.28 α	1.72 ± 1.31 α	103.01 ± 10.04 α

NOTA: Letras iguales indican no significancia ($P > 0.05$).

Las diferencias observadas entre ambos cultivares en la cantidad de agua absorbida, expresada en porcentaje de la ganancia en peso de la semilla, pueden ser explicadas si consideramos que la toma de agua esta influenciada principalmente por el tamaño y peso de la semilla, características que son marcadamente diferentes entre estas dos variedades, considerando además lo reportado por Stiles (1949) citado por Mayer (1977) quien señala que las semillas adaptadas a condiciones xerofíticas tienen bajos requerimientos de agua para la germinación y además de que cada cultivar tiene un nivel de hidratación específico, debajo del cual la germinación no ocurrirá.

Germinación

El porcentaje de germinación se ve ampliamente influenciado por los diferentes niveles de salinidad y las variedades.

Los resultados obtenidos en el análisis de varianza (Tabla 5) nos permiten observar que existen diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) entre los tratamientos y entre las variedades, así como en la interacción de ambas fuentes de variación. Estos resultados se presentan tanto en los cultivares mejorados como en los comerciales. Respecto a los cultivares mejorados de Marín, se puede observar que la interacción de las diferentes fuentes de variación no presenta diferencias significativas ($P > 0.05$).



Tabla 5. Valores de F calculada, obtenidos en el análisis de varianza para el porcentaje de germinación (%), en diferentes grupos de cultivares sometidos a niveles de salinidad (NaCl), durante 96 h.

Fuente de Variación	Anáhuac	Marín	Comerciales
Efectos Medidos	4.90 **	15.37 **	---
Variedades	3.54 **	5.58 **	46.16 **
Tratamientos	9.89 **	39.86 **	298.31 **
Interacción	2.00 **	1.62 NS	7.32 **
Explicado	2.87 **	7.29 **	---

** Valores altamente significativos (P<0.01).

NS Valores no significativos (P>0.05).

En los 12 cultivares mejorados, del grupo Anáhuac la comparación múltiple de medidas (Tabla 6) nos muestra la variabilidad existente con respecto al porcentaje de germinación, observándose que en el control se forman únicamente dos grupos diferentes estadísticamente, donde el cultivar P-10 es diferente a los cultivares P-395, P-373 y P-15. En el tratamiento de 100 mM, los cultivares no muestran diferencias estadísticas entre sí, mientras que con 200 mM el cultivar P-373 es diferente a los cultivares P-24, P-4, P-10 y 389-2. Finalmente con 250 mM los cultivares Anzalduas, P-24, P-395 y P-4 son estadísticamente diferentes al P-10.

Tabla 6. Comparación múltiple de medias (Tukey) y desviación estándar del porcentaje de germinación (%), en 12 cultivares mejorados (Anáhuac) sometidos a niveles de salinidad (NaCl), durante 96 h.

Variedades	Porcentaje de Germinación			
	Tratamientos			
	Control	100 mM	200 mM	250 mM
P-114	65.00 ab	66.66 a	46.66 ab	66.66 ab
40-2-2	48.33 ab	60.00 a	53.33 ab	53.33 ab
389-4	48.33 ab	46.66 a	80.00 ab	40.00 ab
Anzalduas	55.00 ab	40.00 a	80.00 ab	33.33 a
P-24	50.00 ab	46.66 a	99.33 b	20.00 a
P-395	45.00 a	46.66 a	66.67 ab	26.66 a
P-4	46.66 ab	40.00 a	86.66 b	26.66 a
P-10	81.66 b	80.00 a	100.00 b	86.66 b
389-2	58.33 ab	46.66 a	100.00 b	46.66 ab
P-373	43.33 a	53.33 a	20.00 a	53.33 ab
P-55	46.66 ab	33.33 a	53.33 ab	40.00 ab
P-15	38.33 a	26.66 a	46.66 ab	40.00 ab

NOTA: Letras diferentes en un mismo nivel indican diferencias no significativas (P>0.05).

Los cultivares mejorados del grupo Marín, son fuertemente afectados en su porcentaje de germinación, al ser tratados con diferentes niveles de salinidad. Como se puede observar en la Tabla (7) la comparación múltiple de medias en el control forman dos grupos de los cuales el cultivar Pinamerpa presenta el más bajo porcentaje de



germinación alcanzando únicamente un 67%, lo cual la hace estadísticamente diferente al resto de los cultivares que alcanzan del 93% al 100% de germinación. Estos porcentajes se ven afectados conforme aumentan los niveles de salinidad, observándose que con el tratamiento de 150 mM, también se forman dos grupos, de los cuales la variedad Marco Vinicio es estadísticamente diferente al resto de los cultivares. En el tratamiento de 200 mM no se observan diferencias.

De la misma manera, el porcentaje de germinación en las variedades comerciales se ve influenciado por la salinidad. En la Tabla (7) podemos apreciar que en el control, la variedad Negro es diferente al resto de las variedades, alcanzando un 41% de germinación, el segundo grupo formado por las variedades Flor de Mayo, Pinto Mexicano y Pinto Americano, de las cuales la variedad Pinto Mexicano es estadísticamente diferente a las variedades Negro, Flor de Junio, y Pastilla, en el tercer grupo se incluyen las variedades Flor de Junio, Flor de Mayo, Pinto Americano y Pastilla, de las que Flor de Junio y Pastilla son diferentes a Negro y Pinto Mexicano. En el tratamiento de 150 mM se forman tres grupos de los cuales en el primero se encuentran Flor de Junio, Flor de Mayo y Pastilla, en el segundo se incluye la variedad Pinto Mexicano y en el tercero Negro y Pinto Americano las cuales presentan el menor porcentaje de germinación. Finalmente al tratarse con 200 mM se forman únicamente dos grupos de los cuales la variedad Pastilla es estadísticamente diferente al resto de las variedades.

Tabla 7. Comparación múltiple de medias (Tukey) y desviación estándar, del porcentaje de germinación (%), en seis cultivares mejorados (Marín) y seis comerciales, sometidos a niveles de salinidad (NaCl), durante 96h.

Porcentaje de Germinación								
Cultivares Marín				Cultivares Comerciales				
Var	Control	150 mM	200 mM	Var	Control	150 mM	200 mM	
1)	100.00 ± 0.00 a	60.00 ± 20.00 a	60.00 ± 20.00 a	7)	41.33 ± 3.51 c	12.00 ± 1.00 c	17.00 ± 3.51 b	
2)	100.00 ± 0.00 a	53.33 ± 41.63 a	66.66 ± 11.54 a	8)	96.67 ± 4.04 a	68.00 ± 4.58 a	12.00 ± 5.57 b	
3)	93.33 ± 11.54 a	33.33 ± 11.54 a	20.00 ± 20.00 a	9)	90.67 ± 3.21 ab	67.00 ± 16.70 a	19.00 ± 7.94 b	
4)	66.66 ± 11.54 b	26.66 ± 30.55 a	20.00 ± 20.00 a	10)	75.67 ± 13.43 b	44.33 ± 5.51 b	19.33 ± 4.51 b	
5)	100.00 ± 0.00 a	86.66 ± 11.54 b	33.33 ± 23.09 a	11)	83.33 ± 3.21 ab	22.33 ± 4.93 c	10.33 ± 1.15 b	
6)	100.00 ± 0.00 a	26.66 ± 23.09 a	33.33 ± 30.55 a	12)	99.33 ± 0.58 a	66.67 ± 17.01 a	41.00 ± 8.89 a	

1) Anzaiduas; 2) Sel no; 4) 3) Pinto 114; 4) Pinamerpa; 5) Marco Vinicio; 6) Laguna; 7) Negro; 8) Flor de Junio; 9) Flor de Mayo; 10) Pinto Mexicano; 11) Pinto Americano; 12) Pastilla.

NOTA: Letras diferentes indican diferencias significativas (P < 0.05).

En general los resultados obtenidos muestran una reducción gradual en la capacidad de la germinación de la semilla sometida a condiciones de salinidad, aumentando esta sensibilidad conforme aumenta la concentración de los tratamientos. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Pan (1984) y Malibari *et al.*, (1993) al trabajar con diferentes cultivos. De la misma manera Maliwal y Paliwal, 1984 reportaron esta respuesta al trabajar con líneas de Maíz.



Fase 2. Respuestas Bioquímicas en Etapa de Germinación

Azúcares Solubles

Los azúcares solubles encontrados en semilla a 72 h de germinación, en las seis variedades comerciales se muestran en la Tabla (8) donde podemos observar que la arabinosa en combinación con la xilosa se presentan en cada uno de los tratamientos de las variedades Negro y Pastilla, esta combinación de azúcares también se presentó en el tratamiento de 200 mM en la variedad Flor de Junio.

Tabla 8. Identificación de azúcares solubles en seis variedades de frijol, sometidas a niveles de salinidad (NaCl), durante 72 h.

Variedades	Control	150 mM	200 mM
Pastilla	Arabinosa-Xilosa	Arabinosa-Xilosa	Arabinosa-Xilosa
Negro	Arabinosa-Xilosa	Arabinosa-Xilosa	Arabinosa-Xilosa
Pinto Americano	Arabinosa	Maltosa	Maltosa
Pinto Mexicano	Fructosa	Galactosa	Maltosa
Flor de Mayo	Galactosa-Maltosa	Arabinosa	Lactosa-Fructosa
Flor de Junio	Galactosa	Maltosa	Arabinosa-Xilosa

En general los azúcares solubles encontrados son: galactosa, fructosa, maltosa, lactosa, arabinosa, xilosa Tabla (8), concordando estos resultados con lo reportado por Coughlan y Wynjones, (1980). La cuantificación de estos azúcares se presenta en la Tabla (9).

Tabla 9. Acumulación de azúcares solubles (ppm) en seis variedades de frijol, sometidas a niveles de salinidad (NaCl), durante 72 h.

Variedades	Control	150 mM	200 mM
Pastilla	0.47	0.46	0.47
Negro	0.46	0.47	0.44
Pinto Americano	0.43	0.41	0.41
Pinto Mexicano	0.29	0.36	0.38
Flor de Mayo	0.37	0.42	0.30
Flor de Junio	0.35	0.38	0.46

La acumulación de azúcares solubles, en semilla germinada, se puede apreciar en la Tabla (10), donde se muestra que la variedad Pinto Americano (tolerante) acumula galactosa y glucosa en el tratamiento de 150 mM, mientras que en 200 mM, acumula además maltosa, azúcar que se encuentra en la semilla y en el control, por el contrario la variedad Flor de Junio (susceptible) en el tratamiento de 150 mM unicamente presenta maltosa y en 250 mM acumula galactosa y glucosa. La acumulación de estos azúcares es favorable ya que constituyen sustancias con funciones de osmorregulación permitiendo un adecuado funcionamiento celular. Estos resultados concuerdan con lo demostrado por Hasaneen *et al.*, (1990) quienes reportan que Na₂SO₄ incrementa el contenido de azúcares, disminuyendo los niveles de sacarosa y polisacáridos.



Tabla 10. Identificación de azúcares solubles en las variedades Pinto Americano y Flor de Junio, sometidas a niveles de salinidad (NaCl), durante 72 h.

Azúcares	Variedades							
	Pinto Americano				Flor de Mayo			
	Semilla	Testigo	150 mM	250 mM	Semilla	Testigo	150 mM	250 mM
Galactosa			*	*				*
Glucosa			*	*				*
Maltosa	*	*		*	*	*	*	*

En general los resultados obtenidos concuerdan con los trabajos realizados a nivel de ultraestructura en callos de variedades de sorgo tolerantes a este estrés, se ha encontrado que existe movilización y utilización de azúcares en respuesta a los cambios osmóticos (Mir, 1996). Similarmente (Olmos y Hellin, 1996) encontraron lo mismo en *Pisum sativum*.

Proteína Total

Los resultados de los análisis bromatológicos nos mostraron que existen diferencias entre cada una de las variedades, en las determinaciones realizadas, además estos resultados están influenciados por los diferentes niveles de salinidad. Al respecto se encontró que en la variedad Pinto Americano (tolerante) las variaciones en los distintos componentes (Tabla 11) con respecto al control, son menores que en la variedad Flor de Junio (susceptible).

El contenido de ceniza en Pinto Americano se incrementa en un 3 y 9% respectivamente, en los niveles de salinidad 150 y 200 mM, mientras que en Flor de Junio estos incrementos son del 9 y 14%. En la variedad Pinto Americano el contenido de extracto etéreo se incrementa un 1 y 28% en cada uno de los tratamientos (150 y 200 mM) con respecto al control, mientras que en estas mismas condiciones la variedad Flor de Junio presenta incrementos del 36 y 49%. La fibra cruda en Pinto Americano se incrementa 16% en el tratamiento de 150 mM mientras que en Flor de Junio disminuye 22% en 150 mM y aumenta un 2% en 200 mM.

Por otra parte el E.L.N. también se ve afectado aunque en menor proporción, encontrándose que en Pinto Americano disminuye 0.3% en 150 mM y aumenta 2% en 200 mM, en tanto que en la variable Flor de Junio se incrementa 0.1% en 150 mM y disminuye 1% en el segundo tratamiento.

En la presente investigación se observó que la concentración de proteína soluble total se afectó en diferente proporción dependiendo de la concentración de salinidad y el cultivar. En el cultivar Pinto Americano, seleccionado como tolerante se observó que dicho contenido no se afectó en concentraciones de 150 y 200 mM de salinidad, en



tanto que en la variedad Flor de Junio seleccionada como susceptible se observa un ligero decremento conforme aumenta la concentración de salinidad, el comportamiento de estos resultados pueden ser apreciados en la Tabla (11). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Blum (1988) quien reportó que el estrés a diferentes factores afecta el contenido de proteínas solubles.

Tabla 11. Determinación bromatológica (%) en dos variedades de frijol, sometidas a niveles de salinidad (NaCl), durante 96 h.

Determinaciones (%)	Pinto Americano				Flor de Mayo			
	Semilla	Control	150 mM	250 mM	Semilla	Control	150 mM	250 mM
Ceniza	4.45	4.77	4.92	5.20	4.54	4.57	4.97	5.19
Extracto Etéreo	1.36	1.73	1.76	2.22	1.56	1.58	2.15	2.35
Fibra Cruda	2.29	2.18	2.55	—	3.01	2.02	1.58	2.06
Proteína	22.25	22.66	22.29	22.70	21.79	21.30	20.41	20.72
E.L.N.	69.65	68.66	68.48	69.83	69.10	70.53	70.62	69.68

Perfil de Minerales

El contenido de minerales en semilla de frijol sometida a diferentes niveles de salinidad en seis cultivares mejorados (Marín) mostró amplia variabilidad. Al respecto en el análisis de varianza (Tabla 12) se encontró que existen diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) entre las variedades y entre los tratamientos, así como en la interacción de ambas fuentes de variación, para cada uno de los minerales analizados.

Tabla 12. Valores de F calculada, obtenidos en el análisis de varianza, para el perfil de minerales (ppm), en semilla de seis cultivares de frijol mejorados, sometidos a niveles de salinidad (NaCl), durante 96 h.

Fuente de Variación	Gl	Na	Mg	K	Ca	Mo	Mn	Fe	Zn
Efectos Medidos	8	264581.10 **	43755.16 **	28.68 **	58493.57 **	175722.19 **	21533.91 **	2058.53 **	384897.10 **
Variedades	5	8000.42 **	5452.52 **	9.25 **	1320.48 **	103945.67 **	20104.44 **	1577.79 **	98082.98 **
Tratamientos	3	692135.56 **	107592.90 **	61.06 **	153782.05 **	295349.72 **	23916.35 **	2859.75 **	861253.95 **
Interacción	15	3191.05 **	1018.97 **	10.82 **	1564.84 **	12609.58 **	2298.17 **	225.88 **	136276.17 **
Explicado	23	94098.89 **	15883.73 **	17.04 **	21366.14 **	69344.40 **	8988.66 **	863.32 **	222753.02 **
Total	71								

** Valores altamente significativos ($P < 0.01$).



En la Tabla (13) podemos observar que en forma general el contenido de minerales para cada uno de los cultivares es estadísticamente diferente en cada tratamiento, observándose, en la mayoría de los minerales la formación de cuatro grupos diferentes, con excepción del contenido de hierro en los cultivares Sel. no. 4 y Pinto 114 donde el contenido de éste en el tratamiento de 200 mM es igual estadísticamente al contenido de 150 mM. En el cultivar Pinamerpa, el hierro en la semilla no se afectó con el tratamiento de 150 mM.

Tabla 13. Comparación múltiple de medias (Tukey) y desviación estándar del perfil de minerales (ppm) por variedad y mineral, en seis cultivares mejorados de frijol, sometidos a niveles de salinidad (NaCl), durante 96 h.

Variedades	Tratamientos	Na	Mg	K	Ca	Mo	Mn	Fe	Zn
Anacahuas	Semilla	586.13 ± 0.30 a	542.26 ± 0.17 a	6947.96 ± 36.34 a	431.30 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	12.90 ± 0.01 a	26.97 ± 1.75 a	43.23 ± 0.08 a
	Control	910.97 ± 3.70 b	939.73 ± 1.38 b	15575.88 ± 37.50 b	829.61 ± 0.23 b	9.06 ± 0.01 b	15.87 ± 0.04 b	40.30 ± 0.10 b	35.76 ± 0.08 b
	150 mM	8723.09 ± 41.45 c	1003.78 ± 3.68 c	15852.49 ± 77.07 c	1148.38 ± 0.73 c	1.00 ± 0.04 c	16.91 ± 0.02 c	37.32 ± 0.23 c	38.35 ± 0.03 c
	200 mM	5976.67 ± 22.46 d	958.10 ± 0.87 d	13309.07 ± 37.81 d	941.18 ± 1.71 d	9.14 ± 0.05 d	15.02 ± 0.07 d	31.05 ± 0.20 d	27.91 ± 0.07 d
Sel no. 4	Semilla	642.89 ± 1.57 a	589.13 ± 1.55 a	13986.80 ± 24.50 a	475.07 ± 0.11 a	0.00 ± 0.00 a	15.46 ± 0.03 a	28.87 ± 0.49 a	33.46 ± 0.05 a
	Control	502.74 ± 1.91 b	1029.70 ± 3.36 b	17824.89 ± 41.45 b	327.19 ± 0.38 b	2.59 ± 0.01 b	17.78 ± 0.03 b	32.99 ± 0.06 b	29.50 ± 0.07 b
	150 mM	8592.22 ± 22.24 c	1087.18 ± 3.72 c	13219.19 ± 53.35 c	1243.42 ± 0.25 c	2.28 ± 0.02 c	18.85 ± 0.07 c	35.87 ± 0.21 c	24.91 ± 0.02 c
	200 mM	6502.08 ± 42.16 d	1016.90 ± 4.15 d	7726.21 ± 56.37 d	1031.37 ± 3.91 d	2.53 ± 0.02 d	16.06 ± 0.07 d	35.11 ± 0.23 c	27.68 ± 0.12 d
Pinto 114	Semilla	599.20 ± 0.63 a	530.06 ± 2.12 a	13544.67 ± 6.87 a	457.60 ± 0.17 a	0.00 ± 0.00 a	15.44 ± 0.03 a	26.23 ± 0.10 a	63.02 ± 0.04 a
	Control	531.77 ± 1.75 b	907.49 ± 3.49 b	14742.20 ± 35.97 b	915.34 ± 0.16 b	4.21 ± 0.02 b	17.18 ± 0.03 b	37.37 ± 0.06 c	34.87 ± 0.05 b
	150 mM	7865.43 ± 22.06 c	831.89 ± 1.06 c	12006.95 ± 43.48 c	1014.91 ± 0.43 c	4.34 ± 0.02 c	18.37 ± 0.06 c	27.19 ± 0.17 b	21.53 ± 0.02 c
	200 mM	7307.93 ± 13.03 d	826.44 ± 0.43 d	7315.75 ± 17.24 d	1116.14 ± 0.64 d	4.66 ± 0.01 d	16.75 ± 0.04 d	27.16 ± 0.17 b	26.32 ± 0.04 d
Pinamerpa	Semilla	486.96 ± 2.89 a	540.90 ± 4.47 a	13256.83 ± 13.91 a	466.17 ± 0.05 a	0.00 ± 0.00 a	15.65 ± 0.11 a	29.49 ± 0.20 a	141.18 ± 0.12 a
	Control	880.88 ± 1.94 b	967.59 ± 0.28 b	16578.92 ± 34.25 b	897.88 ± 0.41 b	4.01 ± 0.02 b	22.56 ± 0.04 b	39.61 ± 0.21 b	31.28 ± 0.04 b
	150 mM	7302.89 ± 10.55 c	847.28 ± 0.52 c	14795.69 ± 26.76 c	1092.83 ± 0.52 c	3.41 ± 0.01 c	19.23 ± 0.24 c	29.78 ± 0.07 c	32.58 ± 0.04 c
	200 mM	6938.25 ± 16.60 d	862.50 ± 3.83 d	4986.72 ± 18.82 d	1231.07 ± 0.69 d	3.67 ± 0.02 d	14.25 ± 0.08 d	25.10 ± 0.15 c	21.96 ± 0.02 d
Marco Vainio	Semilla	765.71 ± 1.83 a	498.81 ± 2.49 a	12097.67 ± 22.05 a	433.73 ± 15.91 a	0.00 ± 0.00 a	15.39 ± 0.03 a	31.38 ± 0.07 a	42.46 ± 0.34 a
	Control	909.14 ± 1.01 b	1048.32 ± 1.11 b	16336.01 ± 8.49 b	906.77 ± 0.17 b	7.40 ± 0.01 b	22.02 ± 0.01 b	52.54 ± 0.14 b	47.11 ± 0.08 b
	150 mM	6385.57 ± 17.34 c	1088.76 ± 0.38 c	17191.67 ± 48.63 c	1116.99 ± 1.59 c	6.24 ± 0.00 c	20.13 ± 0.08 c	41.40 ± 0.11 c	32.87 ± 0.08 c
	200 mM	604.31 ± 31.41 d	1046.34 ± 4.22 b	15464.38 ± 59.69 d	1165.41 ± 1.55 d	6.37 ± 0.05 d	18.02 ± 0.06 d	41.70 ± 0.00 d	35.32 ± 0.09 d
Laguna	Semilla	960.21 ± 0.87 a	507.59 ± 2.72 a	12534.87 ± 18.48 a	466.53 ± 0.11 a	0.00 ± 0.00 a	17.10 ± 0.05 a	31.53 ± 0.08 a	96.95 ± 0.12 a
	Control	1246.03 ± 1.19 b	862.49 ± 2.61 b	13902.47 ± 19.58 b	904.70 ± 0.71 b	4.55 ± 0.04 b	25.66 ± 0.10 b	44.20 ± 0.30 b	34.01 ± 0.04 b
	150 mM	9430.38 ± 31.65 c	1004.95 ± 5.96 c	12314.95 ± 49.23 c	1306.64 ± 0.37 c	4.63 ± 0.01 c	25.30 ± 0.11 c	40.93 ± 0.21 c	30.41 ± 0.06 c
	200 mM	8643.77 ± 40.35 d	823.30 ± 0.81 d	11322.72 ± 35.69 d	1052.24 ± 0.23 d	4.26 ± 0.01 d	23.20 ± 0.09 d	36.82 ± 0.13 d	30.92 ± 0.06 d

NOTA: Letras diferentes indican diferencias significativas (P < 0.05).



En la Figura (1) podemos apreciar el comportamiento en el contenido de los diferentes minerales en forma individual para cada uno de los tratamientos por variedad, pudiendo observar que con el incremento en la concentración de sal, el contenido de sodio y calcio se incrementa marcadamente, contrario a la disminución gradual que se observa en potasio, fierro y zinc.

El contenido de sodio en la semilla e incluso en el control, alcanza valores menores al 0.2%, los cuales se incrementan con los tratamientos de salinidad alcanzando casi en promedio de 0.6 al 0.9% en las diferentes variedades.

Respecto al contenido de magnesio no se presentan diferencias muy marcadas entre los tratamientos y el control pero con respecto a la semilla, el incremento va de 0.04 al 0.08%. En el potasio se observa una mayor variabilidad entre los cultivares, observándose que en general éste se reduce con los tratamientos de salinidad. El calcio presenta el mismo comportamiento que el sodio, ya que en semilla existe un contenido de aproximadamente 400 ppm las cuales se incrementan a poco más de 800 ppm en el control y de 1000 a 1300 con los tratamientos de 150 y 200 mM. Respecto al molibdeno, a nivel de semilla presentó cantidades no detectables, sin embargo se observa un incremento significativo con los diferentes tratamientos, alcanzando arriba de 8 ppm en el cultivar Anzalduas, aunque no existe una diferencia muy marcada en todos los cultivares entre el control y los tratamientos, sí existe la tendencia a un mayor incremento con la salinidad.

El magnesio y fierro no muestran mucha variabilidad, sin embargo en semilla se presentan cantidades menores, mismas que se incrementan con los diferentes tratamientos, observándose que en el control su contenido es mayor que en 150 y 200 mM de solución salina. Finalmente el contenido de zinc en la semilla supera al encontrado en cada uno de los tratamientos, al respecto podemos observar que los diferentes tratamientos afectan su contenido, observando por ejemplo que en el cultivar Pinamerpa el contenido pasa de 140 ppm en semilla a menos de 20 ppm en el tratamiento de 200 mM de NaCl.

En las líneas mejoradas la reducción en el contenido de potasio, asociada con el incremento en sodio y calcio puede ser explicada debido al grado de interacción que existe entre los iones monovalentes y bivalentes. Este comportamiento no se expresa claramente en los cultivares comerciales, indicando de alguna manera que en los comerciales existe una menor adaptación a las condiciones de estrés.

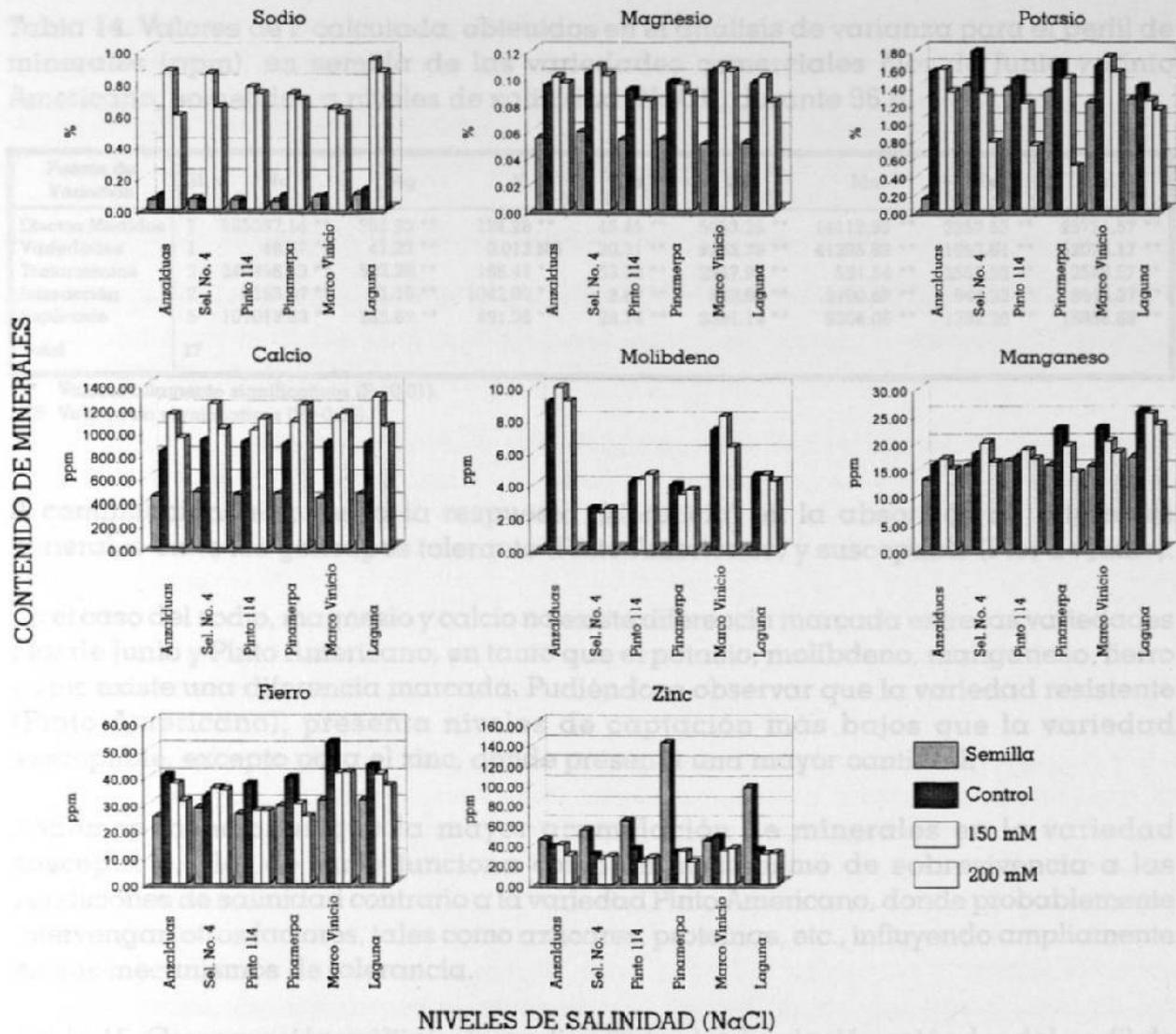


Figura 1. Contenido de minerales en seis cultivares mejorados de frijol, sometidos a diferentes niveles de salinidad.

Cultivar	Control		150 mM		200 mM	
	Flor de Jugo	Pinto Americano	Flor de Jugo	Pinto Americano	Flor de Jugo	Pinto Americano
Ca (ppm)	824.55 ± 8.07a	1151.40 ± 4.59a	4307.30 ± 17.50b	4310.10 ± 5.02b	4875.91 ± 2.31c	4271.20 ± 2.14c
Mg (%)	32.23 ± 0.57a	337.55 ± 1.09a	450.40 ± 1.71a	560.24 ± 0.57b	473.31 ± 0.14c	402.35 ± 1.81c
K (%)	128.15 ± 0.57a	4536.37 ± 37.75a	13981.37 ± 30.03b	15490.17 ± 21.89b	15161.60 ± 21.50c	13998.88 ± 23.01c
Fe (ppm)	481.80 ± 1.07a	464.57 ± 0.07a	460.28 ± 1.17a	482.80 ± 0.12a	465.80 ± 0.15a	473.81 ± 0.97c
Zn (ppm)	9.15 ± 0.03a	1.50 ± 0.01a	2.48 ± 0.01a	1.50 ± 0.01a	1.98 ± 0.03a	0.55 ± 0.01a
Mn (ppm)	18.50 ± 0.20a	0.85 ± 0.01a	16.80 ± 0.02a	1.05 ± 0.00a	14.58 ± 0.05c	5.18 ± 0.07c
Na (%)	41.18 ± 0.51a	31.74 ± 0.25a	38.15 ± 0.13b	27.58 ± 0.17a	31.38 ± 0.03a	22.50 ± 0.71a
Mo (ppm)	25.18 ± 0.28a	28.30 ± 0.34a	30.41 ± 0.82b	38.41 ± 0.82b	25.50 ± 0.03a	47.54 ± 0.10c

Las diferencias en su mismo nivel de salinidad representan significativas ($P < 0.001$) por cultivar.

Comparando los resultados de minerales para los cultivares comerciales y los mejorados, podemos concluir que los líneas mejoradas presentan una mayor...



Tabla 14. Valores de F calculada, obtenidos en el análisis de varianza para el perfil de minerales (ppm), en semilla de las variedades comerciales Flor de Junio y Pinto Americano, sometidas a niveles de salinidad (NaCl), durante 96 h.

Fuente de Variación	Gl	Na	Mg	K	Ca	Mo	Mn	Fe	Zn
Electos Medidos	3	165587.14 **	361.93 **	124.28 **	45.45 **	5053.25 **	14112.99 **	2257.55 **	25751.57 **
Variedades	1	48.57 **	41.23 **	0.013 NS	30.31 **	9263.79 **	41295.99 **	1657.61 **	52076.17 **
Tratamientos	2	248356.43 **	522.28 **	186.41 **	53.02 **	2947.98 **	521.54 **	2557.52 **	12588.27 **
Interacción	2	4153.87 **	71.16 **	1042.03 **	3.67 **	897.98 **	2100.67 **	944.32 **	6514.37 **
Explicado	5	101013.83 **	245.62 **	491.38 **	28.74 **	3391.14 **	9308.06 **	1732.25 **	18856.69 **
Total	17								

** Valores altamente significativos (P<0.01).

NS Valores no significativos (P>0.05).

A continuación se muestra la respuesta diferencial en la absorción de diferentes minerales entre los genotipos tolerante (Pinto Americano) y susceptible (Flor de Junio).

En el caso del sodio, magnesio y calcio no existe diferencia marcada entre las variedades Flor de Junio y Pinto Americano, en tanto que el potasio, molibdeno, manganeso, hierro y zinc existe una diferencia marcada. Pudiéndose observar que la variedad resistente (Pinto Americano), presenta niveles de captación más bajos que la variedad susceptible, excepto para el zinc, donde presenta una mayor cantidad.

Podemos mencionar que la mayor acumulación de minerales en la variedad susceptible, Flor de Junio funciona como un mecanismo de sobrevivencia a las condiciones de salinidad contrario a la variedad Pinto Americano, donde probablemente intervengan otros factores, tales como azúcares, proteínas, etc., influyendo ampliamente en sus mecanismos de tolerancia.

Tabla 15. Comparación múltiple de medias (Tukey) y desviación estándar del perfil de minerales (ppm), en dos variedades de frijol sometidas a niveles de salinidad (NaCl), durante 96 h.

Minerales	Control		150 mM		200 mM	
	Flor de Junio	Pinto Americano	Flor de Junio	Pinto Americano	Flor de Junio	Pinto Americano
Na	699.33 ± 9.07 _a	1134.40 ± 4.33 _a	4269.93 ± 17.59 _b	4340.16 ± 5.62 _b	4875.71 ± 8.31 _c	4271.68 ± 9.54 _c
Mg	552.36 ± 8.57 _a	537.58 ± 1.29 _a	493.40 ± 1.51 _b	529.22 ± 0.57 _b	470.21 ± 0.14 _c	482.55 ± 1.81 _c
K	15623.97 ± 170.66 _a	14536.27 ± 37.75 _a	19061.22 ± 38.09 _b	15409.17 ± 21.59 _b	15146.60 ± 21.63 _c	13898.88 ± 52.01 _c
Ca	481.52 ± 1.07 _a	484.57 ± 0.07 _a	480.39 ± 0.11 _a	492.82 ± 0.12 _b	465.80 ± 7.19 _b	473.64 ± 0.97 _c
Mo	2.13 ± 0.03 _a	1.88 ± 0.01 _a	2.48 ± 0.01 _b	1.60 ± 0.00 _b	1.90 ± 0.03 _c	0.95 ± 0.01 _c
Mn	19.52 ± 0.33 _a	0.85 ± 0.01 _a	16.83 ± 0.02 _b	8.66 ± 0.06 _b	18.68 ± 0.05 _c	5.18 ± 0.07 _c
Fe	41.10 ± 0.51 _a	31.71 ± 0.25 _a	28.13 ± 0.13 _b	27.68 ± 0.17 _b	31.85 ± 0.03 _c	23.53 ± 0.21 _c
Zn	22.12 ± 0.28 _a	30.33 ± 0.04 _a	20.41 ± 0.02 _b	28.41 ± 0.02 _b	22.92 ± 0.03 _c	47.54 ± 0.10 _c

NOTA: Letras diferentes en un mismo nivel indican diferencias significativas (P<0.05); por variedad.

Comparando los resultados de minerales para los cultivares comerciales y los mejorados, podemos concluir que las líneas mejoradas presentan una mayor



acumulación de minerales, lo cual podría estar relacionado con su grado de adaptabilidad a las condiciones adversas, al tratarse de líneas mejoradas.

Respecto a los mecanismos de tolerancia a salinidad se observa que estos involucran el metabolismo relacionado a control e integración de iones de sodio, su acumulación, localización, así como el ajuste y otros aspectos del metabolismo con referencia a fuentes de carbono (Poffenroth, *et al.*, 1992 y Coughlan y Wynjones, 1980).

El ajuste osmótico y la regulación de iones en células de plantas sometidas a salinidad son modelos reconocidos de diferentes mecanismos existentes para obtener tolerancia a sal (Flowers *et al.*, 1977).

En la Figura (2), podemos observar la variabilidad existente en el contenido de minerales en los seis cultivares comerciales, existiendo además un efecto significativo en el contenido de sodio y calcio, los cuales se incrementan al aumentar la concentración de salinidad, en tanto que el magnesio, molibdeno y manganeso disminuyen gradualmente.

En general podemos decir que para el magnesio y el potasio no existen diferencias entre las variedades y los tratamientos.

En el caso del sodio existe una gran variación en la absorción de los genotipos y los tratamientos, observándose que con el incremento de la concentración salina, la captación se incrementa. Los cultivares Pinto Americano y Negro muestran una mayor captación, mientras que los cultivares Flor de Junio, Pinto Mexicano y Pastilla presentan la mínima absorción.

El calcio muestra también gran variabilidad entre los cultivares y tratamientos en general existe un incremento al aumentar la concentración del tratamiento en los cultivares Flor de Junio, Pinto Americano y Pastilla. Para el cultivar Flor de Mayo existe un incremento en el tratamiento de 150 mM, pero al aumentar la concentración se presenta una disminución. El cultivar Pinto Americano absorbe la máxima cantidad de calcio, en comparación con el cultivar Negro el cual presenta la mínima cantidad.

La respuesta del molibdeno también mostró gran variabilidad para los cultivares y los tratamientos, pero se observa que con el incremento de la concentración de salinidad existe una disminución gradual en la captación del molibdeno, siendo los cultivares Pinto Mexicano y Negro los que mostraron las mayores captaciones, en contraste los cultivares Pinto Americano y Pastilla presentaron los mínimos valores.

Con el incremento de la concentración de salinidad la absorción del manganeso presenta una tendencia estable en su absorción, con excepción de las variedades Pinto Americano y Pastilla donde se presenta una disminución al incrementar la salinidad.



La variedad Pastilla muestra la máxima captación de este mineral.

Para el caso del hierro, los genotipos Flor de Mayo y Pinto Americano muestran una disminución en la absorción con el incremento de la salinidad, mientras que para el resto de los genotipos la absorción en general se mantiene estable. Mientras que el genotipo Pinto Mexicano presenta un mayor incremento.

En general el zinc no presenta mucha variación en la absorción del zinc, en las diferentes concentraciones de salinidad, observándose que los genotipos Pinto Americano y Pastilla muestran un incremento marcado en la absorción de este mineral al incrementarse las concentraciones de salinidad.

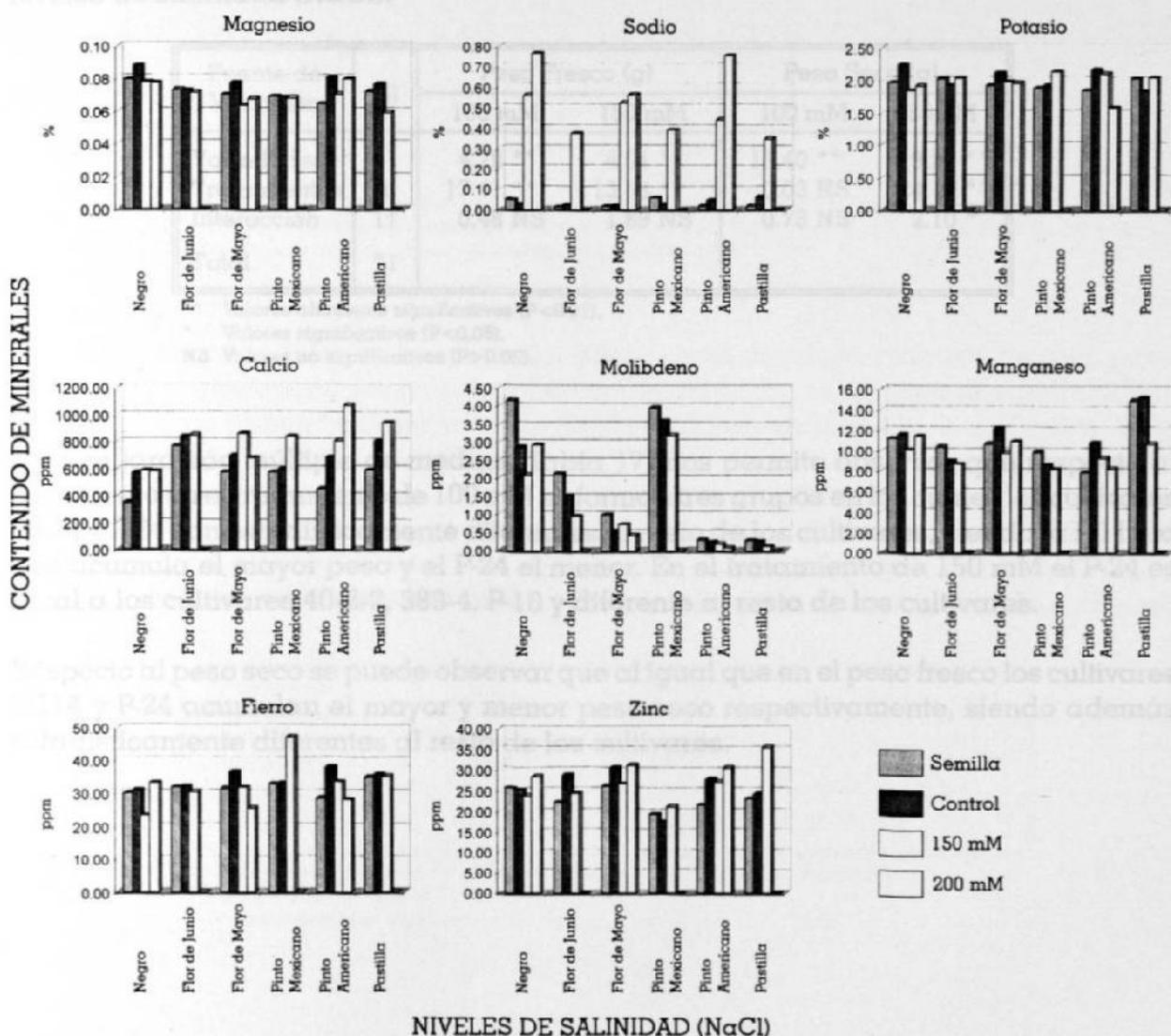


Figura 2. Contenido de minerales en seis variedades comerciales de frijol, sometidas a diferentes niveles de salinidad.



Fase 3. Variabilidad Genotípica en Etapa de Plántula

Crecimiento y Desarrollo

Los resultados del análisis de varianza para las diferentes variables se muestran en la Tabla (16). Diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) fueron observadas para las variables peso fresco y peso seco de la plántula, entre genotipos y tratamientos. En la interacción genotipo-tratamientos se observan diferencias significantes ($p < 0.05$) solo para el peso seco en el tratamiento de 150 mM.

Tabla 16. Valores de F calculada, obtenidos en el análisis de varianza para peso fresco y peso seco (g) de la plántula, en 12 cultivares de frijol mejorados sometidos a diferentes niveles de salinidad (NaCl).

Fuente de Variación	Gl	Peso Fresco (g)		Peso Seco (g)	
		100 mM	150 mM	100 mM	150mM
Variedades	11	4.78 **	4.01 **	13.40 **	9.21 **
Tratamientos	1	17.41 **	13.56 **	0.03 NS	24.13 **
Interacción	11	0.48 NS	1.69 NS	0.78 NS	2.10 *
Total	71				

** Valores altamente significativos ($P < 0.01$).

* Valores significativos ($P < 0.05$).

NS Valores no significativos ($P > 0.05$).

La comparación múltiple de medias (Tabla 17) nos permite observar que respecto al peso fresco en el tratamiento de 100 mM se forman tres grupos en los cuales los cultivares P-114 y P-24 son estadísticamente diferentes al resto de los cultivares, siendo la P-114 la que acumula el mayor peso y el P-24 el menor. En el tratamiento de 150 mM el P-24 es igual a los cultivares 40-2-2, 389-4, P-10 y diferente al resto de los cultivares.

Respecto al peso seco se puede observar que al igual que en el peso fresco los cultivares P-114 y P-24 acumulan el mayor y menor peso seco respectivamente, siendo además estadísticamente diferentes al resto de los cultivares.



Tabla 17. Comparación múltiple de medias (Tukey) y desviación estándar para peso fresco y peso seco (g) de la plántula, en 12 cultivares de frijol mejorados sometidos a diferentes niveles de salinidad (NaCl).

Peso Fresco (g)		Peso Seco (g)	
100 mM	150 mM	100 mM	150 mM
1) 5.38 ± 0.83 a	1) 4.97 ± 1.35 a	1) 1.39 ± 0.01 a	1) 1.14 ± 0.03 a
2) 4.31 ± 0.68 ab	8) 3.95 ± 0.71 ab	7) 1.09 ± 0.01 b	4) 1.02 ± 0.06 ab
3) 4.24 ± 0.98 abc	3) 3.88 ± 0.76 ab	3) 1.06 ± 0.04 b	3) 0.97 ± 0.09 abc
8) 4.02 ± 0.58 abc	4) 3.81 ± 0.01 ab	4) 0.99 ± 0.07 b	10) 0.93 ± 0.01 bc
9) 3.83 ± 0.54 bc	10) 3.53 ± 0.54 b	10) 0.98 ± 0.10 b	11) 0.91 ± 0.06 bc
7) 3.81 ± 0.66 bc	11) 3.50 ± 0.46 b	6) 0.98 ± 0.05 b	2) 0.89 ± 0.05 bcd
10) 3.81 ± 0.11 bc	2) 3.36 ± 0.63 b	2) 0.98 ± 0.01 b	8) 0.87 ± 0.11 bcd
11) 3.57 ± 0.30 bc	6) 3.20 ± 0.09 b	11) 0.98 ± 0.01 b	7) 0.85 ± 0.07 bcd
4) 3.55 ± 0.68 bc	12) 3.18 ± 0.98 b	8) 0.97 ± 0.06 b	6) 0.84 ± 0.22 cd
6) 3.31 ± 0.42 bc	5) 3.11 ± 0.36 b	12) 0.97 ± 0.03 b	12) 0.83 ± 0.08 cd
12) 3.06 ± 0.14 bc	7) 3.04 ± 0.29 b	9) 0.94 ± 0.05 b	9) 0.81 ± 0.12 cd
5) 2.82 ± 0.51 c	9) 3.02 ± 0.04 b	5) 0.74 ± 0.04 c	5) 0.73 ± 0.10 d

1) P-114; 2) 40-2-2; 3) 389-4; 4) Anzalduas; 5) P-24; 6) P-395; 7) P-4; 8) P-10; 9) 389-2; 10) P-373; 11) P-55; 12) P-15.
 NOTA: Letras iguales indican diferencias no significativas (P>0.05).

Respecto a las variables de crecimiento, altura de la plántula, longitud de raíz, peso seco aéreo y peso seco de raíz, se observaron diferencias altamente significativas (P<0.01), como se puede observar en la Tabla (18), con un coeficiente de variación de 19% en peso seco a 30% en longitud de raíz.

Tabla 18. Valores de F calculada, obtenidos en el análisis de varianza para diferentes variables morfofisiológicas en seis variedades comerciales de frijol sometidas a diferentes niveles de salinidad (NaCl).

Fuente de Variación	GI	AP	LR	PSA	PSR
Cultivares	5	14.37 **	8.40 **	93.71 **	43.73 **
Tratamientos	2	99.45 **	38.42 **	128.53 **	54.78 **
Interacción	10	3.73 **	3.56 **	8.35 **	2.95 **

(AP) Altura de Plántula, cm.; (LR) Longitud de Raíz, cm.; (PSA) Peso Seco Aéreo, g.; (PSR) Peso Seco de Raíz, g.
 ** Valores altamente significativos (P<0.01).



Con base en la comparación múltiple de medias se encontró que el peso seco aéreo y peso seco de la raíz de los cultivares Pinto Americano y Pastilla presentan los más altos valores (tolerantes), mientras que Flor de Mayo (susceptible) tiene el valor más bajo. En general se presenta un decremento gradual en la longitud de la plántula, longitud de raíz, peso seco aéreo (Figura 3), y peso seco de la raíz (Figura 4), al incrementar la concentración de la solución salina dependiendo de la susceptibilidad de las variedades.

Tabla 19. Comparación múltiple de medias (Tukey) de cada uno de los tratamientos, dentro de cada variedad, para diferentes variables morfofisiológicas, en plántulas sometidas a niveles de salinidad (NaCl).

Variables	Tratamientos	Variedades					
		Negro	Flor de Junio	Flor de Mayo	Pinto Mexicano	Pinto Americano	Pastilla
Altura de la Plántula (cm)	Control	22.76 a	20.45 a	33.87 a	37.95 a	56.36 a	38.47 a
	150 mM	11.37 ab	9.54 ab	20.59 b	24.11 b	21.90 b	23.56 b
	200 mM	1.83 b	7.28 b	3.65 c	14.80 b	8.52 c	14.24 b
Longitud de Raíz (cm)	Control	8.70 a	4.73 a	8.87 a	7.95 a	9.48 a	10.24 a
	150 mM	3.15 b	3.36 a	6.41 a	5.81 ab	8.06 a	7.74 ab
	200 mM	0.55 b	2.67 a	0.91 b	2.93 b	4.30 b	5.22 b
Peso Seco Aéreo (g)	Control	0.50 a	0.18 a	0.93 a	0.64 a	1.52 a	1.13 a
	150 mM	0.27 b	0.17 a	0.66 b	0.62 a	0.92 b	0.94 a
	200 mM	0.01 c	0.11 a	0.10 c	0.18 b	0.55 c	0.61 b
Peso Seco de Raíz (g)	Control	0.09 a	0.03 a	0.13 a	0.10 a	0.20 a	0.15 a
	150 mM	0.02 b	0.02 a	0.08 b	0.08 a	0.14 b	0.14 a
	200 mM	0.00 b	0.02 a	0.01 c	0.02 b	0.11 b	0.08 b

NOTA: Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05).

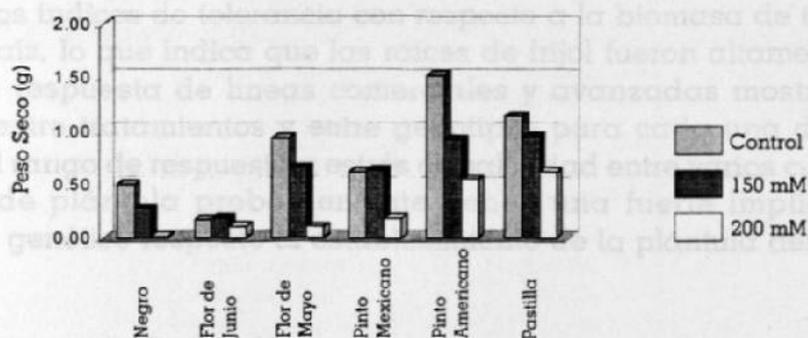


Figura 3. Promedios de peso seco (g) aéreo de seis variedades comerciales de frijol, sometidas a diferentes niveles de salinidad (NaCl).

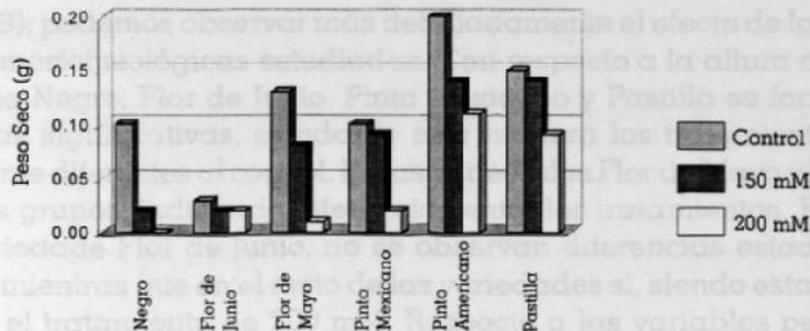


Figura 4. Promedios de peso seco (g) de la raíz en seis variedades comerciales de frijol, sometidas a diferentes niveles de salinidad (NaCl).

Los resultados indican que los cultivares de frijol presentan alta variación en la resistencia a estrés de salinidad en la etapa de plántula. La observación de la variación significativa entre los cultivares de frijol en la altura de la plántula y longitud de raíz, peso seco de tallo y raíz se ofrece una oportunidad para la selección de genotipos tolerantes a salinidad. La variabilidad genotípica para resistencia a salinidad fue reportada por Maiti (1997). El crecimiento de plántula de frijol, mostró una reducción gradual con el incremento de la concentración de salinidad, esta reducción en el crecimiento de la plántula podría correlacionarse con algunas funciones fisiológicas y bioquímicas que reducen la expansión de la célula e incrementa la extensión de la pared celular que interactúa con el mantenimiento de turgencia y tasa de crecimiento de la hoja (Neuman, *et al.*, 1989). Una reducción en el potencial de agua también fue reportada (Nasiry-Mahallati y Sarmadria, 1990) y una reducción en la absorción de minerales (Rehm, *et al.*, 1987 y Abbas, 1991) al mismo tiempo afectando el proceso de fotosíntesis y conductividad estomatal. El presente estudio indicó que algunos cultivares (P-114 y Pinto Americano) fueron tolerantes a estrés de salinidad. Estos cultivares también mostraron altos índices de tolerancia con respecto a la biomasa de tallo, pero no en biomasa de raíz, lo que indica que las raíces de frijol fueron altamente sensitivas a salinidad. La respuesta de líneas comerciales y avanzadas mostraron variación significativa entre tratamientos y entre genotipos para cada una de las variables estudiadas. El rango de respuesta a estrés de salinidad entre varios cultivares de frijol en la etapa de plántula probablemente tienen una fuerte implicación para el mejoramiento genético respecto al establecimiento de la plántula del cultivo de frijol en México.

En este trabajo se estudiaron diferentes respuestas que podrían estar relacionadas con los mecanismos de resistencia a salinidad, por lo tanto los estudios deberán estar enfocados en esta dirección a niveles bioquímicos y moleculares. A este respecto más estudios son necesarios para ultraestructura de cloroplasto, estimación del contenido de clorofila, proteínas de choque térmico y análisis de DNA y en los genotipos tolerantes y susceptibles a salinidad bajo estrés y sin estrés, para conocer los mecanismos de resistencia a estos factores.



En la Tabla (19), podemos observar más detalladamente el efecto de la salinidad sobre las variables morfofisiológicas estudiadas. Con respecto a la altura de la plántula en las variedades Negro, Flor de Junio, Pinto Mexicano y Pastilla se forman dos grupos con diferencias significativas, siendo de esta manera los tratamientos de salinidad estadísticamente diferentes al control. En las variedades Flor de Mayo y Pinto Americano, se forman tres grupos, indicando diferencias entre los tratamientos. En la longitud de raíz de la variedad Flor de Junio, no se observan diferencias estadísticas entre los tratamientos, mientras que en el resto de las variedades sí, siendo esta principalmente, marcada por el tratamiento de 200 mM. Respecto a las variables peso seco aéreo y peso seco de raíz en la variedad Flor de Junio no se presentan diferencias significativas, mientras que en el resto de las variables sí.

En forma general podemos mencionar que la altura de la planta se ve afectada significativamente con los tratamientos de salinidad lo cual puede observarse en la Tabla (19). Con el tratamiento de 150 mM de NaCl esta se reduce hasta un 61% con respecto al control, mientras que con 200 mM el porcentaje de afectación alcanza hasta un 92%. Por otro lado la longitud de la raíz se reduce desde un 64% hasta un 94% con los tratamientos de 150 y 200 mM respectivamente. Aparentemente el peso seco de la parte aérea es la variable que menos afectación presenta, con el tratamiento de 150 mM, reduciéndose hasta un 46% y un 89% en 200 mM. Finalmente el peso seco de la raíz se reduce hasta un 100% en condiciones de 200 mM.

El porcentaje de emergencia está altamente influenciado por la concentración salina, ya que como se puede observar en la Tabla (20), existe una diferencia altamente significativa entre las variedades y entre los tratamientos aplicados.

Tabla 20. Valores de F calculada, obtenidos en el análisis de varianza para el porcentaje de emergencia (%), en seis variedades de frijol comerciales sometidas a niveles de salinidad (NaCl), durante 12 días.

Fuente de Variación	Gl	Emergencia (%)
Covariantes	1	629.78 **
Día	1	629.78 **
Efectos Medidos	7	166.46 **
Tratamientos	2	472.66 **
Variedades	5	43.98 **
Interacción	10	4.46 **
Explicado	18	102.20 **
Total	647	

** Valores altamente significativos (P<0.01).

Como podemos observar en la Figura (5), el control inicia la emergencia a partir de las 24 h, mientras que para cada uno de los tratamientos el inicio de la emergencia requiere entre 6 y 7 días.

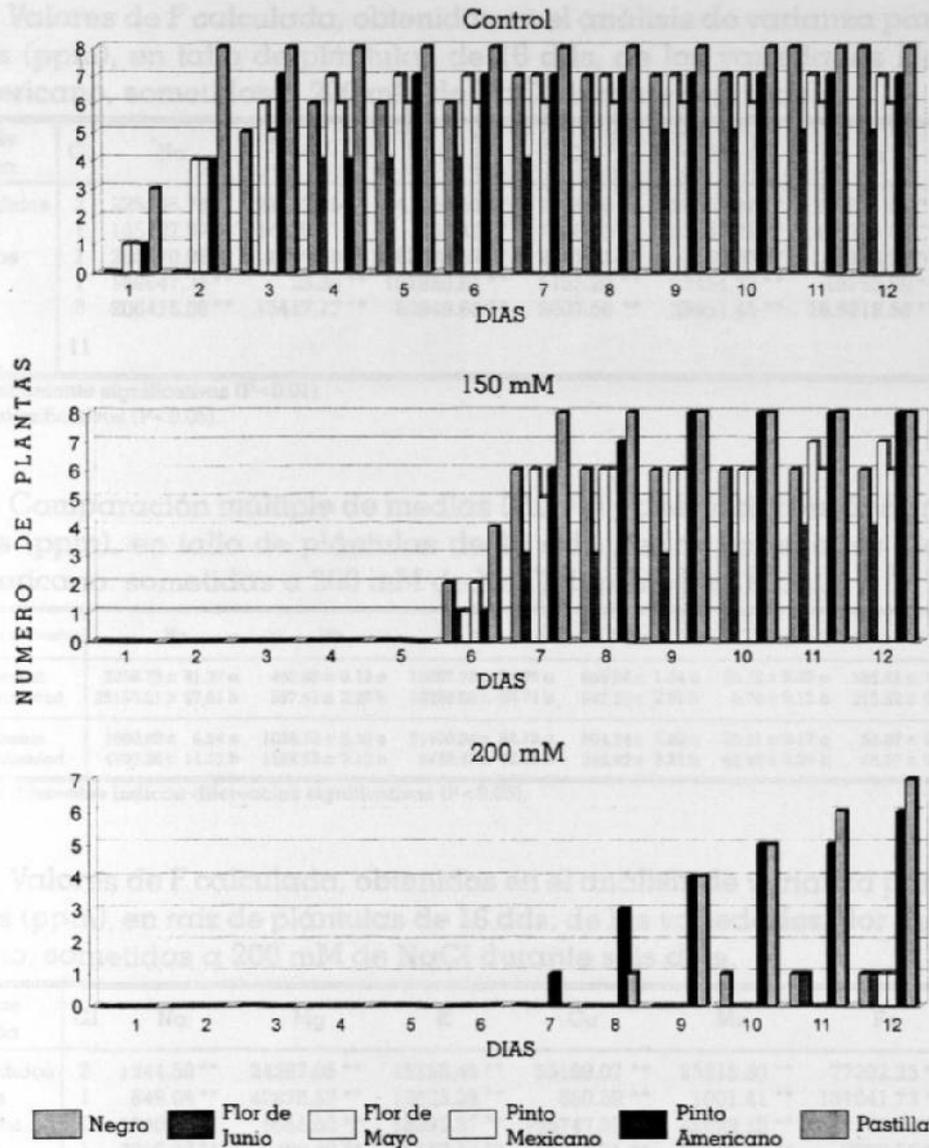


Figura 5. Efecto de diferentes niveles de salinidad (NaCl), sobre la emergencia en seis variedades comerciales de frijol, durante 12 días.

Fase 4. Respuestas Bioquímicas en Etapa de Plántula

Perfil de Minerales

Los resultados obtenidos en el análisis de varianza indican que existen diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) en el contenido de minerales, tanto en el tallo (Tabla 21) como en la raíz (Tabla 23). De igual manera el contenido es estadísticamente diferente entre el control y el tratamiento de salinidad Tabla (22) y Tabla (24).



Tabla 21. Valores de F calculada, obtenidos en el análisis de varianza para el perfil de minerales (ppm), en tallo de plántulas de 16 dds, de las variedades Flor de Junio y Pinto Americano, sometidas a 200 mM de NaCl durante seis días.

Fuente de Variación	Gl	Na	Mg	K	Ca	Mn	Fe	Zn
Efectos Medidos	2	225298.73 **	23112.85 **	41994.50 **	1978.78 **	26759.81 **	239951.58 **	64036.51 **
Variedades	1	185427.37 **	44276.41 **	353.43 **	1396.53 **	53434.02 **	478778.86 **	128067.47 **
Tratamientos	1	265170.09 **	1949.29 **	83635.57 **	2561.02 **	85.59 **	1124.28 **	5.56 **
Interacción	1	168647.78 **	25.80 **	107859.91 **	5155.20 **	33454.73 **	18753.58 **	21045.62 **
Explicado	3	206415.08 **	15417.17 **	63949.63 **	3037.58 **	28991.45 **	15.6218.58 **	49706.22 **
Total	11							

** Valores altamente significativos (P<0.01).

* Valores significativos (P<0.05).

Tabla 22. Comparación múltiple de medias (Tukey) y desviación estándar del perfil de minerales (ppm), en tallo de plántulas de 16 dds, de las variedades Flor de Junio y Pinto Americano, sometidas a 200 mM de NaCl durante seis días.

Variedades	Tratamientos	Na	Mg	K	Ca	Mn	Fe	Zn
Flor de Junio	Control	2356.73 ± 91.37 a	493.85 ± 0.12 a	16687.78 ± 54.99 a	866.64 ± 1.34 a	29.12 ± 0.29 a	382.68 ± 1.03 a	87.96 ± 0.14 a
	Salinidad	28155.21 ± 27.01 b	587.41 ± 2.27 b	18236.08 ± 93.74 b	647.23 ± 2.98 b	5.76 ± 0.12 b	315.92 ± 0.73 b	10.40 ± 0.19 b
Pinto Americano	Control	1800.82 ± 6.54 a	1038.13 ± 5.33 a	31100.24 ± 84.12 a	804.94 ± 3.92 a	35.61 ± 0.17 a	58.07 ± 0.29 a	151.04 ± 0.61 a
	Salinidad	4707.26 ± 14.15 b	1168.62 ± 7.12 b	5428.47 ± 42.96 b	942.92 ± 3.51 b	61.46 ± 0.29 b	98.57 ± 0.41 b	206.77 ± 1.18 b

NOTA: Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05).

Tabla 23. Valores de F calculada, obtenidos en el análisis de varianza para el perfil de minerales (ppm), en raíz de plántulas de 16 dds, de las variedades Flor de Junio y Pinto Americano, sometidas a 200 mM de NaCl durante seis días.

Fuente de Variación	Gl	Na	Mg	K	Ca	Mn	Fe	Zn
Efectos Medidos	2	1244.59 **	24267.05 **	15559.48 **	53199.07 **	25315.30 **	77202.25 **	77482.11 **
Variedades	1	849.08 **	42878.57 **	12823.39 **	650.59 **	1001.41 **	131241.73 **	106849.77 **
Tratamientos	1	1640.10 **	5655.52 **	18295.57 **	105747.55 **	49629.19 **	23162.76 **	48114.45 **
Interacción	1	2096.06 **	2422.40 **	16357.17 **	25215.61 **	21688.23 **	7692.55 **	18147.79 **
Explicado	3	1528.42 **	16985.50 **	15825.37 **	43871.25 **	24106.28 **	54032.35 **	57704.01 **
Total	11							

** Valores altamente significativos (P<0.01).

Tabla 24. Comparación múltiple de medias (Tukey) y desviación estándar del perfil de minerales (ppm), en raíz de plántulas de 16 dds, de las variedades Flor de Junio y Pinto Americano, sometidas a 200 mM de NaCl durante seis días.

Variedades	Tratamientos	Na	Mg	K	Ca	Mn	Fe	Zn
Flor de Junio	Control	6733.22 ± 207.46 a	1142.76 ± 2.18 a	6557.85 ± 340.58 a	1678.19 ± 5.05 a	36.96 ± 0.47 a	787.15 ± 8.09 a	90.20 ± 2.28 a
	Salinidad	8762.70 ± 1311.30 b	1047.74 ± 7.45 b	4886.25 ± 700.18 b	2170.39 ± 5.51 b	73.63 ± 0.47 b	1360.12 ± 0.93 b	157.64 ± 0.58 b
Pinto Americano	Control	35505.95 ± 64.76 a	2079.93 ± 7.07 a	61273.41 ± 56.63 a	1130.02 ± 3.23 a	31.42 ± 0.02 a	151.39 ± 0.37 a	243.32 ± 0.13 a
	Salinidad	2370.88 ± 55.29 b	1824.96 ± 7.06 b	1560.96 ± 91.59 b	2564.66 ± 6.21 b	113.14 ± 0.37 b	285.41 ± 1.33 b	525.44 ± 1.43 b

NOTA: Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05).



En la Figura (6) podemos observar que el contenido de minerales en tallo, se ve influenciado por la salinidad. Con respecto al control el contenido de sodio, magnesio y potasio se incrementa en la variedad Flor de Junio mientras que el calcio, manganeso, fierro y zinc disminuyen, por el contrario en la variedad Pinto Americano observamos que con excepción del potasio que disminuye, el resto de los minerales se incrementan.

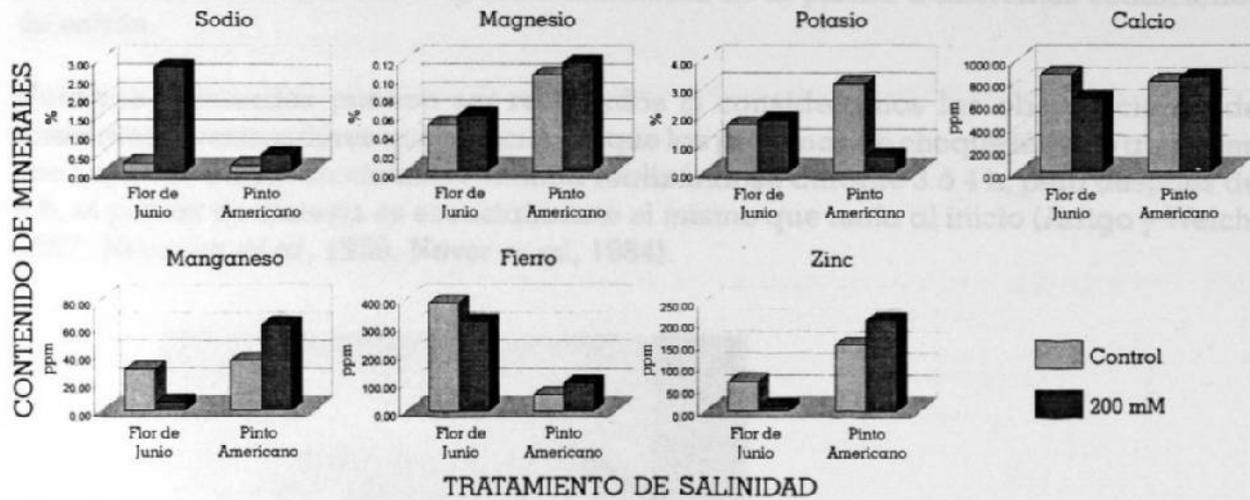


Figura 6. Contenido de minerales en tallo de plántulas de frijol de 16 dds, en dos variedades comerciales, sometidas a 200 mM de NaCl, durante seis días.

Respecto a la raíz, en la Figura (7) observamos que en la variedad Flor de Junio, el contenido de sodio, calcio, manganeso, fierro y zinc se incrementa, disminuyendo el magnesio y el potasio. En Pinto Americano disminuyen el sodio, magnesio y potasio, mientras que el calcio, manganeso, fierro y zinc se incrementan.

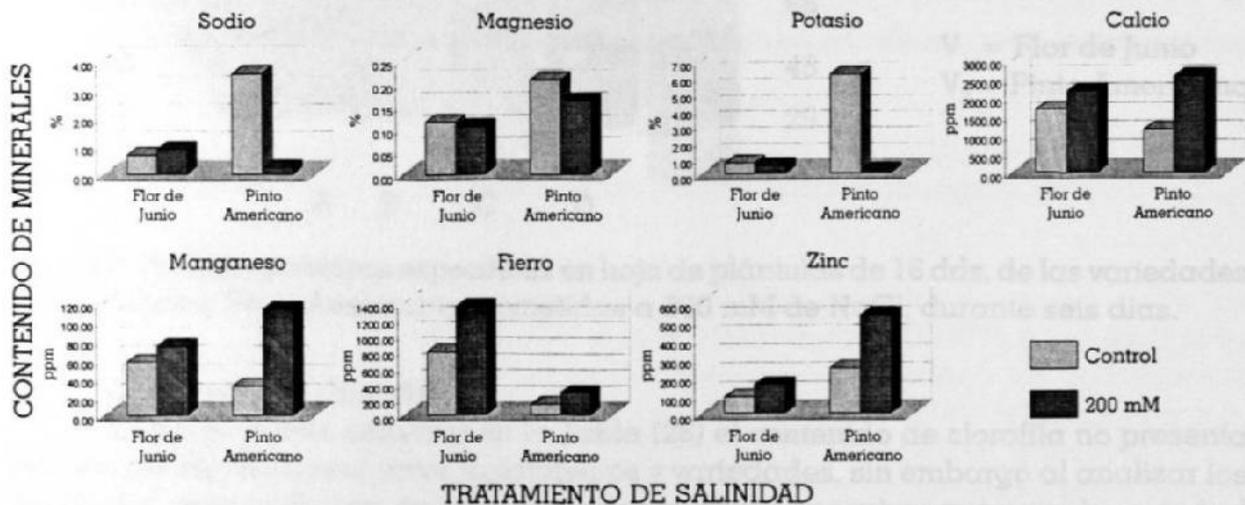


Figura 7. Contenido de minerales en raíz de plántulas de frijol de 16 dds, en dos variedades comerciales, sometidas a 200 mM de NaCl, durante seis días.



Perfil de Proteínas (Proteínas Específicas)

Los resultados obtenidos en la electroforesis, para la determinación de proteínas específicas nos permiten observar que aparentemente éstas no se manifiestan, ya que no existen diferencias en el corrimiento entre el control y el tratamiento, manifestándose únicamente proteínas estructurales. Este hecho nos permite deducir que éstas proteínas son sintetizadas como una respuesta inmediata de la planta a diferentes condiciones de estrés.

Nuestros resultados pueden ser reforzados si consideramos las observaciones de diferentes investigadores que mencionan que las proteínas de choque térmico aparecen con rapidez, donde su síntesis continúa realizándose durante 3 ó 4 h, pero después de 8 h, el patrón de síntesis es esencialmente el mismo que tenía al inicio (Arrigo y Welch, 1987; Neuman *et al.*, 1989; Nover *et al.*, 1984).

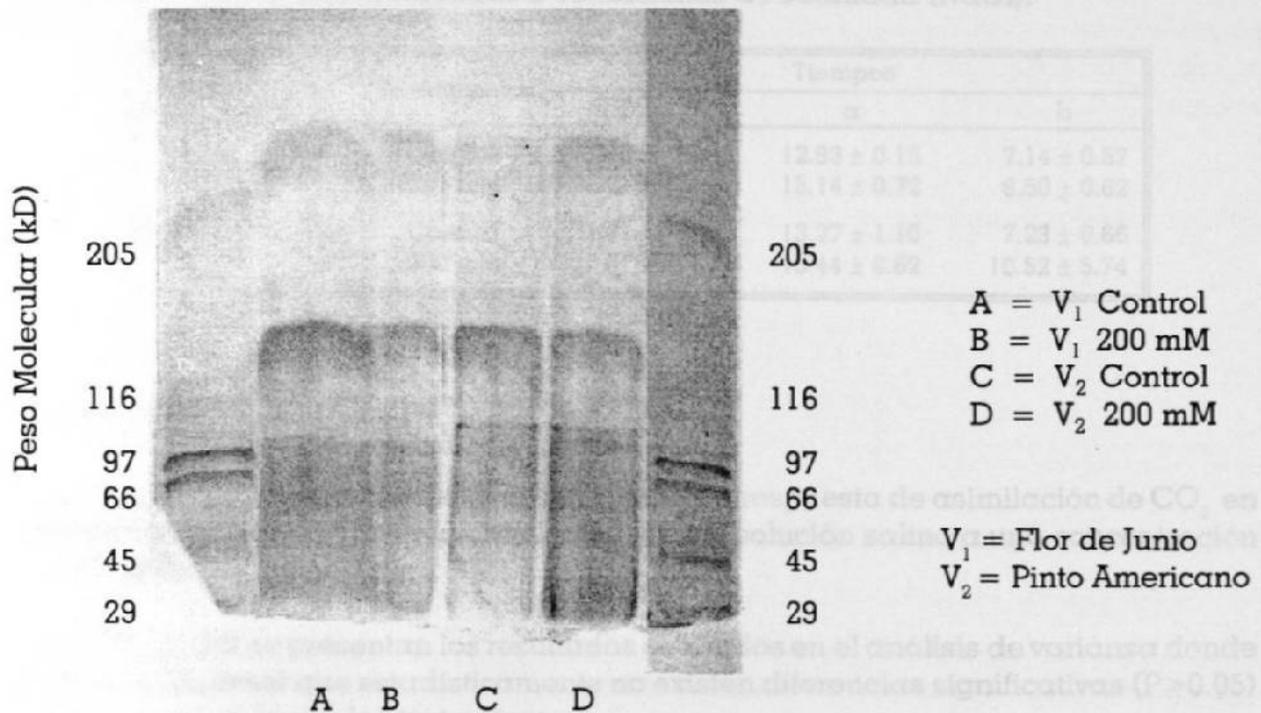


Figura 8. Perfil de proteínas específicas en hoja de plántulas de 16 dds, de las variedades Flor de Junio y Pinto Americano, sometidas a 200 mM de NaCl, durante seis días.

Contenido de Clorofila

Como se puede observar en la Tabla (26) el contenido de clorofila no presenta diferencias significativas entre tratamientos y variedades, sin embargo al analizar los resultados para cada una de las variedades pudimos encontrar que para la variedad Flor de Junio sí se presentan diferencias significativas en el contenido de clorofila a, entre los tratamientos.



La Tabla (25) presenta los valores promedio obtenidos para el contenido de clorofila. Como se puede observar, existe una ligera variación en el contenido de este compuesto entre las variedades y los tratamientos.

Bajo condiciones de salinidad el contenido de clorofila total, aumenta tanto en la variedad Flor de Junio (susceptible), como en Pinto Americano (resistente), pero en el cultivar tolerante el incremento es mayor, demostrando con esto una mayor estabilidad de la clorofila, lo cual ayuda a una mayor tasa de fotosíntesis, por otro lado el incremento del cultivar susceptible se puede considerar como una respuesta de sobrevivencia. Esto está asociado con la alta acumulación de iones de sodio bajo condiciones de estrés de salinidad, los cuales se complementan en la nutrición y el ajuste osmótico. Estos resultados difieren con los encontrados por Bhivare *et al.*, (1988).

Tabla 25. Valores promedio del contenido de clorofila (mg/g) y desviación estándar, en dos variedades de frijol sometidas a condiciones de salinidad (NaCl).

Variedades	Tratamientos	Tiempos		
		Total	a	b
Flor de Junio	Control	21.16 ± 0.46	12.93 ± 0.16	7.14 ± 0.57
	200 mM	24.91 ± 1.42	15.14 ± 0.72	8.50 ± 0.62
Pinto Americano	Control	21.61 ± 1.86	13.27 ± 1.10	7.23 ± 0.66
	200 mM	27.61 ± 13.10	15.44 ± 6.62	10.52 ± 5.74

Fase 5. Asimilación de CO₂

En este apartado se describen los resultados de la respuesta de asimilación de CO₂ en plántulas de dos variedades de frijol expuestas a solución salina a una concentración de 200 mM durante seis días.

En la Tabla (26) se presentan los resultados obtenidos en el análisis de varianza donde podemos observar que estadísticamente no existen diferencias significativas ($P > 0.05$) entre las variedades y los tratamientos.

Aunque estadísticamente no se presentaron diferencias significativas, entre las variedades y los tratamientos, como se puede observar en la Tabla (27), sí existen ligeras diferencias en la tasa de asimilación de CO₂ entre las variedades y los tratamientos. La tasa de asimilación de CO₂ de la variedad Flor de Junio se ve disminuida con el tratamiento de salinidad al pasar de 8.32 ppm/cm²/h a 6.17 ppm/cm²/h, para la variedad Pinto Americano que es considerada con cierto grado de tolerancia, la disminución es mas drástica al pasar de 12.30 ppm/cm²/h a 3.55 ppm/cm²/h.



Tabla 26. Valores de F calculada, obtenidos en el análisis de varianza para la tasa de asimilación de CO₂ (ppm/cm²/h) y contenido de clorofila (mg/g), en las variedades Flor de Junio y Pinto Americano sometidas a salinidad (NaCl, 200 mM).

Fuente de Variación	Gl	Asimilación de CO ₂	Clorofila Total	Clorofila a	Clorofila b
Variedades	1	0.93 NS	4.43 NS	0.21 NS	2.24 NS
Tratamientos	1	59.42 NS	45.91 NS	9.54 NS	10.79 NS
Interacción	1	21.80 NS	2.14 NS	0.00 NS	1.86 NS
Error	4	11.64 NS	44.34 NS	11.39 NS	8.52 NS
Total	7				

NS Valores no significativos (P>0.05).

Aunque la tasa de asimilación de CO₂ del cultivar tolerante sufre una disminución, se puede observar que en este cultivar se desencadenan otros mecanismos como la acumulación de sustancias osmorreguladoras y una mayor acumulación de biomasa total, como se pudo demostrar en los resultados.

Tabla 27. Tasa de asimilación de CO₂ (ppm/cm²/h), en dos variedades de frijol sometidas a condiciones de salinidad.

Variedades	Asimilación de CO ₂	
	Control	200 mM
Flor de Junio	8.32	6.17
Pinto Americano	12.30	3.55

Respecto a la asimilación de CO₂ Bhivare, *et al.*, (1988) reportaron que la salinidad de cloruro afecta significativamente la tasa de asimilación, resultados que concuerdan con los obtenidos en el presente estudio al encontrar que en Flor de Junio y Pinto Americano ésta se reduce en un 26 y 71% respectivamente.



Fase 6. Respuestas de Ultraestructura

En los cultivares susceptibles bajo tratamiento de salinidad una pérdida de orientación en la organización de tilacoides en los cloroplastos, que involucra un hinchamiento de los organelos y amplia separación de tilacoides asociado con una acumulación de gránulos de almidón de gran tamaño, en contraste en las líneas tolerantes no se encuentran este tipo de anomalías en la organización de los cloroplastos. En los genotipos tolerantes bajo condición de salinidad hubo mayor acumulación de gránulos de almidón de gran tamaño, gránulos osmofílicos y mayor número de mitocondrias comparado con el testigo. Estas características proveen a las plantas de una gran ventaja estratégica en las fuentes de material energético y mecanismos osmorreguladores bajo estrés de salinidad. Las modificaciones observadas concuerdan en parte con las reportadas por diferentes investigadores en cultivos de importancia económica (Ristic y Cass, 1992 y Tretyakov *et al.*, 1985).

Figura 9. Ultraestructura de cloroplasto en plántulas 16 dds, de la variedad Flor de Junio, mediante microscopía electrónica de transmisión, a) Control, b) 200 mM de NaCl.

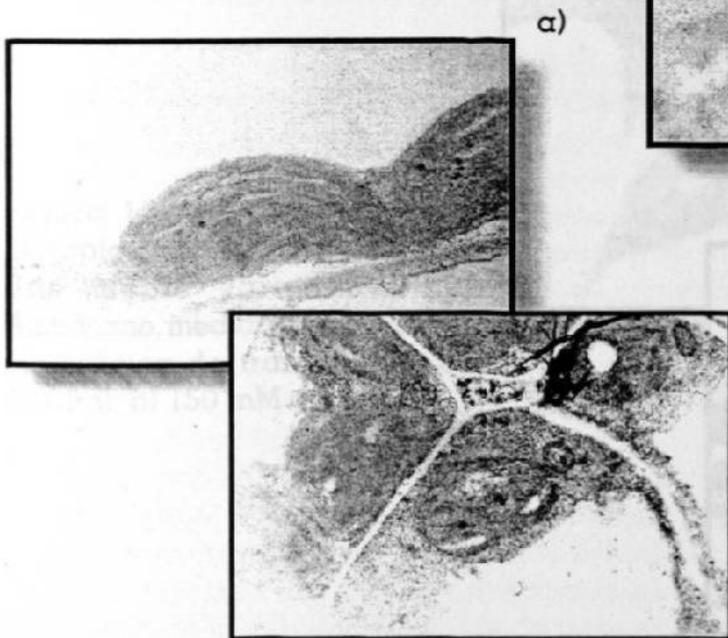
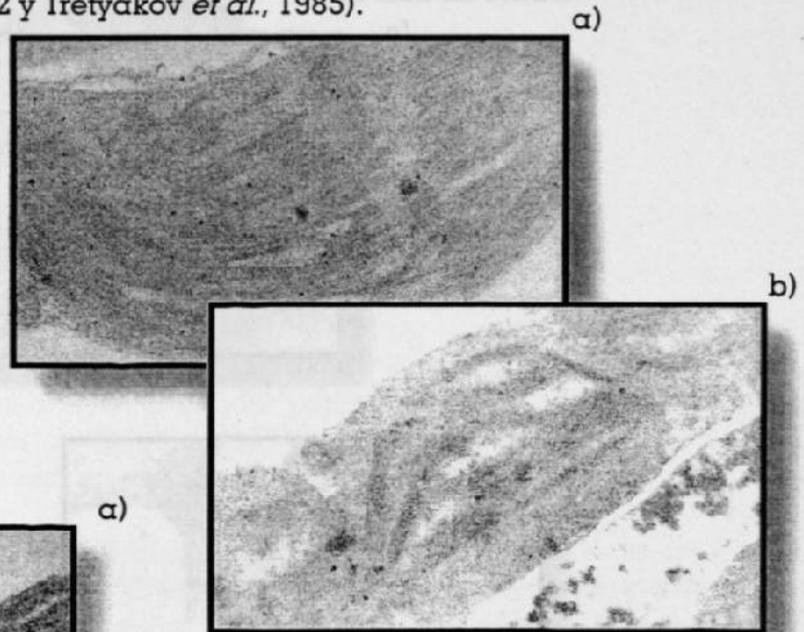


Figura 10. Ultraestructura de cloroplasto en plántulas de 16 dds, de la variedad Flor de Junio, mediante microscopía electrónica de transmisión, a) Control, b) 200 mM de NaCl.