

## Contenido de osmoprotectores, ácido ascórbico y ascorbato peroxidasa en hojas de frijol sometidas a estrés por sequía\*

### Osmoprotectants content, ascorbic acid and ascorbate peroxidase on bean leaves under drought stress

Teresa Susana Herrera Flores<sup>1§</sup>, Joaquín Ortíz Cereceres<sup>2†</sup>, Adriana Delgado Alvarado<sup>3</sup> y Jorge Alberto Acosta Galleros<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados- Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco, km 36.5. C. P. 56230. Montecillo Texcoco. Estado de México. <sup>3</sup>Colegio de Postgraduados- Campus Puebla. Carretera Federal México-Puebla km 125.5, Santiago Momoxpan, Municipio de San Pedro Cholula, Puebla. C. P. 72760. Tel: 01 595 9520200. Ext. 2012. (adah@colpos.mx). <sup>4</sup>Campo Experimental Bajío (INIFAP). km 6.5. Carretera Celaya-San Miguel de Allende. C. P. 38010. Celaya, Guanajuato. Tel: 01 461 6115323. Ext. 164. (acosta.jorge@inifap.gob.mx). <sup>§</sup>Autora para correspondencia: susyherrera75@yahoo.com.mx.

#### Resumen

La acumulación de osmoprotectores en plantas que se encuentran en condiciones de estrés por sequía, le permiten contrarrestar el efecto negativo que le provoca dicha condición ambiental. En el presente trabajo se estudió la respuesta bioquímica de plantas de frijol con base en la acumulación de carbohidratos solubles, almidón, ácido ascórbico, así como la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa, en las hojas simples y en las dos primeras hojas trifolioladas de la variedad resistente, Pinto Villa, y la susceptible a sequía Bayo Madero, ambas de raza Durango. Las plantas de ambas variedades se sometieron a tres tratamientos de humedad, riego, sequía y riego de recuperación. Con respecto a Bayo Madero, Pinto Villa mostró una mayor respuesta de tolerancia al estrés de humedad relacionada con: altas concentraciones de prolina, de ácido ascórbico y mayor actividad de la enzima ascorbato peroxidasa, ésta última en el tratamiento de sequía. En relación a la cantidad de carbohidratos solubles, Bayo Madero fue estadísticamente superior ( $p < 0.05$ ) a Pinto Villa, lo cual puede indicar que estos compuestos están siendo utilizados por la planta para sintetizar otros compuestos osmoprotectores como la prolina y que pueden considerarse como indicadores importantes para clasificar especies vegetales que sobrevivan y cumplan su ciclo biológico bajo condiciones de estrés de humedad.

#### Abstract

The accumulation of osmoprotectants in plants that are under stress from drought, allow you to offset the negative effect that causes these environmental conditions. In this study the biochemical response of bean plants based on the accumulation of soluble carbohydrates, starch, ascorbic acid, and the activity of ascorbate peroxidase enzyme, simple leaves and the first two leaves trifoliolate of studied resistant variety, Pinto Villa, and susceptible to drought Bayo Madero, both of Durango race. Plants from two varieties were subjected to three moisture treatments, irrigation and irrigation drought recovery. Regarding Bayo Madero, Pinto Villa showed increased stress tolerance response related humidity: high concentrations of proline, ascorbic acid, and increased activity of the peroxidase enzyme ascorbate, the latter in the drying treatment. In relation to the amount of soluble carbohydrates, Bayo Madero was statistically superior ( $p < 0.05$ ) to Pinto Villa, which may indicate that these compounds are being used by the plant to synthesize other compounds as osmoprotectants proline and which can be regarded as indicators important to classify plant species to survive and fulfill their life cycle under conditions of moisture stress.

**Keywords:** antioxidant activity, *Phaseolus vulgaris* L., moisture deficit, osmotic regulators.

\* Recibido: enero de 2014  
Aceptado: mayo de 2014

**Palabras clave:** *Phaseolus vulgaris* L., actividad antioxidantes, déficit de humedad, reguladores osmóticos.

## Introducción

La sequía y la salinidad son dos importantes factores ambientales adversos que provocan estrés osmótico, teniendo un impacto negativo en el crecimiento de la planta y productividad del cultivo; para mantener estable las condiciones intracelulares en presencia de factores de estrés ambiental, muchas plantas incrementan su potencial osmótico a través de la acumulación de osmolitos intracelulares como la prolina, glicina, betaina, manitol y trehalosa (Zhu, 2002; Wang *et al.*, 2007). Con el estrés hídrico, los tejidos vegetales generan una acumulación activa de solutos para asegurar la sobrevivencia de las plantas (Attipalli *et al.*, 2004), uno de los principales solutos es la prolina y los azúcares solubles, cuya síntesis se ha asociado con el mantenimiento de la turgencia de los tejidos para continuar con la función celular (Ramanjulu y Sudhakar, 2000). Nayer y Reza (2008) mencionan que la disminución del almidón con la inducción de plasmólisis puede reducir el volumen del citoplasma pero la acumulación de azúcares solubles puede contrarrestar el estrés osmótico.

Se tienen evidencias de que maíz expuesto al estrés de humedad el contenido de carbohidratos se incrementó hasta 42%, debido a que un déficit de agua puede inducir un aumento en el contenido de sacarosa, glucosa y fructosa en la hoja y en algunos casos solamente se incrementa la sacarosa o la hexosa (Pelleschi *et al.*, 1997). La sequía no sólo afecta el contenido de agua en los tejidos, sino que también induce el cierre estomático y en consecuencia ocasiona una disminución de la concentración de CO<sub>2</sub>, de la tasa fotosintética y del crecimiento, así como de la acumulación del Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina Fosfato Reducido (NADPH). Cuando el Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina Fosfato Oxidado (NADP) es un factor limitante, el oxígeno actúa como un aceptor alternativo de electrones de la cadena transportadora de electrones del tilacoide, originando la formación de radicales superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) (Camarena, 2006). El radical superóxido y su producto reductor peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) son compuestos potencialmente tóxicos que al combinarse forman un radical altamente tóxico conocido como radical hidroxilo (OH) (Sairam *et al.*, 1998), estos radicales se conocen como especies reactivas de oxígeno (EROS), provocan la peroxidación de los lípidos y por consecuencia, daño a las membranas, degradación de proteínas e inactivación de enzimas (Sairam *et al.*, 2005),

## Introduction

Drought and salinity are two major adverse environmental triggers, osmotic stress, having a negative impact on plant growth and crop productivity; so, in order to maintain stable intracellular conditions in the presence of environmental stresses, many plants increased osmotic potential by accumulation of intracellular osmolytes such as proline, glycine betaine, trehalose and mannitol (Zhu, 2002; Wang *et al.*, 2007). With drought stress, the plant tissues generate active solute accumulation to ensure the survival of the plants (Attipalli *et al.*, 2004), one of the major solutes proline and soluble sugars, whose synthesis has been associated with the maintenance of tissue turgor to continue cell function (Ramanjulu and Sudhakar, 2000). Nayer and Reza (2008) mention that decreasing starch inducing plasmolysis can reduce the volume of cytoplasm, but the accumulation of soluble sugars can counteract osmotic stress.

Evidence that maize exposed to moisture stress carbohydrate content was increased to 42%, because a shortage of water can induce an increase in the content of sucrose, glucose and fructose in the leaf and in some cases they have only increases sucrose or hexose (Pelleschi *et al.*, 1997). Drought affects not only the water content in tissue, but also induces stomatal closure and hence causes a decrease of the concentration of CO<sub>2</sub>, in the photosynthetic rate and the growth and accumulation Nicotinamide dinucleotide Reduced Adenine Phosphate (NADPH). When dinucleotide nicotinamide adenine phosphate oxidized (NADP) is a limiting factor, oxygen acts as an alternate electron acceptor in the electron transport chain thylakoid, causing the formation of superoxide radicals (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) (Camarena, 2006). The superoxide radical and hydrogen peroxide reducing product (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) are potentially toxic compounds which when combined form a radical known as highly toxic hydroxyl radical (OH) (Sairam *et al.*, 1998), these radicals are referred to as reactive oxygen species (EROS), cause lipid peroxidation and consequently membrane damage, protein degradation and inactivation of enzymes (Sairam *et al.*, 2005), which leads to oxidative stress. The drought tolerant genotypes present an efficient active system to protect against oxidative damage.

The plant tissues possess some antioxidant enzymes to counteract the damage caused by reactive oxygen species: superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), ascorbate

lo que induce al estrés oxidativo. Los genotipos tolerantes a la sequía presentan un sistema activo eficiente para protegerse del daño oxidativo.

Los tejidos de las plantas poseen algunas enzimas antioxidantes para contrarrestar el daño causado por las especies reactivas de oxígeno: superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1), ascorbato peroxidasa (APX, EC 1.11.1.11) y catalasa (CAT, EC 1.11.1.6) y antioxidantes no enzimáticos como pigmentos como carotenoides y ácido ascórbico. Durante las condiciones de estrés por sequía la actividad de los antioxidantes está relacionada con bajos niveles de peroxidación de lípidos (Bowler *et al.*, 1992). Un aumento de la capacidad metabólica de las enzimas antioxidantes puede ser parte de un sistema antioxidativo en plantas con la regulación de proteínas o la expresión de genes (Scandalios, 1993). Poco se ha podido hacer sobre el mejoramiento del frijol para adaptación a sequía, por lo que es importante analizar y establecer criterios de selección para resistencia o tolerancia a sequía, además de entender los mecanismos responsables de su respuesta a la sequía.

Con base en lo anterior se planteó evaluar el efecto del déficit hídrico sobre la concentración de osmoprotectores, ácido ascórbico y la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa en hojas de Pinto Villa y Bayo Madero, resistente y susceptible a la sequía, respectivamente, para identificar indicadores confiables para selección por resistencia a estrés de humedad. La hipótesis fue que el estrés de humedad provocará similar concentración de osmoprotectores, prolina y sacarosa, en Pinto Villa y Bayo Madero, así como en los niveles de ácido ascórbico y la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa.

## Materiales y métodos

### Material vegetal

Se utilizaron dos variedades mejoradas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Pinto Villa, resistente a la sequía y Bayo Madero susceptible a la sequía, ambas pertenecientes a la raza Durango (Singh *et al.*, 1991). Pinto Villa es una variedad de hábito de crecimiento indeterminado III, con tallos y ramas débiles semierectas, con guías cortas sin habilidad para trepar (CIAT, 1987). Alcanza la floración alrededor de los 43 días después de la siembra y la madurez fisiológica se presenta entre los 90 y 104 días después de la siembra (Acosta *et al.*, 1995). Bayo Madero es de características similares en morfología y

peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) and catalase (CAT, EC 1.11.1.6) and non-enzymatic antioxidants such as carotenoid pigments, and ascorbic acid. During conditions of drought stress, the antioxidant activity is related to low levels of lipid peroxidation (Bowler *et al.*, 1992). Increasing the metabolic capacity of the antioxidant enzymes may be part of a system in plants antioxidative protein regulation or gene expression (Scandalios, 1993). Little has been done on bean breeding for drought adaptation, so it is important to analyze and establish selection criteria for resistance or tolerance to drought addition to understanding the mechanisms responsible for its response to drought.

Based on the above were: to evaluate the effect of water deficit on the concentration of osmoprotectants, ascorbic acid and the activity of the enzyme ascorbate peroxidase in leaves of Pinto Villa and Bayo Madero, resistant and susceptible to drought, respectively, to identify indicators Reliable selection for resistance to moisture stress. The hypothesis was that stress would cause a similar moisture concentration of osmoprotectants, proline and sucrose in Pinto Villa and Bayo Madero, as well as the levels of ascorbic acid and ascorbate peroxidase activity enzyme.

## Materials and methods

### Plant material

Two improved bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties Pinto Villa, drought resistant Bayo Madero susceptible to drought, both belonging to the Durango raza (Singh *et al.*, 1991) were used. Pinto Villa is a variety of indeterminate growth habit III, with weak stems and branches semi-erect, with short guides without ability to climb (CIAT, 1987). Reach flowering around 43 days after planting and physiological maturity occurs between 90 and 104 days after sowing (Acosta *et al.*, 1995). Bayo Madero is similar in morphology and phenology, but with leaves, pods and grains and larger commercial type that Pinto Villa (Rosales *et al.*, 2004). The experiment was conducted in a greenhouse where average temperatures of 24 and 16 °C and relative humidities of 54 and 76% for the day and night, respectively were recorded. Styrofoam containers with a capacity of 0.5 to 1 kg were used. The substrate was a mixture of "peat moss" and black earth (2:1) sterilized. In containers of 0.5 kg plants of both varieties were taken to presenting simple leaves, eight

fenología, pero con hojas, vainas y granos de mayor tamaño y diferente tipo comercial que Pinto Villa (Rosales *et al.*, 2004). El experimento se llevó a cabo en un invernadero donde se registraron temperaturas medias de 24 y 16 °C y humedades relativas de 54 y 76% para el día y la noche, respectivamente. Se utilizaron recipientes de unicel con capacidad de 0.5 y 1 kg. El sustrato fue una mezcla de "peat moss" y tierra negra (2:1) esterilizada. En los recipientes de 0.5 kg se tuvieron las plantas de ambas variedades hasta que presentaron las hojas simples, ocho días después de la siembra (dds), y en los de 1 kg las plantas se desarrollaron hasta que presentaron la 1ª hoja trifoliolada, 15 dds y 2ª hojas trifolioladas, 22 dds.

### Tratamientos de sequía

Los tratamientos de humedad se definieron con base en una curva de retención de humedad del sustrato, en la que se determinaron las constantes de humedad por el método de la olla y membrana de presión, que relaciona el potencial matricial y el contenido de agua en el suelo, expresando así la distribución de los diámetros de los poros en el suelo, debido a que la retención capilar depende de su tamaño, así como la capacidad de campo (CC) y punto de marchites permanente (PMP), Castellanos *et al.* (2000). La humedad del sustrato de 50.7% equivalió a un potencial de agua de -0.03 MPa y 33.6% de humedad correspondió a -2 MPa. Se aplicaron tres tratamientos de humedad: riego (-0.03 MPa) durante el periodo de desarrollo de las hojas; sequía (suspensión del riego) cuando las hojas de interés llegaron a su total expansión y se mantuvieron sin riego hasta que el sustrato llegó a PMP (-2 MPa) entre los 5 y 9 días en los recipientes de 0.5 y 1 kg respectivamente; y el riego de recuperación (aplicación del riego), 24 h después se realizó el muestreo en este último. Se consideraron cinco plantas por variedad, para las determinaciones bioquímicas en los tres tipos de hojas analizadas, hojas simples, 1ª y 2ª hojas trifolioladas, en cada uno de los tratamientos de humedad.

### Prolina

La extracción y determinación de prolina, se llevó a cabo por el método de Bates (1973), determinación colorimétrica en la solución. Para ello, después de la reacción con ninhidrina ácida se midió la absorbancia a 520 nm de los productos disueltos en tolueno, en un espectrofotómetro UV/VIS (Evolution 300, Thermo Electron Corporation) con una curva de calibración utilizando L-prolina (Sigma).

days after sowing (dds), and in 1 kg plants were grown to presenting the 1<sup>st</sup> trifoliolate leaf, 15 dds and 2<sup>nd</sup> trifoliolate leaves, 22 dds.

### Drought treatments

The moisture treatments were defined based on a curve of moisture retention of the substrate, wherein the moisture constants were determined by the method of the pot and pressure membrane which relates the matric potential and the content of water in the soil, thus expressing the distribution of pore diameters in the floor, because the capillary retention depends on its size and field capacity (CC) and permanent wilting point (PMP), Castellanos *et al.* (2000). The humidity of the substrate was equivalent to 50.7% water potential -0.03 MPa and 33.6% moisture corresponded to -2 MPa. Moisture three treatments were applied: irrigation (-0.03 MPa) during the development of leaves; drought (irrigation suspension) when the leaves of interest reached its full expansion and maintained without irrigation until the substrate reached PMP (-2 MPa) between 5 and 9 days in containers of 0.5 and 1 kg respectively; recovery and irrigation (water application), 24 h after sampling was performed in the latter. Five plants per variety were considered for the biochemical determinations in the three types of tested sheets, single sheets, 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> trifoliolate leaves, in each humidity treatments.

### Proline

Extraction and determination of proline is conducted by the method of Bates (1973), a colorimetric determination in the solution. For this, after the reaction with acidic ninhydrin absorbance at 520 nm of the product dissolved in toluene was measured on a UV/VIS (Evolution 300, Thermo Electron Corporation) spectrophotometer with a calibration curve using L-proline (Sigma).

### Soluble sugars

The sugars were extracted with 80% ethanol (v/v) and were determined enzymatically following the route of the glycolysis according to Scholes *et al.* (1996). Readings were taken in a microplate reader Multiskan (Ascent<sup>®</sup>, Thermo Electron Co., Finland) at 340 nm against standard curves for glucose, fructose and sucrose. Once extracted the soluble sugars from the leaves, the solid waste is used for determination of starch by measuring glucose.

## Azúcares solubles

Los azúcares se extrajeron con etanol al 80% (v/v) y se determinaron enzimáticamente siguiendo la ruta de la glicólisis, de acuerdo con Scholes *et al.* (1996). Las lecturas se realizaron en un lector de microplacas Multiskan (Ascent<sup>®</sup>, Thermo Electron Co., Finland) a 340 nm, frente a curvas patrón de glucosa, fructosa y sacarosa. Una vez extraídos los azúcares solubles de las hojas, los residuos sólidos se utilizaron para la determinación de almidón a través de la medición de glucosa.

## Ácido ascórbico

La cuantificación del contenido de ácido ascórbico se realizó con el método descrito por Foyer *et al.* (1993) con modificaciones basadas en el método de Kampfenkel *et al.* (1995). La absorbancia se leyó a una longitud de onda de 265 nm en un espectrofotómetro UV/Visible (Evolution 300, Thermo Electron Corporation).

## Actividad de la enzima ascorbato peroxidasa

La cuantificación de la actividad enzimática de ascorbato peroxidasa (APX:EC.1.11.1.11) se realizó por espectrofotometría (Nakano y Asada (1981) con modificaciones de Jiménez *et al.* (1997). La reacción se inició con la adición de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), se registró la reducción en la absorbancia por la oxidación del ácido ascórbico a 290 nm en un espectrofotómetro UV/Visible (Evolution 300, Thermo Electron Corporation), a intervalos de 20 s, durante 5 min.

## Diseño experimental y análisis estadístico empleado

El diseño experimental y el análisis de datos fueron mediante un completo al azar, para cada una de las variables medidas. El análisis estadístico consistió en un análisis de varianza con el paquete SAS<sup>®</sup> 8.0. Las fuentes de variación consideradas fueron variedades, tratamientos de humedad, el error experimental y el total. Se utilizó la prueba de comparación de medias de Tukey con una  $\alpha = 0.05$ , en los casos en que la prueba de F resultó significativa.

## Resultados y discusión

El Cuadro 1, muestra la concentración de prolina en las hojas simples, 1<sup>a</sup> y 2<sup>a</sup> hojas trifolioladas, en las variedades Pinto Villa y Bayo Madero, por el efecto de los tratamientos

## Ascorbic acid

The quantification of the content of ascorbic acid was carried out with the method described by Foyer *et al.* (1993) with modifications based on the method of Kampfenkel *et al.* (1995). The absorbance was read at a wavelength of 265 nm on a UV/Visible spectrophotometer (Evolution 300, Thermo Electron Corporation).

## Activity of ascorbate peroxidase enzyme

The quantification of the enzymatic activity of ascorbate peroxidase (APX:EC.1.11.1.11) was performed spectrophotometrically Nakano and Asada (1981) with modifications of Jiménez *et al.* (1997) the reaction was initiated with the addition of peroxide hydrogen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), the reduction in absorbance was recorded for the oxidation of ascorbic acid at 290 nm in a UV/Visible spectrophotometer (Evolution 300, Thermo Electron Corporation) at intervals of 20 s, for 5 min.

## Experimental design and statistical analysis used

The experimental design and data analysis were using a complete random, for each of the measured variables. Statistical analysis consisted of an analysis of variance with SAS<sup>®</sup> 8.0 software. The sources of variation were considered varieties, moisture treatments, experimental error and the total. The comparison test with Tukey  $\alpha = 0.05$ , where the F test was significant was used.

## Results and discussion

The Table 1 shows the concentration of proline in the simple leaves, 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> trifoliolate leaves in varieties Pinto Villa and Bayo Madero, the effect of moisture treatments: irrigation, drought and recovery irrigation. Statistically significant differences are observed, the highest concentration of proline was on the 1<sup>st</sup> trifoliolate leaf in both varieties; Pinto Villa had values of 153.42 and Bayo Madero values 72.56 nmol g<sup>-1</sup> pf (fresh weight); while in the 2<sup>nd</sup> sheet trifoliolate proline concentration in Pinto Villa declined by almost half of that observed in the 1<sup>st</sup> leaf; Bayo Madero in proline concentration also decreased in the 2<sup>nd</sup> trifoliolate leaf, but less so than in Pinto Villa.



de humedad: riego, sequía y riego de recuperación. Se observan diferencias estadísticas significativas, la mayor concentración de prolina fue en la 1ª hoja trifoliolada en ambas variedades; Pinto Villa tuvo valores de 153.42 y Bayo Madero valores de 72.56 nmol g<sup>-1</sup> pf (peso fresco); mientras que en la 2ª hoja trifoliolada la concentración de prolina en Pinto Villa disminuyó casi a la mitad de lo observado en la 1ª hoja; en Bayo Madero la concentración de prolina también disminuyó en la 2ª hoja trifoliolada, pero en menor proporción que en Pinto Villa.

Regarding the effect of moisture treatments (Table 1), significant differences were observed, Pinto Villa had a proline concentration of 109.02 nmol g<sup>-1</sup> pf the drought treatment, while watering recovery was 98.15 nmol g<sup>-1</sup> pf. In Bayo Madero irrigation recovery was 70.26 nmol g<sup>-1</sup> pf; in these two moisture treatments Proline concentration in Pinto Villa was significantly higher than Bayo Madero, the accumulation of this solute can be related to a greater ability of the plant to continue its life cycle in limiting moisture conditions; can complement these results with

**Cuadro 1. Concentración de prolina (nmol g<sup>-1</sup> pf) en hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero desarrolladas en tres diferentes niveles de humedad.**

**Table 1. Proline concentration (nmol g<sup>-1</sup> pf) in leaves of bean cultivars Pinto Villa and Bayo Madero developed in three different moisture levels.**

Variedad	Hoja			Tratamientos de humedad				
	Simple	1ª hoja trifoliolada	2ª hoja trifoliolada	Media	Riego	Sequía	Recuperación	Media
Pinto Villa	56.01 c	153.42 a	73.46 bc	94.29	75.72 b	109.02 a	98.15 a	94.29
Bayo Madero	56.7 c	77.56 b	66.24 b	66.83	62.79 b	67.45 b	70.26 b	66.83
	DMS 0.05= 20.52			DMS 0.05= 20.52				

Medias con distinta letra entre columnas son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ); pf= peso fresco; Recuperación= riego de recuperación; DMS= diferencia mínima significativa para cada columna.

Con respecto al efecto de los tratamientos de humedad (Cuadro 1), se observaron diferencias significativas, Pinto Villa tuvo una concentración de prolina de 109.02 nmol g<sup>-1</sup> pf en el tratamiento de sequía, mientras que en riego de recuperación fue de 98.15 nmol g<sup>-1</sup> pf. En Bayo Madero en el riego de recuperación fue de 70.26 nmol g<sup>-1</sup> pf; en estos dos tratamientos de humedad la concentración de Prolina en Pinto Villa fue significativamente superior a la de Bayo Madero, la acumulación de este soluto se puede relacionar con una mayor capacidad de la planta para continuar con su ciclo biológico en condiciones limitantes de humedad; dichos resultados se pueden complementar con lo reportado por Harsh (2003) menciona que la acumulación de prolina, en hojas de maíz en condiciones de estrés por humedad, actúa como agente osmótico para proteger a la planta de la desecación; además de que actúa como reserva de nitrógeno, que se utiliza posteriormente durante la rehidratación (Ramanjulu y Sudhakar, 2000). La magnitud de la síntesis y acumulación de prolina depende de la presencia de carbohidratos, ya que éstos proporcionan el carbono precursor y el hidrógeno necesario para dicha síntesis en hojas de cebada (Stewart, 1978); y Larher *et al.* (1993) mencionan que la sacarosa tiene efecto positivo en la acumulación de la prolina.

those reported by Harsh (2003) mentioned that the proline accumulation in maize leaves under stress from moisture, acts as an osmotic agent to protect the plant from drying out; addition to serving as a reserve of nitrogen, which is then used during rehydration (Ramanjulu and Sudhakar, 2000). The magnitude of the synthesis and accumulation of proline depends on the presence of carbohydrate, as these provide the carbon precursor and the hydrogen needed for this synthesis in barley leaves; Stewart (1978); Larher *et al.* (1993) report that sucrose has a positive effect on the accumulation of proline.

In three bean cultivars, it was observed that the lowest values of proline accumulation occurred in the  $\Psi_A$  -0.29 MPa in the simple leaves and the first trifoliolate leaf in  $\Psi_A$  -0.42 MPa in cv "Dobrudjanski"; while the highest concentration was present in the other cultivars, demonstrating that osmotic adaptive adjustment is an important mechanism of *Phaseolus vulgaris*, in response to moisture stress. In this respect Zlatev (2006) mentions that the differences between cultivars were due to the maintenance of turgor which represents the physiological state of the same. The concentrations of this amino vary between and within species, so Pinto Villa indicated, which is considered resistant to water stress, has a greater accumulation of solutes in earlier

En tres cultivares de frijol, se observó que los valores más bajos de la acumulación de prolina se dieron en el  $\Psi_A$  de -0.29 MPa en la hojas simples y en la primera hoja trifoliolada en un  $\Psi_A$  de -0.42 MPa en el cv “Dobrudjanski”; mientras que la concentración más alta se presentó en los otros dos cultivares, lo que demuestra que el ajuste osmótico es un mecanismo adaptativo importante de *Phaseolus vulgaris*; como respuesta al estrés de humedad. A éste respecto Zlatev (2006) menciona que las diferencias entre cultivares se debieron al mantenimiento de la turgencia que representa el estado fisiológico de los mismos. Las concentraciones de éste aminoácido varían entre y dentro de especies, por lo que en Pinto Villa indican, que es considerada como resistente al estrés hídrico, presenta una mayor acumulación de solutos en etapas más tempranas de desarrollo (primera hoja trifoliolada), con respecto a Bayo Madero (segunda hoja trifoliolada) lo cual se puede reflejar en la respuesta de tolerancia a la sequía de Pinto Villa.

La cantidad de carbohidratos solubles en las hojas no fue diferente entre variedades, la mayor concentración de carbohidratos solubles se presentó en la 1ª hoja trifoliolada de Bayo Madero (2.57 mg g<sup>-1</sup> pf), sin mostrar diferencias significativas con la de la variedad Pinto Villa (2.34 mg g<sup>-1</sup> pf). Las concentraciones disminuyeron en la segunda hoja trifoliolada en ambas variedades obteniéndose valores de 2.25 mg g<sup>-1</sup> pf en Bayo Madero y 1.67 mg g<sup>-1</sup> pf en Pinto Villa (Cuadro 2).

En el Cuadro 3, la concentración más alta de almidón se tuvo en la variedad Bayo Madero por efecto del riego de recuperación y sequía con valores de 0.88 y 0.76 mg g<sup>-1</sup> pf respectivamente, dichos valores fueron significativamente superiores a los obtenidos en Pinto Villa con valores de 0.53 y 0.42 mg g<sup>-1</sup> pf en los mismos tratamientos de humedad.

La cantidad de almidón, compuesto principalmente por glucosa, fructosa y sacarosa (Cuadro 3) se incrementó con el desarrollo de la planta, por lo que los valores más altos se tuvieron en la 2ª hoja trifoliolada en donde Bayo Madero tuvo 1.18 mg g<sup>-1</sup> pf (Cuadro 4), mientras que Pinto Villa solo alcanzó 0.69 mg g<sup>-1</sup> pf. Esto coincide con lo mencionado por Fischer y Holl (1991) mencionan que el incremento en la concentración de azúcares puede ser resultado de la degradación del almidón almacenado, lo que tiene una función muy importante en la acumulación de azúcares solubles en las células.

stages of development (first trifoliolate leaf), compared to Bayo Madero (second trifoliolate leaf) which can be reflected in the response of drought tolerance of Pinto Villa.

The amount of soluble carbohydrates in the leaves did not differ between varieties, the highest concentration of soluble carbohydrates was presented at the 1<sup>st</sup> trifoliolate leaf Bayo Madero (2.57 mg g<sup>-1</sup> pf), showing no significant difference with the variety Pinto Villa (2.34 mg g<sup>-1</sup> pf). Concentrations decreased in the second trifoliolate leaf in both varieties yielding values 2.25 mg g<sup>-1</sup> pf in Bayo Madero and 1.67 mg g<sup>-1</sup> pf Pinto Villa (Table 2).

**Cuadro 2. Concentración de carbohidratos solubles (glucosa + fructosa + sacarosa) (mg g<sup>-1</sup> pf) en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.**

**Table 2. Concentration of soluble carbohydrates (glucose + fructose + sucrose) (mg g<sup>-1</sup> pf) in the leaves of bean cultivars Pinto Villa and Bayo Madero.**

Variedad	Hoja			Media
	Simple	1ª hoja trifoliolada	2ª hoja trifoliolada	
Pinto Villa	0.86 d	2.34 a	1.67 bc	1.62
Bayo Madero	1.3 d	2.57 a	2.25 ab	2.04
DMS 0.05 = 0.61				

Medias con distinta letra entre columnas son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ); pf= peso fresco; DMS= diferencia mínima significativa para cada columna.

In Table 3, the highest concentration of starch was in the range Bayo Madero effect of irrigation recovery and drought with values of 0.88 and 0.76 mg g<sup>-1</sup> pf respectively, these values were significantly higher than those obtained in Pinto Villa with values of 0.53 and 0.42 mg g<sup>-1</sup> pf therein moisture treatments.

**Cuadro 3. Concentración de almidón (mg g<sup>-1</sup> pf) de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes tratamientos de humedad.**

**Table 3. Starch concentration (mg g<sup>-1</sup> pf) of bean varieties Pinto Villa and Bayo Madero at different moisture treatments.**

Variedad	Tratamientos de humedad			Media
	Riego	Sequía	Recuperación	
Pinto Villa	0.67 abc	0.42 d	0.53 cd	0.54
Bayo Madero	0.66 bc	0.76 ab	0.88 a	0.76
DMS 0.05 = 0.22				

Medias con distinta letra entre columnas son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ); Recuperación= riego de recuperación; pf= peso fresco; DMS= diferencia mínima significativa para cada columna.

**Cuadro 4. Concentración de almidón (mg g<sup>-1</sup> pf) en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.**

**Table 4. Starch concentration (mg g<sup>-1</sup> pf) in the leaves of bean cultivars Pinto Villa and Bayo Madero.**

Variedad	Hojas			Media
	Simples	1 <sup>a</sup> hoja trifoliolada	2 <sup>a</sup> hoja trifoliolada	
Pinto Villa	0.28 d	0.65 c	0.69 c	0.54
Bayo Madero	0.2 d	0.92 b	1.18 a	0.76
DMS 0.05= 0.22				

Medias con distinta letra entre columnas son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ); pf= peso fresco; DMS= diferencia mínima significativa para cada columna.

Por su parte, Sánchez *et al.* (2005) observaron altas concentraciones de glucosa y fructosa en la raíz y el vástago de plántulas de frijol desarrolladas en altas concentraciones de Nitrógeno (N). Medrano y Flexas (2001) mencionan que las triosas fosfato que no son utilizadas para la síntesis de sacarosa son utilizadas para producir almidón, que actúa como una sustancia de reserva de carbono. En trigo sensible a la sequía se han observado altas concentraciones de fructosa (Martín *et al.*, 1993), mientras que Kerepesi y Galiba (2000) observaron concentraciones similares de glucosa y fructosa en plántulas de la misma especie. En relación a la dinámica de concentración de los azúcares, Wang *et al.* (1995) señalan que una deficiencia de agua induce un incremento en el contenido de glucosa, fructosa y sacarosa en las hojas. Zinselmeier *et al.* (1995) mencionan que en algunos casos solo puede ser sacarosa o solo hexosas (glucosa y fructosa) como lo indican Keller y Ludlow (1993).

La cantidad de ácido ascórbico (Cuadro 5), en Pinto Villa fue incrementando conforme los niveles de humedad en el suelo disminuyeron, pero la concentración más alta se tuvo en el tratamiento de riego de recuperación con 601.95 mmoles g<sup>-1</sup> pf. En Bayo Madero el comportamiento fue diferente ya que la concentración más alta se presentó con el tratamiento de sequía (393.08 mmoles g<sup>-1</sup> pf) y en el riego de recuperación el contenido disminuyó a 330.42 mmoles g<sup>-1</sup> pf.

En las hojas, la cantidad de ácido ascórbico, el valor más alto se presentó en la primera hoja trifoliolada en Pinto Villa con 683.91 mmoles g<sup>-1</sup> pf, siendo estadísticamente superior al de Bayo Madero (229.34 mmoles g<sup>-1</sup> pf), mientras que Bayo Madero tuvo la concentración más alta en la segunda hoja trifoliolada de 565.54 mmoles g<sup>-1</sup> pf (Cuadro 6). La

The amount of starch composed mainly of glucose, fructose and sucrose (Table 3) increased with the development of the plant, so that the highest values were taken at the 2<sup>nd</sup> sheet trifoliolate where Bayo Madero was 1.18 mg g<sup>-1</sup> pf (Table 4), while Pinto Villa only reached 0.69 mg g<sup>-1</sup> pf. This coincides with what was mentioned by Fischer and Holl (1991) mentioned that the increase in the concentration of sugars can result from degradation of the stored starch, which has a very important role in the accumulation of soluble sugars in the cells function.

Meanwhile, Sánchez *et al.* (2005) found high concentrations of glucose and fructose in the root and stem bean seedling developed in high concentrations of nitrogen (N). Flexas Medrano (2001) mention that the triose phosphates that are not used for the synthesis of sucrose are used for producing starch, which acts as a carbon reserve substance. Drought sensitive wheat was observed concentrations of fructose (Martín *et al.*, 1993), while Kerepesi and Galiba (2000) found similar levels of glucose and fructose in seedlings of the same species. Regarding the dynamic concentration of sugars, Wang *et al.* (1995) note that a deficiency of water induces an increase in the content of glucose, fructose and sucrose in the leaves. Zinselmeier *et al.* (1995) mention that in some cases may only be just sucrose or hexoses (glucose and fructose) as indicated by Keller and Ludlow (1993).

The amount of ascorbic acid (Table 5), in accordance Pinto Villa was increased moisture levels in the soil decreased, but the highest concentration was taken into the recovery irrigation treatment with 601.95 mmol g<sup>-1</sup> pf. In Bayo Madero behavior was different in that the highest concentration was presented with the drought treatment (393.08 mmol g<sup>-1</sup> pf) and irrigation recovery content decreased to 330.42 mmol g<sup>-1</sup> pf.

**Cuadro 5. Concentración de ácido ascórbico total (mmoles g<sup>-1</sup> pf) en las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes tratamientos de humedad.**

**Table 5. Overall ascorbic acid concentration (mmol g<sup>-1</sup> pf) in varieties of beans Pinto Villa and Bayo Madero at different moisture treatments.**

Variedad	Tratamientos de humedad			Media
	Riego	Sequía	Recuperación	
Pinto Villa	369.64 b	591.95 a	601.95 a	521.18
Bayo Madero	362.8 b	393.08 b	330.42 b	362.1
DMS 0.05= 146.26				

Medias con distinta letra entre columnas son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ); Recuperación= riego de recuperación; pf= peso fresco; DMS= diferencia mínima significativa para cada columna.



menor concentración de ácido ascórbico se observó en el tratamiento de riego en las dos variedades, y en el caso de sequía y riego de recuperación las concentraciones del antioxidante fueron mayores.

**Cuadro 6. Concentración de ácido ascórbico total (mmoles g<sup>-1</sup> pf) en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.**

**Table 6. Overall ascorbic acid concentration (mmol g<sup>-1</sup> pf) in the leaves of bean cultivars Pinto Villa and Bayo Madero.**

Variedad	Hoja			Media
	Simple	1ª hoja trifoliolada	2ª hoja trifoliolada	
Pinto Villa	234.94 b	683.91 a	644.69 a	521.18
Bayo Madero	291.43 b	229.34 b	565.54 a	362.1
DMS 0.05= 146.26				

Medias con distinta letra entre columnas son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ); pf= peso fresco; DMS= diferencia mínima significativa para cada columna.

Las hojas simples tuvieron las concentraciones más bajas de ácido ascórbico en las dos variedades. Estos resultados son similares a los obtenidos por Bartoli *et al.* (1999) quienes encontraron diferencias significativas en la concentración de ácido ascórbico en hojas de trigo en suelo con  $\Psi_A$  de -2 MPa, en el que los tratamientos de sequía fueron superiores al testigo con 1990 y 2700 mmoles g<sup>-1</sup> pf, respectivamente. Bartoli *et al.*, (2005) mencionan que en hojas de dos cultivares de trigo la mayor concentración de ácido ascórbico se mostró en condiciones de riego con valores de 0.014 mmoles g<sup>-1</sup> pf, mientras que en sequía, fue menos de la mitad que en riego, esto que demuestra la capacidad de las plantas para acumular ácido ascórbico tanto en condiciones óptimas de humedad como de estrés, dicho comportamiento está influenciado por la actividad de la enzima L-galactona-1,4-lactona dehidrogenasa (GalLDH). Con base en lo anterior, se puede señalar que Pinto Villa que se considera una variedad resistente a la sequía, la cual bajo condiciones de estrés severo tiene la capacidad de estimular la síntesis o concentración de ácido ascórbico en etapas más tempranas de desarrollo que Bayo Madero, que es una variedad susceptible.

En el Cuadro 7, se observa que la mayor actividad de la enzima ascorbato peroxidasa, se observó en el tratamiento de sequía, en el que Pinto Villa tuvo una actividad estadísticamente superior a la de Bayo Madero 0.48 y 0.35 mmoles g<sup>-1</sup> pf·min respectivamente.

In the leaves, the amount of ascorbic acid, the highest value was recorded in the first sheet trifoliolate Pinto Villa with 683.91 mmoles g<sup>-1</sup> pf, being statistically higher than Bayo Madero (229.34 mmol g<sup>-1</sup> pf), while Bayo Madero had the highest concentration in the second trifoliolate leaf 565.54 mmol g<sup>-1</sup> pf (Table 6). The lowest concentration of ascorbic acid was observed in the treatment of irrigation in the two varieties, and in the case of drought and recovery irrigation, antioxidant concentrations were higher.

The simple leaves had the lowest concentrations of ascorbic acid in the two varieties. These results are similar to those obtained by Bartoli *et al.* (1999) who found significant differences in the concentration of ascorbic acid in the ground wheat leaves with  $\Psi_A$  -2 MPa, in which drying treatment with the control were 1 990 and 2 700 mmol g<sup>-1</sup> pf, respectively. Bartoli *et al.* (2005) mention that in leaves of two wheat cultivars the highest concentration of ascorbic acid was shown under irrigation with values of 0.014 mmol g<sup>-1</sup> pf, while drought was less than half that in irrigation this demonstrates the ability of plants to accumulate ascorbic acid both humidity conditions such as stress, such behavior is influenced by the activity of the enzyme L-galactona-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH). Based on the foregoing, it can be stated that Pinto Villa is considered a variety resistant to drought, which under conditions of severe stress has the ability to stimulate the synthesis or ascorbic acid concentration at earlier stages of development Bayo Madero, a susceptible variety.

The Table 7 shows that the increased activity of ascorbate peroxidase enzyme, was found in the drying treatment, in which Pinto Villa had an activity statistically superior to Baius Madero 0.48 and 0.35 mmol g<sup>-1</sup> pf·min respectively.

**Cuadro 7. Actividad de la enzima ascorbato peroxidasa (mmoles g<sup>-1</sup> pf min) en las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero en diferentes tratamientos de humedad.**

**Table 7. Activity of the enzyme ascorbate peroxidase (mmol g<sup>-1</sup> pf min) in varieties of beans Pinto Villa and Bayo Madero at different moisture treatments.**

Variedad	Tratamientos de humedad			Media
	Riego	Sequía	Recuperación	
Pinto Villa	0.44 ab	0.48 a	0.31 c	0.41
Bayo Madero	0.3 c	0.35 bc	0.33 c	0.32
DMS 0.05= 0.1				

Medias con distinta letra entre columnas son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ); Recuperación= riego de recuperación; pf= peso fresco; DMS= diferencia mínima significativa para cada columna.

La actividad de la enzima ascorbato peroxidasa fue mayor en la segunda hoja trifoliolada, y con diferencias significativas entre las variedades estudiadas con valores de 0.55 y 0.51 mmol g<sup>-1</sup> pf min en Pinto Villa y Bayo Madero, respectivamente; mientras que en la 1ª hoja trifoliolada y en las hojas simples la actividad de la enzima fue baja en ambas variedades (Cuadro 8).

Zlatev *et al.* (2006) mencionan que en tres cultivares de frijol, la actividad de las enzimas ascorbato peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa estuvieron involucradas en el escape de las plantas al daño por estrés oxidativo, confiriendo estabilidad a la membrana bajo condiciones de estrés de humedad, y que de acuerdo a este criterio dos de esos cultivares (Plovdiv 10 y Prelom) mostraron tolerancia y uno resultó sensible (Dobrudjanski). A su vez, la actividad de la ascorbato peroxidasa en plantas de arroz fue similar en los tratamientos de humedad (riego y sequía) y se identificaron seis diferentes isoformas de APX no desnaturalizadas en geles de acrilamida, las cuales se expresaron dependiendo del nivel de estrés en que se encontraban las plantas (Srivalli *et al.*, 2003).

La actividad de la enzima ascorbato peroxidasa en las hojas en dos cultivares de trigo “Bug Chambergo (BCH)” y “Cooperativa Maipún (CM)” fue mayor en condiciones de riego en el cultivar BCH (0.729 μmol g<sup>-1</sup> pf min) durante la etapa vegetativa (Bartoli *et al.*, 2005); así como en plantas de papa de 28 días de desarrollo, cultivadas in vitro con valores de 250 y 200 mmol mg<sup>-1</sup> de proteína en los cultivares Alpha y Atlantic respectivamente, esto en ambientes con bajas temperaturas y aplicaciones de ácido abscísico (ABA) (Mora, 2007). Ciertas modificaciones en los sistemas de degradación de las especies reactivas de oxígeno (EROS) en los cloroplastos se traducen en tolerancia al estrés oxidativo impuesto por diversos factores bióticos y abióticos (Pastori y Foyer, 2002). Se encontró una correlación alta entre el contenido de ácido ascórbico y la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa en la variedad de Pinto Villa con R<sup>2</sup>= 0.81, y en Bayo Madero de R<sup>2</sup>= 0.93. Ésta alta correlación indica que los dos compuestos antioxidantes se incrementan a la par y puede tener una explicación bioquímica, en el sentido de que el ácido ascórbico sirve como sustrato de la enzima ascorbato peroxidasa para degradar las especies reactivas de oxígeno.

The activity of ascorbate peroxidase enzyme was higher in the second trifoliolate leaf, and significant differences between the varieties studied with values of 0.55 and 0.51 mmol g<sup>-1</sup> pf min Pinto Villa and Bayo Madero, respectively; while in the 1st trifoliolate leaf and simple leaves the enzyme activity was low in both varieties (Table 8).

**Cuadro 8. Actividad de la enzima ascorbato peroxidasa (mmol g<sup>-1</sup> pf min) en las hojas de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero.**

**Table 8. Activity of the enzyme ascorbate peroxidase (mmol g<sup>-1</sup> pf min) in the leaves of bean cultivars Pinto Villa and Bayo Madero.**

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

DMS 0.05= 0.1

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

Zlatev *et al.* (2006) mention that three bean cultivars activity of enzymes ascorbate peroxidase, superoxide dismutase and catalase were involved in the escape of plants to oxidative stress damage, conferring stability to the membrane under stress conditions of moisture, and that according to this criterion two of these cultivars (Prelom 10 and Plovdiv) showed tolerance and one was sensitive (Dobrudjanski). In turn, the ascorbate peroxidase activity in rice plants was similar moisture treatment (irrigation and drying) and six different isoforms of APX undenatured acrylamide gels were identified which are expressed depending on the level of stress in which the plants were located (Srivalli *et al.*, 2003).

The activity of ascorbate peroxidase enzyme in leaves of two cultivars of wheat “Bug Chambergo (BCH)” and “Cooperativa Maipún (CM)” was higher under irrigation in farming BCH (0.729 μmol g<sup>-1</sup> pf min) during the vegetative stage (Bartoli *et al.*, 2005.) and in potato plants 28 days of development, cultured in vitro with values of 250 and 200 mmol mg<sup>-1</sup> of protein in the Alpha and Atlantic cultivars respectively, this in low temperature environments and applications of abscisic acid (ABA) (Mora, 2007). Certain changes in the systems of degradation of reactive oxygen species (EROS) in chloroplasts result in tolerance to

## Conclusiones

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

La concentración de carbohidratos solubles glucosa, fructosa, sacarosa y almidón, fue mayor en Bayo Madero que en Pinto Villa en la primera hoja trifoliolada, sin embargo la concentración de cada uno de ellos difirió entre las variedades y los tratamientos de humedad. El carbohidrato que se concentró en mayor cantidad en ambas variedades fue la glucosa, posiblemente debido al desdoblamiento de la sacarosa a hexosas.

Pinto Villa sintetizó y concentró mayor cantidad de ácido ascórbico en la primera hoja trifoliolada en los tratamientos de sequía y riego de recuperación con respecto a Bayo Madero, lo que también puede estar relacionado con su respuesta de adaptación a la sequía. La actividad de la enzima ascorbato peroxidasa tuvo valores similares en las dos variedades de frijol, pero en Pinto Villa fue mayor en la segunda hoja trifoliolada en los tratamientos de riego y sequía, mientras que en Bayo Madero la mayor actividad se observó en los tratamientos de sequía y riego de recuperación.

De los indicadores relacionados con el tres por sequía analizados en esta investigación se pueden considerar para identificar en etapas tempranas de desarrollo bajo condiciones de estrés por agua y tomarlos como referencias y puntos específicos de comparación en etapas de desarrollo posteriores, y así, ver si la síntesis de dichos compuestos se mantiene durante todo el ciclo del cultivo o solo en etapas específicas.

## Literatura citada

- Acosta, J.; Ochoa, R.; Arrieta, M.; Ibarra, F.; Pajarito, A. and Sánchez, I. 1995. Registration of Pinto Villa common bean. *Crop Sci.* 35:1211.
- Attipalli, R. R.; Kolluru, V. C. and Munusamy, V. 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *J. Plant Physiol.* 161:1189-1202.

oxidative stress imposed by various biotic and abiotic factors (Pastori and Foyer, 2002). A high correlation between ascorbic acid content and activity of ascorbate peroxidase enzyme in the range of Pinto Villa with  $R^2= 0.81$ , and Bayo Madero of  $R^2= 0.93$  was found. This high correlation indicates that the two antioxidant compounds to increase the torque and may have a biochemical explanation, in the sense that ascorbic acid serves as a substrate of the enzyme to degrade ascorbate peroxidase reactive oxygen species.

## Conclusions

The highest concentration of the amino acid proline was observed in the first trifoliolate leaf in variety Pinto Villa in the drought treatment, while Bayo Madero proline concentration was lower, which may mean that Pinto Villa has the ability to synthesize proline earlier in the development of the plant and at higher rates than Bayo Madero and counteract the effect of drought.

The concentration of soluble carbohydrates glucose, fructose, sucrose and starch was higher in Bayo Madero in Pinto Villa in the first trifoliolate leaf, however; the concentration of each differs between varieties and moisture treatments. The carbohydrate concentrated at higher levels in both varieties was glucose, possibly due to the cleavage of sucrose to hexoses.

Pinto Villa synthesized and more concentrated amount of ascorbic acid in the first trifoliolate leaf in the treatments of drought and irrigation recovery from Bayo Madero, which may also be related to their adaptive response to drought. The activity of ascorbate peroxidase enzyme had similar values in the two varieties of beans, Pinto Villa but was higher in the second trifoliolate leaf in drought and irrigation treatments, while Bayo Madero increased activity was observed in treatments drought and recovery irrigation.

Indicators related to stress drought analyzed in this research can be considered to identify in early stages of development under conditions of water stress and take them as references and specific points of comparison in later stages of development, and so, see if the synthesis of such compounds is maintained throughout the crop cycle or only at specific stages.

*End of the English version*



- Bartoli G. C.; Simontacchi, M.; Tambussi, E.; Beltrano, J.; Montaldi, E. and Punturulo, S. 1999. Drought and watering-dependent oxidative stress: effect on antioxidant content in *Triticum aestivum* L. leaves. *J. Exp. Bot.* 50(322):375-383.
- Bartoli G. C.; Guiamet, J. J.; Kiddle, G.; Pastori, G. M.; Di Cagno, R.; Theodoulou, F. L and Foyer C. H. 2005. Ascorbate content of wheat leaves is not determinate by maximal L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH) activity under drought stress. *Plant Cell Environ.* 28:1073-1081.
- Bates L. S. 1973. Rapid determination of free proline for waterstress studies. *Plant Soil.* 39:205-207.
- Bowler, C.; Montague, M. V. and Inze, D. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43:83-116.
- Camarena, G. G. 2006. Las especies reactivas de oxígeno en defensa de las plantas contra patógenos. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente.* Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo México. 12(1):25-35.
- Castellanos, J. Z.; Uvalle, B. S. X. y Aguilar, S. A. 2000. Manual de interpretación de análisis de suelos y aguas. 2ª (Ed.). Colección INCAPA. San Miguel de Allende, Guanajuato. 226 p.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1987. Morfología de la planta de frijol común *Phaseolus vulgaris* L. Cali, Colombia. 50 p.
- Fischer, C. and Holl, W. 1991. Food reserves in scots pine (*Pinus sylvestris* L.) I. Seasonal changes in the carbohydrate and fat reserves of pine needles. *Tress.* 5:187-195.
- Foyer, C. H. 1993. Ascorbic acid. *In: Alscher, R. G. and Hess, J. L. (Eds.). Antioxidants in higher plants.* Boca Raton: CRC Press. 34-58.
- Harsh N. 2003. Accumulation of osmolytes and osmotic adjustment in water-stressed wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) as affected by calcium and its antagonists. *Environ. Exp. Bot.* 50(3):253-264.
- Jiménez, A. J. A.; Hernández, L. A. del Río and Sevilla, F. 1997. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiol.* 114:275-284.
- Kampfenkel, K. V.; Montagu, M. and Inzé, D. 1995. Effects of iron excess on *Nicotiana glauca* plants. Implications to oxidative stress. *Plant Physiol.* 107:725-735.
- Keller, F. and Ludlow, M. M. 1993. Carbohydrate metabolism in drought-stressed leaves of pigeonpeas (*Cajanus cajan*). *J. Exp. Bot.* 44:1351-1359.
- Kerepesi, I. and Galiba, G. 2000. Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. *Crop Sci.* 40:482-487.
- Larher, F.; Lepoint, L.; Petrivalsky, M. and Chappart, M. 1993. Effectors for the osmoinduced proline response in higher plants. *Plant Physiol. Biochem.* 31:911-922.
- Martin, M.; Miceli, F.; Morgan J. A.; Scalet, M. and Zerbi, G. 1993. Synthesis of osmotically active substrates in winter wheat leaves as related to drought resistance of different genotypes. *J. Agric. Crop Res.* 171:176-184.
- Medrano, H. and Flexas, J. 2001. Fijación del dióxido de carbono y biosíntesis de fotoasimilados. *In: fundamentos de fisiología vegetal.* Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (Eds.). McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España. 173-185.
- Mora, H. M. E. 2007. Estrés oxidativo, respuesta antioxidante y tolerancia a baja temperatura en microplantas de *Solanum tuberosum* L. Tesis de Doctora en Ciencias. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 142 p.
- Nakano, Y. and Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. *Plant Cell Physiol.* 22(5):867-880.
- Nayer, M. and Reza, H. 2008. Drought-induced accumulation of soluble sugars and proline in two maize varieties. *World Appl. Sci. J.* 3(3):448-453.
- Pastori, G. M. and Foyer, C. H. 2002. Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of "Redox" and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiol.* 129:460-468.
- Pellesschi, S. J. P. Rocher and Prioul, J. L. 1997. *Plant Cell Environ.* 20:493-503.
- Ramanjulu, S. and Sudhakar, C. 2000. Proline metabolism during dehydration in two mulberry genotypes with contrasting drought tolerance. *J. Plant Physiol.* 157:81-85.
- Rosales, R.; Acosta, J. A.; Muruaga, J. S.; Hernández, J. M. y Esquivel, G. 2004. Variedades mejoradas de frijol del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA)- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. (INIFAP)-Centro de Investigación Regional Región Centro (CIRCE). Libro técnico Núm. 6. Campo Experimental Valle de México, Chapingo. 148 p.
- Sairam, R. K.; Deshmukh, P. S. and Saxena, D. C. 1998. Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerance to water stress. *Biol. Plantarum.* 41:387-394.
- Sairam R. K.; Srivastava, G. C.; Agarwal, S. and Meena, R. C. 2005. Differences in antioxidant activity in response to salinity stress in tolerant and susceptible wheat genotypes. *Biol. Plantarum.* 49:85-91.
- Sánchez, E.; Soto, J. M.; Núñez, A.; Ruiz, J. M. and Romero, L. 2005. Biosynthesis of non-structural carbohydrates and their distribution in green bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv Strike): deficiency vs toxicity of nitrogen. *Rev. Fitotec. Mex.* 28(1):55-61.
- Scandalios J. G. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiol.* 101:7-12.
- Scholes, J.; Bundock, N.; Wilde, R. and Rolfé, S. 1996. The impact of reduced vacuolar invertase activity on the photosynthetic and carbohydrate metabolism of tomato. *Planta.* 200:265-272.
- Singh, S. P.; Gepts, P. and Debouck, D. G. 1991. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Econ. Bot.* 45(3):379-396.
- Srivalli, B.; Sharma, G. and Khanna, C. R. 2003. Antioxidative defense system in an upland rice cultivar subjected to increasing intensity of water stress followed by recovery. *Physiol. Plantarum.* 119:503-512.
- Stewart, C. R. 1978. Role of carbohydrates in proline accumulation in wilted barley leaves. *Plant Physiol.* 61:775-778.
- Wang, Z.; Quebedeaux, B. and Stutte, G. W. 1995. Osmotic adjustment: effect of water stress on carbohydrates in leaves, stems and roots of apple. *Australian J. Plant Physiol.* 22:747-754.
- Wang Z. Q.; Yuan, Y. Z.; Ou, J. Q.; Lin, Q. H. and Zhang, C. F. 2007. Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase contribute differentially to proline accumulation in leaves of wheat (*Triticum aestivum*) seedlings exposed to different salinity. *J. Plant Physiol.* 164:695-701.
- Zinselmeier, C.; Weggate, M. E.; Schussler, J. R. and Jones R. J. 1995. Low water potential disrupts carbohydrate metabolism in maize (*Zea mays* L.) ovaries. *Plant Physiol.* 107:385-391.
- Zlatev, Z. S. 2006. Effects of water stress on leaf water relations of young bean plants. *J. Center Eur. Agric.* 6(1):5-14.
- Zhu, J. K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* 2002:53:247-73.