

CRECIMIENTO Y RESPUESTAS FISIOLÓGICAS DE *Phaseolus* spp. EN CONDICIONES DE SALINIDAD

GROWTH AND PHYSIOLOGICAL RESPONSES OF *Phaseolus* spp. UNDER SALINITY

Leobardo Bahena Betancourt¹, Lourdes Macías Rodríguez², Rodolfo López Gómez²
y Jeannette S. Bayuelo Jiménez^{1*}

¹ Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales e ² Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. Km. 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro. 58880, Tarímbaro, Michoacán, México. Tel. (01) 443 2958324.

*Autor para correspondencia (jsbayuelo@hotmail.com)

RESUMEN

Se estudió el comportamiento de variables fisiológicas e índices de crecimiento en especies de *Phaseolus* en condiciones de salinidad. El experimento se realizó en solución nutritiva en condiciones de invernadero, con cuatro niveles de salinidad (0, 30, 60, and 90 mM NaCl). Durante 20 d de iniciado el tratamiento salino, se analizó la tasa de crecimiento relativo (TCR; g g⁻¹ d⁻¹), tasa de asimilación neta (TAN; g m⁻² día⁻¹), razón de área foliar (RAF; m² g⁻¹), área foliar específica (AFE; m² g⁻¹) y relación de peso foliar (RPF; g g⁻¹). El incremento de salinidad redujo la TCR, TAN, RAF y AFE, pero no afectó la RPF. En todas las especies, excepto en *P. filiformis*, la TCR correlacionó significativamente con TAN y no con RAF, lo que indica que la eficiencia fotosintética es un factor determinante en las diferencias entre especies. En *P. filiformis*, la TCR, TAN y RAF se mantuvieron inalterables aún en la mayor concentración salina. En todas especies, excepto en *P. filiformis*, el incremento de salinidad disminuyó progresivamente la conductancia estomática y la tasa de asimilación de CO₂. Los potenciales hídrico y osmótico disminuyeron conforme se intensificó el agobio salino, pero el ajuste osmótico permitió que la turgencia celular se mantuviera o aumentara. La salinidad provocó incremento significativo de carbohidratos totales en hojas y tallos, pero no en raíces; tal acumulación de carbohidratos se relacionó con el mantenimiento de turgencia en etapas iniciales del agobio. Se confirmó que *P. filiformis* es una especie tolerante a salinidad, tolerancia que está regulada por un adecuado control estomático y eficiencia fotosintética a través de ajuste osmótico.

Palabras clave: *Phaseolus* spp., crecimiento, relaciones hídricas, carbohidratos totales, tolerancia a salinidad.

SUMMARY

To study the behavior of physiological parameters and plant growth analysis under salt stress, *Phaseolus* species were grown under greenhouse conditions, in nutrient solution at four different salinity levels (0, 30, 60, and 90 mM NaCl). Relative growth rate (RGR; g g⁻¹ d⁻¹), net assimilation rate (NAR; g m⁻² d⁻¹), leaf area ratio (LAR; m² g⁻¹), specific leaf area (SLA; m² g⁻¹) and leaf weight ratio (LWR; g g⁻¹) were calculated for 20 d. The increase in salinity significantly reduced RGR, NAR, LAR and SLA, without affecting LWR. In all species, except in *P. filiformis*, NAR, but not LAR, was significantly correlated with RGR, thus indicating that NAR is an

important factor underlying the salinity-induced differences among species. In *P. filiformis* neither NAR nor LAR were affected by increased salinity, and consequently RGR was maintained. Increasing salinity progressively decreased the stomatal conductance. The CO₂ assimilation rate decreased gradually with salinity, but significant reductions were showed only at the highest salt levels (90 mM NaCl). In *P. filiformis*, however, neither stomatal conductance nor CO₂ assimilation were affected by salt stress. Leaf water and osmotic potentials declined significantly as stress conditions intensified, but osmotic adjustment permitted the maintenance of positive turgor throughout the growth period. Salinity increased the concentration of total carbohydrates in leaves and stems; this carbohydrate accumulation was associated to the osmotic adjustment at the initiation of the saline period. Salt tolerance in *P. filiformis* is associated to a better stomatal control and photosynthetic efficiency through osmotic adjustment.

Index words: *Phaseolus* spp., plant growth, water relations, total carbohydrates, salinity tolerance.

INTRODUCCIÓN

Se estima que 20 % de la superficie cultivable actual y aproximadamente la mitad de las áreas irrigadas a nivel mundial se encuentran afectadas por salinidad (FAO, 2005). En México, el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) se cultiva principalmente en ambientes semi-tropicales, planicies semiáridas y en áreas irrigadas (Broughton *et al.*, 2003). Se estima que 30 % de las áreas irrigadas en México está afectado por salinidad y en áreas marginadas el problema es aún más severo (FAO, 2005). La salinidad afecta principalmente al metabolismo de la planta y reduce su crecimiento y productividad por efecto de potenciales hídricos reducidos, toxicidad iónica y desbalance nutricional (Munns, 2002; Ruiz *et al.*, 1997). La capacidad asimilatoria y el estado hídrico de la planta son procesos fisiológicos sensibles a la salinidad, además de ser factores determinantes en el crecimiento vegetal (Cramer *et al.*, 1994).

El estrés hídrico inducido por salinidad afecta el crecimiento de la planta a través de alteraciones en la división celular (Yeo *et al.*, 1985), fotosíntesis (Bayuelo-Jiménez *et al.*, 2003; Martínez-Ballesta *et al.*, 2004), procesos bioquímicos (Plaut *et al.*, 1990) y transpiración (Serraj y Sinclair, 2002). La regulación osmótica celular—mecanismo fisiológico que contrarresta el estrés osmótico causado por exceso de sales en el medio—, contribuye al mantenimiento de la absorción de agua y turgencia celular, y, consecuentemente, de otros procesos fisiológicos (Serraj y Sinclair, 2002). La regulación osmótica en plantas sometidas a estrés salino puede ocurrir por acumulación de solutos orgánicos compatibles (carbohidratos solubles, aminoácidos, prolina y betaína) (Hasewaga *et al.*, 2000), de iones inorgánicos o de ambos (Stepien y Klobus, 2006). En especies cultivadas (glicófitas), el principal mecanismo de tolerancia es a través de exclusión de iones. Sin embargo, a bajas concentraciones de NaCl la inclusión de iones Na^+ y Cl^- puede favorecer el ajuste osmótico (Munn, 2002).

El frijol común es una especie sensible a la salinidad que reduce su rendimiento ($> 50\%$) a una conductividad eléctrica de saturación del extracto del suelo (CE) \geq a 2 dS m^{-1} , equivalente a 20 mM NaCl (Läuchli, 1984). Su tolerancia a la salinidad es muy limitada y se encuentra asociada con una tasa reducida de absorción y transporte de Na^+ al vástago (Läuchli, 1984). Además, su crecimiento es afectado por la acumulación de Cl^- en las hojas y por la alteración del estado nutricional y de las relaciones hídricas (Bayuelo-Jiménez *et al.*, 2003).

Por el contrario, en especies silvestres de *Phaseolus* existe una valiosa fuente de genes para tolerancia a salinidad, particularmente en *P. angustissimus*, *P. acutifolius*, *P. filiformis*, *P. lunatus* y *P. vulgaris* (Bayuelo-Jiménez *et al.*, 2002). Dicha tolerancia se asocia con mayor velocidad de germinación, menor reducción del crecimiento relativo y mayor relación raíz:vástago (Bayuelo-Jiménez *et al.*, 2002). Asimismo, estas especies poseen un mecanismo de exclusión de Na^+ en raíz y ajuste osmótico para mantenimiento de la turgencia mediante la acumulación de Cl^- (Bayuelo-Jiménez, 2003). No obstante, la información relacionada con los índices fisiológicos que determinan la tolerancia en *Phaseolus* y su relación con diferencias genotípicas es reducida. Así, el objetivo de este estudio fue determinar el comportamiento de características fisiológicas e índices de crecimiento en respuesta a la salinidad, en especies de *Phaseolus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se hizo en condiciones de invernadero y cultivo en solución nutritiva, de abril a ju-

lio del 2005, a una temperatura promedio de $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ con una máxima de $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ y mínima de $15\text{ }^{\circ}\text{C}$. La humedad relativa varió de 60 a 70 %. El experimento incluyó cuatro tratamientos, tres correspondientes al estrés salino (30, 60 y 90 mM NaCl) y el testigo (0 mM NaCl), combinados con cuatro especies de *Phaseolus*: dos especies silvestres [*P. acutifolius* Gray (G40169) y *P. filiformis* Benham (PI535309)] y dos cultivadas [*P. acutifolius* (G40142) y *P. vulgaris* L. (G04017)]. Las dos especies silvestres se eligieron por su adaptación a zonas áridas y por su grado de regulación iónica y tolerancia a salinidad previamente identificadas (Bayuelo-Jiménez *et al.*, 2002). *Phaseolus acutifolius* silvestre excluye Na^+ y acumula Cl^- (sensible); *P. filiformis* excluye Na^+ e incluye K^+ (tolerante); *P. acutifolius* cultivado excluye Na^+ y Cl^- (tolerante) y *P. vulgaris* excluye Na^+ e incluye Cl^- (sensible). Antes de establecer el cultivo en solución, las semillas se esterilizaron con 2.5 g L^{-1} de hipoclorito de sodio 5 % (v/v) y agua desionizada; luego se escarificaron mecánicamente y germinaron en una incubadora a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ en papel de germinación (Anchor Paper Co., St. Paul, MN, USA) humedecido con una solución 0.5 mM de CaSO_4 . Las plántulas de 7 d y de tamaño uniforme se transfirieron a tanques aireados (volumen de 100 L), los cuales contenían la solución nutritiva (Epstein, 1972).

La composición de la solución en mM fue de 6 KNO_3 , 4 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1 MgSO_4 1 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.025 Fe-EDTA, 0.05 KCL, 0.025 H_3BO_3 , 0.002 MnSO_4 , 0.005 CuSO_4 , y 0.0005 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_{0.7}\text{H}_2\text{O}$. El pH de la solución se ajustó diariamente a 6-6.5 con una solución amortiguadora de KOH 1 N. Todas las plantas se mantuvieron en esta solución nutritiva hasta la emergencia de la primera hoja trifoliolada (7 d después del trasplante), momento en el cual se inició la aplicación del tratamiento salino. Se hicieron aplicaciones diarias nocturnas de 30 mM NaCl y 3 mM de CaCl_2 hasta alcanzar una concentración final de 30, 60 y 90 mM NaCl y 3, 6 y 9 mM de CaCl_2 . La adición de CaCl_2 al medio nutritivo fue una medida preventiva para evitar el choque osmótico al inicio de la aplicación de los tratamientos salinos.

Las plantas se cosecharon a los 10 y 20 d después de aplicar el tratamiento salino. Se cuantificó el número de hojas y el área foliar por planta con planímetro portátil modelo L1-300 (LI-COR, Lincoln, NE, USA). Las hojas, tallo y raíz se deshidrataron en una estufa a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 96 h, para luego medir el peso seco. Los índices del análisis de crecimiento se calcularon de acuerdo con Hunt (1990). La tasa relativa de crecimiento (TCR, $\text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$) se define como el incremento de materia seca por unidad de materia seca presente, por unidad de tiempo. Los componentes de crecimiento incluyeron la tasa de asimilación neta media (TAN, $\text{g m}^{-2} \text{d}^{-1}$) y la razón de área foliar (RAF, $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$).

TAN se calculó a partir de la relación de incremento de materia seca total por unidad de área foliar por día (RAF) y ésta se calculó como la relación entre el área foliar total y el peso de la materia seca total de la planta. La razón de peso foliar (RPF, g g^{-1}) se determinó como el cociente entre la materia seca total de la hoja y de la planta. El área foliar específica (AFE, $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$) se refiere al área foliar por unidad de peso foliar.

Las mediciones de asimilación neta de CO_2 y conductancia estomática se hicieron a los 20 d después del inicio de la aplicación de los tratamientos salinos, con un analizador de gases al infrarrojo LI-COR 6400 (LI-COR, Lincoln, NE, USA). Tales mediciones se hicieron en el folio central de la quinta hoja trifoliolada, la cual se introdujo en una cámara foliar con temperatura y aireación controlada (6 cm^2). La fotosíntesis neta se midió a una presión parcial externa de 34 MPa ($340 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ aire}$), densidad de presión de vapor de 1.8 kPa y una densidad de flujo fotónico de $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Las mediciones del potencial hídrico (Ψ_w) se hicieron entre las 3:00 y 5:00 am y 19 d después del inicio de la aplicación de los tratamientos salinos, en las mismas hojas en donde se midió la asimilación neta de CO_2 , con una cámara de presión Modelo 3000 (Soilmesture, Santa Barbara, CA, USA) (Scholander *et al.*, 1965). El potencial osmótico ($\Psi\pi$) se calculó a partir de la medición de la osmolaridad de las hojas previamente evaluadas para el potencial hídrico. El tejido foliar se almacenó en nitrógeno líquido y posteriormente se maceró con un homogenizador portátil, y la muestra se centrifugó en una microcentrífuga Eppendorf por 5 min a $2000 \times g$. Se utilizó un volumen de $10 \mu\text{mol}$ del sobrenadante y se midió la osmolaridad con un osmómetro Wescor 5520XR, (Logan, UT, USA). Las lecturas de osmolaridad se convirtieron a unidades de presión por medio de la ecuación de Van' Hoff ($\pi = -cRT$), donde c es la osmolaridad (mosmol kg^{-1}), R es la constante de los gases y T es la temperatura (K) (Nobel, 1991). El potencial de turgencia o presión (Ψ_p) se determinó por diferencia de presiones con la ecuación: $\Psi_p = \Psi_w - \Psi\pi$.

La extracción de los azúcares de hoja, tallo y raíz se hizo mediante la metodología descrita por Ojeda-Real *et al.* (2008). A 2 g de tejido previamente congelado en nitrógeno líquido y almacenado a -80°C se les adicionaron 20 mL de etanol 80 % para su extracción. El tejido se incubó a 60°C con agitación constante por 12 h; transcurrido ese tiempo se filtró al vacío, con papel filtro Watman de 3 mm. Al residuo obtenido se le agregó nuevamente 20 mL de etanol 80 %, se agitó durante 3 h y se volvió a filtrar. Los extractos se unieron y se adicionó carbón activado para eliminar los pigmentos; posterior-

mente la muestra se concentró en un rotavapor a 65°C y se resuspendió en 5 mL de etanol 80 %. Para la determinación de azúcares totales se tomó 1 mL del extracto etanólico y se diluyó en un volumen de 25 mL. De esta dilución se tomaron 2 mL para realizar la determinación mediante el método de Dubois *et al.* (1956). Este análisis se efectuó por triplicado.

Se empleó un diseño experimental de bloques al azar con un arreglo de tratamientos de parcelas divididas y cuatro repeticiones por especie. Los niveles de NaCl correspondieron a la parcela principal y las especies distribuidas aleatoriamente dentro de cada parcela, correspondieron a las sub-parcelas. Con el objeto de verificar las diferencias significativas entre especies en cada variable considerada, se hicieron pruebas de F mediante procedimiento GLM (SAS, Institute, 1995). Se utilizó la prueba protegida DMS (diferencia mínima significativa) de Fisher para comparar las diferencias identificadas con el análisis de varianza (SAS, Institute, 1995).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Biomasa aérea y radical

Los tratamientos salinos tuvieron un efecto significativo en el número de hojas, área foliar, peso seco de hoja, tallo y raíz (Cuadro 1). Asimismo, las diferencias entre especies, tratamientos salinos y las interacciones para todas las variables fueron significativas. En todas las especies, excepto en *P. filiformis*, la salinidad redujo la acumulación de materia seca del vástago (de 22 a 44 %) y de la raíz (de 22 a 62 %). En *P. filiformis* se observó un incremento de materia seca del vástago a 30 mM NaCl (33 %) y una reducción de sólo 22 % a 90 mM NaCl. El número de hojas disminuyó significativamente al aumentar la concentración de NaCl, lo que promovió una disminución del área foliar en todas las especies, excepto en *P. filiformis*. A los 20 d de exposición al agobio salino, el área foliar total del resto de las especies disminuyó de 28 a 45 % en 60 mM NaCl y de 44 a 60 % en 90 mM NaCl.

Índices de crecimiento

El agobio salino disminuyó significativamente la tasa de crecimiento relativo (TCR). Hubo diferencias significativas ($P \geq 0.01$) entre tratamientos de salinidad y entre especies; sin embargo, la interacción entre estos dos factores no fue significativa (Cuadro 2). Entre especies, la TCR del tratamiento testigo varió de 0.10 a $0.17 \text{ g g}^{-1} \text{d}^{-1}$, mientras que en las plantas sometidas a los tratamientos de salinidad varió de 0.07 a $0.14 \text{ g g}^{-1} \text{d}^{-1}$ (Figura 1A); en *P. acutifolius* silvestre (G40169) y cultivada (G40142) y en *P. vulgaris* cultivada (G04017), la TCR disminuyó al

incrementar el agobio salino mientras que en *P. filiformis* silvestre (PI535309) la TCR no fue afectada por la salinidad.

La tasa de asimilación neta (TAN) disminuyó significativamente al aumentar la concentración de NaCl, pero las diferencias entre especies y la interacción no fueron significativas (Cuadro 2). La reducción de TAN siguió una tendencia similar a la TCR, excepto que la reducción de TAN fue mayor a 90 mM NaCl en todas las especies, menos en *P. filiformis* cuya TAN se mantuvo similar al testigo en todos los tratamientos salinos (Figura 1B). El

agobio salino disminuyó significativamente la razón de área foliar (RAF), y las diferencias entre especies y la interacción entre NaCl y especies fue significativa (Cuadro 2). En las especies cultivadas [*P. acutifolius* (G40142) y *P. vulgaris* (G04017)], la RAF disminuyó a mayor concentración salina pero se mantuvo inalterable en las especies silvestres (Figura 1C). La razón de peso foliar (RPF) se mantuvo constante en todas los tratamientos salinos y especies, mientras que el área foliar específica (AFE) disminuyó significativamente a mayor concentración de NaCl solamente en las especies cultivadas, pero no en la especie silvestre *P. acutifolius* (Figuras 1D-E).

Cuadro 1. Efecto del NaCl en el número de hojas, área foliar, peso seco de hoja, tallo y raíz de *Phaseolus* spp.

NaCl (mM)	Número de hojas	Área foliar (cm ² /planta)	Biomasa (g/planta)		
			Hoja	Tallo	Raíz
<i>P. acutifolius</i> G40169					
0	15.3 a	902.0 a	1.38 a	0.95 a	0.58 a
30	12.1 b	622.8 b	1.26 ab	0.83 a	0.40 ab
60	9.6 c	507.7 b	0.93 ab	0.54 b	0.34 ab
90	8.8 c	440.8 b	0.87 b	0.43 b	0.22 b
<i>P. filiformis</i> PI535309					
0	6.4 ab	155.2 a	0.25 a	0.13 a	0.04 a
30	6.9 a	148.5 a	0.20 a	0.22 a	0.08 a
60	5.3 bc	111.8 ab	0.19 a	0.10 a	0.04 a
90	4.8 c	86.2 b	0.18 a	0.10 a	0.05 a
<i>P. acutifolius</i> G40142					
0	13.4 a	1321.2 a	2.13 a	1.47 a	0.62 a
30	11.1 b	1007.9 b	1.84 ab	1.25 b	0.55 a
60	8.7 c	802.3 c	1.57 b	1.15 b	0.59 a
90	8.1 c	583.2 d	1.23 c	0.83 c	0.36 a
<i>P. vulgaris</i> G04017					
0	6.3 a	1713.4 a	2.83 a	1.33 a	0.63 a
30	4.9 b	1097.8 b	2.34 b	1.06 b	0.56 ab
60	4.5 c	932.5 bc	2.13 bc	0.84 c	0.49 ab
90	3.9 d	683.2 c	1.80 c	0.75 c	0.42 b
Valores de F					
NaCl	96.3***	84.5***	21.5***	41.6***	9.8**
Especie	82.7***	197.2***	255.5***	204.8***	54.4***
NaCl x Especie	2.5*	8.3***	2.8*	3.8***	1.6*

Las medias son valores promedio de cuatro repeticiones después de 20 d de exposición a NaCl. Prueba DMS (diferencia mínima significativa) protegida de Fisher a $P \leq 0.05$. *, **, *** Significativo a $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$, $P \leq 0.001$, respectivamente.

Cuadro 2. Cuadrados medios y su significancia para la tasa relativa de crecimiento (TCR), tasa de asimilación neta (TAN), razón de área foliar (RAF), relación de peso foliar (RPF), área foliar específica (AFE), tasa de asimilación de CO₂ (A), conductancia estomática (gs), potencial hídrico (Ψ_w), potencial osmótico (Ψ_{II}), potencial de turgencia (Ψ_t), carbohidratos totales de hoja (CHO_h), tallo (CHO_t) y raíz (CHO_r) de *Phaseolus* spp., después de 20 d de estrés salino.

Fuente de variación						
TCR	TAN	RAF	RPF	AFE	A	
NaCl	0.0069**	0.0018*	0.00015**	0.00086 ns	0.0028*	161.7**
Especie	0.0383**	8.235 ns	0.00009**	0.0023 ns	0.00067**	160.2**
NaCl x Especie	0.0015 ns	2.285 ns	0.0004*	0.0019 ns	0.00014 ns	17.8**

	gs	Ψ _w	Ψ _{II}	Ψ _t	CHO _h	CHO _t	CHO _r
NaCl	0.030***	0.111**	1.501**	0.852**	517.2**	1406.3*	62.1*
Especie	0.048**	1.231***	0.135**	1.262**	1103.3**	3008.8**	127.1**
NaCl x Especie	0.004 ns	0.064***	0.043*	0.095**	53.3 ns	359.7*	9.2ns

*, ** Significativo a $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$, respectivamente; ns = no significativo.

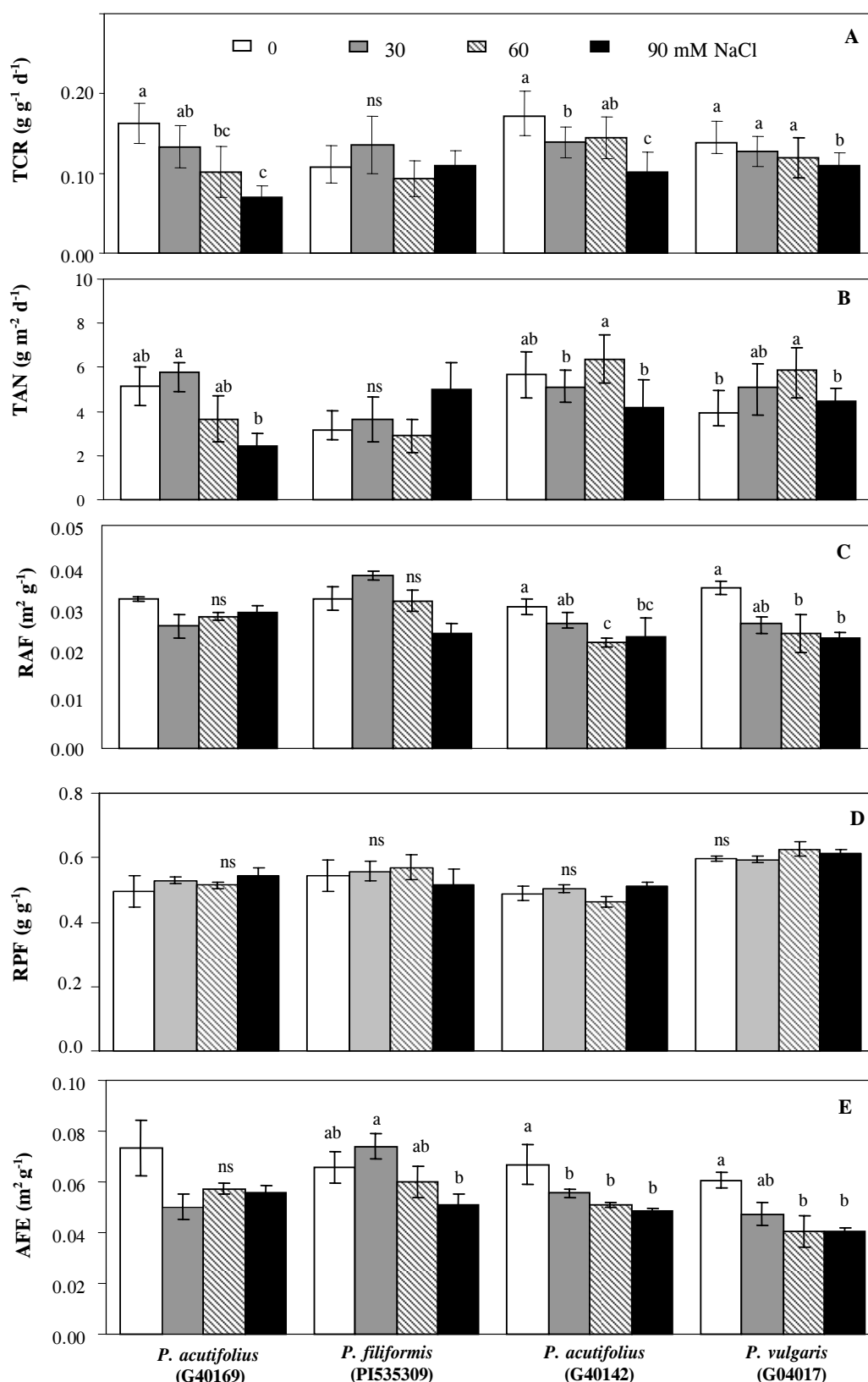


Figura 1. Efecto del NaCl en la tasa de crecimiento relativo TCR (A), tasa de asimilación neta TAN (B), razón de área foliar RAF (C), razón de peso foliar RPF (D) y área foliar específica AFE (E) de *Phaseolus*, después de 20 d de exposición a salinidad. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas (Prueba DMS protegida de Fisher, $P \leq 0.05$).

Fotosíntesis y conductancia estomática

La salinidad afectó significativamente la conductancia estomática y la asimilación de CO₂. Sin embargo, sólo en el caso de la asimilación de CO₂ la interacción salinidad x especie resultó significativa (Cuadro 2). La salinidad redujo la conductancia estomática y la asimilación de CO₂ a medida que aumentó la concentración salina, con reducciones significativas a 60 y 90 mM NaCl (Figuras 2A-D). En condiciones salinas, la conductancia estomática de *P. vulgaris* cultivada fue menor que la de las especies restantes, con una reducción de 26 % en 90 mM NaCl (Figura 2D). Por el contrario, en *P. filiformis* hubo reducción de la conductancia estomática al acentuarse el agobio salino (Figura B). La asimilación de CO₂ disminuyó significativamente en las especies silvestres y cultivadas de *P. acutifolius* en 60 mM NaCl (Figuras A y C), mientras que en *P. vulgaris* disminuyó sólo en 90 mM NaCl (Figura 2D). La asimilación de CO₂ de *P. filiformis*, por el contrario, se mantuvo invariable en todos los tratamientos salinos (Figura 2B); en el resto de las especies se registró un incremento de 15 a 40 % en la tasa fotosintética, en 30 mM

NaCl. Posteriormente, las reducciones en la fotosíntesis aumentaron en función del nivel de salinidad.

Relaciones hídricas

La salinidad afectó significativamente los potenciales de turgencia, hídrico y osmótico (Cuadro 2). Las diferencias entre especies y sus interacciones fueron significativas en todos los tratamientos salinos. En general, el potencial hídrico de las especies silvestres de *P. acutifolius* G40169 y *P. filiformis* PI535309 fue mayor en todos los tratamientos salinos que en las especies cultivadas (Figura 3B). La salinidad disminuyó el potencial osmótico en todas las especies, pero las diferencias entre éstas sólo se observaron a 90 mM de NaCl. *P. filiformis* fue la única especie que mantuvo el mayor potencial osmótico (-1.13 MPa) en 90 mM de NaCl (Figura 3C), mientras que en el resto, el potencial osmótico osciló entre -1.25 y -1.44 MPa (Figura 3C). El potencial de turgencia se mantuvo constante hasta los 30 mM NaCl y aumentó significativamente a 60 y 90 mM de NaCl en todas las especies excepto en *P. vulgaris* cultivado (Figura 3A).

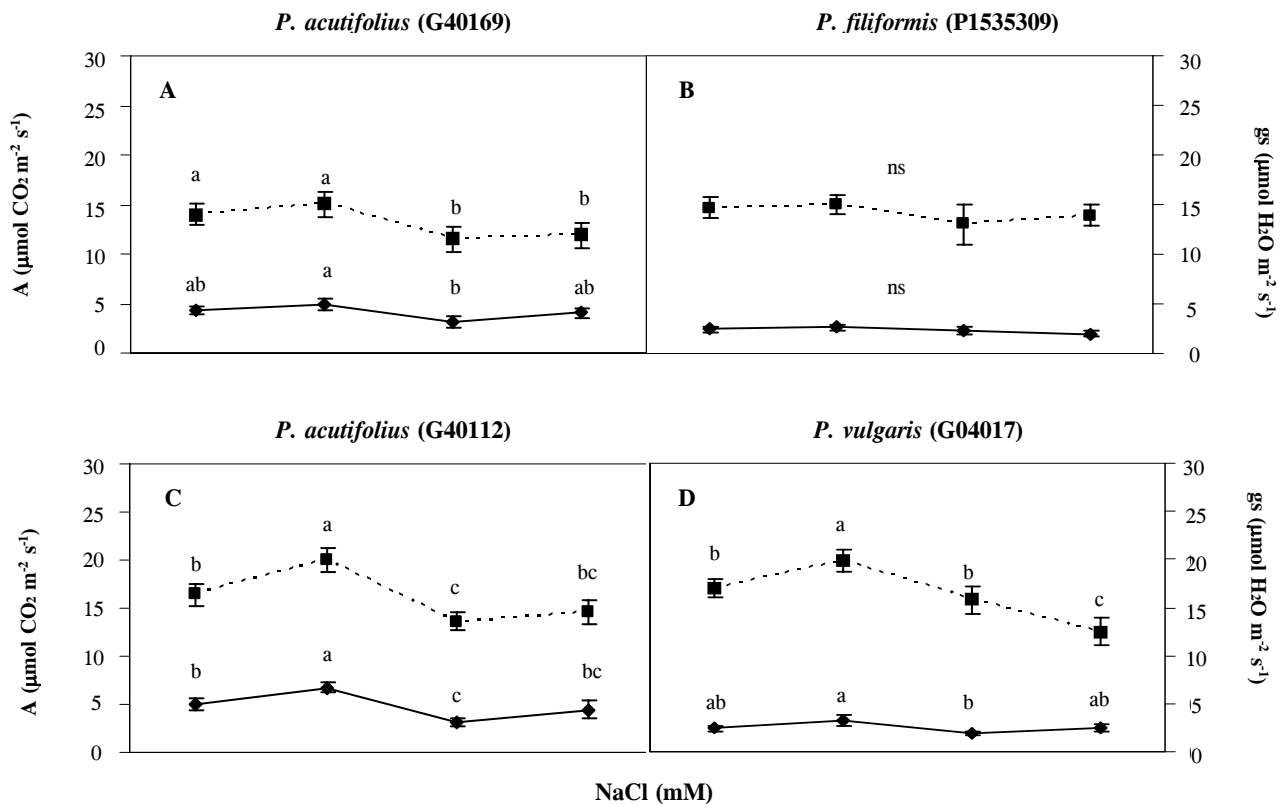


Figura 2. Efecto del NaCl en la tasa de asimilación de CO₂ (---) (eje izquierdo) y conductancia estomática (—) (eje derecho) de *Phaseolus* después de 20 d de exposición a salinidad. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas (Prueba DMS protegida de Fisher, $P \leq 0.05$).

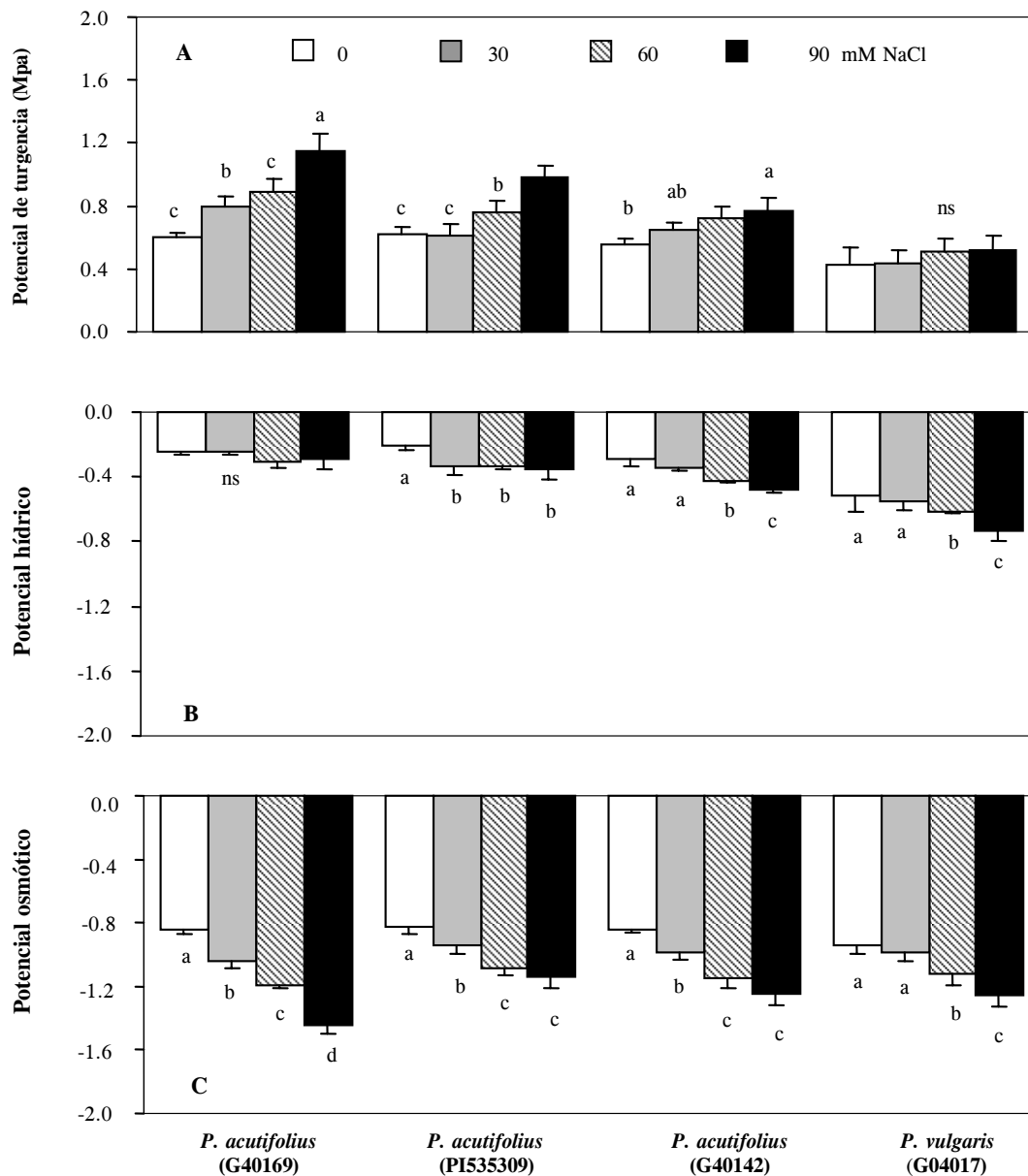


Figura 3. Efecto del NaCl en el potencial de turgencia (A), potencial hídrico (B) y potencial osmótico (C) (MPa) de *Phaseolus* después de 20 d de exposición a salinidad. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas (Prueba DMS protegida de Fisher, $P \leq 0.05$).

Carbohidratos totales

El contenido de carbohidratos totales (CHO) de hoja, tallo y raíz se incrementó significativamente por efecto del NaCl (Cuadro 2). Asimismo, los cambios inducidos por la salinidad fueron dependientes de la especie. En todas las especies, excepto en *P. filiformis*, el contenido de CHO fue mayor en tallos que en hojas, a 60 y 90 mM NaCl (Figuras 4A-B). El contenido de CHO de raíz, sin embargo, se mantuvo constante en todos los tratamientos

salinos excepto en *P. acutifolius* G40142, en el que disminuyó significativamente en 90 mM NaCl (Figura 4C). El incremento del contenido de CHO totales en hojas y tallo con respecto al testigo osciló entre 65.8 y 130 % y de 15 a 78 %, respectivamente. En particular, las especies de *P. acutifolius* (G40169) y *P. acutifolius* (G40142) alcanzaron la mayor concentración de CHO totales en tallo a 90 mM NaCl, mientras que *P. acutifolius* G40142 y *P. filiformis* PI325687 presentaron la mayor acumulación en hojas (Figuras 4A-B).

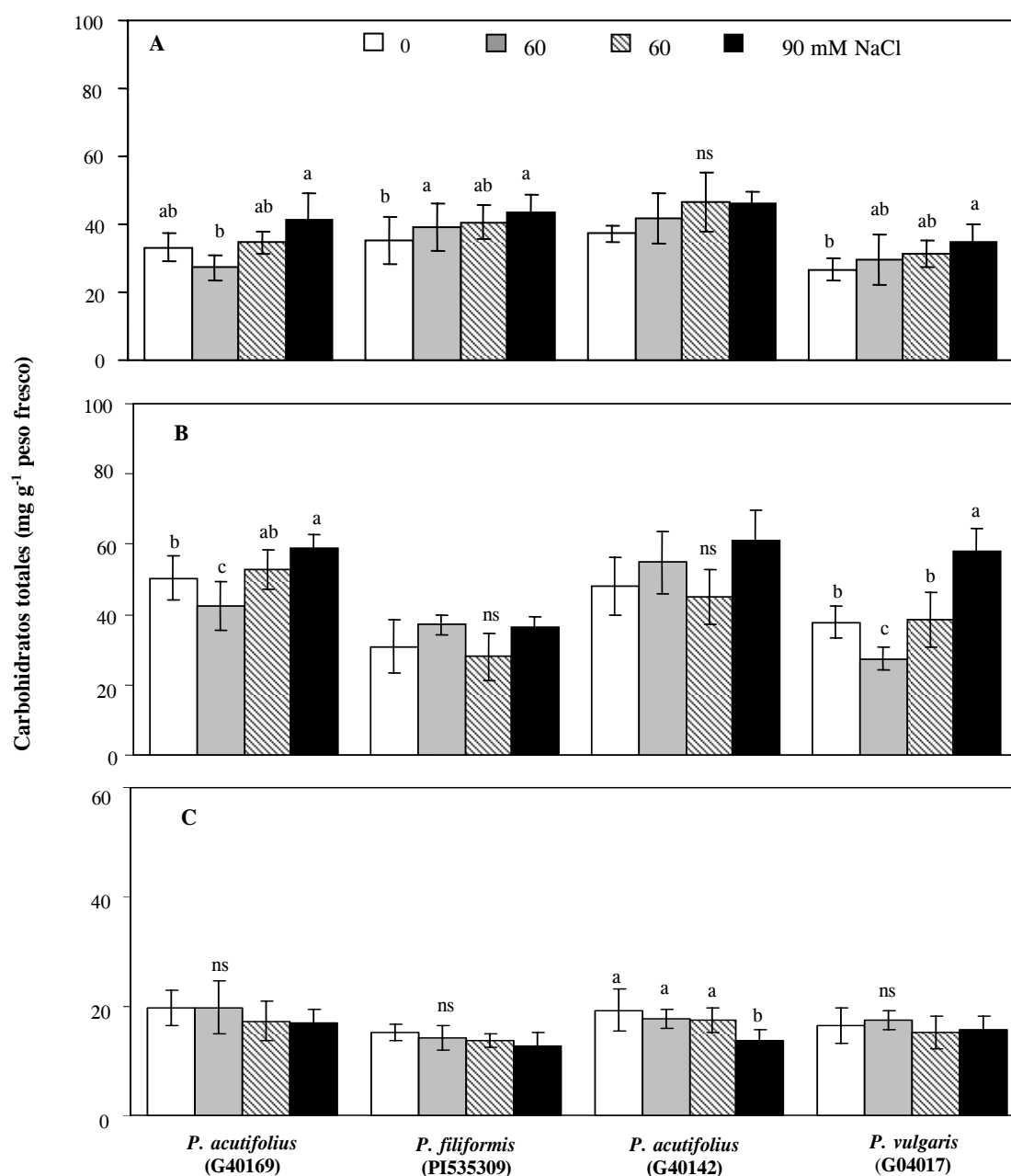


Figura 4. Efecto del agobio salino en el contenido de carbohidratos totales en hoja (A), tallo (B) y raíz (C) de *Phaseolus* spp., después de 20 d de exposición a salinidad. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas (Prueba DMS protegida de Fisher, $P \leq 0.05$).

DISCUSIÓN

La disminución en la TCR puede atribuirse a cambios en la respuesta de la asimilación de CO_2 (TAN) o en la razón de área foliar (RAF) (Bayuelo-Jiménez *et al.*, 2003). Los resultados aquí obtenidos demuestran que la disminución de la TCR de todas las especies excepto de *P. filiformis* se relacionó con la TAN, lo que indica que la reducción del crecimiento en dichas especies se debió a

una reducción de la eficiencia fotosintética del dosel (Figuras 1A-B). Asimismo, el análisis de regresión lineal entre TAN y TCR demostró que la menor eficiencia fotosintética del dosel repercutió en una más baja producción de materia seca en la especie silvestre *P. acutifolius* G40169 ($R^2 = 0.93$ a 0.97) y en las especies cultivadas de *P. acutifolius* G40142 y *P. vulgaris* G04017 ($R^2 = 0.73$ a 0.86). Resultados similares fueron reportados por Azevedo *et al.* (2004), Bayuelo-Jiménez *et al.* (2003) y Romero

et al. (1994). La reducción de la TCR de las especies cultivadas también se asoció con la eficiencia en la producción de área foliar (RAF) (Figura 1C).

La disminución de RAF a mayor salinidad se relacionó significativamente con una reducción del incremento de materia seca por unidad de área (AFE). El coeficiente de determinación entre RAF y AFE ($R^2 = 0.78$ a 0.97) confirman estos resultados. En *P. filiformis*, sin embargo, el AFE se mantuvo constante a 30 y 60 mM NaCl pero fue mayor que en el resto de las especies; es decir, esta especie desarrolló hojas más delgadas al elevarse la concentración salina (Figura 1E). De acuerdo con Baruch y Goldstein (1999), las especies que presentan una mayor AFE pueden tener una mayor TCR. En este estudio se demostró que *P. filiformis* no presenta una TCR mayor que el resto de las especies, pero su crecimiento no es afectado por las concentraciones salinas altas (Figura 1A). Lo anterior podría explicarse en términos de costos de carbono para construcción de estructuras foliares, que es menor para hojas delgadas (Dijkstra, 1989).

El agobio salino provocó diferencias significativas en el intercambio gaseoso y la conductancia estomática. El cierre estomático es un mecanismo efectivo para economizar la utilización de agua en condiciones de salinidad y evitar el daño por toxicidad iónica (Hasegawa *et al.*, 2000). Sin embargo, una disminución en la conductancia estomática promueve simultáneamente una reducción en la tasa fotosintética (Brugnoli y Lauteri, 1991) y absorción de agua (Mencuccini y Grace, 1996). En el presente estudio, la tasa fotosintética disminuyó en todos los tratamientos salinos en comparación al testigo y durante los 20 d de duración del agobio, excepto en *P. filiformis*. De acuerdo con los resultados del análisis de regresión, la asimilación de CO_2 depende de la conductancia estomática en todas las especies. Es pertinente destacar que *P. filiformis* PI535309 fue la única especie que presentó altas tasas de asimilación de CO_2 y de conductancia estomática a 60 y 90 mM de NaCl, en comparación con el testigo.

Estos resultados demuestran que los procesos de fijación de CO_2 y control estomático en *P. filiformis* son tolerantes a altas concentraciones de salinidad, y corroboran los resultados reportados por Bayuelo-Jiménez *et al.* (2003). Posiblemente el mecanismo de tolerancia a este nivel podría estar relacionado con diferencias en la densidad estomática y en la anatomía de la hoja, la respuesta de las células acompañantes, o bien a una combinación de estos factores (Plaut *et al.*, 1990). Según Lynch *et al.* (1992), en condiciones ambientales de alta irradiancia o déficit hídrico en el suelo, una mayor densidad estomática en la lámina foliar favorece una mayor conductancia estomática y asimilación de CO_2 . Lo anterior es de especial

interés en términos de mejoramiento genético de *P. vulgaris*, ya que la densidad estomática se encuentra relacionada con la eficiencia en el uso del agua. Asimismo, la eficiencia fotosintética de *P. filiformis* en condiciones de agobio salino (80 mM NaCl) se relaciona con un incremento en la tasa de absorción y acumulación de potasio en las hojas (Bayuelo-Jiménez *et al.*, 2003). Esta especie mantiene concentraciones bajas de Na^+ y acumula mayor concentración de K^+ en la lámina foliar, lo que contribuye a una adecuada apertura estomática y eficiencia en el uso del agua.

Al igual que en la tasa de asimilación de CO_2 , el estado hídrico de la planta es sensible a la salinidad y, por tanto, es un factor determinante en su crecimiento (Munns, 2002). El análisis de las relaciones hídricas de *Phaseolus* mostró una respuesta a la salinidad común a las reportadas en otras especies (Lazcano-Ferrat y Lovatt, 1997). La disminución del potencial osmótico excedió a la del potencial hídrico, lo que permitió que el potencial de turgencia se mantuviera o incrementara en todas las especies. Esta respuesta celular conocida como ajuste osmótico es un mecanismo que confiere tolerancia a salinidad (Munns, 2002) y se encuentra estrechamente asociado con la regulación de la apertura estomática, actividad fotosintética y crecimiento vegetal. En la mayoría de plantas, la acumulación neta de iones inorgánicos o solutos orgánicos favorece el mantenimiento del potencial de turgencia (Hasegawa *et al.*, 2000).

En este estudio se observó que la concentración de carbohidratos totales, particularmente de tallo y hojas, se incrementó a mayor concentración salina. En todas las especies estudiadas, la concentración de carbohidratos totales y el potencial osmótico tuvieron una correlación significativa en los tratamientos salinos ($R^2 = 0.42$ a 0.80), lo que indica que el incremento de carbohidratos contribuyó a la disminución del potencial osmótico de la planta. Es posible que la reducción de la fotosíntesis a mayores concentraciones de NaCl (Figura 2), haya alterado la cantidad de carbono fijado en el vástago y los azúcares transportados a la raíz (Azevedo *et al.*, 2004). En la especie tolerante *P. filiformis*, sin embargo, hubo acumulación constante de carbohidratos en hojas, acumulación que no se interrumpió a concentraciones altas de NaCl. Es evidente que esta respuesta está relacionada con la mayor eficiencia fotosintética en condiciones de salinidad.

Las altas tasas de asimilación de CO_2 y regulación de turgencia en *P. filiformis* se asocian con un mantenimiento constante de K^+ en las hojas y reducida absorción de Na^+ al vástago (Bayuelo-Jiménez *et al.*, 2003). Aunado a lo anterior, el incremento de carbohidratos en la raíz favoreció la absorción de agua, y esto se reflejó en el

mantenimiento de potenciales hídricos favorables, como lo demuestra el coeficiente de correlación ($R^2 = 0.61$) (Figura 3), y que además se asoció con una adecuada tasa fotosintética y crecimiento ($R^2 = 0.58$). La tolerancia de esta especie podría relacionarse también con otros factores, como una menor inversión metabólica (costo energético) para la osmorregulación (ajuste osmótico) y una adecuada distribución de solutos orgánicos e inorgánicos entre las vacuolas y el citosol (Martínez-Ballesta *et al.*, 2004).

Varios autores han señalado que la producción de solutos orgánicos es metabolíticamente costosa y su contribución a la disminución del potencial osmótico celular es mínima y restrictiva para el crecimiento vegetal (Jouve *et al.*, 2004; Arbona *et al.*, 2005). En este estudio no se cuantificó el aporte de los carbohidratos en el ajuste osmótico pero fue evidente que el costo energético para su producción alteró el crecimiento, especialmente a mayor concentración salina. Una alternativa que contrarresta los costos energéticos de producción incluye la acumulación de iones del medio externo, aunque la acumulación excesiva de iones puede causar toxicidad y repercutir negativamente en las actividades bioquímicas de la célula (Munns, 2000). Las evidencias confirman que la acumulación de Cl^- , Na^+ y K^+ en las hojas contribuyen significativamente (65 y 61 %) con la reducción del potencial osmótico hasta -1.3 y -1.62 MPa a 40 mM NaCl y 80 mM NaCl, respectivamente y, consecuentemente con el mantenimiento de turgencia celular (Bayuelo-Jiménez *et al.*, 2003) y la tolerancia al agobio salino.

CONCLUSIONES

Los resultados demuestran que *P. filiformis* es una especie tolerante a salinidad y que su variabilidad fisiológica contrasta con la del frijol cultivado (*P. vulgaris*). Diversas características que confieren tolerancia a salinidad en esta especie silvestre (control estomático, eficiencia fotosintética y osmorregulación) podrían ser de valor como criterios de evaluación y selección en programas de mejoramiento de *P. vulgaris* cultivado.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Profesores de Tiempo Completo, PROMEP-SEP, México (047/2003-2005) por el apoyo financiero otorgado para la realización del presente estudio.

BIBLIOGRAFÍA

Arbona V, A J Marco, D J Iglesias, M F López-Climent, M Talón, A Gómez-Cadenas (2005) Carbohydrate depletion in roots

- and leaves of salt-stressed potted *Citrus clementina* L. Plant Growth Reg. 46:153-160.
- Azevedo Neto A, J T Prisco, J Enéas-Filho, C Feitosa de Lacerda, J Vieira Silva, P Alves da Costa, E Gomes-Filho (2004) Effects of salt stress on plant growth, stomatal response and solute accumulation of different maize genotypes. Brazil. J. Plant Physiol. 16:31-38.
- Baruch Z, G Goldstein (1999) Leaf construction cost, nutrient concentration and net CO_2 assimilation of native and invasive species in Hawaii. Oecologia 121:183-192.
- Bayuelo-Jiménez J S, D G Debouck, J P Lynch (2003) Growth, gas exchange, water relations, and ion composition of *Phaseolus* species grown under saline conditions. Field Crop Res. 80:207-222.
- Bayuelo-Jiménez J S, D G Debouck, J P Lynch (2002) Salinity tolerance of *Phaseolus* species during early vegetative growth. Crop Sci. 42:2184-2192.
- Broughton W J, G Hernandez, M Blair, S Beebe, P Gepts, J Vanderleyden (2003) Beans (*Phaseolus* spp.) Model food legumes. Plant Soil 252:55-128.
- Brugnoli E, M Lauteri (1991) Effects of salinity on stomatal conductance, photosynthetic capacity, and carbon isotope discrimination of salt-tolerant (*Gossypium hirsutum* L.) and salt-sensitive (*Phaseolus vulgaris* L.) C_3 non halophytes. Plant Physiol. 95: 628-635.
- Cramer G R, G J Alberico, C Schmidt (1994) Salt tolerance is not associated with the sodium accumulation of 2 maize hybrids. Aust. J. Plant Physiol. 21:675-692.
- Dijkstra P (1989) Cause and effect of differences in specific leaf area. In: Causes and Consequences of Variation in Growth Rate and Productivity of Higher Plants. H Lambers, M L Cambridge, H Konings, T L Pons (eds). SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands. pp:125-140.
- Dubouis M, K A Guilles J K Hamilton, P A Rebers, S Smith (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analyt. Chem. 28:350-356.
- Epstein E (1972) Mineral nutrition of plants: principles and perspectives. New York: J. Wiley & Sons.
- FAO (2005) Global Network on Integrated Soil Management for Sustainable Use of Salt-affected Soils. Rome Italy: FAO Land and Plant Nutrition Management Service. <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush> (Febrero 28, 2008).
- Hasegawa P M, R A Bressan, J K Zhu, H J Bohner (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 51:463-499.
- Hunt R (1990). Basic Growth Analysis. Plant Growth Analysis for Beginners. Unwin Hyman. London. 112 p.
- Jouve L, L Hoffmann J F Hausman (2004) Polyamine, carbohydrate, and proline content changes during salt stress exposure of Aspen (*Populus tremula* L.): Involvement of oxidation and osmoregulation metabolism. Plant Biol. 6:74-80.
- Läuchli A (1984) Salt exclusion: an adaptation of legumes for crops and pastures under saline conditions. In: Saline Tolerance in Plants: Strategies for Crop Improvement. R C Staples, G H Toenniessen (eds). Wiley, New York. pp:171-178.
- Lazcano-Ferrat I, C L Lovatt (1997) Effect of salinity on arginine biosynthesis in leaves of *P. vulgaris* L. and *P. acutifolius* A. Gray. Crop Sci. 37:469-475.
- Lynch J, A González, J M Tohme, J A García (1992) Variation in characters related to leaf photosynthesis in wild bean populations. Crop Sci. 32:633-640.
- Martínez-Ballesta MC, V Martínez, M Carvajal (2004) Osmotic adjustment, water relations and gas exchange in pepper plants under NaCl or KCl. Env. Exp. Bot. 52:161-174.
- Mencuccinni M, J Grace (1996) Development patterns of above ground hydraulic conductance in a Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) age sequence. Plant Cell Env. 19:939-948.

- Munns R (2002)** Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Env.* 28:239-250.
- Nobel P S (1991)** *Physicochemical and Environmental Plant Physiology*. 2nd ed. New York: Academic Press. 555 p.
- Ojeda-Real L, R Cárdenas-Navarro, P Lobit, O Grageda-Cabrera, E Valencia-Cantero, L Macías-Rodríguez (2008)** Efecto de la nutrición nitróica y sistemas de riego en el sabor de la fresa. *Rev. Chapingo S. Hort.* 14:61-70.
- Plaut Z, M C Grieve, E V Maas (1990)** Salinity effects on CO₂ assimilation and diffusive conductance of cowpea leaves. *Physiol. Plant.* 79:31-38.
- Romero J M, T Marañón, J M Murillo (1994)** Long-term responses of *Melilotus segetalis* to salinity. I. Growth and partitioning. *Plan Cell Env.* 7:1243-1248.
- Ruiz V V M, M Ortega E, V A González, J J Martínez H, J L Rone P (1997)** Respuesta del frijol a la salinidad sulfático-clorhídrica I. Producción de biomasa y rendimiento. *Rev. Fitotec. Mex.* 20:13-27.
- SAS Institute (1995)**. *SAS User's Guide: Statistics*. 5th ed. Cary, NC: SAS Institute.
- Serraj R, T R Sinclair (2002)** Osmolyte accumulation; can it really help increase crop yield under drought conditions? *Plant Cell Env.* 25:333-341.
- Scholander P F, H T Hammel, E D Bradstres, E A Hemingsen (1965)** Sap pressure in vascular plants. *Science* 148:339-346.
- Stepien P, G Klobus (2006)** Water relations and photosynthesis in *Cucumis sativus* L. leaves under salt stress. *Biol. Plant.* 50:610-616.
- Yeo A R, S P Caporn, T J Flores (1985)** The effect of salinity upon photosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.): Gas exchange by individual leaves in relation to their salt content. *J. Exp. Bot.* 36:1240-1248.