



UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas

**EFFECTO DEL AGOBIO SALINO SOBRE EL CRECIMIENTO,
ACUMULACIÓN DE CARBOHIDRATOS Y EXPRESIÓN DEL GEN PVPTP1
EN *Phaseolus* spp.**

Tesis que presenta

Biol. Leobardo Bahena Betancourt

Para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Biología Experimental

Asesor:

D.C. Rodolfo López Gómez

Coasesor:

D.C. Jeannette S. Bayuelo Jiménez

Morelia, Michoacán, México. Septiembre 2007

SINODALES

¹D.C. Rodolfo López Gómez

²D.C. Jeannette S. Bayuelo Jiménez

¹D.C. Lourdes I. Macías Rodríguez

¹D.C. Rafael Salgado Garciglia

- 1. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la UMSNH.**
- 2. Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la UMSNH.**

Este trabajo fue realizado en diferentes laboratorios:

En el laboratorio de Nutrición Mineral del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF). Utilizando también las instalaciones del invernadero del Instituto de Investigaciones sobre Recursos Naturales (INIRENA). En el laboratorio de Bioquímica ecológica y en el laboratorio de Biología Molecular de Plantas del (IIQB) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Bajo la asesoría del D.C. Rodolfo López Gómez y la coasesoría de la D.C. Jeannette S. Bayuelo Jiménez.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo que a través del programa de Maestría del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas hicieron posible mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico brindado mediante la beca crédito, sin lo cual no hubiera sido posible continuar con estos estudios.

A PROMEP-SESIC-047-2003-2005 por el financiamiento de este trabajo.

A la comunidad de profesores investigadores del instituto de investigaciones Químico-Biológicas, por ser parte fundamental en mi formación académica.

Al D.C. Rodolfo López Gómez, mi asesor por todo el apoyo que me brindó y por compartir su tiempo y conocimientos.

Mi más sincero agradecimiento a la D.C. Jeannette S. Bayuelo Jiménez, mi coasesora por su apoyo académico y económico.

A los integrantes del comité de sinodales D.C. Lourdes I. Macías Rodríguez y al D.C. Rafael Salgado Garciglia, por prestar su valioso tiempo e instalaciones de laboratorio para la realización del trabajo.

Al D.C. Alejandro Martínez Palacios por facilitar las instalaciones del invernadero para realizar la presente investigación.

A mis compañeros de laboratorio y generación 2003-2005, especialmente a; Omar, Yunuen, Cesar, Yuri, Liz, Pedro, Laura, Idolina, Rafa y Elda quienes de alguna forma participaron en la realización de este trabajo.

A mi familia, parientes políticos y consanguíneos que me ayudaron en el momento que los necesitaba.

DEDICATORIA

*Gracias a Dios por darme una segunda oportunidad
y por darme la fortuna de tener una maravillosa familia.*

Pera

y

Josué Isai.

CONTENIDO

	Páginas
ÍNDICE DE CUADROS	<i>iv</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>v</i>
RESUMEN	<i>vi</i>
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Problemas de salinidad en la agricultura	4
2.1.1 Causas y origen de salinidad en los suelos.	6
2.2 Importancia del frijol en México.	6
2.2.1 Clasificación y características botánicas de <i>Phaseolus</i> .	8
2.3 Efecto de la salinidad en las plantas	9
2.3.1 Efecto de la salinidad en crecimiento.	10
2.3.2 Efecto de la salinidad en las relaciones hídricas.	11
2.3.3 Efecto de la salinidad en la fotosíntesis.	12
2.3.4 Efecto de la salinidad en contenido de nutrimentos.	13
2.4 Tolerancia a salinidad	14
2.4.1 Mecanismos fisiológicos de tolerancia a salinidad.	14
2.4.2 Mecanismos fisiológicos de tolerancia a nivel de toda la planta.	14
2.4.3 Mecanismos de tolerancia a salinidad a nivel celular.	15
2.4.4 Ajuste osmótico por iones y/o solutos.	16
2.4.5 Mecanismos de tolerancia a nivel molecular.	17
2.4.6 Líneas de señalización.	18
3 JUSTIFICACIÓN	19
4 HIPÓTESIS	20
5 OBJETIVOS	20
6 MATERIALES Y MÉTODOS	21
6.1 Material vegetal.	21

6.2	Localización del área de trabajo.	21
6.3	Germinación de semillas.	22
6.4	Medidas de intercambio gaseoso.	22
6.5	Relaciones hídricas.	23
6.6	Análisis de crecimiento.	23
6.7	Análisis de carbohidratos solubles.	24
6.7.1	Carbohidratos totales.	25
6.7.2	Derivación de carbohidratos solubles.	25
6.7.3	Análisis de carbohidratos en cromatógrafo de gases- EM.	26
6.8	Análisis molecular	26
6.8.1	Extracción de ARN.	26
6.8.2	Electroforesis y medición de concentración de ARN.	27
6.8.3	Gel desnaturalizante para ARN.	28
6.8.4	Transferencia de ARN a membrana.	28
6.8.5	Purificación de sonda.	29
6.8.6	Preparación de columnas empacadas para purificación de sonda radioactiva.	29
6.8.7	Pre-hibridación de membranas.	30
6.8.8	Marcaje de sonda homóloga complementaria.	30
6.8.9	Lavado de membranas hibridadas.	31
6.8.10	Revelado de películas.	31
6.9	Diseño experimental y análisis estadístico.	31
7	RESULTADOS	33
7.1	Crecimiento vegetal (Biomasa aérea y radical).	33
7.2	Tasa Relativa de Crecimiento y componentes.	34
7.3	Fotosíntesis y conductancia estomática.	35
7.4	Relaciones hídricas.	36
7.5	Carbohidratos totales.	37
7.6	Carbohidratos solubles.	37
7.7	Expresión del gen <i>PVPTP1</i> en raíz de <i>P. vulgaris</i> .	38

8	DISCUSIÓN	52
	8.1 Crecimiento vegetal (biomasa aérea y radical).	52
	8.2 Tasa relativa de crecimiento y componentes.	52
	8.3 Fotosíntesis y conductancia estomática.	53
	8.4 Relaciones hídricas.	54
	8.5 Carbohidratos totales y solubles.	55
	8.7 Expresión del gen <i>PVPTP1</i> en raíz de <i>P. vulgaris</i> .	56
9	CONCLUSIONES	58
10	LITERATURA CITADA	59
11	APÉNDICE	72

ÍNDICE DE CUADROS

		Pág.
CUADRO 1.	Clasificación de suelos sódicos y salinos (USSL, 2005).	5
CUADRO 2.	Clasificación del agua utilizada en riego de cultivos.	6
CUADRO 3.	Producción de frijol en América Latina.	7
CUADRO 4.	Producción de frijol en África.	7
CUADRO 5.	Peso de semilla, origen geográfico de las accesiones silvestres (W) y cultivadas (C) de <i>Phaseolus</i> spp.	21
CUADRO 6.	Efecto del NaCl en número de hojas, área foliar, peso seco de vástago y raíz relación raíz:vástago de <i>Phaseolus</i> spp. después de 20 días de exposición a diferentes concentraciones de NaCl.	39
CUADRO 7.	Análisis de varianza para la tasa relativa de crecimiento (TRC) y componentes de <i>Phaseolus</i> spp. a los 20 días de crecimiento en agobio salino.	40
CUADRO 8.	Análisis de varianza para el potencial hídrico, osmótico y de turgor, tasa de asimilación de CO ₂ y conductancia estomática, de <i>Phaseolus</i> spp. después de 20 días de exposición a estrés salino.	40
CUADRO 9.	Análisis de varianza para carbohidratos totales en hoja, tallo y raíz de <i>Phaseolus</i> spp. a 20 días de cultivo en salinidad.	41
CUADRO 10.	Contenido de carbohidratos solubles en hojas de <i>Phaseolus</i> spp. a diferentes concentraciones de salinidad identificados por cromatógrafo de gases.	42
CUADRO 11.	Contenido de carbohidratos solubles en tallo de <i>Phaseolus</i> spp. a diferentes concentraciones de salinidad identificados por cromatógrafo de gases.	43
CUADRO 12.	Contenido de carbohidratos solubles en raíz de <i>Phaseolus</i> spp. en diferentes concentraciones de salinidad identificados por cromatógrafo de gases.	44

- CUADRO 13. Contenido de azúcares solubles en hojas de *Phaseolus* spp. 45
a diferentes concentraciones de salinidad identificados por
cromatógrafo de GEM.

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1. Efecto de NaCl en tasa relativa de crecimiento TRC (a), tasa de asimilación neta TAN (b), tasa de área foliar TAF (c), tasa de peso foliar TPF (d) y área foliar específica AFE (e), en <i>Phaseolus</i> spp. después de 20 días de exposición a salinidad.	46
FIGURA 2. Efecto del NaCl en la tasa de asimilación de CO ₂ , y conductancia estomática en <i>Phaseolus</i> spp. después 20 días de exposición a salinidad.	48
FIGURA 3. Efecto del NaCl en potencial hídrico, potencial osmótico y potencial de turgencia en <i>Phaseolus</i> spp. después 20 días de exposición a salinidad.	49
FIGURA 4. Efecto del agobio salino en contenido de azúcares totales en hojas, tallo y raíz en <i>Phaseolus</i> spp. después 20 días de exposición a salinidad.	50
FIGURA 5. Ensayo tipo Northern Blot de tejido de raíz de <i>Phaseolus vulgaris</i> a diferentes concentraciones de NaCl y a diferentes tiempos de muestreo.	51

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del agobio salino sobre el crecimiento, fotosíntesis, relaciones hídricas, acumulación de carbohidratos y expresión del gen *PVPTP1* en dos accesiones silvestres (*P. acutifolius*. y *P. filiformis*) y dos cultivadas (*P. acutifolius* y *P. vulgaris*) de frijol. El experimento se realizó en solución nutritiva en condiciones de invernadero y utilizando cuatro niveles de salinidad (control, 30, 60, and 90 mM NaCl). Durante un periodo de 20 días después del inicio del tratamiento salino, se analizó la tasa de crecimiento relativo (RGR; $\text{g g}^{-1} \text{ día}^{-1}$), tasa de asimilación neta (TAN; $\text{g m}^{-2} \text{ día}^{-1}$), razón de área foliar (RAF; $\text{m}^{-2} \text{ g}^{-1}$), área foliar específica (AFE; $\text{m}^{-2} \text{ g}^{-1}$) y relación de peso foliar (RPF; g hoja g^{-1}), tasa de asimilación de CO_2 , relaciones hídricas, acumulación de carbohidratos en raíz, tallo y hoja y la expresión del gen *PVPTP1*. El incremento de salinidad y duración del agobio redujo la TRC, TAN, RAF y AFE pero no afectó la RPF. En todas las accesiones excepto en *P. filiformis*, la TRC se correlacionó significativamente con TAN y no con RAF indicando que la eficiencia fotosintética es un factor determinante en las diferencias entre especies. En *P. filiformis*, la TRC y componentes (TAN y RAF) se mantuvieron inalterables a mayor concentración salina. El incremento de salinidad disminuyó progresivamente la conductancia estomática y, consecuentemente, la tasa de asimilación de CO_2 . Los potenciales hídrico y osmótico disminuyeron conforme se intensificó el agobio salino, sin embargo el ajuste osmótico permitió que el potencial de turgor se mantuviera y/o intensificara. Asimismo, la salinidad promovió el incremento significativo de carbohidratos totales y solubles (glucosa, inositol, xilosa y galactosa) en hojas y tallos pero no así en las raíces. Es probable que la acumulación de carbohidratos en la planta haya estado relacionada con el mantenimiento de turgor en etapas iniciales del agobio pero su contribución fue reducida (4 %). En hojas de *P. filiformis*, sin embargo el incremento de manitol, pinitol y ononitol fue mayor a medida que aumentó la concentración de salinidad y estos carbohidratos pudieron haber estado relacionados con el ajuste osmótico y

mayor tolerancia a salinidad en esta especie. En relación a la expresión del gen *PVPTP1* no se detectó expresión en tejido de raíz de *P. vulgaris*, lo que sugiere que este gen no está relacionado con la tolerancia a salinidad. Los resultados demuestran que *P. filiformis* es una especie tolerante al agobio salino y que su tolerancia está regulada por un adecuado control estomático y eficiencia fotosintética a través de ajuste osmótico. La contrastante variabilidad fisiológica de esta especie podría constituir una base genética para futuros programas de mejoramiento de *P. vulgaris* cultivado.

1. INTRODUCCIÓN

Se estima que el 20 % de la superficie cultivable actual y aproximadamente la mitad de áreas irrigadas a nivel mundial se encuentran afectadas por salinidad (Zhu, 2001). La mayoría de las plantas cultivadas son glicófitas y su productividad esta fuertemente limitada por las heterogéneas concentraciones de sal en el suelo (Munns, 2002). La salinidad altera el crecimiento vegetal por efecto de reducidos potenciales hídricos, toxicidad iónica y modificaciones del balance nutrimental (Munns, 2002). El grado con que estos factores afectan el crecimiento y tolerancia a salinidad depende del genotipo y condiciones ambientales.

Se considera que un parámetro fisiológico clave que permite comparar la tolerancia a salinidad y su relación con el crecimiento entre especies y/o genotipos es la tasa relativa de crecimiento (Cramer y col., 1994). La tasa relativa de crecimiento (TRC, $\text{g g}^{-1} \text{día}^{-1}$) es una función de: (i) la tasa asimilatoria de la planta (TAN, $\text{g m}^{-2} \text{día}^{-1}$) que es un índice de la capacidad asimilatoria por unidad de área foliar y (ii) de la razón de área foliar (RAF, $\text{m}^{-2} \text{g}^{-1}$) que es un índice de la foliosidad de la planta (Hunt, 1990). Ambos parámetros de crecimiento permiten clarificar si la variación genotípica en la tolerancia a salinidad es atribuible a cambios en las respuestas fotosintéticas o morfológicas (Bayuelo-Jiménez y col., 2003).

La fotosíntesis es un proceso fisiológico sensible a la salinidad y un factor determinante en el crecimiento de la planta (Stepien y Klobus, 2006). En varios estudios se ha señalado que la fotosíntesis se correlaciona con la tasa de crecimiento de *Brassica* (Ashraf, 2001), *Triticum aestivum* (El-Hendawy y col., 2005) y *Phaseolus* (Bayuelo-Jiménez y col., 2003), mientras que en otras especies como *Trifolium repens* (Rogers y Noble, 1992) y *Triticum aestivum* (Hawkins y Lewis, 1993) no existe dicha relación. La tasa fotosintética también se ha correlacionado con cambios en la conductancia estomática (g_s) (Brugnoli y Lauteri, 1991; Stepien y Klobus, 2006; Bayuelo y col., 2003).

La salinidad en la solución del suelo disminuye su potencial osmótico y la disponibilidad y absorción del agua necesaria para el crecimiento de la planta.

Como resultado de ello, el potencial hídrico y, consecuentemente, el potencial osmótico de la planta decrece para mantener una adecuada presión de turgor celular (Munns, 2002; Tattini y col., 1995). Hasegawa y col., (2002) señalan que el grado de reducción del potencial hídrico y osmótico en las plantas sometidas a un agobio salino depende del nivel de tolerancia de la especie, siendo menor la reducción del potencial hídrico y osmótico en especies tolerantes y mayor en sensibles. De igual forma, el grado de tolerancia en las relaciones hídricas de la planta podría asociarse con la capacidad de la misma para disminuir el potencial osmótico (ajuste osmótico) a través de la síntesis de solutos orgánicos compatibles (carbohidratos solubles, aminoácidos, prolina, betaina, etc.) y/o por acumulación de iones inorgánicos. El ajuste osmótico en hojas y raíces contribuye con el mantenimiento de la absorción de agua y el turgor celular, y estos a su vez, favorece la homeostasis de importantes procesos fisiológicos como la apertura estomática, fotosíntesis y expansión celular (Serraj y Sinclair, 2002). De tal forma que el estudio del efecto de la salinidad en las relaciones hídricas de la planta es una herramienta útil para evaluar el grado de tolerancia y variabilidad genotípica.

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es extremadamente sensible a salinidad y sufre pérdidas del rendimiento a concentraciones de sales en el suelo menores a 2 dS m⁻¹ (Läuchli, 1984). La tolerancia a salinidad en esta especie cultivada es muy limitada y se encuentra asociada con una reducida tasa de absorción y transporte de Na⁺ al vástago (Cachorro y col., 1993; Bayuelo-Jiménez y col., 2003). En especies silvestres del noroeste de México, por el contrario, 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 y col., 2002). La tolerancia a salinidad de estas especies se asocia con una mayor velocidad de germinación, menor reducción de crecimiento relativo, bajos índices de susceptibilidad y una mayor razón raíz: vástago (Bayuelo-Jiménez y col., 2002). Asimismo, estas especies poseen un mecanismo de exclusión de Na⁺ a nivel de raíz y ajuste osmótico para mantenimiento de turgor a través de acumulación de Cl⁻.

Es evidente que la información relacionada con los parámetros fisiológicos que determinan la tolerancia en *Phaseolus* y su relación con diferencias genotípicas es fragmentaria. Es por ello, que el objetivo de este estudio es proveer de una mayor comprensión sobre algunos de los parámetros fisiológicos que determinan la tolerancia a salinidad entre diferentes especies de *Phaseolus*, con particular referencia en la tasa relativa de crecimiento y sus componentes.

2. ANTECEDENTES

2.1. Problemas de salinidad en la agricultura

En varias partes del mundo, la salinidad de los suelos es un serio problema para los cultivos (Ramoliya y Pandey, 2003), particularmente en las zonas áridas y semiáridas donde el agua disponible para el riego presenta altas concentraciones de sales en solución. Estas sales tienden a acumularse en la parte superior del perfil del suelo, especialmente cuando se presenta un alto porcentaje de evaporación (Rhoades y col., 1992).

En suelos salinos, los iones Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} y HCO_3^- son los que afectan, en mayor grado, la estructura física del suelo y limitan el crecimiento vegetal. De acuerdo a la clasificación propuesta por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (2005), un suelo salino es aquel cuya conductividad eléctrica de saturación del extracto del suelo es mayor o igual a $(\text{EC}_e) \geq 4 \text{ dSm}^{-1}$, equivalente a 40 mM de NaCl (USSS, 2005) (Cuadro 1).

El Servicio de Manejo en Nutrición de Plantas y Suelo de la FAO (2005), estima que la superficie de suelos salinos supera los 800 millones de hectáreas, lo cual representa el 6 % del área total del planeta. De las 230 millones de hectáreas cultivables, 45 millones de hectáreas (20 %) son salinas, ocasionadas por un inadecuado manejo del riego y de los 1500 millones de hectáreas en suelos áridos o semi áridos, 32 millones son afectados por salinidad (2.1%) (FAO, 2005).

En México, la degradación de los suelos por efecto de salinidad está asociada a inadecuados esquemas de irrigación y drenaje deficiente (Cuadro 2), principalmente en zonas áridas y semi áridas (75% del área total). Estas regiones están caracterizadas por temperaturas extremas, baja humedad relativa, alto porcentaje de evaporación y escasa precipitación, lo que ocasiona la degradación de los suelos (Singh, 2001). Se estima que de los 2 millones de hectáreas que representa nuestro país, el 10 % está afectado por salinidad.

Cuadro 1. Clasificación de suelos sódicos y salinos (USSL, 2005).

Término	Definición	Descripción	Efecto en el crecimiento de las plantas	Comentarios
Salinidad	Los suelos salinos que presentan una elevada concentración de sales solubles. Son clasificados como salinos cuando la conductividad eléctrica EC_e es $\geq 4 dSm^{-1}$.	Esta definición proviene de la conductividad eléctrica EC_e y puede reducir el rendimiento de la mayoría de los cultivos, sin embargo muchos cultivos son afectados a una $EC_e < 4 dsm^{-1}$.	Osmótico y específico e inhibe el crecimiento de componentes de raíz y tallo.	EC_e es la conductividad eléctrica a saturación del extracto y refleja la concentración de sales en suelo saturado. Una conductividad de $4 ds m^{-1}$ es equivalente a $40 mM$ de NaCl.
Sodicidad	Los suelos sódicos tienen una baja concentración de sales solubles, pero un alto porcentaje de Na^+ intercambiable (PSI) y son clasificados como sódicos cuando el PSI es ≥ 15 .	La definición de sódico deriva de PSI el cual degrada la estructura del suelo causada por el Na^+ , desplazando a los cationes divalentes y uniéndose con las cargas negativas de las partículas de arcilla.	Una pobre estructura del suelo inhibe el crecimiento de la raíz.	A elevados PSI las partículas de arcilla se separan. El drenaje del suelo es pobre y llegan a ser inundables con poca agua, y son muy duros cuando están secos.
Alcalinidad	Los suelos alcalinos son un tipo de suelos sódicos con alto pH y son definidos como alcalinos cuando presentan un PSI ≥ 15 a pH de 8.5-10.	El alto pH es causado por sales carbonatadas, provenientes del suelo.	El alto pH afecta la absorción de nutrientes.	

Cuadro 2. Clasificación del agua utilizada en riego de cultivos (Rhoades y col., 1992).

Tipo de agua	EC (dS/m)	Clase de agua
Potable	< 0.7	No salina
Riego	0.7-2.0	Ligeramente salina
1 ^{er} tratamiento aguas negras y manto freático	2.0-10	Moderada salinidad
2 ^{do} tratamiento aguas negras y manto freático	10-20.5	Altamente salina
Cuerpo de agua muy salino	20.5-45	Extrema salinidad
Agua de mar	> 45	Salmuera

2.1.1 Causas y origen de salinidad en los suelos

La principal forma de desarrollo de los suelos salinos-sódicos se debe a procesos geológicos e hidrológicos, los materiales de los cuales se forman este tipo de suelos son: rocas ígneas básicas, basalto, rocas ígneas indiferenciadas y depósitos de aluviación. Factores climáticos y manejo de riego así como la evaporación aceleran la formación de suelos salinos-sódicos (Rhoades y col., 1992).

El segundo factor que participa en la formación de suelos salinos es por efecto antropogénico principalmente por métodos inapropiados de riego como agua de mala calidad usada para riego, ocasionando acumulación de sales en la superficie del suelo (Rhoades, 1997). Este mismo esquema se potencia con el incremento en irrigación, deforestación, acumulación de agua contaminada en el suelo y la utilización descontrolada de fertilizantes (Szabolcs, 1994; Mahajan y Tuteja, 2005).

2.2 Importancia del frijol en México

Dentro de las leguminosas, el frijol es uno de los granos de mayor importancia a nivel mundial debido a que se consume directamente por la población humana. La producción total supera los 23 millones de toneladas métrica (TM), de los cuales 7 millones de TM son producidos en América Latina y

África (Cuadros 3, 4). La producción de frijol en América Latina se realiza en pequeñas unidades, no mayores de 10 hectáreas, en suelos con baja fertilidad, pendientes pronunciadas y bajo condiciones de temporal, a excepción de Argentina que el sistema de producción de frijol es modernizado (Cuadro 3).

Cuadro 3. Producción de frijol en América Latina (Broughton y col., 2003).

País/Región	Área(ha 10^{-3})	Producción(MT $\times 10^{-3}$)
Brasil	5092	3055
México	2259	1300
Centro América (Guatemala, Honduras, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica, Panamá)	526	337
Zona Sur (Chile, Argentina, Paraguay)	357	398
Zona Andina (Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia)	299	265
Caribe (Cuba, Haití, República Dominicana)	157	141
Total	8690	5496

Cuadro 4. Producción de frijol en África (Broughton y col., 2003).

Región	Área (%)	Producción (ha $\times 10^{-3}$)
África del Este (Burundi, DR Congo, Etiopía, Kenya, Rwanda, Tanzania, Uganda).	62	2490
África del Sur. (Lesotho, Madagascar, Malawi, Mozambique, Swaziland, Tanzania, Zamba, Zimbawe).	31	1290
África del Oeste. (Angola, Cameron, Cape Verde, Tongo).	3	135
Tierras bajas con producción en primavera (Algeria, DR Congo, Egipto, Mali, Malawi, Mauritius, Morocco, Nigeria, Sudán, Tunisia).	4	200
TOTAL	100	4025

En México, el frijol es uno de los cultivos más antiguos del nuevo mundo, y junto con el del maíz representa toda una tradición productiva y de consumo, cumpliendo con un carácter alimentario y socioeconómico. Esta leguminosa junto con el maíz y sorgo representa una fuente de ingresos para los agricultores, llegando a producir el 8.3 % de cosechas a nivel mundial (Broughton y col., 2003; SAGAR, 2000). El frijol se consume en la mayoría de los países de Latinoamérica por su alto valor nutritivo como fuente de proteínas y minerales. En nuestro país, el grano se consume de forma regular en la mayoría de los estratos sociales de la población (McClean y col., 2004; Gepts y col., 2005).

El frijol se cultiva en todas las regiones del país en pequeña, mediana y gran escala, bajo diversas condiciones climáticas y en suelos con pendientes pronunciadas y de baja fertilidad. En la década de los 90's la superficie destinada a la siembra de frijol representó el 11 % del total nacional, registrándose una cosecha de 1.9 millones de hectáreas con un rendimiento de 631 kg/ha, el cual es considerado bajo, debido a las variadas condiciones ambientales en las que se cultiva (SAGAR, 2000).

El género *Phaseolus* tiene su centro de origen en el centro y sur de Latinoamérica y comprende 72 especies (Debouck 2002). Particularmente, en México se cultivan varias especies de frijol en diferentes ambientes, entre las cuales destacan el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), frijol ayocote (*P. coccineus* L.), frijol comba (*P. lunatus*) y frijol tepari (*P. acutifolius*, Gray). De estas especies, el frijol común se cultiva en todo el mundo ocupando más del 85 % de producción de frijol (Engleman, 1979; Broughton y col., 2003).

2.2.1 Clasificación y características botánicas de *Phaseolus spp*

La familia de las leguminosas representa 750 géneros y aproximadamente 20,000 especies, es una de las tres familias más grandes de las plantas superiores comparada con las Gramíneas, que representa 10,000 especies y las

Brassicaceae con solo 3,500 especies (Gepts y col., 2005). Su amplia distribución geográfica se debe a que es una especie adaptada a diferentes condiciones ambientales, posee una gran variedad morfológica y hábitos de crecimiento.

El género *Phaseolus* pertenece a la familia Leguminosae o Fabaceae, subfamilia Papilionoideae, tribu Phaseolae y subtribu Phaseolinae (Allen y col., 1981). Con base en características taxonómicas florales esta familia se divide en tres subfamilias: Caesalpinioideae con 2,500 a 2,800 especies: Mimosoideae con 3,000 especies: y Papilionoideae de 12,000 a 13,500 especies (Allen y Allen, 1981).

2.3 Efecto de salinidad en las plantas

El efecto de la salinidad en las plantas depende de la especie, estado fenológico, factores ambientales y el tipo de salinidad presente en el suelo. En condiciones naturales, las plantas están expuestas a una amplia variedad de factores bióticos y abióticos que influyen negativamente en su crecimiento, desarrollo y productividad. El estrés abiótico, sin embargo, es el principal factor que influye en la productividad de cultivos, registrando pérdidas que superan el 50 % del rendimiento, en comparación con las pérdidas causadas por patógenos en el orden del 10 a 20 % (Kreps y col., 2002).

La salinidad reduce el crecimiento vegetal por un efecto osmótico y iónico (Munns, 2002). La primera fase de la reducción del crecimiento es de naturaleza osmótica y/o hídrico, este efecto resulta de la disminución del potencial hídrico en suelo, debido a un incremento en la concentración de solutos en la zona radical que reduce y/o impide la absorción de agua y, por lo tanto, el mantenimiento de turgor celular. A bajas o moderadas concentraciones de sal, sin embargo las plantas acumulan osmolitos (solutos compatibles) para mantener adecuados potenciales hídricos. En la segunda fase, la acumulación de iones Na^+ o Cl^- pueden ocasionar inestabilidad en las funciones de la membrana plasmática e interferir en el balance de solutos y nutrientes, causando deficiencias nutricionales (Munns, 2002). En la mayoría de las especies sensibles (glicófitas), la

acumulación de sales es mas rápida que en las especies tolerantes (halófitas), debido a que las células son incapaces de canalizar rápidamente los iones Na^+ y Cl^- en la vacuola (Munns, 1993).

2.3.1 Efecto de la salinidad en crecimiento

La salinidad es uno de los principales factores que limitan el crecimiento vegetal y el grado en el cual se verá reducido va a depender del tipo de cultivo. Aunque algunas especies de cultivos son moderadamente tolerantes a salinidad, muchos cultivos son afectados a bajos niveles de sal. El frijol común es una especie relativamente sensible a salinidad, se estima que a 2.0 dSm^{-1} presenta una disminución de 50 % de su crecimiento (Maas y Hoffman, 1977). Las especies cultivadas presentan baja variabilidad genética para tolerancia a salinidad (Moreno-Limón y col., 2000). En contraste a los genotipos cultivados, las especies silvestres presentan una amplia variedad genética para tolerancia al estrés salino y pueden ser utilizadas como reservorio de genes para mejorar dicha tolerancia en especies cultivadas.

Por otra parte, la disminución del crecimiento se evalúa en términos relativos, mediante la cuantificación de la disminución de materia seca acumulada en condiciones de salinidad con respecto al control, sin agobio salino y en función del tiempo (Munns, 2002). Para tal efecto, la cuantificación se hace mediante la tasa relativa de crecimiento TRC ($\text{g g}^{-1} \text{ día}^{-1}$), que se define como el incremento de materia seca por unidad de materia seca presente, por unidad de tiempo. La TRC está en función de los componentes: tasa de asimilación neta ($\text{TAN g m}^{-2} \text{ día}^{-1}$) y tasa de área foliar ($\text{TAF m}^{-2} \text{ g}^{-1}$). El primer componente se refiere a la capacidad asimilatoria de los fotoasimilados de planta por unidad de área foliar, en tanto que el segundo, es un índice de expansión foliar de la planta, por unidad de tiempo y está en función de la relación de peso foliar (RPF g g^{-1}) y el área foliar específica ($\text{AFE m}^{-2} \text{ g}^{-1}$) (Hunt, 1990). La contribución de estos componentes en la reducción de la TRC por salinidad es variable y depende de los cambios morfológicos y/o respuestas fotosintéticas del genotipo en cuestión.

En la mayoría de las especies, la salinidad afecta la TRC por la reducción de TAF. La disminución de TAF puede ser causada por la reducción del área foliar específica AFE (incremento de biomasa por unidad de área foliar) y/o razón de peso foliar RPF disminución en la producción de materia seca destinada al crecimiento de tejido foliar (Curtis y Läuchli, 1986). En especies de *Schinus* (Anacardiaceae) la disminución de TRC se relacionó con la disminución de TAF por efecto de AFE, y la disminución de TAF en condiciones de salinidad fue de 67 % con respecto al control (Sharon y col., 2005). En 5 genotipos de *Zea mays* sometidos a 100 mmol L⁻¹ de NaCl, la disminución de TAF fue mayor que TAN pero ambos componentes disminuyeron la TRC (Azevedo-Neto y col., 2004)

2.3.2 Efecto de salinidad en las relaciones hídricas

El incremento de la concentración de la sal en el medio de la raíz conduce a la disminución del potencial hídrico de la hoja y afecta varios procesos fisiológicos de la planta (Parida y Das, 2004) tan importantes como la pérdida de turgor celular (Sohan y col., 1999).

La salinidad en la solución del suelo disminuye su potencial osmótico y la disponibilidad y absorción del agua necesaria para el crecimiento de la planta. Como resultado de ello, el potencial hídrico y, consecuentemente el potencial osmótico de la planta decrece para mantener una adecuada presión de turgor celular (Munns, 2002; Tattini y col., 1995). El grado de tolerancia en las relaciones hídricas de la planta se asocia con la capacidad de la misma para disminuir el potencial osmótico (ajuste osmótico) a través de la síntesis de solutos orgánicos compatibles (carbohidratos solubles, aminoácidos, prolina, betaina, etc.) y/o por acumulación de iones inorgánicos. El ajuste osmótico en hojas y raíces contribuye con el mantenimiento de la absorción de agua y el turgor celular, y estos a su vez, favorece la homeostasis de importantes procesos fisiológicos como la apertura estomática, fotosíntesis y expansión celular (Serraj y Sinclair, 2002; Hare y col., 1998; Zhang y col., 1999; Patakas y col., 2002; Azevedo-Neto y col., 2004).

Varios autores han reportado que la reducción del potencial hídrico y osmótico se acentúa a mayor salinidad pero que el potencial osmótico disminuye en mayor proporción que el potencial hídrico, contribuyendo así en el mantenimiento del turgor celular. Un ejemplo de ello es el estudio realizado con dos genotipos de sorgo sometidos a agobio salino, los cuales disminuyeron el potencial osmótico de -1.04 a -1.53 MPa en 0 mmol L^{-1} y 100 mmol L^{-1} de NaCl, respectivamente (Lacerda y col., 2003; Meloni y col., 2004). Azevedo-Neto y colaboradores (2004), reportan resultados similares en la disminución del potencial hídrico en diferentes genotipos de *Zea mays* sometidos a una concentración de 100 mmol L^{-1} de NaCl.

2.3.3 Efecto de la salinidad en la fotosíntesis

El crecimiento de las plantas es el resultado de procesos fisiológicos altamente ordenados y regulados. La disminución del crecimiento está directamente relacionada con el proceso de fotosíntesis. La salinidad afecta el crecimiento vegetal a través de una disminución en la tasa fotosintética y conductancia estomática, por lo tanto, una reducción en la productividad neta y rendimiento del cultivo (Munns, 1993; Volkmar y col., 1998; Ashraf, 2001).

La salinidad disminuye la conductancia estomática y la disponibilidad de CO_2 para las reacciones de carboxilación (Brugnoli y col., 1992). Reddy y colaboradores (1992), sometieron una leguminosa *Macrotyloma uniflorum* a 200 mM de NaCl y registraron una significativa reducción en la tasa de asimilación de CO_2 , conductancia estomática la inhibición de la cadena de transporte de electrones y enzimas del ciclo de Calvin. Además de esto, el agobio salino disminuye la actividad de los complejos cosechadores de luz del cloroplasto, los sistemas de conversión de energía, desintegración de las estructuras del cloroplasto y la cantidad de clorofilas (Parida y Das, 2004). A elevadas concentraciones de NaCl, la asimilación de iones como el K^+ , el cual es requerido para control estomático y como cofactor de las enzimas piruvato cinasa, disminuye

concomitantemente, promoviendo una deformación del fotosistema II (Ball y col., 1987).

En *A. pseudoalhagi* una leguminosa, la tasa de asimilación de CO₂ aumenta a bajas concentraciones de salinidad (50 mM NaCl) y la reducción se presenta solo a concentraciones de 200 mM NaCl con respecto al control (Kurban y col., 1999). Parida y colaboradores (2004), reportan un incremento en la tasa fotosintética de *B. parviflora* a 100 mM de NaCl y una disminución drástica a 200 mM NaCl.

2.3.4 Efecto de la salinidad en contenido de nutrimentos

El incremento de sales en el medio ocasiona un desequilibrio nutricional a la planta por la excesiva concentración de iones Na⁺ y Cl⁻ y por el efecto antagónico entre nutrientes Na⁺/Ca⁺, K⁺, Ca⁺/Mg²⁺ y Cl⁻/NO₃⁻ (Grattan y Grieve, 1999). De acuerdo con Tester y Davenport (2003), el Na⁺ compite con el K⁺ y el efecto tóxico del Na⁺ es debido a la acumulación de dicho ión en el citoplasma. En *Phaseolus* spp, las altas concentraciones de NaCl en el medio aumentan la absorción de Na⁺ y Cl⁻ en raíz, tallo y hojas y disminuyen la tasa de absorción de Ca⁺, K⁺ y Mg²⁺ (Bayuelo-Jiménez y col., 2003). La salinidad afecta la absorción de nitrógeno por el antagonismo del Cl⁻ por el NO₃⁻ (Gouia y col., 1994). Ashraf y colaboradores (2003) reportan disminución de la actividad enzimática de nitrato reductasa en hojas, raíces y formación de nódulos en dos leguminosas (*S. aculeata* y *P. vulgaris*) a concentraciones de 3.5 dS m⁻¹ (35 mM de NaCl). Dicha disminución se relacionó con el aumento de Cl⁻ en hojas. Similares resultados han sido registrados por Parida y Das (2004) en hojas de *B. parviflora* a 100 mM de NaCl. Estos investigadores observaron una disminución en la absorción de NO₃⁻ y en la actividad enzimática de nitrato reductasa. Se ha reportado también que altas concentraciones de NaCl reducen la disponibilidad de Mg²⁺ en hojas. En el caso del fósforo, se tienen resultados diversos, sin embargo, se ha reportado la disminución de la absorción de dicho ion por aumento de salinidad (Grattan y Grieve, 1999).

2.4 Tolerancia a salinidad

La tolerancia al agobio salino es la capacidad inherente de las plantas para soportar el efecto de altas concentraciones de sales en la zona de la raíz o en las hojas sin efecto adverso en el crecimiento (Shannon y col., 1999). No obstante, la tolerancia a salinidad varía en función de la etapa fenológica de la especie, duración del agobio salino, factores ambientales y grado de tolerancia (halófito o glicófito) (Greenway y col., 1980; Shannon y col., 1994; Yeo, 1998). Las respuestas bioquímicas y fisiológicas que mejoran la tolerancia a salinidad, están influenciados por la expresión de múltiples genes que se encuentran distribuidos en diferentes cromosomas de la especie (Yeo, 1998).

2.4.1 Mecanismos fisiológicos de tolerancia a salinidad

Las plantas han desarrollado distintos mecanismos bioquímicos y moleculares para crecer en condiciones salinas. Ambos procesos son sinérgicos y de utilidad en programas de mejoramiento conducentes a incrementar la tolerancia a salinidad de plantas cultivadas (Parida y Das, 2005). De acuerdo con Munns y col. (2002), los mecanismos de tolerancia ocurren en tres niveles de organización: (i) a nivel de toda la planta, (ii) a nivel celular y (iii) a nivel molecular.

2.4.2 Mecanismos fisiológicos de tolerancia a nivel de toda la planta

La tolerancia depende de la capacidad de la planta para controlar la absorción, transporte y distribución de NaCl a través de la raíz hasta las partes aéreas. Se asumen cinco sitios de control en la absorción y transporte de Na^+ y Cl^- . El primer nivel es en toda la planta e involucra los siguientes mecanismos fisiológicos de tolerancia:

1. Exclusión de sal en la zona de la raíz, la absorción de iones en las células de la raíz, preferentemente K^+ . La selectividad en la absorción de este ion ha sugerido estar asociado con la tolerancia a salinidad (Ashraf, 1994).

2. Carga en el xilema. Existen evidencias que la carga es preferentemente por K^+ que Na^+ y esta ocurre a través del estele.
3. La remoción de Na^+ y Cl^- del xilema ocurre en la parte superior de la raíz, en tallo o pecíolos. En *P. vulgaris* se han identificado algunos mecanismos de exclusión de iones a nivel de raíz y xilema. Sin embargo, aún sigue siendo incierto los mecanismos que operan en la adaptación a salinidad de estas especies.
4. La mínima carga de Na^+ y Cl^- en el floema, evitando el daño a los tejidos en crecimiento. Las bajas concentraciones de estos iones en el floema, indican que las especies más tolerantes excluyen Na^+ y Cl^- del floema (Munns, 2005). El transporte de Na^+ hacia el floema depende de la especie. Del 100 % del Na^+ que se transporta en el xilema, el 28% se transloca hacia el floema en *Zea mays*, 37 % en *Gossypium* spp. y 77 % en *Phaseolus vulgaris* (Gouia y col., 1994; Lohaus y col., 2000)
5. La excreción de NaCl por glándulas de sal, solo se presentan en halófitas como *R. mangle*. Este mecanismo esta mejor desarrollado en halófitas, de tal forma que tienen mayor control en la absorción, transporte y excreción del NaCl. En cambio las glicofitas cuentan con los tres primeros mecanismos que operan en diferentes grados de tolerancia (Munns y col., 2002).

2.4.3 Mecanismos de tolerancia a salinidad a nivel celular

El mecanismo de tolerancia a salinidad a nivel celular involucra el mantenimiento de la sal fuera del citoplasma y/o su compartimentalización en la vacuola. En el primer caso, la célula discrimina Na^+/K^+ evitando el ingreso del Na^+ a la célula. En el segundo caso, las células almacenan el Na^+ en la vacuola, citoplasma u otros organelos, o bien favorecen la acumulación de K^+ para contrarrestar la presión osmótica de los iones que se encuentran dentro de la vacuola (Munns y col., 2002). En el proceso de internalización intracelular, el Na^+ ingresa a las células de la hoja mediante canales selectivos y no selectivos, acarreadores y antitransportadores. Antes de que la concentración de Na^+

aumente en el citoplasma y llegue a ser tóxico en la misma, éste se transporta a la vacuola mediante antitransportadores activos de Na^+/H^+ . El transporte de Na^+ requiere la actividad de ATPasa que hidroliza ATP para bombear protones a la vacuola y una pirofosfatasa que hidroliza pirofosfato para bombear protones a la vacuola (Binzel y Ratajczac, 2002). La sobre expresión de este transportador vacuolar ha incrementado la tolerancia a salinidad en algunas especies: *Lycopersicon spp.*, *Arabidopsis*, *Brassica napus* y *Triticum spp* (Tester y Davenport, 2003).

2.4.4 Ajuste osmótico por iones y/o solutos

Bajo condiciones de salinidad, las plantas sintetizan solutos compatibles (carbohidratos solubles, aminoácidos, prolina, betaina, etc.) que evitan la deshidratación celular y protegen la maquinaria enzimática. El aumento de concentración de prolina en *Beta vulgaris* se correlaciona con la tolerancia a salinidad (Jouve y col., 2003; Ashraf y Bashir, 2003) mientras que en *Nicotiana tabacum*, la sobreexpresión de la enzima manitol fosfato deshidrogenasa aumenta dicha tolerancia (Abebe y col., 2003). En plantas de *Solanum tuberosum* transformadas con el gen que codifica para la enzima de gliceraldehído 3 fosfato-deshidrogenasa GDP incrementa la tolerancia al estrés salino (Shen y col., 1999; Mi-Jeong y col., 2001). Otro compuesto amino cuaternario importante en la tolerancia a salinidad es la glicinabetaína en *Arabidopsis*, la cual incrementa hasta $1.0 \mu\text{mol g}^{-1}$ de peso fresco en hojas y en las plantas silvestres no se acumula bajo estas condiciones (Sakamoto y col., 2000).

La tolerancia al estrés salino por medio de la síntesis de solutos es compleja. Se ha reportado que el aumento en la concentración de inositol (1, 4, 5) trifosfato, tiene una función clave en la tolerancia a salinidad (Drøbak y col., 2000). El pinitol es sintetizado a partir de *myo*-inositol por catálisis de inositol-*o*-metiltransferasa y ononitol epimerasa. El pinitol se sintetiza a concentraciones de aproximadamente 100 mM de NaCl, en gametofitos de *Acrostichum aureum* y es relacionado con la tolerancia a salinidad (Bohnert y col., 1996). Los poliols

(carbohidratos alcohol) protegen la célula interactuando con proteínas de membrana para su estabilización. Los carbohidratos que se acumulan bajo agobio salino funcionan como osmoprotectores en ajuste osmótico, y en el almacenamiento de fuente de carbono y amortiguadores de radicales libres (Nelson y col., 1999; Jouve y col., 2003).

El ajuste osmótico (AO) es definido como la disminución del potencial osmótico, por acumulación de solutos en el citoplasma de la célula, para evitar pérdida de agua durante el déficit hídrico ocasionado por el agobio salino. El ajuste osmótico en plantas bajo agobio salino puede ocurrir por acumulación de iones inorgánicos o solutos orgánicos o ambos (Lohaus y col., 2000; Azevedo Neto y col., 2004). En especies cultivadas (glicófitas), el principal mecanismo de tolerancia a la salinidad es a través de la exclusión de iones. Sin embargo, a bajas concentraciones de NaCl, la inclusión de iones Na^+ y Cl^- puede favorecer el ajuste osmótico por el reducido gasto metabólico (Greenway y col., 1980; Munns, 2002; Asharf, 2004).

2.4.5 Mecanismos de tolerancia a nivel molecular

Las adaptaciones fisiológicas o metabólicas al agobio salino son el resultado de la expresión genética de la planta. Los genes que son inducidos mediante el agobio salino pueden ser categorizados en diferentes grupos funcionales que codifican para diferentes proteínas; (i) genes que codifiquen para enzimas fotosintéticas. (ii) genes para la síntesis de solutos compatibles, (iii) genes para ayudar a internalizar iones en la vacuola y (iv) genes para reducir los radicales libres (Parida y Das., 2005). No se conoce en detalle los mecanismos moleculares de respuesta a salinidad. Se han identificado líneas de señalización basadas en genes SOS (Salt Overly Sensitive) identificados en líneas mutantes de *Arabidopsis*. El complejo SOS3 intra celular reconoce las sales del medio y dispara el incremento de calcio en el citosol; el complejo SOS-calcio cambia la conformación e interactúa con SOS2, así que este nuevo complejo SOS3-SOS2 activa SOS1, un antiporter Na^+/H^+ , el cual bombea los iones Na^+ hacia afuera de la

célula. El complejo SOS3, SOS2 también activa AtHKT y NHX (transportadores membranales) mediante cambios conformacionales bloqueando la entrada de Na⁺ al citosol y activando el antiporter vacuolar respectivamente (Zhu, 2002).

La mayoría de los cambios restantes pueden ser considerados como parte de vías de detoxificación que incluyen a) hidrólisis de fosfolípidos b) cambios en la expresión de genes que codifiquen para LEA (Proteínas abundantes de embriogénesis tardía), chaperonas moleculares y proteinasas, proteínas que remueven proteínas desnaturalizadas y c) activación de enzimas relacionadas en la remoción de especies reactivas de oxígeno que se generan durante el agobio salino (Zhu, 2002; Zhu, 2003).

2.4.6 Líneas de señalización

En condiciones naturales, las plantas están expuestas a diversos factores ambientales estresantes. Con base en la presencia de estos múltiples factores es lógico pensar que la planta tenga múltiples sensores de estrés y, a su vez, diferentes vías de transducción de señales que se integran en más de un punto. La familia de protein cinasa PKS son las que forman complejo SOS-Ca²⁺ que pertenecen a la superfamilia de proteincinasa dependiente de Ca²⁺, CDPKs. Estas proteínas están implicadas en vías de transducción de señales de respuesta a estrés por frío, sequía y daños (Chinnusamy y col., 2004). Las PKS se clasifican en dos grandes grupos: serina/treonina cinasa y tirosina cinasa, las cuales fosforilan serina/treonina y tirosina respectivamente. Existen, además, dos grupos principales de fosfatasas que remueven el grupo fosfato fosfo serina/treonina y fosfo tirosina y se les conoce como fosfoproteínas (serina/treonina) Fosfatasa (PPasas) y Protein tirosina fosfatasa (PTPasa).

Las PTPs juegan un papel importante en la transducción de señales en células animales. La activación de MAPKs (Proteína cinasa activada por mitógeno) ocurre mediante la fosforilación de los residuos de tirosinas y treonina. Se ha reportado la especificidad de la PTPasa en la defosforilación e inactivación de MAPKs en células animales y en levaduras (Guan, 1994).

Quiang y colaboradores (1998), reportan la expresión del gen *ATPTP1* en *Arabidopsis*, que codifica para la PTP1 en respuesta al agobio salino en tejido de raíz. A la fecha no se sabe si este gen participa en estrés salino en plantas de frijol.

3. JUSTIFICACIÓN

El agobio salino es uno de los principales factores abióticos que limita el crecimiento y desarrollo de los cultivos a nivel mundial. El estudio de la variabilidad genética intra e inter-específica y los mecanismos que confieren tolerancia a salinidad son herramientas de suma importancia en la generación de programas de mejoramiento de variedades cultivadas. Uno de los mecanismos fisiológicos más importantes que contribuyen con la tolerancia a salinidad es el ajuste omótico a través de la síntesis de solutos compatibles (i.e. carbohidratos y aminoácidos) pero su relación con los parámetros fisiológicos que determinan la tolerancia de especies silvestres de *Phaseolus* es fragmentaria y justifica su estudio. Asimismo, se ha descubierto que la síntesis de la proteína tirosina fosfatasa (PTPs) tiene una función central en la regulación de varios procesos de transducción de señales y que esta juega un papel importante en la tolerancia a salinidad de varias especies y tal vez en *Phaseolus* cultivado bajo condiciones de salinidad.

4. HIPÓTESIS

El agobio salino afecta el crecimiento de las plantas de frijol e induce cambios en la concentración de carbohidratos y expresión del gen *PVPTP1*.

5. OBJETIVOS

GENERAL

- Evaluar el efecto del agobio salino sobre el crecimiento, fotosíntesis, relaciones hídricas, acumulación de carbohidratos y expresión del gen *PVPTP1* en diferentes órganos de *Phaseolus spp.*

ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto del agobio salino en el crecimiento y componentes, tasa relativa de crecimiento (TRC), tasa de asimilación neta (TAN) y tasa de área foliar (TAF).
- Evaluar el efecto del agobio salino en la acumulación de carbohidratos totales y solubles, en diferentes órganos de la planta y su contribución como posibles osmolitos.
- Detectar los cambios en la expresión del gen *PuPTP1* como respuesta al agobio salino.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material vegetal

Se utilizaron tres especies de *Phaseolus* representados por dos especies silvestres, (*P. acutifolius* Gray y *P. filiformis* Benham) y dos cultivadas (*P. acutifolius* y *P. vulgaris* L.) (Cuadro 5). Las dos especies silvestres se eligieron por su adaptación a zonas áridas de México y su grado de tolerancia a salinidad previamente identificada (Bayuelo-Jiménez y col., 2002). Las semillas de las especies seleccionadas provienen de semilla multiplicada en condiciones de invernadero en la Posta Zootecnia de la UMSNH durante el periodo 2003-2004.

Cuadro 5. Peso de semilla, origen geográfico de las accesiones silvestres (W) y cultivadas (C) de *Phaseolus* spp. incluidas en el estudio.

Especies, accesión	PS (g)	Tipo	Origen	Estado	Tolerancia salinidad
<i>P. acutifolius</i> G40169	W	W	MEX	SON	S
<i>P. filiformis</i> PI535309	W	W	MEX	BCS	T
<i>P. acutifolius</i> G40142	C	C	MEX	SON	T
<i>P. vulgaris</i> G04017	C	C	BRA	Sao Paulo	S

S: sensible a salinidad; T: Tolerante a salinidad

6.2 Localización del área de trabajo

La presente investigación se realizó en un invernadero semi-automatizado en las instalaciones del Instituto del Instituto de Investigaciones sobre Recursos Naturales (INIRENA) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. El experimento se realizó durante el periodo de abril a julio del 2004. Las condiciones prevalecientes fueron de una temperatura promedio de 35 °C ± 2 alcanzando una

máxima de 38 °C y mínima de 15 °C. La humedad relativa varió del 60 al 70 %. La densidad de flujo fotónico máximo fue de 1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

6.3 Germinación de semillas

Antes de establecer el cultivo en solución, se esterilizaron las semillas de frijol con 2.5 g l⁻¹ de hipoclorito de sodio y se enjuagaron con agua desionizada. Posteriormente, se realizó una escarificación mecánica de las semillas y germinación en una incubadora a 25 °C en papel de germinación (Anchor Paper Co., St. Paul, MN) humedecido con una solución 0.5 mM de CaSO₄. Las plántulas de siete días 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 KNO₃, 4 Ca(NO₃)₂, 1 MgSO₄, 1 NH₄H₂PO₄, 0.04 KCl, 0.02 H₃BO₃, 0.001 MnSO₄, 0.001 ZnSO₄, 0.0003 CuSO₄, 0.0004 (NH₄)₆MO₇O₂₄ y 0.04 Fe-EDTA. El pH de la solución se ajustó diariamente a 6-6.5. Todas las plantas se mantuvieron en esta solución nutritiva hasta la emergencia de la primera hoja trifoliada (7 días después del transplante), momento en el cual se inició la aplicación del tratamiento salino. La adición del NaCl fue diaria y nocturna en concentraciones de 30 mM NaCl y 3 mM CaCl₂ hasta alcanzar una concentración final de 30, 60 y 90 mM NaCl y 3, 6 y 9 mM CaCl₂.

6.4 Medidas de intercambio gaseoso

Las mediciones de asimilación neta de CO₂ y conductancia estomática se realizaron a los 5, 10 y 15 días después del inicio de la aplicación de los tratamientos salinos. Para las mediciones se utilizaron la segunda, tercera y quinta hoja trifoliada, respectivamente. Se utilizó un analizador de gases al infrarrojo (LI-COR, Lincoln, NE). Las mediciones se realizaron en el trifolio central de la hoja, la cual se introdujo en una cámara foliar con temperatura y aereación controlada (6 cm²). La fotosíntesis neta se midió a una presión parcial externa de 34 MPa, (340 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol aire}^{-1}$) y a una densidad de presión de vapor de 1.8 KPa. La densidad de flujo fotónico fue de 1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ el cual se determinó como

saturante para la fotosíntesis de estas especies. Todas las mediciones se realizaron entre las 9:00 y 12:00 h y solo durante días despejados.

6.5 Relaciones hídricas

Las mediciones del potencial hídrico (Ψ_w) se realizaron antes del amanecer de los 5, 10 y 15 días después del inicio de la aplicación de los tratamientos salinos y en la segunda, tercera y quinta hoja trifoliada, respectivamente, con una cámara de presión (Modelo 3000, Soilmoisture, Santa Bárbara, CA) (Scholander y col., 1965). Las determinaciones del potencial osmótico (Ψ_π) se calcularon 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, dicha muestra se centrifugó en una microcentrífuga Eppendorf por 5 minutos a 2000 x g. Se utilizó un volumen de 10 μ l del sobrenadante y se midió la osmolaridad de la misma con un osmómetro (Wescor 5500, Logan, Modelo 5520XR, USA).

El osmómetro fue recalibrado constantemente, utilizando estándares comerciales. 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 $^{\circ}\text{K}$ (Nobel, 1991). El potencial de turgor (Ψ_p) se determinó por diferencia de presiones usando la relación de $\Psi_p = \Psi_w - \Psi_\pi$.

6.6 Análisis de crecimiento

Se colectaron las plantas a los 5, 10 y 15 días después de aplicar el estrés salino y se separó la raíz del vástago. Asimismo, se cuantificaron el número de hojas y área foliar por planta. Para esta última, se utilizó un planímetro portátil (modelo L1-300, LI-COR, Lincoln, NE). El material vegetal separado se deshidrató en una estufa a 65 $^{\circ}\text{C}$ por 96 h para estimar el peso seco de la misma. A partir de esta información se determinó el crecimiento absoluto (materia seca) y crecimiento

relativo de la planta (el porcentaje de materia seca obtenida en condiciones de agobio salino con respecto al control).

Los parámetros de crecimiento se calcularon de acuerdo a Hunt (1990). La tasa relativa de crecimiento (TRC, $\text{g g}^{-1} \text{ día}$) 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 (TAN, $\text{g m}^2 \text{ día}$) y la tasa de área foliar (TAF, $\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$). TAN es una medida de la eficacia del follaje en la producción de materia seca, por unidad de tiempo y se calculó a partir de la relación de incremento de materia seca total por unidad de área foliar total. TAF se calculó como la relación entre el área foliar total y la materia seca total de la planta, por unidad de tiempo. La relación de peso foliar (RPF, g g^{-1}) se determinó como la relación entre la materia seca total de la hoja y la materia seca total de la planta. El área foliar específica (AFE, $\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$) se refiere al área foliar expuesta por unidad de peso foliar. Con la finalidad de evaluar el impacto individual de los componentes del crecimiento sobre la TRC, se realizó un análisis de regresión lineal.

6.7 Análisis de carbohidratos solubles

Para el análisis de carbohidratos solubles se realizó la extracción en hoja, tallo y raíz, mediante la metodología descrita por Macías-Rodríguez y colaboradores (2002). Se pesó 2 g de tejido fresco previamente congelado en nitrógeno líquido y almacenado a -80°C , la muestra se homogenizó en un mortero y se adicionó nitrógeno líquido para evitar la descongelación del mismo. Se adicionaron 20 ml de metanol al 80 %, y se incubó a una temperatura de 60°C con agitación constante por 12 horas, la fase acuosa se retiró y se agregaron nuevamente 20 ml de metanol al 80 % y se agitó durante 3 h. Los extractos se unieron para retirar los residuos de tejido, se filtró al vacío, utilizando papel filtro whatman[®] 3MM Chr. Se utilizó carbón activado para eliminar los pigmentos y se llevó a deshidratación en un rotavapor a 65°C . La muestra seca se diluyó en 5 ml de metanol al 80 % y se mantuvo a una temperatura de -20°C , para su posterior derivación.

6.7.1 Carbohidratos totales

Para la determinación de carbohidratos totales se tomó 1 ml del extracto metanólico y se diluyó en un volumen final de 25 ml. De esta dilución se tomaron 2 ml para realizar la determinación mediante el método de Dubois y colaboradores (1956). Se preparó una curva estándar con una solución patrón de glucosa (100 µg/ml). En tubos de ensaye de manera independiente se colocaron 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 µl de la solución patrón y se añadió agua desionizada a cada tubo para alcanzar el volumen final de 1ml. Posteriormente, se agregó 1ml de fenol al 5% y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado a cada tubo, se dejó reposar 5 minutos, se agitó y se dejó reposar nuevamente durante 10 minutos en un baño de agua a 25 °C. Finalmente la absorbencia se midió a 490 nm (Dubois y col., 1956).

6.7.2 Derivación de Carbohidratos solubles

El análisis de carbohidratos solubles se determinó utilizando la metodología establecida por Macías-Rodríguez y colaboradores (2002). A partir del extracto metanólico se tomó una alícuota de 1 ml; ésta se colocó en un vial y se le adicionó persitol (25 µg) como estándar interno. Se evaporó completamente bajo corriente de gas nitrógeno; se le agregó 1 ml de diclorometano y nuevamente se evaporó a sequedad. Enseguida, se adicionó 1.5 ml de una mezcla de cloruro de hidroxilamina/piridina (53 mg/ 3 ml), se sonicó por 30 minutos y posteriormente se incubó a 85° C por 1 h. A esta muestra se le agregó 1 ml de piridina y 0.5 ml de anhídrido acético, se incubó a 85° C por 30 minutos, se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se vertió en tubos de ensaye. Se les agregó 1.5 ml de cloroformo y 4 ml de agua desionizada, se agitó con un vortex y se dejó que se separaran las fases. La fase orgánica que contenía los carbohidratos derivados se colectó, deshidrató con sulfato de sodio anhidro, evaporó a sequedad y, finalmente se resuspendió en 500 µl de cloroformo grado cromatográfico y se almacenó a -20 ° C para su posterior inyección en el cromatógrafo de gases.

6.7.3 Análisis de carbohidratos en cromatógrafo de gases-EM

El volumen de inyección fue de 2/ 50 µl de cloroformo. Se utilizó una columna HP-5-MS (30m x 0.25 mm). La temperatura inicial del horno fue de 150 °C por 3 minutos con incrementos de 6 °C/ min hasta alcanzar una temperatura final de horno de 270 °C la cual se mantuvo por 15 minutos. La temperatura del inyector fue de 300 °C, la presión de 5 psi y el flujo de columna de 1 ml/min, utilizando helio como gas acarreador. Al final de la corrida se generó el cromatograma del cual se realizaron los cálculos para conocer la concentración final de carbohidratos de cada muestra.

6.8 Análisis molecular

Para el análisis molecular se colectó tejido de raíz de *P. acutifolius* y *P. vulgaris*, el cual fue sometido a estrés salino por un lapso de 1, 3, 5, 24 y 120 horas. El tejido se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a - 80° C para su posterior análisis.

6.8.1 Extracción de ARN

La extracción de ARN total se realizó utilizando la metodología descrita por López-Gómez y Gómez Lim (1992). Se molió el tejido vegetal en un mortero frío utilizando nitrógeno líquido, el polvo se colocó en un tubo falcón de 15 ml al cual se le agregó 3 ml de amortiguador de extracción. Por cada gramo de tejido utilizado se le agregó 2.8 µl de 2β-mercaptoetanol. La mezcla se agitó en vortex y se incubó durante 10 minutos a 65 °C. Posteriormente, se le agregó 1/3 del volumen de acetato de potasio 5M y ¼ de volumen de etanol absoluto, con respecto al amortiguador de extracción. Nuevamente, se agitó durante 1 minuto, se agregó una cantidad volumen a volumen de cloroformo isoamílico (49:1), se agitó 1 minuto y se centrifugó 10 minutos a 14,000 rpm a 4 °C. La fase acuosa se recuperó y se le agregó una cantidad equivalente de fenol/cloroformo isoamílico (1:1). Ésta se agitó durante 1 minuto y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones. Finalmente, se adicionó cloroformo isoamílico (49:1), se recuperó la

fase acuosa y se le agregó 1/3 de cloruro de litio 9M con respecto al volumen recuperado. Se dejó precipitando toda la noche a -20 °C y se centrifugó 30 minutos a 14,000 rpm, se tiró el sobrenadante y se secó la pastilla. Esta última se resuspendió en agua destilada estéril.

6.8.2 Electroforesis y medición de concentración de ARN

Para determinar la calidad y la cantidad de ARN extraído de raíz, se corrieron las muestras en geles de agarosa al 1% por electroforesis. Los geles se colocaron en una cámara de electroforesis (Owl Separation Systems™) y se sumergieron en amortiguador TAE 1X. Las muestras se mezclaron con amortiguador de carga y se colocaron en los carriles del gel. El corrimiento electroforético se realizó mediante la aplicación de corriente eléctrica de 60 voltios durante una a dos horas.

Después del corrimiento de las muestras en el gel, éstas se verificaron en un transiluminador de luz ultravioleta (MacroVue UVis-20). Para evaluar la concentración de ARN del extracto se utilizó un espectrofotómetro (spectometer jenway) a una absorbancia de 260 y 280nm de luz ultravioleta. Con los datos obtenidos se sustituyó a la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Densidad óptica a (260nm)} \times (40) \times (\text{dilución})}{1000} \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Realizado lo anterior se calculó una concentración de 15 µg/µl de muestra para posteriormente realizar el gel desnaturalizante, para la transferencia de ARN a la membrana.

6.8.3 Gel desnaturalizante para ARN

Para realizar los ensayos tipo Northern, se utilizó la metodología descrita por Ausubel y colaboradores (1999). Se preparó 100 ml de gel de agarosa al 1% conteniendo 2.2 M de formaldehído. Se agregó 1g de agarosa a 72 ml de agua destilada estéril, la agarosa se fundió, se dejó enfriar el gel a una temperatura de 55 °C y se le agregó 10 ml de MOPS 10X y 18 ml de formaldehído y se dejó solidificar. El ARN se preparó de forma independiente en tubo eppendorf de 1.5 ml y se le agregó 15 µg/µl 2 µl MOPS 10X, 4 µl Formaldehído y 10 µl NN dimetil formamida.

El ARN se incubó durante 15 minutos a 65 °C, después 1 minuto en hielo y se le agregó 1 µl de bromuro de etidio y 3 µl de amortiguador de carga, se cargaron las muestras en el gel antes descrito, se corrieron las muestras a 60 volts por 2 horas en amortiguador MOPS 1X.

6.8.4 Transferencia de ARN a membrana

El ARN desnaturalizado se transfirió a una membrana de nylon Hybond-N+; en un recipiente se colocó una esponja con amortiguador SSC 10X, se hizo una plataforma con papel filtro whatman[®] 3MM del tamaño del gel saturados con la misma solución y sobre la esponja se colocó el papel filtro y el gel. Inmediatamente se colocó la membrana Hybond-N+ humedecida con la misma solución, se eliminaron las burbujas y se colocaron 2 hojas Whatman húmedas. Después se colocaron hojas absorbentes haciendo una columna de 7cm de alto sobre el gel. Se colocó 1kg de peso sobre la columna y se dejó transfiriendo por 16 horas. Concluido el tiempo, el gel se observó en luz UV para asegurarse que el ARN se haya transferido correctamente. Posteriormente, se fijó el ARN en la membrana mediante luz ultravioleta, en un spectrolinker XL-1000 UV crosslinker (Spectronics corporation) y en optimal croslinker por ambos lados de la membrana. Finalmente la membrana se almacenó a -20 °C.

6.8.5 Purificación de sonda (geneclean kit)

Para marcar la sonda radioactiva, se purificó el producto de la digestión con las enzimas Eco R1 y Hind III. La digestión se corrió en gel de agarosa, se cortó la banda del gel y se colocó en un tubo Eppendorf. Asimismo, se pesó para determinar el volumen aproximado del gel (cada 0.1g equivale a 100 μ l) y se adicionaron 3 volúmenes de NaI, de acuerdo al peso obtenido de la banda. El tubo se colocó en un "thermoblock" a 55 °C por 5 minutos aproximadamente para disolver la agarosa. De acuerdo al volumen final se adicionaron de 5-10 μ l de Glassmilk para que el ADN se adhiriera al mismo. Después de haber adicionado el Glassmilk a la solución, se mezcló y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Al término de la incubación se centrifugó por 5 segundos a 12 000 rpm y se removió el sobrenadante. Se lavó 3 veces la "pastilla" con 500 μ l de New Wash amortiguador, centrifugando entre cada lavado a 12 000 rpm por 5 segundos y se eliminaron los restos de líquido en el tubo. La sonda se eluyó con agua destilada en un volumen igual al del Glassmilk (5-10 μ l) y se centrifugó tres veces a 12 000 rpm por 30 seg y se recuperó el sobrenadante.

6.8.6 Preparación de columnas empacadas para purificación de sonda radioactiva.

Preparación del gel de empaque. En un tubo falcón de 15 ml se colocó biogel hasta la marca de 3 ml (polyacrilamide beads, Biorad Laboratories) y se adicionó gradualmente agua destilada estéril para disolver el gel, hasta que se logró la consistencia deseada.

Es necesario eliminar la marca radioactiva no incorporada de la sonda para lo cual se emplearon las siguientes columnas: Columnas: se perforaron tubos Eppendorf de 500 μ l por la parte inferior utilizando una aguja caliente y se colocó una pequeña cantidad de esferas de vidrio (425-600 micrones) a las cuales se le agregaron 500 μ l de biogel. El tubo (columna) se introdujo en un tubo Eppendorf

de 1.5 ml y se centrifugó 2 minutos a 2,000 rpm para eliminar el exceso de agua. Este se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.8.7 Prehibridación de membranas

Las membranas de nylon que se obtuvieron para los ensayos tipo Northern se humedecieron 15 minutos en amortiguador SSC 2X, después de este tiempo se enrollaron con el ARN hacia dentro y se introdujeron en el tubo que contiene la solución de hibridación, eliminando las burbujas de aire entre las membranas y las paredes del tubo. El tubo se colocó en un horno a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ (temperatura de hibridación) con rotación y se dejó prehibridando de 1 a 2 h.

6.8.8 Marcaje de sonda homóloga complementaria

La sonda que se utilizó en el marcaje fue la purificada, la cual se marcó radiactivamente con el Kit Prime-a-Gene Labeling System. El ADN (sonda) se desnaturalizó con agua 5 minutos a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ y después se colocó en hielo por 5 minutos. Se preparó la mezcla siguiente: 31 μl agua libre de nucleasas, 10 μl de Labeling amortiguador 5X, 2 μl mix dNTPs, 3 μl ADN (sonda), 2 μl BSA, 1 μl dCTP [$\alpha^{32}\text{P}$] y 1 μl de enzima Klenow. La mezcla se incubó 1 h a temperatura ambiente y después del tiempo de incubación se agregó 50 μl de agua destilada estéril. Se colocaron los 100 μl de la sonda en una columna previamente calibrada para purificar la sonda, se centrifugó 2 minutos a 2,000 rpm a temperatura ambiente y el recuperado es la sonda purificada. A esta se le agregó 200 μl de agua destilada estéril y se desnaturalizó 5 minutos a 95°C y 5 minutos en hielo. Posteriormente, se le agregó al tubo de hibridación con las membranas y se dejó hibridando toda la noche.

6.8.9 Lavado de membranas hibridadas

El lavado de membranas se hace con el objetivo de quitar toda la sonda radioactiva que no hibridó, las membranas se transfirieron a un recipiente que contenía amortiguador de baja astringencia. Se realizaron 2 lavados a 15 °C y agitación durante 20 minutos. Se realizó un lavado más con amortiguador de alta astringencia en las mismas condiciones anteriores. Se midió la cantidad de radioactividad con un contador Geiger (TBM – 15, Technical associates). Las membranas se extendieron sobre una placa de revelado (usada) con el ARN hacia arriba y se envolvió con plástico auto-adherente y se colocó en un cassette de exposición con una película de revelado nueva (KONICA X-Ray Film) en un cuarto oscuro. El cassette se expuso a – 80 °C por el tiempo necesario (3-5 días) de acuerdo al tiempo de vida media de la radioactividad. Después del tiempo de exposición transcurrido, las placas se revelaron en un cuarto oscuro.

6.8.10 Revelado de películas.

Después de que la placa se expuso a la radioactividad, se reveló en un cuarto oscuro de la siguiente manera: se sacó la placa y se introdujo en una charola con solución reveladora en agitación durante 2 minutos, se escurrió y se introdujo en una charola con agua en agitación durante 1 minuto para enjuagarla. Se escurrió y se introdujo en una charola con solución fijadora en agitación durante 2 minutos, se sacó y dejó secar.

6.9 Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se diseñó con cuatro tratamientos, tres correspondientes al agobio salino (30, 60 y 90 mM NaCl) y el control (0 mM NaCl). La selección de los tratamientos salinos correspondió a la amplitud de respuesta de sensibilidad/tolerancia del frijol previamente determinadas (Bayuelo-Jiménez y col., 2003). Se empleó un diseño experimental de bloques completamente al azar con un arreglo de tratamientos de parcelas divididas y cuatro repeticiones. Los niveles de sal correspondieron a la parcela principal y los genotipos, distribuidos

aleatoria mente dentro de cada parcela, correspondieron a las subparcelas. Para la comparación de medias de los tratamientos se utilizó la prueba de Duncan, con una probabilidad de $P \leq 0.05$. Se utilizó con el paquete estadístico SAS (SAS 2000 Institute, Inc.).

7 RESULTADOS

7.1 Crecimiento vegetal (biomasa aérea y radical)

Los tratamientos salinos ocasionaron un efecto significativo en el número de hojas, área foliar, peso seco de raíz y vástago y relación raíz: vástago (Cuadro 6). Asimismo, las diferencias entre especies y las interacciones entre especies y tratamientos salinos para número de hojas, área foliar, peso seco de raíz y vástago y relación raíz: vástago también fueron altamente significativas (Cuadro 6). En las especies silvestres y cultivadas de *Phaseolus*, la salinidad inhibió en mayor grado el crecimiento del vástago que el de la raíz (Cuadro 6). El peso seco del vástago disminuyó significativamente en todas las accesiones y niveles de estrés salino excepto en *P. filiformis*. En esta especie se presentó un incremento de materia seca a 30 mM NaCl (69 %) y una reducción del 23 % con 60 y 90 mM NaCl, respectivamente. El peso seco de la raíz disminuyó significativamente a partir de 60 mM NaCl en todas las accesiones excepto en *P. filiformis*, la cual no presentó reducción del crecimiento radical en ninguna de las concentraciones de NaCl ni duración del estrés (Cuadro 6). A mayor concentración de salinidad, la relación raíz: vástago aumentó en todas las accesiones excepto en *P. acutifolius* sensible. Nuevamente, dicha relación aumenta a mayor concentración de NaCl y duración del estrés en *P. filiformis*.

El efecto de la salinidad en el número de hojas y área foliar fue similar al obtenido para peso seco del vástago en todas las accesiones (Cuadro 6). El número de hojas disminuyó significativamente a mayor concentración de NaCl y duración del estrés, promoviendo así una disminución en el área foliar en todas las accesiones, excepto en *P. filiformis*. En esta accesión se presentó una mayor área foliar a 30 mM NaCl que a 0 mM NaCl. A los 20 días de exposición a estrés salino, el área foliar total disminuyó de 28 a 45% a 60 mM NaCl y de 44 a 60% a 90 mM NaCl (Cuadro 6).

7.2 Tasa relativa de crecimiento y componentes

El estrés salino disminuyó significativamente la tasa relativa de crecimiento (TRC) (Cuadro 7). Las diferencias en la TRC entre las plantas sometidas a estrés salino y el control fueron evidentes después de los 20 días de exposición al estrés salino. Entre especies, la TRC de las plantas del tratamiento sin estrés salino varió de 0.10 a 0.17 g g⁻¹ por día⁻¹, mientras que en las plantas sometidas a estrés salino varió de 0.07 a 0.14 g g⁻¹ por día⁻¹ (Figura 1a). En las accesiones de *P. acutifolius* silvestre (G40169) y cultivado (G40142), la TRC disminuyó con el incremento de estrés salino y mayor duración del estrés. En la accesión de *P. filiformis* silvestre (PI535309) y *P. vulgaris* cultivado (G04017), la TRC no disminuyó significativamente a mayor concentración y duración del estrés (Figura 1a).

La tasa de asimilación neta (TAN) disminuyó significativamente a mayor concentración de NaCl (Cuadro 7). La reducción de TAN siguió una tendencia similar a la TRC excepto que la reducción de la TAN fue mayor a 90 mM NaCl en todas las accesiones excepto en *P. filiformis*, cuya TAN se mantuvo similar al control en todos los tratamientos salinos y aumentó en 36 % en 90 mM de NaCl (Figura 1b).

El estrés salino disminuyó la tasa de área foliar (TAF) en las accesiones cultivadas de *P. acutifolius* (G40142) y *P. vulgaris* (G04017) (Figura 1c) pero se mantuvo inalterable en las accesiones silvestres a mayor concentración salina (Figura 1c). TAF es el producto de un componente morfológico (AFE, área foliar específica; relación de área y peso foliar) y la fracción del peso seco total de la planta asignado a las hojas (RPF, relación de peso foliar). RPF se mantuvo inalterable en todas los tratamientos salinos, mientras que el AFE disminuyó significativamente a mayor concentración de NaCl en las accesiones cultivadas de *Phaseolus* pero no así para las accesiones silvestres de *P. acutifolius* y *P. filiformis* (Figura 1d, 1e). La correlación de TAN y TRC fue altamente significativo en los tratamientos salinos en todas las especies cultivadas y silvestres, el promedio del

coeficiente de correlación fue de ($r^2 = 0.85 - 0.95$). La RPF se correlacionó significativamente con TRC en las especies silvestres en el tratamiento control ($r^2 = 0.91$), y en tratamientos salinos solo se correlacionó una de las especies silvestres *P. acutifolius* G40169 ($r^2 = 0.45$). El AFE no se correlacionó con TRC en los tratamientos salinos. Se encontró una alto grado de correlación entre TRC y carbohidratos totales en raíz de *P. filiformis* ($r^2 = 0.48$), también con carbohidratos totales de tallo en *P. acutifolius* G040142 ($r^2 = 0.54$) y finalmente la correlación entre TRC y carbohidratos totales de hoja en *P. vulgaris* G04017 fue de ($r^2 = 0.40$). Para esta especie la TRC se correlacionó con el potencial osmótico ($r^2 = 0.56$) en los tratamientos salinos.

7.3 Fotosíntesis y conductancia estomática

La salinidad y duración del estrés salino afectaron significativamente la conductancia estomática y la tasa de asimilación de CO₂. La interacción entre salinidad y especie también fue significativa indicando que las especies difieren en sus respuestas al estrés salino (Cuadro 8). La salinidad redujo la conductancia estomática y la tasa de asimilación de CO₂ a medida que aumentó la concentración salina, mostrando reducciones significativas a 60 y 90 mM NaCl (Figura 2d). En condiciones controladas, la conductancia estomática de las accesiones cultivadas de *P. vulgaris* fue una de las mayores en comparación con las accesiones restantes. Sin embargo, esta accesión fue la más susceptible al estrés salino, mostrando un porcentaje de reducción del 26 % a 90 mM NaCl. Por el contrario, en *P. filiformis* no se presentó reducción de la conductancia estomática a mayor estrés salino.

La tasa de asimilación de CO₂ disminuyó marcadamente en las accesiones silvestres y cultivadas de *P. acutifolius* a 60 mM NaCl, mientras que en *P. vulgaris* disminuyó significativamente a 90 mM NaCl (Figura 2a). La tasa de asimilación de CO₂ de *P. filiformis*, por el contrario, se mantuvo constante en todos los tratamientos salinos y durante todo el periodo de estrés salino. En el resto de las accesiones, se presentó un incremento del 15 al 40 % en la tasa fotosintética a 30

mM NaCl. Posteriormente, las reducciones en la tasa fotosintética aumentaron en función del nivel de salinidad. La conductancia estomática exhibió un patrón similar al de la tasa fotosintética. A los 15 y 20 días, la conductancia estomática disminuyó hasta un 60 % en todas las accesiones excepto en *P. filiformis*. La correlación de fotosíntesis (A) y conductancia estomática (gs) fue significativa en el control para todas las especies, el grado de correlación entre ambas variables fue de ($r^2 = 0.62$ a 0.83). Y sólo en *P. filiformis* PI535309 a 90 mM de NaCl fue altamente significativa ($r^2 = 0.89$). Además se encontró correlación significativa entre A, gs y TRC en *P. acutifolius* G40169 ($r^2 = 0.42$ y 0.47) respectivamente.

7.4 Relaciones hídricas

La salinidad afectó significativamente el potencial hídrico, osmótico y de turgor (Figura 3a, b, c). Las diferencias entre accesiones silvestres y cultivadas fueron altamente significativas en todos los tratamientos salinos (Cuadro 8). En general, el potencial hídrico de las accesiones silvestres de *P. acutifolius* G40169 y *P. filiformis* PI535309 fue mayor a 0, 30, 60 y 90 mM NaCl comparado con las accesiones cultivadas. La salinidad disminuyó el potencial osmótico en todas las accesiones pero las diferencias entre éstas sólo se observaron a 90 mM de NaCl. *P. filiformis* nuevamente fue la única especie que alcanzó el mayor potencial osmótico (-1.13 MPa) a 90 mM de NaCl, mientras que en el resto de las accesiones, el potencial osmótico osciló entre -1.25 y -1.44 MPa (Cuadro 8). El potencial de turgor se mantuvo constante hasta los 30 mM NaCl y aumentó significativamente a 60 y 90 mM de NaCl en todas las accesiones excepto en *P. vulgaris* cultivado (Figura 3a). El potencial hídrico declinó significativamente durante los primeros 15 días de tratamiento salino (-0.26 a -0.63 MPa) y posteriormente se mantuvo constante hasta 90 mM de NaCl, en donde disminuyó en mayor grado. La duración del estrés salino incidió en el potencial osmótico, el cual disminuyó en mayor grado a los 15 y 20 días de duración del estrés (-1.13 a -1.53 MPa). Lo anterior, se reflejó en el potencial de turgor, mismo que incrementó a 90 mM de NaCl, particularmente para las accesiones silvestres de *Phaseolus*.

7.5 Carbohidratos totales

El contenido de carbohidratos totales de hoja, tallo y raíz fue afectado significativamente por el efecto del NaCl y la especie (Cuadro 9). Sin embargo, la interacción accesión y salinidad solo fue significativa para el tallo. Se presentó un incremento de carbohidratos totales en hojas y tallos a mayor concentración de NaCl en todas las accesiones de *Phaseolus* spp. En particular, las accesiones silvestres *P. acutifolius* G40169 y *P. filiformis* PI535309 alcanzaron la mayor concentración de carbohidratos totales en tallo a 60 y 90 mM NaCl comparada con el resto de las accesiones, mientras que la accesión cultivada de *P. acutifolius* G40142 presentó mayor acumulación en hojas (Figura 4a-b). En raíz, la concentración de carbohidratos totales se mantuvo constante en todos los tratamientos salinos excepto en *P. acutifolius* G40142, la cual disminuyó a 90 mM NaCl (Figura 4c).

El contenido de carbohidratos totales (CHO) incrementó en función del periodo de estrés salino. A los 15 y 20 días de exposición a salinidad, el incremento de CHO a 90 mM NaCl fue mayor en hojas que en tallos (Figuras 5a-b). El incremento del contenido de CHO en hojas con respecto al control osciló entre el 11 y 33 % y del 65 al 133 % a los 15 y 20 días, respectivamente. En el tallo se presentó una acumulación de CHO de 28 a 33 % y entre el 16 y 75 %, dentro periodo y concentración salina señalada. Para el contenido de carbohidratos totales de la raíz, no se registraron diferencias significativas en el patrón de acumulación excepto en *P. filiformis* PI535305, el cual mostró un incremento del 27 y 48 % de CHO a 15 y 20 días respectivamente (Figura 5c).

7.6 Carbohidratos solubles

El estrés salino indujo modificaciones en el contenido de carbohidratos solubles de hojas, tallo y raíz de *Phaseolus* spp. El contenido de glucosa, inositol y galactosa varió significativamente en función de una mayor concentración y duración del estrés salino. En comparación al control, todas las accesiones que fueron tratadas durante 15 días a concentraciones de 60 y 90 mM NaCl mostraron

un incremento del 60 al 92 % y 76 al 89 % en el contenido de glucosa en hojas, respectivamente (Cuadro 10). En 90 mM NaCl, el contenido de glucosa en tallos y raíces aumentó del 43 al 47 % y 52 al 58 % en *P. filiformis* PI535309 y *P. vulgaris* G04017, respectivamente (Cuadro 10). El contenido de inositol de hojas presentó un patrón similar que el de la glucosa con incrementos del 50 al 66 % y 75 al 90 % (Cuadro 10). En *P. filiformis* PI535309 y *P. vulgaris* G04017, el contenido de galactosa de hojas se incrementó en 90 y 82 %. Similarmente, en *P. filiformis* PI535309 se registró un incremento del 87 % en el contenido de galactosa de raíz a 90 mM NaCl (Cuadro 11). El contenido de xilosa y manosa se encontró solo en pequeñas cantidades en todas las accesiones y niveles de estrés salino excepto un incremento del 86 % en el contenido de xilosa de hojas de *P. acutifolius* G40142 (Cuadro 10).

7.7 Expresión del gen *PVPTP1* en raíz de *P. vulgaris*

Con la finalidad de conocer si el agobio salino induce la expresión del gen *PVPTP1* en tejido de raíz de *P. vulgaris* y *P. acutifolius* se realizó un ensayo tipo Northern Blot utilizando ARN total, se utilizó una sonda homóloga complementaria con marca radioactiva. El cual no presento alguna señal de expresión del gen en ninguno de los tratamientos (0, 30, 60 y 90 mM de NaCl) ni en los diferentes tiempos del muestreo (Figura 5). Incluso a menor temperatura de hibridación 50° C tampoco se observó señal. No se realizó el ensayo tipo Northern blot para *P. filiformis* debido a la poca cantidad de tejido que presentaba esta especie.

Cuadro 6. Efecto del NaCl en el número de hojas, área foliar, peso seco de tallo, peso seco de raíz y relación raíz: vástago de *Phaseolus* spp. durante un periodo de 20 días de exposición a diferentes concentraciones de NaCl.

NaCl (mM)	Número de hojas	Área foliar (cm ² planta ⁻¹)	Peso seco vástago (g)	Peso seco raíz (g)	Relación Raíz: vástago
<i>P. acutifolius</i> G40169					
0	15.33	902.01	0.95	0.58	0.61
30	12.16	622.79	0.83	0.40	0.48
60	9.58	507.68	0.54	0.34	0.62
90	8.83	440.78	0.43	0.22	0.51
LSD _{0.05}	2.05	189	0.2	0.28	0.06
<i>P. filiformis</i> PI535309					
0	6.41	155.15	0.13	0.04	0.31
30	6.91	148.51	0.22	0.08	0.36
60	5.33	111.81	0.10	0.04	0.40
90	4.83	86.15	0.10	0.05	0.50
LSD _{0.05}	1.27	46.76	0.13	0.06	0.04
<i>P. acutifolius</i> G40142					
0	13.40	1321.19	1.47	0.62	0.42
30	11.16	1007.88	1.25	0.55	0.44
60	8.75	802.28	1.15	0.59	0.51
90	8.16	583.18	0.83	0.36	0.43
LSD _{0.05}	1.92	83.69	0.16	0.13	0.05
<i>P. vulgaris</i> G04017					
0	6.33	1713.41	1.33	0.63	0.47
30	4.91	1097.80	1.06	0.56	0.53
60	4.50	932.51	0.84	0.49	0.58
90	3.91	683.20	0.75	0.42	0.56
LSD _{0.05}	0.39	298	0.17	0.15	0.04
ANOVA					
NaCl	96.3***	84.5***	41.6***	9.8**	-
Especies	82.7***	197.2***	204.8***	54.4***	-
NaCl x Especies	2.5*	8.3***	3.8***	1.6*	-

Las medias son valores promedio de cuatro repeticiones. LSD es la diferencia mínima significativa para cada variable a una $P \leq 0.05$.

Cuadro 7. Análisis de varianza para la tasa relativa de crecimiento y componentes de *Phaseolus* spp. a 20 días de exposición a estrés salino.

TRC: Tasa relativa de crecimiento; TAN: Tasa de asimilación neta; Tasa de área

Fuente de Variación	TRC	TAN	TAF	RPF	AFE
NaCl	12.92 **	1.68 ^{ns}	10.55 **	0.18 ^{ns}	6.01 *
Especie	2.23 ^{ns}	2.40 ^{ns}	5.43 **	13.85 ***	7.19 ***
NaCl*Especie	1.45 ^{ns}	1.57 ^{ns}	2.64 *	0.70 ^{ns}	1.52 ^{ns}
CV	26.19	41.04	13.87	9.7	17.55

foliar; RPF: Relación de peso foliar; AFE: Área foliar específica. CV: coeficiente de variación; ^{ns}: no significativo; * Significativo a $P \leq 0.05$; ** Significativo a $P \leq 0.001$; *** Significativo a $P \leq 0.0001$.

Cuadro 8. Análisis de varianza para el potencial hídrico, osmótico y de turgor, tasa de asimilación de CO₂ y conductancia estomática, de *Phaseolus* spp. después de 20 días de exposición a estrés salino.

Fuente de variación	Potencial (Ψ)				
	hídrico	osmótico	turgor	A	gs
NaCl	8.48**	126.60***	29.11***	26.53***	15.55***
Especie	152.08***	8.53***	43.42***	32.54***	22.82***
NaCl x Especie	7.93***	2.70*	3.25**	3.61**	1.79 ^{ns}

A: Asimilación de CO₂ y gs: conductancia estomática. ^{ns}: no significativo; * Significativo a $P \leq 0.05$; ** Significativo a $P \leq 0.001$; *** Significativo a $P \leq 0.0001$.

Cuadro 9. Análisis de varianza para carbohidratos totales en hoja, tallo y raíz de *Phaseolus* spp. después de 20 días de exposición a estrés salino.

Fuente de variación	Carbohidratos totales		
	Hoja	Tallo	Raíz
NaCl	27.91 ***	8.16 *	7.15 *
Especie	15.40 ***	25.28 ***	8.47 ***
NaCl x Especie	0.74 ^{ns}	3.02 *	0.60 ^{ns}

^{ns}: no significativo; * Significativo a $P \leq 0.05$; ** Significativo a $P \leq 0.001$; *** Significativo a $P \leq 0.0001$.

Cuadro 10. Contenido de carbohidratos solubles en hojas de *Phaseolus* spp. a diferentes concentraciones de NaCl. Después de 20 días de cultivo.

	Carbohidratos solubles mg g ⁻¹ peso fresco					%
NaCl (mM)	Glucosa	Inositol	Xilosa	Galactosa	Manosa	CHO
<i>P. acutifolius</i> G40169						
0	0.27 a	0.24 b	Tr	0.06 a	0.02 a	1.0
60	0.28 a	0.55 a	Tr	0.04 a	0.06 a	1.1
90	0.31 a	0.46 a	Tr	0.04 a	0.03 a	0,8
<i>P. filiformis</i> PI535309						
0	0.05 b	0.01 b	0.01 a	0.01 b	Tr	0.1
60	0.63 a	0.26 a	0.05 a	0.12 a	Tr	1.4
90	0.48 a	0.10 a	0.03 a	0.17 a	Tr	1.0
<i>P. acutifolius</i> G40142						
0	0.35 b	0.20 b	0.03 b	0.04 a	Tr	1.0
60	0.31 b	0.40 b	0.05 b	0.06 a	Tr	1.0
90	1.60 a	0.81 a	0.21 a	0.08 a	Tr	3.0
<i>P. vulgaris</i> G04017						
0	0.10 b	0.10 b	0.01 a	0.12 a	Tr	0.5
60	0.25 b	0.29 b	0.03 a	0.13 a	Tr	0.9
90	0.42 a	0.56 a	0.03 a	0.22 a	Tr	1.4
ANOVA						
Especies	14.47***	11.42**	13.88**	8.28**	-	-
NaCl x Especie	11.92***	3.76*	8.59**	2.07 ^{ns}	-	-

(-): no medido; ^{ns} no significativo * Significativo a $P \leq 0.05$; ** Significativo a $P \leq 0.001$; *** Significativo a $P \leq 0.0001$; Tr: Traza; % CHO: porcentaje de contribución de carbohidratos al potencial osmótico. Las medias son valores de cuatro repeticiones y las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos a $P \leq 0.05$.

Cuadro 11. Contenido de carbohidratos solubles en tallo de *Phaseolus* spp. a diferentes concentraciones de NaCl. Después de 20 días de cultivo.

	Carbohidratos solubles mg g ⁻¹ peso fresco					%
NaCl (mM)	Glucosa	Inositol	Xilosa	Galactosa	Manosa	CHO
<i>P. acutifolius</i> G40169						
0	0.25 a	0.06 a	Tr	0.06 a	0.02 a	0.68
60	0.34 a	0.14 a	Tr	0.04 a	0.01 a	0.65
90	0.18 a	0.20 a	Tr	0.01 a	0.01 a	0.40
<i>P. filiformis</i> PI535309						
0	0.25 b	0.02 a	0.02 a	0.04 b	Tr	0.56
60	0.30 b	0.05 a	0.04 a	0.30 a	Tr	0.89
90	0.44 a	0.05 a	0.02 a	0.30 a	Tr	0.99
<i>P. acutifolius</i> G40142						
0	0.22 a	0.23 a	0.04 a	0.05 a	Tr	0.89
60	0.23 a	0.29 a	0.02 a	0.05 a	Tr	0.72
90	0.16 a	0.14 a	0.01 a	0.03 a	Tr	0.39
<i>P. vulgaris</i> G04017						
0	0.24 c	0.24 a	0.02 a	0.07 a	Tr	0.86
60	0.35 b	0.35 a	0.03 a	0.10 a	Tr	1.04
90	0.45 a	0.28 a	0.03 a	0.07 a	Tr	0.94
ANOVA						
Especies	4.70*	10.43***	0.13 ^{ns}	10.57***	-	-
NaCl x Especie	2.70*	0.85 ^{ns}	2.36 ^{ns}	3.60*	-	-

(-): no medido; ^{ns} no significativo; * Significativo a $P \leq 0.05$; ** Significativo a $P \leq 0.001$; *** Significativo a $P \leq 0.0001$; Tr: Traza; % CHO: porcentaje de contribución de carbohidratos al potencial osmótico. Las medias son valores de cuatro repeticiones y las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos a $P \leq 0.05$.

Cuadro 12. Contenido de carbohidratos solubles en raíz de *Phaseolus* spp. a diferentes concentraciones NaCl. Después de 20 días de cultivo.

	Carbohidratos solubles mg g ⁻¹ peso fresco					%
NaCl (mM)	Glucosa	Inositol	Xilosa	Galactosa	Manosa	CHO
<i>P. acutifolius</i> G40169						
0	0.12 a	0.03 a	Tr	0.02 a	0.02 a	0.31
60	0.13 a	0.06 a	Tr	0.03 a	0.01 a	0.26
90	0.12 a	0.07 a	Tr	0.02 a	0.01 a	0.21
<i>P. filiformis</i> PI535309						
0	0.08 b	0.01 a	0.01 a	0.00 b	Tr	0.17
60	0.09 b	0.03 a	0.01 a	0.03 b	Tr	0.20
90	0.19 a	0.07 a	0.03 a	0.16 a	Tr	0.55
<i>P. acutifolius</i> G40142						
0	0.06 b	0.01 b	0.02 a	0.02 a	Tr	0.17
60	0.23 a	0.11 a	0.02 a	0.04 a	Tr	0.50
90	0.06 b	0.05 b	0.01 a	0.01 a	Tr	0.15
<i>P. vulgaris</i> G04017						
0	0.06 b	0.02 b	0.02 a	0.09 a	Tr	0.28
60	0.18 a	0.20 a	0.05 a	0.17 a	Tr	0.75
90	0.15 b	0.08 b	0.02 a	0.16 a	Tr	0.45
ANOVA						
Especies	0.23 ns	4.81*	1.25 ^{ns}	15.80***	-	-
NaCl*Spp.	7.15**	4.55**	1.06 ^{ns}	3.60*	-	-

(-): no medido; ^{ns} no significativo; * Significativo a $P \leq 0.05$; ** Significativo a $P \leq 0.001$; *** Significativo a $P \leq 0.0001$; Tr: Traza; % CHO: porcentaje de contribución de carbohidratos al potencial osmótico. Las medias son valores de cuatro repeticiones y las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos a $P \leq 0.05$.

Cuadro 13. Contenido de carbohidratos solubles en hojas de *Phaseolus* spp. a diferentes concentraciones de salinidad e identificados por cromatografía de gases-espectro de masas.

NaCl (mM)	Carbohidratos solubles mg g ⁻¹ peso fresco										%	
	Xilosa	Ribosa	Sacarosa	Fructuosa	Pinitol	Ononitol	Manitol	Otros	CHO			
<i>P. acutifolius</i> G40169												
0	0.01	0.01	0.7	0.0	nd	nd	0.01					
90	0.01	0.01	5.9	0.02	nd	nd	0.08			0.05		1.5
<i>P. filiformis</i> PI535309												
0	0.0	0.02	3.46	0.0	0.0	0.0	0.06			0.02		4
90	0.01	0.01	3.73	0.0	0.2	0.09	0.03			0.17		4.1
<i>P. acutifolius</i> G40142												
0	0.03	0.0	5.4	0.02	nd	nd	0.1			0.07		6.3
90	0.11	0.3	11.2	0.04	nd	nd	0.7			0.58		10.4
<i>P. vulgaris</i> G04017												
0	0.02	0.02	0.9	0.02	nd	nd	0.05			0.04		1.5
90	0.02	0.01	7.6	0.04	nd	nd	0.19			0.16		11.4

Nd: no detectado; % CHO: Porcentaje de contribución de carbohidratos al potencial osmótico

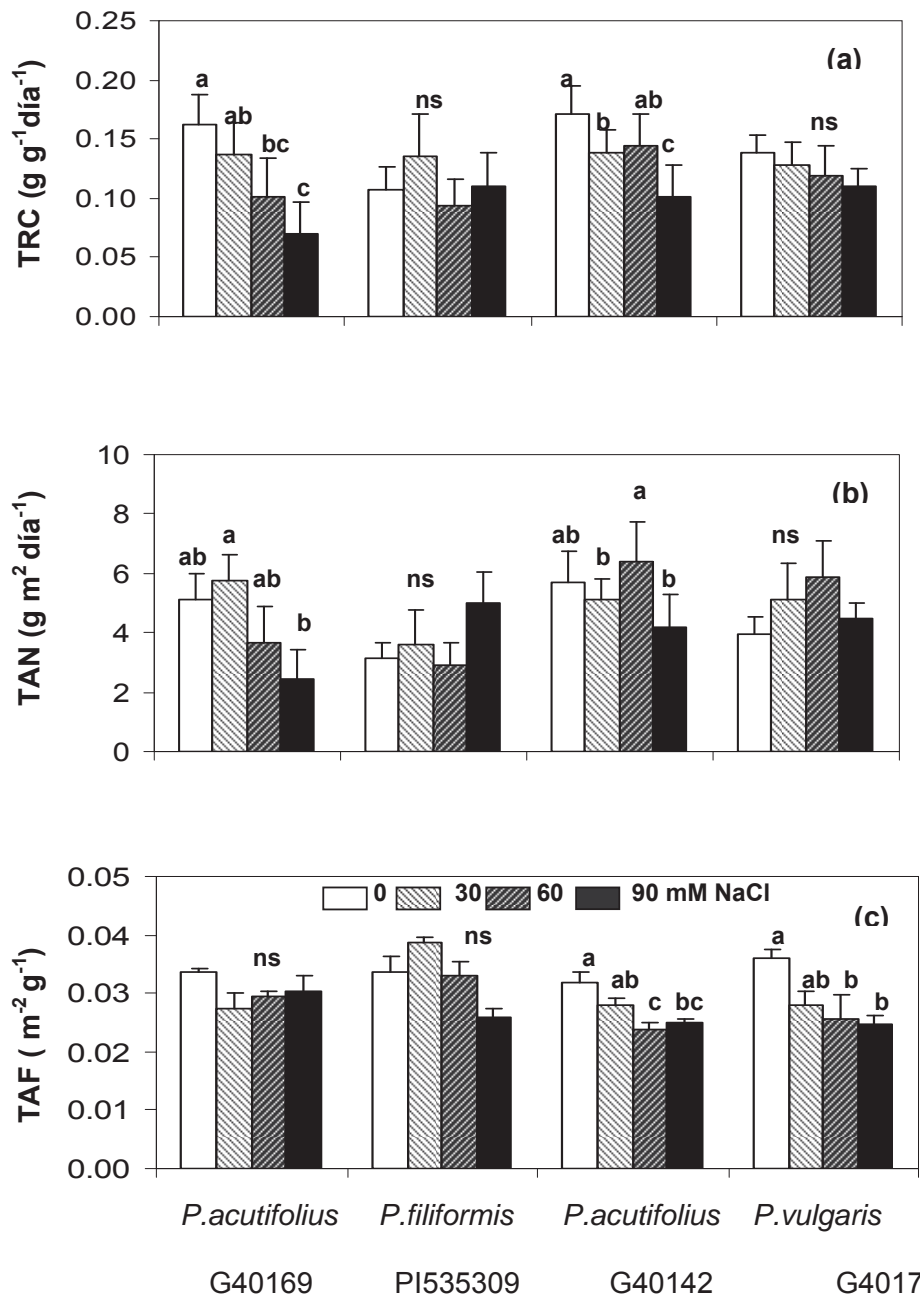


Figura 1a. Efecto del NaCl en la tasa relativa de crecimiento TRC (a), tasa de asimilación neta TAN (b) y tasa de área foliar TAF (c), de *Phaseolus*, después de 20 días de exposición a salinidad. Las barras representan el promedio de cuatro repeticiones. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas a $P \leq 0.05$.

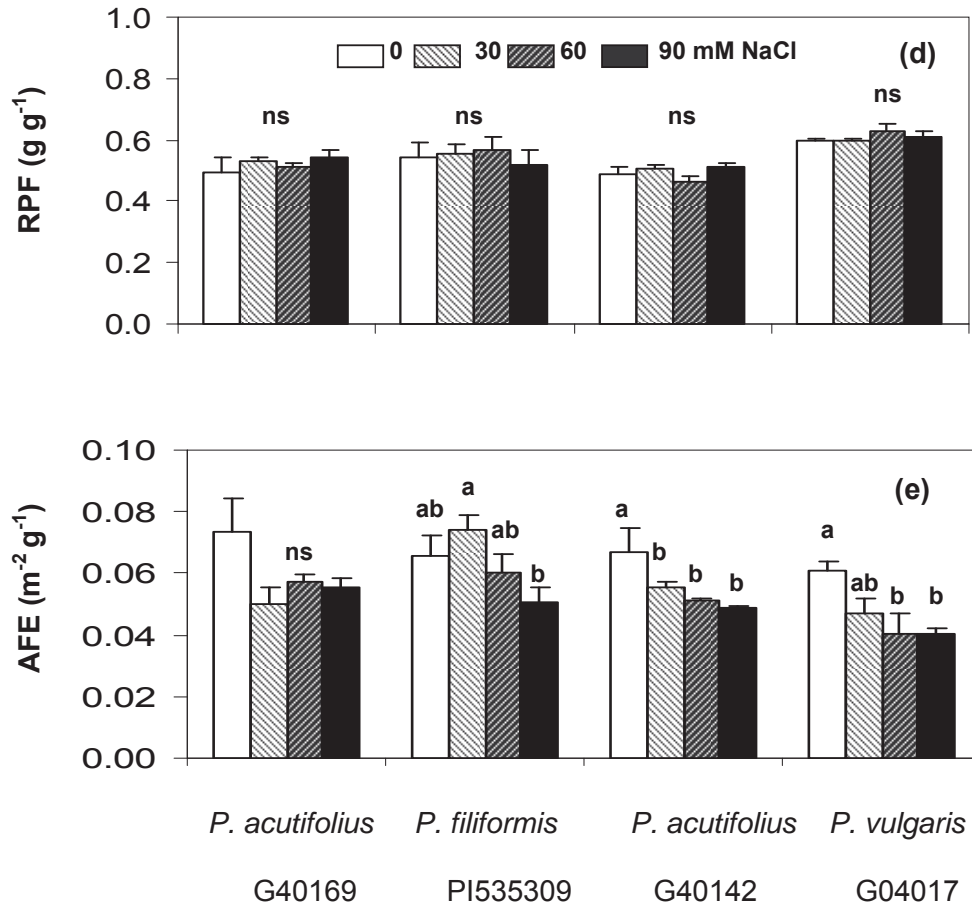


Figura 1b. Efecto del NaCl en la relación de peso foliar RPF (d) y área foliar específica AFE (e) de *Phaseolus*, después de 20 días de exposición a salinidad. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas a $P \leq 0.05$.

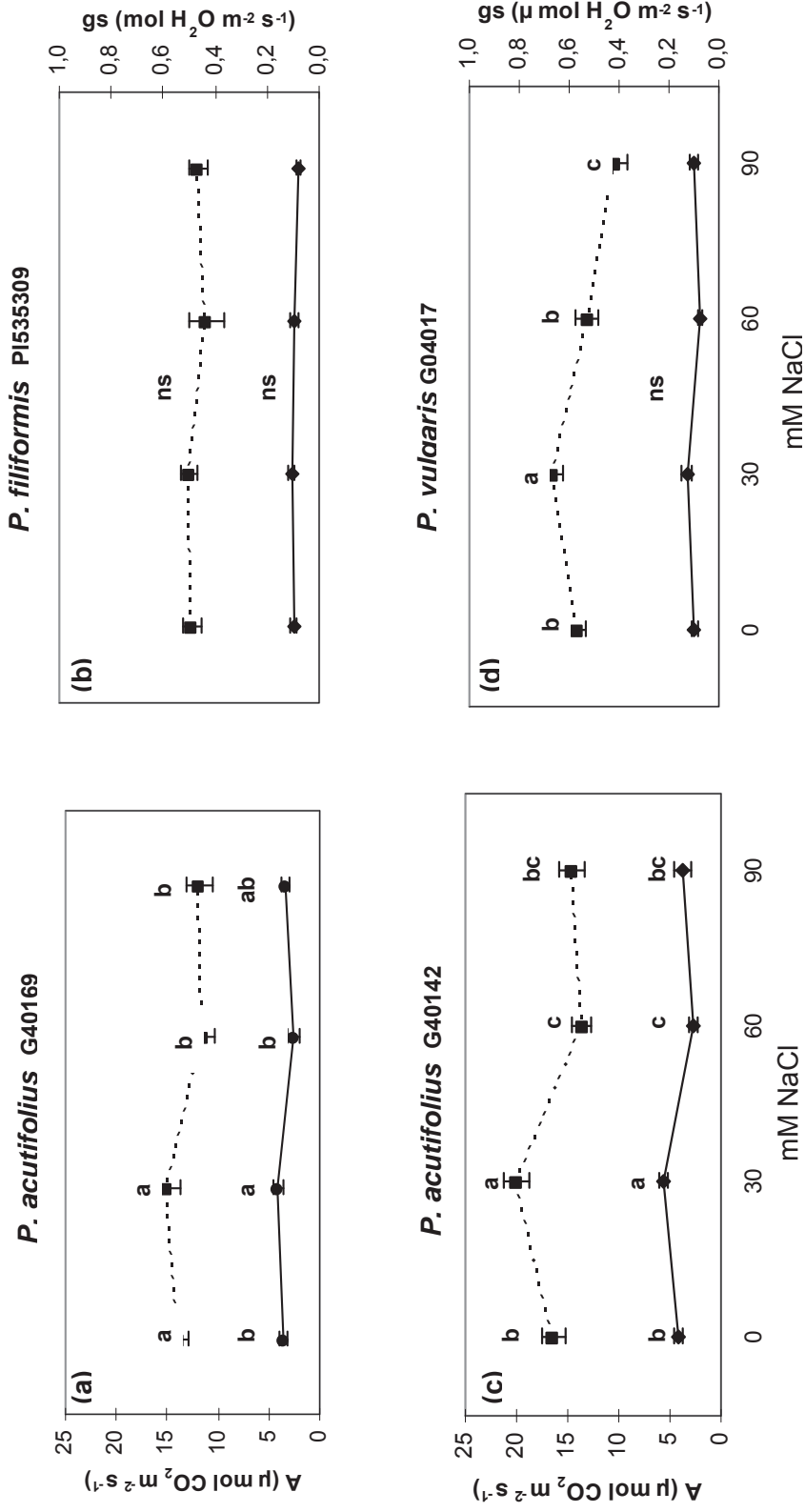
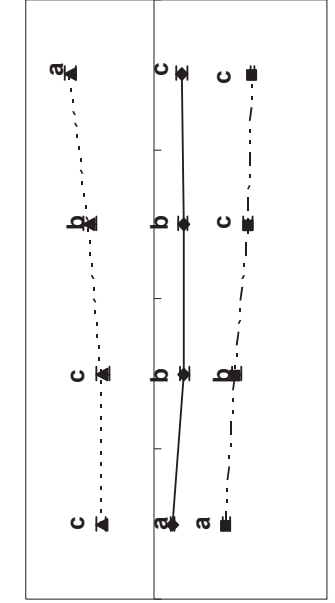
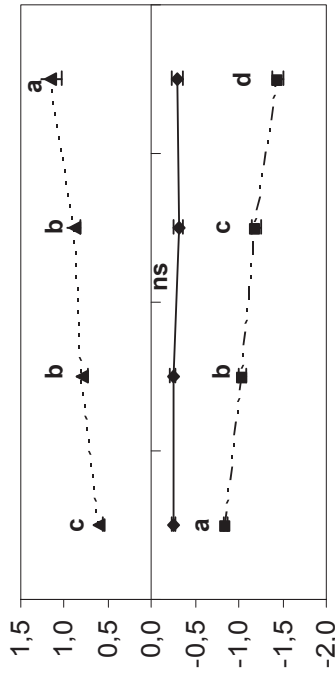


Figura 2. Efecto del NaCl en la tasa de asimilación de CO_2 (---) (eje izquierdo) y conductancia estomática (—) (eje derecho) de *Phaseolus* después de 20 días de exposición a salinidad. Las barras verticales representan el error estándar de cuatro repeticiones y las letras indican diferencias significativas a $P \leq 0.05$.

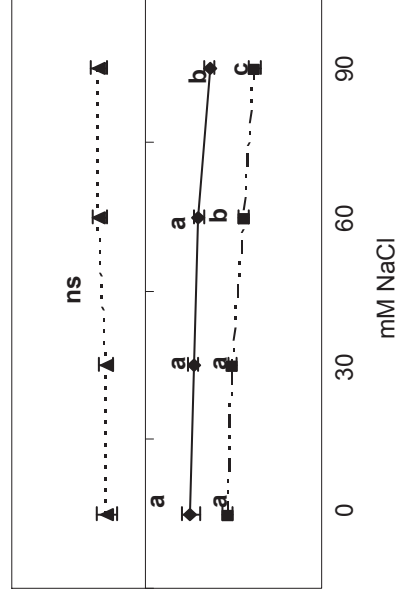
P. filiformis PI535309



P. acutifolius G40169



P. vulgaris G04017



P. acutifolius G40142

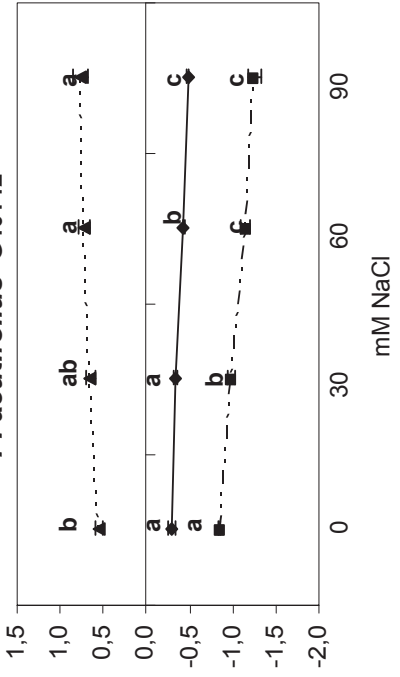


Figura 3. Efecto del NaCl en el potencial hídrico (---▲---), potencial osmótico (—◆—) y potencial de turgencia (---■---) de *Phaseolus* después de 20 días de exposición a salinidad. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas a $P \leq 0.05$.

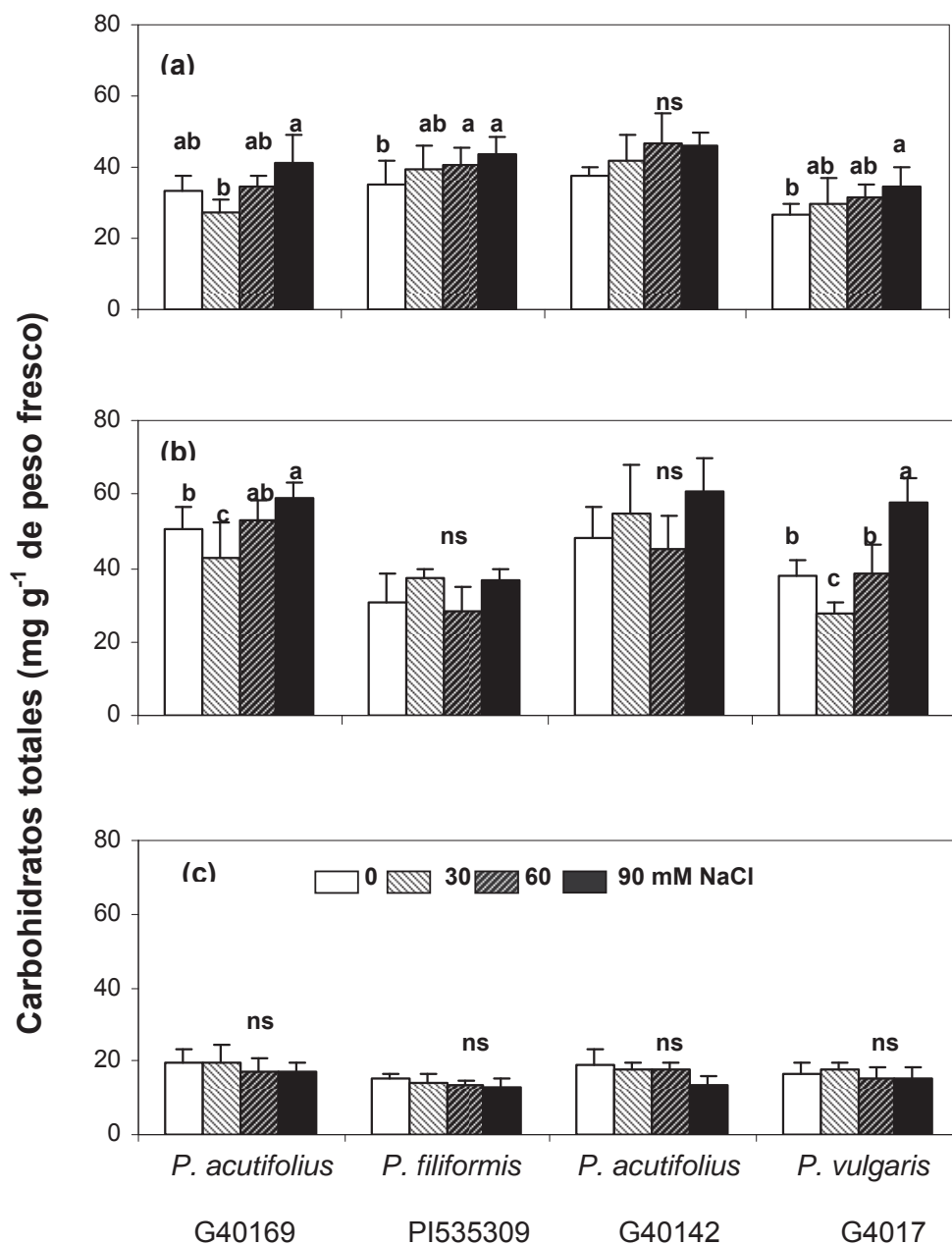


Figura 4. Efecto del agobio salino en el contenido de carbohidratos totales en hojas(a), tallo (b) y raíz (c) de *Phaseolus* spp. después de 20 días de exposición a salinidad. Las barras verticales representan el error estándar de cuatro repeticiones. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas a $P \leq 0.05$.

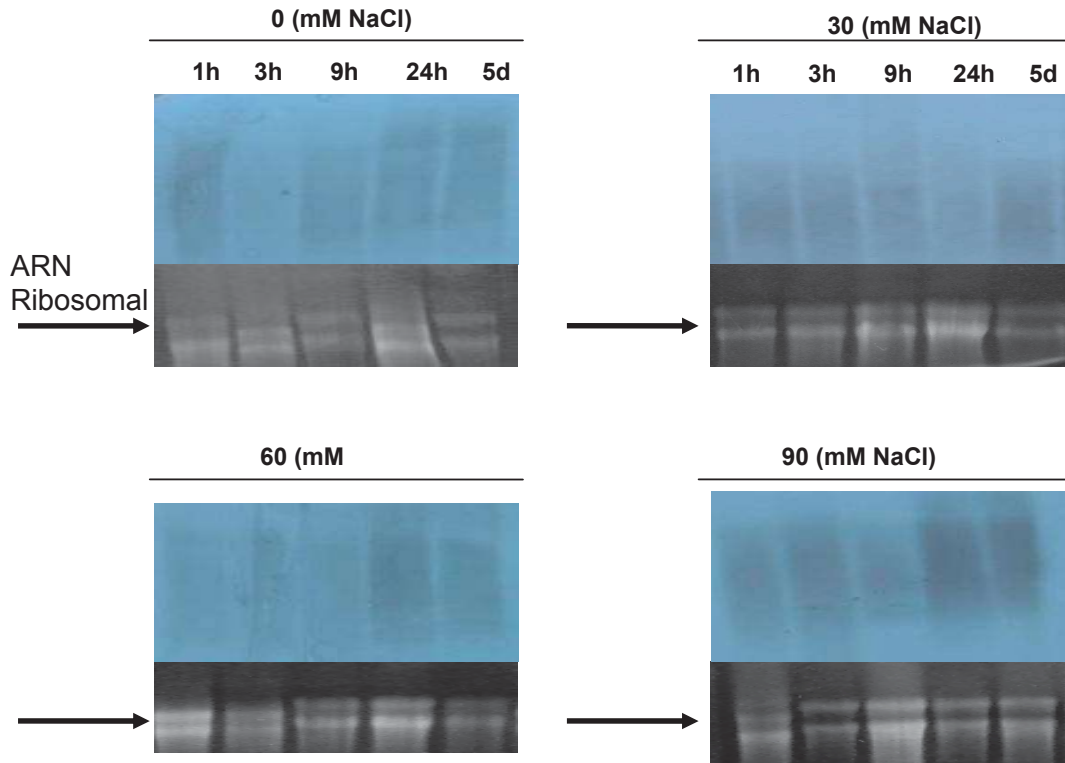


Figura 5. Ensayo tipo Northern Blot de tejido de raíz de *Phaseolus vulgaris* a concentraciones de (0, 30, 60 y 90 mM de NaCl) y a diferentes tiempos de muestreo (1, 3, 9, 24 horas y 5 días).

8 DISCUSIÓN

8.1 Crecimiento vegetal (biomasa aérea y radical)

El incremento de la concentración y duración del estrés salino influyó diferencialmente en el crecimiento de *Phaseolus* spp., lo cual se manifestó en una disminución del número de hojas, área foliar, peso seco de raíz y vástago y relación raíz: vástago (Cuadro 6). Estos resultados son similares a los reportados en *P. vulgaris* por Debouba y colaboradores (2005) y Meloni y colaboradores (2004). En *P. filiformis*, sin embargo, una concentración de 30 mM de NaCl favoreció el aumento en biomasa radical (60 %). El incremento en la acumulación de biomasa radical es una característica adaptativa que se ha relacionado, a menudo, con una mayor eficiencia en la absorción de agua y nutrientes en especies cultivadas (Zhang, 1995; Khan y col., 2000; Khan y col., 2004) y en silvestres como *P. filiformis* (Bayuelo y col., 2003).

8.2 Tasa relativa de crecimiento y componentes

La disminución en la TRC puede atribuirse a cambios en la respuesta de asimilación de CO₂ (TAN) o al área foliar (RAF) (Bayuelo y col., 2003). Los resultados del presente estudio demuestran que la disminución de la TRC de todas las accesiones excepto de *P. filiformis* se relacionó con la TAN pero no con RAF, indicando que la reducción del crecimiento en dichas accesiones se debió a una reducción de la tasa de asimilación de CO₂. El análisis de regresión lineal entre TAN y TRC demostró que la disminución de la eficacia fotosintética del follaje repercutió en la producción de materia seca en la accesión silvestre *P. acutifolius* G40169 ($R^2 = 0.93$ a 0.97) y en las accesiones cultivadas de *P. acutifolius* G40142 y *P. vulgaris* G04017 ($R^2 = 0.73$ a 0.86). Resultados similares han sido reportados por Azevedo Neto y col. (2004); Bayuelo y col., (2003), Romero y col., (1994); Sharon (2005).

La reducción de la TRC de las accesiones cultivadas también se asoció con la eficiencia en la producción de área foliar (RAF) (Fig. 1c). Aún cuando en este

estudio no se presentó una correlación significativa entre la TRC y la RAF ($R^2 = 0.35$ a 0.41), los efectos de la salinidad en las accesiones cultivadas repercutieron en una disminución de la expansión foliar. La correlación positiva 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 accesiones, es decir que esta accesión desarrolló hojas más delgadas a mayor concentración salina (Fig. 1e). De acuerdo a Baruch y Goldstein (1999), las especies que presenten una mayor AFE pueden tener una mayor TRC. Este mismo efecto se ha reportado en algunas especies de *Schinus terebinthifolius* a concentraciones moderadas de salinidad (Sharon y col., 2005). En este estudio se demostró que *P. filiformis* no presenta una TRC mayor que el resto de las accesiones pero sí mantiene inalterable dicho crecimiento a mayor concentración salina y duración del agobio (Fig. 1a). Lo anterior podría explicarse en términos de costos de construcción (carbón) de órganos foliares, el cual es menor para hojas delgadas e incrementa a mayor grosor de las mismas.

8.3 Fotosíntesis y conductancia estomática

El agobio salino promovió diferencias significativas en los parámetros de intercambio gaseoso y conductancia estomática. El cierre estomático es un mecanismo efectivo que economiza la utilización de agua en condiciones de salinidad y evita el daño por toxicidad iónica (Hasegawa y col., 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 control y durante los 20 días de duración del agobio, excepto en *P. filiformis*. De acuerdo a los resultados obtenidos, la tasa fotosintética y la conductancia estomática correlacionaron significativamente en todas las accesiones de los tratamientos no salinos ($r^2 = 0.91$ a 0.95) y salinos ($r^2 = 0.83$ a 0.85), indicando que la reducción de la asimilación de CO_2 se atribuyó en parte a una disminución de la conductancia estomática. Es pertinente destacar que *P. filiformis* P1325687 es la única accesión

que presentó una alta tasa de asimilación de CO₂ y conductancia estomática a moderada (60 mM NaCl) y alta concentración (90 mM) de NaCl comparada al control. Estos resultados demuestran que los procesos de fijación de CO₂ y control estomático en *P. filiformis* son tolerantes a altas concentraciones de salinidad y corroboran los resultados reportados por Bayuelo-Jiménez y col. (2003). Se presume que el mecanismo de tolerancia a este nivel podría estar relacionado con diferencias en la densidad estomática y anatomía de la hoja, la respuesta de las células acompañantes o bien, a una combinación de estos factores (Plaut y col., 1990). 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 y col., 2003). Esta especie mantiene reducidas concentraciones de Na⁺ en la lámina foliar y acumula mayor concentración de K⁺ en las mismas, lo que evidentemente contribuye con una adecuada apertura estomática y eficiencia en el uso del agua.

8.4 Relaciones hídricas

Al igual que en la tasa de asimilación de CO₂, el estado hídrico de la planta es sensible a la salinidad y, por lo tanto un factor determinante en el crecimiento de la planta (Munns, 2002). Durante el análisis de las relaciones hídricas de *Phaseolus*, observamos una respuesta común a aquellas reportadas en otras especies bajo salinidad (Lazcano-Ferrat y col., 1997). La disminución del potencial osmótico excedió a la del potencial hídrico permitiendo así que el potencial de turgor se mantuviera o incrementara en todas las accesiones (Fig. 3). 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 las plantas, la acumulación neta de iones inorgánicos y/o solutos orgánicos favorecen el mantenimiento del potencial de turgor (Hasegawa y col., 2000).

8.5 Carbohidratos totales y solubles

En este estudio se observó que la concentración de carbohidratos totales incrementó a mayor concentración salina. De acuerdo a los resultados obtenidos, la concentración de carbohidratos totales y el potencial osmótico correlacionaron significativamente en todas las accesiones de los tratamientos salinos ($r^2 = 0.42$ a 0.80), indicando que el incremento de carbohidratos contribuyó con la disminución del potencial osmótico de la planta pero alteró y/o disminuyó el transporte de carbohidratos a los órganos de demanda, especialmente a la raíz. Es posible que la reducción de la fotosíntesis a mayores concentraciones de NaCl (Fig. 2), haya alterado la cantidad de carbono fijado en el vástago y los carbohidratos transportados a la raíz (Azevedo Neto y col., 2004). En la accesión tolerante *P. filiformis*, sin embargo se presentó una acumulación constante de carbohidratos en hojas y el transporte de carbohidratos no se interrumpió a mayor concentración de NaCl. El incremento de carbohidratos a la raíz, especialmente a mayor duración del agobio favoreció la absorción de agua y el transporte al vástago y esto, a su vez, se reflejó con el mantenimiento de potenciales hídricos favorables ($r^2 = 0.61$) (Fig. 3) que promovieron una adecuada tasa fotosintética y crecimiento ($r^2 = 0.58$) (Fig. 1). Cabe señalar, que la tolerancia de *P. filiformis* podría relacionarse también con otros factores como son: (i) menor inversión metabólica (costo energético) para la osmoregulación (ajuste osmótico) (Patakas y col., 2002) y (ii) la adecuada distribución de solutos inorgánicos en las vacuolas y solutos orgánicos en el citosol (Sánchez y col., 1998; (Khan y col., 2000). Diversos autores señalan que la producción de solutos orgánicos es metabólicamente costosa y su contribución a la disminución del potencial osmótico celular es mínima y limitante para el crecimiento vegetal (Jouve y col., 2004; Arbona y col., 2004). Diversos estudios señalan que la glucosa, inositol, fructuosa y sacarosa, son algunos de los carbohidratos solubles que confieren tolerancia a salinidad. La glucosa es un carbohidrato involucrado en la protección de la membrana plasmática (Jouve y col., 2004) mientras que el inositol funciona como un reservorio para la síntesis de otros azúcares como el manitol, pinitol y ononitol, los cuales, se ha documentado intervienen como osmoprotectores y en mecanismos de señalización (Styer,

2000). El pinitol se ha identificado como el principal carbohidrato que protege a las células de la deshidratación en dos especies de Nyctaginaceae nativas de zonas costeras (Bialeski, 1994). Este carbohidrato también se ha encontrado en *Mesembryanthemum crystallinum* como principal compuesto osmoregulador y su síntesis está regulada directamente por el NaCl (Nelson y col. 1999). Otros carbohidratos solubles como la glucosa, fructosa y sacarosa funcionan como osmolitos compatibles para el ajuste osmótico de la planta y como amortiguadores de especies reactivas de oxígeno y fuente de carbono (Parida y Das, 2005). En particular, el agobio salino promovió la acumulación de inositol en hojas de *P. filiformis* (Cuadro 10), dicho incremento podría estar íntimamente asociado a la tolerancia de esta especie. Posiblemente, esta molécula actuó como osmolito y facilitó la retención de agua en el citoplasma y captura de Na^+ en la vacuola (Nelson y col., 1999).

En este estudio se cuantificó el aporte de los carbohidratos solubles en el ajuste osmótico de la planta pero su contribución fue menor del 3 %. Es evidente que el costo energético para su producción alteró el crecimiento y sus componentes, 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 (Volkmar y col., 1998). 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 (-1.3 y -1.62 MPa) a 40 mM NaCl y 80 mM NaCl, respectivamente y, consecuentemente con el mantenimiento de turgor celular (Bayuelo y col., 2003) y tolerancia al agobio salino.

8.7 Expresión del gen *PVPTP1* en raíz de *P. vulgaris*

El ensayo tipo Northern de raíz a diferentes tiempos de exposición a salinidad no se detectó expresión del gen *PVPTP1* en *Phaseolus* (Fig. 5). En los resultados obtenidos no pudimos obtener señal en ninguno de los ensayos realizados. Esto

contrasta con los resultados obtenidos por Xu y colaboradores (1998), que encontraron un aumento en la expresión del gen *PTP* en raíz de *Arabidopsis* bajo condiciones de 150 mM de NaCl. Esto sugiere que probablemente en las especies de *Phaseolus* probadas la PTP no este involucrada en el ajuste a salinidad y que los mecanismos sean diferentes en las especies de plantas. Recientemente, se ha reportado que la PTP está involucrada en la regulación del movimiento estomático (apertura y cierre) a nivel de los canales transportadores de K^+ (Luan, 2002).

9 CONCLUSIONES

La disminución de la TRC de las accesiones *P. acutifolius* G40169, *P. acutifolius* G40142 y *P. vulgaris* G04017 se relacionó directamente con una reducción de la eficiencia fotosintética (TAN) y no con cambios en la expansión foliar (RAF). En *P. filiformis*, por el contrario, la TRC y sus componentes TAN y RAF permanecieron constantes a mayor concentración salina y duración del agobio. La reducción de TAN en todas las accesiones excepto en *P. filiformis* se correlacionó con la disminución de la tasa de asimilación de CO₂ debido mayormente al cierre estomático. Las relaciones hídricas, sin embargo, no parecen ser un factor limitante en el crecimiento de *Phaseolus* ya que los potenciales hídrico y osmótico declinaron a mayor concentración salina permitiendo así que el potencial de turgor se mantuviera o incrementara. La acumulación de carbohidratos totales parece contribuir con la disminución del potencial osmótico y mantenimiento de turgor (ajuste osmótico) en etapas tempranas del agobio y a bajas concentraciones de NaCl pero la acumulación excesiva de iones en el tejido foliar causa toxicidad y repercute negativamente en la asimilación de CO₂ y, consecuentemente en el crecimiento de *Phaseolus*. Por último, no se detectó la expresión del gen *PVPTP* en raíz de *P. acutifolius* y *P. vulgaris* bajo agobio salino, lo que supone que este gen no está involucrado en tolerancia a salinidad en frijol cultivado. Los resultados demuestran que *P. filiformis* es una especie tolerante a salinidad y que su contrastante variabilidad fisiológica podría constituir una base genética para futuros programas de mejoramiento de *P. vulgaris* cultivado, particularmente en lo que se refiere a control estomático y eficiencia fotosintética.

10. LITERATURA CITADA

- Abebe, T., Guenzi, A.C., Bjorn, M., Cuchman, J.C. 2003. Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiology* 131:1748-1755.
- Allen, O. y Allen, E. 1981. *The Leguminosae. A Source Book of Characteristics Uses and Nodulation.* University of Wisconsin Press; Madison, Wisconsin, USA. 812 pp.
- Arbona, V., Marco, A.J., Iglesias, D.J., López-Climent, M.F., Talon, M., Gómez-Cadenas, A. 2005. Carbohydrate depletion in roots and leaves of salt-stressed potted *Citrus clementina* L. *Plant Growth Regulation* 46:153-160.
- Ashraf, M. 1994. Breeding for salinity tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Science* 13:17- 42.
- Ashraf, M. 2001. Relationship between growth and gas exchange characteristics in some salt-tolerant amphidiploid *Brassica* species in relation to their diploid parents. *Environmental Experimental Botany* 45: 155-163.
- Ashraf, M. y Bashir, A. 2003. Salt stress induced changes in some organic metabolites and ionic relations in nodules and other plant parts of two crop legumes differing in salt tolerance *Flora* 198:486-498.
- Ashraf, M. 2004. Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants. *Flora* 199: 361-376.
- Ausubel, F.M., Brend, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidan, G.J., Smith, J.A., Struhl, K. 1999. *Short protocols in molecular biology.* Ed. Wiley. USA. Fourth edition. 1200 pp.
- Azevedo-Neto, A.D., Prisco, J.T., Enéas-Filho, J., Lacerda, C.F., Silvia, J.V., Da Costa, H.A., Gomes-Filho, E. 2004. Effects of salt stress on plant growth,

- stomatal response and solute accumulation of different maize genotypes
Brazilian Journal of Plant Physiology 16:31-38.
- Ball, M.C., Chow, W.S., Anderson, J.M. 1987. Salinity induced potassium deficiency causes a loss of functional photo system II in leaves of grey mangroves, *Avicennia marina*, through depletion of the atrazine-binding polypeptide. Australian Journal of Plant Physiology 14:351-361.
- Baruch, Z. Y Goldstein. 1999. Leaf construction cost, nutrient concentration and net CO₂ assimilation of native and invasive species in Hawaii. Oecologia. 121:183-192.
- Bayuelo-Jiménez, J.S., Craig, R., Lynch, J.P. 2002. Salinity Tolerance of *Phaseolus* Species During Early Vegetative Growth. Crop Science 42: 2184-2192.
- Bayuelo-Jiménez, J.S., Debouck, D.G., Lynch, J.P. 2003. Growth, gas exchange, water relations and ion composition of *Phaseolus* species grown under saline conditions. Field Crop Research 80: 207-222.
- Bieleski, L.R. 1994. Pinitol is a major carbohydrate in leaves of some costal plants indigenous to New Zeland. New Zeland Journal of Botany 32:73-78.
- Binzel, M., Ratajczac, R. 2002. Function of membrane transport systems under salinity: In: Läuchli A, Lüttge U. (Eds.). Salinity: Environment-Plants-Molecules. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer. 423-449.
- Bonhert, H.J., Jensen, R.G. 1996. Metabolic engineering for increased salt tolerance-the next step. Australian Journal of Plant Physiology 23: 661-666.
- Broughton, W.J., Hernández, G., Blair, M., Beebe S., Gepts P., Vanderleyden J. 2003. Beans (*Phaseolus* spp) – model food legumes. Plant Soil 252: 55-128.

- Brugnoli, E. y Lauteri, M. 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.) C₃ non halophytes. *Plant Physiology*. 95:628-635.
- Brugnoli, E., Bjorkman, O. 1992. Growth of cotton under continuous salinity stress: influence on allocation pattern, stomatal and non stomatal components of photosynthesis and dissipation of excess light energy. *Planta* 187: 335-347.
- Chinnusamy, V., Schumaker, K., Zhu J.K. 2004. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signaling in plants. *Journal Experimental Botany* 55(395):225-236.
- Cachorro, P., Ortiz, A., Cerda, A. 1993. Growth, water relations and composition of *Phaseolus vulgaris* L. under saline conditions. *Plant Science*. 95:23-29.
- Cramer, G.R., Alberico, G.J., Schmidt, C. 1994. Salt tolerance is not associated with the sodium accumulation of 2 maize hybrids. *Australian Journal of Plant Physiology* 21:675-692.
- Cramer, R.G., A. Läuchli., Epstein E. 1986. Effect of NaCl and CaCl₂ on ion activities in complex nutrient solutions and root growth of cotton. *Plant Physiology* 81:792-797.
- Curtis, P.S., Läuchli, A. 1986. The role of leaf area development and photosynthetic capacity in determining growth of kenat under moderate salt stress. *Australian Journal of Plant Physiology* 18: 553-565.
- Drøbak, B.K., Watkins, A.C. P. 2000. Inositol (1,4,5) triphosphate production in plant cells: an early response to salinity and hyper osmotic stress. *FEBS Letters* 481:240-244.
- Debouck, G.D. y Freytag, F.G. 2002. Taxonomy, distribution, and ecology of the genus *Phaseolus* (Leguminosae-Papilionoideae) in North America, Mexico

- and Central America. Ed. SIDA, Botanical Miscellany No.23 Botanical Research Institute of Texas. 298 pp.
- Debouba, M., Gouia, H., Zuzuki, A., Ghorbel, M.H. 2005. NaCl stress effect on enzymes involved in nitrogen assimilation pathway in tomato *Lycopersicon esculentum* seedlings. *Journal of Plant Physiology* 9:1-12.
- Dubouis, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, S. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28 (3):350-356
- El-Hendawy, S.E., Hu, Y., Schmidhalter, U. 2005. Growth, ion content, gas exchange, and water relations of wheat genotypes differing in salt tolerances. *Australian Journal of Agricultural Research* 56:123-134.
- Engleman, E.M. 1979. Contribuciones al conocimiento del frijol (*Phaseolus*) en México. Ed. Rama de Botánica Colegio de Postgraduados Chapingo, México. 140 pp.
- Epstein, E. 1972. Mineral nutrition of plants: Principles and perspectives. Wiley. New York. 421 pp.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 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/aq//spush>
- Flores, T. J. 2004. Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany* 55(396):307-319.
- Gepts, P., Beavis, W.D., Brummer, E.C., Shoemaker, R.C., Stalker, H.T., Weeden, N.F., Young, N. D. 2005. Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the Cross-Legume advances through genomics conference. *Plant Physiology* 137:1228-1235.

- Gouia, H., Ghorbal, M.H., Touraine, B. 1994. Effects of NaCl on flows of N and mineral ions and on NO₃⁻ reduction rate within whole plants of salt-sensitive bean and salt-tolerant cotton. *Plant physiology* 105: 1409-1418.
- Goram, J., Foster, B.P., Budrewicz E., Jones, R.G.W., Miller, T.E., Law, C.N. 1986. Salt tolerance in the Triticeae: Solute accumulation and distribution in an amphidiploid derived from *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring and *Thynopyrium bessarabicum*. *Journal of Experimental Botany* 37:1435-1449.
- Grattan, S.R., Grieve, C.M. 1999. Salinity-mineral nutrient relations in horticultural crop. *Scientia Horticulturae* (78): 127-157.
- Greenway, H. y Munns, R. 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual Review of Plant Physiology* 31:149-190.
- Guan, K. L. 1994. The Mitogen activated protein kinase signal transduction pathway: From the cell surface to the nucleus. *Cell Signalling* 6:581-589.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., Bohner, H.J. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Molecular Biology* 51:463-499.
- Hare, P.D., Cress, W.A., Van Staden, J. 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell and Environment* 21: 535-553.
- Hawkins, H.J. y Lewis, O.A.M. 1993. Combination effect of NaCl salinity, nitrogen form and calcium-concentration on the growth, ionic content and gaseous exchange properties of *Trifolium aestivum* L. Cv. Gamtoos. *New Phytologists* 124:161-170.
- Hunt, R., 1990. Basic Growth Analysis. In *Plant Growth Analysis for Beginners*. Unwin Hyman, London. 110 pp.

- Jouve, L., Hoffmann, L., Hausman J.F. 2004. Polyamine, carbohydrate and proline content changes during salt stress exposure of aspen (*Populus tremula* L.): involvement of oxidation and osmoregulation metabolism. *Plant Biology* 6:74-80.
- Khan, M.A., Ungar, I.A., Showalters, A.M. 2000. Effects of salinity on growth, water relations and ion accumulation of the subtropical perennial halophyte *Atriplex griffithii*, var. *stocksii*. *Annals of Botany* 85:225-232.
- Khan, A.N., Quereshi, R.H., Ahmad, N. 2004. Salt tolerance of cotton cultivars in relation to relative growth rate in saline environments. *International Journal of Agriculture and Biology* 6(5):786-787.
- Krepesi, I., Galiba, G. 2000. Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. *Crop Science* 40:482-487.
- Kreps, A.J., Wu, Y., Hur-song, C., Zhu, T., Wang, X., Harper, J.F. 2002. Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic and cold stress. *Plant Physiology* 130: 2129-2141.
- Kurban, H., Saneoka, H., Nehira, K. 1999. Effect of salinity on growth and accumulation of organic and inorganic solutes in the leguminous plants *Alhagi pseudoalhagi* and *Vigna radiata*. *Soil Science and Plant Nutrition* 44:589-597.
- Lacerda, C.F., Cambraia, J., Oliva, M.A., Ruiz, H.A. 2003. Osmotic adjustment in roots and leaves of two sorghum genotypes under NaCl stress. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 15(2):113-118.
- Läuchli, A. 1984. Salt exclusion: an adaptation of legumes for crop and pastures under saline conditions. In: *Saline Tolerance in Plants: Strategies for Crop Improvement*. Staples RC, Toenniessen GH (eds.). Wiley New York. pp. 171-187.

- Lazcano-Ferrat, I. Y Lovatt, C.L. 1997. Effect of salinity on arginine biosynthesis in leaves of *P. Vulgaris* L. And *P. Acutifolius* A. Gray. *Crop Science* 37:469-475.
- Lohaus, G., Hussmann, M., Pennewiss, K., Schneider, H., Jian-Jun, Z., Sattelmacher, B. 2000. Solute balance of maize (*Zea mays* L.) source leaf as affected by salt treatment with special emphasis on phloem retranslocation and ion leaching. *Journal Experimental Botany* 51(351):1721-1732.
- López-Gómez, R., Gómez, M.A.G. 1992. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. *Hort Science* 27(5):440-442.
- Luan, S. 2002. Tyrosine Phosphorylation in plant cell signalling. *PNAS* 99 (18):11567-11569.
- Macias-Rodriguez, L., Quero, E., López, G.E. 2002. Carbohydrate differences in strawberry crowns and fruit (*Fragaria X ananassa*) during plant development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 20:3317-3321.
- McClellan, P., Kami, J., Gepts, P. 2004. Genomics and genetic diversity in common bean. In: *Legumes Crop Genomics*. Richard F. Wilson., H. Thomas Stalker y E. Charles Brummer (eds.). AOCs PRESS. Illinois. pp. 61-82.
- Mahajan, S., Tuteja, N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444: 139-158.
- Mass, E.V., Hoffman, G.J. 1977. Crop salt tolerance. Current assessment. *Journal of the Irrigation and Drainage Division, ASCE* 103: 115-134.
- Meloni, D.A., Oliva, M.A., Ruiz H.A., Mattínez, C.A. 2001. Contribution of proline and inorganic solutes to osmotic adjustment in cotton under salt stress. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 24:599-612.

- Meloni, D.A., Gulotta, M.R., Martínez, C.A. 2004. The effects of salt stress on growth, nitrate reduction and proline and glycinebetaine accumulation in *Prosopis alba*. Brazilian Journal of Plant Physiology 16(1): 39-46
- Mencuccini, M. Y Grace J. 1996. Development patterns of above ground hydraulic conductance in a Scots Pine (*Pinus silvestris* L.) age sequence. Plant Cell and Environment. 19:939-948.
- Minhas, P.S. 1996. Saline water management for irrigation in India. Agricultural water management 30: 1-24.
- Mi-Jeong, J., Soo-Chul, P., Myung O.K. 2001. Improvement of salt tolerance in transgenic potato plants by Glyceraldehyde-3 Phosphate Dehydrogenase gene transfer. Molecules and Cells 112(2):185-189.
- Moreno-Limón, S., Maiti, R.K., Foroughbakhch, R. 2000. Genotypic variability in *Phaseolus* bean cultivars exposed to salinity at the germination stage. Crop Research 19: 487-492.
- Munns, R. 1993. Physiological processes limiting plant growth in saline soil: some dogmas and hypotheses. Plant, Cell and environment 16: 15-24.
- Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. Plant cell and environment 25: 239-250
- Munns, R. Husain, S., Rivelli, A.R., James, R.A., Condon, A.G., Lindsay, M.P., Lagudah, E.S., Sehaachtman, D.P., Hare, R.A. 2002. Avenues for increasing salt tolerance of crops and the role of physiologically base selection traits. Plant soil 247: 93-105
- Munns, R. 2005. Genes and salt tolerance: bringing together. Tansley Reviews. New phytologist 167: 645-663.

- Mukhopadhyay, A., Vij, S., Tyagi A.K. 2004. Overexpression of a zing-finger protein gene from rice confers tolerance to cold, dehydration and salt stress in transgenic tobacco. *PNAS* 101(16):6309-6314
- Nelson, D.E., Koukoumanos, M., Bohnert, H.J. 1999. Myo-Inositol-Dependent Sodium Uptake in Ice Plant. *Plant Physiology* 119: 165-172
- Novel, P.S. 1991. *Physicochemical and environmental plant physiology*. Academic Press, New York. pp 72.
- Parida, A.K., Das, A.B. 2004. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and environmental safety* 60:324-349.
- Parida, A.K., Das, A.B. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60:324-349.
- Patakas, A., Nikolaou, N., Zioziou, E., Radoglou, K., Noitsakis. 2002. The role of organic solute and ion accumulation in osmotic adjustment in drought-stressed grapevines. *Plant Science* 163: 361-367.
- Pérez-Alfocea, F., Balibrea, M.E., Santa Cruz, A., Estan, M.T. 1996. Agronomical and physiological characterization of salinity tolerance in a commercial tomato hybrid. *Plant and Soil* 180: 251-257.
- Plaut, Z., Gieve, M.C., Maas, E.V. 1990. Salinity effects on CO₂ assimilation and diffusive conductance of cowpea leaves. *Physiology Plantarum*. 79:31-38
- Poorter, H., 1989. Interspecific variation in relative growth rate: on ecological causes and physiological consequences. In: *Causes and consequences of variation in growth rate and productivity of Higher Plants*. Lambers, H. (ed.). Academic Publishing, The Hague, The Netherlands. pp. 45-68.

- Ramoliya, P.J., Pandey, A.N. 2003. Effect of salinization of soil on emergence, growth and survival of seedlings of *Cordia rothii*. Forest Ecology and Management 176:185-194.
- Romero, J.M., Marañón, T., Murillo, J.M. 1994. Long-term responses of *Melilotus segetalis* to salinity. I. Growth and Partitioning. Plant Cell Environment 7:1243-1248.
- Rogers, M.E. y Noble, C.L. 1992. Variation in growth and ion accumulation between 2 selected populations of *Trifolium repens* L. differing in salt tolerance. Plant and Soil 146:131-136.
- Reddy, M.P., Sanish, S., Iyengar, E.R.R. 1992. Photosynthetic studies and compartmentation of ions in different tissues of *Salicornia brachiata* Roxb. under saline conditions. Photosynthetica 26: 173-179.
- Rhoades, J.D. 1997. Sustainability of irrigation: An overview of salinity problems and control strategies. Lethbridge, Alberta, Canada. pp. 1-42.
- Rhoades, J.D., Kandia, A., Mashali, A.M. 1992. The use of saline waters for crop production. FAO. Irrigation and Drainage. Paper No. 48 United Nations, Rome. 133 pp.
- SAGAR, 2000. Situación actual y perspectiva de la producción de frijol en México 1990-2000. Editorial (SIAP), Servicio de información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera. 41 pp.
- Sakamoto, A., Murata, N. 2000. Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. Journal of Experimental Botany 51(342):81-88.
- Sánchez, F.J., Manzanares, M., Andres, E.F., Tenorio, J.L., Eyerbe, L. 1998. Turgor maintenance, osmotic adjustment and soluble sugar and proline

- accumulation in 49 pea cultivars in response to water stress. *Field Crop Research* 59:225-235.
- SAS Institute, 2000. *SAS User's guide: Statistics*. 5th ed. SAS Institute., Cray, NC.
- Serraj, R. Y Sinclair, T.R. 2002. Osmolyte accumulation; can it really help increase crop yield under drought conditions?. *Plant Cell Environment* 25:333-341.
- Scholander, P., Hammel, H., Bradstreet, E., Hemminbsen, E. 1965. Sap pressure in vascular plants. *Science* 148: 339-346.
- Shanon, M.C. 1984. Salinity Tolerance in Plants Strategies for Crop improvement. In Staples R.C. (ed) *Breeding, selection and the genetics of salt tolerance*. John Wiley, New York, USA pp. 231-254.
- Shannon, M.C., Grive, C.M., Francois, L.E. 1994. Whole-Plant Response to Salinity. In: R.E. Wilkinson (ed.). *Plant-environment interactions*. Marcel Dekker, New York. pp.199-249.
- Shannon, M.C., Grive, C.M., 1999. Tolerance of vegetable crops to salinity. *Scientia Horticulturae* 78: 5-38.
- Sharon, M.L. E., Da silveira, L.L.S. 2005, Growth and gas Exchange responses of Brazilian pepper (*Schinus terebinthifolius*) and native south Florida species to salinity. *Trees* 19: 119-128.
- Shen, B., Hohamann, S., Jensen, R.G., Bohnert, H.J. 1999. Roles of sugar alcohols in osmotic stress adaptation. Replacement of glycerol by mannitol and sorbitol in yeast. *Plant Physiology* 121:45-52.
- Singh, S.P., 2001. Broadening the genetic base of common bean cultivars: a review. *Crop Science* 41: 1659-1675.

- Sohan, D., Jasoni, R., Zajicek, J. 1999. Plant-water relations of NaCl and calcium-treated sunflower plants. *Environmental and Experimental Botany* 42: 105-111.
- Stephen, J.H., Gilroy, R., Lynch J.P. 2003. Sodium chloride reduces growth and cytosolic calcium, but does not affect cytosolic pH, in root hairs of *Arabidopsis thaliana* L. *Journal of Experimental Botany* 54(385):1269-1280.
- Stepien, P. Y Klobus, G. 2006. Water relations and photosynthesis in *Cucumis sativus* L. leaves under salt stress. *Biologia Plantarum* 50:610-616.
- Styer C. Jean. 2000. Regulating inositol biosynthesis in plants: Myo-inositol phosphate synthase and myo-inositol monophosphatase. Thesis of Master Degree. Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University. 86 pp.
- Szabolcs, I., 1994. Soils and salinization. In: M Pessaraki (ed.) *Hand Book of plant and crop stress*. Marcel Dekker, New York. pp. 3-11.
- Tattini, M., Gucci, R., Coradeschi, M.A., Ponzio, C., Everard, J.D. 1995. Growth, gas-exchange and ion content in *Olea europea* plants during salinity stress and subsequent relief. *Physiologia Plantarum* 95:203-210.
- Tester, M., Davenport, R. 2003. Na⁺ Tolerant and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany* 91: 503-527.
- Volkmar, K.M., Hu, Y., Steppuhn, H., 1998. Physiological responses of plants to salinity: a review. *Canadian Journal of plant science* 78: 19-27
- Xu, Q., Fu, H.H., Gupta, R., Luan, S. 1998. Molecular characterization of a Tyrosine-Specific protein Phosphatase encoded by a stress-responsive gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10:849-857.
- Yeo, A., 1998. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *Journal of Experimental Botany* 49 (323): 915-929.

- Zhang, J., Nguyen H.T., Blum, A. 1999. Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. *Journal of Experimental Botany* 50(332):291-302.
- Zhang D.Y., 1995. Analysis of growth redundancy of crop root system in semi-arid area. *Acta Botánica Boreali Occidentalia Sinaca* 15:110-4.
- Zhu, J.K. 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion Plant Biology* 6: 441-445.
- Zhu, J.K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review Plant Biology* 53:247-273.
- Zhu, J.K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends Plant Science* 6:66-72.
- USSL, 2005. George E. Brown, Jr Salinity Laboratory. Riverside, Ca, USA: USDA-ARS. <http://www.ussl.ars.usda.gov>.

11. APÉNDICE 1

Cuadro 13. Efecto del NaCl en el número de hojas, área foliar, peso seco de vástago, raíz y relación raíz: vástago de *Phaseolus* spp. en diferentes concentraciones de salinidad.

NaCl (mM)	Número de hojas	Área foliar (cm ² planta ⁻¹)	Peso seco vástago (g)	Peso seco raíz (g)	Relación Raíz:vástago
<i>P. acutifolius</i>					
G40169					
0	6.75	447.3	0.33	0.16	0.48
30	6.75	405.8	0.30	0.14	0.47
60	6.25	331.3	0.25	0.17	0.68
90	6.0	299.1	0.25	0.16	0.64
LSD _{0.05}	1.5	164.5	0.14	0.12	0.06
<i>P. filiformis</i>					
PI535309					
0	3	70.6	0.09	0.03	0.33
30	3	65.5	0.09	0.01	0.11
60	3	54.6	0.04	0.02	0.50
90	3	44.9	0.03	0.05	1.67
LSD _{0.05}	1.92	195.9	0.15	0.08	0.05
<i>P. acutifolius</i>					
G40142					
0	6.0	455.8	0.42	0.24	0.57
30	6.5	473.4	0.47	0.24	0.51
60	5.5	377.7	0.42	0.29	0.59
90	5.5	336.6	0.39	0.20	0.51
LSD _{0.05}	1.6	303.4	0.13	0.09	0.06
<i>P. vulgaris</i>					
G04017					
0	2.5	737.9	0.47	0.28	0.60
30	2.5	600.6	0.41	0.28	0.68
60	2.5	388.2	0.35	0.26	0.74
90	2.5	394.1	0.29	0.23	0.79
LSD _{0.05}	1.35	97.2	0.12	0.07	0.05

Las medias son valores de 4 repeticiones después de 10 días de exposición a NaCl y LSD muestra la diferencia mínima significativa para cada variable a $P \leq 0.05$.

Cuadro 14. Efecto del NaCl en el número de hojas, área foliar, peso seco de vástago, raíz y relación raíz: vástago de *Phaseolus* spp. en diferentes concentraciones de salinidad.

NaCl (mM)	Número de hojas	Área foliar (cm ² planta ⁻¹)	Peso seco vástago (g)	Peso seco raíz (g)	Relación Raíz:vástago
<i>P. acutifolius</i>					
G40169					
0	14.5	789.3	0.76	0.23	0.30
30	12.2	762.3	0.84	0.30	0.36
60	10	555.4	0.47	0.39	0.83
90	10	486	0.53	0.20	0.38
LSD _{0.05}	5.28	278.7	0.34	0.16	0.04
<i>P. filiformis</i>					
PI535309					
0	7.7	181.7	0.13	0.05	0.38
30	7.5	143.8	0.27	0.06	0.22
60	6.2	137.3	0.13	0.04	0.31
90	4.2	83.2	0.09	0.04	0.44
LSD _{0.05}	3.41	354.1	0.62	0.14	0.04
<i>P. acutifolius</i>					
G4042					
0	12.7	1255.1	1.17	0.40	0.34
30	12.2	1085.5	1.20	0.41	0.34
60	9.2	795.9	0.95	0.44	0.46
90	10.2	672.4	0.95	0.44	0.46
LSD _{0.05}	2.5	214.2	0.32	0.22	0.06
<i>P. vulgaris</i>					
G04017					
0	6.25	1651.1	1.15	0.52	0.45
30	4.75	1021.9	0.75	0.50	0.67
60	4.75	941.8	0.79	0.42	0.53
90	4	693	0.84	0.40	0.48
LSD _{0.05}	3.8	211.5	0.33	0.09	0.04

Las medias son valores de 4 repeticiones después de 15 días de exposición a NaCl y LSD muestra la diferencia mínima significativa para cada variable a $P \leq 0.05$.

Cuadro 15. Efecto del NaCl en el número de hojas, área foliar, peso seco de vástago, raíz y relación raíz: vástago de *Phaseolus* spp. en diferentes concentraciones de salinidad.

NaCl (mM)	Número de hojas	Área foliar (cm ² planta ⁻¹)	Peso seco vástago (g)	Peso seco raíz (g)	Relación Raíz:vástago
<i>P. acutifolius</i>					
G40169					
0	24.7	1472.3	1.70	1.35	0.79
30	17.5	700.2	1.34	0.74	0.55
60	12.5	636.3	0.91	0.44	0.48
90	10.5	537.1	0.63	0.30	0.48
LSD _{0.05}	5	557.2	0.5	0.94	0.05
<i>P. filiformis</i>					
PI535309					
0	8.5	209.2	0.16	0.05	0.31
30	10.2	236.2	0.29	0.07	0.24
60	6.7	143.5	0.13	0.06	0.46
90	7.2	130.2	0.17	0.06	0.35
LSD _{0.05}	3.1	673.1	0.29	0.17	0.05
<i>P. acutifolius</i>					
G4042					
0	21.7	2252.7	2.8	1.22	0.44
30	14.7	1464.6	2.07	1.01	0.49
60	11.5	1333.2	2	1	0.50
90	8.7	740.3	1.16	0.52	0.45
LSD _{0.05}	1.6	272	0.26	0.18	0.06
<i>P. vulgaris</i>					
G04017					
0	10.2	2787.3	2.3	1	0.43
30	7.5	1670.9	2.06	0.91	0.44
60	6.2	1467.5	1.3	0.79	0.61
90	5.2	962.4	1.11	0.63	0.57
LSD _{0.05}	3.1	162.2	0.28	0.16	0.05

Las medias son valores de 4 repeticiones después de 10 días de exposición a NaCl y LSD muestra la diferencia mínima significativa para cada variable a $P \leq 0.05$.

MEDIDAS DE INTERCAMBIO GASEOSO

Cuadro 16. Efecto del NaCl en intercambio gaseoso, conductancia estomática y transpiración en *Phaseolus* spp. en diferentes concentraciones de salinidad.

NaCl (mM)	Intercambio gaseoso ($\mu\text{ mol CO}_2\text{ m}^{-2}\text{ s}^{-1}$)	Conductancia estomática ($\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$)	Transpiración ($\mu\text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{ s}^{-1}$)
<i>P. acutifolius</i>			
G40169			
0	14.40	0.22	7.75
30	17.92	0.35	10.20
60	14.02	0.22	7.51
90	15.40	0.34	8.30
LSD _{0.05}	1.26	0.02	0.83
<i>P. filiformis</i>			
PI535309			
0	15.17	0.18	5.68
30	16.57	0.23	6.88
60	11.12	0.14	5.17
90	12.65	0.12	4.73
LSD _{0.05}	3.93	0.11	3.17
<i>P. acutifolius</i>			
G40142			
0	17.77	0.24	9.29
30	20.10	0.31	11.13
60	13.3	0.16	7.56
90	16.9	0.34	11.26
LSD _{0.05}	3.19	0.08	1.78
<i>P. vulgaris</i>			
G04017			
0	13.90	0.10	5.12
30	17.47	0.18	7.66
60	11.79	0.09	4.83
90	13.9	0.19	8.13
LSD _{0.05}	3.52	0.15	3.19

Las medias son valores de 4 repeticiones después de 10 días de exposición a NaCl y LSD muestra la diferencia mínima significativa para cada variable a $P \leq 0.05$.

Cuadro 17. Efecto del NaCl en intercambio gaseoso, conductancia estomática y transpiración en *Phaseolus* spp. a diferentes concentraciones de salinidad.

NaCl (mM)	Intercambio gaseoso ($\mu\text{ mol CO}_2\text{ m}^{-2}\text{ s}^{-1}$)	Conductancia estomática ($\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$)	Transpiración ($\mu\text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{ s}^{-1}$)
<i>P. acutifolius</i>			
G40169			
0	13.53	0.12	4.85
30	15.55	0.09	4.27
60	9.33	0.04	1.95
90	12.49	0.04	2.10
LSD _{0.05}	3.53	0.04	1.82
<i>P. filiformis</i>			
PI535309			
0	10.29	0.03	1.92
30	10.55	0.03	1.67
60	10.51	0.07	3.21
90	13.50	0.05	2.86
LSD _{0.05}	3.13	0.06	2.14
<i>P. acutifolius</i>			
G40142			
0	15.02	0.14	5.85
30	21.45	0.21	8.49
60	10.65	0.05	3.22
90	13.15	0.05	2.99
LSD _{0.05}	4.64	0.03	2.21
<i>P. vulgaris</i>			
G04017			
0	16.06	0.12	5.52
30	17.27	0.12	5.60
60	12.14	0.06	3.07
90	8.75	0.05	2.08
LSD _{0.05}	2.72	0.03	1.33

Las medias son valores de 4 repeticiones después de 15 días de exposición a NaCl y LSD muestra la diferencia mínima significativa para cada variable a $P \leq 0.05$.

Cuadro 18. Efecto del NaCl en intercambio gaseoso, conductancia estomática y transpiración en *Phaseolus* spp. a diferentes concentraciones de salinidad.

NaCl (mM)	Intercambio gaseoso ($\mu\text{ mol CO}_2\text{ m}^{-2}\text{ s}^{-1}$)	Conductancia estomática ($\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$)	Transpiración ($\mu\text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{ s}^{-1}$)
<i>P. acutifolius</i>			
G40169			
0	14	0.08	3.74
30	11.54	0.05	2.89
60	11.10	0.04	2
90	7.79	0.02	1.20
LSD _{0.05}	2.90	0.04	1.80
<i>P. filiformis</i>			
PI535309			
0	11.24	0.06	3.22
30	10.17	0.05	3.06
60	10.89	0.05	2.86
90	8.67	0.06	3.02
LSD _{0.05}	3.81	0.02	1.12
<i>P. acutifolius</i>			
G40142			
0	16.27	0.11	4.87
30	18.57	0.14	5.95
60	16.00	0.10	4.04
90	13.50	0.05	2.62
LSD _{0.05}	3.83	0.03	1.08
<i>P. vulgaris</i>			
G04017			
0	12.37	0.06	3.17
30	14.97	0.08	4.04
60	10.89	0.07	3.30
90	8.48	0.05	2.78
LSD _{0.05}	4.64	0.03	1.53

Las medias son valores de 4 repeticiones después de 20 días de exposición a NaCl y LSD muestra la diferencia mínima significativa para cada variable a $P \leq 0.05$.

MEDIDAS DE RELACIONES HÍDRICAS

Cuadro 19. Efecto del NaCl en relaciones hídricas, potencial hídrico y osmótico en hojas de *Phaseolus* spp. a diferentes concentraciones de salinidad.

NaCl (mM)	Potencial en (-MPa)		
	ψ_w (Potencial hídrico en hojas)	ψ_π (Potencial osmótico en hojas)	Ψ_p (Potencial de turgor)
<i>P. acutifolius</i>			
G40169			
0	-0.28	-0.77	0.48
30	-0.33	-1.02	0.68
60	-0.36	-1.03	0.67
90	-0.30	-1.34	1.04
LSD _{0.05}	0.18	0.08	0.22
<i>P. filiformis</i>			
PI535309			
0	-0.23	-0.76	0.52
30	-0.31	-0.94	0.63
60	-0.23	-1.04	0.80
90	-0.20	-1.07	0.87
LSD _{0.05}	0.10	0.16	0.20
<i>P. acutifolius</i>			
G40142			
0	-0.36	-0.79	0.43
30	-0.51	-1.08	0.56
60	-0.47	-1.08	0.60
90	-0.51	-1.20	0.69
LSD _{0.05}	0.10	0.15	0.09
<i>P. vulgaris</i>			
G04017			
0	-0.58	-0.89	0.30
30	-0.58	-0.97	0.38
60	-0.60	-1.10	0.50
90	-0.67	-1.23	0.56
LSD _{0.05}	0.11	0.17	0.19

Las medias son valores de 4 repeticiones después de 10 días de exposición a NaCl y LSD muestra la diferencia mínima significativa para cada variable a $P \leq 0.05$.

Cuadro 20. Efecto del NaCl en relaciones hídricas, potencial hídrico y osmótico en hojas de *Phaseolus* spp. en diferentes concentraciones de salinidad.

NaCl (mM)	Potencial en (-MPa)		
	ψ_w (Potencial hídrico en hojas)	ψ_π (Potencial osmótico en hojas)	Ψ_p (Potencial de turgor)
<i>P. acutifolius</i>			
G40169			
0	-0.21	-0.86	0.65
30	-0.12	-1.02	0.90
60	-0.26	-1.21	0.94
90	-0.15	-1.44	1.20
LSD _{0.05}	0.15	0.12	0.26
<i>P. filiformis</i>			
PI535309			
0	-0.16	-0.79	0.63
30	-0.38	-0.91	0.52
60	-0.50	-1.03	0.53
90	-0.10	-1.16	1.06
LSD _{0.05}	0.16	0.15	0.26
<i>P. acutifolius</i>			
G40142			
0	-0.22	-0.84	0.62
30	-0.21	-0.92	0.71
60	-0.45	-1.13	0.68
90	-0.50	-1.20	0.70
LSD _{0.05}	0.16	0.14	0.24
<i>P. vulgaris</i>			
G04017			
0	-0.50	-0.86	0.36
30	-0.50	-0.97	0.47
60	-0.63	-1.12	0.48
90	-0.85	-1.21	0.36
LSD _{0.05}	0.12	0.19	0.26

Las medias son valores de 4 repeticiones después de 15 días de exposición a NaCl y LSD muestra la diferencia mínima significativa para cada variable a $P \leq 0.05$.

Cuadro 21. Efecto del NaCl en relaciones hídricas, potencial hídrico y osmótico en hojas de *Phaseolus* spp. en diferentes concentraciones de salinidad

NaCl (mM)	Potencial en (-MPa)		
	ψ_w (Potencial hídrico en hojas)	ψ_π (Potencial osmótico en hojas)	Ψ_p (Potencial de turgor)
<i>P. acutifolius</i>			
G40169			
0	-0.22	-0.88	0.66
30	-0.26	-1.06	0.80
60	-0.28	-1.33	1.05
90	-0.42	-1.53	1.11
LSD _{0.05}	0.12	0.18	0.10
<i>P. filiformis</i>			
PI535309			
0	-0.23	-0.93	0.69
30	-0.31	-0.97	0.66
60	-0.26	-1.19	0.92
90	-0.16	-1.17	1.01
LSD _{0.05}	0.16	0.16	0.23
<i>P. acutifolius</i>			
G40142			
0	-0.28	-0.88	0.60
30	-0.30	-0.96	0.66
60	-0.35	-1.23	0.88
90	-0.42	-1.33	0.90
LSD _{0.05}	0.14	0.20	0.31
<i>P. vulgaris</i>			
G04017			
0	-0.46	-1.06	0.60
30	-0.57	-1.06	0.43
60	-0.60	-1.14	0.54
90	-0.67	-1.31	0.64
LSD _{0.05}	0.25	0.20	0.38

Las medias son valores de 4 repeticiones después de 20 días de exposición a NaCl y LSD muestra la diferencia mínima significativa para cada variable a $P \leq 0.05$.

CARBOHIDRATOS TOTALES

Cuadro 22. Efecto de NaCl en el contenido de carbohidratos totales en tallo, hoja y raíz de *Phaseolus* spp.

NaCl (mM)	Contenido de carbohidratos totales mg g ⁻¹ peso fresco		
	Hojas	Tallo	Raíz
<i>P. acutifolius</i>			
G40169			
0	33.07	50.99	15.98
30	35.18	30.70	28.34
60	34.82	41.34	16.56
90	36.20	50.80	13.59
LSD _{0.05}	11.7	15.37	6.24
<i>P. filiformis</i>			
PI535309			
0	36.13	9.62	10.28
30	21.44	21.62	7.20
60	35.94	26.40	12.59
90	27.09	9.14	8.66
LSD _{0.05}	19.84	27.47	12.09
<i>P. acutifolius</i>			
G40142			
0	24.00	47.49	21.82
30	51.41	63.80	17.35
60	57.08	47.39	15.84
90	42.39	43.49	17.93
LSD _{0.05}	23.91	21.19	10.12
<i>P. vulgaris</i>			
G04017			
0	31.01	43.26	17.23
30	47.02	34.36	16.71
60	41.26	41.04	19.33
90	25.51	47.53	17.53
LSD _{0.05}	15.94	18.02	3.78

Las medias son valores de 4 repeticiones después de 10 días de exposición a NaCl y LSD muestra la diferencia mínima significativa para cada variable a $P \leq 0.05$.

Cuadro 23. Efecto de NaCl en el contenido de carbohidratos totales en tallo, hoja y raíz de *Phaseolus* spp.

NaCl (mM)	Contenido de carbohidratos totales mg g ⁻¹ peso fresco		
	Hojas	Tallo	Raíz
<i>P. acutifolius</i>			
G40169			
0	42.43	56.18	24.89
30	24.94	59.84	15.66
60	24.79	54.86	14.94
90	37.14	56.00	16.96
LSD _{0.05}	17.52	17.29	11.43
<i>P. filiformis</i>			
PI535309			
0	33.41	39.24	11.27
30	47.45	51.78	22.30
60	32.78	15.04	10.53
90	44.01	50.50	9.23
LSD _{0.05}	4.31	31.23	9.92
<i>P. acutifolius</i>			
G40142			
0	38.05	38.04	17.34
30	35.88	58.02	21.36
60	26.75	39.14	12.91
90	43.32	67.88	14.35
LSD _{0.05}	9.90	12.44	7.65
<i>P. vulgaris</i>			
G04017			
0	26.85	28.76	13.96
30	26.73	23.12	23.55
60	25.10	32.64	7.55
90	28.65	53.03	13.28
LSD _{0.05}	6.54	14.97	5.79

Las medias son valores de 4 repeticiones después de 15 días de exposición a NaCl y LSD muestra la diferencia mínima significativa para cada variable a $P \leq 0.05$.

Cuadro 24. Efecto de NaCl en el contenido de carbohidratos totales en tallo, hoja y raíz de *Phaseolus* spp.

NaCl (mM)	Contenido de carbohidratos totales mg g ⁻¹ peso fresco		
	Hojas	Tallo	Raíz
<i>P. acutifolius</i>			
G40169			
0	23.99	43.86	18.14
30	21.86	36.70	15.15
60	44.12	61.81	20.31
90	50.57	69.95	20.53
LSD _{0.05}	12.01	7.51	12.78
<i>P. filiformis</i>			
PI535309			
0	36.14	43.62	23.92
30	48.47	37.76	12.99
60	53.12	42.73	17.80
90	59.92	50.00	20.43
LSD _{0.05}	31.46	8.69	5.63
<i>P. acutifolius</i>			
G40142			
0	49.46	59.15	18.49
30	37.88	42.89	14.40
60	55.88	48.93	23.72
90	52.51	71.72	8.49
LSD _{0.05}	11.12	11.76	6.00
<i>P. vulgaris</i>			
G04017			
0	21.82	41.04	17.81
30	14.65	24.95	12.18
60	27.74	42.07	18.87
90	49.99	72.83	15.87
LSD _{0.05}	13.43	13.86	9.43

Las medias son valores de 4 repeticiones después de 20 días de exposición a NaCl y LSD muestra la diferencia mínima significativa para cada variable a $P \leq 0.05$.

Cuadro 25. Correlación entre variables de relaciones hídricas, fotosíntesis, fotosíntesis, tasa relativa de crecimiento y componentes, carbohidratos totales de hoja, tallo y raíz en *P. acutifolius* G40169 a diferentes concentraciones de NaCl.

	PH	PO	PT	A	Gs	TRC	TAN	TAF	RPF	AFE	Az_hoja	Az_raíz	Az_tallo
PH	1.00												
PO	0.74**	1.00											
PT	-0.32 ^{ns}	-0.85*	1.00										
A	0.61*	0.40 ^{ns}	0.12 ^{ns}	1.00									
gs	0.71**	0.54*	0.24 ^{ns}	0.93***	1.00								
TRC	0.91**	0.55*	0.12 ^{ns}	0.63*	0.69*	1.00							
TAN	0.91**	0.53 ^{ns}	-0.1 ^s	0.67*	0.71**	0.98***	1.00						
TAF	0.10 ^{ns}	0.27 ^{ns}	0.31 ^{ns}	-0.04 ^{ns}	0.08 ^{ns}	0.10 ^{ns}	-0.1 ^{ns}	1.00					
RPF	0.26 ^{ns}	0.43 ^{ns}	-0.4 ^{ns}	0.12 ^{ns}	0.26 ^{ns}	0.23 ^{ns}	0.18 ^{ns}	0.27 ^{ns}	1.00				
AFE	-0.03 ^{ns}	0.08 ^{ns}	-0.1 ^{ns}	-0.10 ^{ns}	-0.02 ^{ns}	-0.01 ^{ns}	-0.1 ^{ns}	0.87***	0.2 ^{ns}	1.00			
az_hoja	-0.64*	0.57 ^{ns}	0.27 ^{ns}	-0.47 ^{ns}	-0.60*	-0.54 ^{ns}	0.49 ^{ns}	-0.53 ^{ns}	0.33 ^{ns}	0.35 ^{ns}	1.00		
az_raíz	-0.60 ^{ns}	0.59 ^{ns}	0.34 ^{ns}	-0.19 ^{ns}	-0.36 ^{ns}	-0.46 ^{ns}	0.43 ^{ns}	-0.38 ^{ns}	0.31 ^{ns}	0.22 ^{ns}	-0.42 ^{ns}	1.00	
az_tallo	-0.17 ^{ns}	0.45 ^{ns}	0.46 ^{ns}	0.10 ^{ns}	0.06 ^{ns}	-0.10 ^{ns}	0.04 ^{ns}	-0.37 ^{ns}	0.65*	0.02 ^{ns}	0.75*	0.57*	1.00

* significativo a $P \leq 0.05$; **significativo a $P \leq 0.001$; significativo a $P \leq 0.0001$, ^{ns} no significativo.

PH: potencial hídrico, PO: potencial osmótico, A: fotosíntesis, gs: conductancia estomática, TRC: tasa relativa de crecimiento, TAN: tasa de asimilación neta, TAF: tasa de área foliar, RPF: relación de peso foliar, AFE: área foliar específica, az_hoja: carbohidratos totales en hojas, az_raíz: carbohidratos totales en raíz, az_tallo: carbohidratos totales en tallo.

Cuadro 26. Correlación entre variables de relaciones hídricas, fotosíntesis, tasa relativa de crecimiento y componentes, carbohidratos totales de hoja, tallo y raíz en *P. filiformis* PI535309 a diferentes concentraciones de NaCl.

	PH	PO	PT	A	gs	TRC	TAN	TAF	RPF	AFE	Az_ hoja	Az_ raíz	Az_ tallo
PH	1.00												
PO	0.67*	1.00											
PT	-0.03 ^{ns}	-0.75**	1.00										
A	0.50*	0.17 ^{ns}	0.21 ^{ns}	1.00									
Gs	0.69**	0.52*	-0.09 ^{ns}	0.87***	1.00								
TRC	0.19 ^{ns}	0.47 ^{ns}	-0.47 ^{ns}	-0.12 ^{ns}	0.13 ^{ns}	1.00							
TAN	0.11 ^{ns}	0.37 ^{ns}	-0.41 ^{ns}	-0.15 ^{ns}	0.08 ^{ns}	0.1 ^{ns}	1.00						
TAF	0.41 ^{ns}	0.73**	-0.63*	0.04 ^{ns}	0.24 ^{ns}	0.2 ^{ns}	0.08 ^{ns}	1.00					
RPF	-0.56*	-0.68*	0.43 ^{ns}	-0.16 ^{ns}	-0.33 ^{ns}	-0.5*	-0.42	0.61*	1.00				
AFE	0.55*	0.78**	-0.57*	0.13 ^{ns}	0.35 ^{ns}	0.4 ^{ns}	0.33 ^{ns}	0.85***	-0.90**	1.00			
az_hoja	-0.37 ^{ns}	-0.59*	0.50 ^{ns}	0.24 ^{ns}	-0.13 ^{ns}	-0.4 ^{ns}	-0.39 ^{ns}	-0.21 ^{ns}	-0.36 ^{ns}	-0.3 ^{ns}	1.00		
az_raíz	0.22 ^{ns}	0.06 ^{ns}	0.10 ^{ns}	0.76**	0.74**	-0.4 ^{ns}	-0.46 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.08 ^{ns}	-0.1 ^{ns}	0.38 ^{ns}	1.00	
az_tallo	-0.04 ^{ns}	-0.28 ^{ns}	0.35 ^{ns}	0.45 ^{ns}	0.16 ^{ns}	-0.4 ^{ns}	-0.40 ^{ns}	-0.23 ^{ns}	0.39 ^{ns}	-0.3 ^{ns}	0.49 ^{ns}	0.48 ^{ns}	1.00

* significativo a $P \leq 0.05$; **significativo a $P \leq 0.001$; significativo a $P \leq 0.0001$; ^{ns} no significativo. PH: potencial hídrico, PO: potencial osmótico, A: fotosíntesis, gs: conductancia estomática, TRC: tasa relativa de crecimiento, TAN: tasa de asimilación neta, TAF: tasa de área foliar, RPF: relación de peso foliar, AFE: área foliar específica, az_hoja: carbohidratos totales en hojas, az_raíz: carbohidratos totales en raíz, az_tallo: carbohidratos totales en tallo.

Cuadro 27. Correlación entre variables de relaciones hídricas, fotosíntesis, tasa relativa de crecimiento y componentes, carbohidratos totales de hoja, tallo y raíz en *P. acutifolius* G40142 a diferentes concentraciones de NaCl.

	PH	PO	PT	A	gs	TRC	TAN	TAF	RPF	AFE	Az_ hoja	Az_ raíz	Az_ tallo
PH	1.00												
PO	0.86***	1.00											
PT	-0.42 ^{ns}	-0.8***	1.00										
A	0.78**	0.80**	-0.55*	1.00									
Gs	0.80**	0.76**	-0.46 ^{ns}	0.93***	1.00								
TRC	0.58*	0.59*	-0.41 ^{ns}	0.67*	0.67*	1.00							
TAN	0.50*	0.45 ^{ns}	-0.25 ^{ns}	0.58*	0.63*	0.94***	1.00						
TAF	0.43 ^{ns}	0.55*	-0.50*	0.32 ^{ns}	0.19 ^{ns}	0.34 ^{ns}	0.04 ^{ns}	1.00					
RPF	0.39 ^{ns}	0.15 ^{ns}	0.16 ^{ns}	0.23 ^{ns}	0.46 ^{ns}	0.27 ^{ns}	0.38 ^{ns}	-0.29 ^{ns}	1.00				
AFE	0.29 ^{ns}	0.45 ^{ns}	-0.48 ^{ns}	0.25 ^{ns}	0.08 ^{ns}	0.23 ^{ns}	-0.04 ^{ns}	0.92***	-0.56*	1.00			
az_hoja	-0.25 ^{ns}	-0.29 ^{ns}	0.24 ^{ns}	-0.01 ^{ns}	-0.15 ^{ns}	0.08 ^{ns}	0.05 ^{ns}	-0.06 ^{ns}	0.00 ^{ns}	-0.1 ^{ns}	1.00		
az_raíz	0.18 ^{ns}	0.13 ^{ns}	-0.02 ^{ns}	0.30 ^{ns}	0.17 ^{ns}	0.13 ^{ns}	0.08 ^{ns}	0.27 ^{ns}	0.19 ^{ns}	0.11 ^{ns}	0.30 ^{ns}	1.00	
az_tallo	-0.06 ^{ns}	-0.19 ^{ns}	0.28 ^{ns}	-0.12 ^{ns}	-0.18 ^{ns}	-0.61*	-0.61*	-0.22 ^{ns}	0.12 ^{ns}	-0.23 ^{ns}	0.47 ^{ns}	0.02 ^{ns}	1.00

* significativo a $P \leq 0.05$; **significativo a $P \leq 0.001$; significativo a $P \leq 0.0001$; ^{ns} no significativo. PH: potencial hídrico, PO: potencial osmótico, A: fotosíntesis, gs: conductancia estomática, TRC: tasa relativa de crecimiento, TAN: tasa de asimilación neta, TAF: tasa de área foliar, RPF: relación de peso foliar, AFE: área foliar específica, az_hoja: carbohidratos totales en hojas, az_raíz: carbohidratos totales en raíz, az_tallo: carbohidratos totales en tallo.

Cuadro 28. Correlación entre variables de relaciones hídricas, fotosíntesis, tasa relativa de crecimiento y componentes, carbohidratos totales de hoja, tallo y raíz en *P. vulgaris* G04017 a diferentes concentraciones de NaCl.

	PH	PO	PT	A	gs	TRC	TAN	TAF	RPF	AFE	Az_ hoja	Az_ raíz	Az_ tallo
PH	1.00												
PO	0.92***	1.00											
PT	-0.37 ^{ns}	-0.69*	1.00										
A	0.66*	0.57*	-0.14 ^{ns}	1.00									
Gs	0.81***	0.75**	-0.31 ^{ns}	0.93**	1.00								
TRC	0.75**	0.85***	-0.65*	0.32 ^{ns}	0.53*	1.00							
TAN	0.83***	0.87***	-0.59*	0.51*	0.71**	0.89***	1.00						
TAF	-0.54*	-0.54*	0.29 ^{ns}	-0.54*	0.67*	-0.41 ^{ns}	-0.73**	1.00					
RPF	0.80***	0.77**	-0.38 ^{ns}	0.59*	0.66*	0.58*	0.80***	-0.71**	1.00				
AFE	-0.70**	-0.68*	0.35 ^{ns}	-0.60*	-0.70**	-0.52*	-0.78**	0.91***	-0.9***	1.00			
az_hoja	-0.69*	-0.67*	0.23 ^{ns}	-0.08 ^{ns}	-0.23 ^{ns}	-0.69*	-0.50 ^{ns}	0.02 ^{ns}	-0.42 ^{ns}	0.25 ^{ns}	1.00		
az_raíz	-0.05 ^{ns}	0.07 ^{ns}	-0.32 ^{ns}	-0.09 ^{ns}	0.04 ^{ns}	0.12 ^{ns}	0.29 ^{ns}	-0.51 ^{ns}	0.09 ^{ns}	-0.2 ^{ns}	0.35 ^{ns}	1.00	
az_tallo	-0.64*	-0.55*	0.04 ^{ns}	-0.05 ^{ns}	-0.19 ^{ns}	-0.59*	-0.37 ^{ns}	-0.05 ^{ns}	-0.29 ^{ns}	0.16 ^{ns}	0.94***	0.44 ^{ns}	1.00

* significativo a $P \leq 0.05$; **significativo a $P \leq 0.001$; significativo a $P \leq 0.0001$; ^{ns} no significativo. PH: potencial hídrico, PO: potencial osmótico, A: fotosíntesis, gs: conductancia estomática, TRC: tasa relativa de crecimiento, TAN: tasa de asimilación neta, TAF: tasa de área foliar, RPF: relación de peso foliar, AFE: área foliar específica, az_hoja: carbohidratos totales en hojas, az_raíz: carbohidratos totales en raíz, az_tallo: carbohidratos totales en tallo.

APENDECIE 2

AMORTIGUADOR

100mM Tris-Cl pH 8.0

10mM EDTA pH 8.0

AMORTIGUADOR DE LISIS (Extracción de ARN)

Trisborato 150 mM pH 7.5

EDTA 50 mM

SDS 2%

AMORTIGUADOR TAE (Amortiguador de electroforesis)

Tris- acetato 0.04 M

EDTA 0.001 M

SOLUCIONES PARA DESNATURALIZACIÓN DE GELES

Solución de ácido clorhídrico 0.25N

21.16ml de ácido clorhídrico para 250ml y queda 1N, diluir a 0.25N

SOLUCIÓN DE DESNATURALIZACIÓN

NaCl 1.5 M

NaOH 0.5 M

Solución de neutralización

NaCl 1.5 M

Tris-HCl 0.5 M pH 7.2

EDTA 0.001 M

AMORTIGUADOR MOPS 10X

MOPS pH 7.0 0.2 M

Acetato de sodio 20 mM

EDTA pH 8.0 10 Mm

SOLUCIONES PARA TRANSFERENCIA DE ARN

SSC 20X

NaCl 175.3 g concentración final: 3 M

Citrato de Sodio 88.2 g concentración final: 0.3 M

Ajustar pH a 7.0 y aforar a 1 L.