

---

# EFECTO DE LA SALINIDAD SOBRE EL CRECIMIENTO, DAÑO OXIDATIVO Y CONCENTRACIÓN FOLIAR DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN DOS VARIEDADES DE CARAOTA (*Phaseolus vulgaris* L.)

---

Marina García, Grisaly García Gil y María Elena Sanabria

## RESUMEN

La caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) es un cultivo cuyo rendimiento se reduce marcadamente en suelos salinos. Se condujo un experimento en cobertizo con las variedades 'Tacarigua' y 'Montalbán', a fin de estudiar el impacto de la salinidad sobre el crecimiento, el daño oxidativo foliar y el contenido de algunos metabolitos secundarios antioxidantes presentes en las hojas de este cultivo. Plantas de quince días de edad fueron estresadas con 40 u 80 mol·m<sup>-3</sup> de NaCl; a los 7 y 14 días después de iniciado el estrés salino (dases) se determinó el contenido relativo de clorofila mediante la lectura de valores SPAD, grado de peroxidación lipídica (GPL), concentración de alcaloides, fenoles totales y flavonoides en la hoja y, además, se estimó área foliar total, biomasa aérea y radical, y relación biomasa

radical/biomasa del vástago (R/V) a los 14 dases. La concentración de 80 mol·m<sup>-3</sup> de NaCl fue letal para ambas variedades, mientras que a 40 mol·m<sup>-3</sup> se redujeron todas las variables de crecimiento, excepto la relación R/V en 'Tacarigua'. Con base en los valores SPAD y GPL, 'Montalbán' mostró mayor daño oxidativo a nivel foliar que 'Tacarigua'. A los 14 dases, en las plantas estresadas se incrementó la concentración de alcaloides y flavonoides y disminuyó el contenido de fenoles totales, mostrando 'Tacarigua' mayor contenido de los primeros dos metabolitos que 'Montalbán'. Estos resultados muestran diferencias genotípicas en la respuesta a la salinidad en este cultivo, con ventajas para 'Tacarigua' sobre 'Montalbán'.

## Introducción

La salinidad en los suelos es uno de los principales factores ambientales que limitan la productividad agrícola, debido a la sensibilidad que manifiestan la mayoría de las plantas cultivadas ante este tipo de estrés (Maas, 1990). La distribución de suelos salinos es amplia y ha venido aumentando progresivamente, restringiendo el uso de las tierras de vocación agrícola a nivel mundial, por lo que es necesario que se concentren esfuerzos en la comprensión de los mecanismos fisiológicos de respuesta ante el estrés salino, a fin de generar información útil que pueda ser usada en programas de mejo-

ramiento genético dirigidos a incrementar su tolerancia a la salinidad en los cultivos (Pitman y Läuchli, 2002).

La presencia de sales en el suelo inhibe el crecimiento de las glicófitas debido a que provocan alteraciones en el balance hídrico, relaciones iónicas, distribución de asimilados y otros procesos fisiológicos y bioquímicos (Willadino y Cámara, 2005; Munns y Tester, 2008). Adicionalmente, en las plantas sometidas a estrés salino, se incrementa la producción de especies activas de oxígeno (EAO), debido a la alteración en la transferencia de electrones durante los procesos de fotosíntesis y respiración (Silveira *et al.*, 2005; Abdul *et al.*, 2009), lo que provo-

ca procesos degenerativos de biomoléculas, tales como peroxidación de lípidos (Shalata y Tal, 1998; Silveira *et al.*, 2005), oxidación de aminoácidos y fragmentación de proteínas (Bartels y Sunkar, 2005), inhibición de actividad enzimática (Gueta-Dahan *et al.*, 1997), y daños estructurales en ácidos nucleicos (Sairam y Tyagi, 2004) y en otras biomoléculas como la clorofila (Alves Da Costa *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2007), todo lo cual va en detrimento de las funciones vitales de la planta.

El funcionamiento del sistema antioxidante en condiciones salinas es relevante debido a su función protectora, controlando la proliferación de EAO. Este sistema

incluye compuestos enzimáticos, así como metabolitos no enzimáticos de naturaleza muy variada (Abdul *et al.*, 2009). Dentro del segundo grupo se incluyen los metabolitos secundarios; no obstante, es poco lo que se conoce sobre su acción depuradora (Hadacek, 2002) y su relación con la capacidad de adaptación a diferentes tipos de estrés abiótico, entre ellos la salinidad (Ali y Abbas, 2003; Wahid y Ghazanfar, 2006; Ksouri *et al.*, 2007).

La caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) es un cultivo de gran importancia en Venezuela, pero en los últimos años su producción ha decrecido considerablemente en el país y se ha señalado que la

---

**PALABRAS CLAVE / Crecimiento / Daño Oxidativo / Metabolitos Secundarios / *Phaseolus vulgaris* L. / Salinidad /**

Recibido: 14/04/2010. Modificado: 14/10/2010. Aceptado: 21/10/2010.

**Marina García.** Ingeniera Agrónoma, M.Sc. en Agronomía y Doctora en Ciencias Agrícolas, Universidad Central de Venezuela (UCV). Docente Investigadora, UCV, Venezuela Dirección: Instituto de Botánica

Agrícola, Facultad de Agronomía, UCV. Av. Universidad, El Limón. Maracay (2101), Estado Aragua. Venezuela. e-mail: garciam@agr.ucv.ve

**Grisaly García Gil.** Ingeniera Agrónoma y M.Sc. en Botánica Agrícola, UCV, Venezuela. Docente Investigadora, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA), Venezuela. e-mail: grisalysgarcia@ucla.edu.ve

**María Elena Sanabria.** Licenciada en Biología y M.Sc. en Botánica Aplicada, Universidad de Oriente, Venezuela. Docente Investigadora, UCLA, Venezuela. e-mail: mesanabria@ucla.edu.ve

## EFFECT OF SALINITY ON GROWTH, OXIDATIVE DAMAGE AND FOLIAR CONCENTRATION OF SOME SECONDARY METABOLITES IN TWO BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.) VARIETIES

Marina García, Grisaly García Gil and María Elena Sanabria

### SUMMARY

The yield of black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is strongly reduced on saline soils. A greenhouse experiment was conducted with the varieties 'Tacarigua' and 'Montalbán', in order to determine the impact of salinity on growth, oxidative damage and the possible role of some secondary metabolites on the antioxidant response of this crop. Fifteen days-old plants were stressed with NaCl (40 or 80 mol·m<sup>-3</sup>); at 7 and 14 days after saline stress (dass), relative chlorophyll content (RCC), lipid peroxidation grade (LPG) and alkaloids, total phenols and flavonoids concentration were determined; also total foliar area, root and shoot biomass and root biomass/shoot biomass ratio

(R/S) were measured at 14 dass. Concentration of 80 mol m<sup>-3</sup> NaCl resulted lethal for both varieties, and at 40 mol m<sup>-3</sup> all the growth variables were reduced, except R/S in Tacarigua'. Based on RCC and LPG values, 'Montalbán' showed higher oxidative damage than 'Tacarigua'. At 14 dass, concentration of alkaloid and flavonoid was increased and total phenols content decreased in both varieties, showing 'Tacarigua' a higher content of the first two metabolites than 'Montalbán'. These results showed genotypic differences in response to salinity in this crop, with advantages in 'Tacarigua' over 'Montalbán'.

## EFEITO DA SALINIDADE SOBRE O CRESCIMENTO, DANO OXIDATIVO E ACUMULAÇÃO FOLIAR DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM DUAS VARIEDADES DE *Phaseolus vulgaris* L.

Marina García, Grisaly García Gil e Maria Elena Sanabria

### RESUMO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma cultura sensível a sais e o seu rendimento é fortemente reduzido neste tipo de solos. Foi conduzido um experimento sob condições de estufa com as variedades 'Tacarigua' e 'Montalbán', a fim de determinar o impacto da salinidade sobre o crescimento dano oxidativo foliar e o conteúdo de alguns metabólitos secundários em folhas dessa cultura. Plantas de quinze dias de idade foram estressadas com NaCl (40 mol·m<sup>-3</sup> ou 80 mol·m<sup>-3</sup>); 7 e 14 dias após o início do estresse salino (ddes). Foi determinado o conteúdo relativo de clorofila mediante leitura de valores SPAD, grau de peroxidação lipídica (GPL) e concentração de alcalóides, fenóis totais e flavonóides; além foram determinadas a área foliar, biomassa aérea e radicular

e relação biomassa radicular/biomassa aérea (SR/AS) 14 ddes. A concentração de 80 mol m<sup>-3</sup> de NaCl foi letal para ambas as variedades, enquanto que com a concentração 40 mol m<sup>-3</sup> todas as variáveis de crescimento foram reduzidas, exceto a relação SR/SA na variedade 'Tacarigua'. Baseado nos valores de SAPD e GPL, 'Montalbán' mostrou maior dano oxidativo do que 'Tacarigua'. Em plantas estressadas observou-se incremento do conteúdo de alcalóides e flavonóides e diminuição do conteúdo de fenóis totais, mostrando 'Tacarigua' o maior conteúdo dos primeiros dois metabólitos do que 'Montalbán'. Esses resultados mostram diferenças genotípicas na resposta à salinidade nesta cultura, com vantagens para 'Tacarigua' sobre 'Montalbán'.

salinidad de los suelos es uno de los factores que limita su productividad (Morros, 1992; Villafañe, 2000). Esta especie es sensible a las sales; sin embargo, se ha demostrado una gran variabilidad intraespecífica en su respuesta ante este factor estresante (Moreno-Limón *et al.*, 2000; Gama *et al.*, 2007; Campos *et al.*, 2009). En cuanto al papel de los metabolitos secundarios en la respuesta de este cultivo ante condiciones salinas, se conoce muy poco.

El objetivo de esta investigación consistió en estudiar el efecto del estrés salino provocado con NaCl sobre el crecimiento, daño oxidativo y acumulación foliar de algunos metabolitos secundarios

con propiedad antioxidante en las variedades de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) 'Tacarigua' y 'Montalbán' durante la fase juvenil del cultivo, a fin de verificar si existen diferencias genotípicas entre éstas ante la salinidad del sustrato y su posible vinculación con el comportamiento del sistema antioxidante de este cultivo.

### Materiales y Métodos

El experimento se realizó en un umbráculo del Instituto de Botánica Agrícola, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela, (10°17'14"N y 67°36'02"O), a 480 msnm. Las condiciones climáticas dentro del umbráculo fue-

ron: densidad de flujo fotónico 625 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, temperatura diurna promedio 35°C, temperatura nocturna promedio 23°C y humedad relativa promedio 57%. Se utilizaron las variedades de caraota 'Tacarigua' y 'Montalbán', ampliamente usadas por los productores del país. Las semillas fueron suministradas por el banco de germoplasma de la Unidad de Conservación de Recursos Fitogenéticos, INIA/Ceniap, Maracay, Venezuela, y antes de la siembra, las mismas fueron desinfectadas con cloro comercial al 3% y bactericida Phytol.

Para la siembra se usaron bolsas negras de polietileno de 4kg de capacidad, conteniendo arena lavada de río

previamente esterilizada con calor. Se colocaron tres semillas por bolsa y luego de la emergencia se realizó un raleo para dejar solo una planta, conformando una población de 72 plantas (36 plantas/genotipo). El riego se efectuó con agua de grifo los primeros tres días después de la siembra (dds) y a partir de allí, con una solución nutritiva preparada siguiendo la fórmula recomendada por Cabrera (2003), cuya composición (mol·m<sup>-3</sup>) es 13,9 N; 2,1 P; 4,1 K; 0,5 Mg; 9,4 S; 3,8 Ca; 7,2×10<sup>-3</sup> Fe; 3,6×10<sup>-3</sup> Mn; 1,6×10<sup>-3</sup> Cu; 9,3×10<sup>-3</sup> B; 1×10<sup>-4</sup> Mo; y 6,1×10<sup>-3</sup> Zn. Esta solución se aplicó diluida al 50% de su concentración hasta el octavo dds, cuando se inició el

riego con solución nutritiva completa.

Transcurridos 15 dds se inició la salinización de las plantas, añadiendo a la solución base de riego NaCl 40mol·m<sup>-3</sup> (salinidad moderada) u 80mol·m<sup>-3</sup> (salinidad alta). Paralelamente se dejó un grupo control. Esas concentraciones se seleccionaron con base en la conductividad eléctrica umbral de la caraota, estimada en 1dS·m<sup>-1</sup> (Maas, 1990), lo que equivale a ~10mol·m<sup>-3</sup> de NaCl. Para ambos genotipos se distribuyeron aleatoriamente un total de 12 plantas por cada tipo de solución de riego aplicada; la concentración de las soluciones salinas se incrementó en forma progresiva para evitar que las plantas sufrieran shock osmótico, alcanzando la concentración de NaCl deseada al quinto día, a partir del cual se mantuvo el lapso de estrés por 14 días. Cabe indicar que 7 días después de iniciado el estrés salino (ddes), las plantas regadas con 80mol·m<sup>-3</sup> de NaCl mostraron una clorosis fuerte y a los 14 ddes la mayoría de las mismas había muerto. Por tal razón, este tratamiento no se consideró para la estimación de las variables que se describen seguidamente.

#### Crecimiento

Al final del experimento (14 ddes) se determinó en tres plantas por tratamiento el área foliar total, biomasa del vástago, biomasa de raíces y la relación biomasa de raíces/biomasa del vástago (R/V). Para estimar el área foliar, todas las hojas trifoliadas y los protófilos de cada planta se llevaron a un medidor de área foliar marca CI-202 (CID Inc., Camas, WA, EEUU). Para la determinación de biomasa, se separó el vástago y el sistema radical de cada planta y se secaron las muestras en una estufa (70°C) durante tres días; posteriormente, se registró el peso seco de

cada componente y se calculó la relación R/V.

#### Contenido relativo de clorofila

La estimación de esta variable se realizó a los 7 ddes y a los 14 ddes en tres plantas por tratamiento, usando para ello un método no destructivo consistente en medir, en cuatro posiciones distintas de la primera hoja trifoliada de cada planta, la absorbancia foliar de luz utilizando un medidor portátil SPAD-501 (Minolta Corp., Ramsey, NJ, EEUU), el cual registra esta medida como un valor numérico llamado unidades SPAD (*soil plant analysis development*), que ha mostrado una correlación alta con la estimación de la concentración de clorofila usando métodos espectrofotométricos (Caires *et al.*, 2005).

#### Peroxidación de lípidos

Esta determinación se realizó en tres plantas por tratamiento, sobre muestras de la primera hoja trifoliada, las cuales fueron preservadas en frío (-18°C) hasta su procesamiento. Se siguió el método propuesto por Cakmak y Horst (1991). Al momento de iniciar la determinación se preparó un extracto del material vegetal usando 0,1% ácido tricloroacético, luego se centrifugó, se obtuvo el sobrenadante y al mismo se añadió una solución de 0,5% ácido tiobarbitúrico y 20% ácido tricloroacético. Las muestras se incubaron a 95°C durante 30min y la reacción se detuvo utilizando hielo. Posteriormente se hizo la estimación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), que es una medida indirecta del grado de oxidación de los lípidos de las membranas celulares. Para ello se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Ge-

nesys 20 (Thermo Instruments, Madison, WI, EEUU) a 532 y 600nm. La concentración de TBARS se calculó por la diferencia de las dos absorbancias entre el coeficiente de extinción del ácido tiobarbitúrico (155m·M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>), y el resultado expresado en nmol·g<sup>-1</sup>.

#### Concentración de metabolitos secundarios

Para determinar el contenido de metabolitos secundarios se usaron muestras de la misma hoja utilizada para la estimación del grado de peroxidación lipídica, pero en este caso se tomó el peso fresco del material foliar y luego éste se maceró en etanol 96% por 48h a 27°C; posteriormente se obtuvo un filtrado que se concentró a presión reducida en un rota-

bolito respectivo durante la corrida, la cual fue aislada para su cuantificación (Vásquez *et al.*, 2008) y el resultado expresado en µg·g<sup>-1</sup> de peso fresco.

El análisis estadístico de los resultados se hizo según un diseño completamente aleatorizado, en un arreglo de tratamientos factorial 2×2 (2 variedades y 2 tipos de solución de riego, control y 40mol·m<sup>-3</sup> de NaCl), para un total de cuatro tratamientos con tres repeticiones cada uno. Se efectuó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, y en el caso de aquellas variables donde se obtuvieron diferencias significativas, se realizó una prueba de medias de Tukey, mediante el programa Statistix versión 8.0.

#### Resultados

TABLA I  
VALORES PROMEDIO DE ÁREA FOLIAR Y BIOMASA AÉREA EN DOS VARIEDADES DE CARAOTA SOMETIDAS A ESTRÉS SALINO CON 40mol·m<sup>-3</sup> NaCl DURANTE LA FASE JUVENIL

Factores	Área foliar (cm <sup>2</sup> )	Biomasa aérea (g)
Variedad		
Tacarigua	957,90 ±485,11 a	4,56 ±1,64 a
Montalbán	856,84 ±438,01 a	4,52 ±1,43 a
Solución de riego		
Control	1316,50 ±164,15 a	5,89 ±0,35 a
NaCl	498,20 ± 67,54 b	3,19 ±0,51 b
Variedad - solución de riego	0,505 ns	0,479 ns

Valores corresponden a las medias ±desviación estándar. Letras distintas dentro de cada factor indican diferencia significativa (P<0,01) de acuerdo a la prueba de medias de Tukey. ns: interacción no significativa.

vapor Brinkmann<sup>MR</sup> (Westbury, NY, EEUU) obteniéndose así el extracto etanólico. La cuantificación de alcaloides, fenoles totales y flavonoides se realizó por cromatografía ascendente de capa fina, utilizando cromatofolios de sílica gel (Merck AL TCL 20×20cm, sílica/gel 60 F<sub>254</sub>) y los solventes específicos indicados por Marcano y Hasegawa (2002) para cada uno de estos metabolitos. Una vez revelados los cromatofolios se observó un área irregular, correspondiente al ascenso del meta-

#### Crecimiento

La salinidad afectó notablemente el crecimiento en las dos variedades de caraota estudiadas, siendo ese efecto más drástico en las plantas tratadas con 80mol·m<sup>-3</sup> de NaCl, las cuales a los 7 ddes mostraron clorosis intervenal en las hojas trifoliadas y necrosis en los protófilos, mientras que a los 14 ddes 75% de ellas había muerto, lo que evidencia que esta concentración salina fue letal para

TABLA II  
VALORES PROMEDIO DE BIOMASA RADICAL Y  
RELACIÓN BIOMASA RADICAL/BIOMASA AÉREA (R/V),  
EN DOS VARIEDADES DE CARAOTA SOMETIDAS  
A ESTRÉS SALINO CON 40mol·m<sup>-3</sup> NaCl DURANTE  
LA FASE JUVENIL

Variedad / Solución de riego	Biomasa radical (g)	Relación biomasa (R/V)
Tacarigua		
Control	3,41 ±0,194 a	0,57 ±0,04 a
NaCl	1,86 ±0,061 b	0,61 ±0,09 a
Montalbán		
Control	3,81 ±0,187 a	0,72 ±0,07 a
NaCl	0,70 ±0,081 c	0,24 ±0,02 b
Variedad - solución de riego	0,000***	0,000***

Valores corresponden a las medias ±desviación estándar. Letras distintas dentro de cada columna indican diferencia significativa (P<0,01) de acuerdo a la prueba de medias de Tukey.  
\*\*\* Interacción altamente significativa.

ambas variedades. La aplicación de 40mol·m<sup>-3</sup> de NaCl redujo significativamente el área foliar y la biomasa aérea, en una magnitud similar en las dos variedades estudiadas, lo que refleja la no significancia de la interacción genotipo-solución de riego para estas dos variables (Tabla I).

En cuanto al sistema radical, la salinización con 40mol·m<sup>-3</sup> provocó una disminución del peso seco de las raíces en las dos variedades probadas, pero en la variedad 'Montalbán' esa reducción fue de mayor magnitud que en 'Tacarigua', razón por la cual la interacción genotipo-solución de riego resultó estadísticamente significativa para esta variable (Tabla II). En cuanto a la relación biomasa de raíces/biomasa del

vástago (R/V), en la variedad 'Tacarigua' esta relación no se afectó con la salinidad, mientras que en 'Montalbán' la misma se redujo significativamente; este comportamiento explica la significancia de la interacción genotipo-solución salina para la relación R/V (Tabla II).

#### Contenido relativo de clorofila

En cuanto al contenido relativo de clorofila, expresado como valores SPAD, el comportamiento de las dos variedades estudiadas fue distinto en los dos periodos considerados. A los 7 ddes, las plantas control de 'Montalbán' mostraron un valor significativamente mayor que las de 'Tacarigua', mientras que en las plantas tratadas con

40mol·m<sup>-3</sup> de NaCl, esta variable disminuyó muy ligeramente en 'Tacarigua' y se redujo significativamente en 'Montalbán' (Figura 1). A los 14 ddes, el valor SPAD en las plantas control aumentó en relación al observado a los 7 ddes, siendo este efecto mayor en 'Montalbán' que en 'Tacarigua', manteniéndose entre ellas la misma tendencia descrita para ese primer lapso, en tanto que en las plantas es-tresadas, las dos variedades mostraron una reducción significativa del valor SPAD, aunque en 'Montalbán' esta disminución fue más severa (Figura 1).

#### Peroxidación de lípidos

En los dos periodos considerados, el grado de peroxidación lipídica en las plantas control fue significativamente mayor en 'Montalbán' que en 'Tacarigua' (Figura 2). La aplicación de la solución de riego salina provocó un aumento significativo en esta variable, respecto al valor encontrado en las plantas control en ambos genotipos y en los dos periodos considerados. Tanto a los 7 ddes, como a los 14 ddes, la magnitud del aumento en el grado de peroxidación de lípidos, respecto al tratamiento control, fue mayor en 'Montalbán', lo que refleja un gra-

do de estrés oxidativo más pronunciado en esa variedad, siendo mayor la diferencia entre ambos genotipos durante el primer lapso de estrés considerado.

#### Concentración foliar de metabolitos secundarios

La acumulación foliar de alcaloides en las plantas control fue más alta en 'Tacarigua' que en 'Montalbán' en los dos periodos evaluados, siendo la diferencia entre ambas variedades sustancialmente mayor a los 7 ddes (Figura 3a). Asimismo se observó que a los 14 ddes, la primera variedad mostró un descenso notable en el contenido de este metabolito, en comparación a lo observado en el período anterior, mientras que en la segunda variedad éste se incrementó (Figura 3a). En cuanto a las plantas tratadas con NaCl, a los 7 ddes no se encontraron diferencias significativas en la concentración de alcaloides, respecto a las plantas control, en ninguna de las dos variedades, mientras que en la fase prolongada de estrés (14 ddes), se observó un incremento significativo en el contenido de este metabolito en ambos genotipos, en relación a lo observado en las plantas control. Cabe indicar que para los dos periodos considerados, el contenido foliar de alcaloides en las plantas bajo estrés salino fue mayor en 'Tacarigua' que en 'Montalbán' en un 78 y 24% aproximadamente, para el primer y segundo lapso de estrés, respectivamente.

En cuanto a la concentración de fenoles totales, en las plantas control ésta fue significativamente mayor en 'Tacarigua' que en 'Montalbán' a los 7 ddes, y a los 14 ddes su contenido fue similar en las dos variedades. En este último lapso la acumulación de fenoles totales se redujo en ambos genotipos, respecto a la observada en el período previo (Figura 3b). La salinización durante 7 días, no provocó cambios en la acu-

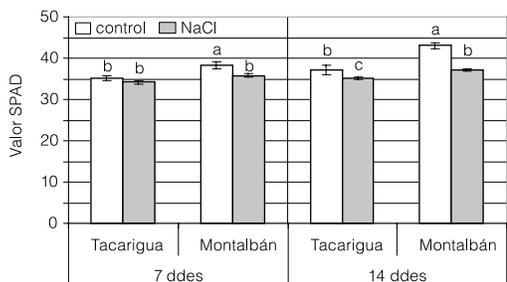


Figura 1. Contenido relativo de clorofila (valor SPAD) en la primera hoja trifoliada, en dos variedades de caraota tratadas con 40mol·m<sup>-3</sup> de NaCl, a los 7 y 14 días después de iniciado el estrés salino (ddes). Letras distintas en cada periodo de estrés indican diferencia estadística según la prueba de medias de Tukey (P<0,05).

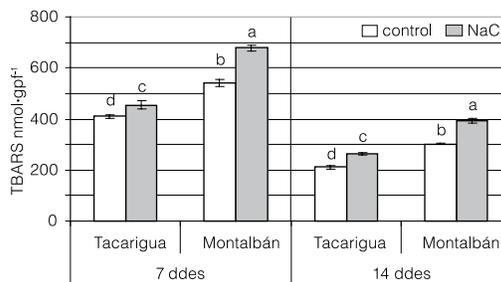


Figura 2. Grado de peroxidación de lípidos expresado como contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), en la primera hoja trifoliada, en dos variedades de caraota tratadas con 40mol·m<sup>-3</sup> de NaCl, a los 7 y 14 ddes. Letras distintas en cada periodo de estrés indican diferencia estadística según la prueba de medias de Tukey (P<0,05).

mulación foliar de fenoles totales en ‘Tacarigua’, mientras que en ‘Montalbán’ ésta se redujo significativamente. A los 14 ddes, el contenido foliar de fenoles totales disminuyó significativamente en las dos variedades, con relación al de las plantas del tratamiento control, siendo esa reducción de 42 y 55% en ‘Tacarigua’ y ‘Montalbán’, respectivamente (Figura 3b).

En relación a los flavonoides, a los 7 ddes no se detectó la presencia de este metabolito secundario ni en las plantas control, ni en las estresadas, mientras que en el segundo lapso evaluado (14 ddes), solo en las plantas tratadas con  $40\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$  de NaCl se evidenció la presencia de flavonoides, siendo su contenido significativamente mayor en ‘Tacarigua’ que en ‘Montalbán’.

## Discusión

Los efectos descritos del estrés salino impuesto sobre el crecimiento en las dos variedades estudiadas confirman la alta sensibilidad a la salinidad de este cultivo, el cual según Maas (1990) es uno de los más sensibles a este factor estresante. El tratamiento con la concentración salina alta ( $80\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$ ) resultó letal para las plantas, lo cual pone en evidencia el marcado efecto tóxico de esta sal para las variedades utilizadas. No obstante, este comportamiento no puede extrapolarse a condiciones salinas de campo, ya que en el suelo la salinidad por lo común es producto de la combinación de distintas sales, y el efecto tóxico de las sales simples es mucho mayor, comparado con el que provocan las mezclas de sales (García y Medina, 2010). La solución salina con  $40\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$  de NaCl

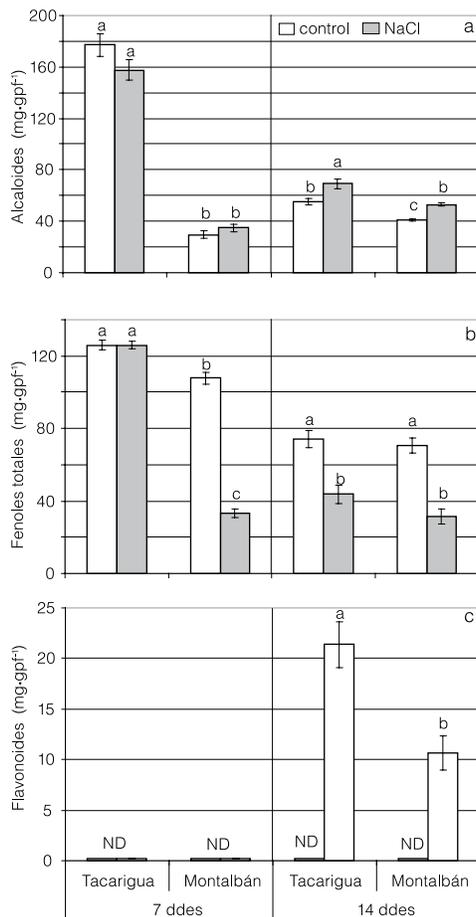


Figura 3. Contenido foliar de alcaloides (a), fenoles totales (b) y flavonoides (c) en dos variedades de caraota tratadas con  $40\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$  de NaCl, a los 7 y 14 ddes. Letras distintas en cada período de estrés indican diferencia estadística según la prueba de medias de Tukey ( $P < 0,05$ ). ND: valor no detectado.

afectó notablemente el área foliar y la acumulación de biomasa aérea, sin diferencias notables entre las dos variedades. Este comportamiento se corresponde con evidencias previas en este cultivo. Neumann *et al.* (1988) encontraron una reducción de 28% en el área foliar de plantas de un cultivar de caraota, al aplicar  $100\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$  de NaCl durante tres días, mientras que Ashraf y Bashir (2004) observaron un descenso del 50% del área foliar en plantas tratadas con  $35\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$  de NaCl durante 45 días. Brugnoli y Lauteri (1991) reportaron marchitez total de las hojas de una variedad de caraota al inducir estrés salino con  $50\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$  de NaCl por un lapso de 37 días. Estos resultados coinciden además con lo encontrado por Campos *et al.*

(2009), quienes detectaron una reducción similar en el área de los protófilos y la acumulación de biomasa aérea, respecto al grupo control, en las dos variedades probadas en el presente estudio cuando éstas fueron estresadas con NaCl ( $40\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$ ) durante la fase plantular.

En las dos variedades el tratamiento con  $40\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$  de NaCl provocó una reducción de la biomasa de raíces, pero la magnitud de la misma fue sustancialmente mayor en la variedad ‘Montalbán’ que en ‘Tacarigua’. Adicionalmente, la relación biomasa de la raíz/biomasa del vástago (R/V) no se afectó en ‘Tacarigua’ pero en ‘Montalbán’ experimentó una reducción significativa, lo que demostró la capacidad del primer genotipo para mantener la proporción de asimilados destinados al crecimiento del sistema radical bajo la condición salina impuesta, lo cual no ocurrió en ‘Montalbán’. Este hallazgo resulta de interés ya que se ha demostrado en especies como el sorgo (Boursier y Läu-chli, 1990) y en caña de azúcar (García y Medina, 2010), que aquellos genotipos con mayor relación raíz/vástago usualmente tienen mayor capacidad para enfrentar el efecto osmótico provocado por la salinidad y, por consiguiente, son menos sensibles al estrés salino.

Similarmente, Gama *et al.* (2007) encontraron, en plántulas de caraota, un aumento en la relación raíz/vástago en los genotipos que presentaron mayor sobrevivencia bajo estrés salino, mientras que lo contrario ocurrió en aquellos que mostraron el efecto más adverso ante las sales. Campos *et al.* (2009) estresaron las mismas variedades usadas en este estudio con  $40\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$  de NaCl durante la fase plantular y encontraron un incremento en la relación raíz/vástago respecto a las plantas control, siendo éste de mayor magnitud en

‘Tacarigua’ que en ‘Montalbán’, lo cual sugiere que la tendencia de la primera variedad para sostener un desarrollo adecuado de raíces en condiciones salinas, es consistente durante toda la etapa de desarrollo vegetativo de esta especie. Sin embargo, el crecimiento de la parte aérea es afectado en forma similar por la salinidad en las dos variedades, tanto en fase plantular como en la juvenil. Es posible que el mantenimiento de la relación raíz/vástago en condiciones de salinidad tenga un impacto favorable en fases posteriores de la ontogenia de ‘Tacarigua’, permitiéndole enfrentar mejor el efecto de estrés hídrico impuesto por el estrés salino.

En cuanto al contenido relativo de clorofila en la hoja, las plantas no estresadas de ‘Montalbán’ mostraron un valor sustancialmente mayor que las de ‘Tacarigua’ en los dos períodos evaluados, lo cual puede considerarse como una cualidad favorable para la primera variedad, tomando en cuenta el papel central de este pigmento en la fotosíntesis. Sin embargo, en las plantas de ‘Tacarigua’ sometidas a la condición salina, el contenido relativo de clorofila solo disminuyó en el período de estrés más prolongado, mientras que en ‘Montalbán’ éste se redujo significativamente en los dos lapsos evaluados, y a los 14 ddes la magnitud de esa disminución fue más pronunciada en este segundo genotipo. Esa reducción puede deberse a la inhibición en la síntesis de precursores de la clorofila, lo cual por lo común se acentúa a medida que se prolonga el período de estrés (Koca *et al.*, 2007). Asimismo, estudios previos en genotipos de sorgo (Netondo *et al.*, 2004) y de avena (Zhao *et al.*, 2007) con tolerancia salina diferencial, han mostrado una tendencia clara a una mayor reducción en el contenido de clorofila y en la eficiencia fotosintética en los genotipos más sensibles a las sales, respecto a aquellos de menor sensibilidad. Con base en

esto, podría inferirse una sensibilidad menor al estrés salino impuesto en 'Tacarigua' en relación a 'Montalbán', siendo este comportamiento más evidente cuando la duración del estrés fue más breve.

Por otra parte, bajo la condición salina el grado de peroxidación de lípidos en los dos periodos considerados fue mayor en 'Montalbán' que en 'Tacarigua', siendo la diferencia entre ambas variedades más evidente en el lapso de estrés más corto, lo que sugiere una mayor proliferación de especies activas de oxígeno (EAO) en la primera variedad. Tomando en cuenta que la peroxidación lipídica ha sido reconocida por diferentes autores como un indicador del daño oxidativo inducido por la salinidad (Hernández *et al.*, 2001; Koca *et al.*, 2007), estos resultados evidencian una mejor protección contra el daño oxidativo en 'Tacarigua', especialmente cuando el periodo de estrés es más breve.

Al analizar el efecto del tratamiento salino sobre la acumulación foliar de metabolitos secundarios, se determinó que en los dos materiales genéticos evaluados el contenido de alcaloides no varió significativamente a los 7 días, pero a los 14 días éste aumentó en ambas variedades. La concentración de fenoles totales disminuyó en 'Montalbán' a los 7 días y se redujo en ambas variedades a los 14 días, mientras que el grupo de los flavonoides solo fue detectado en las plantas salinizadas, en el lapso de estrés más prolongado, siendo su contenido significativamente mayor en 'Tacarigua'. Con base en estos resultados, puede inferirse que los alcaloides y flavonoides pudieran tener un papel importante en la protección antioxidante ante el estrés salino en caraota, especialmente a medida que este se prolonga, ejerciendo probablemente una acción depuradora de las EAO, e inhibiendo el efecto de estrés oxidativo que éstas provocan. Por el contrario, los fenoles conside-

rados en su totalidad, no parecen tener un papel en la respuesta antioxidante de las variedades estudiadas.

Es de hacer notar que en la variedad 'Tacarigua', a los 14 días de la concentración de alcaloides y flavonoides fue significativamente mayor que en 'Montalbán', lo que sugiere una mayor protección antioxidante ante el estrés salino impuesto en la primera variedad cuando el lapso del mismo fue más largo. Anitha y Kumari (2006) y Ahmad *et al.* (2008) han mostrado un efecto estimulante del NaCl sobre la síntesis de alcaloides en plantas medicinales. Asimismo, en genotipos de cebada (Ali y Abbas, 2003) y de caña de azúcar (Wahid y Ghazanfar, 2006), se ha descrito un incremento significativo en la producción de flavonoides en respuesta al estrés salino, lo cual coincide con lo observado en las variedades de caraota estudiadas cuando el periodo de estrés se hizo más prolongado. Cabe resaltar que los flavonoides, poseen la capacidad de limitar la peroxidación mediante la modificación del arreglo de lípidos estructurales, reduciendo la fluidez de la membrana, lo cual restringe la difusión de los radicales libres y con ello el grado de estrés oxidativo (Ali y Alqurainy, 2006).

### Conclusiones

En condiciones salinas la variedad 'Tacarigua' se comportó mejor que 'Montalbán', en cuanto a su capacidad para sostener una inversión adecuada de asimilados hacia el desarrollo del sistema radical y una relación raíz/vástago más alta, lo cual puede conferirle ventajas para crecer en condiciones de cultivo en suelos con salinidad moderada, al permitirle explorar mejor el sustrato para enfrentar la condición de suplencia hídrica restringida que impone la salinidad. Dada la importancia de este carácter, el mismo podría ser útil en programas de mejoramiento genético, como criterio para la

selección de materiales de caraota que toleren mejor la salinidad. El estrés salino indujo disminución en el contenido relativo de clorofila e incrementó la peroxidación de lípidos a nivel foliar, y esos efectos fueron más pronunciados en 'Montalbán' que en 'Tacarigua', lo que refleja una mejor protección antioxidante en esta última variedad. A los 14 días, las plantas salinizadas de las dos variedades mostraron un aumento en el contenido foliar de alcaloides y flavonoides y una disminución de fenoles totales, lo que indica un posible papel protector de los dos primeros metabolitos secundarios ante el estrés oxidativo, especialmente cuando el estrés salino se prolonga. Bajo la condición salina impuesta, la concentración foliar de alcaloides y flavonoides fue más elevada en 'Tacarigua', lo que sugiere un posible papel de esos dos metabolitos en mejorar la respuesta de la caraota al estrés salino.

### AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) de la Universidad Central de Venezuela por el financiamiento de la presente investigación a través del proyecto N°. PG-01-00-7102-2008.

### REFERENCIAS

Abdul C, Riadh K, Gopi R, Manivannan P, Jallali I, Jasim H, Chang-Xing Z, Hong-Bo S, Panneerselvam R (2009) Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. *Acta Physiol. Plant.* 31: 427-436.

Ahmad M, Ahmad S, Aslam J, Mujib A, Mahmooduzzfar A (2008) Salinity stress enhances production of solasodine in *Solanum nigrum* L. *Chem. Pharm. Bull.* 56: 17-21.

Ali A, Alqurainy F (2006) Activities of antioxidants in plants under environmental stress. En Motohashi N (Ed.) *The Lutein-Prevention and Treatment for Diseases*. Transworld Research Network. India. pp. 187-256.

Ali R, Abbas H (2003) Response of salt stressed barley seedling to phenylurea. *Plant Soil Env.* 49: 158-162.

Alves da Costa P, Dias de Azevedo-Neto A, Alves-Bezerra M, Prisco J, Gomes-Filho E (2005) Antioxidant-enzymatic system of two *Sorghum* genotypes differing in salt tolerance. *Braz. J. Plant Physiol.* 17: 353-361.

Anitha S, Kumari B (2006) Reserpine accumulation in NaCl treated calli of *Rauvolfia tetraphylla* L. *Sci. Asia* 32: 417-419.

Ashraf M, Bashir A (2004) 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.

Bartels D, Sunkar R (2005) Drought and salt tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 24: 23-58.

Boursier P, Läubli A (1990) Growth responses and mineral nutrient relations of salt-stressed *Sorghum*. *Crop Sci.* 30: 1126-1233.

Brugnoli E, 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 Physiol.* 95: 628-635.

Cabrera G (2003) *Hidroponia Casera (Cultivo sin Suelo)*. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay. 90 pp.

Caires O, Guedes de Carvalho J, Dias F, Pereira de Pádua T, Pinho P (2005) Uso do SPAD-502 na avaliação dos teores foliares de clorofila, nitrogênio, enxofre, ferro e manganês do algodoeiro herbáceo. *Pesq. Agropec. Bras.* 40: 517-521.

Cakmak I, Horst W (1991) Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plant.* 83: 463-468.

Campos G, García M, Pérez D (2009) Efecto de la salinidad sobre el crecimiento en dos genotipos de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) durante la fase plantular. *Mem. XVIII Congreso Venezolano de Botánica*. Barquisimeto, Venezuela.

Gama P, Inanaga S, Tanaka K, Nakazawa R (2007) Physiological response of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings to salinity stress. *Afr. J. Biotechnol.* 6: 79-88.

- García M, Medina E (2010) Crecimiento y morfología radical en dos genotipos de caña de azúcar sometidos a salinización con sales simples o suplementadas con calcio. *Rev. Fac. Agron. LUZ* 27: 17-38.
- Gueta-Dahan Y, Yaniv Z, Zilinskas B, Ben-Hayyim B (1997) Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in citrus. *Planta* 203: 460-469.
- Hadacek F (2002) Secondary metabolites as plant traits: Current assessment and future perspectives. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21: 273-322.
- Hernández J, Ferrer M, Jiménez A, Ros Barceló A, Sevilla F (2001) Antioxidant system and O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiol.* 127: 817-831.
- Koca H, Bor M, Özdemir F, Türkan İ (2007) The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and proline content of sesame cultivars. *Env. Exp. Bot.* 60: 344-351.
- Ksourí R, Megdiche W, Debez A, Falleh H, Grignon C, Abdelly C (2007) Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Physiol. Biochem.* 45: 244-249.
- Maas E (1990) Crop salt tolerance. En Tanji K (Ed.) *Agricultural Salinity Assessment and Management*. American Society of Civil Engineers. Nueva York, EEUU. pp. 262-304.
- Marcano D, Hasegawa M (2002) *Fitoquímica Orgánica*. 2ª ed. Universidad Central de Venezuela. 588 pp.
- Moreno-Limón S, Maiti R, Foroughbakh Ch (2000) Genotypic variability in *Phaseolus* cultivars exposed to salinity at the germination stage. *Crop Res.* 19: 487-492.
- Morros M (1992) Caraota, producción artesanal de semillas: una alternativa para pequeños y medianos productores. *Fonaiap Divulga* 40: 4-6.
- Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 651-681.
- Netondo G, Onyango J, Beck E (2004) *Sorghum* and salinity: II. Gas exchange and chlorophyll fluorescence of *Sorghum* under salt stress. *Crop Sci.* 44: 806-811.
- Neumann P, Van Volkenburgh E, Cleland R (1988) Salinity stress inhibits bean leaf expansion by reducing turgor, not wall extensibility. *Plant Physiol.* 88: 233-237.
- Pitman M, Läuchli A (2002) Global impacts of salinity and agricultural ecosystems. En Läuchli A, Lüttge U (Eds.) *Salinity: Environment - Plant - Molecules*. Kluwer. Alphen aan den Rijn, Netherlands. pp. 3-20.
- Sairam R, Tyagi A (2004) Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Curr. Sci.* 86: 407-421.
- Shalata A, Tal M (1998) The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennelii*. *Physiol. Plant.* 104: 169-174.
- Silveira J, Lima J, Cavalcanti F, Maia J, Viégas R (2005) Salt induced oxidative response in plants: damage or protection? En Custodio R, Araújo E, Gómez L, Cavalcante U (Eds.) *Estresses Ambientais: Danos e Benefícios em Plantas*. MXM Gráfica. Recife, Brasil. pp. 106-117.
- Vásquez C, Aponte O, Morales J, Sanabria M, García G (2008) Biological studies of *Oligoniscus punicae* (Acari: Tetranychidae) on grapevine cultivars. *Exp. Appl. Acarol.* 45: 59-69.
- Villafañe R (2000) Calificación de suelos por sales y dispersión por sodio y su aplicación en la evaluación de tierras. *Agron. Trop.* 50: 645-658.
- Wahid A, Ghazanfar A (2006) Possible involvement of some secondary metabolites in salt tolerance of sugarcane. *J. Plant Physiol.* 163: 723-730.
- Willadino L, Cámara T (2005) Aspectos fisiológicos do estresse salino em plantas. En Custodio R, Araújo E, Gómez L y Cavalcante U (Eds.) *Estresses ambientais: Danos e benefícios em plantas*. MXM Gráfica e editora. Recife, Brasil. pp. 127-137.
- Zhao G, Ma B, Ren C (2007) Growth, gas exchange, chlorophyll fluorescence, and ion content of naked oat in response to salinity. *Crop Sci.* 47: 123-131.