

Efectos del ácido salicílico en la germinación y crecimiento inicial de plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

Effects of salicylic acid on the germination and initial growth of bean seedlings (*Phaseolus vulgaris* L.)

Efeitos do ácido salicílico sobre a germinação e o crescimento inicial das plântulas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)

Luis Alfredo Rodríguez-Larramendi^{1*}, Mauricio González-Ramírez¹, Marco Antonio Gómez-Rincón¹, Francisco Guevara-Hernández², Miguel Ángel Salas-Marina¹ y Alder Gordillo-Curiel¹

¹Facultad de Ingeniería, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), sede Villa Corzo, Chiapas, México. Correos electrónicos: alfredo.rodriguez@unicach.mx, maugonzramirez@outlook.es, marc_anthony_13@hotmail.com, miguel.salas@unicach.mx, alder.gordillo@unicach.mx. ²Facultad de Ciencias Agronómicas Campus V, Universidad Autónoma de Chiapas (UNACH), Villaflores, Chiapas, México. Correo electrónico: fragueher@prodigy.net.mx. Fuente de financiamiento: Proyecto “Efecto fisiológico de la aplicación de productos bio-activos en cultivos agrícolas y forestales de interés económico para la región Frailesca, Chiapas” (DSA/103.5/16/10564), a través del Programa PRODEP, de la Secretaría de Educación Pública de México (SEP).

Resumen

Con el objetivo de evaluar el efecto de concentraciones y tiempos de imbibición de las semillas en ácido salicílico (AS) sobre la germinación y el crecimiento inicial de plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L. var. ‘Negro’) se montó un experimento en un diseño completamente al azar en condiciones de laboratorio. Los tratamientos consistieron en cinco concentraciones de AS (0; 0,01; 0,025; 0,05 y 0,1 mM) y tiempos de imbibición de 1, 2, 3 y 4 horas. Se registró el porcentaje de germinación, crecimiento de raíces primarias y secundarias, así como el crecimiento del vástago y emisión de hojas primarias. Los resultados

Recibido el 24-01-2017 • Aceptado el 04-03-2017

*Autor de correspondencia. Correo electrónico: alfredo.rodriguez@unicach.mx

demonstraron que embeber las semillas durante 1 hora a concentración de 0,01 mM incrementó la germinación. A las 2 y 3 horas de imbibición, la germinación se incrementó a concentraciones de 0,01 y 0,025 mM, mientras que concentraciones de AS superiores a 0,025 mM por más de 3 horas de imbibición inhibieron la germinación. El crecimiento de la raíz principal, cantidad de raíces secundarias, longitud del vástago y porcentaje de hojas primarias formadas fue mayor a una concentración de 0,01 mM y se inhibió a concentraciones superiores a 0,025 mM y tiempos de imbibición mayores a las 3 horas. Se concluyó que el tiempo de imbibición de las semillas determinó el efecto del AS, probablemente como resultado de un proceso acumulativo del AS que provocó un desbalance hormonal inhibitorio de la división celular.

Palabras clave: ácido salicílico, germinación, crecimiento, *Phaseolus vulgaris*.

Abstract

In order to evaluate the effect of concentrations and time of imbibition of seeds on salicylic acid (SA) on germination and early growth of bean seedlings (*Phaseolus vulgaris* L. var. 'Negro') an experiment was carried out in a completely randomized design under laboratory conditions. The treatments consisted of five concentrations of SA (0, 0.01, 0.05, 0.025 and 0.1 mM) and imbibition times of 1, 2, 3 and 4 hours. The percentages of germination, growth of primary and secondary roots, as well as the growth of the stem and emission of primary leaves were registered. The results show that by soaking the seeds for 1 hour at a concentration of 0.01 mM germination increases. At 2 and 3 hours of imbibition, germination increased at concentrations of 0.01 and 0.025 mM, while concentrations of SA higher than 0.025 mM for more than 3 hours of imbibition inhibited germination. Growth of the main root, number of secondary roots, stem length and percentage of primary leaves was greater at a concentration of 0.01 mM and inhibited at concentrations greater than 0.025 mM and inhibition times greater than 3 hours. It is concluded that the time of inhibition of seeds determines the effect of SA, probably because of a cumulative process of SA that causes inhibitory cell division because of a hormonal imbalance.

Key words: salicylic acid, germination, growth, *Phaseolus vulgaris*.

Resumo

A fim de avaliar o efeito de concentrações e tempos de absorção de ácido salicílico (SA) pelas sementes sobre a germinação e o crescimento inicial de mudas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L. var. 'Negro'), um experimento foi montado em um projeto em condições de laboratório inteiramente casualizado. Os tratamentos consistiram de cinco concentrações de AS (0; 0,01; 0,025; 0,05 ou 0,1 mM) e tempos de imersão de 1, 2, 3 e 4 horas. A porcentagem de germinação, crescimento de raízes primárias e secundárias e crescimento do caule e emissão de folhas primárias foi

gravado. Os resultados mostraram que a imersão das sementes durante 1 hora a una concentração de 0,01 mM aumentou a germinação. Ao fim de 2 e 3 horas de embebição, germinação aumentou a concentrações de 0,01 e 0,025 mM, enquanto que concentrações acima de 0,025 mM, por mais de 3 horas de germinação inibida embebição. O crescimento da raiz principal, quantidade raízes secundárias, comprimento do caule e percentagem de folhas primárias formada era superior a uma concentração de 0,01 mM e foi inibida em concentrações superiores a 0,025 mM e embebição vezes superiores ao fim de 3 horas. Concluiu-se que as sementes de tempo de embebição determinaram o efeito do AS, provavelmente como resultado de um processo cumulativo que causou uma inibição em desequilíbrio hormonal de divisão celular.

Palavras-chave: ácido salicílico, germinação, crescimento, *Phaseolus vulgaris*.

Introducción

El frijol se originó en Mesoamérica, concretamente en México, desde Jalisco hasta Oaxaca y de ahí la especie migró a Sudamérica (Hernández-López *et al.*, 2013). Esto, unido a los aportes nutritivos de este cultivo a la dieta humana, realza su importancia y la necesidad de seguir investigando mecanismos fisiológicos que expliquen su crecimiento y desarrollo.

El efecto de la aplicación de ácido salicílico (AS) en el crecimiento de plantas cultivadas no se ha estudiado mucho en comparación con otros reguladores de crecimiento. La mayoría de las investigaciones sobre este tema no incluyen el AS, o su función apenas se describe (Santner y Estelle, 2009; Santner *et al.*, 2009; Wolters y Jurgens, 2009).

Rivas-San Vicente y Plasencia (2011), publicaron una extensa revisión que documenta el efecto del AS exógeno en diferentes cultivos. Estos autores demostraron que el

Introduction

Bean has its origin in Mesoamerica, especially in Mexico from Jalisco to Oaxaca, later the specie migrated to South America (Hernández-López *et al.*, 2013). This, along to the nutritional provision of this crop to the human diet makes this specie important and creates the need of investigating the physiological mechanisms that would explain its growth and development.

The application effect of salicylic acid (SA) in the growth of cropped plants has not been extensively studied compared to other growing regulators. Most of the investigations about this topic do not include SA, and its function is barely described (Santner and Estelle, 2009; Santner *et al.*, 2009; Wolters and Jurgens, 2009).

Rivas-San Vicente and Plasencia (2011) published an extensive revision that states the effect of the exogenous SA in different crops. These authors show that the effect of SA in some of the studied physiological processes is

efecto del AS en algunos procesos fisiológicos estudiados, resultó a veces contradictorio y dependió de las concentraciones utilizadas y la especie vegetal estudiada.

Las respuestas de las plantas al efecto del AS y particularmente ante situaciones de estrés biótico son las más abundantes en la literatura. Las concentraciones endógenas de AS en la savia del floema de plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.) y de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) se incrementaron tras la infección con patógenos que condujeron a la resistencia sistémica adquirida (RSA) (Métraux *et al.*, 1990; Yalpani *et al.*, 1991). En conjunto, estas observaciones sugirieron que el AS actuó como una señal de larga distancia en la RSA.

Senaratna *et al.* (2000) demostraron que las concentraciones de AS y sus derivados pueden conferir tolerancia al estrés térmico e hídrico en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Al respecto se observó que las plantas cultivadas a partir de semillas embebidas en disoluciones acuosas de AS o ácido acetilsalicílico (ASA) a concentraciones de 0,1-0,5 mM, mostraron mayor tolerancia al calor y al estrés por sequía.

El papel del AS en la germinación de semillas ha sido controvertido, ya que hay resultados que demuestran que puede inhibir la germinación o aumentar el vigor de la semilla. Los efectos contradictorios reportados pueden estar relacionados con las concentraciones de AS empleadas. En *Arabidopsis thaliana* Heynh,

sometimes contradictory and depends on the concentrations used and the vegetal specie studied.

The responses of the plants to the SA effect and particularly to the situations to the biotic stress are extensively reported in papers. The endogenous concentrations of SA in the sap of the phloem in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) and tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) increased after the infection with pathogens that caused the acquired systemic resistance (ASR) (Métraux *et al.*, 1990; Yalpani *et al.*, 1991). Generally, these observations suggest that SA acts as a long-distance signal in the ASR.

Senaratna *et al.* (2000) showed that SA concentrations and the derivate may give tolerance to the thermal and hydric stress in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) and tomato (*Solanum lycopersicum* L.). On this matter, it was observed that plants cropped after seeds embedded in aqueous dilutions of SA or acetylsalicylic acid (ASA) at concentrations of 0.1-0.5 mM, showed more tolerance to the heat and stress by the drought.

The role of the SA in the seed germination has been controverted, since there are results that show that it can inhibit the germination or increase the vigor of the seed. The contradictory effects reported might be related to the concentrations of SA employed. In *Arabidopsis thaliana* Heynh, concentrations of SA superior to 1 mM retard or even inhibit the germination (Rajjou *et al.*, 2006). In barley (*Hordeum vulgare* L.), doses over 0.250 mM of SA

concentraciones de AS superiores a 1 mM retardaron o incluso inhibieron la germinación (Rajjou *et al.*, 2006). En cebada (*Hordeum vulgare* L.) dosis por encima de 0,250 mM de AS inhibieron la germinación (Xie *et al.*, 2007), mientras que la germinación del maíz (*Zea mays* L.) fue completamente inhibida por dosis que fueron desde 3 a 5 mM (Guan y Scandalios, 1995). El efecto del AS como inhibidor de la germinación se debió presumiblemente a un estrés oxidativo inducido. En las plantas de *A. thaliana*, tratadas con AS (1-5 mM), los niveles de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) aumentaron hasta tres veces como resultado del incremento de las actividades de Cu, Zn-superóxido dismutasa e inactivación de las enzimas degradantes de H_2O_2 , catalasa y ascorbato peroxidasa (Rao *et al.*, 1997).

En cuanto a la forma de aplicación, algunos autores han demostrado que aspersiones de bajas concentraciones de AS al follaje de plántulas de maíz incrementaron el tamaño de sus raíces, independientemente de las condiciones de cultivo (Tucuch-Haas *et al.*, 2016). Similarmente, Larqué-Saavedra *et al.* (2010) concluyeron que las plántulas de tomate (*S. lycopersicum*) asperjadas con AS a concentración de 1 μ M aumentaron significativamente el crecimiento de la raíz, el tallo y el área foliar. Sánchez-Chávez *et al.* (2011) usaron otra forma de aplicar el AS a las plantas y encontraron que al incorporarlo al agua de riego a concentraciones de 0,1 y 0,2 mM las plantas de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.) cv. Chichimeca

inhibited germination (Xie *et al.*, 2007), while the germination of corn (*Zea mays* L.) is completely inhibited by doses that go from 3 to 5 mM (Guan and Scandalios, 1995). The effect of SA as germination inhibitor is presumably due to induced oxidative stress. In plants of *A. thaliana*, treated with SA (1-5 mM), the levels of hydrogen peroxide (H_2O_2) increased even three times as a result of the increment of the activities of Cu, Zn-superoxide dismutase and inactivation of degrading enzymes of H_2O_2 , catalase and ascorbate peroxidase (Rao *et al.*, 1997).

Regarding the forms of applications, some authors have stated that low-concentration aspersions of SA to the foliage of corn seedlings increase the size of the roots, independent behavior to the crop conditions (Tucuch-Haas *et al.*, 2016). Similarly, Larqué-Saavedra *et al.* (2010) concluded that tomato seedlings (*S. lycopersicum*) irrigated with SA at concentrations of 1 μ M significantly increased the growth of the root, stem and foliar area. Sánchez-Chávez *et al.* (2011) used other application forms when applying the SA to the plants and found out that when incorporating it to the irrigation water at concentrations of 0.1 and 0.2 mM, plants of Jalapeño pepper (*Capsicum annuum* L.) cv. Chichimeca significantly increased the root and total foliar biomass production. Rodríguez-Larramendi *et al.* (2008) showed that concentrations of 0.01 mM stimulated the emission of secondary branches and fruit cluster by plant and inflorescence in tomato plants. Likewise, the diameter and

aumentaron significativamente la producción de biomasa foliar, en raíces y total. Rodríguez-Larramendi *et al.* (2008), demostraron que concentraciones de 0,01 mM, estimularon la emisión de ramas secundarias y de infrutescencias por planta y de inflorescencias en plantas de tomate. Igualmente, tanto el diámetro como la biomasa fresca de los frutos de plantas provenientes de semillas tratadas con AS a 0,01 mM fueron superiores en comparación con el resto de los tratamientos. Bajo estas mismas condiciones aumentó el contenido de vitamina C y de ácido cítrico en los frutos. Tanto el rendimiento por planta como por área fue mayor en las plantas cuyas semillas fueron tratadas con AS a una concentración de 0,01 mM (Rodríguez-Larramendi *et al.*, 2008).

Los antecedentes ofrecen evidencias contundentes sobre los efectos del AS en plantas de diferentes especies vegetales. Sin embargo, en los estudios publicados no se muestran resultados relacionados con el efecto del tiempo de imbibición de las semillas con AS sobre las respuestas fisiológicas de las plantas. El objetivo de esta investigación fue conocer el efecto combinado de bajas concentraciones exógenas de AS y el tiempo de imbibición de las semillas sobre la germinación y el crecimiento inicial de plántulas de frijol.

Materiales y métodos

Localización

La investigación se llevó a cabo durante el mes de noviembre de 2016, en el Laboratorio de Ciencias

the fresh biomass of fruits from plants coming from seeds treated with SA at 0.01 mM were higher compared to the rest of the treatments. Under these conditions, the content of vitamin C and citric acid increased in the fruits. The yield of the plant and the area was higher in plants whose seeds were treated with SA at a concentration of 0.01 mM (Rodríguez-Larramendi *et al.*, 2008).

The background information offer undeniable proofs about the SA effects in plants of different plant species. However, in the studies published there are not results related to the effect of the inhibition time of seeds with SA about the physiologic responses of the plants. The objective of this research was to know the combined effect of low exogenous concentrations of SA and the inhibition time of seeds on the germination and the initial growth of bean seedlings.

Materials and methods

Location

The research was carried out on November, 2016, at the Science Laboratory of Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), Villa Corzo campus, Chiapas, Mexico, located at 16°09'45.6" N, 93°16'40.3" W, at an altitude of 400 masl. The mean daily temperature in the laboratory was of 27 ± 2 °C and a relative humidity of 78%.

Concentrations of salicylic acid (SA)

The preparation of SA concentrations was performed

de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH) sede Villa Corzo, Chiapas, México, ubicada en los 16°09'45,6" N, 93°16'40,3" O, a una altitud de 400 msnm. La temperatura media diurna dentro del laboratorio fue de 27 ± 2 °C y una humedad relativa del 78%.

Concentraciones de ácido salicílico (AS)

La preparación de las concentraciones de AS se realizó tomando como referencia su masa molar. Se preparó una solución acuosa de 1 mM de AS con agua destilada estéril a partir de la cual se realizaron diluciones con concentraciones acuosas de 0,1; 0,05; 0,025 y 0,01 mM. Se consideró el testigo con agua destilada estéril como concentración de 0 mM de AS.

Material vegetal y diseño experimental

Se seleccionaron semillas de frijol (*P. vulgaris* var. 'Negro') con 95% de germinación y 99% de pureza. Se diseñó un experimento completamente al azar bifactorial con seis repeticiones. El factor A estuvo compuesto por cinco niveles, cuatro concentraciones de AS y un testigo con agua destilada. El factor B consistió en cuatro tiempos de imbibición de las semillas en AS: 1, 2, 3 y 4 h. Se colocaron 20 semillas en placas Petri, replicadas seis veces, sobre papel de filtro de acuerdo con las respectivas concentraciones y tiempos de imbibición, lo cual totalizó 120 semillas por tratamiento. Las semillas fueron sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio (2%) durante 4 minutos para su desinfección y posteriormente lavadas

considerando as a reference their molar mass. A 1 mM aqueous solution of SA was prepared with sterile distilled water from which were done different dilutions with aqueous solutions of 0.1; 0.05; 0.025 and 0.01 mM. The control with sterile distilled water was considered as a 0 mM concentration of SA.

Plant material and experimental design

Bean seeds (*P. vulgaris* L. var. 'Negro') were selected with 95% of germination and 99% of pureness. An experiment was designed completely random bifactorial with six replications. Factor A was composed by five levels, four concentrations of SA and a control with distilled water. Factor B consisted on four inhibition times of the seed in SA: 1, 2, 3 and 4 h. Twenty seeds were located on Petri plates, replicated six times on filtered paper according to the corresponding concentrations and inhibition times, which totalized 120 seeds by treatment. Seeds were immersed in a sodium hypochlorite solution (2%) for 4 min for their disinfection, later were washed with distilled water. Seeds were soaked daily with 40 mL of sterile distilled water per Petri plate in order to keep them hydrate.

Evaluated variables

Germinated seeds were counted from the second day of established the experiment until the fifth days, and the germination percentage (GP, %) was calculated on each treatment. Within 5 days were determined the longitude of the main root (LMR) of all germinated seeds expressed in centimeters, the number of secondary

con agua destilada. Para mantener las semillas hidratadas fueron remojadas diariamente con 40 mL de agua destilada estéril por placa Petri.

VARIABLES EVALUADAS

A partir del segundo día de establecido el experimento y hasta el quinto día, se contaron las semillas germinadas y se calculó el porcentaje de germinación (PG, %) en cada tratamiento. A los 5 días se determinó la longitud de la raíz principal (LRP) de todas las semillas germinadas expresada en centímetros, el número de raíces secundarias (NRS), la longitud del vástago (LV) en centímetros. Se define la LV como la suma de la longitud del hipocótilo y del epicótilo. Se determinó también el porcentaje de plántulas con hojas primarias totalmente formadas (PPHP, %).

La LRP, la LV y el NRS se expresaron como el promedio de los datos del total de semillas germinadas en cada placa Petri.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se sometieron a análisis de varianza bifactorial y las medias se compararon a través de la prueba de Tukey para un nivel de significación (α) del 5%. Previo a todos los análisis estadísticos se comprobó el cumplimiento de la homogeneidad de varianzas, a través de la prueba de Bartlett (Snedecor y Cochran, 1989). Para todos los análisis se usó el software Statistica (StatSoft, 2008).

Resultados y discusión

Germinación

El mayor PG se logró en el tratamiento con AS a una concentración de 0,01 mM a 1 h

roots (NSR), the longitude of the stem (LS) in centimeters. Longitude of the stem (LS) is defined as the sum between the longitude of the hypocotyl and the epicotyl. The seedling percentage was also determined with totally formed primary leaves (TFPL, %).

Longitude of the main root, LS and NSR were expressed as the average of the data from the total of germinated seeds on each Petri plate.

Statistical analysis

The data was submitted to a two-factor variance and means were compared using Tukey's test for a significance level (α) of 5%. Before all the statistical analysis, the fulfillment of the variance homogeneity was proved using Bartlett test (Snedecor and Cochran, 1989). For all the analysis the software Statistica was used (StatSoft, 2008).

Results and discussion

Germination

The highest GP was achieved with SA at a concentration of 0.01 mM at 1 h (95.8%) and 3 h (85.0%) of seed inhibition without significant differences with the control treatment at 1 h (85.0%) of inhibition (figure 1). Inhibition of the germination was observed as increased the exposure time of the seeds, especially with the increment of SA concentrations over 0.025 mM. According to the results obtained by Rao *et al.* (1997), it is probable that at concentrations higher to 0.025 mM, the levels of hydrogen peroxide (H_2O_2) have increased due to the inactivation of the enzymes degrading H_2O_2 , catalase and ascorbate peroxidase, causing the inhibition of the germination.

(95,8%) y 3 h (85,0%) de imbibición de las semillas sin diferencias significativas con el tratamiento testigo a 1 h (85,0%) de imbibición (figura 1). Se observó una inhibición de la germinación en la medida que aumentó el tiempo de exposición de las semillas, sobre todo con el incremento de las concentraciones de AS por encima de 0,025 mM. De acuerdo con los resultados obtenidos por Rao *et al.* (1997), fue probable

A reduction pattern of germination was observed at concentrations higher to 0.025 mM until values lower to 60% and more evidently when the inhibition time of the seeds increased, which suggests that the effect of SA concentrations depends on the exposure time to this hormone. It is probable that with the increment of the concentration and the inhibition time of seeds in SA there would be a hormone unbalance, mainly affecting

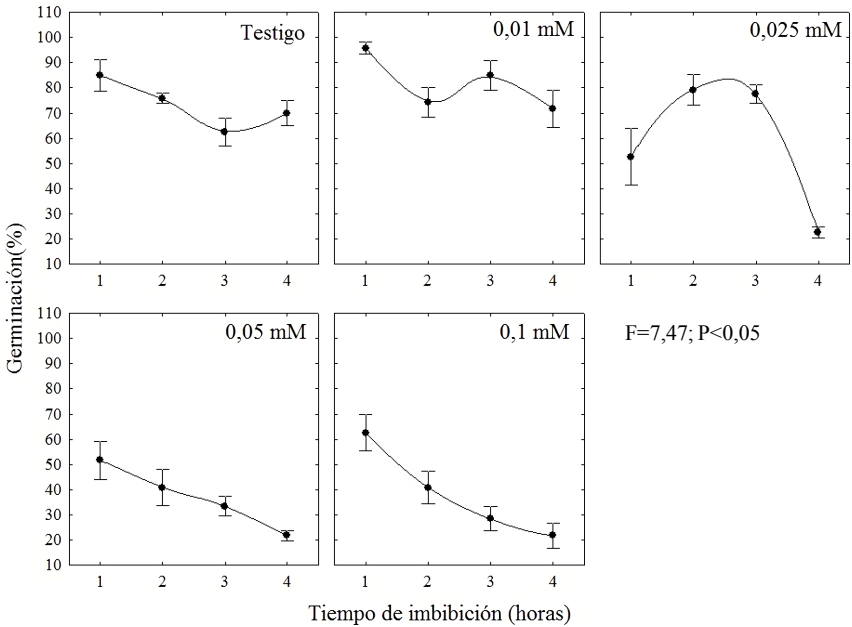


Figura 1. Efecto de concentraciones de ácido salicílico sobre la germinación de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a diferentes tiempos de imbibición. Las líneas verticales representan el error estándar de la media para n= 6.

Figure 1. Concentration effects of salicylic acid on the germination of bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.) at different imbibition times. Vertical lines represent the standard error of the mean for n= 6.

que a concentraciones superiores a 0,025 mM, los niveles de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) hayan aumentado producto de la inactivación de las enzimas degradantes de H_2O_2 catalasa y ascorbato peroxidasa, por lo que condujo a la inhibición de la germinación.

A concentraciones superiores a 0,025 mM, fue notable un patrón de disminución de la germinación hasta valores inferiores al 60% y más evidente cuando aumentó el tiempo de imbibición de las semillas; lo cual sugirió que el efecto de las concentraciones de AS dependió del tiempo de exposición a esta hormona. Es probable que cuando incrementan las concentraciones y el tiempo de imbibición de las semillas en AS se produzca un desbalance hormonal, principalmente afectándose al incrementar los niveles endógenos de ácido abscísico y de este modo inhibir la germinación. Al respecto, se ha demostrado que en *A. thaliana*, concentraciones de AS superiores a 1 mM retardaron o incluso inhibieron la germinación (Rajjou *et al.*, 2006). En cebada, dosis mayores de 0,250 mM de AS también inhibieron la germinación de las semillas (Xie *et al.*, 2007), mientras que la germinación del maíz fue completamente inhibida por dosis que estuvieron entre 3 a 5 mM (Guan y Scandalios, 1995). Nótese como en todos los casos, la respuesta de la germinación a la aplicación exógena de AS fue diversa y varió en concentraciones, incluso difirió con los resultados logrados en esta investigación en cuanto a las diferencias en las concentraciones inhibitorias de las altas concentraciones de AS exógeno.

when increasing the endogenous levels of abscisic acid; thus, inhibiting the germination. On this regard, it has been proved that in *A. thaliana*, SA concentrations superior to 1 mM delay or even inhibit germination (Rajjou *et al.*, 2006). In barley, SA doses higher to 0.250 mM also inhibited the seed germination (Xie *et al.*, 2007), while the corn germination is completely inhibited by doses that go from 3 to 5 mM (Guan and Scandalios, 1995). In all the cases, the response of the germination to the exogenous application of SA was diverse and varied in concentrations; it even differs with the results obtained in the current research regarding the differences in the inhibitory concentrations of high concentrations of exogenous SA.

The latter corroborates the reports of the investigations published by Rivas-San Vicente and Plasencia (2011), who affirm that the role of SA in the seed germination has been controverted, since there are contradictory results related to the concentrations of SA used that suggest that germination might inhibit or the vigor of the seeds might inhibit.

The germination is submitted to oxidative stress at concentrations higher to 0.025 mM (Rivas-San Vicente and Plasencia, 2011). In *Arabidopsis* plants treated at concentrations from 1-5 mM the levels of hydrogen peroxide (H_2O_2) increased three times as a result of the increment of the activities Cu, Zn-superoxide dismutase and inactivation of enzymes degrading of H_2O_2 catalase and ascorbate peroxidase (Rao *et al.*, 1997), and

Lo antes expuesto corroboró los reportes de las investigaciones publicadas por Rivas-San Vicente y Plasencia (2011), quienes afirmaron que el papel del AS en la germinación de semillas ha sido controvertido, ya que hubo resultados contradictorios, relacionados con las concentraciones de AS utilizadas, que sugirieron que podría inhibir la germinación o aumentar el vigor de la semilla.

A concentraciones mayores a 0,025 mM la germinación estuvo sometida a un estrés oxidativo (Rivas-San Vicente y Plasencia, 2011). En plantas de *Arabidopsis* tratadas con concentraciones de 1-5 mM los niveles de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) aumentaron hasta tres veces como resultado del incremento de las actividades de Cu, Zn-superóxido dismutasa e inactivación de las enzimas degradantes de H_2O_2 , catalasa y ascorbato peroxidasa (Rao *et al.*, 1997) y que su rol en el mantenimiento de homeostasis redox celular mediante la regulación de la actividad de las enzimas antioxidantes (Durner y Klessig, 1995; 1996; Slaymaker *et al.*, 2002), solo se produjo a concentraciones menores de AS y/o a los mínimos tiempos de imbibición de la semilla.

Crecimiento de las raíces

La LRP fue mayor en el tratamiento con AS a 0,01 mM con diferencias significativas respecto al testigo y con el resto de los tratamientos a 1 y 2 h de imbibición de las semillas (figura 2). Las semillas expuestas a 0,025 mM y 3 h de imbibición, mostraron mayor crecimiento radicular, sin diferencias significativas con relación al tratamiento con AS a 0,01 mM. El NRS siguió una tendencia similar a la

the maintenance of cellular redox homeostasis through the regulation of the activity of antioxidant enzymes (Durner and Klessig, 1995; 1996; Slaymaker *et al.*, 2002), has produced at lower concentrations of SA and/or the minimal inhibition times of the seed.

Growth of the roots

Longitude of the main root was higher in the treatment with SA at 0.01 mM with significant differences regarding the control and with the rest of the treatments at 1 and 2 h of seed inhibition (figure 2). Seeds exposed to 0.025 mM and 3 h of inhibition showed higher radicular growth without significant differences in relation to the treatment with SA at 0.01 mM. Number of the secondary root had a similar tendency to LMR, being superior in the treatment with SA at 0.01 mM for 1 to 3 h of inhibition (figure 2) which agrees with Echeverría-Machado *et al.* (2007), who found that with the application of low doses of SA is produced an increase in the size of the cortex and the apparition of lateral roots, Larqué-Saavedra and Martín-Mex (2007), mentioned that one of the mechanisms that causes the increment of the bioproductivity with SA is the root modification (Gutiérrez-Coronado *et al.*, 1998; Tucuch-Hass *et al.*, 2016), inducing changes in the longitude, weight, perimeter, area (Villanueva-Cohuo *et al.*, 2009; Larqué-Saavedra *et al.*, 2010) and root morphology (Echeverría-Machado *et al.*, 2007).

When the seeds are exposed to concentrations superior to 0.025 mM an inhibitory effect of the radicular growth was observed. Likewise,

LRP, siendo superior en el tratamiento con AS a 0,01 mM durante 1 y 3 h de imbibición (figura 2) lo cual coincidió con Echeverría-Machado *et al.* (2007) quienes encontraron que con la aplicación de bajas concentraciones de AS se produjo un aumento del tamaño de la cofia y la aparición de raíces laterales, así como con Larqué-Saavedra y Martín-Mex

the growth of the roots inhibited at an inhibition time superior to 3 h, though with the treatment 0.01 mM this reduction was produced lineally and after 2 h of inhibition. These results suggest that a prolonged time of seed immersion in SA increases their endogenous concentrations and probably modify the hormonal contents, especially those that inhibit

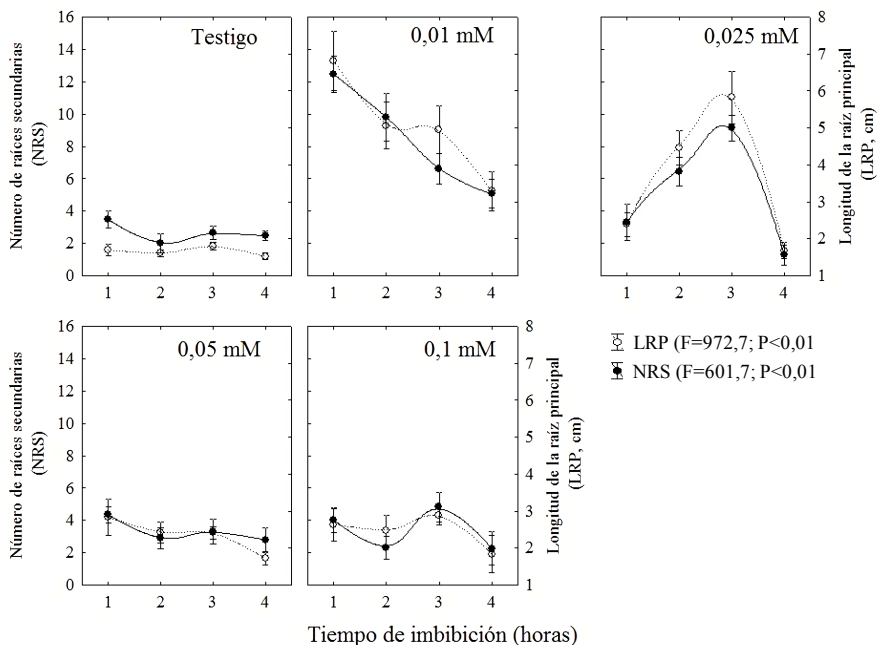


Figura 2. Efecto de concentraciones de ácido salicílico sobre la longitud de la raíz principal LRP) y el número de raíces secundarias (NRS) de plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a diferentes tiempos de imbibición. Las líneas verticales representan el error estándar de la media para n= 6.

Figure 2. Concentration effect of salicylic acid on the longitude of the main root (LMR) and the number of secondary roots (NSR) of bean seedlings (*Phaseolus vulgaris* L.) at different imbibition times. Vertical lines represent the standard error of the mean for n= 6.

(2007) quienes mencionaron que uno de los mecanismos por el cual se incrementó la bioproduktividad con AS, fue a través de la modificación de la raíz (Gutiérrez-Coronado *et al.*, 1998; Tucuch-Hass *et al.*, 2016), induciéndose cambios en la longitud, biomasa, perímetro, área (Villanueva-Cohuo *et al.*, 2009; Larqué-Saavedra *et al.*, 2010) y morfología de la raíz (Echeverría-Machado *et al.*, 2007).

Cuando las semillas se expusieron a concentraciones superiores a 0,025 mM se observó un efecto inhibitorio del crecimiento radicular. De igual manera, se inhibió el crecimiento de las raíces, a tiempo de imbibición superior a las 3 h, aunque en el tratamiento de 0,01 mM esta disminución se produjo de forma lineal y a partir de las 2 h de imbibición. Estos resultados sugirieron que un tiempo prolongado de inmersión de las semillas en AS aumentó sus concentraciones endógenas y probablemente modificaron los contenidos hormonales, sobre todo de aquellas que en concentraciones elevadas, inhibieron el crecimiento de las raíces, lo cual coincidió con los resultados obtenidos por Khan *et al.* (2010), quienes encontraron que aplicaciones de AS en altas concentraciones podría inhibir o tener efectos negativos en el crecimiento de plantas de frijol.

Estos resultados coincidieron con los publicados por Shakirova *et al.* (2003) quienes encontraron que en plántulas de trigo (*Triticum aestivum* L.) tratadas con 50 μ M de AS se observó una mayor división celular dentro del meristemo apical de las raíces. Evidentemente, por encima de esta concentración el efecto estimulante

the root growth at high concentrations, agreeing to the results reported by Khan *et al.* (2010), who found that SA applications in high concentrations might inhibit or have negative effects in the growth of bean plants.

These results agree to the ones published by Shakirova *et al.* (2003), who found that in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.) treated with 50 μ M of SA was observed a higher cellular division in the apical meristem of the roots. Over this concentration, the stimulating effect of SA changes until becoming inhibitory.

The growth of the stem and emission of primary leaves

The percentage of seedlings with totally formed primary leaves (TFPL) expressed in the percentage from the total of seeds germinated in different inhibition time, significantly modified in function of the concentration and the exposure time of seeds at SA (figure 3). The concentration of 0.01 mM induced higher TFPL, inducing higher effect at 1 and 2 h of inhibition, but significantly reduced when exposing the seeds at inhibition times with SA superior to 3 h.

The promoting effect of SA on TFPL might be due to a higher production of growth regulators. As affirmed by Rivas-San Vicente and Plasencia (2011), that SA is a vegetal hormone that acts coordinately with other hormones such as cytokines, ethylene, gibberellins, auxins and jasmonic acid to impinge on the growth and development of the plants, even though the biochemical mechanisms that mediate many of the responses are still unknown.

del AS cambió hasta convertirse en inhibitorio.

Crecimiento del vástago y emisión de hojas primarias

El porcentaje de plántulas con hojas primarias totalmente formadas (PPHP), expresado en porcentaje del total de semillas germinadas en diferentes tiempos de imbibición, se modificó significativamente en función de la concentración y el tiempo de exposición de las semillas al AS (figura 3). La concentración de 0,01 mM indujo mayor PPHP, induciéndose mayor efecto a 1 y 2 h de imbibición, pero disminuyó significativamente al exponerse las semillas a tiempos de imbibición con AS superiores a 3 h.

El efecto promotor del AS sobre el PPHP presumiblemente se debió a una mayor producción de reguladores del crecimiento. Esto demostró, tal y como lo afirmaron Rivas-San Vicente y Plasencia (2011), que el AS es una hormona vegetal que actuó de manera coordinada con otras hormonas como las citokininas, el etileno, las giberelinas, las auxinas y el ácido jasmónico para incidir en el crecimiento y desarrollo de las plantas, aunque los mecanismos bioquímicos que mediaron muchas de esas respuestas, aún se desconocen.

La respuesta de la LV a la aplicación de AS (figura 3), siguió la misma tendencia que el PPHP. Resultados similares fueron publicados por Tucuch-Haas *et al.* (2016) en el cultivo de maíz (*Z. mays*) y en otras especies como *Carica papaya* (Martin-Mex *et al.*, 2012), *S. lycopersicum* (Larqué-Saavedra *et al.*, 2010) y *Chrysanthemum morifolium* (Villanueva-Couoh *et al.*, 2009), en los

The response of the LS to the application of SA (figure 3) had the same tendency of TFPL. Similar results were published by Tucuch-Haas *et al.* (2016) in corn (*Z. mays*) and in other species such as *Carica papaya* (Martin-Mex *et al.*, 2012), *S. lycopersicum* (Larqué-Saavedra *et al.*, 2010) and *Chrysanthemum morifolium* (Villanueva-Couoh *et al.*, 2009), reporting increments in the height and diameter of the stem.

The results found in this research promote new questions about the effect of SA in the cropped plants in relation to the inhibition time of seeds and their possible physiological and biochemical implications. In practical terms, it allows creating the bases to generate strategies of seed pre-germinative treatments to induce more germination and growth of bean plants.

Conclusions

The seed inhibition for 1 and 2 h at SA concentrations of 0.01 and 0.025 mM stimulated the seed germination of bean. The inhibition times superior to 2 h inhibit the germination.

The growth of the roots and stem, as well as the emission of primary leaves of bean seedlings increased when seeds embedded at SA concentrations of 0.01 mM and 0.025 mM for 3 h. The inhibition times superior to 3 h inhibit the initial growth of bean seedlings.

End of English version

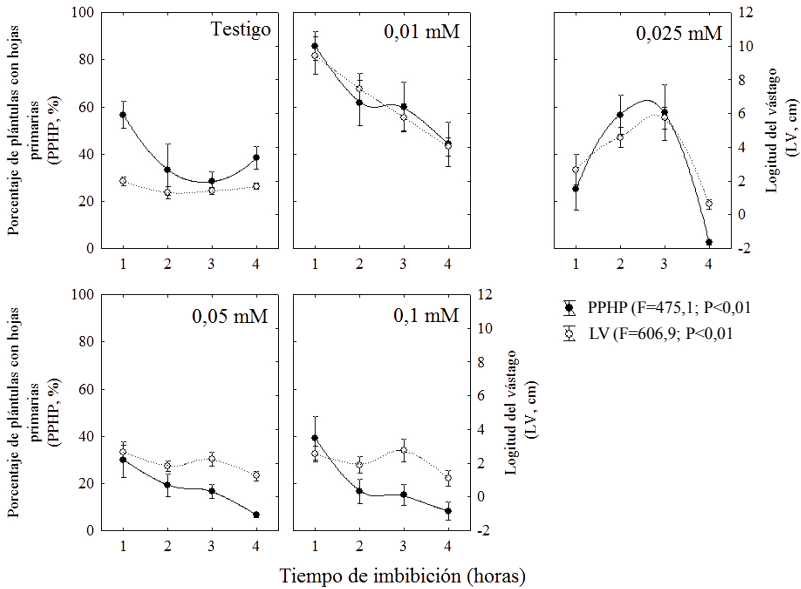


Figura 3. Efecto de concentraciones de ácido salicílico sobre porcentaje de plántulas con hojas primarias (PHP) y la longitud del vástago (LV) de plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a diferentes tiempos de imbibición. Las líneas verticales representan el error estándar de la media para n= 6.

Figure 3. Concentration effect of salicylic acid on the seedling percentage with primary leaves (SPL) and the longitude of the rod (LR) of bean seedlings (*Phaseolus vulgaris* L.) at different inhibition times. Vertical lines represent the standard error of the mean for n= 6.

que se reportaron incrementos en la altura y diámetro del tallo.

Los resultados encontrados en esta investigación abren nuevas e interesantes interrogantes del efecto del AS en las plantas cultivadas relacionadas con el tiempo de imbibición de las semillas y sus posibles implicaciones fisiológicas y bioquímicas. En términos prácticos, permite crear las bases para generar estrategias de tratamientos pre-germinativos de semillas para inducir mayor germinación y crecimiento de plantas de frijol.

Conclusiones

La imbibición de semillas durante 1 y 2 h y a concentraciones de AS de 0,01 y 0,025 mM estimuló la germinación de semillas de frijol. Tiempos de imbibición superiores a las 2 h inhiben la germinación.

El crecimiento de las raíces y del vástago, así como la emisión de hojas primarias de plántulas de frijol se incrementaron cuando las semillas se embebieron a concentraciones de AS de 0,01 mM y a 0,025 mM durante 3

h. Tiempos de imbibición superiores a las 3 h inhiben el crecimiento inicial de las plántulas de frijol.

Literatura citada

- Durner, J. and D.F. Klessig. 1995. Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. 92:11312-11316.
- Durner, J. and D.F. Klessig. 1996. Salicylic acid is a modulator of tobacco and mammalian catalases. J. Biol. Chem. 271:28492-28501.
- Echeverría-Machado, I., M.R.M. Escobedo-G. and A. Larqué-Saavedra. 2007. Responses of transformed *Catharanthus roseus* roots to femtomolar concentrations of salicylic acid. Plant Physiol. Biochem. 45:501-507.
- Guan, L. and J.G. Scandalios. 1995. Developmentally related responses of maize catalase genes to salicylic acid. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. 92:5930-5934.
- Gutiérrez-Coronado, M.A., C. Trejo-López and A. Larqué-Saavedra. 1998. Effects of salicylic acid on the growth of roots and shoots in soybean. Plant Physiol. Biochem. 36(8):563-565.
- Hernández-López, V., P.M.L. Vargas-Vázquez, J.S. Muruaga-Martínez, S. Hernández-Delgado y N. Mayek-Pérez. 2013. Origen, domesticación y diversificación del frijol común. Avances y perspectivas. Rev. Fitotec. Mex. 36(2):95-104.
- Khan, N.A., S. Syeed, A. Masood, R. Nazar and N. Iqbal. 2010. Application of salicylic acid increases contents of nutrients and antioxidative metabolism in mungbean and alleviates adverse effects of salinity stress. Int. J. Plant Biol. 1:1-8.
- Larqué-Saavedra, A. and R. Martín-Mex. 2007. Effect of salicylic acid on the bioproductivity of plants. p. 15-24. In: Salicylic acid: A plant hormone. Hayat S. and A. Ahmad (Eds.). Springer. The Netherlands.
- Larqué-Saavedra, A., R. Martín-Mex, A. Nexticapan-Garcéz, S. Vergara-Yoisura y M. Gutiérrez-Rendón. 2010. Efecto del ácido salicílico en el crecimiento de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Revista Chapingo Serie Horticultura 16(3):183-187.
- Martin-Mex, R., A. Nexticapan-Garcez and A. Larqué Saavedra. 2012. Potential benefits of salicylic acid in food production. p. 299-313. In: Hayat S., A. Ahmad (Eds.). Salicylic acid, plant growth and development. Springer, Dordrecht. The Netherlands.
- Métraux, J.P., H. Signer, J. Ryals, E. Ward, M. Wyss-Benz, J. Gaudin, K. Raschdorf, E. Schmid, W. Blum and B. Inverardi. 1990. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. Science 250:1004-1006.
- Rajjou, L., M. Belghazi, R. Huguet, C. Robin, A. Moreau, C. Job and D. Job. 2006. Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on *Arabidopsis* seed germination and establishment of early defense mechanisms. Plant Physiol. 141:910-923.
- Rao, M.V., G. Paliyath, D.P. Ormrod, D.P. Murr and C.B. Watkins. 1997. Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂-metabolizing enzymes. Plant Physiol. 115:137-149.
- Rivas-San Vicente and M.J. Plasencia. 2011. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. J. Exp. Bot. 62(10):3321-3338.
- Rodríguez-Larramendi, L., Y. Matos, P. Santos y S. Infante. 2008. Crecimiento, floración y fructificación en plantas de tomate (*Lycompersicom esculentum* L., var. Vyta) provenientes de semillas tratadas con ácido salicílico. Centro Agrícola 35(1):29-34.
- Sánchez-Chávez, E., R. Barrera-Tovar, E. Muñoz-Márquez, D.L. Ojeda-Barrios y A. Anchondo-Nájera. 2011. Efecto del ácido salicílico sobre biomasa, actividad fotosintética, contenido nutricional del chile jalapeño. Revista Chapingo Serie Horticultura 17(1):63-66.
- Santner A. and M. Estelle. 2009. Recent advances and emerging trends in plant hormone signaling. Nature 459:1071-1078.

- Santner, A., L.I.A. Calderon-Villalobos and M. Estelle. 2009. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nat. Chem. Biol.* 5:301-307.
- Senaratna, T., D. Touchell, E. Bunn and K. Dixon. 2000. Acetyl salicylic acid (Aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Plant Growth Regul.* 30:157-161.
- Shakirova, M.F., R.A. Sakhabutdinova, V.M. Bezrukova and D.R. Fatkhutdinova. 2003. Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. *Plant Sci.* 164(3):317-322.
- Slaymaker, D.H., D.A. Navarre, D. Clark, O. del Pozo, G.B. Martin and D.F. Klessig. 2002. The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant capacity and plays a role in the hypersensitive response. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.* 99:11640-11645.
- Snedecor, G.W. and W.G. Cochran 1989. *Statistical Methods*, Eighth Edition, Iowa State University Press. 507 p.
- StatSoft Inc. (2008). *STATISTICA (Data Analysis Software System)*, version 8.0. Disponible en: <http://www.statsoft.com/>.
- Tucuch-Haas, C., J. Alcántar-González, G. Volke-Haller, V.H. Salinas-Moreno, Y. Trejo-Téllez, I. Libia y A. Larqué-Saavedra. 2016. Efecto del ácido salicílico sobre el crecimiento de raíz de plántulas de maíz. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 7(3):709-716.
- Villanueva-Couoh, E., G. Alcántar-González, P. Sánchez-García, M. Soria-Fregoso y A. Larqué-Saavedra. 2009. Efecto del ácido salicílico y dimetilsulfóxido en la floración de *Chrysanthemum morifolium* (Ramat) Kitamura en Yucatán. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 15:25-31.
- Wolters, H. and G. Jurgens. 2009. Survival of the flexible: hormonal growth control and adaptation in plant development. *Nat. Rev. Genet.* 10:305-317.
- Xie, Z., Z.L. Zhang, S. Hanzlik, E. Cook and Q.J. Shen. 2007. Salicylic acid inhibits gibberellin-induced alpha-amylase expression and seed germination via a pathway involving an abscisic-acid inducible WRKY gene. *Plant Mol. Biol.* 64:293-303.
- Yalpani, N., P. Silverman, T.M.A. Wilson, D.A. Kleier and I. Raskin. 1991. Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. *Plant Cell* 3:809-818.