



BRADYRIZOBIUM-COWPEA RELATIONSHIP UNDER SALINITY CONDITIONS: ITS INFLUENCE ON TOLERANCE TO SALT STRESS †

[RELACIÓN BRADYRIZOBIUM-CAUPÍ EN CONDICIONES DE SALINIDAD: SU INFLUENCIA EN LA TOLERANCIA AL ESTRÉS SALINO]

Ernesto Gómez-Padilla¹, Francisco Guevara-Hernández^{2*},
Manuel Alejandro La-O Arias², Mercedes Fernández-Pascual³,
René Pinto-Ruiz² and Raúl López-Sánchez⁴

¹ Universidad Autónoma de Chiapas, Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Sustentabilidad (DOCAS), 29020, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. E-mail: ernesto.gomez54@unach.mx

² Universidad Autónoma de Chiapas, Facultad de Ciencias Agronómicas, 30470, Villaflores, Chiapas, México. E-mail: francisco.guevara@unach.mx*, pacholaoarias@gmail.com; pinto_ruiz@yahoo.com.mx

³ Instituto de Ciencias Agrarias (CSIC), 28006, Madrid, España. E-mail: mfernandezp@ccma.csic.es

⁴ Universidad de Granma, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal, 85100, Bayamo, Granma, Cuba. E-mail: rlopezs@udg.co.cu

* Corresponding author

SUMMARY

Background: The introduction of species with tolerance to salinity is one of the strategies to reduce the harmful effect of salts in the eastern region of Cuba. The species *Vigna unguiculata* L., shows rusticity and capability of adaptation, however, it is necessary to search for cultivars with greater tolerance and symbiotic nitrogen fixation possibilities to increase yields. **Objective:** To determine the behavior of the *bradyrhizobium*-cowpea bean relationship under salinity conditions, based on variables related to symbiotic nitrogen fixation, growth and development. **Methodology:** An experiment was carried out under controlled glass house conditions at the CSIC, Madrid, Spain. Two cultivars were used; IITA-Precoz and IT 86 D-715, which were inoculated with Strain VIBA-1 of *Bradyrhizobium liaoningense*. Treatments were Hoagland nutrient solution (control) and nutrient solution with 150 mM NaCl (saline). A completely randomized design with eight replications was used. At 40 days after germination, variables related to symbiotic nitrogen fixation, growth and development, protein concentration of the cytosolic soluble fraction of leaves and nodules were evaluated. **Results:** Although salinity negatively affected both cultivars, the damage did not manifest with the same intensity. IT 86 D-715 was less affected by showing less damage on the variables number of nodules, ARA, protein concentration in nodules and leaves, accumulation of leaf and root biomass, so its tolerance was greater. The IITA-Precoz cultivar was more susceptible, all the variables were notably affected under stress conditions, therefore, its tolerance level is lower. **Implications:** The cultivar IT 86 D-715 can be used in salinized soils due to its high tolerance, which is evidenced in variables of growth development and atmospheric nitrogen fixation. **Conclusions:** The cultivar IT 86 D-715 presents a greater capacity for symbiotic nitrogen fixation under salinity conditions and the tolerance index in all the growth and development variables evaluated was higher than IITA-Precoz, for which it presents a high susceptibility level.

Keywords: saline stress; symbiotic relationship; tolerance; nodulation

RESUMEN

Antecedentes: La introducción de especies con tolerancia a la salinidad es una de las estrategias para disminuir el efecto dañino de las sales en la región oriental del Cuba. La especie *Vigna unguiculata* L., muestra rusticidad y poder de adaptación, sin embargo, es necesaria la búsqueda de cultivares con mayor tolerancia y fijación simbiótica de nitrógeno para incrementar los rendimientos ante estas condiciones. **Objetivo:** Determinar el comportamiento de la relación bradyrizobio-frijol Caupí en condiciones de salinidad, a partir de variables relacionadas con la fijación simbiótica de nitrógeno, crecimiento y desarrollo. **Metodología:** Se desarrolló un experimento en condiciones

† Submitted October 4, 2022 – Accepted January 26, 2023. <http://doi.org/10.56369/tsaes.4559>



Copyright © the authors. Work licensed under a CC-BY 4.0 License. <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>
ISSN: 1870-0462.

controladas de casa de cristal en el CSIC, Madrid, España. Se utilizaron dos cultivares; IITA-Precoz y IT 86 D-715, que fueron inoculados con la Cepa VIBA-1 de *Bradyrhizobium liaoningense*. Los tratamientos fueron solución nutritiva Hoagland (control) y solución nutritiva con 150 mM NaCl (salino). Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con ocho repeticiones. A los 40 días después de la germinación, se evaluaron variables relacionadas con la fijación simbiótica de nitrógeno, crecimiento y desarrollo, concentración de proteína de fracción soluble citosólica de hojas y nódulos. **Resultados:** La salinidad provocó un efecto dañino sobre la relación bradyrizobio-frijol Caupí en ambos cultivares, aunque estos no se manifestaron con la misma intensidad. IT 86 D-715 fue menos afectado al evidenciarse menor perjuicio sobre las variables número de nódulos, ARA, concentración de proteínas en nódulos y hojas, acumulación de biomasa foliar y radical, por lo que su tolerancia fue mayor. El cultivar IITA-Precoz fue más susceptible, todas las variables fueron notablemente afectadas en condiciones de estrés, por tanto, su nivel de tolerancia es menor. **Implicaciones:** El cultivar IT 86 D-715 puede ser utilizado en suelos salinizados por su alta tolerancia, que se evidencia en variables del crecimiento, desarrollo y fijación de nitrógeno atmosférico. **Conclusiones:** La relación bradyrizobio-frijol Caupí manifestó afectaciones en condiciones de salinidad en ambos cultivares, pero la capacidad de tolerancia fue diferente: IT 86 D-715 presentó una mayor capacidad de fijación simbiótica de nitrógeno en condiciones de salinidad y el índice de tolerancia en todas las variables de crecimiento y desarrollo evaluadas fue superior a IITA-Precoz, por lo cual este presenta un alto nivel de susceptibilidad.

Palabras clave: estrés salino; relación simbiótica; tolerancia; nodulación.

INTRODUCCIÓN

En Cuba, el 14.9 % de las áreas cultivables se encuentran afectadas por sales, sin embargo, la zona más representativa es la región oriental del país con 65 % y de ella, la provincia Granma es la de mayor amplitud, con alrededor 228 mil ha (Anuario Estadístico de Cuba 2021).

Por estas razones, se desarrollan investigaciones encaminadas a la recuperación de estos suelos, con la implementación de métodos que incluyen el uso de cultivares tolerantes a altos tenores de sales (Pernús, 2015; Gómez-Padilla *et al.*, 2017; López-Sánchez *et al.*, 2018).

El frijol Caupí, presenta predisposición natural para establecer simbiosis con los rizobios nativos del suelo y entre las especies más comunes, se encuentran *Bradyrhizobium liaoningense*, *B. yuanmingense*, *B. elkanii* y *B. japonicum* (Chidebe *et al.*, 2018; Cabral *et al.*, 2020). En los nódulos de Caupí, recientemente se ha logrado identificar sobre la base de la secuencia filogenética del gen 16S ARNr, otras especies de rizobios entre las que se encuentran *Rhizobium leguminosarum*, *R. etli* y *Sinorhizobium fredii*, así como otras especies pertenecientes a los géneros *Azorhizobium* y *Mesorhizobium* (da Costa *et al.*, 2019; do Nascimento *et al.*, 2021).

Esta capacidad de establecer simbiosis con una gran diversidad de géneros rizobianos, le ofrece la ventaja de suplir las necesidades mínimas de nitrógeno de manera mucho más fácil y efectiva que otras leguminosas más específicas (Chidebe *et al.*, 2018; Cabral *et al.*, 2020; Kehinde *et al.*, 2020).

De igual forma, esto ha permitido que sea utilizada como planta trampa para lograr aislamientos en suelos

poco cultivados y limitados por condiciones estresantes (Ndungu *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2019).

Aunque la habilidad para formar nódulos con un amplio rango de especies de rizobios, no indica necesariamente una eficiente fijación de nitrógeno, el frijol Caupí por lo general supera los 170 kg.ha⁻¹ de N, lo cual se considera superior a muchas de las leguminosas de grano (Gómez-Padilla *et al.*, 2017; AL-Mansor y Thaher, 2020; Kehinde *et al.*, 2020).

Existen algunos informes sobre la capacidad del frijol Caupí para realizar simbiosis con los rizobios del suelo en condiciones de estrés por sales (Omara y El-Gaafarey, 2018; Kebede *et al.*, 2020), sin embargo, muchos autores coinciden en que bajo estas condiciones de estrés, la inoculación con aislamientos nativos o comerciales adaptados contribuye a aumentar las poblaciones de bacterias, las posibilidades de mayor nodulación y en consecuencia las cantidades de nitrógeno por concepto de fijación simbiótica (Haro *et al.*, 2018; Mukhtar *et al.*, 2020). Mientras que el uso de especies leguminosas y cepas de rizobios poco adaptadas, trae consigo que se produzcan afectaciones tanto en la planta como en la bacteria, por lo cual, desde las primeras fases de reconocimiento el proceso simbiótico puede sufrir el efecto perjudicial del estrés salino (Santos *et al.*, 2018; Mukhtar *et al.*, 2020).

Debido a ello, la búsqueda de cepas de rizobios adaptados a ambientes salinizados se convierte en una prioridad para zonas afectadas por este tipo de estrés, debido a que pueden potenciar la fijación de nitrógeno en los cultivares de Caupí usados, lo que se traduce posteriormente en incrementos de producción de biomasa o rendimiento del cultivo. Sin embargo, para lograr una adecuada selección que permita mantener estabilidad en la relación simbiótica, se necesita conocer cómo se manifiestan algunas variables relacionadas con este proceso, lo cual podría tomarse como referente para estudios de caracterización de esta

relación en otros ambientes donde el estrés salino sea una de las variables limitantes.

Por lo antes expuesto, el objetivo del presente trabajo estuvo encaminado a determinar el comportamiento de la relación bradyrizobio-frijol Caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp) en condiciones de salinidad y su influencia en la capacidad de tolerancia al estrés, a partir del análisis de variables relacionadas con la fijación simbiótica de nitrógeno y crecimiento y desarrollo del cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones para el desarrollo del experimento

El experimento se estableció en el Instituto de Ciencias Agrarias del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, España. Se utilizaron dos cultivares: IT 86 D-715 y el IITA-Precoz (Gómez-Padilla *et al.*, 2013). Para la inoculación de las semillas, fue seleccionada la cepa nativa VIBA-1, con características de tolerancia a condiciones estresantes de salinidad, pH y temperatura (Gómez-Padilla *et al.*, 2017).

El experimento se desarrolló en condiciones controladas de casa de cristal, con variaciones medias de temperaturas entre el día y la noche de 26 y 19 °C respectivamente, humedad relativa del 70 % y fotoperiodo de 13 horas de luz con una intensidad luminosa de 190 $\mu\text{E m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, suministrada por tubos fluorescentes (Silvania Gro-Lux) y bombillas incandescentes de 25 W (*General electric*s).

Las semillas fueron desinfectadas con etanol al 95 % durante 30 s y HgCl_2 al 0.1 % durante 45 s, luego fueron lavadas diez veces con agua destilada estéril. La siembra se realizó en macetas de 15 cm de alto y 8.5 cm de diámetro, en un soporte inerte de vermiculita Asfaltex S.A, lavada previamente con agua destilada y esterilizada en Autoclave SC-500 Matachana, durante 20 min, a 120 °C y 2 180 hPa.

Se sembraron dos semillas por maceta que se inocularon en el momento de la siembra y 7 días después con 1 mL de suspensión bacteriana (10^8 bacterias. mL^{-1}) en medio de cultivo LM, de la cepa VIBA-1.

Durante la primera semana, las macetas fueron regadas con agua destilada estéril (100 mL/día), mientras que en la segunda, las semillas germinadas se regaron con solución Hoagland (Hoagland y Arnon, 1938), a razón de 150 mL/día, a la cual se le incluyó una dosis baja de NH_4NO_3 a razón de 57 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de nitrógeno como iniciador.

Tratamientos y diseño experimental

A partir de la tercera semana, los dos cultivares utilizados IT 86 D-715 e IITA-Precoz se regaron con solución Hoagland, esta vez sin nitrógeno (tratamiento control) y se comenzó a aplicar el tratamiento salino (solución Hoagland + 150 mM) a razón 200 mL/día. Se conformaron un total de 4 tratamientos con 8 repeticiones, que fueron distribuidos en un diseño experimental completamente aleatorizado.

Cosecha del experimento y preparación de muestras

La cosecha del experimento se realizó a los 40 días después de la germinación, extrayéndose las plantas de cada una de las macetas con cuidado para no dañar el sistema radicular, el cual fue separado de la planta a nivel del cambio de color entre la raíz y la parte aérea (cuello), para luego ser lavado con agua corriente.

Evaluación de la biomasa, nodulación y actividad de reducción de acetileno

Se evaluó la biomasa de las plantas (BPL), masa seca de la raíz (MSR), masa seca foliar (MSF), masa fresca de los nódulos (MFN), la cantidad de nódulos totales (NNT).

La actividad de la enzima nitrogenasa, se midió mediante la técnica de reducción de acetileno (ARA), según la metodología descrita por FAO (1995) y modificada por Fernández-Pascual *et al.* (1988).

Determinación de la concentración de proteínas del citosol

La extracción de proteínas de fracción soluble del citosol, se realizó mediante homogeneización de los nódulos y hojas en mortero a 4 °C con tampón de extracción Tris HCL 0.1 M; pH 8.0; EDTA 1mM y mercaptoetanol (0.13 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). En hojas, la proporción del tampón de extracción fue de 1:25 (p/v) y 0.5 g de arena lavada; el homogeneizado obtenido se filtró con tres capas de gasa y seguidamente se centrifugó a 12 263 rpm a 4 °C, durante 30 min. En nódulos, se extrajo con una proporción de 1:10 (p/v) y PVPP, insoluble al 30 % (p/p), igualmente se filtró y se centrifugó a 8 034 rpm, durante 5 min a 4 °C, en una centrífuga refrigerada Heraeus Fresco 21.

La concentración de proteína de fracción soluble citosólica de hojas y nódulos, se determinó en el sobrenadante por el método de (Bradford, 1976). Se utilizó seroalbúmina bovina como estándar y el reactivo de BIO-RAD según las indicaciones del fabricante.

Procedimiento estadístico

Para determinar si los datos cumplían con la homogeneidad de varianza, fue realizada la prueba de Cochran, Hartley-Bartlett y para comprobar si se distribuyeron de forma normal, se les realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para comparar el tratamiento salino con relación al control no salino, fue utilizada la prueba de t-Student. Los datos fueron procesados con el paquete *Statistica* para Windows, versión 10 (StatSoft, 2011).

RESULTADOS

Formación de nódulos y acumulación de biomasa en plantas y nódulos

Al evaluar las variables en su conjunto, se observa la influencia negativa de las altas concentraciones salinas (150 mM NaCl) sobre las plantas durante los primeros 40 días de establecido el experimento, evidenciándose reducciones en la biomasa (BPL), masa seca de las raíces (MSR), masa seca foliar (MSF), así como en el número de nódulos totales (NNT) y masa fresca de los nódulos (MFN), en los dos cultivares utilizados (Tabla 1).

Este comportamiento se manifestó con independencia del nivel de tolerancia a la salinidad de los genotipos, siendo así, se puede observar como en el cultivar IT 86

D-715, todos los valores en condiciones de salinidad se redujeron significativamente.

Esta manifestación pudo haber estado condicionada por el efecto dañino que ejerce la sobreacumulación de sales en los tejidos vegetales afectando procesos fisiológicos y bioquímicos a nivel celular, que posteriormente se manifiestan en nivel de tejidos, estructuras y la acumulación de biomasa tanto de la raíz como de la parte foliar.

Como se puede observar, tanto el número de nódulos totales como su masa también fueron afectados, lo que indica que igualmente la alta concentración de sales en el medio, impidió que las primeras fases de reconocimiento entre las bacterias y los pelos radicales y posteriormente la colonización y multiplicación celular dentro del nódulo, no se realizara de manera óptima con independencia del nivel de tolerancia del cultivar.

Actividad de reducción de acetileno y concentración de proteínas

Si bien en las evaluaciones morfológicas realizadas a los nódulos estos presentaron una coloración rosada, indicador cualitativo de una adecuada fijación simbiótica de nitrógeno, ambos cultivares manifestaron una disminución de la actividad de reducción de acetileno total y específica (Tabla 2).

Tabla 1. Influencia de la salinidad sobre la biomasa de las plantas (BPL), masa seca de la raíz (MSR), masa seca foliar (MSF), número de nódulos totales (NNT) y masa fresca de los nódulos (MFN).

Variables	IT 86 D-715		IITA-Precoz	
	control	estrés	control	estrés
BPL (g.planta ⁻¹)	11.25(±1.03)	8.82(±0.65)**	7.97(±1.17)	4.27(±0.66)***
MSR (g.planta ⁻¹)	2.03(±1.18)	1.65(±0.11)**	1.46(±0.20)	0.86(±0.11)***
MSF (g.planta ⁻¹)	9.22(±0.85)	7.17(±0.54)**	6.51(±0.97)	3.40(±0.55)***
MFN (g.planta ⁻¹)	0.76(±0.03)	0.56(±0.03)***	0.48(±0.02)	0.33(±0.07)***
NNT	174.2(±9.15)	157(±5.09)**	94.6(±6.91)	45.6(±5.59)***

Nota: ** y *** indican significación para $P \leq 0.01$ y $P \leq 0.001$ respectivamente, al aplicar la prueba de t-Student. Los valores ubicados dentro de paréntesis corresponden a la desviación estándar de los datos por tratamiento.

Tabla 2. Influencia de la salinidad sobre la actividad de reducción de acetileno y la concentración de proteínas de hojas y nódulos en dos cultivares de frijol Caupí.

Variables	IT 86 D-715		IITA-Precoz	
	control	estrés	control	estrés
ARA total ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4\text{.planta}^{-1}$)	59.63(±1.68)	54.74(±1.72)*	36.22(±3.99)	26.02(±2.55)*
ARA específica ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4\text{ g}^{-1}\text{.MSN}$)	79.18(±5.76)	70.70(±2.39)ns	56.60(±2.67)	36.82(±1.31)***
Proteínas nódulos (Conc-mg.mL ⁻¹)	3.30(±0.03)	3.10(±0.02)***	3.14(±0.01)	1.36(±0.12)***
Proteínas hojas (Conc-mg.mL ⁻¹)	3.24(±0.12)	2.83(±0.05)*	3.01(±0.03)	1.99(±0.09)***

Nota: *, ** y *** indican significación para $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$ y $P \leq 0.001$ respectivamente, al aplicar la prueba de t-Student. Los valores ubicados dentro de paréntesis corresponden a la desviación estándar de los datos por tratamiento. ARA, Actividad de reducción de acetileno; MSN, masa seca de los nódulos.

La misma tendencia ocurrió con la concentración de proteínas en nódulos y hojas, la cual siempre fue menor en presencia de sales (Tabla 2), demostrándose que a nivel de estructura foliar y nodular probablemente hayan existido afectaciones relacionadas con un efecto osmótico, seguido de una toxicidad iónica y desequilibrio nutricional y como consecuencia el inicio de daños oxidativos.

En el caso de los nódulos, estas afecciones provocan perturbaciones en los mecanismos antioxidantes, por lo cual, puede reducirse la cantidad de la enzima superóxido dismutasa, la dehidroascorbato reductasa y por lo tanto una degradación de la membrana peribacteroidal y de proteínas citosólicas como la legumoglobina, por lo cual, los contenidos de las proteínas totales disminuyen.

Evaluación del índice de tolerancia

Sin embargo, los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que la intensidad del daño provocado por la salinidad en sus diferentes niveles no se manifestó de la misma forma, lo cual estuvo condicionado a la capacidad de tolerancia de los cultivares. Esto se pudo demostrar al realizar un análisis de estos genotipos a partir de la determinación del índice de tolerancia de cada una de las variables evaluadas. Por ejemplo, en el cultivar tolerante IT 86 D-715, existió una menor afectación en dichas variables, debido a que el índice de tolerancia para este cultivar fue siempre significativamente mayor que IITA-Precoz. No obstante, la excepción fue la MFN, en la cual, ambos genotipos manifestaron la misma respuesta (Figura 1). No obstante, el índice de tolerancia vuelve a revelar de manera clara una respuesta diferente entre los genotipos. Nuevamente el

cultivar IT 86 D-715, fue significativamente superior a IITA-Precoz, tanto en la concentración de proteínas de hojas y nódulos como en la ARA total y específica (Figura 1).

DISCUSIÓN

Informes realizados, indican que el estrés salino afecta tempranamente la formación de nódulos y la fijación de nitrógeno al provocar alteraciones morfológicas, fisiológicas y estructurales (Omara y El-Gaafarey, 2018; Mukhtar *et al.*, 2020). Observaciones realizadas con microscopía electrónica de transmisión a la ultraestructura de los cloroplastos en las hojas de estos cultivares (IT 86 D-715 e IITA-Precoz) crecidos en condiciones de estrés salino, demostraron que ocurren alteraciones en el interior de las células debido a un incremento desproporcional de los gránulos de almidón, lo que provoca desorganización de los orgánulos celulares y en casos extremos, puede ocurrir incluso la ruptura de la membrana, manifestación que está asociada a un daño estructural extremo (Gómez-Padilla *et al.*, 2014). Sin embargo, ha sido demostrado que inicialmente la acumulación de almidón en los cloroplastos es uno de los mecanismos que utilizan las plantas ante condiciones estrés abiótico, ya que sus productos de hidrólisis son usados para contrarrestar el efecto osmótico y/o tóxico provocado por las sales a nivel celular (Tofiño *et al.*, 2007; Dong y Beckles, 2019).

De igual forma, ha sido demostrado que en las estructuras nodulares también existen mecanismos que evitan el efecto perjudicial del NaCl, como la acumulación de solutos compatibles entre los que se encuentran la prolina, azúcares, entre otros, la exclusión de los iones de Na⁺ de la zona infectada, utilizando como barrera la corteza fue encontrado y

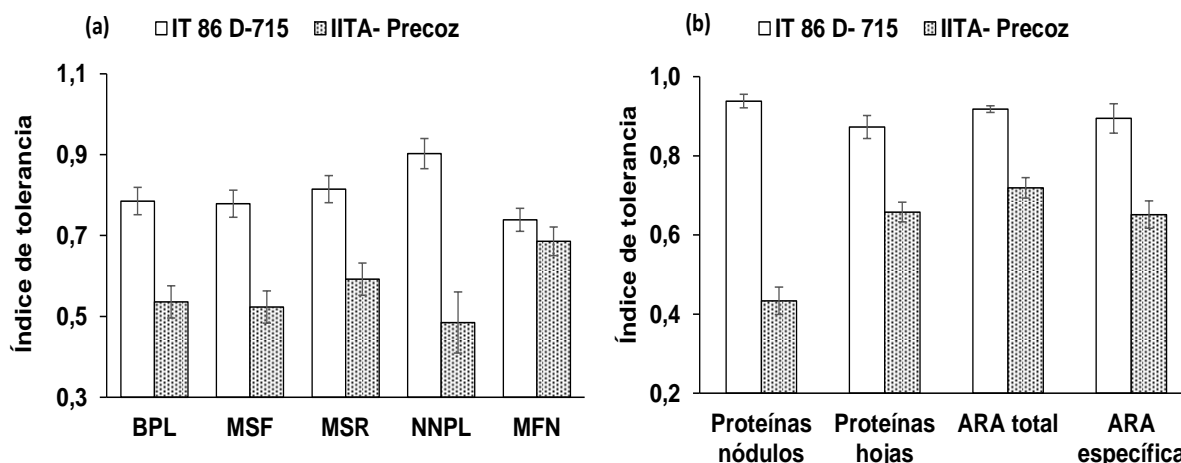


Figura 1. Comportamiento del índice de tolerancia de las variables relacionadas con la acumulación de biomasa y nodulación (a), concentración de proteínas y la ARA (b), en los cultivares IT 86 D-715 e IITA-Precoz. Barras verticales (I), indican la desviación estándar de la media, al ser aplicada la prueba de t-Student. ARA, actividad de reducción de acetileno; BPL, biomasa de las plantas; MSF, masa seca foliar; MSR, masa seca de la raíz; NNPL, número de nódulos por planta; MFN, masa fresca de los nódulos.

caracterizado un *antiporter* vacuolar Na^+/H^+ , que juega un importante papel en la tolerancia a la salinidad y la homeostasis iónica en la leguminosa *Trifolium repens*, probablemente por la inducción de la acumulación de Na^+ dentro de la vacuola (Kebede *et al.*, 2020; Le, 2020; Mukhtar *et al.*, 2020).

Existen leguminosas y cepas rizobianas capaces de establecerse, desarrollarse y lograr tasas de fijación simbióticas importantes, en dependencia del comportamiento de variables como la selección y manejo de la leguminosa y la bacteria, así como del desarrollo de mecanismos que le permitan adaptarse a las condiciones de estrés (Omara y El-Gaafarey, 2018).

Otras investigaciones, indican que la reducción en la concentración de proteínas tanto en nódulos como en hojas, constituye también una respuesta al estrés, lo cual puede deberse a la descomposición o la alteración de los aminoácidos en las proteínas (Haro *et al.*, 2018).

Si bien la acumulación selectiva de aminoácidos intercelulares, es una respuesta importante de muchos organismos al estrés osmótico, en ocasiones algunos de estos pueden contribuir al detrimento de otros compuestos como las proteínas, tal es el caso de la síntesis de prolina, uno de los osmolitos más comunes (Arif *et al.*, 2020; Shahid *et al.*, 2020). La aparición de las especies reactivas de oxígeno, debido a los daños oxidativos que se producen, pueden inducir también disminución de la concentración de proteínas en nódulos y otros compuestos orgánicos, así como la senescencia de los mismos (Biswas *et al.*, 2020; Matamoros y Becana, 2021).

Las diferencias en el comportamiento entre los cultivares con relación a su capacidad de tolerancia al estrés, puede deberse a que estos pueden usar mecanismos diferentes para evitar los daños provocados por la sobre acumulación de los iones tóxicos de Cl^- y Na^+ .

Diversos autores han informado que las manifestaciones de tolerancia en las leguminosas, entre las cuales se incluye el Caupí, están relacionadas con la restricción de la acumulación de iones tóxicos en las hojas y su consecuente aumento en las raíces (Hernández, 2019; Khan *et al.*, 2020). A esto se une, el incremento de la concentración de osmolitos compatibles en el citosol y orgánulos celulares, como es el caso del Ca^{2+} y K^+ , los cuales tienen funciones importantes en el ajuste osmótico y/o actúan como osmoprotectores, lo cual constituye una de las primeras respuestas de la planta para contrarrestar los daños provocados por el estrés (Kataria y Verma, 2018; Ravelombola *et al.*, 2021).

Se ha demostrado que las relaciones entre estos iones, determina en gran medida la respuesta de las plantas a

la salinidad, debido a que por una parte, aunque las altas concentraciones externas de Na^+ disminuyen la adquisición de K^+ (Safdar *et al.*, 2019; Khan *et al.*, 2020), el incremento de la concentración de Ca^{2+} en la célula, mejora la acumulación selectiva del K^+ intracelular e incrementa la relación K^+/Na^+ y a su vez incrementa los niveles de tolerancia (Hernández, 2019; Arif *et al.*, 2020). Este comportamiento es común en especies con características de tolerancia, donde el aumento del Ca^{2+} citosólico libre, es una de las primeras respuestas que se producen ante un incremento del Na^+ (Fatima *et al.*, 2020).

Sumado a la acumulación de iones como K^+ y Ca^{2+} , otros mecanismos son utilizados por las leguminosas para evitar el efecto perjudicial de las sales, tal es el caso de la producción y acumulación de otros solutos compatibles como carbohidratos no estructurales, alcoholes de azúcares, aminoácidos como la prolina, betaína y otras moléculas derivadas de la betaína y amidas (Fatima *et al.*, 2020; Khan *et al.*, 2020).

Por otro lado, el aumento de las sustancias antioxidantes, la disminución del consumo de la energía metabólica y el desarrollo de características estructurales, funcionales y moleculares, tanto en los nódulos como en las plantas, constituyen de igual forma, vías para frenar la entrada y el efecto perjudicial del Na^+ (Hernández, 2019; Fatima *et al.*, 2020; Khan *et al.*, 2020).

Por lo anteriormente expuesto, para próximos estudios de tolerancia a estrés por sales es necesario incluir variables como la concentración de iones, en este caso de Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , P y la relación K^+/Na^+ , $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ tanto en hojas como en raíces y nódulos radicales, así como otras variables bioquímicas y fisiológicas que permitan descubrir otros mecanismos de tolerancia a nivel celular que estén presentes estos cultivares. Unido a ello determinar el índice de tolerancia, ya que permite detectar diferencias con relación a los niveles de afectación que sufren los cultivares en condiciones de salinidad y por tanto, poder contribuir con los programas de mejora al realizar recomendaciones prácticas en zonas con este tipo de estrés.

En nuestro estudio, se logra una valiosa información debido a que se demuestra que el cultivar que mayor nivel de tolerancia a las condiciones de estrés por sales y por consiguiente el de mejor nivel de adaptación es IT 86 D-715, debido a que los índices de tolerancia determinados para las variables relacionadas con la fijación simbiótica de nitrógeno y nodulación, así como aquellas implicadas en el crecimiento y desarrollo, fueron mayores que los obtenidos en el cultivar IITA-Precoz, por lo cual se evidencia la susceptibilidad de este cultivar.

CONCLUSIONES

La salinidad ejerce un efecto negativo sobre la relación bradyrizobio-frijol Caupí, lo que se manifiesta en las variables de fijación de nitrógeno, crecimiento y desarrollo, sin embargo, la capacidad de tolerancia fue diferente. El cultivar IT 86 D-715, manifestó mayor nivel de tolerancia a las condiciones de salinidad que el cultivar IITA-Precoz, al demostrar una mayor capacidad de fijación de nitrógeno (ARA total y específica), formación de nódulos, concentración de proteínas en nódulos y hojas, así como la acumulación de biomasa foliar y radical, por lo cual, el índice de tolerancia podría utilizarse como criterio de referencia para estudios de selección en condiciones similares de estrés.

Acknowledgments

Agency for International Development Cooperation (AECID), Superior Council for Scientific Research (CSIC), Granma University and CONACYT.

Funding. This work was funded by Spanish Agency for International Development Cooperation (AECID) to support scientific training with the reference project A/8500/07 y A/019119/08, developed by Superior Council for Scientific Research (CSIC), Granma University.

Conflict of interest statement. The authors of this work declare that they have no conflict of interest with the institution or any person related to the proposed manuscript.

Compliance with ethical standards. Due to its characteristics, this study does not require the approval of a bioethics committee.

Data availability. Data are accessible through the author Ernesto Javier Gómez Padilla, Ernesto.gomez54@unach.mx

Author contribution statement (CRediT). E.J. Gómez-Padilla: Conceptualization, data collection, visualization, writing, editing. F. Guevara-Hernández: Conceptualization, supervision, review. Manuel Alejandro La-O Arias: Conceptualization, supervision, review. Raúl López-Sánchez: Conceptualization, supervision, visualization, review. Beatriz Ruiz-Diez: Conceptualization, supervision, data collection, review. Mercedes Fernández-Pascual: Conceptualization, supervision, data collection, writing, review.

REFERENCIAS

AL-Mansor, K.J.A. and Thaher, A.Z.T., 2020. Isolation and Diagnosis of Rhizobium of

Cowpea Plant and their Efficiency in Host Plant Infection and Nitrogen Fixation. *International Journal of Agricultural and Statistical Sciences*, 16(2), pp. 641–645. <https://connectjournals.com/03899.2020.16.641>

Anuario Estadístico de Cuba., 2021. [online] Oficina Nacional de Estadística e Información. Available at: <http://www.onei.gob.cu/node/18491> [Accessed 22 September 2022].

Arif, Y., Singh, P., Siddiqui, H., Bajguz, A. and Hayat, S., 2020. Salinity induced physiological and biochemical changes in plants: An omic approach towards salt stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 156, pp. 64–77. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.08.042>

Biswas, K., Adhikari, S., Tarafdar, A., Kumar, R., Saha, S. and Ghosh, P., 2020. Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defence Systems in Plants: Role and Crosstalk Under Biotic Stress. *Sustainable Agriculture in the Era of Climate Change* pp. 265–292. https://doi.org/10.1007/978-3-030-45669-6_12

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), pp. 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Cabral, M.D., Amanda, A.G., da Costa Elaine, M., de Carvalho Teotonio, S., Eduardo, B., Willems, A. and de Souza Emanuel, M., 2020. *Bradyrhizobium uaiense* sp. nov., a new highly efficient cowpea symbiont. *Archives of Microbiology*, 202(5), pp. 1135–1141. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01827-w>

Chidebe, I.N., Jaiswal, S.K. and Dakora, F.D., 2018. Distribution and phylogeny of microsymbionts associated with cowpea (*Vigna unguiculata*) nodulation in three agroecological regions of Mozambique. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(2), pp. e01712–17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01712-17>

da Costa, E.M., de Carvalho, T.S., Guimarães, A.A., Leão, A.C.R., Cruz, L.M., de Baura, V.A., Lebbe, L., Willems, A. and de Souza Moreira, F.M., 2019. Classification of the inoculant strain of cowpea UFLA03-84 and of other

- strains from soils of the Amazon region as *Bradyrhizobium viridifuturi* (symbiovar tropici). *Brazilian Journal of Microbiology*, 50(2), pp. 335–345. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00045-x>
- do Nascimento, T.R., Sena, P.T.S., Oliveira, G.S., da Silva, T.R., Dias, M.A.M., de Freitas, A.D.S., Martins, L.M.V. and Fernandes-Júnior, P.I., 2021. Co-inoculation of two symbiotically efficient *Bradyrhizobium* strains improves cowpea development better than a single bacterium application. *3 Biotech*, 11(1), pp. 1–12. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02534-5>
- Dong, S. and Beckles, D.M., 2019. Dynamic changes in the starch-sugar interconversion within plant source and sink tissues promote a better abiotic stress response. *Journal of Plant Physiology*, 234, pp. 80–93. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.01.007>
- FAO, 1995. Manual técnico de la fijación simbiótica del nitrógeno: leguminosa/*Rhizobium*. Rome: Organización de las Naciones Unidas para Agricultura y la Alimentación. Available at: https://books.google.com.mx/books/about/M anual Tecnico de la Fijacion Simbiotica.html?id=Lcf6ZUeOvdAC&redir_esc=y
- Fatima, T., Mishra, I., Verma, R. and Arora, N.K., 2020. Mechanisms of halotolerant plant growth promoting *Alcaligenes* sp. involved in salt tolerance and enhancement of the growth of rice under salinity stress. *3 Biotech*, 10(8), pp. 1–12. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02348-5>
- Fernández-Pascual, M., Pozuelo, J.M., Serra, M.T. and De Felipe, M.R., 1988. Effects of Cyanazine and Linuron on Chloroplast Development, Nodule Activity and Protein Metabolism in *Lupinus albus* L. *Journal of Plant Physiology*, 133(3), pp. 288–294. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(88\)80202-5](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(88)80202-5)
- Gómez-Padilla, Ernesto J., Argentel M.L., Amador, C., Alarcón B.K., López S.R., Ruiz-Díez, B., Fernández-Pascual, M., and Eichler-Loebermann, B., 2013. Evaluación de la tolerancia a la salinidad en frijol Caupí a partir de variables relacionadas con la nodulación y la acumulación de nitrógeno foliar. *Cultivos Tropicales*, 34(3), 11-16. Recuperado en 18 de enero de 2023, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_artt_ext&pid=S0258-59362013000300002&lng=es&tlng=pt.
- Gómez-Padilla, E., López Sánchez, R., Ruiz-Díez, B., Fernández-Pascual, M., Fajardo, S. and Eichler-Loebermann, B., 2014. Ultrastructural alterations into chloroplasts and root nodules of cowpea plants grown under saline stress conditions. *Cultivos Tropicales*, 35(1), pp. 62–66. Recuperado en 18 de enero de 2023, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_artt_ext&pid=S0258-59362014000100009&lng=es&tlng=en.
- Gómez-Padilla, E., Ruiz-Díez, B., Fajardo, S., Eichler-Loebermann, B., Samson, R., Van-Damme, P., López-Sánchez, R. and Fernández-Pascual, M., 2017. Characterization of rhizobia isolated from cowpea nodules, in Cuban saline soils. *Cultivos Tropicales*, 38(4), pp. 39-49. Recuperado en 18 de enero de 2023, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_artt_ext&pid=S0258-59362017000400009&lng=es&tlng=en.
- Haro, H., Sanon, K.B., Le Roux, C., Duponnois, R. and Traoré, A.S., 2018. Improvement of cowpea productivity by rhizobial and mycorrhizal inoculation in Burkina Faso. *Symbiosis*, 74(2), pp. 107–120. <https://doi.org/10.1007/s13199-017-0478-3>
- Hernández, J.A., 2019. Salinity tolerance in plants: trends and perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10), p.2408. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20102408>
- Hoagland, D.R. and Arnon, D., 1938. The Water-Culture Method for Growing Plants Without Soil. California Agricultural Experiment Station, Circular 347 [Revised January 1950], Berkeley: The College of Agriculture, University of California. [online] Available at: <https://www.semanticscholar.org/paper/The-Water-Culture-Method-for-Growing-Plants-Without-Hoagland-Arnon/a0b7f89857e268e0066b34461183b3a4d2cad499> [Accessed 13 September 2021].
- Kataria, S. and Verma, S.K., 2018. Salinity stress responses and adaptive mechanisms in major glycophytic crops: the story so far. In: V. Kumar, S. Wani, P. Suprasana, L.S. Tran, eds. *Salinity Responses and Tolerance in Plants*, Vol. 1. Cham: Springer pp. 1–39.

- https://doi.org/10.1007/978-3-319-75671-4_1
- Kebede, E., Amsalu, B., Argaw, A. and Tamiru, S., 2020. Symbiotic effectiveness of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) nodulating rhizobia isolated from soils of major cowpea producing areas in Ethiopia. *Cogent Food & Agriculture*, 6(1), p.1763648. <https://doi.org/10.1080/23311932.2020.1763648>
- Kehinde, A.A., Titilola, A.O., Bosede, A.F., Oluremi, O.A. and Esther, O.T., 2020. Nutrient uptake and cowpea performance following early season maize cultivation under different fertilizer types. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, [online] 23(1), pp. #04. Available at: <https://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/2611> [Accessed 22 September 2022].
- Khan, W.-D., Tanveer, M., Shaukat, R., Ali, M. and Pirdad, F., 2020. An overview of salinity tolerance mechanism in plants. In: M. Hasanuzzaman, M. Tanveer, eds. *Salt and drought stress tolerance in plants*. Cham: Springer. pp. 1–16. https://doi.org/10.1007/978-3-030-40277-8_1
- Le, L., 2020. Examining salinity tolerance mechanisms in (sub) tropical grain legumes: Soybean (*Glycine max*), cowpea (*Vigna unguiculata*), mungbean (*Vigna radiata*), and common bean (*Phaseolus vulgaris*). Thesis presented of doctor of philosophy. University of Western Australia. School of Agriculture and Environment Faculty of Science, pp. 237. https://api.research-repository.uwa.edu.au/ws/portalfiles/portal/100845195/THESIS_DOCTOR_OF_PHILOSOPHY_LE_Thi_Thanh_Ly_2020.pdf
- López-Sánchez, R.C., Gómez-Padilla, E., Campos-Posada, R., Eichler-Löbermann, B., Rodríguez-Larramendi, L.A., Guevara-Hernández, F. and Gongora-Mora, G., 2018. Afectaciones en el rendimiento de líneas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) provocado por salinidad. *Cultivos Tropicales*, 39(1), pp. 74–80. Recuperado en 18 de enero de 2023, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_artext&pid=S0258-59362018000100009&lng=es&tlng=es
- Matamoros, M.A. and Becana, M., 2021. Molecular responses of legumes to abiotic stress: post-translational modifications of proteins and redox signaling. *Journal of Experimental Botany*, 72(16), pp. 5876–5892. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab008>
- Mukhtar, S., Hirsch, A.M. and Khan, N., 2020. Impact of soil salinity on the cowpea nodule-microbiome and the isolation of halotolerant. *Phytobiomes Journal*, 4 (4), pp. 364–374. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-09-19-0057-R>
- Ndungu, S.M., Messmer, M.M., Ziegler, D., Gamper, H.A., Mészáros, É., Thuita, M., Vanlauwe, B., Frossard, E. and Thonar, C., 2018. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) hosts several widespread bradyrhizobial root nodule symbionts across contrasting agro-ecological production areas in Kenya. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 261, pp. 161–171. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.12.014>
- Oliveira, G.S., Sena, P.T.S., do Nascimento, T.R., Neto, R.A.F., Pereira, J.R.C., Martins, L.M.V., de Freitas, A.D.S., Signor, D. and Fernandes-Júnior, P.I., 2019. Are cowpea-nodulating bradyrhizobial communities influenced by biochar amendments in soils? Genetic diversity and symbiotic effectiveness assessment of two agricultural soils of Brazilian drylands. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 20, pp. 439–449. <https://doi.org/10.1007/s42729-019-00128-6>
- Omara, A., and El-Gaafarey, T. (2018). Alleviation of salinity stress effects in forage cowpea (*Vigna unguiculata* L.) by Bradyrhizobium sp. inoculation. *Microbiology Research Journal International*, 23(3), 1–16. <https://doi.org/10.9734/MRJI/2018/40727>
- Pernús, M., and Sánchez, JA (2015). Salinidad en Cuba y tratamientos pregerminativos de hidratación-deshidratación de semillas. *Pastos y Forrajes*, 38 (4), 379–392. Recuperado en 18 de enero de 2023, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_artext&pid=S0864-03942015000400001&lng=es&tlng=es
- Ravelombola, W., Dong, L., Barickman, T.C., Xiong, H., Olaoye, D., Bhattarai, G., Zia, B., Alshaya, H., Alatawi, I. and Shi, A., 2021. Evaluation of salt tolerance in cowpea at

- seedling stage. *Euphytica*, 217(6), pp. 1–20.
<https://doi.org/10.1007/s10681-021-02832-w>
- Safdar, H., Amin, A., Shafiq, Y., Ali, A., Yasin, R., Shoukat, A., Hussan, M.U. and Sarwar, M.I., 2019. A review: Impact of salinity on plant growth. *Nature and Science*, 17(1), pp. 34–40.
<https://doi.org/10.7537/marsnsj170119.06>
- Santos, A. de A., Silveira, J.A.G. da, Guilherme, E. de A., Bonifacio, A., Rodrigues, A.C. and Figueiredo, M. do V.B., 2018. Changes induced by co-inoculation in nitrogen–carbon metabolism in cowpea under salinity stress. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49, pp. 685–694.
<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.01.007>
- Shahid, M.A., Sarkhosh, A., Khan, N., Balal, R.M., Ali, S., Rossi, L., Gómez, C., Mattson, N., Nasim, W. and Garcia-Sanchez, F., 2020. Insights into the Physiological and Biochemical Impacts of Salt Stress on Plant Growth and Development. *Agronomy*, 10(7), p. 938.
<https://doi.org/10.3390/agronomy10070938>
- StatSoft, Inc. 2011. STATISTICA (Sistema de software de análisis de datos), versión 10.
<http://www.statsoft.com>
- Tofiño, A., Romero, H.M. and Ceballos, H., 2007. Efecto del estrés abiótico sobre la síntesis y degradación de almidón. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 25(2), pp. 245–254. Recuperado el 18 de enero de 2023, de
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99652007000200006&lng=en&tlng=