

Universidad de Granma



**SELECCIÓN DE COMBINACIONES BRADYRIZOBIOS
NATIVOS - VIGNA UNGUICULATA (L.) WALP.,
TOLERANTES A LA SALINIDAD**

**Ernesto Javier Gómez Padilla (Autor); Alberto Arnaldo
Medina León (Director)**

Gómez Padilla, Ernesto Javier (Autor)

Selección de combinaciones Bradyrizobios nativos - *Vigna unguiculata* (L.) Walp., tolerantes a la salinidad / Ernesto Javier Gómez Padilla (Autor); Alberto Arnaldo Medina León (Director). – La Habana : Editorial Universitaria, 2015. -- ISBN 959-16-2569-4.

1. Gómez Padilla, Ernesto Javier (Autor)
2. Medina León, Alberto Arnaldo (Director)
3. Universidad de Granma
4. Ciencias Agrícolas

Digitalización: Editorial Universitaria, torri@mes.edu.cu

(c) Todos los derechos reservados: Universidad de Granma, 2015.

Editorial Universitaria

Calle 23 entre F y G, No. 564.

El Vedado, Ciudad de La Habana, CP 10400,

Cuba





UNIVERSIDAD DE GRANMA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

Selección de combinaciones bradyrizobios nativos - *Vigna unguiculata* (L.) Walp., tolerantes a la salinidad

**Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias Agrícolas**

ERNESTO JAVIER GÓMEZ PADILLA



Bayamo
2014





UNIVERSIDAD DE GRANMA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

**Selección de combinaciones bradyrizobios nativos -
Vigna unguiculata (L.) Walp., tolerantes a la
salinidad**

**Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias Agrícolas**

Autor: Ing. Ernesto Javier Gómez Padilla, MSc.

**Tutores: Ing. Raúl Carlos López Sánchez, Dr C.
Lic. Mercedes Fernández-Pascual, Dra C.**

Bayamo

2014

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores: Raúl Carlos López Sánchez, por demostrarme en cada momento el valor de la perseverancia y el optimismo ante la vida. Por ser un guía certero en la investigación desde mis inicios. Mercedes Fernández-Pascual, por su voluntad de cooperación y ayuda en todo momento, por brindar sus conocimientos y poner a mi disposición su tiempo, personas y laboratorios. A ambos, les reitero mi más profundo agradecimiento.

En la Universidad de Granma: a los rectores, Antonia María, Quirino Arias, Narcy Bueno; Decanos, Luis Céspedes, Carlos Ávila, Juan J. Silva y Orlando González; Jefes de departamento, Tony Boicet, Norge Tornés, por darme la oportunidad. A los profesores de nuestra Facultad, Irene Expósito, Silvio Meneses, Sergio Rodríguez, por contribuir a mi formación científica.

En el Centro de Ciencias Medioambientales: a los colegas Susana Fajardo, Cesar, Teo y en especial a Beatriz Ruiz-Díez, por la amistad y ayuda que me brindaron durante y después de mi estancia en esta institución.

En la Universidad de Rostock: a Bettina Eichler, por su amistad y su voluntad de ayudar en todo momento.

En el INCA: a los miembros de la Comisión Científica de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas, José Herrera, Adriano Cabrera, Blanca de la Noval, Jorge Corbera y en especial Gloria Martín, por tener la gentileza de acogerme en el departamento y brindarme sus consejos, críticas y sugerencias, en función de aumentar mi formación científica y la calidad del documento de tesis. A María C. Nápoles G. (Tere), por su inestimable ayuda en el mejoramiento del documento, por impregnarme optimismo y confianza en el triunfo. A Mario Varela, por sus acertadas sugerencias en el uso de técnicas estadísticas. A Yamila, Omisailen, Eliane y Yolanda, por todos los detalles. A Daymí, Sucel, María Isabel, Flora, a los compañeros de protocolo por su amabilidad y atenciones; a los ya doctores Gicli y Guille, quienes constituyeron ícono de amistad, camaradería e intercambio científico; a los doctorantes Jaime, Yaniuska, Michel, Almeida, Tuto, David; al master Yonger, por haber compartido durante dos años como verdaderos hermanos de lucha.

En la CCS-F “8^{vo} Congreso” a Eduardo Armas y en la **Empresa Genética y Cría “Manuel fajardo”** a Ana Mercedes, por su colaboración con los experimentos de campo.

En el Instituto de Suelos: a Luis Gómez Jorrín, por sus oportunas críticas y atinadas sugerencias.

En el IIA “Jorge Dimitrov”: a todos mis colegas y amigos de la estación experimental, por participar en mi formación como investigador. A Ramiro Ramírez, por contribuir al mejoramiento del documento de tesis.

A mis amigos: Pacholo y Luisito, por regalarme su amistad y haber estado siempre para apoyarme.

A mi querida familia: especialmente a mi esposa Francis, mi hija Lis Frances, mis padres Matilde y Ernesto, mis hermanos Odalmis y Kerman. Por acompañarme siempre con tanto cariño y con la comprensión que necesité en todo este tiempo. Por haber participado en mi formación y hacerme una persona de bien. Por la preocupación y el apoyo incondicional. Por todo el sacrificio que significaron mis ausencias. Por la confianza depositada en mí.

A todos, mi eterno agradecimiento

DEDICATORIA

A mi hija Lis Frances

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μM	Micromol
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr	Ácido desoxirribonucleico ribosómico
ARDRA	Análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
ATP	Adenosina trifosfato
cmol	Centimol
dS	Decisiemens
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FEN	Fijación específica de nitrógeno
hPa	Hectopascal
ITS	Índice de tolerancia a la salinidad
kb	Kilobase (s)
Lb	Leghemoglobina
RFLP	Fragmentos de restricción de longitud polimórfica
EIR	Espacio intergénico ribosomal
LM	Levadura-Manitol
LMA	Levadura-Manitol-Agar
M	Molar
M.O	Materia orgánica
mg	Miligramo
min	Minuto (s)
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
nmol	Nanomol
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ppm	Partes por millón
PVPP	Polivinil polipirrolidona
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
SAAD	Servicio de secuenciación automático
TAE	Tris acetato
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
UFC	Unidades formadoras de colonias

SÍNTESIS

Con el objetivo de mejorar el rendimiento del frijol Caupí [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] en condiciones de suelos salinizados, se desarrollaron experimentos que incluyeron la selección de variedades tolerantes, el aislamiento y caracterización genética y fenotípica de cepas nativas de *Bradyrhizobium*, y la evaluación de la interacción *Bradyrhizobium*-leguminosa en ambiente controlado y de campo bajo condiciones de estrés por sales. Existieron diferencias en la tolerancia a la salinidad, debido a que cultivares como IT 86 D-715, IT 86 D-510, IT 82 E-9 y Cancarro, evidenciaron un alto nivel tolerancia, mientras que IITA-Precoz, IT 86 D-386, IT 86 D-719 y Viñales-144, fueron las más susceptibles. Se aislaron cuatro cepas de *Bradyrhizobium* clasificadas como; *B. liaoningense* (VIBA-1) y *B. yuanmingense* (VIBA-2, VIBA-3 y VIBA-5), de las cuales VIBA-1 y VIBA-2 evidenciaron mejor adaptación al estrés salino. Aunque las variables relacionadas con la fijación de nitrógeno y la concentración de proteínas, fueron afectadas en condiciones de salinidad, el índice de tolerancia fue significativamente superior al utilizarse la variedad tolerante IT 86 D-715. En las hojas de esta variedad, se incrementó la concentración de K^+ y Ca^{2+} , mientras que la de Na^+ y Cl^- disminuyó. A nivel ultraestructural, se produjo incremento de los gránulos de almidón en los cloroplastos y desorganización de los orgánulos celulares en las hojas de las plantas sometidas a estrés por sales. El rendimiento fue favorecido por la inoculación con las cepas VIBA-1 y VIBA-2. La fijación específica de nitrógeno, se incrementó con el uso de las dos cepas por separado con relación al control. El mayor índice de efectividad de la inoculación se encontró en la cepa VIBA-1.

TABLA DE CONTENIDOS

CONTENIDOS	Pág
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
2.1. La salinidad de los suelos	6
2.1.1. Causas que provocan la salinidad en los suelos	6
2.1.2. Distribución y extensión de las áreas afectadas por sales en el mundo y en Cuba	6
2.1.3. Clasificación de los suelos afectados por sales según el daño que se produce en los cultivos	7
2.2. Efecto perjudicial de la salinidad sobre las plantas	8
2.3. Tolerancia de las plantas a la salinidad	10
2.3.1. Descripción de algunos mecanismos utilizados por las plantas para contrarrestar el estrés por sales	12
2.4. Las leguminosas tropicales en la agricultura	15
2.4.1. El frijol Caupí	16
2.4.2. Respuesta del frijol Caupí en condiciones de salinidad	18
2.5. El proceso de fijación simbiótica del nitrógeno	19
2.5.1. Los rizobios. Identificación genética con técnicas moleculares	19
2.5.2 Interacción rizobio-leguminosa	20
2.5.3. Fisiología del nódulo	21
2.6. Daños provocados por la salinidad y mecanismos de tolerancia desarrollados por los rizobios	22
2.7. La fijación simbiótica del nitrógeno en el frijol Caupí	24
III. MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1. Condiciones generales para el desarrollo de los experimentos	26

Tabla de Contenidos

3.1.1. Material vegetal y microorganismos utilizados	27
3.1.2 Experimentos de laboratorio y ambiente controlado	28
3.1.3. Características edafoclimáticas y ubicación de las localidades donde se realizaron los experimentos en condiciones de campo	28
3.1.3.1 Descripción de las variables meteorológicas en las áreas y años en los que se desarrollaron los experimentos	28
3.1.3.2. Ubicación y características edáficas del experimento de campo 1	29
3.1.3.3. Ubicación y características edáficas del experimento de campo 2	30
3.2. Descripción de los experimentos	31
3.2.1. Experimento 1. Tolerancia de variedades de Caupí a la salinidad durante la germinación de la semilla	31
3.2.2. Experimento 2. Evaluación de la tolerancia a la salinidad en variedades de frijol Caupí en condiciones de campo	32
3.2.2.1. Diseño experimental	32
3.2.2.2. Evaluaciones realizadas	32
3.2.3. Experimento 3. Aislamiento y caracterización de rizobios nativos	33
3.2.3.1. Aislamiento de bacterias	33
3.2.3.2. Caracterización fenotípica	34
3.2.3.3. Tolerancia de los aislados a condiciones estresantes de salinidad, pH y temperatura.	34
3.2.3.4. Prueba de infectividad	35
3.2.3.5. Caracterización genética de los aislados	36
3.2.4. Experimento 4. Influencia de la salinidad sobre la relación bradyrizobio-frijol Caupí en ambiente controlado	38
3.2.4.1. Condiciones para el desarrollo del experimento y diseño experimental	38

3.2.4.2. Evaluaciones realizadas _____	39
3.2.5. Experimento 5. Respuesta del frijol Caupí a la inoculación con cepas nativas de <i>Bradyrhizobium</i> en un suelo afectado por sales _____	41
3.2.5.1. Evaluaciones realizadas _____	42
3.3. Métodos utilizados para la toma de muestras de suelo y análisis químico de suelo y planta en el laboratorio _____	43
3.4. Atenciones culturales _____	44
3.5. Procedimientos estadísticos _____	44
3.6. Análisis económico _____	46
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN _____	47
4.1. Características edafoclimáticas de las zonas donde fueron desarrollados los experimentos de campo _____	47
4.2. Evaluación de la tolerancia a la salinidad de variedades de Caupí _____	48
4.2.1 Evaluación de la tolerancia a la salinidad durante la germinación de la semilla _____	48
4.2.2. Evaluación de la tolerancia a la salinidad en condiciones de campo _____	51
4.3. Aislamiento, caracterización fenotípica y molecular de los aislamientos nativos _____	59
4.3.1. Aislamiento _____	59
4.3.2. Análisis de los resultados fenotípicos _____	60
4.3.2.1. Evaluación de la tolerancia de los aislamientos a estrés por sales. Crecimiento en medio de cultivo líquido LM _____	61
4.3.2.2. Evaluación de la tolerancia de los aislamientos a estrés por pH. Crecimiento en medio de cultivo líquido LM _____	64
4.3.2.3. Respuesta de los aislamientos a diferentes temperaturas _____	65
4.3.3. Análisis genético de las cepas _____	66
4.3.3.1. Análisis de restricción del ADNr amplificado _____	66

Tabla de Contenidos

4.3.3.2. Análisis de secuencia del gen 16S ARNr	67
4.4. Influencia de la salinidad sobre la relación bradyrizobio-frijol Caupí en ambiente controlado	70
4.4.1. Evaluación de las variables relacionadas con la nodulación, fijación simbiótica de nitrógeno, crecimiento y desarrollo de las plantas	70
4.4.2. Evaluación de la concentración de iones en plantas	74
4.4.3. Influencia de la salinidad sobre la ultraestructura de hojas y nódulos de plantas de Caupí inoculadas	80
4.4.3.1. Efecto de la salinidad sobre la ultraestructura de las hojas	80
4.4.3.2. Influencia de la salinidad sobre la ultraestructura de los nódulos	83
4.5. Respuesta del frijol Caupí a la inoculación con cepas nativas de <i>Bradyrhizobium</i> en un suelo afectado por sales.	86
4.5.1. Evaluación de la nodulación	87
4.5.2. Biomasa foliar y concentración de iones	89
4.5.3. Respuesta del rendimiento y sus componentes	93
4.5.4. Valoración económica de los resultados	95
4.6. Consideraciones generales	97
V. CONCLUSIONES	99
VI. RECOMENDACIONES	100
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
VIII. ANEXOS	

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

La salinización de los suelos, puede producirse de manera natural en las zonas áridas y semiáridas del planeta caracterizadas por escasas precipitaciones y elevadas tasas de evaporación (Manchanda y Garg, 2008). Por otra parte, el uso de agua de riego con alto contenido de sales, prácticas inapropiadas de cultivos, el uso excesivo de químicos, entre las fundamentales, marcan al hombre como principal responsable de la salinización de muchas áreas agrícolas (*Queensland Department of Primary Industries (DPI)*, 2011).

Alrededor del 7 % de las tierras cultivables en el mundo están afectadas por sales y para los próximos años se estima su incremento en más de un 20 %, por lo cual se considera la salinidad uno de los problemas más importantes para la agricultura a nivel internacional (Munns y Tester, 2008; Kosová *et al.*, 2013).

En Cuba, más de un millón de hectáreas se encuentran afectadas por sales y de ellas el 14 % se localizan en zonas cultivadas, de acuerdo con la Oficina Nacional de Estadística de Cuba (ONE, 2006). En la provincia Granma, existen más de 228 mil hectáreas que están clasificadas como fuertemente y muy fuertemente salinizadas, con 28 y 11 % respectivamente, mientras el 61 % presenta niveles de salinización moderados (González *et al.*, 2001).

El exceso de sales en el suelo, provoca daños en las plantas que están relacionados con una toxicidad específica, normalmente asociada a la absorción excesiva de Na^+ y Cl^- , un desequilibrio nutricional provocado por la interferencia de los iones salinos con los nutrientes esenciales, el estrés hídrico que se produce por la disminución del potencial osmótico del medio y la combinación de los efectos antes indicados (Tavakkoli *et al.*, 2011).

Diversos métodos han sido utilizados para disminuir el efecto perjudicial de las sales de los suelos y aumentar su calidad agroproductiva (Álvarez *et al.*, 2008; Ashraf *et al.*, 2010;

Ashraf *et al.*, 2012). Las tendencias actuales incluyen métodos biológicos y de manejo agrotécnico, como el uso de microorganismos, la rotación de cultivos, utilización de materiales orgánicos y la introducción y/o selección de especies y variedades que presenten niveles de tolerancia, adaptabilidad y producción adecuados, que permitan sustituir las más susceptibles (Munns, 2005; Hussain *et al.*, 2010; Ashraf *et al.*, 2012).

El frijol Caupí [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], es comúnmente tomado en cuenta en programas de manejo por su capacidad de desarrollarse en zonas donde predominan factores limitantes como las altas temperaturas, escasas precipitaciones, así como la presencia de metales pesados y el alto arcillamiento en los suelos (Sprent *et al.*, 2010; Cha-um *et al.*, 2013), lo cual se relaciona con el gran poder de adaptación a diferentes condiciones estresantes, que le permite obtener rendimientos superiores a 1,5 t.ha⁻¹ (Al-Garni, 2006; Murillo *et al.*, 2006; FAOSTAT, 2010). Puede alcanzar tasas de fijación simbiótica de nitrógeno que superan los 170 kg.ha⁻¹ de N, razón por la cual es preferida por los productores, quienes las incluyen en esquemas de asociación y rotación de cultivos, atribuyéndole capacidad para mejorar el suelo (Pule-Meulenberg *et al.*, 2010; Sprent *et al.*, 2010; Olufajo, 2012; Cha-um *et al.*, 2013).

Por otra parte, aunque ha sido bien documentado que la salinidad por lo general afecta la capacidad de sobrevivencia de los rizobios en el suelo, disminuye la posibilidad de colonización de estos a las raíces, reduce de manera importante la cantidad de nódulos y provoca la disminución de la actividad de la enzima nitrogenasa (Bolaños *et al.*, 2006), algunos informes han confirmado la existencia de especies con habilidad para realizar simbiosis con los rizobios en suelos afectados por sales, entre las que se encuentran las pertenecientes al género *Vigna* (Zilli *et al.*, 2004; Steenkamp *et al.*, 2008).

Sumado a esto, se ha demostrado que la inoculación con cepas nativas o comerciales adaptadas a ambiente salino, por lo general contribuye a mejorar la fijación simbiótica

(Martins *et al.*, 2003; Sprent *et al.*, 2010). Por esta razón, el hecho de que determinadas especies de rizobios y leguminosas sean capaces de interactuar y fijar cantidades de nitrógeno apreciables en condiciones de exceso de sales, es considerado por diversos autores un marcador importante de tolerancia a este tipo de estrés (Garg y Singla, 2004).

Los informes sobre el uso de leguminosas en suelos salinos en Cuba son limitados y muchos de ellos se refieren a trabajos realizados en la región oriental del país, fundamentalmente en la provincia Granma (Mesa, 2003). En este sentido, se destacan las investigaciones realizadas por González *et al.* (2000) y López (2001), relacionadas con el uso de leguminosas pratenses y la utilización del frijol Caupí como leguminosa de granos, fundamentados en el estudio de la tolerancia a partir de variables relacionadas con la producción de biomasa y rendimiento (González *et al.*, 2001).

Los trabajos que abordan temáticas relacionadas con la interacción macro-microsimbionte y la capacidad de fijación simbiótica de nitrógeno, son aún más escasos. Algunos de estos fueron realizados por López (2001), quién recomendó las mejores combinaciones rizobio-leguminosa pratenses en suelos afectados sales.

A esto se suma, que en áreas donde existe acumulación de sales, aún se utilizan especies y variedades tradicionales con poca adaptabilidad a este tipo de estrés, debido a lo cual, los rendimientos se afectan y en los casos más extremos, dejan de ser utilizadas con fines productivos, contribuyendo al incremento de la vulnerabilidad del agroecosistema (López, 2001; González *et al.*, 2002).

En Cuba, el frijol Vigna ha cobrado gran importancia desde el punto de vista agronómico y económico, debido al incremento de su consumo en forma de legumbres frescas y granos secos, fundamentalmente para la alimentación humana y por su contribución a la sustitución de importaciones (MINAG, 2003).

A nivel del país, se comenzaron a incrementar las áreas dedicadas al cultivo a partir del año 2010 y las mayores cifras se cuantificaron en 2012 en la región oriental con más de 5 000 hectáreas. Específicamente en la provincia Granma, se produjo un aumento de 300 hectáreas en el año 2010 a 1 706 hectáreas en 2012, con producciones que alcanzaron las 925 t (MINAG, 2012).

Por las razones anteriormente descritas, en la provincia Granma se desarrollan investigaciones que persiguen la introducción de variedades de frijol Caupí y cepas nativas de *Bradyrhizobium*, con mejores características de adaptación y tolerancia a las condiciones de suelos afectados por sales, como respuesta al siguiente **problema científico**: ¿Cómo mejorar la interacción bradyrizobio - frijol Caupí, para incrementar el rendimiento de esta leguminosa en suelos fluvisoles afectados por sales de la provincia Granma?

A partir del problema planteado, se estableció la siguiente **hipótesis**: Mediante la selección de combinaciones bradyrizobios nativos - frijol Caupí adaptadas a las condiciones de salinidad, se incrementa el rendimiento de este cultivo en suelos afectados por sales.

Como **objetivo general**: Incrementar el rendimiento de granos del frijol Caupí en áreas afectadas por sales, mediante la selección de combinaciones bradyrizobio - leguminosa tolerantes a la salinidad.

Objetivos específicos

1. Clasificar cultivares de frijol Caupí de acuerdo a su nivel de tolerancia a la salinidad, a partir del análisis de variables relacionadas con la germinación, crecimiento, desarrollo y rendimiento del cultivo.
2. Caracterizar rizobios aislados de suelos afectados por sales desde el punto de vista fenotípico, genético y de su tolerancia a condiciones estresantes de salinidad, pH y temperatura.

3. Determinar la influencia de la salinidad sobre la relación bradyrizobio – leguminosa, a partir del análisis de variables como la actividad de reducción de acetileno, proteínas totales, contenido de iones y ultraestructura de nódulos y hojas de plantas de frijol Caupí.
4. Evaluar el efecto de la inoculación de cepas nativas de *Bradyrhizobium* sobre el rendimiento de variedades de Caupí desarrolladas en suelos afectados por sales.

Novedad científica

Se logran aislar y caracterizar fenotípica y genéticamente, cepas nativas del género *Bradyrhizobium* pertenecientes a las especies *liaoningense* y *yuanmingense*, a partir de nódulos de frijol Caupí crecidos en suelos salinizados. Se demuestra que un mecanismo de tolerancia a la salinidad en frijol Caupí, es la retención de los iones salinos en las raíces, así como el incremento en la absorción de iones compatibles. Se muestra por primera vez el incremento de los gránulos de almidón en los cloroplastos y la desorganización de los orgánulos celulares en las hojas de las plantas sometidas a estrés por sales.

Valor práctico

Se ofrecen recomendaciones, sobre las variedades de frijol Caupí con mejores características de adaptación a las condiciones de salinidad. Se mejora la fijación simbiótica de nitrógeno y el rendimiento del cultivo, en suelos afectados por sales. Se contribuye a la recuperación de áreas marginadas por el efecto perjudicial de la salinidad, con la introducción de especies adaptadas. Desde el punto de vista ambiental, se ofrece una alternativa a la fertilización mineral por el uso de microorganismos biológicamente inocuos.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. La salinidad de los suelos

2.1.1. Causas que provocan la salinidad en los suelos

En ocasiones, los elementos naturales constituyen la principal causa de acumulación de sales en los suelos. A este tipo de salinización se le denomina “Salinidad Primaria” y es común encontrarla en regiones áridas, semiáridas y en las estepas. Esta se produce al romperse el equilibrio entre el volumen de precipitaciones y la evaporación del suelo (Manchanda y Garg, 2008; Ladeiro, 2012). Sin embargo, de forma natural también puede aparecer en lugares cercanos al mar, lagunas, litorales, pantanos, domos salinos y lugares que presentan manantiales y mantos freáticos salinos cercanos a la superficie (Rengasamy, 2006; Manchanda y Garg, 2008).

Por otro lado, el uso de agua de mala calidad, el mal drenaje, la baja permeabilidad, el inadecuado manejo de la fertilización, entre otras causas, de igual forma contribuyen a incrementar los niveles de sales en los suelos. A este tipo de salinidad se le llama “Salinidad Secundaria” (Rengasamy *et al.*, 2003; Rengasamy, 2006; Naz *et al.*, 2010).

El proceso de salinización, presenta los mismos principios independientemente de las causas que lo originen, en él se produce acumulación de sales solubles principalmente de Cl^- y Na^+ en los horizontes superficiales del suelo, en las fases líquida o sólida o en forma de bases de intercambio, en cantidades que afectan el crecimiento y desarrollo de la mayoría de las especies cultivables (Serraj y Sinclair, 2002; Rengasamy, 2006).

2.1.2. Distribución y extensión de las áreas afectadas por sales en el mundo y en Cuba

Se ha logrado contabilizar alrededor de 800 millones de ha en diferentes regiones del mundo (Munns y Tester, 2008). De los 1 500 millones de hectáreas dedicadas a la agricultura de secano, 32 millones (2 %) son afectadas por la salinidad, mientras que de los

230 millones de hectáreas irrigadas, 45 millones (20 %) son afectadas por sales (Rhoades y Loveday, 2004; Munns y Tester, 2008).

En Cuba, el 14 % de las áreas cultivables presentan esta problemática, entre ellas, las más representativas se ubican en Pinar del Río con más de 54 mil ha, Santi Spiritus y Camagüey con más de 100 mil y 140 mil ha respectivamente. No obstante, en la región oriental del país, se concentra más del 65 % de estas y son las provincias Santiago de Cuba y Granma las de mayor amplitud, con alrededor de 213 mil y 228 mil ha, respectivamente (González *et al.*, 2001; González, 2005).

Por estas razones, se desarrollan investigaciones encaminadas a la recuperación de estos suelos, con la implementación de métodos que incluyen el uso de variedades tolerantes a altos tenores de sales (López, 2001). No obstante, en ocasiones se hace necesario recurrir a otros métodos, que aunque costosos, garantizan en gran medida la recuperación de las condiciones físicas y químicas de los suelos.

2.1.3. Clasificación de los suelos afectados por sales según el daño que se produce en los cultivos

Se han establecido diversas clasificaciones, según el grado de afectación que sufren los cultivos por el efecto acumulativo de la sales en el suelo. Una de las primeras y más difundidas la realizó Jackson (1958), quién demostró que con una conductividad eléctrica (C.E) de 2 dS.m⁻¹ se producen afectaciones en los cultivos más sensibles, a pesar de ser la salinidad muy ligera, mientras que con C.E de 16 ó más dS.m⁻¹, se afectan la mayoría de los cultivos.

Borroto *et al.* (1997), al realizar un análisis de las plantas resistentes a la salinidad en Cuba, determinó que en el rango de 2-4 dS.m⁻¹, comienzan las afectaciones entre 20 y 50 % del rendimiento de la mayoría de los cultivos de interés agrícola y entre 4-5 dS.m⁻¹ se reducen

los rendimientos de los resistentes, entre 5-8 dS.m⁻¹, solo se obtienen rendimientos en los muy resistentes y por encima de 8 dS.m⁻¹, solo logran sobrevivir los muy resistentes.

Por otro lado, Royo y Areques (2003), establecieron que entre 0 y 0,7 dS.m⁻¹, no hay problemas de salinidad; de 0,8 a 1,2 la salinidad es baja y los cultivos son poco afectados, observándose daños a partir de un nivel de salinidad considerado como medio con rango de 1,3 a 2,0 dS.m⁻¹, mientras que a partir de 3,0 y hasta 4,0 dS.m⁻¹ o por encima de este valor, la mayoría de los cultivos son afectados.

A partir del año 2009, en la Norma Cubana (NC), NC (2009), se definió como la salinidad al proceso natural o antrópico que conduce a una concentración de sales que pueden afectar la fertilidad del suelo; en tanto que utiliza el término “salinización” para definir el incremento de la concentración de electrolitos en la solución de los suelos a niveles que provocan afectación por efecto osmótico o tóxico en los cultivos. En esta NC, se clasifican los suelos salinizados (indicador, C.E) en: **No salino (S₀)**, <1 dS.m⁻¹; **Débilmente salino (S₁)**, 1 a 2 dS.m⁻¹; **Medianamente salino (S₂)**, 2 a 4 dS.m⁻¹; **Salino (S₃)**, 4 a 6 dS.m⁻¹; **Fuertemente salino (S₄)**, 6 a 8 dS.m⁻¹; **Muy fuertemente salino (S₅)**, >8 dS.m⁻¹.

2.2. Efecto perjudicial de la salinidad sobre las plantas

Entre los efectos obvios de la salinidad sobre las plantas, se destacan la supresión del crecimiento, la aparición de daños en las hojas y la disminución del rendimiento y la calidad comercial de las cosechas (Parida y Das, 2005; Patel *et al.*, 2010).

La reducción del desarrollo se produce por el efecto osmótico y la toxicidad específica asociada a la absorción excesiva de Na⁺ y de Cl⁻, el desequilibrio nutricional provocado por la interferencia de los iones salinos con los nutrientes esenciales, otros estreses secundarios como los daños oxidativos y la combinación de los efectos antes indicados (Acevedo, 2003; Liu *et al.*, 2011; Elzaawely y Tawata, 2012).

Una célula vegetal expuesta a un medio salino, pierde agua para equilibrar el potencial hídrico, lo que produce la disminución del potencial osmótico y del de turgencia (Cheong y Yun, 2007). Es difícil precisar los límites máximos de concentración tolerables para un anión o catión potencialmente tóxico como el Na^+ y Cl^- , ya que varían entre rangos muy amplios según especies y variedades. Los síntomas propios de los efectos específicos se reflejan de una forma más o menos inmediata y estos son diversos, pero la principal evidencia es la disminución del crecimiento y desarrollo (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

Se han descrito muchos síntomas fisiológicos asociados a la toxicidad de los iones a partir de determinados niveles críticos, tales como: daños que tienen lugar a nivel celular en orgánulos y membranas, inhibición de la actividad enzimática, alteraciones en la funcionalidad de la membrana, inhibición de la fotosíntesis, alteración de los mecanismos de transporte y selectividad y derivación de parte de la energía metabólica de la planta, para su inversión en procesos distintos al crecimiento (Frahm *et al.*, 2004; Yuen, 2004).

Es necesario señalar, que el tipo de sales predominantes en el medio influye de un modo distinto en el desarrollo de las plantas: por ejemplo, a igualdad del potencial osmótico en el medio, las sales con predominio de cloruro son generalmente más tóxicas que las del SO_4^{2-} . Entre los cationes, el Mg^{2+} , es más tóxico que el Ca^{2+} o el Na^+ (Ben *et al.*, 2003).

La presencia de iones salinos en la solución del suelo, a partir de un determinado nivel crítico de concentración, origina un desplazamiento del equilibrio nutricional mineral de las plantas. Este efecto se produce de dos maneras: 1) La fuerza iónica del sustrato tiene un efecto directo sobre la absorción y traslocación de nutrientes. Una evidencia de este efecto es que la salinidad induce una absorción y acumulación de fósforo en ciertas especies. Este es un efecto osmótico y se presenta, independientemente del tipo de sal existente (Yuen, 2004). 2) El mecanismo más común, por el que la salinidad altera la nutrición mineral de

las plantas es por la interacción directa del Cl^- y el Na^+ sobre la absorción y traslocación de nutrientes dentro de la planta (Michel y Kaufmann, 2001).

Uno de los primeros resultados que reveló desequilibrios nutricionales en las plantas, como consecuencia de la presencia de los iones salinos, se mostraron en estudios de nutrición del Ca^{2+} . En judías (*Phaseolus vulgaris*) por ejemplo, se comprobó que la absorción de Ca^{2+} depende de la relación $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. A su vez, numerosos estudios muestran que la concentración de K^+ en la planta, disminuye al aumentar la salinidad o la relación $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en el medio (Zhu, 2003).

La reducción en la absorción de K^+ en la planta por el Na^+ , es un proceso competitivo y aunque las plantas tienen una selectividad alta de K^+ con respecto al Na^+ , cantidades excesivas de Na^+ tanto en compartimientos celulares como extracelulares afectan negativamente la adquisición y homeostasis del K^+ (Craine, 2006). La disminución de la relación $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ por adición de Ca^{2+} a la solución nutritiva, provoca que los niveles de K^+ intracelular se recuperen, de esta forma, aumenta la tolerancia de la planta a la salinidad. Por otra parte, se ha comprobado que el NaCl puede también inducir toxicidad de fósforo en algunas especies como maíz (*Zea mays* L.) en sésamo (*Sesamum indicum* L.) y en ciertas variedades de soya (*Glycine max* L.) (Bartels y Sunkar, 2005).

2.3. Tolerancia de las plantas a la salinidad

La tolerancia, es una propiedad desarrollada por las plantas durante el proceso evolutivo, para poder perpetuar la especie donde se producen condiciones estresantes de clima o suelo en forma permanente o que se repiten periódicamente (González *et al.*, 2002). Los ejemplares que no se adaptan a esas condiciones adversas, se eliminan de la población, mientras que se conservan y dan descendencia, aquellos que logran sobrevivir, hasta que aparecen organismos adaptados a la situación de estrés, que se transmite genéticamente a las próximas generaciones (Zhu, 2007).

Las características de tolerancia son potenciales, no es posible descubrirlas en condiciones óptimas de crecimiento y se evidencian sólo cuando actúan sobre la planta los factores adversos del medio (Schulze *et al.*, 2005; Bohnert *et al.*, 2006). Las manifestaciones de tolerancia en la naturaleza son diversas, mientras que en algunas plantas se manifiesta gran plasticidad fenotípica, en otras la tolerancia muestra una base genética, que parece depender de varios genes con caracteres aditivos y dominantes (Inan *et al.*, 2004; Moller y Tester, 2007).

En las ciencias biológicas, sobre la base de que en los suelos con diferentes grados de salinidad, se pueden cultivar distintos tipos de plantas, se maneja el concepto de tolerancia a la salinidad (González *et al.*, 2004; Cheong y Yun, 2007). Ello ha permitido que en los últimos años se hayan intensificado los estudios dirigidos a la selección para la tolerancia a la salinidad, así como a la búsqueda de nuevas especies y variedades tolerantes, que puedan ser utilizadas directamente en la producción o como progenitores en los programas de mejora genética (Murillo, *et al.*, 2006; Praxedes *et al.*, 2010).

Para evaluar la tolerancia a la salinidad en las plantas, se deben tener en cuenta las respuestas biológicas y agronómicas (González *et al.*, 2004). Desde el punto de vista biológico, la tolerancia se manifiesta por la capacidad que tienen las plantas para completar su ciclo de desarrollo y producir semillas viables (Zhu, 2007). Desde el punto de vista agronómico, la tolerancia está determinada por la habilidad para sobrevivir y producir rendimientos económicos en condiciones de estrés y se expresa como la relación entre el rendimiento de una variedad en condiciones salinas con respecto a su rendimiento en condiciones normales (González *et al.*, 2004).

Con diferentes niveles de sales en el suelo, la relación entre el rendimiento de una variedad en condiciones de estrés salino con respecto a su rendimiento en condiciones normales,

puede variar, por lo que al caracterizar el grado de tolerancia de las especies y/o variedades objeto de estudio, se debe indicar el nivel de salinidad presente (Udovenko, 1977).

Referente a estos aspectos, es de destacar que muchas veces al cultivar un grupo de especies o variedades de plantas en condiciones salinas, se establecen como más tolerantes aquellas que mayor rendimiento producen, pero en este caso, sólo se presentan los resultados sobre su productividad en condiciones adversas y aunque este indicador es importante para la práctica agrícola, no constituye un criterio de tolerancia del organismo a la salinidad, ya que no se conoce su productividad en condiciones óptimas, por lo que no se puede determinar en qué medida las plantas se afectan en condiciones adversas (González, 1996).

2.3.1. Descripción de algunos mecanismos utilizados por las plantas para contrarrestar el estrés por sales

La raíz, como principal órgano de absorción de agua e iones, tiene gran importancia en la respuesta, a corto y largo plazo, al estrés salino. En este órgano se sintetiza ácido abscísico (ABA), una de las señales tempranas de estrés, capaz de producir cambios fisiológicos locales (conductividad hidráulica) y a distancia (cierre estomático) (Maggio *et al.*, 2001).

La supresión de la actividad meristemática, particularmente aquella asociada con los tejidos vasculares provoca la reducción del diámetro de la raíz y del cilindro vascular, e incrementa la formación de células totalmente vacuoladas cerca del ápice radical, tanto en plantas halófitas como en glicófitas (Chinnusamy *et al.*, 2005).

Esta vacuolización, en ocasiones promueve la suberización y lignificación de las células de la hipodermis y endodermis, produciéndose un engrosamiento e impermeabilización de las paredes, formándose a su vez una banda de Caspary muy bien desarrollada en una región cercana al ápice radical (Zyalalov, 2004). Una temprana diferenciación de bandas de

Caspary, genera una barrera que minimiza el libre influjo de iones a través del apoplasto hacia el xilema radical y finalmente dentro del flujo transpiracional (Chen *et al.*, 2007).

Los cambios inducidos por el estrés salino en la ultraestructura, morfología y desarrollo de tejidos especializados (endodermis y exodermis) de la raíz, reflejan los cambios adaptativos conducentes al control de la absorción y transporte de agua e iones a la parte aérea (Ashraf y Bashir, 2004).

Otro de los mecanismos utilizados por las plantas para evitar el efecto dañino de las sales, es la osmorregulación o ajuste osmótico, el cual confiere a las plantas la capacidad de tolerar condiciones de escasez de agua y salinidad elevada, con la expresión de mecanismos adaptativos que evitan la disminución de la fotosíntesis, las alteraciones en la traslocación y la distribución de los fotoasimilatos y las pérdidas de rendimiento (Rodríguez-Pérez, 2006). Durante el proceso de ajuste, se produce la acumulación neta de solutos en respuesta al déficit hídrico, lo que le permite a la célula disminuir su potencial osmótico y mantener una relación isotónica entre compartimentos sub-celulares (Rodríguez-Pérez, 2006).

El ajuste osmótico está generalmente ligado a la síntesis de solutos orgánicos que se mantienen estables o se incrementan como la betaína, colina, glicina-betaína, prolina y sacarosa, así como otros aminoácidos o proteínas solubles totales (Kishor *et al.*, 2005; Márquez *et al.*, 2005).

Por otro lado, Cuando en el suelo existe una acumulación excesiva de Na^+ y Cl^- , se produce una interferencia con la absorción de nutrientes (K^+ , Ca^{2+}) e impide la captación de los mismos, al tiempo que pueden alcanzar niveles citosólicos tóxicos para el metabolismo celular. El catión Na^+ en particular, presenta dos formas de ingreso a la planta: a) por un sistema de rápida saturación que presenta alta afinidad tanto para el Na^+ como para el K^+ ; y b) por un sistema que no presenta saturación, pero que tiene baja afinidad (Berthomieu *et al.*, 2003; Platten *et al.*, 2006).

Debido a la diferencia electronegativa del potencial transmembrana, un aumento en la concentración extracelular de Na^+ establece un gradiente electroquímico a favor del ingreso pasivo del ión al citosol (Rus *et al.*, 2004). El Na^+ compite con el K^+ en la absorción a través de co-transportadores Na^+-K^+ y puede también bloquear los transportadores específicos de K^+ , por lo que aumentan los niveles intracelulares tóxicos de Na^+ y se reducen los de K^+ (Apse y Blumwald, 2007; Pesqueira, 2008; Jha *et al.*, 2010).

Un tipo de transportador de iones K^+ y Na^+ bastante conocido es el perteneciente a la familia de los HKT (*High affinity K⁺ Transporter*) (Vera-Estrella *et al.*, 2005; Davenport *et al.*, 2007; Moller *et al.*, 2009). El HKT, es un transportador de alta afinidad para K^+ , que funciona también acoplado al Na^+ y contribuye a su ingreso en suelos salinos (Davenport *et al.*, 2007; Moller *et al.*, 2009).

Otros canales como los que median el transporte de los iones Na^+ y K^+ , conducen rápidamente los iones desde la solución y los secretan dentro de la corriente xilemática, a diferencia de los transportadores (Vera-Estrella *et al.*, 2004; Davenport *et al.*, 2005; Rodríguez-Pérez, 2006). Entre ellos, se encuentran los canales rectificadores de la entrada de K^+ (KIR, del inglés: *K⁺ Inward Rectifying Channel*), los rectificadores de la liberación de K^+ (KOR, del inglés: *K⁺ Outward Rectifying Channel*) y los canales no selectivos de cationes (NSC, del inglés: *Non Selective Channel*) (Horie y Schroeder, 2004; Gilliham y Tester, 2005; Moller *et al.*, 2009).

Otro mecanismo que contribuye a disminuir el efecto perjudicial de las sales en las plantas, es la homeostasis. El proceso homeostático se inicia cuando en un ambiente salino el ingreso pasivo de Na^+ aumenta la concentración del mismo en el citosol por encima de un valor crítico, a partir de ese momento se inicia la exclusión del ión tóxico (Maathuis, 2006). La homeostasis de las concentraciones iónicas intracelulares es fundamental para el normal desarrollo de las células. Se requiere una correcta regulación del flujo iónico para mantener

una baja concentración de iones tóxicos y una óptima concentración de aquellos que son esenciales (Fukuda *et al.*, 2004).

Ante una situación de estrés salino, la regulación de la absorción de K^+ , la prevención de entrada de Na^+ a la raíz o su ingreso a la corriente xilemática y la expulsión de este al medio extracelular, son estrategias comunes utilizadas por las plantas, lo cual permite mantener una óptima relación K^+/Na^+ en el citosol (Tada y Kashimura, 2009).

El papel del ión Ca^{2+} en la respuesta de las plantas a salinidad resulta esencial, por su papel señalizador, su función estructural en la membrana y su efecto sobre la actividad de algunos transportadores iónicos (Tester y Davenport, 2003).

Es conocido que el papel del Ca^{2+} es complejo, ya que actúa como intermediario en la cascada de señales que conducen a la transcripción de numerosos genes involucrados en la respuesta adaptativa (Zhu, 2003).

El flujo de agua provocado por la transpiración foliar, produce el movimiento de sales desde las raíces hasta las hojas (Maathuis, 2006). En las raíces, los solutos que entran mediante el flujo transpiratorio, se mueven por el apoplasto y si logran atravesar la membrana de una célula radical, continúan su transporte por el simplasto hasta alcanzar el xilema. En todo este camino hasta llegar al xilema, el flujo de iones encuentra células especializadas con un sistema vacuolar desarrollado y donde el paso a través de las membrana plasmática o vacuolar, constituye una barrera selectiva en su transporte hacia las hojas (Manchanda y Garg, 2008).

2.4. Las leguminosas tropicales en la agricultura

La familia de las leguminosas está formada por las subfamilias, *Caesalpinioideae*, *Mimosoidae* y *Papilionioideae*, las cuales incluyen más 700 géneros y 18 000 especies. Esta diversidad, es la que hace posible su aparición en un amplio rango de hábitats, entre los que

se incluyen; llanuras, grandes alturas, regiones áridas e incluso semidesérticas o lugares donde las precipitaciones son abundantes durante todo el año (Sprent, 2007).

Las leguminosas son usadas frecuentemente en esquemas de asociación y rotación de cultivos (Lavin *et al.*, 2005; Jemo *et al.*, 2006; Herridge *et al.*, 2008). Juegan un importante papel en el equilibrio de nitrógeno en el ecosistema natural, debido fundamentalmente, a la asociación Rizobio/leguminosa, la cual es responsable de la fijación de al menos 35 millones de toneladas de nitrógeno anualmente (Gutiérrez *et al.*, 2001). Pueden ser utilizadas como forraje, fuente combustible y abonos verdes. Algunas especies arbóreas son importantes por su madera y otras por sus frutos y hojas, que pueden servir como fuente de alimento humano y animal (Giller *et al.*, 1994).

2.4.1. El frijol Caupí

El género *Vigna*, ha sido sometido a cambios y reestructuraciones taxonómicas, las más recientes fueron detalladas por Singh (2004) y Schrire *et al.*, (2005). Un poco más de la mitad de 99 especies existentes, son nativas de África y otro número importante de ellas provienen de la India y algunos países Asiáticos (Maxted *et al.*, 2004; Naab *et al.*, 2009).

Algunas de estas especies, son utilizadas como alimento humano de diversas maneras, por ejemplo, *V. marina*, *V. subterranea*, así como la especie *V. unguiculata* (subespecies *sesquipedalis* y *unguiculata*) se consumen fundamentalmente en forma de grano seco o legumbres, en forma de semillas germinadas o brotes (Rusinamhodzi *et al.*, 2006), mientras que de las especies *V. heterophylla*, *V. luteola* y *V. vexillata* se consumen los tubérculos que estas producen (Maxted *et al.*, 2004; Sprent *et al.*, 2010), constituyendo todas estas formas de consumo una alternativa de suministro de proteínas (26 %), calorías y minerales para la alimentación humana y animal (MINAG, 2003; Ávila, 2006).

El frijol Caupí, está extensamente difundido en el mundo y puede crecer en regiones tropicales y subtropicales entre 44° N a 35° S en el globo terráqueo (Édson *et al.*, 2004;

FAO, 2007; Hallensleben *et al.*, 2009). Sus producciones, así como las áreas dedicadas a su cultivo en el mundo, han aumentado. En 2011, se produjeron 4,9 millones de toneladas en 10,4 millones de hectáreas y los mayores productores fueron, Nigeria, Níger y Brasil, en los cuales se concentró el 84,1 % de la superficie y el 70,9 % de la producción mundial (FAOSTAT, 2010). El rendimiento del frijol Caupí puede variar entre 0,50 y 2.00 t.ha⁻¹, siendo las causas que condicionan estas variaciones las características edafoclimáticas de las regiones en las que se desarrolla, el potencial de rendimiento de los cultivares, la incidencia de plagas y enfermedades, entre otras (Murillo *et al.*, 2006; FAOSTAT, 2010; Patel *et al.*, 2010; Olufajo, 2012).

En Cuba, inicialmente el cultivo estuvo asociado al sector campesino, fundamentalmente en la región oriental del país. Las siembras, se incrementaron a partir de 1990 por incidencia de la mosca blanca, que limitó la siembra de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en la provincia de Holguín (MINAG, 2003). En el año 2007, el área cosechada en Cuba superó las 84 000 hectáreas, con un volumen de producción de 97 000 toneladas (FAOSTAT, 2010).

Muchos autores, le atribuyen gran importancia al cultivo debido a cualidades de fácil adaptación a los suelos arcillosos, su aceptable nivel de tolerancia a la incidencia de plagas, enfermedades, altas temperaturas, radiaciones ultravioletas y metales pesados (Al-Garni, 2006; Singh, 2008; Apáez *et al.*, 2009; Olufajo, 2012). Una de las características distintivas en este cultivo, es su alta tasa de fijación simbiótica de nitrógeno, razones por las cuales se prefiere por los productores los cuales las incluyen en esquemas de asociaciones y rotaciones con otros cultivos por sus características como mejoradora de los suelos (Gutiérrez *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2003; Naab *et al.*, 2009).

Algunos informes, señalan que el género *Vigna* manifiesta características de tolerancia a la salinidad que varían entre especies y variedades (González *et al.*, 2000; Murillo *et al.*, 2002a).

2.4.2. Respuesta del frijol Caupí en condiciones de salinidad

Como en la mayoría de los cultivos, la respuesta de las leguminosas a la salinidad varía ampliamente y depende de factores tales como las condiciones climáticas, propiedades del suelo y el estado de desarrollo de los cultivos (Tester y Davenport, 2003; Cha-um *et al.*, 2013).

Existen leguminosas que muestran mayor grado tolerancia a la presencia de sales, otras como es el caso de alfalfa (*Medicago sativa* L.), trébol de Alejandría (*Trifolium alexandrinum* L.) y haba (*Vicia faba* L.), las cuales soportan niveles salinos superiores a frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), soya (*Glycine max.* L.) y chícharo (*Pisum sativum* L.), que manifiestan mayor susceptibilidad (Farias *et al.*, 2005).

Dentro del género *Vigna*, existe gran variabilidad en la respuesta ante condiciones de estrés por sales, lo que puede estar condicionado por el amplio rango de regiones con climas diferentes de donde estas provienen (Sprenst *et al.*, 2010; Cha-um *et al.*, 2013). La especie *V. marina*, es considerada como salino tolerante, mientras que los cultivares pertenecientes a la especie *V. unguiculata*, son más sensibles a este tipo de estrés (Stamford *et al.*, 2003; Doleib y Elsheikh, 2006; Imbomba, 2006).

Sin embargo, la variabilidad en la respuesta de este cultivo ante condiciones de estrés salino, también puede variar entre genotipos de la misma especie. Murillo *et al.* (2002b), al evaluar 8 cultivares de Caupí, encontró una conducta diferenciada entre variedades clasificándolas en tolerantes, medianamente tolerantes y aquellas que son sensibles a las sales, atribuyendo las variaciones en el grado de tolerancia, a la capacidad de redistribución de los iones tóxicos desde las hojas, hacia las raíces.

Por su parte, Chávez *et al.* (2002) informaron, que las manifestaciones de tolerancia o susceptibilidad, comienzan a manifestarse desde la absorción de agua por la semilla durante el proceso de germinación. Mientras que Doleib y Elsheikh (2006), encontraron que el Caupí, manifiesta gran sensibilidad a la salinidad durante el crecimiento y desarrollo, en tanto, la mayor tolerancia se exhibe durante la floración y el llenado de las vainas.

2.5. El proceso de fijación simbiótica del nitrógeno

2.5.1. Los rizobios. Identificación genética con técnicas moleculares

Las bacterias del suelo del orden *Rhizobiales* conocidas genéricamente como rizobios, son α -proteobacterias Gram-negativas, pertenecen a un número diverso de géneros, entre los que se encuentran, *Rhizobium*, *Allorhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Blastobacter*, *Azorhizobium*, *Devosia*, *Methylobacterium*, *Burkholderia*, *Ralstonia* y *Ochrobactrum* (Ramírez, 2006; Domínguez, 2007).

Existen diversas técnicas para la identificación genética de rizobios, basadas en aproximaciones desde la biología molecular. Una de ellas consiste en el análisis de secuencias de genes ARNr de 16S, la cual proporciona la base para deducir la posición taxonómica y filogenia de la familia *Rhizobiaceae* (Martínez-Romero, 1994; Lang *et al.*, 2013; Hassen *et al.*, 2014).

El gen ARNr de 16S, es considerado un buen marcador molecular para construir filogenias de linajes a nivel de dominio, división, subdivisión, género y especie. La técnica de amplificación de este gen, es usada por su alta precisión en la identificación y caracterización de bacterias con características diferentes a los géneros y especies conocidos. El análisis de la secuencia de estos genes, permite entonces ubicar a cada bacteria dentro de su propio grupo (Lloret y Martínez-Romero, 2005; Vinuesa *et al.*, 2005; Degefu *et al.*, 2013; Hassen *et al.*, 2014).

Para obtener información filogenética y taxonómica referente al gen ARNr de 16S, se puede utilizar la técnica PCR-RFLP, en la cual se analiza el patrón electroforético que se obtiene después de la digestión del gen con enzimas de restricción (Laguerre *et al.*, 1994). Para identificar las diferentes especies, se pueden combinar dos técnicas, PCR-RFLP del gen ARNr de 16S y PCR-RFLP de la región 16S-23S (EIR), ya que esta región presenta importantes variaciones en la longitud y secuencia nucleotídica a nivel de género, especie y subespecie (Van-Berkum y Fuhmiann, 2000; Berrada, H. y Fikri-Benbrahim, 2014).

El ARDRA genotipo es una técnica rápida y sencilla, por lo cual es también utilizada con frecuencia y esta consiste en la amplificación del gen ARNr de 16S y la posterior digestión de los fragmentos amplificados con enzimas de restricción. En este caso, la identificación se logra al comparar los patrones de restricción obtenidos, con una biblioteca de perfiles ARDRA (Kaschuk *et al.*, 2006; Espinoza *et al.*, 2008; Berrada, H. y Fikri-Benbrahim, 2014).

La hibridación cuantitativa ADN-ADN es otro de los métodos utilizados que permite también diferenciar especies, subespecies y establecer relaciones filogenéticas (Vinuesa *et al.*, 2005; Lorite *et al.*, 2009).

2.5.2 Interacción rizobio-leguminosa

Estas bacterias, colonizan las raíces de las leguminosas y forman nuevas estructuras conocidas como nódulos radicales, en los cuales se fija el dinitrógeno atmosférico (de Felipe, 2006).

El reconocimiento previo entre la planta y la bacteria, está condicionado por señales moleculares (D'Haeze y Holsters, 2002; Subramanian *et al.*, 2007). Una de las primeras señales es la liberación de metabolitos secundarios, fundamentalmente compuestos flavonoides como naringenina, genisteína y daidzeína y no flavonoides como ácidos

aldónicos y betaínas, que atraen químicamente a los rizobios hacia la región apical de los pelos radicales (Oldroyd *et al.*, 2005; Rodríguez y Sicardi, 2010).

Los rizobios, al reconocer los compuestos flavonoides, inician la transcripción de los genes denominados de nodulación (genes *nod*), los cuales a su vez inducen una serie de cambios morfológicos y fisiológicos en los pelos radicales de la planta, que condicionan la entrada de la bacteria (de las Heras, 2004; Miwa *et al.*, 2006; Oliva, 2008).

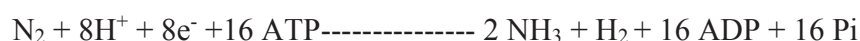
Una vez que las bacterias son retenidas por las células vegetales que forman el primordio nodular, son rodeadas por la membrana peribacteroidal (MPB), la cual mantiene físicamente fuera del citoplasma a los bacteroides y de esta forma, se evita la posible respuesta de defensa de la planta. Esta membrana, además juega un papel relevante en el intercambio metabólico entre el citoplasma celular y los bacteroides en la simbiosis (Giles *et al.*, 2008; Masson-Boivin *et al.*, 2009).

De esta forma, queda constituido el simbiosoma, unidad básica de fijación de nitrógeno, capaz de regular el transporte de metabolitos entre los simbiosomas. La relación simbiótica, se manifiesta en el hecho de que la planta proporciona energía y esqueletos carbonados a los bacteroides, para que puedan realizar la fijación de nitrógeno y éstos a cambio, suministran a la planta nitrógeno asimilable en forma de amidas o de ureidos (Kinkema *et al.*, 2006; Coque *et al.*, 2008; Hayat *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2009).

2.5.3. Fisiología del nódulo

Una vez que la bacteria se convierte en bacteroide en el interior de la célula, adquiere la capacidad de reducir el nitrógeno atmosférico a través del complejo enzimático nitrogenasa. La enzima, consta de dos proteínas: los componentes I y II. El componente I: molibdoferredoxina (MoFe), es responsable de la reducción del N₂ molecular a amoníaco. El componente II: azoferredoxina, cuya función es la transferencia de electrones al componente I y por último al nitrógeno (Igarashi *et al.*, 2005; Rees *et al.*, 2005; Hoffman *et*

al., 2008; Rajasekaran *et al.*, 2012). Estos componentes conllevan a la reacción de reducción:



Esta fijación enzimática de N_2 , es un proceso con un elevado costo energético que requiere el acoplamiento de un sistema eficiente de generación de ATP, como la fosforilación oxidativa (Zhao *et al.*, 2006). En rizobios, del 30 al 60 % de la energía suministrada para la nitrogenasa se pierde como H_2 , disminuyendo la eficiencia de la fijación de nitrógeno (Cheng *et al.*, 2005; Cheng, 2008).

Por otra parte, la enzima nitrogenasa es muy sensible al O_2 , por ello, su concentración en las proximidades de la enzima, debe ser controlada para crear un ambiente microaeróbico y evitar que esta se inactive. En los nódulos, se han desarrollado mecanismos de resistencia variable a la difusión de O_2 : a) mediante una barrera de resistencia a la difusión; b) el transportador específico leghemoglobina, con alta afinidad por el O_2 ; c) el desarrollo una elevada tasa de respiración bacteroidal a bajas concentraciones de este elemento (L'Taief *et al.*, 2007; Navascués *et al.*, 2012; Pérez-Rontomé *et al.*, 2012).

2.6. Daños provocados por la salinidad y mecanismos de tolerancia desarrollados por los rizobios

La salinidad, puede afectar significativamente el crecimiento y la fisiología de los rizobios del suelo, reduce el número, tamaño y masa de los nódulos, el contenido de leghemoglobina y la actividad de la enzima nitrogenasa, razones por las cuales, se afecta el proceso de fijación simbiótica del nitrógeno, que es considerado más sensible a la salinidad que la leguminosa huésped y la bacteria en su estado libre (Bolaños *et al.*, 2006; Khadri *et al.*, 2007).

Aunque existen estos y otros daños fisiológicos provocados por las sales, tanto las estructuras nodulares como las bacterias, han desarrollado mecanismos de adaptación para

disminuir su efecto dañino. El rizobio, reduce la intensidad de su metabolismo bajo estrés osmótico debido a la represión de genes implicados en el ciclo del ácido tricarboxílico, la toma de suplementos carbonados, el metabolismo del glicógeno en la cadena respiratoria y en la composición de los ribosomas (Ormeño-Orrillo, 2005; Domínguez-Ferreras *et al.*, 2006; MacLean *et al.*, 2007).

En presencia de estrés por sales, en los rizobios ocurren alteraciones en la expresión de genes acompañantes, así como de aquellos que están involucrados en la división celular, (Miller-Williams *et al.*, 2006; Karuppasamy *et al.*, 2011). Se ha demostrado, que el incremento de la concentración osmótica en el medio desencadena la acumulación de iones compatibles como K^+ y la síntesis de solutos como, glutamato, trealosa, betaína y prolina (Rüberg *et al.*, 2003; Deaker *et al.*, 2004; Bartels y Sunkar, 2005; Domínguez, 2007).

Las bacterias, durante el proceso de infección y establecimiento dentro de la leguminosa, además de transformarse en bacteroides, también se enfrentan a ambientes adversos que las preparan para diferentes condiciones estresantes, algunos de ellos relacionados con el estrés oxidativo y osmótico (Liu *et al.*, 2011; Elzaawely y Tawata, 2012).

Los nódulos, también sufren transformaciones ultraestructurales que le permiten adaptarse a las condiciones hostiles del estrés hiperosmótico, como sucede en plantas de alfalfa, donde el espacio peribacteroidal se incrementa, lo cual sugiere un aumento de la presión de turgor en el interior del simbiosoma y la elevación de la concentración de los solutos compatibles (Trinchant *et al.*, 2004).

Los niveles de tolerancia en el microsimbionte pueden variar por diversas razones, por ejemplo, se ha demostrado que existen diferencias importantes relativas al tipo de crecimiento. En este sentido, la mayoría de los informes coinciden en que las cepas de crecimiento rápido, presentan mayor nivel de tolerancia a las condiciones de estrés por sales que las de crecimiento lento (Boscari *et al.*, 2004). De igual forma, las cepas aisladas

de suelos salinizados, presentaron mayores niveles de adaptación y tolerancia a la sal, que aquellas que provienen de suelos sin esa afectación (Ashraf y Bashir, 2004).

No obstante, existen informes que demuestran que esta respuesta puede ser diferente. Cuadrado *et al.* (2009), encontraron cepas de *Bradyrhizobium* de crecimiento lento, más tolerantes a la salinidad que las de *Rhizobium* de crecimiento rápido y, que aquellas aisladas de suelos no afectados de sales, presentaron niveles de tolerancia al NaCl similares a las aisladas en suelos salinizados.

De igual forma, es bien conocido que los nódulos indeterminados producidos por leguminosas como *Medicago sativa*, *Vicia faba*, y *Trifolium alexandrinum*, son más osmo-tolerantes que los determinados, producidos por ejemplo por *Glycine*, *Phaseolus spp.*, entre otras, debido a que solo los nódulos indeterminados tienen el potencial para regenerar la actividad y las estructuras deformadas por el efecto perjudicial de las sales (Bouhmouch *et al.*, 2005; Yokoyama *et al.*, 2006; Fernández-Pascual *et al.*, 2007).

2.7. La fijación simbiótica del nitrógeno en el frijol Caupí

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* (Wolde-Meskel *et al.*, 2005; Germano *et al.*, 2006; Yokoyama *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008). En los nódulos de Caupí, recientemente se han 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* (Chemining'wa *et al.*, 2007; Azarias *et al.*, 2012).

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 (Van-Kessel y Hartley, 2000).

De igual forma, esto ha permitido que sea utilizada como planta trampa para lograr aislamientos en suelos poco cultivados y limitados por condiciones estresantes (Zilli *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2012).

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 (Belane y Dakora, 2009; Édson *et al.*, 2004).

Existen algunos informes sobre la capacidad del frijol Caupí para realizar simbiosis con los rizobios del suelo en condiciones de estrés por sales (Zilli *et al.*, 2004; Steenkamp *et al.*, 2008), 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 (Gómez y López, 2004; Doleib y Elsheikh, 2006; Sprent *et al.*, 2010).

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 (Sousa *et al.*, 2003).

Otras de las causas que pueden afectar el efecto beneficioso de la inoculación bajo estas condiciones, es el uso de cepas poco específicas para el frijol Caupí. En este sentido, Nascimento *et al.* (2012), informaron que en Brasil al inocular 5 cultivares de frijol Caupí con cepas de *Rhizobium* en suelos afectados por sales, se redujo la formación de nódulos y el índice de fijación simbiótica, probablemente debido a la baja especificidad de las cepas usadas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Condiciones generales para el desarrollo de los experimentos

La investigación se llevó a cabo en tres fases (Figura 3.1). En la primera, se caracterizó el comportamiento de los cultivares de Caupí, crecidos en condiciones de ambientes salinizados, para lo cual se determinó el índice de tolerancia a partir de la evaluación de variables relacionadas con la germinación, crecimiento y el rendimiento del cultivo.

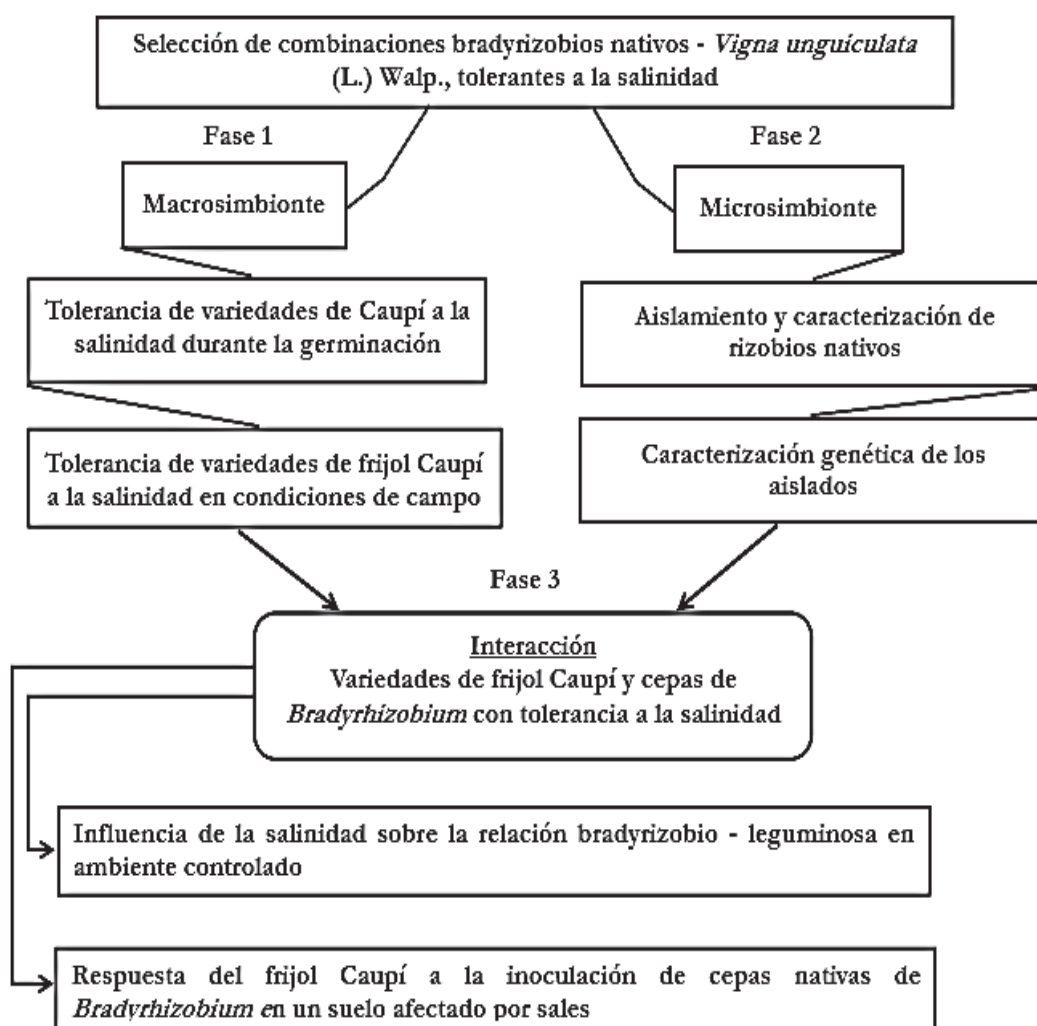


Figura 3.1. Esquema general del trabajo de investigación.

La segunda fase, se orientó a la caracterización fisiológica y genética de los nuevos aislados, obtenidos a partir de nódulos radicales de plantas de Caupí, crecidas en suelos afectados por sales.

En la tercera y última fase, se hicieron interactuar la leguminosa y la bacteria rizobiacea en dos momentos importantes. El primero, en condiciones controladas para evaluar el efecto del estrés por sales sobre algunas de las variables que caracterizan la tolerancia a la salinidad y la fijación simbiótica de nitrógeno. El segundo, en condiciones de campo para determinar la influencia de la inoculación con cepas aisladas de suelos afectados por sales, sobre variables relacionadas con la nodulación, fijación simbiótica de nitrógeno y rendimiento.

3.1.1. Material vegetal y microorganismos utilizados

Fue utilizada la especie *Vigna unguiculata* (L.) Walp., Subespecie *unguiculata* (Maxted *et al.*, 2004), de nombre común en Cuba, frijol Caupí o Carita. Las semillas certificadas de las variedades Cubanita-666, Trópico Yarey, IT 86 D-715, IT 86 D-792, IT 86 D-389, IT 82 E-9, IITA-Precoz, IT 86 D-386, IT 86 D-510, Viñales-144 A, Cancarro, IT 86 D-719, usadas en las investigaciones, fueron donadas por el Instituto de Investigaciones Agropecuarias “Jorge Dimitrov”. Estas se establecieron o se sembraron en dependencia de las exigencias de cada experimento, así como de sus características, las cuales aparecen resumidas en el Anexo 1A.

La especie/cepa tipo de *Bradyrhizobium yuanmingense* utilizada fue CCBAU 10071 (Yao *et al.*, 2002), la cual se usó como control en la determinación de la tolerancia de los aislados a condiciones abióticas estresantes de salinidad, pH y temperatura, cuyas características se reflejan en el Anexo 1B.

Para la caracterización genética de los aislados nativos, fueron utilizadas especies de referencia provenientes del *GeneBank* (Anexo 2).

3.1.2 Experimentos de laboratorio y ambiente controlado

En el Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal de la Universidad de Granma, fue desarrollado un experimento en condiciones de laboratorio para evaluar la tolerancia de variedades de frijol Caupí a la salinidad durante la germinación.

La caracterización fisiológica y genética de los aislados nativos, la evaluación de su tolerancia a estrés salino, altas temperaturas y pH en condiciones *in vitro*, así como la evaluación del efecto de la salinidad sobre la fijación simbiótica de nitrógeno en el frijol Caupí en ambiente controlado, se realizaron en el Instituto de Ciencias Agrarias del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, España.

Para los experimentos relacionados con los rizobios a nivel de laboratorio, se utilizó el medio de cultivo sólido, Levadura-Manitol-Agar (LMA) o Levadura-Manitol (LM) para cultivos líquidos a pH 6,8, según correspondió en cada caso (Vincent, 1970).

3.1.3. Características edafoclimáticas y ubicación de las localidades donde se realizaron los experimentos en condiciones de campo

3.1.3.1 Descripción de las variables meteorológicas en las áreas y años en los que se desarrollaron los experimentos

Las variables meteorológicas, precipitaciones y temperaturas medias mensuales de las zonas y en los años en que fueron desarrollados los experimentos, se muestran en la Figura 3.2. Las precipitaciones medias mensuales en ambas localidades fueron muy escasas, sobre todo en el período de noviembre-abril, las cuales no llegaron a los 20 mm.

A partir del mes de mayo, las precipitaciones se incrementaron en ambas localidades sobre todo en el municipio Jiguaní durante el mes de junio, donde se alcanzó un valor medio mensual de 55 mm, lo cual responde al inicio de la temporada de lluvia en el clima de Cuba.

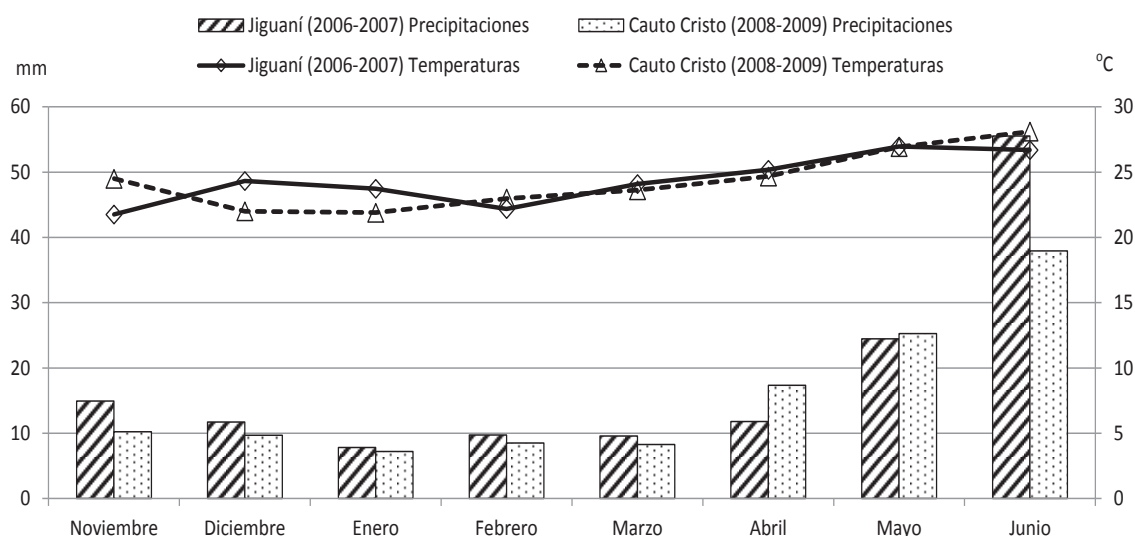


Figura 3.2. Comportamiento de las variables meteorológicas temperatura y precipitaciones medias de los meses y los años en los que se establecieron los experimentos (INSMET, 2009).

La temperatura media se mantuvo entre 21-25 °C durante los meses de noviembre-abril, para luego incrementarse a partir de mayo y lograr un máximo de 28 °C en la localidad de Babiney, municipio de Cauto Cristo.

3.1.3.2. Ubicación y características edáficas del experimento de campo 1

El primer experimento, se realizó en la Empresa Genética y Cría “Manuel Fajardo” ubicada a 20° 22’ 12’’ latitud norte y 76° 27’ 56’’ longitud oeste, en el municipio Jiguaní (Anexo 3). Se desarrolló simultáneamente en dos áreas, que aunque separadas entre sí por una distancia aproximada de 256 m, sus suelos clasificaron dentro del Agrupamiento Fluvisol (Hernández *et al.*, 1999).

En la primera de ellas, el Fluvisol clasificó dentro del Subtipo Diferenciado, Género Salinizado, con un contenido de sales solubles totales promedio de 3 712 ppm y valores medios de conductividad eléctrica (C.E) en el extracto de saturación de 5,8 dS.m⁻¹, por lo cual clasifica de acuerdo a la gradación establecida por la NC, (2009), como suelo salinizado (S₃).

Tabla 3.1. Cationes y aniones solubles del suelo donde se desarrollaron los experimentos en el municipio de Jiguaní (0-30 cm de profundidad).

Suelos	Cationes y aniones solubles (cmol (+) kg ⁻¹)								Otras características			
	Ca ⁺²	Mg ⁺²	Na ⁺	K ⁺	CO ₃ ⁻²	HCO ₃ ⁻	Cl	SO ₄ ⁻²	C.E (dS.m ⁻¹)	SST (ppm)	pH (H ₂ O)	M.O %
No afectado por sales	1,2	0,2	0,1	0,08	0,00	0,2	0,52	0,31	0,96	614	7	3
Afectado por sales	1,25	1,22	7,2	0,08	0,1	0,32	7,9	1,6	5,8	3 712	7,3	3,3

Nota: CE, conductividad eléctrica; SST, sales solubles totales; M.O, materia orgánica

En la segunda área, el Fluvisol perteneció al Subtipo Diferenciado y presentó un contenido de sales de 614 ppm y valores medios de C.E en el extracto de saturación de 0,96 dS.m⁻¹, por lo que clasifica de acuerdo a la gradación establecida por la NC, (2009), como no salinizado (S₀). Los suelos utilizados en este experimento, no tienen correlación con la clasificación realizada por la *World Reference Base (WRB)*, (2006). Entre las sales solubles del suelo afectado se destacan por sus altas concentraciones las de cloro y sodio (Tabla 3.1).

3.1.3.3. Ubicación y características edáficas del experimento de campo 2

El segundo experimento fue desarrollado en áreas de la Cooperativa de Créditos y Servicios Fortalecida “8^{vo} Congreso”, situada en el municipio Cauto Cristo específicamente a los 20° 26′ 58″ latitud norte y 76° 32′ 15″ longitud oeste (Anexo 3).

Tabla 3.2. Cationes y aniones solubles del suelo donde se desarrolló el experimento en el municipio de Cauto Cristo. (0-30 cm de profundidad).

Suelos	Cationes y aniones solubles (cmol (+) kg ⁻¹)								Otras características			
	Ca ⁺²	Mg ⁺²	Na ⁺	K ⁺	CO ₃ ⁻²	HCO ₃ ⁻	Cl	SO ₄ ⁻²	C.E (dS.m ⁻¹)	SST (ppm)	pH(H ₂ O)	M.O %
Afectado por sales	1,56	0,54	9,30	0,60	0,00	0,64	4,25	3,84	5,55	3 552	7,30	3,12

Nota: CE, conductividad eléctrica; SST, sales solubles totales; M.O, materia orgánica.

El suelo presente clasificó dentro del Agrupamiento Fluvisol, Subtipo Gléyico, Género salinizado (Hernández *et al.*, 1999), que correlaciona con un Fluvisol Gléyico (*WRB*, 2006). El mismo presentó una concentración de sales solubles totales de 3 552 ppm y valores medios de C.E en el extracto de saturación de 5,55 dS.m⁻¹, por ello presenta un grado de

salinidad S_3 y es clasificado como suelo salinizado de acuerdo a la gradación establecida por la NC, (2009) (Tabla 3.2).

3.2. Descripción de los experimentos

3.2.1. Experimento 1. Tolerancia de variedades de Caupí a la salinidad durante la germinación de la semilla

El experimento fue desarrollado en condiciones de laboratorio de la Universidad de Granma, con variaciones de temperaturas día/noche de 28/24 °C, humedad relativa del 80 % y fotoperiodo de 12 horas luz y 12 de oscuridad.

Se pusieron a germinar 50 semillas de frijol Caupí de 12 variedades (Anexo 1 A), en placas Petri con papel de filtro, a razón de 5 semillas por placa, para un total de 10 placas por tratamiento. Los tratamientos consistieron en la aplicación de soluciones salinas de NaCl ajustadas a conductividades eléctricas (C.E) de 0,02; 5; 10 y 15 dS.m⁻¹ a cada variedad por separado, a razón de 10 mL por placa, los cuales fueron distribuidos en un diseño completamente aleatorizado.

Las semillas fueron pesadas antes de establecer el experimento y luego a las 36 horas después de colocadas a germinar, posteriormente se determinó la absorción de agua por la semilla (AAS), a partir del método gravimétrico (González *et al.*, 1996).

$AAS = 100 * (PF - PI) / PF$ Donde: PF-peso final PI-peso inicial

Siete días después de germinadas las semillas, se determinó la longitud de la raíz (LR), longitud del hipocótilo (LH), masa seca de la raíz (MSR) y masa seca del hipocótilo (MSH) de todas las variantes experimentales. Se calculó el Índice de Tolerancia a la Salinidad (ITS) a partir de la ecuación propuesta por Fernández (1993), para lo cual se utilizaron los resultados obtenidos en el tratamiento con 15 dS.m⁻¹ y el control sin sales de todas las variables.

$ITS = Ts / Tc$ Dónde: Tc-tratamiento control y Ts-tratamiento salino.

3.2.2. Experimento 2. Evaluación de la tolerancia a la salinidad en variedades de frijol Caupí en condiciones de campo

3.2.2.1. Diseño experimental

El experimento se desarrolló en la Empresa Genética y Cría “Manuel Fajardo” del municipio Jiguaní, entre los meses de enero y abril de los años 2006 y 2007, bajo las condiciones edafoclimáticas descritas en el Acápite 3.1.3.2.

Fueron utilizados los 12 cultivares de frijol Caupí (Anexo1 A), los cuales se sembraron simultáneamente en el suelo salinizado y en el no salinizado (Acápite 3.1.3.2), en parcelas de 2,80 x 4,00 m (11,2 m²). Todos los tratamientos, tanto en el suelo afectado por sales como en el no afectado, recibieron una dosis baja de nitrógeno en forma de urea como iniciador a razón de 30 kg.ha⁻¹ (CIAT, 1988).

Los genotipos fueron distribuidos en ambos suelos, en diseños experimentales de Bloques al Azar con tres réplicas, para un total de 36 parcelas en cada caso. Para definir el diseño empleado, se tomó en cuenta que la variabilidad espacial de la salinidad presentó una tendencia al aumento en la dirección sureste-noroeste para el suelo salinizado y, norte-sur para el no salinizado.

La distancia de siembra empleada fue 0,70 x 0,10 m y las labores fitotécnicas se realizaron de acuerdo a lo establecido en la tecnología del cultivo (MINAG, 2003).

3.2.2.2. Evaluaciones realizadas

A inicios de la floración de cada variedad, se realizó un muestreo donde se tomaron 10 plantas por parcela experimental, con el objetivo de realizar las determinaciones: número de nódulos por planta (NNPL), número de nódulos en la raíz principal (NNRP) y, número de nódulos efectivos (coloración interna de color rosado) según determinación visual (NNRo).

Las raíces y la parte foliar de las plantas por separado, al igual que los nódulos radicales recolectados, fueron secados en estufa a una temperatura de 70 °C hasta alcanzar peso constante. Se determinó la masa seca aérea (MSF) y de la raíz (MSR), masa seca de los nódulos (MSN) y el contenido de nitrógeno de la masa seca aérea (N).

En el momento de la cosecha, se determinó el rendimiento del grano (t.ha^{-1}), número de vainas y granos por planta y peso de 100 semillas, para lo cual se tomaron todas las plantas del área de cálculo de cada una de las parcelas.

Para cada variedad, se calculó el índice de tolerancia (fórmula descrita en el Experimento 1, Acápite 3.2.1.) resultante de promediar los diferentes índices obtenidos a partir de cada una de las repeticiones correspondientes al suelo salinizado y el valor promedio de la variedad correspondiente al suelo no salinizado.

3.2.3. Experimento 3. Aislamiento y caracterización de rizobios nativos

3.2.3.1. Aislamiento de bacterias

A partir de nódulos de las variedades IT 86 D-715, Cancarro e IT 82 E-9 desarrolladas en suelos afectados por sales, se obtuvieron los aislados VIBA-2, VIBA-3 y VIBA-5 del municipio Cauto Cristo, así como VIBA-1 del municipio Jiguaní. Los nódulos fueron extraídos de la raíz principal y las plantas fueron cosechadas antes del inicio de la floración, entre los 40 y 45 días después de la germinación.

La desinfección de los nódulos extraídos de las raíces, se realizó con etanol al 95 % durante 30 s y bicloruro de mercurio (HgCl_2) al 0,1 % durante 45 s, luego fueron lavados diez veces con agua destilada estéril. Una vez desinfectados, se cortaron y se trituraron uno a uno con ayuda de una varilla de vidrio estéril y se sembraron en placas Petri con medio de cultivo LMA, para luego ponerlas en incubación a 28 °C por un período de 5-7 días (Vincent, 1970).

3.2.3.2. Caracterización fenotípica

Las colonias bacterianas obtenidas, fueron purificadas en un medio de cultivo de igual composición y para examinar su morfología se empleó la tinción de Gram y observación al microscopio. Se determinó la apariencia, textura, forma, diámetro, tiempo de crecimiento en el que produce turbidez visual y la producción de ácido o álcali al ser utilizado el azul de bromotimol como indicador de pH (concentración 5,0 mg.L⁻¹; pH 6,8). Los aislados se incubaron a temperatura de 28 °C de acuerdo a su tiempo de crecimiento. El cambio de color del medio a amarillo, probará que son cepas productoras de acidez, mientras que el cambio a color azul, indicará que son productoras de alcalinidad (Beck *et al.*, 1993). Los aislamientos se conservaron a -80 °C medio LMA con un 20 % (v:v) de glicerol y los cultivos de rutina se realizaron en LMA a 28 °C.

3.2.3.3. Tolerancia de los aislados a condiciones estresantes de salinidad, pH y temperatura.

Para realizar la evaluación del crecimiento de bacterias en condiciones de estrés por sales, pH y temperatura, se siguió el protocolo de Ruiz-Díez *et al.* (2009).

Para evaluar la tolerancia a la salinidad, los 5 aislamientos se sembraron por separado en medio de cultivo líquido LM. Cada aislado se sometió a siete tratamientos: 0,17; 2,6; 3,4; 4,2; 5,0; 5,8; 6,6 dS.m⁻¹ de NaCl. Como control, se utilizó la concentración de 0,17 mM por ser el nivel de sal recomendado para cultivo de rizobios (0,1 g.L⁻¹=1,7 mM= 0,17 dS.m⁻¹) (Vincent, 1970).

La tolerancia a pH, fue evaluada al someter cada cepa a tres tratamientos que consistieron en medios líquidos LM, tamponados a pH 4,5; 7 y 9. Para la obtención de pH 4,5, fue utilizado el ácido 2,2 dimetilsuccínico a 30 mM, mientras que para pH 9, se utilizó tris-clorhídrico a 50 mM. Después de la esterilización en autoclave, el pH fue medido nuevamente en las soluciones sin observarse cambios de $\pm 0,1$ unidades en el mismo.

Los aislados, fueron sembrados en placas Petri con medio sólido LMA e incubados por separado a temperaturas entre 28-45 °C, para determinar su tolerancia a altas temperaturas.

Para los experimentos de tolerancia a salinidad y pH, fue utilizado el medio de cultivo líquido LM estéril, vertido a razón de 5 mL en tubos Kimax de 25 mL, esterilizados en autoclave SC-500 Matachana, durante 20 min, a 120 °C y 2 180 hPa. Los tubos fueron inoculados en condiciones asépticas de flujo laminar, con 50 µL de cultivo en fase exponencial e incubados a 28 °C en agitación a 100 rpm. Para evaluar la tolerancia a la temperatura, fue utilizado el medio sólido LMA estéril, vertido en condiciones asépticas de flujo laminar en placas Petri esterilizadas.

El crecimiento bacteriano para los ensayos de tolerancia a la salinidad y pH, se evaluó a través de la medición de la densidad óptica (Absorbancia a 680 nm), en un espectrofotómetro Spectronic 2000 (*Bausch and Lomb*), a las 120 horas después de sembrados los inóculos. Para evaluar la tolerancia a la temperatura, se realizaron observaciones cada 24 horas hasta un máximo de 10 días, para monitorear la aparición o no de colonias.

En los tres ensayos realizados los tratamientos fueron distribuidos en un diseño completamente aleatorizado con tres repeticiones cada vez.

3.2.3.4. Prueba de infectividad

Las semillas de Caupí previamente desinfectadas, se inocularon con los aislados para evaluar su habilidad en la formación nódulos radicales, para lo que se utilizó la metodología descrita por Vincent, (1970).

La siembra se realizó en macetas de 15 cm de alto y 8,5 cm de ancho, 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 de las variedades IT 86 D-715 e IITA-Precoz, que fueron inoculadas en

el momento de la siembra con 1 mL por semilla de suspensión bacteriana (10^8 UFC.mL⁻¹) de los aislamientos. Las plántulas se mantuvieron durante un mes en cámara de crecimiento en condiciones controladas (25/20 °C, fotoperiodo de 13 horas de luz y 11 de oscuridad y 70 % de humedad), momento en que se verificó la presencia o no de nódulos radicales.

3.2.3.5. Caracterización genética de los aislados

A partir de cultivos líquidos obtenidos de los aislados VIBA-1, VIBA-2, VIBA-3 y VIBA-5, se extrajo el ADN con el uso del protocolo *Kit “UltraClean”* (MOBIO Laboratorios), (Ruiz-Díez *et al.*, 2011). La integridad y concentración del ADN total obtenido, se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8 % TAE (tris-acetato 0,04M; EDTA 0,001M) (Sambrook y Russell, 2001). Para establecer la lectura de las bandas, se utilizó un espectrofotómetro (*Vilber Lourmat*) con cámara digital EDAS- DC290 acoplada y el software KODAK 1D 3.5.4. USB. Las muestras del ADN fueron homogenizadas a 50 ng.μL⁻¹, con el equipo UNIVAPO SP 11V (Savant).

La región del 16 ADNr de los aislamientos, fue amplificada a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, siglas en inglés) (Laguerre *et al.*, 1994). Los iniciadores utilizados fueron fD1 y rP2 (Weisburg *et al.*, 1991), a una concentración final de 1 μM cada uno. La amplificación fue desarrollada en el termociclador (Veriti 96 Well, *Applied Biosystems*).

Los parámetros usados en la PCR fueron: durante la desnaturalización inicial, 95 °C durante 5 min, seguidos por 35 ciclos de desnaturalización a 1 min a 95 °C, la hibridación se produjo a 55 °C durante 1 min y la extensión a 72 °C durante 2 min. La extensión final se realizó a 72 °C durante 10 min. Para el proceso de amplificación, fue utilizado un control negativo y ADN de las cepas de referencia como control positivo (Anexo 2). Los productos de la PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1 % TAE (tris-acetato 0,04M; EDTA 0,001M).

Los amplificadores de la región 16S del ADN_r de las cepas aisladas, así como los obtenidos de las cepas de referencia, fueron sometidos a análisis de restricción (ARDRA). Para las digestiones, fueron usadas las enzimas endonucleasas de restricción *Msp* I, *Hinf* I, *Dde* I, *Hha* I (*New England BioLabs*[®]) y cada una de ellas se realizó de manera individual, a la temperatura de 37 °C durante dos horas. Las condiciones de digestión para las cuatro enzimas, fueron realizadas según lo descrito por Ruiz-Díez *et al.* (2009).

Las cepas que tuvieron idéntica composición de patrones de restricción fueron designadas como un genotipo ARDRA (Análisis de Restricción del ADN Ribosomal Amplificado).

Antes de la secuenciación, los amplificadores del 16S ADN_r, todos con un tamaño aproximado de 1500 pares de bases (pb), fueron purificados con el Kit EZNA-PURE CYCLE (Omega). Las secuencias de los productos de PCR, fueron obtenidas con un secuenciador ABI PRISM 3700 (*Applied Biosystems*), para lo cual fueron usados los sistemas de terminadores de ciclo *Taq* Dyedexi, en el servicio de secuenciación automático del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, España.

Para las reacciones de secuenciación, se utilizaron 14 µL de producto de PCR de las cepas seleccionadas y 1,4 µL de los iniciadores 1050R, 800R, 800F e IRF1 (Lane, 1991), lo cual permitió la secuenciación casi completa del 16S ADN_r.

El programa *Clustal W*. (disponible en <http://www.npsa-pbil.ibcp.fr/>), se utilizó para determinar la secuencia de los aislamientos mediante pares de alineamientos y, para calcular la similitud entre las secuencias de la región 16S mediante múltiples alineamientos. Posteriormente, fueron analizadas con el programa BLASTN en el servicio de red del Banco de Genes, para compararlas con las bases de datos.

El programa MEGA versión 4 (Tamura *et al.*, 2007), fue usado para el análisis de filogenia. El árbol filogenético, fue construido con el método *neighbour-joining* (Saitou y Nei, 1987), para lo cual se utilizó el modelo de distancia de los dos parámetros de Kimura (Kimura,

1980). Los valores confianza fueron determinados a partir del análisis de 1000 réplicas con el fin de asegurarse de la confianza de cada rama en el árbol filogenético.

3.2.4. Experimento 4. Influencia de la salinidad sobre la relación bradyrizobio-frijol Caupí en ambiente controlado

3.2.4.1. Condiciones para el desarrollo del experimento y diseño experimental

El experimento se estableció en el Instituto de Ciencias Agrarias del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, España. Para su desarrollo, se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos en los Acápites 3.2.1 y 3.2.2. Del germoplasma, se utilizaron dos variedades contrastantes de acuerdo a su nivel de tolerancia a la salinidad, una ellas susceptible y la otra tolerante. Para la inoculación de las semillas, fue seleccionado uno de los 5 aislamientos con mejores características de tolerancia ante las condiciones estresantes de salinidad, pH y temperatura presentes (Acápite 3.2.3.2).

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

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, 1950) a razón de 150 mL/día, a la cual se le incluyó una dosis baja de NH_4NO_3 a razón de 57 mg.L^{-1} de nitrógeno como iniciador. A partir de la tercera semana, las plantas se regaron con la misma solución Hoagland, esta vez sin nitrógeno y a razón 200 mL/día.

Las variedades utilizadas, fueron sometidas a dos tratamientos; solución nutritiva Hoagland sin NaCl (control) y solución nutritiva a la que se le agregó NaCl hasta alcanzar una concentración salina de 150 mM (salino).

Los tratamientos fueron distribuidos en un diseño experimental completamente aleatorizado con 8 repeticiones.

3.2.4.2. Evaluaciones realizadas

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.

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

La actividad de la enzima nitrogenasa, se midió mediante la técnica de reducción de acetileno (ARA), según Fernández-Pascual *et al.* (1988). Las medidas de etileno y acetileno se realizaron en un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer 8310, equipado con una columna de acero (2 m x 3 mm de diámetro), rellena con porapak-R y se utilizó nitrógeno como gas portador a una velocidad de flujo de 50 mL.min^{-1} .

Las muestras de gas, se tomaron a los 15 min de exposición del acetileno a razón de 0,5 mL, que fueron valoradas en el cromatógrafo de gases para obtener la cantidad de C_2H_4

(nmol) presentes en la muestra. El cálculo de la actividad de la nitrogenasa, se obtuvo a partir de la siguiente ecuación (FAO, 1995):

$$\text{Actividad } (\mu\text{mol C}_2\text{H}_2 \cdot \text{g}^{-1}) = (\mu\text{mol.planta}^{-1} \text{ C}_2\text{H}_4 \cdot v) / P$$

Dónde: v, volumen del tubo (mL) y P, masa fresca del nódulo (g.planta^{-1}).

La extracción de proteínas de fracción soluble del citosol, se realizó mediante homogenización 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 ($0,13 \text{ g.L}^{-1}$). 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.

Las muestras de hojas y nódulos para el análisis de su ultraestructura, fueron tomadas a los 35 días después de la germinación (5 días antes de la cosecha del experimento), se tomaron de la parte media de la planta y de la raíz, hojas y nódulos de la misma edad, posición y estado de desarrollo. De las hojas, se cortaron con una cuchilla de acero inoxidable, secciones de 1 ó 2 mm cercanas al nervio central y los nódulos se seccionaron en 4 partes pequeñas, de alrededor de 2 mm (de las Heras, 2004).

Se realizó la inclusión de las muestras en resina *LR White* (*London Resin Company*), (Sigma), según lo descrito por, de las Heras (2004). Se utilizó el ultramicrotomo *Reichert Ultracut S.*, (Leica. Vienna, Austria), equipado con cuchillas de diamante Diatome 45°, para tallar las muestras y eliminar la resina alrededor del tejido, hasta que este quedara

accesible. Posteriormente, realizaron secciones ultrafinas de 70 nm, que se recogieron sobre rejillas de cobre o de níquel de 150-200 ventanas y fueron observadas en un microscopio electrónico STEM LEO-910, con cámara digital integrada Gatan Bioscan (modelo 792) a 0,5 μm , para realizar las observaciones con microscopía electrónica (de María, 2004).

3.2.5. Experimento 5. Respuesta del frijol Caupí a la inoculación con cepas nativas de *Bradyrhizobium* en un suelo afectado por sales

El experimento fue establecido en la localidad de Babiney, municipio Cauto Cristo, entre los meses de enero y abril de los años 2008 y 2009, sobre un suelo afectado por sales (Acápite 3.1.3.3).

En este experimento fue utilizada una de las variedades de frijol Caupí con mayor nivel de tolerancia a la salinidad (Acápites 3.2.1 y 3.2.2). Fueron utilizados cuatro tratamientos, que consistieron en la inoculación con dos de las cepas que mejores respuestas presentaron ante condiciones de salinidad (tratamientos inoculados +I) (Acápite 3.2.3.2), dos controles, en el primero de ellos las plantas se fertilizaron con urea a razón de 150 $\text{kg}.\text{ha}^{-1}$ de nitrógeno (+N) y, en el segundo, no se inoculó ni se fertilizó (-I-N). El resto de los tratamientos recibieron una dosis baja de nitrógeno en forma de urea como iniciador, a razón de 30 $\text{kg}.\text{ha}^{-1}$ (CIAT, 1988).

Los tratamientos, fueron distribuidos en un diseño de Bloques al Azar con cuatro réplicas para un total de 16 parcelas experimentales, cada una de las cuales presentó una dimensión de 2,80 x 4,00 m (11,2 m^2). Para definir el diseño empleado, se tomó en cuenta que la variabilidad espacial de la salinidad, presentó una tendencia al aumento en la dirección sur-norte.

La distancia de siembra empleada fue 0,70 x 0,10 m y las labores fitotécnicas del cultivo se realizaron en correspondencia con la tecnología del cultivo (MINAG, 2003).

Los inoculantes bacterianos crecieron en medio de cultivo líquido LM, por un periodo que dependió de la tasa de crecimiento de cada una de las cepas (Vincent, 1970). La turba estéril empleada como material de soporte se mezcló con los inóculos, que posteriormente se maduraron entre 7 y 14 días, en dependencia del crecimiento de cada una de las cepas. Los biopreparados, alcanzaron una concentración celular de 10^9 UFC.g⁻¹ en soporte sólido. Todo el procedimiento, se realizó según las normas de control de calidad establecidas en el laboratorio para la producción de inoculantes (FAO, 1995).

3.2.5.1. Evaluaciones realizadas

A los 40 días después de la germinación, momento en el que inicia la floración, se tomaron un total de 10 plantas al azar por parcela experimental, las cuales se secaron en estufa a una temperatura de 70 °C, hasta lograr el peso constante de las muestras. Se evaluó la masa seca foliar (MSF), su concentración de P, Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, el contenido de N foliar y la masa seca de las raíces (MSR). Fueron evaluadas las variables relacionadas con la nodulación, número de nódulos por planta (NNPL), número de nódulos en la raíz principal (NNRP), número de nódulos en las raíces secundarias (NNRS) y la masa seca de los nódulos (MSN), (CIAT, 1988). Se determinó además, el Índice de Efectividad de la Inoculación (IEI) mediante la fórmula:

$$IEI = \frac{\text{Rendimiento N (+I)} - \text{Rendimiento N (-I)}}{\text{Rendimiento N (+I)}} * 100$$

Donde (+I) y (-I), representan los tratamientos inoculados y sin inocular, respectivamente. Mientras que N, es el contenido de nitrógeno foliar (CIAT, 1988).

Se calculó la Fijación Específica de Nitrógeno (FEN) mediante la fórmula propuesta por Vieira *et al.* (2007).

$$FEN = \frac{\text{mg N masa seca foliar}}{\text{mg masa seca de nódulos}}$$

En el momento de la cosecha, se tomaron todas las plantas del área de cálculo de cada una de las parcelas para evaluar el rendimiento del grano, vainas por planta, granos por planta y peso de 100 semillas. La ecuación del IEI, se utilizó para determinar la efectividad de las cepas inoculadas para el rendimiento del grano (IEIR) y se interpretó como el incremento relativo del rendimiento.

3.3. Métodos utilizados para la toma de muestras de suelo y análisis químico de suelo y planta en el laboratorio

De cada suelo por separado, se tomaron 50 muestras en tres transeptos en distintas zonas y direcciones, a una distancia entre puntos de 1 m y profundidad de 15-20 cm, con el objetivo de estudiar la variabilidad espacial de la salinidad.

En el experimento de campo realizado en Jiguaní, el análisis químico del suelo se realizó en el Laboratorio Provincial de Suelos de la provincia Granma. La extracción de los cationes se realizó con solución extractora de NH_4Ac 1N a pH 7. Para la determinación del Ca^{2+} y el Mg^{2+} se utilizó el método volumétrico con EDTA, mientras que Na^+ y K^+ se determinaron por fotometría de llama. Los resultados se expresaron en cmol.kg^{-1} (Paneque *et al.*, 2010).

La extracción de fósforo y potasio, se realizó con solución 0,1N de H_2SO_4 con relación suelo - solución 1:25 con tiempo de agitación de 3 min y determinación por fotometría de llama (Paneque *et al.*, 2010). Los aniones CO_3^- , HCO_3^- , Cl^- y SO_4^{2-} se determinaron por los Métodos Unificados de la Dirección General de Suelos y Fertilizantes (MINAG, 1981). La conductividad eléctrica (C.E 25°C) se determinó por el método de la Pasta Saturada, esta se utilizó para calcular las Sales Solubles Totales (SST) (Paneque *et al.*, 2010). El pH (H_2O) relación suelo:solución de 1:2,5; por el método potenciométrico. La materia orgánica se determinó por el método de Combustión Húmeda de Walkley-Black (Paneque *et al.*, 2010). Los análisis químicos de suelo y plantas del experimento de campo desarrollado en el municipio Cauto Cristo, fueron realizados en la Unidad Central de Análisis CCMA, CSIC,

Madrid. La concentración de iones solubles, fue estimada por cromatografía de iones (Dionex, modelo DX 120, equipo *Ion Chromatograph* con un detector ED40 para lo cual se utilizó una columna IonPac AS7). El pH (H₂O) relación suelo:solución de 1:1, se determinó por el método potenciométrico y la materia orgánica por el método de Walkley-Black. La conductividad eléctrica del suelo se determinó según Bower y Wilcox, (1965).

La determinación de nitrógeno en plantas fue realizada por el método de Kjeldhal (*Autoanalyzer Technicon AAII*) (Jackson, 1958), mientras que la concentración de Na⁺, K⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺ se determinaron según la metodología de Winternmans y De Mots, (1965).

3.4. Atenciones culturales

En el experimento en macetas, se midió diariamente el contenido de humedad del sustrato y se mantuvieron las condiciones controladas durante el desarrollo del mismo. Los experimentos de campo se mantuvieron libre de plantas indeseables, uniformes y las atenciones culturales se realizaron según las normas establecidas para el cultivo del frijol Caupí (MINAG, 2003).

3.5. Procedimientos estadísticos

Los datos fueron procesados con el paquete *Statistica* para *Windows*, versión 10 (StatSoft, 2011). Para determinar si los mismos 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.

Se utilizó un análisis de varianza simple en el experimento 1, para evaluar el efecto de los cuatro niveles de salinidad sobre las variables relacionadas con la germinación en cada uno de los cultivares por separado y, en el experimento 2, para evaluar el índice de tolerancia a la salinidad calculado para todas las variedades. En los experimentos 4 y 5, fueron utilizados análisis de varianza de clasificación doble, en el primero de ellos, para determinar la influencia de la salinidad sobre el concentración de iones en hojas y raíces y,

en el segundo, para evaluar el efecto de la inoculación de dos cepas nativas sobre el frijol Caupí, en condiciones de suelo afectado por sales.

En el experimento 3, el incremento de la concentración salina y las variaciones de pH sobre el crecimiento de los aislados en medio de cultivo, se evaluó al comparar las medias y sus intervalos de confianza para $1-\alpha=0,05$ y $n=3$.

Cuando fueron evaluadas solo dos medias, como en los experimentos 2 y 4, para comparar los datos obtenidos en el suelo afectado por sales o, el tratamiento salino con relación a un control no salino, según fue el caso, fue utilizada la prueba de t-Student (Lerch, 1977).

Para la comparación múltiple de medias, fue usada la prueba de Tukey (Tukey, 1949).

En el experimento 2, se realizó un análisis multivariado de componentes principales con representación gráfica biplot (Varela, 2002), con el objetivo de caracterizar la relación entre las variables evaluadas, número de nódulos por planta y en la raíz principal, nódulos efectivos, masa seca de los nódulos, masa seca de la raíz, masa seca foliar, contenido de nitrógeno foliar, fijación específica de nitrógeno, vainas por planta, granos por planta, peso de cien semillas y rendimiento del grano en los 12 cultivares, que constituyeron una matriz 24×13 ($n \geq p$), desarrollados en dos condiciones diferentes, suelo afectado y no afectado por sales.

En los experimentos 1 y 2, se utilizaron análisis Multivariados de Conglomerado Jerárquico y de Ligamiento Completo sobre la base de la Distancia Euclidiana (Sokal y Sneath, 1973), para agrupar los 12 cultivares de acuerdo a su nivel de tolerancia a la salinidad. En el experimento 1, se construyó una matriz 12×5 ($n \geq p$), a partir del índice de tolerancia de las variables, absorción de agua por las semillas, largo de la radícula e hipocótilo y masa seca de la raíz e hipocótilo de los 12 cultivares utilizados. En el experimento 2, la matriz 12×12 ($n \geq p$) fue resultado de la combinación de los 12 cultivares con las variables: número de nódulos por planta y en la raíz principal, nódulos efectivos, masa seca de los nódulos,

masa seca de la raíz, masa seca foliar, contenido de nitrógeno foliar, fijación específica de nitrógeno, vainas por planta, granos por planta, peso de cien semillas y rendimiento del grano.

3.6. Análisis económico

Para el análisis económico, se consideraron los valores obtenidos en el rendimiento en $t \cdot ha^{-1}$ de la semilla seca (14 % de humedad) de las variantes experimentales del experimento 5, Acápite 3.2.5. Se empleó como precio de un bolso de inoculante \$ 25,00, mientras que el precio de la tonelada de Urea en el mercado internacional para el mes de mayo de 2012 fue de \$ 496,70 USD (www.indexmundi.com). Se tomó como base el valor de la tonelada de frijol en el mercado, \$ 915 USD, (Banco Central de Cuba, 2011). Se determinó el Costo de la Producción, (CP), Valor de la Producción (VP), Ganancia (G), Beneficio Económico (BE), Costo Relativo del Tratamiento (CRT) y la Relación Costo Beneficio (RCB) (Recompensa y Angarica, 2008).

- VP (\$ ha^{-1}): rendimiento del cultivo multiplicado por el precio de venta de una tonelada de grano seco a 14 % de humedad.
- CP (\$ ha^{-1}): sumatoria de los gastos incurridos por la aplicación del fertilizante o los inóculos microbianos según correspondió, más el costo del resto de las labores.
- G (\$ ha^{-1}): diferencia entre el valor de la producción y los costos de producción.
- BE (\$ ha^{-1}): diferencia entre la ganancia del tratamiento inoculado y la del tratamiento control sin fertilizante y sin inocular.
- CRT (\$ ha^{-1}): diferencia entre los costos del tratamiento inoculado y los del tratamiento control sin fertilizante y sin inocular.
- C/P (\$): cociente obtenido de dividir el costo de producción y el valor de la producción.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Características edafoclimáticas de las zonas donde fueron desarrollados los experimentos de campo

La época en que se desarrollaron los experimentos (Acápites 3.1.3.1), coincidió con el período seco del año, según la clasificación climática de Koppen (CITMA, 2003), donde las precipitaciones no superaron en ninguna de las dos localidades los 20 mm de lluvia caída mensual y las temperaturas medias oscilaron entre 21 y 25 °C. Este comportamiento, condicionó la estabilidad de las variables durante los años en que fueron replicadas las experiencias. A partir del mes de abril, tanto temperaturas como precipitaciones, tuvieron una ligera tendencia al incremento en las dos localidades, lo cual es una manifestación propia del inicio de la época de primavera, donde estas variables comienzan a incrementarse (CITMA, 2003).

Los estudios realizados por López (2001); CITMA (2003) y González *et al.* (2004), indican que las medias históricas de temperatura en esta zona del valle del río Cauto y Sub-cuenca del río Cautillo oscilan entre 22,5 y 27,9 °C, con máximas entre 29 y 33,4 °C y mínimas entre 15,4 y 24 °C. Las precipitaciones, están en el rango de los 600-800 mm anuales, donde se define un período lluvioso enmarcado en los meses de mayo a octubre y un período seco en los meses de noviembre a abril. Por su parte, los valores de evaporación están en el orden de los 2 400 mm, en tanto la humedad relativa se encuentra entre 72 y 84 %, con los mayores registros entre los meses de junio y noviembre.

El hecho de que las variables climáticas durante el establecimiento de los experimentos, estuvieran en el rango de las medias históricas, contribuyó a que las condiciones edáficas se mantuvieran estables y los niveles de sales en el suelo donde se manifestó este tipo de estrés, no sufrieran alteraciones.

Otras causas también relacionadas con las condiciones climáticas, como es el caso de la elevada tasa de evaporación que supera la cantidad de lluvia caída, proporciona de igual forma, el ascenso y acumulación de sales solubles en los primeros 30 cm de profundidad del suelo (González *et al.*, 2004; Rengasamy, 2006; Álvarez *et al.*, 2008).

A estos factores, se suman las condiciones edáficas y de manejo de cada zona. En la localidad de Jiguaní, el uso de agua proveniente de un pozo cuya C.E es de 3,12 dS m⁻¹ sin un control adecuado de las normas de riego por surco, un relieve llano a débilmente diseccionado y un drenaje superficial deficiente, contribuyeron a la acumulación de sales en el suelo.

Mientras que en Cauto Cristo, la salinización se favoreció por la acumulación de sales provenientes de zonas altas de la llanura sur-este de la sub cuenca del río Cautillo, debido a que las cotas hacia esa dirección fueron más altas. Por otro lado, el agua usada para el riego proviene del mismo río, la cual presenta una C.E de 1,32 dS.m⁻¹ durante el período seco, a lo que se une el relieve llano a depresional que provoca un deficiente drenaje.

4.2. Evaluación de la tolerancia a la salinidad de variedades de Caupí

4.2.1 Evaluación de la tolerancia a la salinidad durante la germinación de la semilla

Los resultados muestran que la salinidad, afecta la absorción de agua por las semillas y tiene un efecto negativo sobre la longitud y masa seca de la radícula e hipocótilo, debido a que los valores de la mayoría de los indicadores evaluados disminuyeron a medida que aumentó la salinidad (Anexo 4).

Una de las variedades que resultó menos afectada por el incremento de las sales fue IT 82 E-9, en la cual no se observaron afectaciones de las variables AAS, LR, MSR y MSH con el nivel de C.E de 10 dS.m⁻¹.

En el resto de los cultivares, la respuesta fue diferente debido a que en la mayoría de las variables existieron afectaciones a partir de 5 dS.m⁻¹. Solo en algunos ellos, como

Cubanita-666 para AAS y la MSR, así como Cancarro en la AAS y Trópico Yarey e IT 86 D-510 para la masa seca del hipocótilo, se lograron obtener resultados similares entre el control y niveles altos de C.E, que en algunos casos llegaron a los 15 dS.m⁻¹.

Para establecer agrupamientos de los cultivares, teniendo en cuenta el nivel de tolerancia a la salinidad, se realizó el análisis de Conglomerado Jerárquico con los índices de tolerancia determinados de acuerdo a lo descrito en el Acápite 3.2.1.

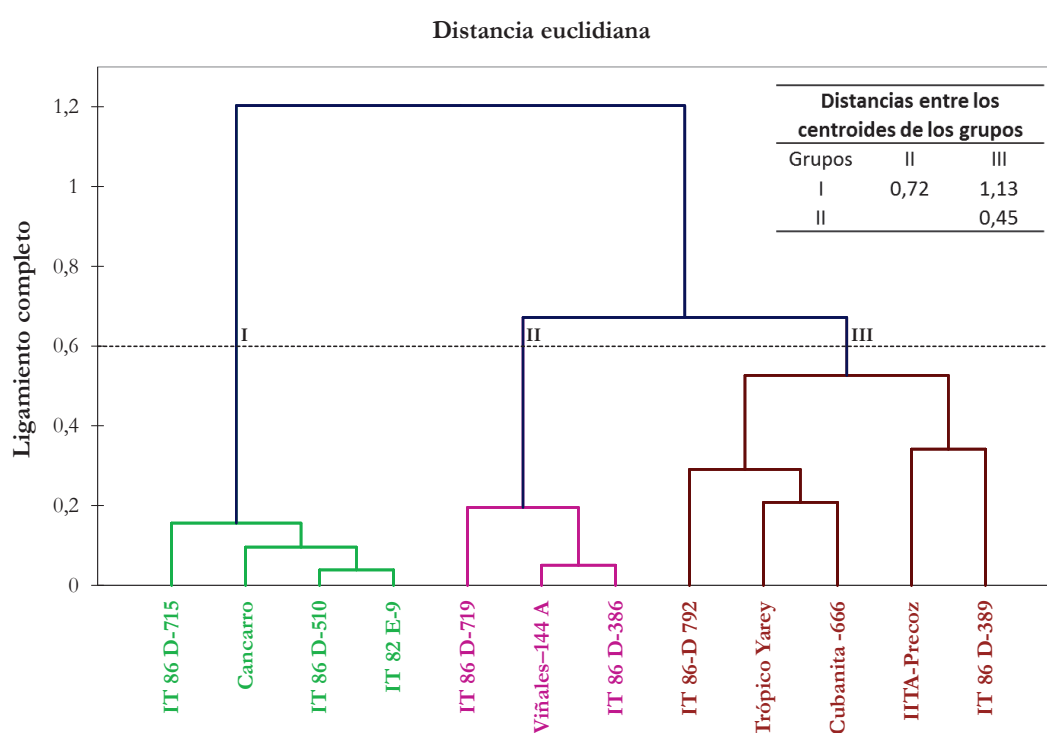


Figura 4.1. Agrupamiento de los cultivares de acuerdo a su nivel de tolerancia a la salinidad con relación a variables relacionadas con el proceso germinativo. Variables: absorción de agua por las semillas, largo de la radícula e hipocótilo y masa seca de la raíz e hipocótilo. Grupo I, color verde (tolerante); grupo II, color morado (medianamente susceptible); grupo III, (color marrón) susceptible. Umbral de corte= 50 %. Matriz formada: 12 x 5 ($n \geq p$). Correlación cofenética= 0,85.

A partir del análisis, se formaron tres grupos con diferencias en cuanto su capacidad para tolerar el estrés salino (Figura 4.1). En el grupo I, se encuentran las variedades IT 86 D-715, Cancarro, IT 86 D-510 e IT 82 E-9, cuyos índices de tolerancia para las variables

absorción de agua por la semilla, longitud y masa seca de la radícula, presentaron los valores promedios mayores (Tabla 4.1), por lo cual este grupo se clasifica como tolerante.

El grupo II, se caracterizó por presentar rasgos intermedios entre los grupos I y III y agrupó los genotipos IT 86 D-719, Viñales-144 A e IT 86 D-386. Por su parte, el grupo III estuvo integrado por las variedades Trópico Yarey, Cubanita-666, IT 86 D-792, IT 86 D-389 e IITA-Precoz y se caracterizó por tener los aportes promedios más bajos, contrastando de esta forma con el grupo I, que evidenció baja capacidad de tolerancia (Tabla 4.1).

La definición de las características de cada grupo con relación a su tolerancia, fue corroborada con el análisis de las distancias entre sus centroides (Figura 4.1), donde se observó de manera clara, la lejanía entre los grupos contrastantes I y III, los que clasificaron como tolerante y susceptible, respectivamente. Debido a que el grupo II, presentó mayor cercanía al grupo III que al grupo I, se clasifica como medianamente susceptible.

Tabla 4.1. Valores promedios de los índices de tolerancia a la salinidad, sobre la base de las variables relacionadas con la germinación en los grupos formados.

Grupos	AAS (%)	LR (cm)	LH(cm)	MSR (g.pl ⁻¹)	MSH (g.pl ⁻¹)
I	0,93	0,83	0,81	0,83	0,75
II	0,88	0,61	0,39	0,42	0,41
III	0,87	0,31	0,29	0,16	0,21

Nota. LR, largo de la raíz; LH, longitud del hipocótilo; MSR, masa seca de la raíz; MSH, masa seca del hipocótilo; AAS, absorción de agua por la semilla.

Los efectos perjudiciales de la salinidad sobre la germinación, pudieran estar relacionados con la disminución del potencial osmótico del medio, provocado por la persistencia de altas concentraciones de Na⁺ y Cl⁻ después de iniciado el crecimiento de la radícula e hipocótilo. Bajo estas condiciones, se dificulta la absorción de agua por las plántulas y por otra parte, la sobre acumulación de los iones tóxicos comienza a provocar toxicidad en los tejidos

formados, lo cual se refleja posteriormente en afectaciones de variables como la masa seca del hipocótilo (González *et al.*, 2002; Murillo *et al.*, 2006).

Se considera que el proceso germinativo, presenta una alta tolerancia a la salinidad inhibiéndose sólo a altas concentraciones, debido a que durante esta etapa, en la semilla tienen lugar fundamentalmente procesos físico-químicos, tales como la imbibición del epiblasto, que es resistente a la salinidad (González *et al.*, 2001).

Sin embargo, se ha demostrado que durante la absorción de agua, proceso que constituye la primera fase de la germinación, se desencadenan de manera simultánea cambios metabólicos que incluyen la respiración, la síntesis proteica y la movilización de sustancias de reservas, los cuales son obviamente afectados por las sales. Si durante las etapas subsiguientes, las concentraciones de sales dentro de la semilla son altas, resulta muy difícil que la segunda fase (germinación) y tercera fase (crecimiento) se produzcan (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

Esta manifestación de grupos contrastantes bien definidos y grupos intermedios, también fue reseñada por Murillo *et al.* (2006), al establecer agrupamientos de variedades tolerantes y medianamente tolerantes, susceptibles y medianamente susceptibles. Con este autor, se encontró coincidencia en la respuesta del genotipo IT 86 D-719, el cual fue clasificado como susceptible. Por otra parte, se coincide con González *et al.* (2000), el cual informó una elevada tolerancia a la salinidad en la variedad IT 86 D-510.

4.2.2. Evaluación de la tolerancia a la salinidad en condiciones de campo

Los resultados indicaron la existencia de cepas nativas tanto en el suelo control como en el salino, debido a que todas las variedades lograron nodular (Tabla 4.2).

Aunque el número de nódulos por planta (NNPL) en el suelo no salinizado, por lo general fue significativamente superior, algunos cultivares como IT 86 D-715, IT 86 D-510, IT 82

E-9 y Cancarro, lograron formar la misma cantidad en el suelo afectado por sales (Tabla 4.2).

La masa seca de los nódulos (MSN), también disminuyó notoriamente en todas las variedades utilizadas cuando estas fueron desarrolladas en condiciones de salinidad, pero a pesar de ello, la mayoría de los nódulos presentaron una coloración rosada (NNRo) con resultados similares al control, lo que demuestra que estos eran activos (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Comportamiento de la nodulación natural de variedades de frijol Caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp.), desarrolladas en suelos afectados por sales.

Variedades	NNPL		NNRo		NNRP		MSN (mg.pl ⁻¹)	
	No salino	Salino	No salino	Salino	No salino	Salino	No salino	Salino
IT 86 D-715	8(2,01±)	7(±1,82)ns	7(±1,71)	6(±1,71)ns	5 (±1,00)	4,55(±0,14)ns	331,8(±2,23)	303,00(±6,32)***
Trópico Yarey	12(±1,22)	8(±1,21)**	7(±0,86)	7(±0,68)ns	6,12(±0,97)	5,54(±0,22)ns	370,53(±8,55)	235,20(±1,60)***
Cubanita-666	14(±0,18)	9(±0,21)***	8(±1,03)	7(±0,92)ns	10,05(±0,12)	9,19(±0,21)**	337,00(±1,73)	219,00(±6,00)***
IITA-Precoz	11(±1,49)	4(±0,85)***	6(±2,09)	4(±0,85)ns	4,38(±0,85)	3,44(±0,16)ns	367,55(±4,53)	179,20(±3,09)***
IT 86 D-510	12(±1,87)	11(±1,63)ns	7(±0,18)	7(±0,16)*	7,70(±1,09)	7,36(±0,22)ns	344,39(±12,26)	311,97(±7,51)*
IT 86-D 792	13(±1,86)	8(±1,28)*	8(±1,31)	8(±1,27)ns	6,73(±1,85)	5,07(±0,27)*	353,73(±1,62)	226,8(±5,6)***
IT 86 D-389	10(±1,65)	6(±1,02)*	6(±0,05)	6(±0,06)***	7,00(±0,13)	6,46(±0,12)**	344,40(±5,60)	212,80(±5,58)***
IT 82 E-9	7(±0,70)	6(±0,64)ns	5(±0,54)	5(±0,57)ns	4,98(±0,70)	3,56(±0,64)ns	319,11(±5,59)	287,93(±3,71)**
Viñales-144	12(±1,57)	4(±0,55)***	8(±1,07)	4(±0,18)**	8,20(±0,40)	3,90(±0,35)***	395,50(±4,67)	196,00(±4,00)***
IT 86 D-386	12(±1,35)	5(±1,08)**	5(±1,32)	4(±1,36)ns	6,27(±1,22)	3,82(±0,24)*	370,53(±6,50)	199,73(±5,19)**
Cancarro	11(±2,00)	11(±1,91)ns	7(±0,55)	6(±0,45)ns	8,32(±1,40)	7,54(±0,13)ns	312,30(±4,91)	285,00(±4,36)**
IT 86-D 719	11(±1,48)	5(±0,49)**	5(±0,33)	4(±0,24)*	5,64(±0,60)	4,24(±0,17)*	382,67(±5,83)	188,53(±469)***

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. NNPL, Número de nódulos por planta; NNRo, número de nódulos rosados; MSN, masa seca de los nódulos. (Los datos mostrados constituyen la media de 10 plantas al azar por parcela experimental).

Otras variables, como la masa seca de las raíces (MSR) y la masa seca foliar (MSF), también experimentaron reducciones en presencia de sales en la mayoría de las variedades (Tabla 4.3), excepto para IT 86 D-715, IT 86 D-510 e IT 82 E-9 donde se encontraron resultados similares al suelo no salinizado, respuesta que no se manifestó para la concentración de nitrógeno foliar (N), debido a que este se redujo en todos los casos (Tabla 4.3).

Con relación al rendimiento, los resultados obtenidos en las variedades crecidas en el suelo no afectado por sales fueron adecuados para la época en que se estableció el experimento y coinciden con los resultados obtenidos por Zamora (1999).

En el suelo con presencia de sales, los componentes del rendimiento, vainas por planta, granos por planta y peso de 100 semillas disminuyeron, con excepción las variedades IT 86 D-510 y IT 86 D-792 en variables como el número de vainas, donde no se evidenciaron diferencias. Similar manifestación ocurrió en IT 86 D-715, IT 86 D-510 e IT 82 E-9, para la cantidad de granos, el peso de 100 semillas y el rendimiento (Tabla 4.4).

Tabla 4.3. Comportamiento de la masa seca de la raíz, masa seca foliar y su contenido de nitrógeno en plantas del frijol Caupí (*Vigna unguiculata* L.Walp.), desarrolladas en suelos afectados por sales.

Variedades	MSR (g.pl ⁻¹)		MSF (g.pl ⁻¹)		N (mg.pl ⁻¹)	
	No salino	Salino	No salino	Salino	No salino	Salino
IT 86 D-715	3,69(±0,36)	3,42(0,30)ns	32,14(±3,71)	29,25(±3,25)ns	375,20(±5,05)	325,80(±10,76)**
Trópico Yarey	4,23(±0,24)	2,66(0,11)***	25,84(±3,75)	16,66(±2,78)*	414,40(±7,41)	258,30(±5,62)**
Cubanita-666	6,27(±0,80)	4,34(0,80)*	27,64(±0,06)	18,05(±0,71)***	328,53(±1,89)	212,40(±2,62)***
IITA-Precoz	3,57(±0,50)	1,63(0,43)**	22,68(±1,38)	11,18(±0,65)***	335,07(±0,83)	162,00(±2,40)***
IT 86 D-510	4,02(±0,91)	3,73(0,85)ns	29,30(±1,64)	26,58(±1,84)ns	349,69(±2,43)	311,53(±6,36)***
IT 86-D 792	4,33(±0,37)	2,80(0,33)**	24,87(±0,75)	16,28(±0,43)***	345,33(±8,55)	216,90(±4,12)***
IT 86 D-389	4,16(±0,04)	2,65(0,08)***	25,1(±0,42)	15,98(±0,23)***	333,20(±5,60)	204,30(±6,79)***
IT 82 E-9	2,46(±0,36)	2,30(0,31)ns	13,99(±0,80)	12,68(±0,68)ns	220,27(±7,64)	195,10(±4,35)**
Viñales-144	3,83(±0,71)	1,68(0,19)**	22,46(±1,39)	10,12(±0,97)***	325,73(±4,03)	140,40(±2,70)***
IT 86 D-386	3,78(±0,38)	2,22(0,23)**	23,82(±1,78)	12,55(±1,13)***	323,87(±9,83)	159,30(±5,40)***
Cancarro	2,97(±0,05)	2,72(0,04)**	27,68(±3,29)	24,89(±3,06)ns	440,00(±4,45)	395,16(±5,22)***
IT 86-D 719	4,11(±0,12)	1,82(0,05)***	26,46(±0,42)	13,93(±0,37)***	394,80(±5,20)	183,60(±5,40)***

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. MSR, masa seca de la raíz; MSF, masa seca foliar; N, contenido de nitrógeno foliar. (Los datos mostrados constituyen la media de 10 plantas al azar por parcela experimental).

Estos resultados, indican una relación negativa entre las variables evaluadas y la salinidad, debido a que en todas existió una tendencia a la reducción en presencia de sales, lo cual se comprobó a través de un análisis de componentes principales, donde se describió la naturaleza de esta relación (Figura 4.2).

A través de este análisis, se logró realizar la caracterización de los elementos de la muestra y se formaron dos nuevas variables o componentes (C1 y C2), que lograron explicar el 83,07 % de la varianza total del experimento, en este caso, la C1 presentó la mayor contribución con el 66,24 % (Figura 4.2). Esta componente, se caracterizó por las variables relacionadas con la nodulación natural y la fijación simbiótica de nitrógeno NNPL, NNRo, MSN, MSA, NITRO y FEN, así como las relacionadas con el rendimiento del cultivo entre las que están, vainas y granos por planta, peso de 100 semillas y rendimiento del grano en t.ha⁻¹.

Tabla 4.4. Efecto del estrés salino sobre la cantidad de vainas y granos por plantas, peso de 100 semillas y rendimiento.

Variedades	Vainas por planta		Granos por planta		Peso 100 semillas(g)		Rendimiento (t.ha ⁻¹)	
	No salino	Salino	No salino	Salino	No salino	Salino	No salino	Salino
IT 86 D-715	16,25(±0,06)	16,33(±0,01)ns	80,29(±3,44)	74,86(±3,39)ns	16,79(±2,56)	15,26(±2,22)ns	0,84(±0,07)	0,78(±0,07)ns
Trópico Yarey	14,68(±0,14)	12,68(±0,06)***	45,31(±2,07)	27,80(±1,27)***	12,96(±1,00)	7,87(±0,54)**	1,36(±0,02)	0,82(±0,02) ***
Cubanita-666	15,27(±0,84)	13,64(±0,62)ns	42,06(±1,38)	30,20(±1,18)***	11,01(±0,44)	7,90(±0,32)***	0,98(±0,05)	0,69(0,04) ***
IITA-Precoz	15,75(±0,32)	12,46(±0,17)***	55,93(±1,44)	25,15(±0,45)***	19,62(±2,64)	8,44(±1,14)**	1,52(±0,02)	0,78 (0,001) ***
IT 86 D-510	18,16(±0,44)	17,39(±0,41)ns	64,37(±2,20)	59,43(±2,31)ns	19,20(±0,54)	16,85(±0,60)**	0,83(±0,06)	0,76(±0,05)ns
IT 86-D 792	14,32(±1,09)	13,07(±0,78)ns	46,81(±2,31)	35,48(±1,86)***	17,68(±0,79)	13,04(±0,55)**	1,31(±0,01)	0,97(0,01) ***
IT 86 D-389	14,89(±0,15)	13,37(±0,08)***	45,91(±1,47)	32,62(±0,9)***	16,62(±0,66)	12,05(±0,16)***	1,33(±0,03)	0,95(0,02) ***
IT 82 E-9	18,05(±0,15)	17,07(±0,07)***	48,41(±2,61)	43,50(±2,64)ns	19,87(±0,42)	17,59(±0,47)**	1,02(±0,07)	0,93(±0,04)ns
Viñales-144	15,14(±0,74)	12,28(±0,35)***	53,01(±3,65)	24,09(±1,56)***	16,95(±1,77)	7,91(±1,07)**	1,72(±0,15)	0,81(0,02) ***
IT 86 D-386	15,51(±0,91)	12,49(±0,41)**	49,83(±1,99)	23,11(±0,97)***	15,41(±0,86)	7,84(±0,47)***	1,53(±0,03)	0,80(0,01) ***
Cancarro	16,97(±0,06)	16,00(±0,01)***	72,23(±0,79)	64,11(±1,00)***	16,97(±0,57)	15,40(±0,45)*	0,99(±0,02)	0,85(0,02) ***
IT 86-D 719	16,06(±0,10)	12,70(±0,02)***	60,15(±1,22)	26,86(±0,41)***	15,81(±1,34)	7,50(±0,63)***	1,45(±0,01)	0,79(0,01) ***

Nota. *, ** y *** indican significación para $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$ y $P \leq 0,01$ respectivamente, al aplicar la prueba de t-Student.

Por el grado de relación que existió entre ellas, se definieron tres grupos de variables. El primer grupo, en el que se encuentran las relacionadas con el rendimiento, número de granos y vainas por planta, peso de 100 semillas y rendimiento del grano (Figura 4.2).

Un segundo grupo, integrado por la masa seca y su contenido de nitrógeno foliar, la FEN y la masa seca de los nódulos, mientras que el tercer grupo, se caracterizó por las variables relacionadas con la nodulación, NNPL, NNRP, NNRo y la MSR. Por otra parte, aunque todas las variables en su conjunto tuvieron una correlación positiva con el rendimiento, las

que ejercieron una influencia mayor fueron el número de granos y vainas por planta, el peso de 100 semillas, la MSF, FEN, N y MSN. En tanto que el NNRP y la MSR, tuvieron una influencia menor (Figura 4.2).

Otra de las manifestaciones que se evidenciaron, fue la mayor dispersión existente entre las variedades que se desarrollaron en el suelo salino, lo cual explica el alto grado de variabilidad para la condición estresante, mientras que las crecidas en condiciones normales presentaron una variabilidad menor, pues las distancias entre ellas se redujeron.

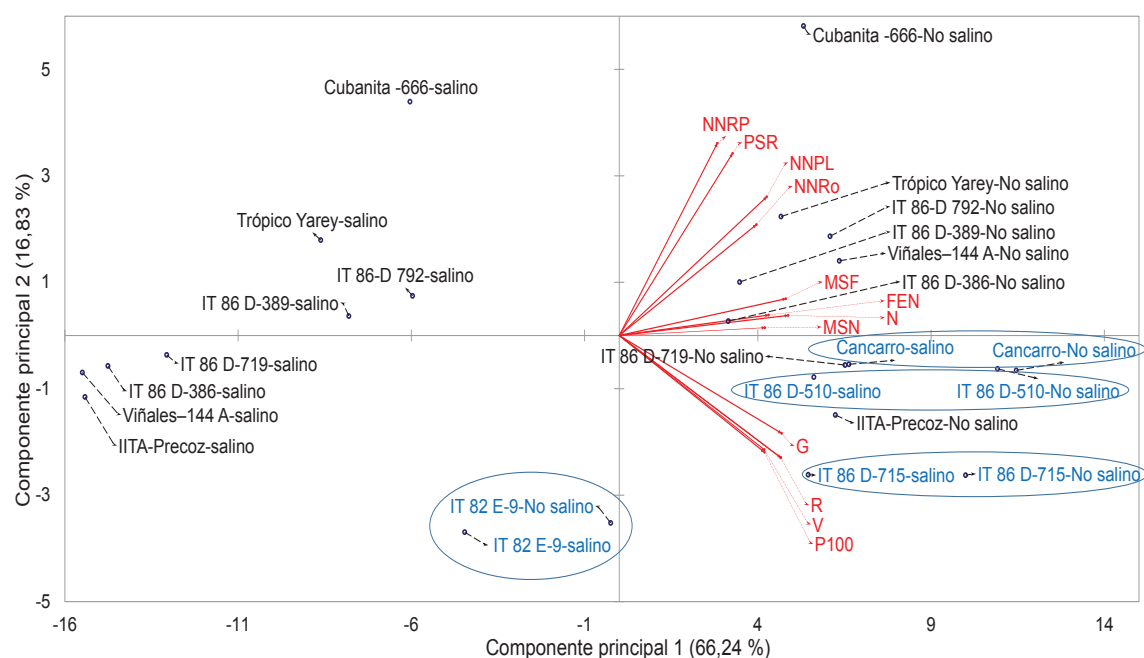


Figura 4.2. Representación Biplot según el Análisis de Componentes Principales, para cultivares de frijol Caupí desarrollados en dos condiciones: suelo afectado y no afectado por sales. Cultivares de color azul y dentro de la elipse, presentan las menores variaciones en la condición estresante con respecto a la no estresante. Variables (color rojo): NNPL, número de nódulos por planta; NNRP, número de nódulos en la raíz principal; NNRO, número efectivos; MSN, masa seca de los nódulos; MSR, masa seca de la raíz; MSF, masa seca foliar; N, contenido de nitrógeno foliar; FEN, fijación específica de nitrógeno; V, vainas por planta; G, granos por planta; P100, peso de cien semillas; R, rendimiento. *Correlación cofenética*= 0,98.

En este sentido, las que mostraron variaciones menores en la condición estresante con respecto a la no estresante fueron, Cancarro, IT 86 D-715, IT 86 D-510 e IT 82 E-9, lo que sugiere que estas se adaptan mejor a la salinidad. Por el contrario, Viñales-144 A, IITA-

Precoz, IT 86 D-386 e IT 86 D-719 presentaron las distancias mayores entre ambas condiciones, por lo que se manifiestan como menos adaptadas al estrés.

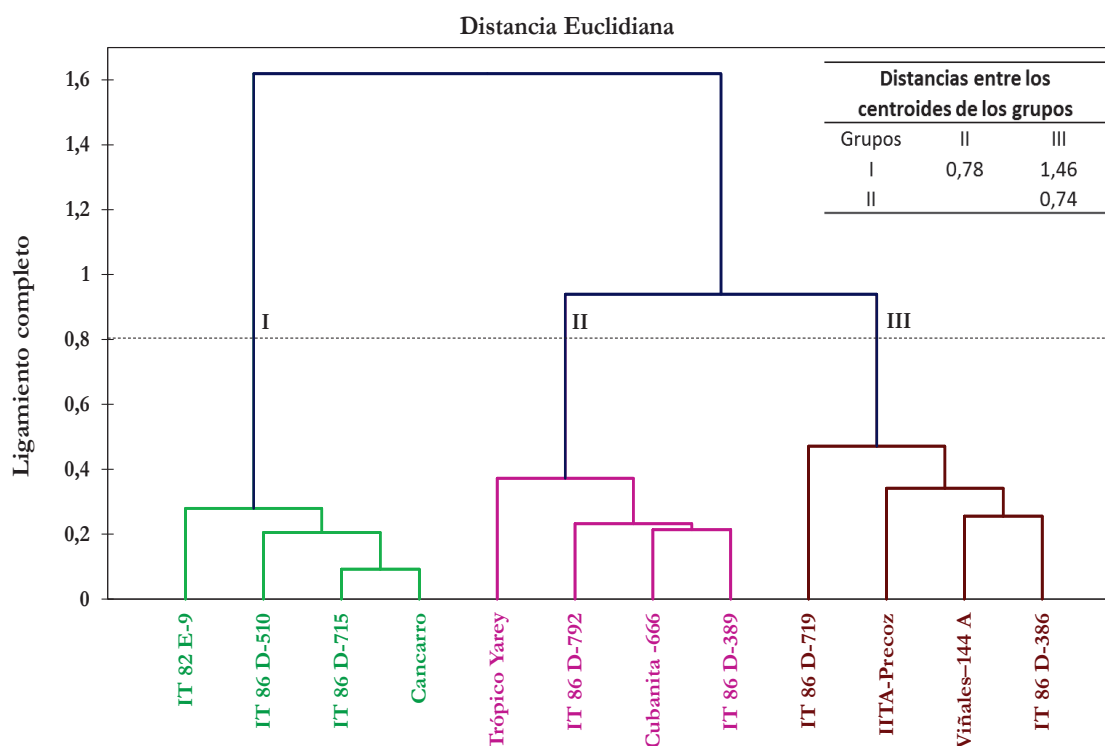


Figura 4.3. Agrupamiento de las variedades de acuerdo a la tolerancia a la salinidad en condiciones de campo. Variables: número de nódulos por planta y en la raíz principal, nódulos efectivos, masa seca de los nódulos, masa seca de la raíz, masa seca foliar, contenido de nitrógeno foliar, fijación específica de nitrógeno, vainas por planta, granos por planta, peso de cien semillas y rendimiento del grano. Grupo I, color verde (tolerante); grupo II, color morado (medianamente susceptible); grupo III, (color marrón) susceptible. Umbral de corte=50 %. Matriz formada: 12 x 12 ($n \geq p$). Correlación cofenética= 0,81.

Con el objetivo de corroborar los resultados obtenidos en el análisis de componentes principales, en cuanto a la tendencia en tolerancia o susceptibilidad de las variedades utilizadas, se realizó un análisis de Conglomerado Jerárquico de ligamiento completo en base a la distancia euclidiana, para establecer agrupamientos a partir del índice de tolerancia a la salinidad. Este análisis, facilitó la formación de tres grupos que resumen la tendencia en la respuesta de estas variedades (Figura 4.3).

El grupo I, estuvo formado por las variedades IT 86 D-715, IT 86 D-510, IT 82 E-9 y Cancarro (Figura 4.3), con los valores promedios mayores y por ende, con las características de mayor tolerancia (Tabla 4.5). El grupo II, se caracterizó por presentar rasgos intermedios entre los grupos I y III, agrupando los genotipos Trópico Yarey, Cubanita-666, IT 86 D-389 e IT 86 D-792. Mientras que las variedades IITA-Precoz, Viñales-144, IT 86 D-386 e IT 86 D-719, fueron agrupadas en el grupo III, con los aportes promedios menores en la mayoría de las variables, lo cual sugiere manifestaciones marcadas de susceptibilidad (Tabla 4.5).

La valoración de las distancias entre los grupos (Figura 4.3), muestra lo lejanos que se encuentran los grupos I y III, formados por variedades contrastantes, razón por la cual, éstas clasifican como tolerantes y susceptibles a la salinidad, respectivamente.

Tabla 4.5. Valores promedios de los índices de tolerancia a la salinidad sobre la base la nodulación, fijación de nitrógeno y el rendimiento en los grupos formados.

Grupos	NNPL	NNRP	NNRo	MSN	MSR	MSF	N	FEN	V	G	P 100	R
I	0,89	0,87	0,91	0,93	0,85	0,89	0,87	0,93	0,95	0,91	0,89	0,81
II	0,66	0,87	0,85	0,69	0,67	0,65	0,56	0,81	0,89	0,70	0,70	0,49
III	0,41	0,66	0,60	0,65	0,50	0,50	0,43	0,66	0,80	0,45	0,47	0,21

Nota: NNPL, número de nódulos por planta; NNRP, número de nódulos en la raíz principal; NNRo, número efectivos; MSN, masa seca de los nódulos; MSR, masa seca de la raíz; MSF, masa seca foliar; N, contenido de nitrógeno foliar; FEN, fijación específica de nitrógeno; V, vainas por planta; G, granos por planta; P100, peso de cien semillas; R, rendimiento.

Si bien el grupo II, presentó características intermedias entre el I y el III, las distancias entre estos evidenciaron mayor cercanía del II al III, por lo cual las variedades que lo integran presentan mayor tendencia a la susceptibilidad que a la tolerancia ante condiciones de estrés por sales, debido a ello, son clasificadas como medianamente susceptibles.

Sin embargo, en todos los casos se informan reducciones en la acumulación de biomasa, formación de nódulos y capacidad de fijación simbiótica del nitrógeno por el efecto perjudicial de las sales, pero las diferencias en la capacidad para evitar los daños, dependen

en gran medida de las características de adaptación tanto de la leguminosa huésped como del microsimbionte, así como de la eficiencia en su interacción (Appunu *et al.*, 2008; Florentino *et al.*, 2010; de Freitas *et al.* 2012).

En estudios realizados por González *et al.* (2000), se revelaron afectaciones del rendimiento y sus componentes en condiciones de suelos salinizados, sin embargo, el método utilizado basado en la evaluación de la condición estresante con relación a la no estresante, le permitió clasificarlas de acuerdo a su nivel de tolerancia relativo.

Según informan Doleib y Elsheikh (2006), el frijol Caupí manifiesta el mayor grado de sensibilidad durante los estadios de desarrollo foliar, si el estrés ha sido aplicado desde el establecimiento de la semilla, por lo tanto en las variedades más tolerantes, algunos de los perjuicios que provocan las altas concentraciones de sales pudieran hacerse evidentes durante la culminación del ciclo vegetativo o inicio del reproductivo, lo cual se ve reflejado directamente sobre el rendimiento.

No obstante, esto no siempre es así, debido a que los resultados obtenidos en estos experimentos, demuestran que existe un grupo de variedades con características definidas de tolerancia manifestada desde los primeros estadios de la germinación (Figura 4.1), hasta la evaluación del rendimiento y sus componentes (Figuras 4.2 y 4.3), entre las cuales están, IT 86 D-715, Cancarro, IT 86 D-510 e IT 82 E-9.

En otros grupos esta respuesta no es estable, por ejemplo, las variedades IT 86 D-792, Trópico Yarey, Cubanita-666, IITA-Precoz e IT 86 D-389, que mostraron su mayor sensibilidad a las condiciones salinas durante el proceso germinativo (Figura 4.1), clasificaron como medianamente sensibles cuando fueron evaluadas variables relacionadas con la nodulación, fijación de nitrógeno, crecimiento y rendimiento del cultivo en condiciones de campo (Figuras 4.2 y 4.3), lo que indica que durante el avance de su ciclo

vegetativo, estas lograron en alguna medida sobreponerse a la condición estresante, lo cual se manifestó en el rendimiento.

Por el contrario, las variedades IT 86 D-719, Viñales-144 A e IT 86 D-386, que mostraron solo algún grado de sensibilidad durante la germinación, manifestaron su mayor susceptibilidad al ser evaluadas en condiciones de campo, pues la mayoría de las variables se afectaron en estas condiciones (Figura 4.2).

El procedimiento utilizado para evaluar la tolerancia a la salinidad en las variedades de frijol Caupí en fases como la germinación (Acápite 4.2.1), crecimiento y rendimiento del cultivo (Acápite 4.2.2), permitió realizar una clasificación de los genotipos de acuerdo al nivel de tolerancia a las sales, lo cual constituye un elemento importante para recomendar los más adecuados en áreas que estén afectadas por este tipo de estrés.

Una vez obtenidos los cultivares de mejores características de adaptación a las condiciones de salinidad, el trabajo fue enfocado hacia la obtención de cepas de rizobios nativas de estos suelos con capacidad para establecer simbiosis y contribuir al mejoramiento del rendimiento del frijol Caupí, dando de esta forma cumplimiento al segundo objetivo de esta investigación.

4.3. Aislamiento, caracterización fenotípica y molecular de los aislamientos nativos

4.3.1. Aislamiento

Se lograron obtener 4 aislamientos puros a partir de los nódulos cosechados en las localidades de Jiguaní y Babiney. El aislamiento VIBA-1 fue obtenido a partir de nódulos de plantas de la variedad IT 86 D-715 desarrolladas en un suelo salinizado con una C.E de 5,8 dS.m⁻¹ en el municipio Jiguaní, mientras que los aislamientos VIBA-2, VIBA-3 y VIBA-5, fueron obtenidos de plantas de la variedad IT 82 E-9, desarrolladas en un suelo de igual forma afectado por sales, con una C.E de 5,55 dS.m⁻¹ (Acápite 3.1.3), de la zona de Babiney, municipio Cauto Cristo.

4.3.2. Análisis de los resultados fenotípicos

Los aislados fueron bacilos Gram negativos, por lo general de apariencia gelatinosa y textura cremosa, excepto VIBA-5, la cual se manifestó con apariencia acuosa y textura elástica. Las colonias formadas por VIBA-1 fueron redondeadas, mientras que VIBA-2, VIBA-3 y VIBA-5 fueron planas. Las colonias de todos los aislados presentaron diámetros menores de un 1 mm y las de mayor tamaño fueron las formadas por VIBA-1.

La turbidez en el medio de cultivo, se observó entre tres y cinco días después de realizadas las siembras. El aislado VIBA-1, fue el de crecimiento más lento con aparición de turbidez cinco días después. Por su parte, VIBA-2, VIBA-3 y VIBA-5 fueron de crecimiento intermedio (tres a cuatro días) (Tabla 4.6).

Los aislados VIBA-2, VIBA-3 y VIBA-5, produjeron acidez en el medio de cultivo, mientras que VIBA-1, produjo alcalinidad (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Determinaciones micromorfológicas y culturales de los aislados.

Aislados	TG	Características de las Colonias (LMA)				C (LM)	Reacción LMA+AB
		Apariencia	Textura	Forma	Diámetro (mm)		
VIBA-1	(-)	Gelatinosa	Cremosa	Redonda	0,8	5	alcalinidad
VIBA-2	(-)	Gelatinosa	Cremosa	Plana	0,7	3-4	acidez
VIBA-3	(-)	Gelatinosa	Cremosa	Plana	0,6	3-4	acidez
VIBA-5	(-)	Acuosa	Elástica	Plana	0,6	4	acidez

Nota: AB, azul de bromotimol; C, crecimiento en días; LMA, Levadura-Manitol-Agar; LM, Levadura-Manitol; TG, Tinción Gram.

Ha sido ampliamente documentado, que los rizobios de crecimiento lento necesitan entre seis y ocho días para producir turbidez en medio de cultivo líquido LM y los de crecimiento rápido, solo de dos a tres días (CIAT, 1988; Somasegaran y Hoben, 1994).

En el frijol Caupí, se han aislado rizobios de crecimiento lento que producen alcalinidad en el medio y son clasificados como bradyrizobios (Lafay y Burdon, 1998), sin embargo, a

partir del uso de técnicas moleculares para la clasificación genética, no solo se ha logrado identificar especies diferentes a las del género *Bradyrhizobium* en este cultivo (Fening *et al.*, 2004), sino que también se ha demostrado que algunas de las especies del género *Bradyrhizobium*, pueden tener una respuesta diferente en cuanto su tasa de crecimiento en medio LMA.

Los estudios de este tipo de manifestación son escasos, los primeros fueron realizados por Hungria *et al.* (2001), quienes aislaron en Brasil cepas de *B. japonicum* y *B. elkanii* a partir de nódulos de soya, caracterizadas genéticamente a través de la secuencia parcial del gen 16S ADNr, que presentaron crecimiento rápido con tasas de entre 130 a 240 min y produjeron reacción ácida en el medio LMA. Posteriormente Leblanc *et al.* (2005), lograron aislar de nódulos de la leguminosa arbórea *Inga edulis*, cuatro cepas de *B. japonicum* y *B. liaoningense*, que produjeron turbidez visual en tres días, causaron reacción ácida en el medio y fueron consideradas rizobios de crecimiento rápido.

En Cuba, existen informes sobre cepas de *Bradyrhizobium* aisladas de leguminosas forrajeras que crecen entre 3 y 5 días, sin embargo, se clasificaron por Bécquer *et al.* (2001) como cepas de crecimiento lento.

En el caso de frijol Caupí para condiciones de suelos cubanos salinizados, no se han informado bradyrizobios cuya tasa de crecimiento esté entre los tres y cuatro días y que además, acidifiquen el medio de cultivo como lo hicieron VIBA-2, VIBA-3 y VIBA-5.

4.3.2.1. Evaluación de la tolerancia de los aislamientos a estrés por sales. Crecimiento en medio de cultivo líquido LM

El aumento de la salinidad en el medio de cultivo (Figura 4.4) provocó la reducción del crecimiento de los aislados, sobre todo a partir de la aplicación de 4,2 dS.m⁻¹ de NaCl, tendencia que se mantuvo en todos los aislamientos hasta la máxima concentración de 6,6 dS.m⁻¹.

De los aislamientos utilizados, solo VIBA-1 y VIBA-2 lograron crecer en medio con 3,4 dS.m⁻¹ de NaCl con resultados similares a la concentración recomendada para cultivo de rizobio (0,17 dS.m⁻¹), mientras que VIBA-3 y VIBA-5 disminuyeron su crecimiento significativamente a partir de 2,6 dS.m⁻¹. De todas formas, aunque se observó disminución en el crecimiento por el incremento sucesivo de las concentraciones salinas, todos los aislamientos lograron crecer, aún con el nivel de sal más alto (6,6 dS.m⁻¹). A este nivel, se manifestaron también diferencias entre los aislados. Los de mejor respuesta fueron VIBA-1 y VIBA-2, mientras que VIBA-3 y VIBA-5 resultaron ser los más afectados, razón por la cual, estos son clasificados como como tolerantes y susceptibles respectivamente.

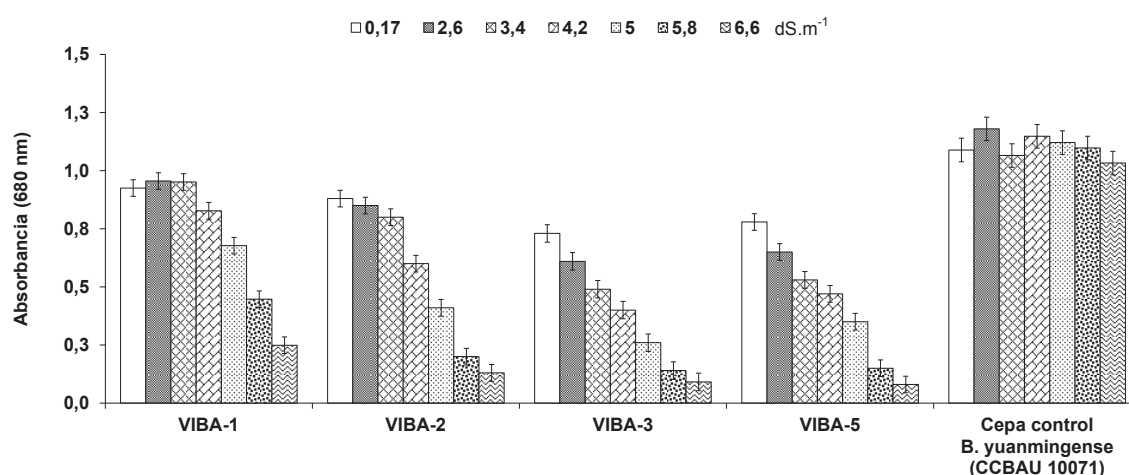


Figura 4.4. Efecto de diferentes concentraciones de sales (NaCl) en el medio de cultivo líquido LM, sobre el crecimiento de los aislados. Barras verticales (I), indican Intervalos de Confianza para $1-\alpha=0,05$ y $n=3$.

Por otra parte, ninguno de los aislados logró niveles de crecimiento a los alcanzados por la cepa tipo CCBAU 10071 de *B. yuanmingense*, en la cual, las mayores lecturas de absorbancia se alcanzaron con 2,6 dS.m⁻¹. El crecimiento de esta cepa con el resto de las concentraciones utilizadas fue similar al control, lo que indica el alto nivel de tolerancia a la salinidad que presenta para condiciones *in vitro*.

La cepa CCBAU 10071, fue aislada por primera vez de nódulos de *Lespedeza cuneata* en el norte de China (Yao *et al.*, 2002) y posteriormente, se han notificado aislamientos de esta especie a partir de diferentes hospederos en un rango amplio de regiones, sobre todo de climas templados, secos y calurosos del sur y sureste asiático y el sur de África. Se ha empleado para investigaciones relacionadas con la adaptación de esta especie a condiciones estresantes, por sus características de tolerancia a bajas y altas temperaturas, diferentes tipos de pH y estrés hiperosmótico (Vinuesa *et al.*, 2008).

Para que las bacterias puedan manifestar algún nivel de tolerancia a la salinidad, es necesaria la acumulación de solutos a través de la absorción o la síntesis. Los solutos protegen a la célula del efecto nocivo de los bajos niveles de agua, mantienen el volumen y turgor celular, protegen las macromoléculas intercelulares del efecto desestabilizador de la sal, dan protección y estabilizan las enzimas y estructuras de las membranas, así como disminuyen el daño celular producido por radicales libres (Bartels y Sunkar, 2005). Entre los solutos compatibles, se pueden identificar aminoácidos (glutamato y prolina), derivados de aminoácidos (betaina y moléculas análogas) y carbohidratos (sacarosa, trealosa, glicerol) (Khadri *et al.*, 2006; Khadri *et al.*, 2007).

Otros mecanismos que permiten la supervivencia de los rizobios en condiciones de estrés salino, parecen estar relacionados con la abundante producción de exopolisacáridos y trealosa, así como las alteraciones que se producen en la membrana celular (Skorupska *et al.*, 2006; Freitas *et al.*, 2007; Medeot *et al.*, 2007; Xavier *et al.*, 2007).

A estos mecanismos, se suman las características específicas de cada especie e incluso de cada cepa, lo cual hace que las manifestaciones de tolerancia sean diferentes (Ruiz-Díez *et al.*, 2009). Esta manifestación, se observa también en los resultados obtenidos en este estudio debido a que, aunque el crecimiento de las bacterias tuvo una tendencia a la

disminución con el incremento de la concentración, los aislados tuvieron respuestas diferentes.

4.3.2.2. Evaluación de la tolerancia de los aislamientos a estrés por pH. Crecimiento en medio de cultivo líquido LM

Los resultados evidenciaron que tanto los aislamientos, como la cepa *B. yuanmingense* CCBAU 10071 utilizada en el experimento como control, solo crecieron a pH 7 y 9 (Figura 4.5).

Los aislamientos VIBA-1, VIBA-2 y VIBA-3, presentaron mayor crecimiento a pH 7 con diferencias significativas respecto a cuando fueron utilizados medios ajustados a pH 9. El aislamiento VIBA-5, presentó similar crecimiento en ambos pH, mientras que la cepa CCBAU 10071 creció mejor en pH alcalino.

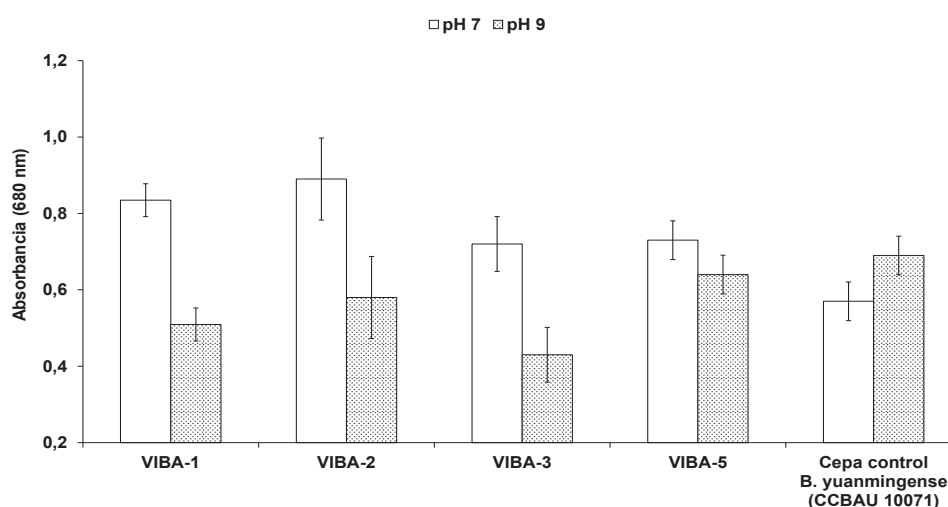


Figura 4.5. Efecto de diferentes pH en el medio de cultivo líquido LM, sobre el crecimiento de los aislados. Barras verticales (I), indican Intervalos de confianza para $1-\alpha=0,05$ y $n=3$.

Los resultados obtenidos en este ensayo, evidencian que los aislados son susceptibles a pH ácido y que aunque pueden crecer en condiciones de alcalinidad, los mayores niveles de tolerancia se manifestaron solo en VIBA-5 por presentar crecimientos similares al control, por lo cual se puede considerar alcalino tolerante.

De acuerdo con (Kuykendall, 2005), el pH óptimo para el desarrollo de las cepas de

rizobios está entre 6 y 7. No obstante, se ha demostrado que *Bradyrhizobium sp.* es capaz de crecer desde pH 4,5 hasta 9 (Ruiz-Díez *et al.*, 2009, 2012). Werner y Newton (2005), plantearon que son más ácido tolerantes que *Rhizobium sp.* Por su parte, los estudios de Bécquer *et al.* (2000), demostraron la capacidad de *Bradyrhizobium* para crecer en medios alcalinos con pH 11, lo cual coincide con los resultados obtenidos en estas investigaciones.

4.3.2.3. Respuesta de los aislamientos a diferentes temperaturas

La Tabla 4.7, muestra el efecto de las altas temperaturas sobre el crecimiento de los bradyrizobios. Todos los aislamientos crecieron hasta los 40 °C, sólo VIBA-5 creció a 45 °C.

Estos resultados coinciden con los informes realizados por Bécquer *et al.* (2001) y Marsh *et al.*, (2006), los que lograron aislar y caracterizar cepas de *Bradyrhizobium sp.* que crecieron en medios de cultivos a temperaturas que fluctuaron entre 30 y 40 °C.

Tabla 4.7. Influencia de la temperatura sobre el crecimiento de cepas rizobianas.

Aislamientos	Temperatura °C	
	De 28 a 40	45
VIBA-1	+	-
VIBA-2	+	-
VIBA-3	+	-
VIBA-5	+	+
<i>B. yuanmingense</i> (CCBAU 10071)	+	-

Autores como Yates *et al.* (2004); FAO (2005); Manchanda y Garg (2008), coinciden en que la adaptación de los rizobios a las altas temperaturas está relacionada con su origen, ubicándose por lo general en zonas caracterizadas por prolongados períodos de sequía y elevadas temperaturas del suelo.

La respuesta *in vitro* de aislamientos de rizobios ante condiciones estresantes como salinidad, sequía y temperatura en condiciones controladas y en medios de cultivo sólido o líquido, ha constituido la base de las investigaciones para caracterizar fenotípicamente,

clasificar y seleccionar las cepas nativas (Soria *et al.*, 2006; Ruiz-Díez *et al.*, 2012).

Aunque la evaluación de cultivos puros, puede ser una prueba preliminar para la selección de cepas tolerantes a las bajas o altas temperaturas (Marsh *et al.*, 2006), por sí solo, el estudio y la selección del microorganismo en estas condiciones no proporciona los beneficios que se persiguen en relación a la optimización del proceso de fijación simbiótica del nitrógeno, para ello es también necesario la evaluación de la interacción de estos con la leguminosa (Ruiz-Díez *et al.*, 2012). De hecho, la existencia de criterios divididos con respecto a la tolerancia a la temperatura y la baja o alta capacidad para fijar nitrógeno, corrobora esta hipótesis. Mientras que Rodrigues *et al.* (2006), relacionaron la capacidad de supervivencia de los rizobios en altas temperaturas, con la baja capacidad de fijación simbiótica de nitrógeno, Marsh *et al.* (2006), informaron que en frijol Caupí las cepas que mayores cantidades de nitrógeno fijaron fueron las termo tolerantes.

4.3.3. Análisis genético de las cepas

4.3.3.1. Análisis de restricción del ADNr amplificado

A partir de la amplificación del gen 16S ARNr, fue obtenido un fragmento de aproximadamente 1 400 pares de bases (pb) en todos los aislados.

Los fragmentos de restricciones formados a partir de las digestiones del gen 16S ARNr, estuvieron en el orden de 4 a 8 para cada una de las enzimas (Figura 4.6). Las enzimas *MspI* y *HinfI*, produjeron 7 patrones diferentes cada una, mientras que las endonucleasas *HhaI* y *DdeI* rindieron 5 patrones.

Con la utilización de los cuatro aislamientos y la colección de cepas tipos, se formaron patrones de restricción diferentes que dieron lugar a 12 genotipos ARDRA distintos (Anexo 2). Los 5 aislamientos se dividieron en 3 grupos diferentes, ubicándose la mayoría dentro del grupo 2, donde se encuentran VIBA-2, VIBA-3 y VIBA-5, los cuales presentaron similitud con la cepa de referencia *Bradyrhizobium yuanmingense* (cepa tipo CCBAU

10071). Por su parte, VIBA-1 no presentó similitud con ninguna de las cepas de referencia utilizadas en el análisis.

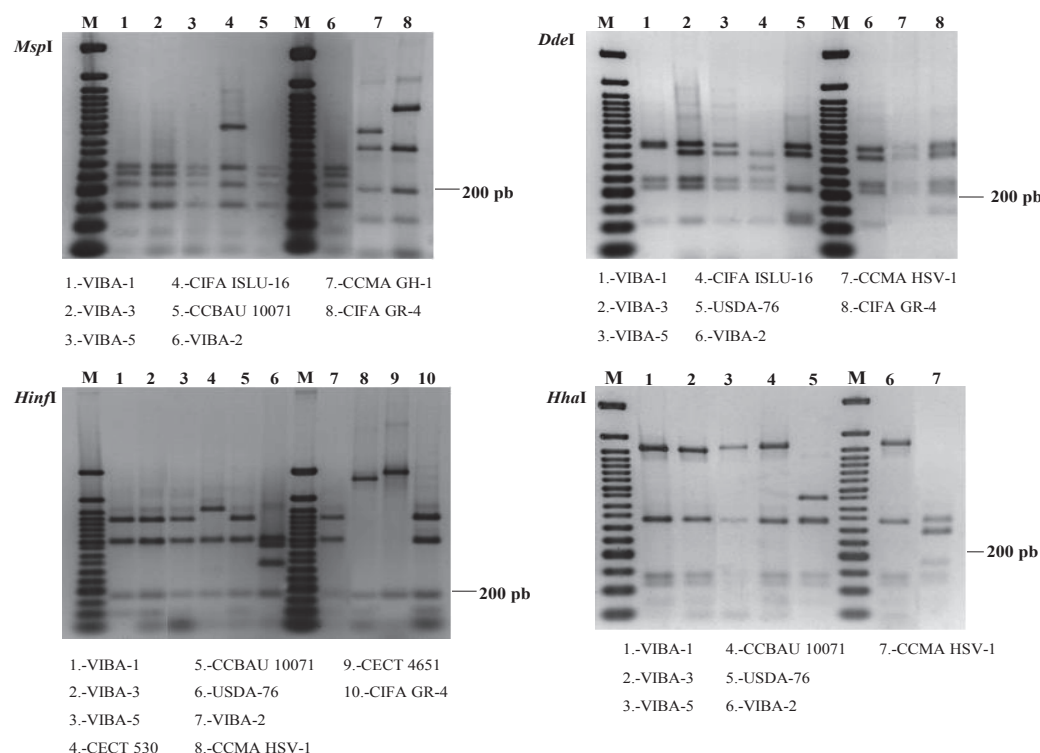


Figura 4.6. Patrones de restricción de 16S ADNr PCR-amplificado, digeridos con las endonucleasas *MspI*, *HinfI*, *DdeI*, *HhaI*, obtenidos de los aislamientos utilizados. M, marcador molecular 50 pb (*New England BioLabs*). VIBA-1, VIBA-2, VIBA-3, VIBA-5, Aislamientos obtenidos de suelos afectados por sales de Jiguaní y Cauto Cristo, Granma, Cuba. CIFA ISLU-16, *Bradyrhizobium. sp* Lupinus; CCBAU 10071, *B. yuanmingense*; CCMA GH-1, *R. leguminosarum* bv. *Viceae*; CIFA GR-4, *S. meliloti*; USDA 76, *B. elkanii*; CCMA HSV-1 *R. leguminosarum* bv. *Viceae*; CECT 530, *Bradyrhizobium japonicum*; CECT 4651; *Rhizobium etli*.

A partir de los resultados del análisis ARDRA, fue determinada la secuencia del gen 16S ARNr de los aislamientos de distinto patrón y diferentes coordenadas, para obtener su identificación a nivel de género y/o especie.

4.3.3.2. Análisis de secuencia del gen 16S ARNr

La secuencia de los cuatro aislamientos obtenidos, fue depositada en la base de datos del Banco de genes con los siguientes números de acceso: VIBA-1, FJ 941843; VIBA-2, FJ941844; VIBA-3, FJ941845; VIBA-5, GU784792.

Para los alineamientos realizados con el *Clustal W. Multiple Alignments* (en <http://www.npsa-pbil.ibcp.fr/>), se emplearon 1 434 nucleótidos de la cepa VIBA-1, 1 279 de la VIBA-2, 1 262 de la VIBA-3 y 1 261 de la VIBA-5.

El análisis Blast, evidenció que la cepa más próxima a VIBA-1 con un 99,8 % de homología fue *Bradyrhizobium liaoningense* LYG2, (número de acceso DQ497619), mientras que la homología con la especie/cepa tipo más próxima la acercó a *B. liaoningense*, USDA 3 622 (número de acceso AF208513), con una similitud de 99,7 %. Por su parte, VIBA-2 tuvo una cercanía de 99,9 % con *B. yuanmingense* TSC10 (número de acceso FJ540961) y una homología de 99,53 % con la especie/cepa tipo *B. yuanmingense*, CCBAU 10071 (número de acceso AF193818). La cepa más próxima a VIBA-3, fue de igual forma *B. yuanmingense* TSC10 (número de acceso FJ540961), con un 99,8 %, mientras que presentó una homología de 99,52 % con la especie/cepa tipo *B. yuanmingense* CCBAU 10071, (número de acceso AF193818).

La cepa más próxima a VIBA-5 fue TSC10 (número de acceso FJ540961) de *B. yuanmingense*, con una homología de 99,2 % y la especie/cepa tipo más próxima, fue *B. yuanmingense* CCBAU 10071, (número de acceso AF193818) con un 98,9 % de homología.

Las relaciones evolutivas de los aislamientos, fueron obtenidas mediante el análisis filogenético. Estas relaciones, se calcularon con respecto a la secuencia de las especies rizobianas más significativas, representadas por su cepa tipo.

El árbol filogenético (Figura 4.7), demostró que la cepa VIBA-1 se agrupa en la misma rama que la cepa de referencia de *B. liaoningense*, USDA 3622, con un elevado *bootstrap* (86), el resto de los aislamientos se agrupó con *B. yuanmingense*, CCBAU 10071 pero con un *bootstrap* más bajo (61), lo cual indica que su adscripción a dicha especie es de igual

forma correcta, aunque con un margen de precisión menor que la especie anterior, todo lo cual es congruente con los resultados obtenidos en el análisis del genotipo ARDRA.

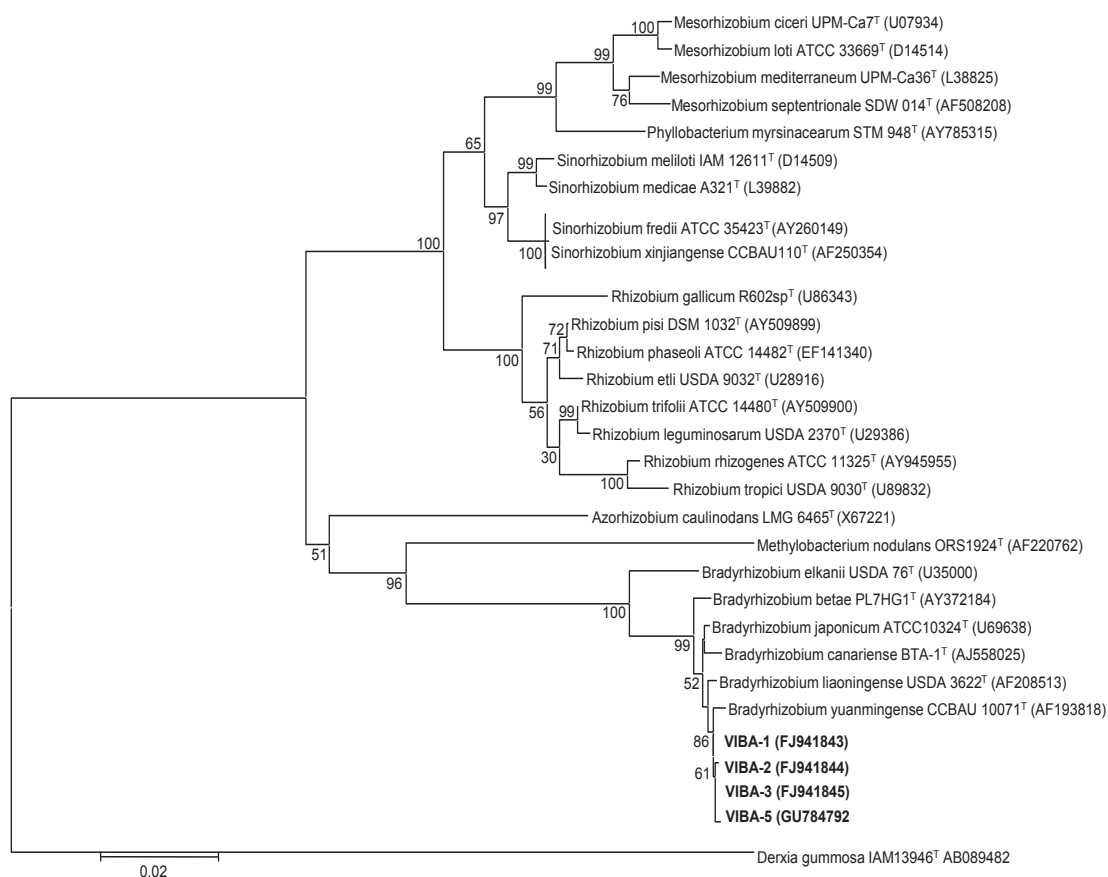


Figura 4.7. Árbol filogenético obtenido del alineamiento de 1 484 pb del gen 16S ARNr, a partir de los rizobios aislados y cepas tipo (T) de especies rizobianas más representativas. Valores de *bootstrap* basados en 1000 réplicas (mostrados sólo > 50 %). Escala, 2 nt sustitución/100 nt.

Los análisis genotipo ARDRA y secuenciación del 16S ARNr, permitieron la identificación genética de los 5 aislamientos y su ubicación taxonómica. Todas las cepas obtenidas fueron situadas dentro del género *Bradyrhizobium*.

A través del análisis de la secuencia completa del 16S ARNr, se definió que del género *Bradyrhizobium*, existieron solo dos especies: *Bradyrhizobium liaoningense*, representada por la cepa VIBA-1 y *Bradyrhizobium yuanmingense*, con las cepas VIBA-2, VIBA-3 y VIBA-5.

Las técnicas moleculares son utilizadas como una de las herramientas más eficaces para la caracterización de rizobios, debido a que permiten identificar, clasificar taxonómicamente y evaluar su diversidad (Mouhsine *et al.*, 2007; Orozco-Mosqueda *et al.*, 2009; Elboutahiri *et al.*, 2009; Binde *et al.*, 2009).

La especie *Bradyrhizobium liaoningense* fue descubierta por Xu *et al.* (1995), los cuales lograron aislarla de nódulos provenientes de plantas de Soya. Por su parte, *B. yuanmingense* fue aislada por Yao *et al.* (2002) de nódulos de *Lespedeza*, pero también mostró capacidad de nodulación en *Medicago sativa* y *Melilotus albus*, no así en *Glycine max*. Por su parte, Steenkamp *et al.*, (2008), encontraron que *B. yuanmingense* presentó capacidad de infección en plantas de frijol Caupí, mientras que *B. liaoningense* no produjo nódulos.

En Cuba, no se habían informado estas dos especies para el frijol Caupí en suelos afectados por sales, sin embargo, el desarrollo de estas cepas es posible para diversas condiciones ambientales estresantes. Estudios desarrollados por Appunu *et al.* (2008 y 2009) así lo demuestran, al realizar aislamientos en regiones de suelos con problemas de salinidad, alcalinidad o sodicidad, así como en regiones de escasas precipitaciones.

Por estas razones, la obtención de nuevos aislados constituye uno de los aspectos a tener en cuenta para aumentar y mejorar las poblaciones de bacterias, su tolerancia a la salinidad y la mejora de la simbiosis en estas condiciones.

4.4. Influencia de la salinidad sobre la relación bradyrizobio-frijol Caupí en ambiente controlado

4.4.1. Evaluación de las variables relacionadas con la nodulación, fijación simbiótica de nitrógeno, crecimiento y desarrollo de las plantas

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 variables como 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 las dos variedades utilizadas (Tabla 4.8).

Tabla 4.8. 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.

Sin embargo, al realizar un análisis de estos genotipos a partir del índice de tolerancia, se evidenció que la respuesta a la condición estresante no fue igual. Por ejemplo, en IT 86 D-715 existió una afectación menor en dichas variables, debido a que el índice de tolerancia para esta variedad fue siempre significativamente mayor que IITA-Precoz. No obstante, la excepción fue la MFN, en la cual, ambos genotipos manifestaron la misma respuesta (Figura 4.8).

Por otra parte, en las evaluaciones morfológicas realizadas, los nódulos presentaron una coloración rosada, indicador cualitativo de una adecuada fijación simbiótica de nitrógeno, sin embargo, en ambas variedades la actividad de reducción de acetileno total y específica experimentó disminuciones significativas en los dos genotipos (Tabla 4.9).

La misma tendencia ocurrió con la concentración de proteínas en nódulos y hojas, la cual siempre fue menor en presencia de sales (Tabla 4.9). 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 como en la ARA de hojas y nódulos (Figura 4.8).

Tabla 4.9. Influencia de la salinidad sobre la actividad de reducción de acetileno y la concentración de proteínas de hojas y nódulos en dos variedades 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($\pm 1,68$)	54,74($\pm 1,72$)*	36,22($\pm 3,99$)	26,02($\pm 2,55$)*
ARA específica ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1}.\text{MSN}$)	79,18($\pm 5,76$)	70,70($\pm 2,39$)ns	56,60($\pm 2,67$)	36,82($\pm 1,31$)**
Proteínas nódulos (Conc-mg.mL ⁻¹)	3.30(± 0.03)	3,10(± 0.02)**	3.14($\pm 0,01$)	1,36($\pm 0,12$)**
Proteínas hojas (Conc-mg.mL ⁻¹)	3,24($\pm 0,12$)	2,83($\pm 0,05$)*	3,01($\pm 0,03$)	1,99($\pm 0,09$)**

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.

Informes realizados, indican que el estrés salino afecta tempranamente la formación de nódulos y la fijación de nitrógeno al provocar alteraciones morfológicas, fisiológicas y ultraestructurales (Miransari *et al.*, 2006; Borucki y Sujkowska, 2008), otros estudios demuestran que existen leguminosas y cepas rizobianas capaces de establecerse, desarrollarse y lograr tasas de fijación simbióticas importantes, en dependencia del comportamiento de factores 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 (Ballard, 2004).

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 (Rai y Singh, 1999). 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 (Ashraf e Iram, 2005; Tejera *et al.*, 2005; Verdoy *et al.*, 2006; Rubio *et al.*, 2009).

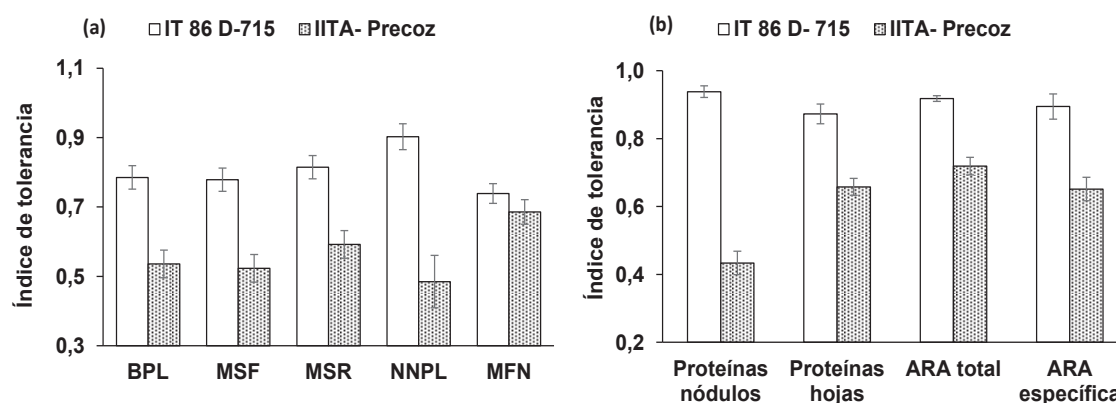


Figura 4.8. Comportamiento del índice de tolerancia de las variables relacionadas con la acumulación de biomasa y nodulación (a), concentración de proteínas y la ARA (b), en las variedades IT 86 D-715 e IITA-Precoz. Barras verticales (I), indican la desviación estándar de la media, al ser aplicada la 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.

Por otra parte, 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 (Chang *et al.*, 2009; Ding y Hynes, 2009; Foyer y Graham, 2009). No obstante, esta respuesta puede variar entre las especies e incluso entre cultivares, por ejemplo, en plantas de *Vigna mungo* tolerantes a la salinidad, la concentración de proteínas aumentó al

incrementarse la concentración de sales, en tanto que en garbanzo estas se redujeron, al tiempo que aumentó la concentración de aminoácidos y prolina (Sharma *et al.* 1990).

4.4.2. Evaluación de la concentración de iones en plantas

La salinidad, provocó un incremento significativo de la concentración de Na^+ y Cl^- en las raíces y hojas de las dos variedades evaluadas, mientras que en el control, estas cantidades decayeron consecuentemente (Figura 4.9 a, b).

Aunque esta respuesta fue evidente, la presencia de estos elementos en los órganos evaluados no fue la misma. En IT 86 D-715, las mayores concentraciones de Na^+ y Cl^- para el tratamiento salino fueron encontradas en las raíces con diferencias significativas en relación a las acumuladas en las hojas (Figura 4.9 a).

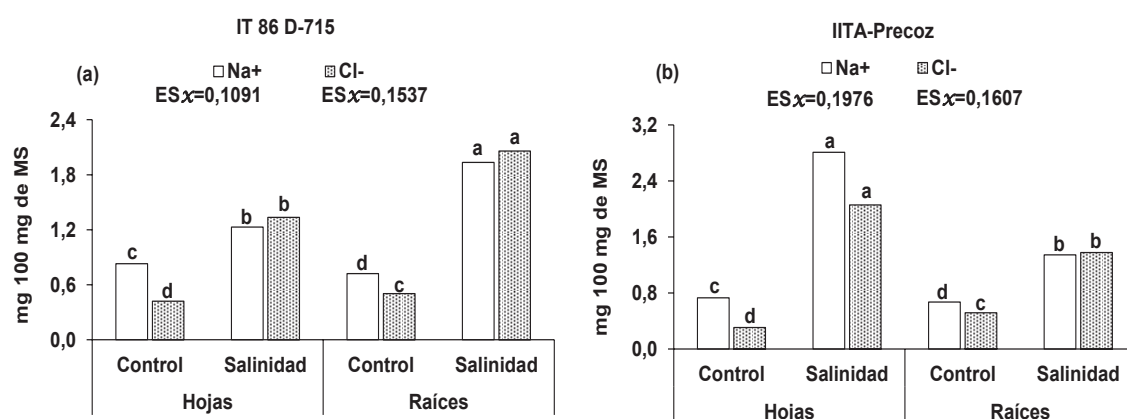


Figura 4.9. Concentración de Na^+ y Cl^- en hojas y raíces de las variedades IT 86 D-715 (a) e IITA-Precoz (b) sometidas a dos niveles de sales, 0 (control) y 150 (Salinidad) mM de NaCl. Barras con letras desiguales difieren significativamente según la prueba de Tukey ($p < 0,05$). MS, materia seca.

Por su parte, la variedad IITA-Precoz se manifestó de manera diferente al registrar un incremento de estos elementos en las hojas, mientras que en las raíces la reducción ocurrió de manera abrupta (Figura 4.9 b).

En el tratamiento control, la presencia de Na^+ fue superior en las hojas, en tanto que el Cl^- mostró su más alto valor en las raíces, característica observada en las dos variedades (Figura 4.9 a, b).

En la variedad IT 86 D-715, las mayores concentraciones de Ca^{2+} y K^+ fueron encontradas en las hojas del tratamiento control, produciéndose reducciones importantes en presencia de sales, aunque estas fueron siempre superiores a las observadas en las raíces, donde su presencia se redujo de manera notable, sobre todo en las plantas sometidas a estrés (Figura 4.10 a).

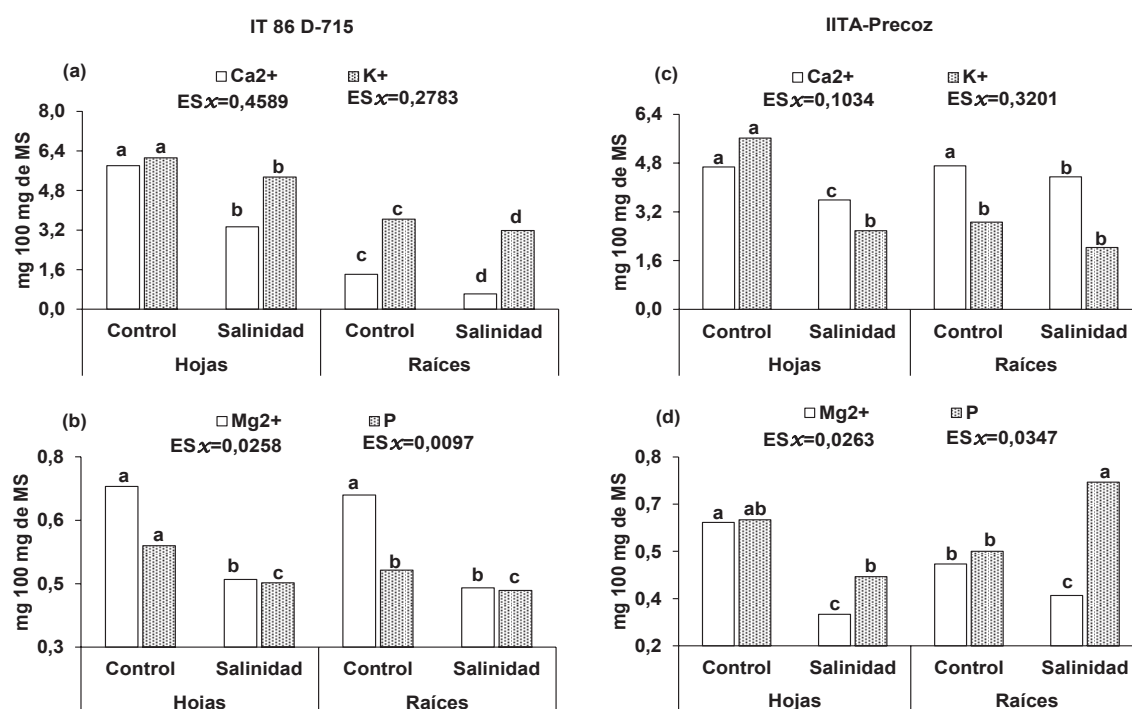


Figura 4.10. Concentración de Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} y P en hojas y raíces de las variedades IT 86 D-715 (a, b) e IITA-Precoz (c, d) sometidas a dos niveles de sales, 0 y 150 mM de NaCl. Barras con letras desiguales difieren significativamente según la prueba de Tukey ($p < 0,05$). MS, materia seca.

El Mg^{2+} , se mostró similar en hojas como en raíces en el tratamiento control y su concentración en presencia de sales se redujo considerablemente, aunque las cantidades registradas en los dos órganos fueron similares (Figura 4.10 b). En condiciones normales, la presencia del P fue mayor en las hojas que en las raíces, mientras que en presencia de sales, en ambos órganos su concentración fue similar (Figura 4.10 b).

En la variedad IITA-Precoz, las manifestaciones en cuanto a la acumulación de iones compatibles fue diferente. La concentración de Ca^{2+} y K^+ , se redujo en presencia de sales tanto en hojas como en raíces con relación a su respectivo control, pero la tendencia en la acumulación de estos elementos en los órganos no fue la misma, al evidenciarse su incremento en las raíces con relación a su presencia en las hojas (Figura 4.10 c).

El Mg^{2+} , se redujo tanto en hojas como en raíces en presencia de sales y las cantidades de este elemento fueron similares en los dos órganos (Figura 4.10 d). Sin embargo, el P en el tratamiento salino se redujo significativamente en las hojas, pero aumentó de manera notable en las raíces con valores superiores a los encontrados en los controles (Figura 4.10 d).

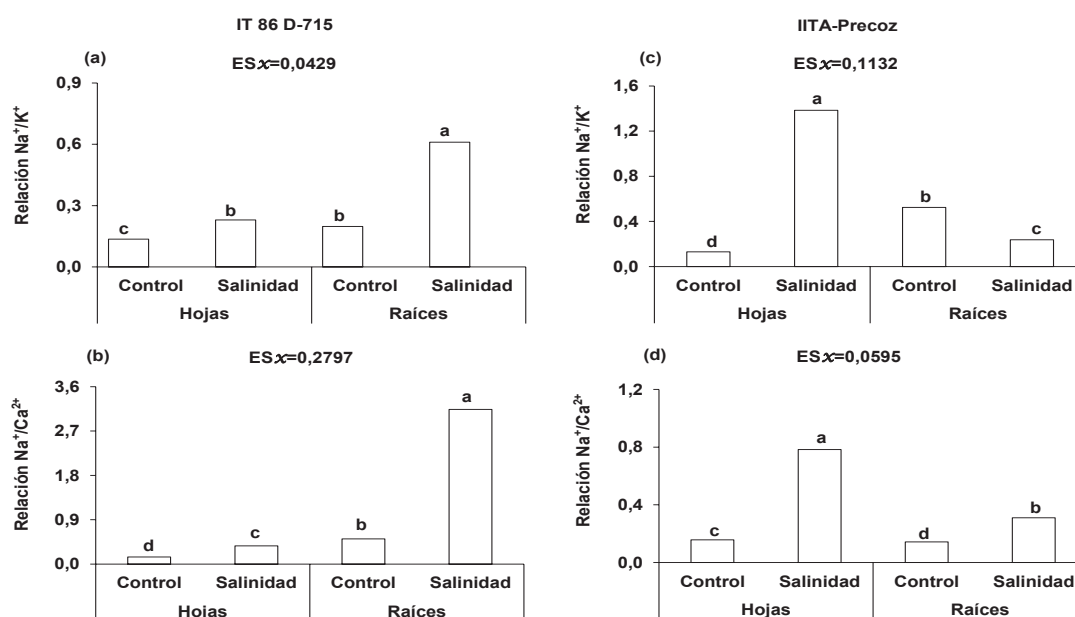


Figura 4.11. Relación Na^+/K^+ y $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en hojas y raíces de las variedades IT 86 D-715 (a, b) e IITA-Precoz (c, d) sometidas a dos niveles de sales, 0 y 150 mM de NaCl. Barras con letras desiguales difieren significativamente según la prueba de Tukey ($p<0,05$).

La relación Na^+/K^+ en hojas y raíces, presentó una respuesta diferente en las dos variedades. En condiciones de estrés, esta relación se incrementó significativamente en las raíces de IT 86 D-715, disminuyendo de forma significativa en las hojas (Figura 4.11 a). La relación

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, presentó un comportamiento similar, encontrándose los valores mayores en las raíces de las plantas tratadas con sal, con diferencias significativas con relación al resto de los tratamientos (Figura 4.11 b).

La variedad IITA-Precoz, presentó una respuesta contraria a IT 86 D-715, debido a que las mayores proporciones de las relaciones Na^+/K^+ y $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, se encontraron en las hojas y no en las raíces, donde ocurrió una disminución importante de las mismas (Figura 4.11 c, d).

De acuerdo con el análisis de los resultados obtenidos, la variedad IT 86 D-715 tiene una tendencia a acumular los iones tóxicos de Na^+ y Cl^- en las raíces (Figura 4.9 a), en tanto que es capaz de suministrar una cantidad superior de cationes compatibles, sobre todo de Ca^{2+} y K^+ en las hojas (Figura 4.10 a), lo cual podría influir en la reducción de los daños provocados por el efecto osmótico y tóxico de los iones de Na^+ y Cl^- .

En IITA-Precoz, este mecanismo no se puso de manifiesto debido a que las mayores concentraciones de Na^+ y Cl^- se encontraron en las hojas (Figura 4.9 b), en detrimento de iones compatibles como el Ca^{2+} y el K^+ (Figura 4.10 c), capaces de contrarrestar el efecto osmótico y tóxico, cuestión que proporciona que las plantas desarrolladas en condiciones de estrés salino, sean vulnerables a los daños característicos provocados por las sales a nivel celular.

Los resultados obtenidos en esta investigación, apuntan a que uno de los mecanismos que utilizan estas variedades, sobre todo la IT 86 D-715 (tolerante), es la retraslocación de los iones tóxicos de Na^+ y Cl^- de las hojas hacia las raíces o, su compartimentación en estas últimas, lo que evita su ingreso a la parte foliar de la planta, por cuanto, su concentración en las raíces se incrementa, a diferencia de su disminución en las hojas. Mientras que en la variedad IITA-Precoz (susceptible), este mecanismo no estuvo presente, evidenciándose las mayores concentraciones de Na^+ y Cl^- en las hojas de las plantas.

Informes similares han sido realizados por algunos autores, quienes coinciden en 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 (Costa *et al.*, 2003; Cavalcanti *et al.*, 2007; Shabala y Cuin, 2008). 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 (Ibragimova *et al.*, 2006; Hussain *et al.*, 2010).

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^{+} (Manchanda y Garg, 2008), el incremento de la concentración de Ca^{2+} en la célula, mejora la acumulación selectiva del K^{+} intracelular e incrementa la relación $\text{K}^{+}/\text{Na}^{+}$ y a su vez incrementa los niveles de tolerancia (Hussain *et al.*, 2010), lo cual es evidente 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^{+} (Knight, 2000; Tracy *et al.*, 2008).

Sin embargo, los resultados obtenidos por Shabala y Cuin (2008) difieren al respecto, debido a que en las variedades de Caupí tolerantes que utilizaron, no se encontraron incrementos en las concentraciones de K^{+} en los tejidos, por lo cual este elemento no fue asociado con la tolerancia a la salinidad.

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 (Márquez *et al.*, 2005; Larrainzar *et al.*, 2009; Coba de la Peña y Pueyo, 2012).

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^+ (Niu *et al.*, 2005; Fernández-Pascual *et al.*, 2007; Zhu, 2007; Hussain *et al.*, 2010).

Las características de la variedad IT 86 D-715, de acumular mayores cantidades de iones compatibles en las hojas y a su vez evitar la concentración de los tóxicos, pudo haber tenido una influencia positiva en los resultados obtenidos en las variables biomasa de las plantas, masa seca foliar y de las raíces, la formación de nódulos radicales y su masa seca, así como la acumulación de proteínas y la ARA, cuyos índices de tolerancia se incrementaron.

A pesar de que en la variedad IITA-Precoz se registró la mayor concentración de elementos tóxicos y la disminución de iones compatibles en las hojas, el incremento de la concentración de fósforo en las raíces en presencia de sales, pudo haber tenido una influencia marcada en que variables como ARA total y específica no se deprimieran completamente y registraran valores, aunque mucho más discretos que IT 86 D-715.

Esta hipótesis, está sustentada sobre la base del importante papel que juega el fósforo en el proceso de fijación simbiótica del nitrógeno, al formar parte de la energía en forma de ATP que se necesita para convertir cada molécula de N_2 en amoníaco (NH_3), y por otro lado, al influir de manera positiva en el mejoramiento de variables relacionadas con la fijación simbiótica, como es el caso del número, tamaño y masa de los nódulos, cuando existen niveles adecuados del elemento a nivel celular en raíces y nódulos (Sungthongwises *et al.*, 2011; Hassen *et al.*, 2014; Niste *et al.*, 2014).

4.4.3. Influencia de la salinidad sobre la ultraestructura de hojas y nódulos de plantas de Caupí inoculadas

4.4.3.1. Efecto de la salinidad sobre la ultraestructura de las hojas

Al analizar las microfotografías de los cloroplastos de las hojas del cultivar IT 86 D-715 en el tratamiento control (Figura 4.12), se pueden observar una gran cantidad de tilacoides situados a lo largo del eje mayor del cloroplasto, los cuales se unen y forman numerosos granos en forma de sacos globosos y alargados. Se observan además, uno o dos gránulos de almidón de tamaño normal y grandes mitocondrias en los extremos.

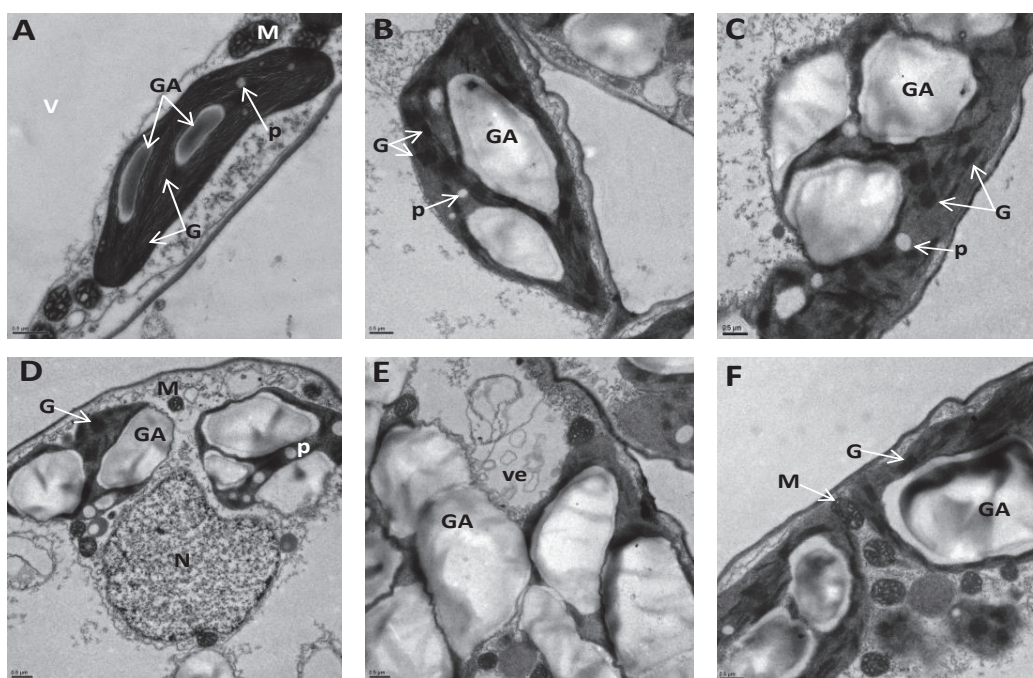


Figura 4.12. Ultraestructura de hojas de frijol Caupí, Variedad IT 86 D-715. Microfotografía obtenida a partir de microscopía electrónica de transmisión. GA, gránulos de almidón; G, grana; M, mitocondrias; N, núcleo; p, plastoglóbulos; V, vacuola; Ve, vesículas. Tratamiento control (A); aplicación de 150 mM de NaCl durante 45 días (B-F). Barras: 0,5 μ M.

En los cloroplastos de las hojas tratadas con NaCl, el tamaño de los gránulos de almidón aumentó considerablemente y provocó modificaciones en la distribución normal de los granos (Figura 4.12 B-F), los cuales, en vez de situarse a lo largo del eje mayor del cloroplasto, se relegaron a sus bordes (Figura 4.12 C y D). Como consecuencia de la gran

acumulación de almidón, en algunas células es muy difícil distinguir los elementos estructurales del cloroplasto, e incluso se produce el rompimiento de su membrana (Figura 4.12 E). Por su parte, las mitocondrias no sufrieron alteraciones estructurales con el tratamiento salino (Figura 4.12 D, F).

En el tratamiento control de la variedad IITA-Precoz (Figura 4.13 A), de igual forma, la distribución de los granos se realizó a lo largo del eje mayor del cloroplasto y tanto las cantidades, como el tamaño de los gránulos de almidón aparecieron de forma normal.

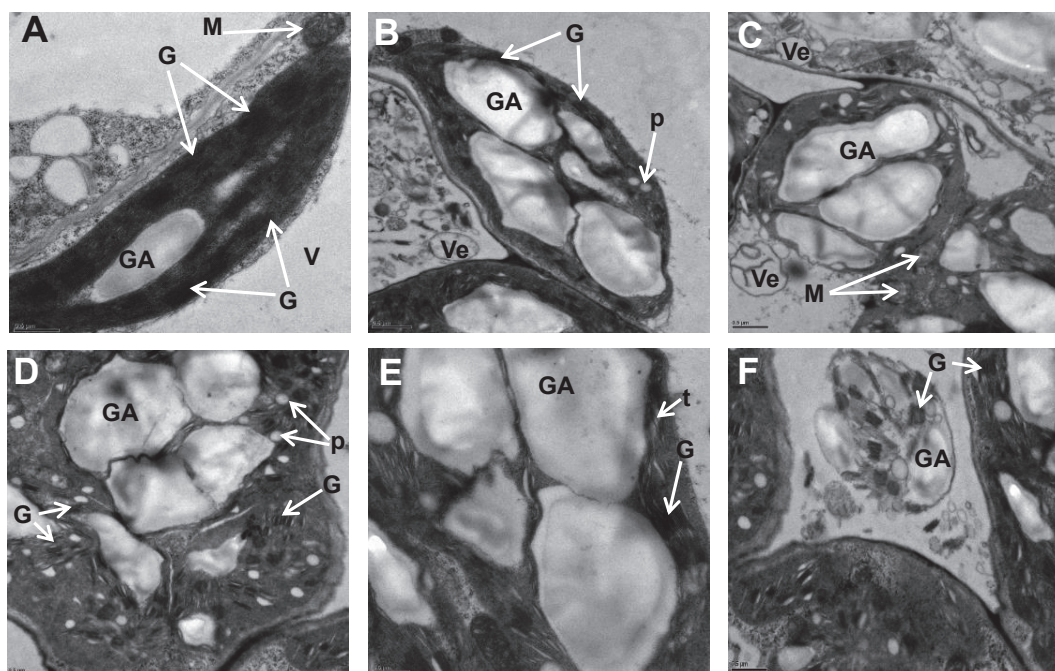


Figura 4.13. Ultraestructura de hojas de frijol Caupí, Var. IITA-Precoz. Microfotografía obtenida a partir de microscopía electrónica de transmisión. GA, gránulos de almidón; G, grana; M, mitocondria; p, plastoglobulo; t, tilacoide; V, vacuola; Ve, vesícula. Tratamiento control (A); aplicación de 150 mM de NaCl durante 45 días (B-F). Barras: 0,5 μ M.

La desorganización de la estructura del cloroplasto fue máxima, cuando el incremento de los gránulos de almidón provocó la ruptura de su membrana (Figura 4.13 F), sin embargo, aun así permanecieron algunas agrupaciones de tilacoides.

El análisis de las microfotografías, muestra alteraciones sobre todo en el incremento del número de gránulos de almidón así como la cantidad almacenada en los cloroplastos. Esta manifestación, fue características de las dos variedades evaluadas cuando fueron sometidas a estrés por sales por un periodo de 45 días, lo que provocó modificaciones en las estructuras e incluso el rompimiento de las membranas de sus cloroplastos.

Este comportamiento, indica que en el momento en que fueron tomadas las muestras y realizadas las evaluaciones, algunas funciones fisiológicas ya habían comenzado a deteriorarse, en este caso fueron evidentes alteraciones en el metabolismo del almidón, específicamente en su hidrólisis. De esta forma, el incremento desproporcionado de los gránulos de almidón en esta investigación, parece estar más relacionado con el inicio de daños provocados por el estrés salino a nivel celular, que con el efecto beneficioso que tiene el almidón como polisacárido de reserva.

Sin embargo, todo parece indicar que este fenómeno es reciente, debido a las características del metabolismo del almidón en las plantas, el cual es sintetizado durante el día y luego degradado en la noche (Bernal y Martínez, 2006).

De esta forma, las plantas de Caupí crecidas en ambiente salino fueron capaces de sintetizar y degradar el almidón para utilizar sus productos de hidrólisis, probablemente en contrarrestar el efecto osmótico y/o tóxico provocado por las sales a nivel celular. Pero esta conducta, se mantuvo solo hasta el momento en que se comenzaron a manifestar los problemas con su hidrólisis, lo que se manifestó con la sobreacumulación del carbohidrato y los desórdenes estructurales, que como consecuencia se produjeron en los cloroplastos.

Cómo ya ha sido expresado, la síntesis y degradación del almidón ocurre en un ciclo muy cerrado (día-noche), sin embargo, para que se produzca la degradación, tienen que ser activadas por las plantas enzimas hidrolíticas e isoformas de las mismas como son las α - y β -amilasas, enzimas desramificadoras, almidón fosforilasa, glucosidasas y enzimas

desproporcionadoras (Asatsuma *et al.*, 2005; Bernal y Martínez, 2006), e incluso, antes de que ocurra la hidrólisis, el polisacárido tiene que haber sido fosforilado dos veces por la glucano-agua dikinasa, en dos reacciones que requieren ATP para producirse (Tofiño *et al.*, 2007). Sin embargo, es muy probable que la carencia de agua que se comienza a producir a partir del incremento en la concentración de los iones salinos, provoque la inactivación de estas enzimas y por tanto, anule su degradación (Weise *et al.*, 2006; Tofiño *et al.*, 2007).

La acumulación de almidón en las hojas de plantas sometidas a estrés salino, varía entre las especies vegetales y el grado de tolerancia que estas presentan. Investigaciones realizadas en *Lupinus*, indican la reducción de los gránulos de almidón en las hojas por el efecto negativo de la salinidad (Fernández-Pascual *et al.*, 1996).

En otras especies como *Medicago truncatula* (osmo-susceptible) y *Lotus japonicus* (osmo-tolerante), las manifestaciones son diferentes, mientras que en la primera los niveles de almidón disminuyen tanto en nódulos como en hojas por el efecto dañino de la sal, en *Lotus japonicus* se incrementan, triplicándose su contenido a partir de los 14 días, a medida que se eleva la concentración salina (López, 2007).

Es importante resaltar, que las plantas de esta experiencia no fueron afectadas de manera visible y significativa por la salinidad en la mayoría de las variables evaluadas, al menos hasta los 45 días, momento en que fueron recolectadas las muestras.

4.4.3.2. Influencia de la salinidad sobre la ultraestructura de los nódulos

En la variedad IT 86 D-715 (Figura 4.14 A), en las células infectadas del tratamiento control, se observa una gran cantidad de bacteroides con sus membranas peribacteroidales bien definidas.

En la zona infectada de los nódulos de la variedad IITA-Precoz, se observan dos tipos de células, las infectadas y las no infectadas o intersticiales (Figura 4.15 A). En estas células, existen plastidios y peroxisomas. Las células infectadas, están llenas de bacteroides

rodeados de la membrana peribacteroidal, los cuales contienen varios gránulos de poli- β -hidroxibutirato (Figura 4.15 A).

La diferencia más significativa que existe entre las células infectadas de los nódulos tratados con sal, con relación a los no tratados, es la disminución de los granos de poli- β -hidroxibutirato y un ligero debilitamiento de la membrana peribacteroidal en algunos de los bacteroides (Figura 4.15 B).

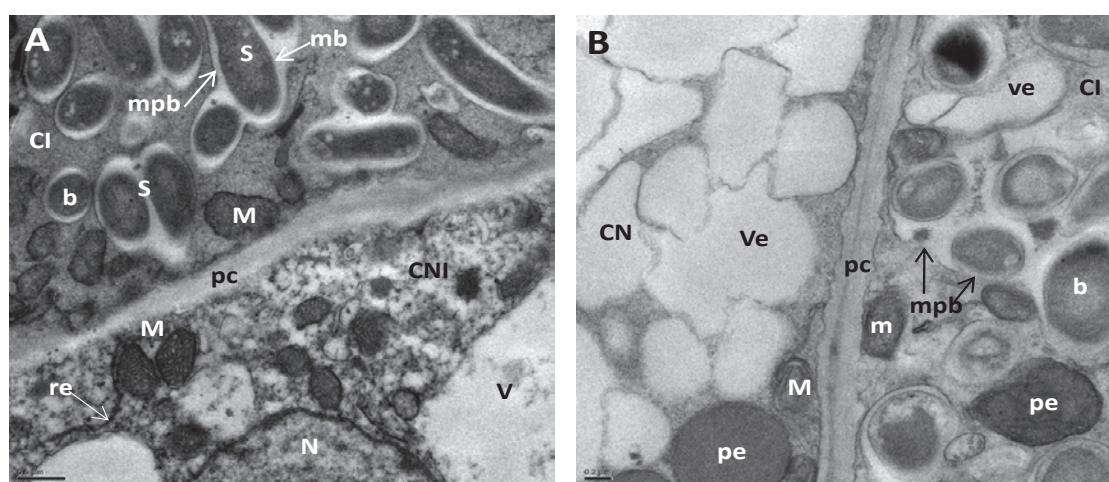


Figura 4.14. Ultraestructura de nódulos de frijol Caupí, Var. IT 86 D-715. Microfotografía obtenida a partir de microscopía electrónica de transmisión. b, bacteroide; CI, célula infectada; CNI, célula no infectada; M, mitocondria; mb, membrana bacteroidal; mpb, membrana peribacteroidal; N, núcleo; pc, pared celular; pe, peroxisoma; re, retículo endoplasmático; S, simbiosoma; V, vacuola; Ve, vesícula. Tratamiento control (A); aplicación de 150 mM de NaCl durante 45 días (B). Barras: 0,5 μ m.

Dos de las principales diferencias encontradas entre los dos genotipos utilizados, es que en IT 86 D-715 (Figura 4.14 A) no aparecen gránulos de poli- β -hidroxibutirato, mientras que en IITA-Precoz si están presentes en el tratamiento control (Figura 4.15 A). En presencia de estrés por sales, lo más distintivo es la formación de vesículas en la célula no infectada de IT 86 D-715 (Figura 4.14 B), que no fueron observadas en la variedad IITA-Precoz (Figura 4.15 B).

Es evidente que la salinidad, no ejerció un efecto negativo severo sobre la estructura del nódulo en ninguna de las dos variedades, manifestándose solamente ligeras variaciones con

relación a la disminución de los granos de poli- β -hidroxibutirato en IITA-Precoz (Figura 4.15 B) y el debilitamiento de la membrana peribacteroidal en algunos de los bacteroides, sobre todo de la variedad IT 86 D-715 (Figura 4.14 B), sin embargo, tanto en el tratamiento control como el salino de ambas variedades, las células infectadas mostraron una gran cantidad de bacteroides.

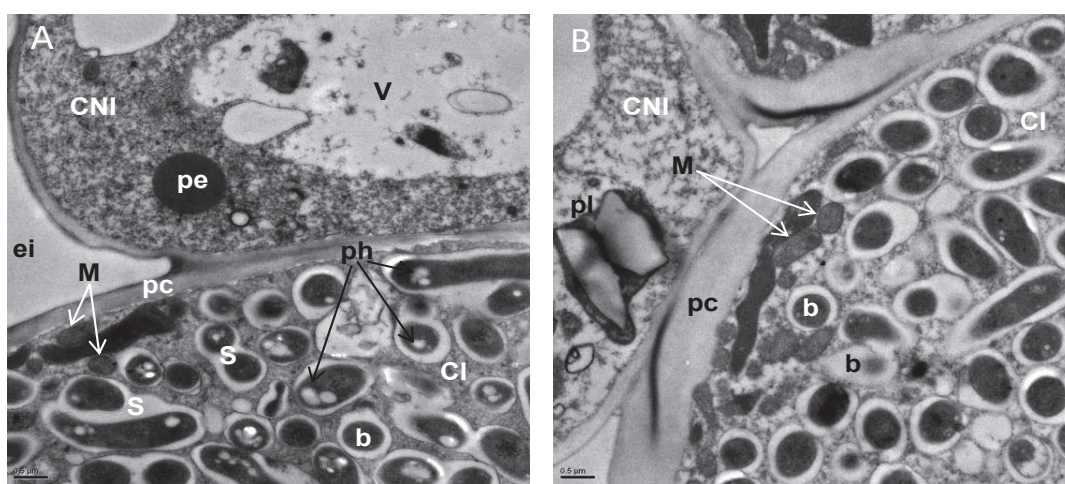


Figura 4.15. Ultraestructura de nódulos de frijol Caupí, Var. IITA-Precoz. Microfotografía obtenida a partir de microscopía electrónica de transmisión. b, bacteroide; CI, célula infectada; CNI, célula no infectada; ei, espacio intercelular; M, mitocondria; pc, pared celular; pe, peroxisoma; ph, polihidroxibutirato; pl, plastidio; S, simbiosoma. Tratamiento control (A); aplicación de 150 mM de NaCl durante 45 días (B). Barras: 0,5 μ M.

En diversos estudios se señala, que el estrés salino induce alteraciones morfológicas y ultraestructurales en los nódulos, incluyendo la desintegración del citoplasma y la pérdida de la rigidez de la pared celular, disminución en el empaquetamiento de las células dentro de la corteza interna, disminución de los espacios intercelulares y el aumento de la superficie de la membrana de la epidermis y de la corteza, debido al incremento del número de vesículas, entre otras afecciones (Coba de la Peña *et al.*, 2003; Borucki y Sujkowska, 2008).

No obstante a ello, en el nódulo 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 (Verdoy *et al.*, 2006; Larrainzar *et al.*, 2009), la exclusión de los iones de Na^+ de la zona infectada, utilizando como barrera la corteza (Fernández-Pascual *et al.*, 2007), y recientemente fue encontrado y 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 (Tang *et al.*, 2010).

De esta manera, la respuesta de los Cultivares de frijol Caupí utilizados en esta experiencia ante condiciones de estrés por sales, obedece a la combinación entre: la tolerancia de la planta; la cual está estrechamente ligada a la capacidad de exclusión o retraslocación del Na^+ y el Cl^- hacia las raíces y la acumulación de iones compatibles en las hojas como el K^+ y el Ca^{2+} , y por otro lado, a la capacidad de adaptación de la cepa de *Bradyrhizobium* utilizada, la mejora de la interacción *Bradyrhizobium*-frijol Caupí y la no ocurrencia de grandes cambios en las estructuras y funciones del nódulo bajo estas condiciones.

Una vez obtenidas algunas de las respuestas de las plantas y la interacción planta-microorganismo al estrés por sales en condiciones controladas, se hizo necesario evaluar la respuesta de esta interacción en condiciones de campo, en un suelo afectado por sales, donde numerosos factores abióticos y bióticos interactuaron con el cultivo y las cepas de *Bradyrhizobium* aisladas.

4.5. Respuesta del frijol Caupí a la inoculación con cepas nativas de *Bradyrhizobium* en un suelo afectado por sales.

Las cepas utilizadas para este experimento fueron VIBA-1 y VIBA-2, las cuales presentaron las mejores respuestas a las condiciones de estrés por sales en medio de cultivo líquido LM (Acápite 4.3.2.1), además de representar las dos especies de rizobios encontradas, *B. liaoningense* y *B. yuanmingense* respectivamente (Acápite 4.3.3). Mientras

que la variedad de frijol Caupí utilizada por sus características de tolerancia a la salinidad, fue la IT 86 D-715 (Acápita 4.2).

El suelo donde se estableció el experimento, al presentar una alta concentración de sales solubles totales que sobrepasa las 3 552 ppm y C.E de 5,55 dS.m⁻¹, se considera un suelo fuertemente salinizado por el nivel de afectación que ejercen las sales solubles a la mayoría de las especies glicófitas (Munns y Tester, 2008). La salinidad de este suelo se debe fundamentalmente, a la acumulación de sales provenientes de zonas altas de la llanura sureste de la subcuenca del río Cautillo. Las cotas hacia esa dirección son más altas, caracterizadas por terrenos situados en climas más secos y suelos salinizados, el empleo de agua de riego de mala calidad, unido a un relieve llano a depresional, han provocado un drenaje deficiente, con la consiguiente sobreacumulación de sales solubles.

4.5.1. Evaluación de la nodulación

La presencia de nódulos en plantas de la variedad IT 86 D-715, fue observada en todos los tratamientos, incluido el control, lo que indica la existencia de cepas nativas en estos suelos. El mayor número de nódulos, se produjo cuando fue utilizada la cepa VIBA-1, tanto en la raíz principal como en las secundarias, así como su masa seca (Tabla 4.10).

Tabla 4.10. Número, masa seca y distribución de nódulos en las raíces de la variedad de frijol Caupí, IT 86 D-715.

Tratamientos	NNPL	NNRP	NNRS	MSN (mg.planta)
VIBA-1	22,47 ^a	5,97 ^a	16,5 ^a	301,67 ^a
VIBA-2	13,57 ^b	4,66 ^b	8,91 ^b	296,00 ^a
150 kg.ha⁻¹ N	6,23 ^c	2,53 ^c	3,7 ^c	80,00 ^c
Control	9,16 ^c	3,34 ^c	5,82 ^c	218,00 ^b
ESx	1,88	0,41	1,48	26,97

Nota: Letras diferentes en las columnas difieren significativamente según la prueba de Tukey (P≤0,05). NNPL, número de nódulos por planta; NNRP, número de nódulos en la raíz principal; NNRS, número de nódulos en las raíces secundarias; MSN, masa seca de los nódulos.

Aunque la cepa VIBA-1, por lo general presentó mejores resultados que la cepa VIBA-2, esta última superó siempre al control absoluto de manera significativa en el número de nódulos y su masa seca, así como su presencia en la raíz principal. Por otra parte, se encontró una nodulación menor en el tratamiento con fertilización nitrogenada (Tabla 4.10).

La inhibición de la formación de nódulos en presencia de fertilización nitrogenada, ha sido informada con anterioridad (Manchanda y Garg, 2008) y aunque no se conoce el mecanismo específico por el cual los nitratos ejercen su efecto perjudicial sobre la nodulación, los resultados indican que estos reprimen la expresión de los genes *nod* en las bacterias, he impiden el reconocimiento específico entre la bacteria y la planta. De igual forma, existe evidencia de la reducción en la síntesis de lectina, lo que provoca la disminución de la habilidad de anclaje de las bacterias a las raíces, con una formación menor de pelos radicales, por lo que la superficie radicular expuesta disminuye, además del aborto de los hilos de infección (Racca *et al.*, 1990).

En todos los tratamientos, hubo mayor presencia de nódulos en las raíces secundarias que en la raíz principal, lo que puede ser debido al retraso inicial de la infección de las bacterias a las raíces provocado por el alto contenido de sales en el suelo.

Estudios realizados por Manchanda y Garg (2008), sugieren que bajo condiciones de estrés por sales, se produce un retraso significativo de la infección de las bacterias a las raíces de las leguminosas, lo cual disminuye el número de nódulos y su masa seca. Sin embargo, parece ser que algunas especies de leguminosas tienen la capacidad de reponerse a este primer efecto negativo de las sales, en lo que respecta a la infección y nodulación de las raíces.

Según Zahran (1999), *Vicia faba*, entre otras leguminosas, presentan dos periodos de infección en condiciones de estrés por sales, el primero durante el proceso de germinación

de la semilla considerado como temprano y el segundo momento durante el desarrollo nombrado tardío, debido a lo cual, las plantas presentan una mayor tolerancia a las condiciones de salinidad y desarrollan una mejor fijación simbiótica de nitrógeno.

Al parecer, el frijol Caupí (IT 86 D-715) en condiciones de estrés por sales, presenta la capacidad de extender el periodo de reconocimiento e infección de los rizobios mucho tiempo después de haberse culminado el proceso germinativo, lapso en el que los pelos radiculares comienzan a aparecer en mayor proporción en las raíces secundarias.

4.5.2. Biomasa foliar y concentración de iones

Aunque el máximo desarrollo de la masa seca foliar se alcanzó con la fertilización mineral, la inoculación con cepas nativas de *Bradyrhizobium* (VIBA-1 y VIBA-2), incrementó de manera similar y significativa esta variable, al compararse con el control sin fertilizante y si inocular (Figura 4.16 a).

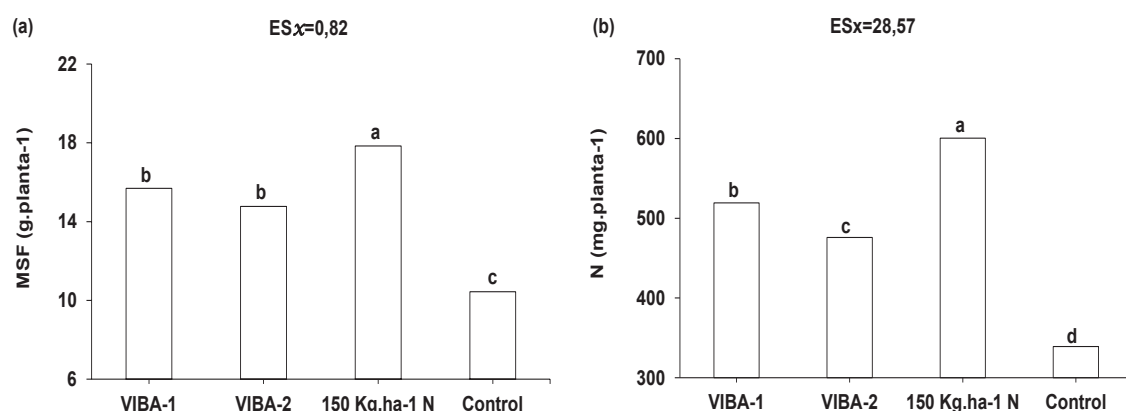


Figura 4.16. Efecto de la inoculación con cepas nativas de *Bradyrhizobium*, sobre la masa seca y el contenido de nitrógeno foliar del frijol Caupí, desarrollado en un suelo afectado por sales. Barras con letras desiguales difieren significativamente según la prueba de Tukey ($p < 0,05$). MSF, masa seca foliar; N, nitrógeno.

Con relación a la acumulación de nitrógeno foliar, existieron diferencias importantes entre las cepas usadas. La mayor influencia fue ejercida por VIBA-1, con resultados superiores a VIBA-2 y a su vez, ambas fueron significativamente superiores al control, donde los resultados decayeron notoriamente (Figura 4.16 b). Aun cuando el uso de las cepas, ejerció

una influencia positiva sobre las variables MSF y contenido de N, los mayores valores se obtuvieron con la fertilización nitrogenada (Figura 4.16 a, b).

La concentración de los iones K^+ y Ca^{2+} , se incrementó de manera significativa cuando fue utilizada la inoculación, al compararse con el resto de los tratamientos. Entre las dos cepas no existieron diferencias para Ca^{2+} y K^+ , pero si para P, el cual incrementó su concentración foliar al utilizar VIBA-1.

La concentración de los iones Mg^{2+} y Na^+ , fue similar en todos los tratamientos, al igual que la relación Na^+/K^+ . Sin embargo, en la relación Na^+/Ca^{2+} los mayores valores se encontraron con la fertilización nitrogenada y el control, mientras que con la inoculación de las cepas, estos valores disminuyeron de manera significativa (Tabla 4.11).

Tabla 4.11. Efecto de la inoculación con cepas nativas de *Bradyrhizobium*, sobre la concentración de nutrientes en la masa seca foliar del frijol Caupí.

Tratamiento	mg.g ⁻¹ de materia seca						
	K ⁺	Ca ²⁺	P	Mg ²⁺	Na ⁺	Na ⁺ /K ⁺	Na ⁺ /Ca ²⁺
VIBA-1	25,03ab	34,19a	3,47a	5,08	3,34	0,13	0,09b
VIBA-2	27,36a	36,04a	3,30b	6,31	3,07	0,11	0,08b
150 kg.ha ⁻¹ N	24,45b	26,77b	3,38ab	5,82	3,28	0,14	0,13a
Control	22,45b	27,49b	3,29b	5,37	2,79	0,12	0,10ab
ESx	0,59	1,28	0,026	0,20 ^{NS}	0,12 ^{NS}	0,004 ^{NS}	0,005

Nota: Letras diferentes en las columnas difieren significativamente según la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$).

En términos generales, estos resultados sugieren que las plantas presentaron una mayor afinidad a la acumulación de los iones Ca^{2+} y K^+ en la masa foliar, que el ion Na^+ . Este resultado demuestra la existencia de algún mecanismo que evita la acumulación excesiva de los iones tóxicos en las hojas de las plantas, como es el caso de la retraslocación hacia las raíces o su compartimentación en las vacuolas de las mismas, evitando así el efecto perjudicial de las sales.

Una tendencia similar, fue encontrada en las evaluaciones realizadas en el experimento en ambiente controlado en esta misma variedad (Acápite 4.4.2), donde las mayores concentraciones de Na^+ y Cl^- se localizaron en las raíces, mientras que la de los iones compatibles Ca^{2+} y K^+ fueron encontradas en las hojas.

Otra posible explicación de la mayor presencia de Ca^{2+} en la MSF al utilizarse la inoculación, es que la concentración de K^+ también se incrementó, lo que pudo haber provocado que los niveles de Na^+ descendieran.

Este fenómeno también fue descrito en el Acápite 4.4.2, donde el uso de la inoculación, sobre todo en la variedad tolerante (IT 86 D-715), provocó que las concentraciones de K^+ y Ca^{2+} se incrementaran en la MSF de las plantas, disminuyendo así las de Na^+ , mientras que en las raíces ocurrió lo contrario, acumulándose en este órgano gran cantidad del Na^+ total.

Tabla 4.12. Efecto de la inoculación con cepas nativas de *Bradyrhizobium* en variables relacionadas con la fijación simbiótica de nitrógeno.

Cepas	FEN	IEI
VIBA-1	1,72 ^a	42,17 ^a
VIBA-2	1,61 ^b	33,26 ^b
Control	1,55 ^c	-
ESx	0,025	2,12

Nota: Letras diferentes en las columnas, difieren significativamente según la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$). FEN, fijación específica de nitrógeno (mg N masa foliar.mg masa seca de nódulos⁻¹); IEI, índice de efectividad de la inoculación (%).

La FEN, fue significativamente mayor siempre que fueron inoculadas las cepas, lo cual indica que con independencia de su masa seca, los nódulos formados en estos tratamientos contribuyeron con mayores cantidades de nitrógeno a la MSF, que a su vez, se traduce en una mejor fijación simbiótica de nitrógeno, si este proceso es evaluado cualitativamente (Tabla 4.12).

Algunos autores, coinciden en que una alta absorción y concentración de K^+ y Ca^{2+} en las hojas, unido a una baja relación Na^+/K^+ , son características de plantas que toleran la salinidad en suelos que presentan esta problemática (Wenxue *et al.*, 2003; Bano y Fatima, 2009). De igual forma, Unno *et al.* (2002) y Giri y Mukerji (2004), enfatizaron que la persistencia en la toma y transporte del Ca^{2+} en condiciones de salinidad, facilita a nivel celular una alta selectividad del K^+ con respecto al Na^+ , razón por la cual disminuye la concentración de este.

La tendencia que existió en el incremento de las concentraciones de fósforo foliares cuando se utilizó la inoculación, sobre todo de VIBA-1, pudo haber influido en los resultados obtenidos en las variables, NNPL y MSN, así como la acumulación de nitrógeno foliar y la fijación específica de nitrógeno, las cuales se incrementaron de manera significativa. Esta manifestación fue encontrada también en las especies *Glycine max L.* y *Vigna radiata*, donde el déficit de fósforo limitó de manera significativa la nodulación, fijación de nitrógeno y el rendimiento de estos cultivos (Ali *et al.*, 2010; Hassen *et al.*, 2014; Hussain *et al.*, 2012).

Las estrechas relaciones de dependencia entre las variables de la nodulación y fijación simbiótica de nitrógeno, con la producción de biomasa foliar y el rendimiento del grano, han sido referidas por algunos autores. Sin embargo, bajo condiciones de estrés por sales, la mayoría de estas son afectadas por el efecto osmótico y/o tóxico, sobre todo, las relacionadas con la formación de nódulos y el proceso de fijación de dinitrógeno atmosférico, entre otras razones, porque por lo general también ocurren alteraciones fisiológicas en las plantas (Okogun *et al.*, 2004).

No obstante, algunos estudios indican que en los nódulos también se crean mecanismos para excluir los iones salinos de la parte central del nódulo y así evitar reducciones perjudiciales en el contenido de leghemoglobina, proteínas totales y actividades de algunas

enzimas como las catalasas, peroxidases y superóxido dismutasa, así como el aumento de las concentraciones de sacarosa, como ocurre en los nódulos de *Lupinus* blanco (Fernández-Pascual, 1996).

4.5.3. Respuesta del rendimiento y sus componentes

La inoculación con las cepas VIBA-1 y VIBA-2, permitió mejorar las variables del rendimiento y sus componentes, con relación al control sin inoculo y sin fertilizante, aunque los mejores valores en estas variables se obtuvieron con la aplicación de 150 kg.ha⁻¹ de N (Tabla 4.13).

Tabla 4.13. Efecto de la inoculación con cepas nativas de *Bradyrhizobium*, sobre el rendimiento y sus componentes.

Tratamientos	V	G	PS	R	IEIR (%)
VIBA-1	16,63b	47,17a	9,29ab	1,13b	48,91a
VIBA-2	16,46b	46,81a	8,6b	1,01c	29,23b
150 kg.ha ⁻¹ N	17,05a	49,05a	9,79a	1,20a	-
Control	16,06c	41,39b	7,15c	0,73d	-
ESx	0,11	0,91	0,31	0,05	4,45

Nota: Letras diferentes en las columnas difieren significativamente según la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$). V, número de vainas por planta; G, número de granos por planta; PS, peso de 100 semillas (g); R, rendimiento (t.ha⁻¹); IEIR, índice de efectividad de la inoculación para el rendimiento.

Para el número de vainas y el rendimiento, ambas cepas manifestaron la segunda mejor respuesta al ser comparadas con el control, el cual presentó en todos los casos los menores valores. En este sentido, el uso de VIBA-1 y VIBA-2, incrementó el rendimiento del grano en 48,91 y 29,23 % respectivamente, con relación a cuando no se inoculó, lo cual demuestra la factibilidad de esta práctica desde el punto de vista agronómico, para las condiciones edafoclimáticas en las que se desarrolló el experimento.

De forma general, los resultados muestran que la utilización de cepas nativas de *Bradyrhizobium* obtenidas de suelos afectados por sales, puede mejorar variables

relacionadas con la nodulación, fijación simbiótica de nitrógeno y el rendimiento del cultivo, resultados que son novedosos para estas condiciones específicas, debido a que no existen informes sobre trabajos realizados anteriormente en este cultivo.

Uno de los más significativos fue realizado por López (2001), el cual refiere la conveniencia de la selección e inoculación con cepas de rizobios nativas aisladas de suelos salinizados, para mejorar el rendimiento en materia seca de especies pratenses. Este señala además, que la clasificación no debe estar dirigida solo a las especies rizobianas, sino también a las variedades de plantas capaces de tolerar condiciones de salinidad en el suelo, para lograr una buena interacción planta-microorganismo.

En otros cultivos de granos como *Pisum sativum*, Figueira y Caldeira (2005), informaron la posibilidad de establecer una simbiosis efectiva bajo condiciones de salinidad al utilizar cepas de rizobios tolerantes y con buena capacidad de fijación de nitrógeno. Sin embargo, en los estudios realizados por Tejera *et al.* (2004) los resultados fueron diferentes, al reducirse la actividad de la enzima nitrogenasa en *Phaseolus vulgaris*, cuando esta fue inoculada con cepas nativas, mientras que con el uso de una cepa mutante, la misma se incrementó.

Estos resultados indican, que la búsqueda de nuevas cepas autóctonas en los suelos salinizados pudiera contribuir a aumentar la diversidad de especies disponibles para la fabricación de inóculos, que permitan realizar un mejor manejo y optimización de la fijación simbiótica, dirigido a aumentar la producción de granos en el cultivo del frijol Caupí.

El aislamiento de cepas rizobianas y de cultivares tolerantes a condiciones de estrés por sales, ha constituido un objetivo importante para muchos investigadores, sobre todo, por ser una alternativa para la reforestación y recuperación de áreas productivas con leguminosas,

sin embargo, la búsqueda de la diversidad genética en las especies rizobianas es un complemento relevante para lograr estos objetivos (Ruiz-Díez *et al.*, 2009).

De acuerdo con esta premisa, es evidente la necesidad de lograr un mayor número de aislamientos y el aumento de la diversidad genética de los mismos en las zonas donde se desarrollaron estas investigaciones, para asegurar la diversidad y la existencia de bacterias con mayor capacidad de infección y efectividad en la fijación del nitrógeno para las condiciones de suelos salinos donde se desarrolló la experiencia.

No obstante a esto, los resultados obtenidos en este experimento son complemento de los obtenidos en los desarrollados anteriormente en esta investigación, en los cuales se demostró que a partir de una adecuada selección de variedades, así como de rizobios nativos con características de tolerancia a las condiciones salinas, es posible mejorar variables relacionadas con la nodulación y fijación simbiótica de nitrógeno y a su vez, incrementar el rendimiento del cultivo.

4.5.4. Valoración económica de los resultados

Para realizar el análisis económico, se tuvieron en cuenta las condiciones y resultados del experimento 5, descritos en los Acápites 3.2.5 y 4.5 respectivamente.

Aunque el costo de producción al utilizar la biofertilización se incrementó ligeramente con relación al control debido al precio del inoculante utilizado, el aumento del rendimiento al ser usadas VIBA-1 y VIBA-2, propició que los indicadores económicos-productivos como el valor de la producción, la ganancia y el beneficio económico se incrementaran (Tabla 4.14).

La cepa que mejor respuesta presentó en estos atributos fue VIBA-1, en la cual crecieron las ganancias, aumentó el beneficio económico y la relación beneficio costo.

En este sentido, la relación beneficio costo indica la obtención de beneficios notables en el tratamiento con las cepas nativas y al ser usado el fertilizante. Sin embargo, la cepa VIBA-

1 presentó la mayor relación, seguida de la VIBA-2, mientras que con el uso de la fertilización nitrogenada, los valores en este parámetro decayeron de manera abrupta, lo cual guarda una estrecha relación con el incremento del costo de producción, provocados por los altos precios a los que se cotiza la urea (500 USD) (Tabla 4.14).

Tabla 4.14. Valoración económica de la inoculación con cepas nativas de *Bradyrhizobium*, sobre el frijol Caupí en suelos afectados por sales

Tratamientos	CP	R	PV	VP	G	BE	CRT	RBC
VIBA-1	666,45	1,13	915,00	1033,95	367,50	331,00	35,00	9,46
VIBA-2	666,45	1,01	915,00	924,15	257,70	221,20	35,00	6,32
150 kg.ha ⁻¹ N	706,45	1,20	915,00	1098,00	391,55	355,05	75,00	4,73
Control	631,45	0,73	915,00	667,95	36,50			

Nota: CP, costo de producción (\$ ha⁻¹); R, rendimiento (t.ha⁻¹); PV, precio de venta (\$); VP, Valor de la producción (\$ ha⁻¹); CP, costo de producción (\$ ha⁻¹); G, ganancia (\$ ha⁻¹); BE, Beneficio Económico; CRT, Costo Relativo del Tratamiento; RBC, Relación Beneficio Costo.

Aunque es evidente que el fertilizante aumentó el costo de producción, su influencia positiva sobre el rendimiento del cultivo se reflejó en la mejoría de otros parámetros como la ganancia y el beneficio económico, los cuales se incrementaron (Tabla 4.14).

Diversos autores, han informado efectividad económica al aplicar inoculantes rizobianos en diferentes especies de leguminosas y aseveran que, su utilización constituye una opción sostenible que puede ser efectiva para disminuir la aplicación de fertilizantes químicos, ayudar a preservar el ambiente y reducir los costos de producción (Moschetti *et al.*, 2005, Ben *et al.*, 2008 y Herridge *et al.*, 2008).

Desde el punto de vista económico-productivo, los resultados obtenidos señalan la factibilidad de la utilización de las combinaciones rizobio-leguminosa en suelos afectados por la salinidad, como una vía alternativa a la utilización de la fertilización química, lo que a largo plazo, permitirá incrementar significativamente la producción de granos en áreas

vulnerables e influirá positivamente en la fertilidad del suelo y en el aumento del contenido proteico de la dieta humana.

4.6. Consideraciones generales

A partir del esquema experimental utilizado en la investigación (Figura 3.1), se logró la clasificación de los cultivares de frijol Vigna y de las cepas de rizobios aisladas de suelos afectados por sales en cuanto a su capacidad de tolerar el estrés salino. El análisis fue realizado a partir del Índice de Tolerancia a la Salinidad y se abarcaron las etapas de germinación, crecimiento y rendimiento de las variedades. Para el análisis de los rizobios y su interacción con la leguminosa, se evaluó el crecimiento bacteriano, así como variables relacionadas con la FSN y rendimiento del cultivo, respectivamente.

En los estudios referentes al macrosimbionte, las manifestaciones de tolerancia y/o susceptibilidad se observaron desde la germinación, por ello, en esta etapa las variables que pueden servir como indicadores para caracterizar su condición ante el estrés salino son: absorción de agua por las semillas, longitud y masa seca de la radícula e hipocótilo.

En las etapas de crecimiento, desarrollo y reproducción del cultivo, la habilidad para tolerar las sales se caracterizó por la MSN, MSF, concentración de nitrógeno foliar, FEN, así como el número de granos y vainas por planta, peso de 100 semillas y rendimiento.

En los estudios relacionados con los rizobios aislados, el crecimiento bacteriano en medios de cultivo salinizados mediante la medida de la densidad óptica, fue el indicador para caracterizar la tolerancia a la salinidad en condiciones “in vitro”. Por su parte, en la evaluación de la interacción macro-microsimbionte en ambiente controlado y condiciones de campo, las variables que mejor describieron esta condición fueron la MSN, MSF, concentración de N foliar, FEN, así como el número de granos y vainas por planta, peso de 100 semillas y rendimiento del grano.

La concentración de iones en la masa seca de raíces y hojas, jugó un importante papel en la caracterización de la tolerancia. La evidencia demostró que en un cultivar tolerante disminuye la concentración de los iones tóxicos de Na^+ y Cl^- en las hojas y se incrementan los compatibles como el Ca^{2+} , K^+ y Mg^{2+} , constituyendo este uno de los mecanismos fisiológicos que utiliza la planta para evitar los daños provocados por el exceso de sales.

Otro de los mecanismos que pudieran influir en la mejor adaptación de esta especie a los ambientes salinizados, está relacionado con la acumulación de almidón en los cloroplastos de las hojas. En las observaciones ultraestructurales, se evidenció un incremento de la cantidad y tamaño de los gránulos de este en el tratamiento salino, los cuales podrían ser utilizados por las plantas como carbohidrato de reserva bajo estas condiciones.

Desde el punto de vista científico y práctico, es importante tener en cuenta las variables y los principales mecanismos antes descritos, pues brindan criterios que pueden ser usados para la selección de variedades de *Vigna* y especies de rizobios con mejor adaptación al estrés salino, lo cual tiene una influencia positiva en el mejoramiento del proceso de fijación simbiótica y el rendimiento del cultivo.

V. CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

1. Los cultivares tolerantes a la salinidad fueron IT 86 D-715, IT 86 D-510, IT 82 E-9 y Cancarro. Clasifican como medianamente susceptibles, Trópico yarey, Cubanita-666, IT 86 D-792 e IT 86 D-389. Fueron clasificados como susceptibles, Viñales-144 A, IITA-Precoz, IT 86 D-386 e IT 86 D-719.
2. Las cepas aisladas clasificaron genéticamente dentro del género *Bradyrhizobium* y pertenecen a las especies *Bradyrhizobium liaoningense* (VIBA-1) y *Bradyrhizobium yuanmingense* (VIBA-2, VIBA-3 y VIBA-5).
3. Las cepas mejores adaptadas a condiciones de salinidad en medio de cultivo, fueron VIBA-1 y VIBA-2. Todas las cepas mostraron tolerancia a altas temperaturas y pH alcalino y susceptibilidad a pH ácido.
4. El incremento de la concentración de los iones compatibles K^+ y Ca^{2+} y la disminución de los tóxicos Na^+ y Cl^- en las hojas, es un mecanismo utilizado por la variedad IT 86 D-715 (tolerantes) para disminuir el efecto dañino del estrés salino.
5. A nivel ultraestructural, se produjo incremento de los gránulos de almidón en los cloroplastos y desorganización de los orgánulos celulares en las hojas de las plantas sometidas a estrés por sales, con independencia de su grado de tolerancia.
6. La inoculación con las cepas nativas VIBA-1 y VIBA-2, mejoró las variables relacionadas con la fijación simbiótica de nitrógeno y el rendimiento, incrementándose este último en 35,40 y 27,72 % respectivamente.

VI. RECOMENDACIONES

VI. RECOMENDACIONES

1. Utilizar la cepa de *Bradyrhizobium* VIBA-1, en la inoculación de las variedades de frijol Caupí clasificadas como tolerantes, en zonas con suelos que presenten características de salinidad similares a los de esta investigación.
2. Realizar prospección de nuevas cepas de rizobios que permitan aumentar el número y la diversidad de especies, así como desarrollar estudios de dinámica de poblaciones rizobianas en los suelos donde fueron inoculadas las cepas de *Bradyrhizobium*.
3. Realizar estudios de síntesis y degradación de almidón en el frijol Caupí, sometido a altos niveles de salinidad, que den respuesta a los mecanismos que utiliza el cultivo para tolerar el estrés salino, basado en la acumulación de este polisacárido en las hojas.
4. Utilizar los resultados obtenidos, como vía para promover nuevas investigaciones encaminadas a lograr un mejor manejo de la simbiosis *Bradyrhizobium*-frijol Caupí e incrementar el rendimiento de este cultivo, en suelos que presenten problemas de salinidad.
5. Que el presente documento de tesis, sea utilizado como material de consulta para los diferentes niveles de enseñanza en la carrera de agronomía y en estudios de postgrado en las ciencias agrícolas.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acevedo, E. Resistence to abiotic stresses. *Produc. Protec. Veg.* 2003, vol. 12, no. 1, 2 y 3, p. 133-145.
2. Al-Garni. Increased heavy metal tolerance of cowpea plants by dual inoculation of an arbuscular mycorrhizal fungi and nitrogen-fixer *Rhizobium bacterium*. *Afri. J. Biotech.* 2006, vol. 5, no.2, p. 133-142.
3. Ali, A.; Ali, A.J. y Yaseen, M. Effect of phosphorus in combination with *Rhizobium* inoculation on growth and yield parameters of mungbean. *Crop Environ.* 2010, vol. 1, p. 53-56.
4. Álvarez, A.M.; Baños, R. y Otero, L. Salinidad y uso de aguas salinas para la irrigación de cultivos y forrajes en Cuba. *Cienc. Tecno. Ganad.* 2008, vol. 2, no. 1, p. 1-12.
5. Apáez, B.P.; Escalante, J.A.; Rodríguez, G.M.T.; Olalde, G.V.M y Ramírez, V., P. Frijol Chino [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], Importancia Económica y Medicinal. *Revi. Altern.* 2009, vol. 19.
6. Appunu, C.; N'Zoue, A.; Moulin, L.; Depret, G. y Laguerre, G. *Vigna mungo*, *V. radiata* and *V. unguiculata* plants sampled in different agronomical–ecological–climatic regions of India are nodulated by *Bradyrhizobium yuanmingense*. *Sys. Appl. Microb.* 2009, vol. 32, p. 460-470.
7. Appunu, C.A.; Zoue, A.N.; Laguerre, G. Genetic diversity of native bradyrhizobia isolated from soybean (*Glycine max* L.) indifferent agro-eco-climatic regions of India. *Appl. Environ. Microb.* 2008, vol.74, p. 5991-5996.
8. Apse, M.P. y Blumwald, E. Na⁺ transport in plants. *FEBS Letters.* 2007, vol. 581, p. 2247-2254.

9. Asatsuma, S.; Sawada, C.; Itoh, K.; Okito, M y Kitajima, A. Involvement of α -Amilasa I-1 in starch degradation in rice chloroplasts. *Plant Cell Physio.* 2005, vol. 46, p. 858-865.
10. Ashraf, M. e Iram, A. Drought stress induced changes in some organic substances in nodules and other plant parts of two potential legumes differing in salt tolerance. *Flora.* 2005, vol. 200, p. 535-546.
11. Ashraf, M. y Bashir, A. 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.* 2004, vol. 198, no, 6, p. 486-498.
12. Ashraf, M.Y.; Ashraf, M.; Mahmood, K.; Akhter, J.; Hussain, F. y Arshad, M. Phytoremediation of saline soils for sustainable agricultural productivity, In: *Plant Adaptation and Phytoremediation.* (Eds.): Ashraf, M.; Oztruck, M. y Ahmad, M.S.A. Published by Springer, the Netherlands. Pringer Science. Business Media B.V. 2010 pp. 335-356.
13. Ashraf, M.Y; Awan, A.R. y Mahmood. Rehabilitation of saline ecosystems through cultivation of salt tolerant plants. *Pak. J. Bot.* 2012, vol. 44, p. 69-75.
14. Ávila, S.N.Y. Evaluaciones de producción forrajera y rendimiento de grano en cultivares de frijol Yorimón [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], y su efecto en aspectos productivos de cabras criollas. *Tesis de Doctorado.* Centro de investigaciones biológicas del Noroeste, S. C. La Paz Baja California Sur. México, 2006, 117 p.
15. Azarias, A.G.; Duque, P.M.J.; Abrahão, R.S.N.; Florentino, L.A.; Barroso, K.S. y de Souza, F.M.M. Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from agricultural soils in the western amazon by using cowpea as the trap plant. *Appl. Environ. Microb.* 2012, vol. 78, no. 18, p. 6726-6733.

16. Azcón-Bieto, J. y Talón, M. Fundamentos de fisiología vegetal. Edicions Universitat de Barcelona. McGraw-Hill-Interamericana. Barcelona. España. 2008, 521 p.
17. Ballard, J.R. Optimising the legume symbiosis in stressful and competitive environments within southern Australia some contemporary thoughts. *Soil Biol. Biochem.* 2004, vol. 36, p. 1261-1273.
18. Banco Central de Cuba, Información económica. Alimentos. 2011, año 3, no. 171.
19. Bano, A. y Fatima, M. Salt tolerance in *Zea mays* (L) following inoculation with *Rhizobium* and *Pseudomonas*. *Biol. Ferti.Soils.* 2009, vol. 45, p. 405-413.
20. Bartels, D. y Sunkar, R. Drought and salt tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 2005, vol. 24, p. 23-58.
21. Beck, D.P.; Materon, L.A. y Afandi, F. Practical *Rhizobium*-legume technology manual. *ICARDA. Syria.* 1993, 55 p.
22. Bécquer, C.J.; Prévost D. y Cloutier, J. “Aspectos fisiológicos y genéticos de rizobios aislados de leguminosas forrajeras”. *Pastos y Forrajes.* 2001, vol. 24, p. 123-132.
23. Bécquer, C.J.; Prévost D. y Prieto, A. “Caracterización fisiológica y bioquímica de rizobios, aislados de leguminosas forrajeras”. *Biología.* Universidad de La Habana. 2000, vol 14, p. 57-65.
24. Belane, A.K. y Dakora, F.D. Measurement of N₂ fixation in 30 cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] genotypes under field conditions in Ghana using 15N natural abundance technique. *Symbiosis.* 2009, vol. 48, p. 47-57.
25. Ben, K.L.; Morte, G.A.; Ouarraqi, E.M. y Oihabi, A. Réponses physiologiques et biochimiques du trèfle (*Trifolium alexandrinum* L.) à la double association Mycorhizes-*Rhizobium* sous une contrainte saline (Physiological and biochemical responses to salt stress of mycorrhizal and/or nodulated clover seedlings (*Trifolium alexandrinum* L.). *Agronomie. Francia.* 2003, vol. 23, no. 7, p. 571-580.

26. Ben, R.; Aouani, M.E.; Trabelsi, M.; De Lajudie, P. y Mhamdi, R. Selection of high nitrogen-fixing rhizobia nodulating Chickpea (*Cicer arietinum*) for semi-arid Tunisia. *J. Agro.Crop Sci.* 2008, vol. 194, p. 413-420.
27. Bernal, L. y Martínez, E.B. Una nueva visión de la degradación del almidón. *Rev. Centro de Inves. Universidad La Salle.* 2006, vol.7, no. 025, p. 1665-8612.
28. Berrada, H. y Fikri-Benbrahim, K. Taxonomy of the Rhizobia: Current Perspectives. *British Microbiol. Research J.* 2014, vol.4, no. 6, p. 616-639.
29. Berthomieu, P.G.; Conejero, A.; Nublat, W.; Brackenbur, C.; Lambert, C.; Savio, N., Uozumi, S.; Oiki, K. y Yamada, C.F, Functional analysis of At A HKT1 in Arabidopsis shows that shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *EMBO J.* 2003, vol. 22, p. 2004-2014.
30. Binde, D.R.; Menna, P.; Bangel, E.V.; Barcellos, F.G. y Hungria, M. rep-PCR fingerprinting and taxonomy based on the sequencing of the 16S RNA gene of 54 elite commercial rhizobial strains. *Appl. Microb. Biotech.* 2009, vol. 83, p. 897-908.
31. Bohnert, H.J; Gong, Q; Li, P. y Ma, S. Unraveling abiotic stress tolerance mechanisms-getting genomics going. *Curr. Opi. Plant Biol.* 2006, vol. 9, p.180-188.
32. Bolaños, L.; Martín, M.; El-Hamdaoui, A.; Rivilla, R y Bonilla, I. Nitrogenase inhibition in nodules from pea plants grown under salt stress occurs at the physiological level and can be alleviated by B and Ca. *Plant Soil.* 2006, vol. 280, p. 135-142.
33. Borroto, M.; Borges, O.; Gell, P.; Saiz, J. y Mendez, A. Plantas resistentes a la salinidad en Cuba. *Agrot. de Cuba.* 1997, vol. 27, p. 62.
34. Borucki, W. y Sujkowska, M. The effects of sodium chloride salinity upon growth, nodulation, and root nodule structure of pea (*Pisum sativum L.*) plants. *Act. Physiol. Plant.* 2008, vol. 30, p. 293-301.

35. Boscari, A.; Mandon, K.; Poggi, M.C. y Le Rudulier, D., Functional expression of *Sinorhizobium meliloti* BetS, a high-affinity betaine transporter, in *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *Appl. Environ. Microb.* 2004, vol. 70, no. 10, p. 5916-5922.
36. Bouhmouch, I.; Souad-Mouhsine, B.; Brhada, F. y Aurag, J. Influence of host cultivars and *Rhizobium* species on the growth and symbiotic performance of *Phaseolus vulgaris* under salt stress. *J. Plant Physiol.* 2005, vol. 162, no.10, p. 1103-1113.
37. Bower, C.A. y Wilcox, L.V. "Methods of Soil Analysis". *Ame. Soci. Agro.* 1965, part 2, p. 937-940.
38. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analyt. Bioch.* 1976, vol. 72, p. 248-254.
39. Cavalcanti, F.R; Lima, J.P.M.S; Silva, S.L.F.; Viegas, R.A. y Silveira J.A.G. Roots and leaves display contrasting oxidative response during salt stress and recovery in cowpea. *J. Plant Physiol.* 2007, vol. 164, no. 5, p. 591-600.
40. Chang, C.; Damiani, I.; Puppo, A y Frendo, P. Redox changes during the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Mol. Plant.* 2009, vol. 2, p. 370-377.
41. Cha-um, S.; Batin, C.B.; Samphumphung, T.; Kidmanee, C. Physio-morphological changes of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) and jack bean (*Canavalia ensiformis* (L.) DC.) in responses to soil salinity. *Austral. J. Crop Sc.* 2013, vol. 7, no. 13, p. 2128-2135.
42. Chávez, S.L.; González, L y Ramírez, M.R. Efecto de la salinidad en la absorción de agua por las semillas de *Vigna unguiculata* (L). Walp. y su relación con la tolerancia varietal. *Eypasa*. Madrid. España. 2002, vol. 339, p. 99-102.

43. Chemining'wa, G.N.; Muthomi, J.W. y Theuri, S.W.M. Effect of rhizobia inoculation and starter-N on nodulation, shoot biomass and yield of grain legumes. *Asian J. Plant Sci.* 2007, vol. 6, no. 7, p. 1113-1118.
44. Chen, H.; An, R., Tang, J-H.; Cui, X-H. y Hao, F.S. Over expression of vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene improves salt tolerance in an upland rice. *Mol. Breeding.* 2007, vol. 19, p. 215-225.
45. Cheng, Q. Perspectives in Biological Nitrogen Fixation Research. *J. Int. Plant Biol.* 2008. vol. 50, no. 7, p. 784-796.
46. Cheng, Q.; Yang, J.; Day, A.; Dowson-Day, M. y Dixon, R. Evolutionary implication of nitrogenase-like genes in plant kingdom and prospects for gene transfer in model eukaryotes. In: Wang Y.P., eds. Biological Nitrogen Fixation, *Sust. Agric. Environ.* 2005, p. 387-389.
47. Cheong, M.S. y Yun, D.J. Salt-stress signaling. *J. Plant Biol.* 2007, vol. 50, no. 2, p.148-155.
48. Chinnusamy, V.; Liming, X. y Zhu, J. K. Chapter two: Use of genetic engineering and molecular biology approaches for crop improvement for stress environments. En: Ashraf, M. y P. Harris (eds.). Abiotic stresses plant resistance through breeding and molecular approaches. *Food Products Press*, Binghamton. 2005, p. 47- 95.
49. CIAT, Simbiosis leguminosa-rizobio. Manual de Métodos de Evaluación, Selección y Manejo Agronómico. *Proyecto CIAT-UNDP*, Cali, Colombia. 1988, 178 p.
50. CITMA, Programa nacional de Lucha contra la desertificación y la sequía en la república de Cuba. 2003.
51. Coba de la Peña, T. y Pueyo, J.J. Legumes in the reclamation of marginal soils, from cultivar and inoculant selection to transgenic approaches. *Agro. Sust. Develop.* 2012, vol. 32, p. 65-91.

52. Coba de la Peña, T.; Verdoy, D.; Redondo, F.J. y Pueyo, J.J. Salt tolerance in the *Rhizobium*-legume symbiosis: an overview. In: Pandalai SG (eds.) Recent research developments in plant molecular biology. *Resea. Sig. Triv.* 2003, p. 187-205.
53. Coque, L.; Neogi, P.; Pislariu, C.; Wilson, K.A.; Catalano, C.; Avadhani, M.; Sherrier, D.J. y Dickstein, R. Transcription of ENOD8 in *Medicago truncatula* Nodules directs ENOD8 esterase to developing and mature symbiosomes. *Mol. Plant Micro. Inter.* 2008, vol. 21, no. 4, p. 404-410.
54. Costa, P.H.A.; Silva, J.V.; Bezerra, M.A.; Eneas F.J.; Prisco, J.T. y Gomes F.E. Crescimento e níveis de solutos orgânicos e inorgânicos em cultivares de *Vigna unguiculata* submetidos a salinidade. *Rev. Braz. Bot.* 2003, vol. 26, p. 289-297.
55. Craine, J. M. Competition for nutrients and optimal root allocation. *Plant Soil.* 2006, vol. 285, p. 171-185.
56. Cuadrado, B.; Rubio, G. y Santos, W. Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de frijol Caupí [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] como potenciales bioinóculos. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* 2009, vol. 38, no. 1, p. 78-104.
57. Davenport, R.; James, R.A.; Zakrisson-Plogander, A.; Tester, M. y Munns, R. Control of sodium transport in durum wheat. *Plant Physiol.* 2005, vol. 137, p. 807-818.
58. Davenport, R.J.; Muñoz-Mayor, A.; Jha, D.; Essah, P.A.; Rus, A. y Tester, M. The Na⁺ transporter AtHKT1; 1 controls retrieval of Na⁺ from the xylem in Arabidopsis. *Plant Cell Environ.* 2007, vol. 30, no. 497-507.
59. de Felipe, A.M.R.; Fernández-Pascual, M.; Lucas Sánchez, M.M.; Fedorova, E.; Golvano, H.M.P.; González, S.A., Guasch, P.L., De Lorenzo, C, C.; de las Heras, N.; Pozuelo, G.J.M.; Pueyo, D.J.J. y Vivo, R.A. Factores Estructurales, Bioquímicos y

- Moleculares de la Simbiosis *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*)-*Lupinus*. *An. Real Acad. Naci. Farm. Madrid*, España. 2006, vol. 72, p. 423-442.
60. de Freitas, A.D.S., Fernandes, A.S. y Valadares, E.B.S. Yield and biological nitrogen fixation of cowpea varieties in the semi-arid region of Brazil. *Biol. Bioen.* 2012, vol. 45, p. 109-114.
61. de las Heras, N.M. Efecto del glifosato sobre la simbiosis *Lupinus albus-Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*). *Tesis doctoral*. Departamento de biología Vegetal I. Madrid. 2004, 177 p.
62. de Maria, N. Efecto del Glifosato sobre la simbiosis *Lupinus albus-Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*). *Tesis Doctoral*. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. Madrid, España. 2004, 177 p.
63. Deaker, R.; Roughley, R.J. y Kennedy, I. R. Legume seed inoculation technology. A review. *Soil Biol. Bioch.* 2004, vol. 36, p. 1275-1288.
64. Degefu, T.; Wolde-Meskel, E.; Liu, B.; Clennwerck, I.; Willems, A.; Frostegard, A. *Mesorhizobium shonense* sp. nov., *Mesorhizobium hawassense* sp. nov. and *Mesorhizobium abyssinicae* sp. nov., isolated from root nodules of different agroforestry legume trees. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2013, vol. 63, p. 1746-1753.
65. D'Haeze, W. y Holsters, M. Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobio.* 2002, vol. 12, p. 79-105.
66. Ding, H. y Hynes, M.F. Plasmid transfer system in the rhizobia. *Canad. J. Microb.* 2009, vol. 55, p. 917-927.
67. Doleib, N.H.M.E. y Elsheikh, E.A.E. Modeling the effect of salt-stress on growth, nodulation and nitrogen fixation of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. *U. K. J. Agric. Sci.* 2006, vol.14, no. 3, p. 354-369.

68. Domínguez, A.F. Identificación y Caracterización de genes de osmoadaptación en *Rhizobium* y de su papel en simbiosis con leguminosas. *Tesis Doctoral*. Universidad de Granada. España. 2007, p. 291.
69. Domínguez-Ferreras, A.; Pérez-Arnedo, R.; Becker, A., Olivares, J., Soto. M.J. y Sanjuán, J. Transcriptome profiling reveals the importance of plasmid pSymB for osmoadaptation of *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 2006, vol. 188, p. 7617-7625.
70. Édson, Z.J.; ValisheskiR, R.; Rodrigues, F.F.; Prata, N.M.C. y Gouvêa, N.R. Assessment of cowpea *Rhizobium* diversity in Cerrado areas of northeastern Brazil. *Brazil. J. Microb.* 2004, vol. 35, no. 4.
71. Elboutahiri, N.; Thami-alami, I.; Zaid, E. y Udupa, S.M. Genotypic characterization of indigenous *Sinorhizobium meliloti* and *Rhizobium*-Legumes in the reclamation of marginal soils rhizobium sullae by rep-PCR, RAPD and ARDRA analyses. *Afr. J. Biotech.* 2009, vol. 8, p. 979-985.
72. Elzaawely, A.A. y Tawata, S. Antioxidant activity of phenolic rich fraction obtained from *Convolvulus arvensis* L. Leaves Grown in Egypt. *Asian J. Crop Sci.* 2012, vol. 4, p. 32-40.
73. Espinoza, M.A.; Kogad, I. y Zavaleta, I.A. Amplified 16S ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Avibacterium paragallinarum*. *Avi. Diseases.* 2008, vol. 52, no. 1, p. 54-58.
74. FAO. Food and agriculture organization of United Nations (FAO), Rome, Italy. Disponible en: <http://faostat.fao.org>. 2007. Acceso a la base de datos, 10 de marzo de 2007.
75. FAO. Global network on integrated soil management for sustainable use of salt-affected soils. FAO land and plant nutrition management service, Rome. 2005.

76. FAO. Manual técnico de la fijación simbiótica del nitrógeno: leguminosa/*Rhizobium*. 1995.
77. FAOSTAT. Crops. Cowpeas, dry. Statistics division. Disponible en: <http://faostat.fao.org/>. 2010. Acceso a la base de datos, 26 de junio, 2010.
78. Farias, A. M.E.; Moreira, M.G.; Oliveira, M.L.O.; Florindo, M.I. G.; Fernández, D.M. y Silva, M.G. Differential responses of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activities of two *Vigna unguiculata* cultivars to salt stress. *Braz. J. Plant Physiol.* 2005, vol. 17, no. 2.
79. Fening, J.O.; Sessitsch, A.; Offei, S.K. y Danso, S.K.A. Genomic heterogeneity within Cowpea Bradyrhizobia isolated from Ghanaian soils. *West Afri. J. Appl. Ecol.* 2004, vol. 6, p. 20-29.
80. Fernández, G.C.J. Effective selection criteria for assessing plant tolerance. p: 257-270 In: Proc. On Adaptation of food crops to temperature and water stress (Kuo, C. G. Ed.). Taiwan, 13-18. *Asian Veg. R. Develop. Center.* 1993, p. 93-410.
81. Fernández-Pascual, M.; De Lorenzo, C.; de Felipe, M.R.; Rajalakshmi, S. Gordon A.J., Thomas B.J., y Minchin F.R. Possible reasons for relative salt stress tolerance in nodules of White lupin cv. *Multolupa*. *J. Exp. Bot.* 1996, vol. 47, no. 304, p. 1709-1716.
82. Fernández-Pascual, M.; Pozuelo, J.M. y Serra M.T. Effects of cyana zine and linuron on chloroplast development, nodule activity and protein metabolism in *Lupinus albus* L. *J. Plant Physiol.* 1988, vol. 133, p. 288-294.
83. Fernández-Pascual, M.; Pueyo, J.J.; de Felipe, M.R.; Golvano, M.P. y Lucas, M.M. Singular Features of the *Bradyrhizobium-Lupinus* Symbiosis. Dynamic Soil, Dynamic Plant. *G. Sci. Books.* 2007., vol. 1, no. 1, p.1-16.

84. Figueira, E., y Caldeira, G. Effect of nitrogen nutrition on salt tolerance of *Pisum sativum* during vegetative growth. *J. Plant Nut. Soil Sc.* 2005, vol. 168, no. 3, p. 359-363.
85. Florentino, L.A.; de Sousa, P.M.; Silva, J.S.; Barroso, S.K. y de Sousa, M.F. Diversity and efficiency of *Bradyrhizobium* strains isolated from soil samples collected from around *Sesbania virgata* roots using Cowpea as trap species. *Rev. Bras. Cient. do Solo.* 2010, vol. 34, p. 1113-1123.
86. Foyer, C.H. y Graham, N. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Ant. Redox Signal.* 2009, vol. 11, p. 861-905.
87. Frahm, M.A.; Rosas, J.C.; Mayek-Pérez, N. y López-Salinas, E. Breeding beans for resistance to terminal drought in the lowland tropics. *Euphytica.* 2004, vol. 1362, p. 223-232.
88. Freitas, A.D.S.; Vieira, C.L.; Santos, C.E.R.S.; Stamford, N.P. y Lyra, M.C.C.P. Caracterização de rizóbios isolados de jacatupé cultivado em solo salino do Estado de Pernambuco. *Bragantia.* 2007, vol. 66, p. 497-504.
89. Fukuda, A.; Chiba, K.; Maeda, M.; Nakamura, A.; Maeshima, M. y Tanaka, Y. Effect of salt and osmotic stresses on the expression of genes for the vacuolar H⁺-pyrophosphatase, H⁺-ATPase subunit A, and Na⁺/H⁺ antiporter from barley. *J. Exp. Bot.* 2004, vol. 55, p. 585-94.
90. Garg, N. y Singla, R. Growth, photosynthesis, nodule nitrogen and carbon fixation in the chickpea cultivars under salt stress. *Braz. J. Plant Physiol.* 2004, vol. 16, no. 3, p. 137-146.
91. Germano, M.P.; D'Angelo V.; Biasini, T.; Sanogo, R.; De Pasquale, R. y Catania, S. Evaluation of the antioxidant properties and bioavailability of free and bound

- phenolic acids from *Trichilia emetic* Vahl. *J. Ethnopharmacol.* 2006, vol. 105, p. 368-373.
92. Giles, E.; Oldroyd, G. y Downie, A. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Ann. Rev. Plant Biolo.* 2008, vol. 59, p. 519-546.
93. Giller, J. E.; Mc Donagh, J.F. y Cadish, G. Can biological nitrogen fixation sustain agriculture in the tropics. In: Soils science and sustainable land management in the tropics (*J.K. Syers and D.L. Rimmer, eds.*). *CAB Internat. Walling.* 1994, 173 p.
94. Gilliham, M. y Tester, M. The regulation of anion loading to the root xylem. *Plant Physiol.* 2005, vol. 137, p. 819-828.
95. Giri, B. y Mukerji, K.G. Mycorrhizal inoculant alleviates salt stress in *Sesbania aegyptiaca* and *Sesbania grandiflora* under field conditions: evidence for reduced sodium and improved magnesium uptake. *Mycorrhiza.* 2004, vol. 14, p. 307-312.
96. Gómez, P.E. y López, S.R. Evaluación de la nodulación natural de variedades de frijol caupí [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] en un Fluvisol de la llanura del Río Cauto en la Provincia Granma. *Alimentaria.* España. 2004, vol. 350, p. 103-105.
97. González, L. M. Efecto de la sequía simulada con PEG-6000 sobre la germinación y el crecimiento de las plántulas de dos variedades de trigo. *Cult. Trop.* 2005, vol. 26, no. 4, p. 45-49.
98. González, L. M. Uso de la radio-inducción de mutaciones en la obtención de genotipos de arroz tolerantes a la salinidad. *Tesis de Doctorado.* Bayamo: I.I.A. "Jorge Dimitrov". 1996, 100 p.
99. González, L. M.; González, María C.; y Ramírez, R. Aspectos generales sobre la tolerancia a la salinidad en las plantas. *Cult. Trop.* 2002, vol. 23, no. 2, p. 27-37.

100. González, L.M.; Ramírez, R.; López, R. y Gómez, D. Integrated management of SALT-affected soils in Cuba. *Proc. Inter. Works. Manage. Probl. Degra Soils, SALT-affected soils*. Valencia. Spain. 2001, vol.7-11, p. 11-22.
101. González, L.M.; Tóth, T. y García, D. Integrate management for the sustainable use of salt-affected soils in Cuba. *Uni. Cienc.* 2004, vol. 20, no. 40, p. 85-102.
102. González, L.M.; Zamora A. y Céspedes, N. Análisis de la tolerancia a la salinidad en variedades de *Vigna unguiculata* (L.) sobre la base de caracteres agronómicos, la acumulación de iones y el contenido de proteína. *Cult. Trop.* 2000, vol. 21, no. 1, p. 47-52.
103. Gutiérrez, W.; Medrano, C.; Materan, M.; Villalobos, Y.; Esparza, D.; Báez, J. y Medina, B. Evaluación del rendimiento y nodulación del frijol [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] bajo dos sistemas de labranza en las condiciones agroecológicas de la planicie de Maracaibo, Venezuela. *Rev. Fac. Agron.* 2001, vol. 18, p. 237-246.
104. Hallensleben, M.; Polreich, S.; Heller, J. y Brigitte, L.M. Assessment of the importance and utilization of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] as leafy vegetable in small-scale farm households in Tanzania-East Africa. Tropentag 2009. Conference on International Research on Food Security, Natural Resource Management and Rural Development. University of Hamburg. Hamdi, Y. A. 1985. La fijación biológica del nitrógeno, *FAO*. 2009, 160 p.
105. Han, L.L.; Wang, E.T.; Lu, Y.L.; Zhang, Y.F.; Sui, X.H.; Chen, W.F. y Chen W. X., *Bradyrhizobium Spp.* and *Sinorhizobium fredii* are predominant in root nodules of *Vigna angularis*, a native legume crop in the Subtropical Region of China. *J. Microb.* 2009, vol. 47, no. 3, p. 287-296.
106. Hassen, A.I.; Bopape, F.L.; Rong, I.H. y Seane, G. Nodulation efficacy of *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain WB74 on soybean (*Glycine max* L.

- Merrill) is affected by several limiting factors. *Afric. J. Microbiol. Research*. 2014, vol. 8, no. 20, p. 2069-2076.
107. Hayat, R.; Ali, S.; Tariq, M.S. y Hussain, C.H. Biological nitrogen fixation of summer legumes and their residual effects on subsequent rainfed wheat yield. *Pak. J. Bot.* 2008, vol. 40, no. 2, p. 711-722.
108. Hernández, A.; Pérez, J. M.; Bosch, D. y Rivero, L. Nueva Versión de la Clasificación Genética de los Suelos de Cuba. Inst. Suelos, *AGRINFOR*, Ciudad Habana. 1999, 64 p.
109. Herridge, D.F.; Peoples, M.B. y Boddey, R.M. Global inputs of Biological Nitrogen Fixation in Agricultural Systems. *Plant Soil*. 2008, vol. 311, p. 1-18.
110. Hoagland, D.R. y Arnon, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. *Cal. Agric. Exp. Sta. Cir.* 1950, vol. 347, p. 1-32.
111. Hoffman, B.M.; Dean, D.R. y Seefeldt, L.C. Climbing Nitrogenase: Toward a mechanism of enzymatic nitrogen fixation. *Acc. Chem. Resea.* 2008, vol. 42, no. 5, p. 609-619.
112. Horie, T. y Schroeder, J.I. Sodium transporters in plants. Diverse genes and physiological functions. *Plant Physiol.* 2004, vol. 136, p. 2457-2462.
113. Hungria, M.; Chueire, L.M.O.; Coca, R. G. y Megias, M. Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soybean nodules in *Braz. Soil Biol. Biochem.* 2001, vol. 33, p. 349-1361.
114. Hussain, A.; Ali, A. y Noorka, R. Effect of phosphorus with and without *Rhizobium* inoculation on nitrogen and phosphorus concentration and uptake by Mungbean (*Vigna radiata*). *J. Agric. Res.* 2012, vol. 50, no. 1, p. 49-55.

115. Hussain, K.; Farrukh, M.; Majeed, A.; Nawaz, K.; Hayat, K.; Afghan, S. y Shahazad, Zia-ul-Hussnain, S. What molecular mechanism is adapted by plants during salt stress tolerance? *Afr. J. Biotech.* 2010, vol. 9, no.4, p 416-422.
116. Ibragimova, M.V.; Rumiantseva, M.L.; Onishchuk, O.P.; Belova, V.S.; Kurchak, O.N.; Andronov, E.E.; Dziubenko, N.I. y Simarov, B.V. Symbiosis between the nodule bacterium *Sinorhizobium meliloti* and alfalfa (*Medicago sativa*) under salinization conditions. *Mikrobiol.* 2006, vol. 75, no. 1, p. 94-100.
117. Igarashi, R.Y.; Laryukhin, M.; Santos, P.C.D.; Lee, H.I., Dean, D.R.; Seefeldt, L.C. y Hoffman, B.M. Trapping H-bound to the nitrogenase FeMo-cofactor active site during H₂ evolution: Characterization by ENDOR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, vol. 127, p. 6231-6241.
118. Imbomba, S. K. Response of Cowpeas to Salinity and (2-Chloroethyl) trimethyl-ammonium Chloride (CCC). *Physio. Plant.* 2006, vol. 28, no. 2, p. 346-349.
119. Inan, G.; Khang, Q.; Li, P.H. wang, Z.L.; Zhang, H.; Zhang, C.Q.; Quist, T.M.; Goodwin, S.M., y Zhu, J.H. Salt cress: and halophyte and cryophyte Arabidopsis relative model system and its applicability in molecular genetic analysis of growth and development of extremophiles. *Plant Physiol.* 2004, vol.135, p.1718-1737.
120. INSMET, Hojas de asentamiento de las variables meteorológicas diárias. Estaciones meteorológicas de Veguitas, Jucarito y Dos ríos. Instituto de Meteorología. CITMA. Cuba. 2009.
121. Jackson, M.L. Soil Chemical Analysis, Prentice-Hall, Inc., Englewood, N.J. 1958, p. 59-67.
122. Jemo, M.; Abaidoo, R.C.; Nolte, C.M.; Tchienkoua, N. y Horst, S. W.J. Phosphorus benefits from grain-legume crops to subsequent maize grown on acid soils of southern Cameroon. *Plant Soil.* 2006, vol. 284, p. 385-397.

123. Jha, D.N.S.; Tester, M. y Roy, S.J., Variation in salinity tolerance and shoot sodium accumulation in *Arabidopsis* ecotypes linked to differences in the natural expression levels of transporters involved in sodium transport. *Plant, Cell Environ.* 2010, vol. 33, p. 793-804.
124. Karupphasamy, K.; Nagaraj, S. y Kathiresan, K. Stress tolerant *Rhizobium* enhances the growth of *Samanea saman* (JECQ) Merr. *Afr. J. Basic Appl. Sc.* 2011, vol. 3, No. 6, p. 278-284.
125. Kaschuk, G.; Hungria, M.; Andrade, D. S. y Campo, R.J. Genetic diversity of rhizobia associated whit common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. *Appl. Soil Ecol.* 2006, vol. 32, p. 210-220.
126. Khadri, M.; Tejera, N.A. y Lluch, C. Alleviation of salt stress in common bean (*Phaseolus vulgaris*) by exogenous abscisic acid supply. *J. Plant Gr. Regul.* 2006, no. 25, p. 110-119.
127. Khadri, M.; Tejera, N.A. y Lluch, C. Sodium chloride-ABA interaction in two common bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars differing in salinity tolerant. *Environ. Exp. Bot.* 2007, vol. 60, p. 211-218.
128. Kimura, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 1980, vol. 16, p. 111-120.
129. Kinkema, M.; Scott, P.T. y Gresshoff, P.M. Legume nodulation: successful symbiosis through short and long distance signalling. *Funct. Plant Biol.* 2006, vol. 33, p. 707-721.
130. Kishor, P.B.K.; Sangam, S.; Amrutha, R.N.; Laxmi, P.S.; Naidu, K.R.; Rao K.R.S.S.; Rao, S; Reddy, K.J.; Theriappan, P. y Sreenivasulu, N. Regulation of proline

- biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Curric. Sc.* 2005, vol. 88, p. 424-438.
131. Knight, H. Calcium signaling during abiotic stress in plants. *Int. Rev. Cytol.* 2000, vol. 192, p. 269-324.
132. Kosová, K.; Prasil, T.I. y Vítámvás, P. Protein Contribution to Plant Salinity Response and Tolerance Acquisition. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, vol. 14, p. 6757-6789. ISSN 1422-0067.
133. Kuykendall, L.D. Family, I. *Rhizobiaceae*. In: Brenner, D.J.; Krieg, N.R.; Staley, J.T. y Garrity G.M., (eds) *Bergey's. Man. Syst. Bacteriol. Springer*. New York. 2005, vol 2, part C., p. 324-361.
134. L'Taief, B.; Sifi, B.; Zaman-Allah, M.; Drevon, J.J. y Lachaal, M. Effect of salinity on rootnodule conductance to the oxygen diffusion in the *Cicer arietinum* *Mesorhizobium ciceri* symbiosis. *J. Plant Physiol.* 2007, vol. 164, p. 1028-1036.
135. Ladeiro, B. Saline Agriculture in the 21st Century: using salt contaminated resources to cope food requirements. *J. Botany.* 2012, vol. 2012, p. 7.
136. Lafay, B. y Burdon J.J. Molecular diversity of rhizobia occurring on native shrubby legumes in Southern Australia. *Appl. Environ. Microb.* 1998, vol. 64, p. 3989-3997.
137. Laguerre, G.; Allard, M.R.; Revoy, E. y Amarger, N. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length poly-morphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microb.* 1994, vol. 60, p. 56-63.
138. Lane, D.J. 16S rRNA sequencing. In: Strackebrandt E., Goodfellow M (eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematic*. Wiley, Chischester. 1991, p. 115-175.
139. Lang, E.; Schumann, P.; Adler, S.; Sproer, C.; Sahin, N. *Azorhizobium oxalatophilum* sp. nov., and emended description of the genus *Azorhizobium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2013, vol. 63, p. 1505-1511.

140. Larrainzar, E.; Wienkoop, S.; Scherling, C.; Kempa, S.; Ladrera, R.; Arrese-Igor, C.; Weckwerth, W. y González, E.M. Carbon metabolism and bacteroid functioning are involved in the regulation of nitrogen fixation in *Medicago truncatula* under drought and recovery. *Mol. Plant-Microbe Inter.* 2009, vol. 22, p. 1565-1576.
141. Lavin, M.; Herendeen, P.S. y Wojciechowski, M.F. Evolutionary rates analysis of *Leguminosae* implicates a rapid diversification of lineages during the tertiary. *Syst. Biol.* 2005, vol. 54, p. 574-594.
142. Leblanc, H. A.; McGraw, R. L.; Nygren, P. y Le Roux, C. Neotropical legume tree *Inga edulis* forms N₂-fixing symbiosis with fast-growing *Bradyrhizobium* strains. *Plant Soil.* 2005, vol. 275, p.123-133.
143. Lerch, G. La experimentación en las ciencias biológicas y agrícolas. Edi. Científico-Técnica. Ciudad de la Habana. Cuba. 1977, p. 482.
144. Liu, J.; Wang, C.; Wang, Z.; Zhang, C.; Lu, S. y Liu, J. The antioxidant and free-radical scavenging activities of extract and fractions from corn silk (*Zea mays* L.) and related flavone glycosides. *Food Chem.* 2011, vol. 126, p. 261-269.
145. Lloret, L. y Martínez-Romero, E. Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *R. Latin. Microbiol.* 2005, vol. 47, p.43-60.
146. López, G.M. Metabolismos carbonado nodular en *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti*, *Lotus japonicus*-*Mesorhizobium loti* en estrés salino: implicación de la trehalosa. *Tesis Doctoral*. Universidad de Granada. Facultad de Ciencias. 2007, p. 315. ISBN: 978-84-338-4466-8.
147. López, R. Selección y Evaluación de combinaciones rizobio-leguminosa pratenses en suelos afectados por salinidad. *Tesis Doctoral*. Universidad de Granma, 2001, 100 p.

148. Lorite, M.; Muñoz, S.; Olivares, J.; Soto, M. y Sanjuán, J. Characterization of strains unlike *Mesorhizobium loti* that nodulate *Lotus* in saline soils of Granada (Spain). *Appl. and Environ. Microbiol.* 2009, vol. 76, p. 4019-4026.
149. Maathuis, F.J.M. The role of monovalent cation transporters in plant responses to salinity. *J. Exp. Bot.* 2006, vol. 57, no. 5, p. 1137-1147.
150. MacLean, A.M.; Finan, T.M. y Sadowsky, M.J. Genomes of the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of legumes. *Plant Physiol.* 2007, vol. 144, p. 615-622.
151. Maggio, A.; Hasegawa, P.M.; Bressan, R.A.; Consiglio, M.F. y Joly, R.J. Unravelling the functional relationship between root anatomy and stress tolerance. *Aust. J. Plant Physiol.* 2001, vol. 28, p. 999-1004.
152. Manchanda, G. y Garg, N. Salinity and its effects on the functional biology of legumes. *Acta Physiol. Plant.* 2008, vol. 30, p. 595-618.
153. Márquez, A.J; Betti, M.; García-Calderón, M.; Palove-Balang, P.; Díaz, P. y Monza, J. Nitrate assimilation in *Lotus japonicus*. *J. Exp. Bot.* 2005, vol. 56, p. 1741-1749.
154. Marsh, L.E.; Baptiste, R.; Marsh, D.B.; Trinklein, D. y Kremer, R.J. Temperature Effects on *Bradyrhizobium spp.* growth and symbiotic effectiveness with pigeonpea and cowpea. *J. Plant Nutrition*, 2006, vol. 29, no. 2, p. 331-346.
155. Martínez-Romero, E. Recent developments in *Rhizobium* taxonomy. *Plant Soil.* 1994, vol. 161, p. 11-20.
156. Martins, L.M.; Xavier, G.R.; Rangel, F.W.; Ribeiro, J.R.A.; Neves, M.C.P.; Morgado, L.B. y Rumjanek N.G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. *Biol. Fert. Soils.* 2003, vol. 38, no. 6, p. 333-339.

157. Masson-Boivin, C.; Giraud, E.; Perret, X. y Batut, J. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many *Rhizobium* recipes? *T. Microb.* 2009, vol. 17, p 458-466.
158. Maxted, N.; Mabuza-Dlamini, P.; Moss, H.; Padulosi, S.; Jarvis, A. y Guarino L. An ecogeographic survey: African Vigna. *Sys. Ecoge. Studies Crop Gene.* 2004, vol. 10, p.1-468.
159. Medeot, D.B.; Bueno, M.A.; Dardanelli, M.S. y Lema, M.G. Adaptational changes in lipids of *Bradyrhizobium* SEMIA 6144 nodulating peanut as a response to growth temperature and salinity. *Curr. Microb.* 2007, vol. 54, p. 31-35.
160. Mesa, D. Obtención de plantas resistentes a la salinidad para los suelos salinos cubanos. *Rev. Cubana Cien. Agrí.* 2003, vol. 37, no. 3, p. 217-226.
161. Michel, B.F. y Kaufmann, M.R. The osmotic potential of poliethylene glyco-6000. *Plant Physiol.* 2001, vol. 51, p. 1914-1916.
162. Miller-Williams, M; Lowen, P.C. y Oresnik, I.J. Isolation of salt-sentive mutants of *Sinorhizobium meliloti* strain Rm 1021. *Microb.* 2006, vol. 152, p. 2049-2059.
163. MINAG, Norma Ramal Agrícola no. 279. Suelos, Análisis Químicos. Reglas generales. Edit. Dirección de Normalización, Metrología y Control de la Calidad. La Habana. 1981, 63 p.
164. MINAG. Género Vigna para el Consumo humano. Tecnología de Cultivo. 2003, p. 37. ISBN 959-7111-22-5.
165. MINAG. Informe Oficial de Estadística Nacional, Provincia Granma. 2012. Modelo 3361.
166. Miransari, M.; Balakrishnan, P.; Smith, D.; Mackenzie, A.F.; Bahrami, H.A.; Malakouti, M.J. y Rejali, F. Overcoming the stressful effect of low pH on soybean

- root hair curling using lipochitooligosaccharides. *Commun Soil Sci. Plant Anal.* 2006, vol. 37, p. 1103-1110.
167. Miwa, H.; Sun, J.; Oldroyd, G.E. y Downie, J.A. Analysis of nod-factor-induced calcium signaling in root hairs of symbiotically defective mutants of lotus japonicas. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 2006, vol. 19, no. 8, p. 914-923.
168. Moller, I.S. y Tester, M. Salinity tolerance of Arabidopsis: a good model for cereals? *Trends Plant Sci.* 2007, no.12, p. 534-40.
169. Moller, I.S.; Gilliam, M.; Jha, D.; Stuart, G.M.J.; Juliet, C., Jim Haseloff, y Mark Tester. Shoot Na⁺ exclusion and increased salinity tolerance engineered by cell type-specific alteration of Na⁺ transport in *Arabidopsis*. *The Plant Cell.* 2009, vol. 21, p.2163-2178.
170. Moschetti, G.; AnnaLucia, P.; Protopapa, A.; Anastasio, M.; Pepe, O. y Defez, R. Use of nodulation pattern, stress tolerance, nodC gene amplification, RAPD-PCR and RFLP-16S rDNA analysis to discriminate genotypes of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Syst. Appl. Microb.* 2005, vol. 28, p. 619-631.
171. Mouhsine, B.; Prell, J.; Filali-Maltouf, A.; Priefer, U.B. y Aurag, J. Diversity, phylogeny and distribution of bean rhizobia in salt-affected soils of North-West Morocco. *Symbiosis.* 2007, vol. 43, p. 83-96.
172. Munns, R. Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytol.* 2005, vol. 167, p. 645-663.
173. Munns, R. y Tester, M. Mechanisms of salinity tolerance. Review. *Ann. Rev. Plant Biol.* 2008, vol. 59, p. 651-681.
174. Murillo, A.B.; López-Aguilar, R.; Kaya, C.; Larrinaga-Mayoral, J. y Flores-Hernández, A. Comparative effects of NaCl and polyethylene glycol on germination,

- emergence and seedling growth of Cowpea. *J. Agr. Crop Sc.* 2002a, vol. 188, no. 4, p. 235-247.
175. Murillo, A.B.; Troyo-Diequez, E.; García-Hernández, J.L.; Larinaga-Mayoral, J.A.; Nieto-Garibay, A. y López, C.A. Efecto de la salinidad en genotipos de chicharo de vaca [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], durante la etapa de plántula. *Agroch. J.* 2002b, vol. 46, no. 1-2, p. 73-87.
176. Murillo, A.B.; Troyo-Diequez, E.; Garcia-Hernández, J.L.; López-Aguilar, R.; Ávila-Serrano, N.Y.; Zamora, S.S.; Rueda-Puente, E.O. y Kaya, C. Effect of NaCl salinity in the genotypic variation of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] during early vegetative growth. *Scientia Horti.* 2006, vol.108, no. 4, p. 423-431.
177. Naab, J.B; Chimphango, S.M.B. y Dakora F.D. N fixation in cowpea plants grown in farmers' fields in the upper west region of Ghana, measured using ¹⁵N natural abundance. *Symbiosis*, 2009, vol. 48, p. 37-46.
178. Nascimento, R., de Andrade J.R., da Silva, F.V., de Alencar A.E.V., de Melo, D.F. y Barbosa, J.W. Biological nitrogen fixation in genotypes of Cowpea under salt stress increasing the state of Paraíba, Brazil. International conference of agricultural engineering CIGR-Ag. En Valencia Conference Center. Valencia. España. 2012, p. 8-12.
179. Navascués, J.; Pérez-Rontomé, C.; Gay, M., Marcos, M., Yang, F., Walker, F.A., Desbois, A., Abián, J. y Becana, M. Leghemoglobin green derivatives with nitrated hemes evidence production of highly reactive nitrogen species during aging of legume nodules. *Proce. Natio. Acade. Sc. USA.* (PNAS). 2012, vol. 109, no. 7, p. 2660-2665.

180. Naz, N.; Hameed, M.; Ahmad, M.S.A.; Ashraf, M. and Arshad, M. Is soil salinity, the major determinant of community structure under arid environments? *Commun. Ecol.* 2010, vol. 11, p. 84-90.
181. Niste, M.; Vidican, R.; Rotar, I.; Stoian, V.; Pop, R.; Miclea, R. 2014. Plant nutrition affected by soil salinity and response of *Rhizobium* regarding the nutrients accumulation. *ProEnvironmet.* 2014, vol. 7, p. 71-75.
182. Niu, X.; Bressan, R.A.; Hasegawa, P.M. y Pardo, J.M. Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiol.* 2005, vol. 109, p. 735-742.
183. Norma Cubana (NC), Calidad del suelo. Evaluación de la afectación por la salinidad. 1ra Edición. 2009. CS:13.080.01; 01.040.13.
184. Oficina Nacional de Estadística de Cuba (ONE). Superficie cosechada y en producción de cultivos seleccionados de la agricultura no cañera. Sector estatal. Versión digital. 2006.
185. Okogun, J.A.; Otuyemi, B.T. y Sanginga, N. Soybean yield determinants and response to rhizobial inoculation in an on-farm trial in the northern Guinea Savanna of Nigeria. 2004.
186. Oldroyd, G.; Harrison, M. y Udvardi, M. Peace talks and trade deals. Keys to long-term harmony in legume-microbe symbioses. *Plant Physiol.* 2005, vol. 137, p. 1205-1210.
187. Oliva, G.J.J. Mutualismo y patogénesis: Importancia de Genes Implicados en la Virulencia para el Establecimiento de la Simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. Tesis doctoral. Universidad de Granada. Departamento de microbiología del suelo y sistemas simbióticos. Granada. España. 2008. p. 259.

188. Olufajo, O. Agronomic performance of improved Cowpea varieties under natural infestation with *Alectra vogelii* (Benth.) in the northern Guinea savannah of Nigeria. *Agricul. Tropica et subtrop.* 2012, vol. 45, no. 2, p. 66-71.
189. Ormeño-Orrillo, E. Lipopolysaccharides of rhizobiaceae: structure and biosynthesis. *Rev. Lat. Microb.* 2005, vol. 47, p. 165-175.
190. Orozco-Mosqueda, M.; Altimirano-Hernández, C.; Farias-Rodríguez, R.J.; Valencia-Cantero, F. y Santoyo, G. Homologous recombination and dynamics of rhizobial genomes. *Res. Microb.* 2009, vol. 160, p. 733-741.
191. Paneque, P.V.M.; Calaña, N.J.M.; Calderón, V.M.; Borges, Y.; Hernández, G.T.C. y Caruncho, M.C. Manual de técnicas analíticas para análisis de suelo, foliar, abonos orgánicos y fertilizantes químicos. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). 2010, p. 157, ISBN: 978-959-7023-51-7.
192. Parida, A.K. y Das, A.B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxi. Environ. Safety.* 2005, vol. 60, p. 324-349.
193. Patel, A.D.; Jadeja, H. y Pandey, A.N. Effect of salinization of soil on growth, water status and nutrient accumulation in seedlings of *Acacia auriculiformis* (Fabaceae). *J. Plant Nut.* 2010, vol. 33, p. 914-932.
194. Pérez-Rontomé, C., Gay, M., Marco, M., Yang, F., Walker, F.A., Desbois, A., Abián J. y Becana, M. Leghemoglobin green derivatives with nitrated hemes evidence production of highly reactive nitrogen species during aging of legume nodules. *Plant Biol.* 2012, vol. 109, no.7, p. 2660-2665.
195. Pesqueira, J. Cambios bioquímicos, morfológicos y ecofisiológicos en plantas del género *Lotus* bajo estrés salino. *Tesis doctoral*. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Biología Vegetal. España, 2008, 156 p.

196. Platten, J.D.; Cotsaftis, O.; Berthomieu, P.; Bohnert, H.; Davenport, R.J.; Fairbairn, D.J.; Horie, T.; Leigh, R.A.; Lin, H.X.; Luan, S.; Mäser, P.; Pantoja, O.; Rodríguez-Navarro, A.; Schachtman, D.P.; Schroeder, J.I.; Sentenac, H.; Uozumi, N.; Véry, A.A.; Zhu, J.K.; Dennis, E.S. y Tester, M. Nomenclature for HKT transporters, key determinants of plant salinity tolerance. *Trends in Plant Sc.* 2006, vol.11, p. 372-374.
197. Praxedes, S.C.; de Lacerda, C.F.; DaMatta, F.M.; Prisco, J.T. y Gomes-Felho, E. Salt tolerance is associated with differences in ion accumulation, biomass allocation and photosynthesis in cowpea cultivars. *J. Agro. Crop Sc.* 2010, vol. 196, p. 193-204.
198. Pule-Meulenberg, F.; Belane, A.K.; Krasova-Wade, T. y Dakora, F.D. Symbiotic functioning and bradyrhizobial biodiversity of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] in Africa. *B.M.C. Microb.* 2010, vol. 10, no. 89.
199. Queensland Department of Primary Industries (DPI). Salinity management handbook. Second edition. Department of Environment and Resource Management. Australia. p. 165. 2011. ISBN 0 7242 7412 X.
200. Racca, R.W.; Argúello, J.A.; Nuñez, S.; Luna, V.; Frioni, L. y Bottini, R. Endogenous growth inhibitors nodulation and nitrogen fixation in soybean under drought and treated with gibberellic acid and abscisic acid. *Rev. Cs. Agrop.* 1990, vol. 7, p. 13-17.
201. Rai, R. y Singh, R.P. Effect of salt stress on interaction between lentil (*Lens culinaris*) genotypes and *Rhizobium spp.* strains: symbiotic N₂ fixation in normal and sodic soils. *Biol. Fertil. Soils.* 1999, vol. 29, no. 2, p. 187-195.
202. Rajasekaran, S.; Sankar, K.G.; Jayakumar, K.; Rajesh, M.; Bhaaskaran, C. y Sundaramoorthy, P. Biofertilizers-Current Status of Indian Agriculture. *Inter. J. Environ. Bioen.* 2012, vol. 4, no. 3, p. 176-195.

203. Ramírez, B.M. H. Estudio de la biodiversidad de las poblaciones de *Rhizobium* que establecen simbiosis con trébol en España. *Tesis Doctoral*. Universidad de Salamanca. 2006.
204. Recompensa, C. y Angarica, L. Introducción a la Economía Agrícola. Editorial Pueblo y Educación. La Habana. Versión Digital. 2008.
205. Rees, D.C.; Tezcan, F.A.; Haynes, C.A.; Walton, M.Y.; Andrade, S.; Einsle, O. y Howard, J.B. Structural basis of biological nitrogen fixation. *Philos. Trans. R. Soc. A*. 2005, vol. 363, p. 971-984.
206. Rengasamy, P. World salinization with emphasis on Australia. *J. Exp. Bot.* 2006, vol. 57, no. 5, p. 1017-1023.
207. Rengasamy, P.; Chittleborough, D. y Helyar, K. Root zone constraints and plant-based solutions for dryland salinity. *Plant Soil*. 2003, vol. 257, p. 249-260.
208. Rhoades, A. y Loveday, J. Potencial problems of salinity on the hearth in the next five year. *SIG. J. Fac. Agr.* 2004, vol. 42, no.3-4, p. 273-280.
209. Rodrigues, C.S; Laranjo, M. y Olivera, S. Effect of heat and pH stress in the growth of chickpea Mesorhizobia. *Curr. Microb.* 2006, vol. 53, p. 1-7.
210. Rodríguez, A. y Sicardi, M. Competition for nodule occupancy between introduced and native strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Biol. Fertil. Soils*. 2010, vol. 46, p. 419-425.
211. Rodríguez-Pérez, L. Implicaciones fisiológicas de la osmorregulación en plantas. *Agro. Colom.* 2006, vol. 24, no. 1, p. 28-37.
212. Royo, A. y Aragues, R. Establecimiento de nuevos índices de tolerancia de los cultivos a la salinidad: la cebada como caso de estudio. *Invest. Agrar. Producc. Vegetal*. 2003, vol. 17, No. 3, p. 410-421.

213. Rüberg, S.; Tian Z-X.; Krol E.; Linke, B.; Meyer, F.; Wang, Y.; Puhler A.; Weidner, S. y Becker, A. Construction and validation of a *Sinorhizobium meliloti* whole genome DNA microarray: genome wide profiling of osmoadaptative gene expression. *J. Biotech.* 2003, vol. 106, p. 255-268.
214. Rubio, M.C.; Bustos-Sanmamed, P.; Clemente, M.R. y Becana, M. Effects of salt stress on the expression of antioxidant genes and proteins in the model legume *Lotus japonicus*. *New Phytol.* 2009, vol. 181, p. 851-859.
215. Ruiz-Díez, B.; Fajardo, S.; de Felipe, M. y Fernández-Pascual, M. Characterization of rhizobia from legumes of agronomic interest grown in semi-arid areas of Central Spain relates genetic differences to soil properties. *J. Basic Microb.* 2011, vol. 51, p. 1-13.
216. Ruiz-Díez, B.; Fajardo, S.; de Felipe, M. y Fernández-Pascual, M. Selection of Rhizobia from agronomic legumes grown in semiarid soils to be employed as bioinoculants. *Agro. J.* 2012, vol. 104, p. 550-559.
217. Ruiz-Díez, B.; Fajardo, S.; Puertas-Mejía, M.A.; Rosario de Felipe, M. y Fernández-Pascual, M. Stress tolerance, genetic analysis and symbiotic properties of root-nodulating bacteria isolated from Mediterranean leguminous shrubs in Central Spain. *Arch. Microb.* 2009, vol. 191, p. 35-46.
218. Rus, A.; Lee, B.; Munoz-Mayor, A.; Sharkhuu, A.; Miura, K.; Zhu, J.K.; Bressan, R.A. y Hasegawa, P.M. AtHKT1 facilitates Na⁺ homeostasis and K⁺ nutrition in Planta. *Plant Physiol.* 2004, vol. 136, p. 2500-2511.
219. Rusinamhodzi, L.; Murwira, H.K. y Nyamangara, J. Cotton-cowpea intercropping and its N₂ fixation capacity improves yield of a subsequent maize crop under Zimbabwean rain-fed conditions. *Plant Soil.* 2006, vol. 287, p. 327-336.

220. Saitou, N. y Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987, vol. 4. p. 406-425.
221. Sambrook, J. y Russell, D. Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. *Cold Spring Harbor*, NY. 2001, p. 5.8-5.7.
222. Schrire, B.D.; Lewis, G.P. y Lavin, M. Biogeography of the Leguminosae, In: Legumes of the world, Lewis, G.; Schrire, G.; Mackinder, B.; y Lock, M., (Eds.) *Royal Bot. Gardens*. Kew, UK, 2005, p. 21-54. ISBN 8773043044.
223. Schulze, E.D.; Beck, E. y Müller-Hohenstein, K. Springer-Verlag. Heidelberg (Germany). *Plant Ecol.* 2005, p. 702.
224. Serraj, R. y Sinclair, T.R. Osmolyte accumulation: can it really help increase in crop yield under drought conditions? *Plant Cell Enviro.* 2002, vol. 25, p. 333-341.
225. Shabala, S. y Cuin T.A. Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiol. Plantar.* 2008, vol. 133, p. 651-669.
226. Sharma, K.D.; Datta, K.S y Varma, S.K. Effect of chloride and sulphate salinity on nodulation and nitrogen fixation in chickpea. *Ann. Biol.* 1990, vol. 6, p. 13-20.
227. Silva, F.V.; Simões-Araújo, J.L.; Silva-Júnior, J.P.; Xavier, G.R. y Rumjanek, N.G. Genetic diversity of Rhizobia isolates from Amazon soils using cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] as trap plant. *Braz. J. Microb.* 2012, vol. 43, no. 2, p. 682-691.
228. Singh, B.B. Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]: In R.J. Singh and Jauhar, P.P. Eds. Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement. CRC Press, Boca Raton, F.L. 2004, p. 117-161.
229. Singh, S.K. Developing screening tools for abiotic stresses using cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] as a model crop. A dissertation submitted to the Faculty of Mississippi State University in partial fulfillment of the requirements for the degree

- of Doctor of Philosophy in agronomy. *Depart. Plant Soil Sc.* Mississippi State, United State of America. 2008, p. 164.
230. Skorupska, A.; Janczarek, M.; Marczak, M.; Mazur, A. y Król, J. Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microb. Cell Fact.* 2006, vol. 5, no. 7.
231. Sokal, R.R. y Sneath, P.H. Principles of numerical taxonomy. N.R. Freeman. San Francisco. 1973, p. 573.
232. Somasegaran y Hoben. Methods in Legume-*Rhizobium* technology. Proyecto NIFTAL. Hawai. 1994, 367 p.
233. Soria, M.A.; Pagliero, F.E.; Correa, O.S.; Kerber, N.L. y García, A.F. Tolerance of *Bradyrhizobium japonicum* E109 to osmotic stress and the stability of liquid inoculants depend on growth phase. *World J. Microb. Biotech.* 2006, vol. 22, p. 235-1241.
234. Sousa, M.F.; Campos, F.A.P.; Prisco, J.T.; Eneas-Filho, J. y Gomes-Filho, E. Growth and protein pattern in cowpea seedlings subjected to salinity. *Biol. Plant.* 2003, vol. 47, no. 3, p. 341-346.
235. Sprent, J.I. Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytol.* 2007, vol. 174, p.11-25.
236. Sprent, J.I.; Odee, W.D. y Dakora, D.F. African legumes: a vital but under-utilized resource. *J. Exp. Bot.* 2010, vol. 61, no. 5, p.1257-1265.
237. Stamford, N.P.; Freitas, A.D.; Ferraz, D.S.; Montenegro, A. y Santos, C.E. Nitrogen fixation and growth of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] and yam bean (*Pachyrhizus erosus* L.) in a sodic soil as affected by gypsum and sulphur inoculated with *Thiobacillus* and rhizobial inoculation. *Tropical Grasslands.* 2003, vol. 37, p. 11-19.

238. StatSoft, Inc. (2011). STATISTICA (data analysis software system), version 10. www.statsoft.com.
239. Steenkamp, E.T.; Stepkowski, T.; Przymusiak, A.; Botha, W.J. y Law, I.J. Cowpea and peanut in southern Africa are nodulated by diverse *Bradyrhizobium* strains harbouring genes that belong to the large pantropical clade common in Africa. *Mol. Phylog. Evol.* 2008, vol. 48, p. 1131-1144.
240. Subramanian, S.; Stacey, G. y Yu, O. Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *TRENDS in Plant Sc.* 2007, vol. 12, no. 7, p. 282-285.
241. Sungthongwises, K.; Poss, R. y Drevon, J.J. Effects of P on *Vigna unguiculata* Cv. 305 and *Stylosanthes hamate* Cv. Verano symbiosis in the field of a rubber-tree plantation. *Asian J. Plant Sc.* 2011, vol. 10, no. 7, p. 357-364.
242. Tada, Y. y Kashimura, T. Proteomic Analysis of salt-responsive proteins in the mangrove plant, *Bruguiera gymnorhiza*. *Plant Cell Physiol.* 2009, vol. 50, no. 2, p. 439-446.
243. Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M. y Kumar, S. MEGA 4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 2007, vol. 24, p. 1596-1599.
244. Tang, R.; Li, C.; Xu, K.; Du, Y.H. y Xia, T. Isolation, functional characterization, and expression pattern of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene TrNHX1 from *Trifolium repens* L. *Plant Mol. Biol.* 2010, vol. 28, p. 102-111.
245. Tavakkoli, E.; Fatehi, F.; Coventry, S.; Rengasamy, P. y McDonald, G. Additive effects of Na⁺ and Cl⁻ ions on barley growth under salinity stress. *J. Exp. Bot.* 2011, vol. 62, no. 6, p. 2189-2203.
246. Tejera, N.A.; Campos, R.; Sanjuan J. y Lluch, C. Nitrogenase and antioxidant enzyme activities in *Phaseolus vulgaris* nodules formed by *Rhizobium tropici*

- isogenic strains with varying tolerance to salt stress. *J. Plant Physiol.* 2004, vol. 61, no. 3, p. 329-338.
247. Tejera, N.A.; Campos, R.; Sanjuan, J. y Lluch, C. Effect of sodium chloride on growth, nutrient accumulation, and nitrogen fixation of common bean plants in symbiosis with isogenic strains. *J. Plant Nutr.* 2005, vol. 28, p. 1907-1921.
248. Tester, M. y Davenport, R. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann. Botanic.* 2003, vol. 91, p. 503-527.
249. Tofiño, A.; Romero, H.M. y Ceballos, H. Efecto del estrés abiótico sobre la síntesis y degradación de almidón. Una revision. Fisiología de cultivos. *Agr. Colomb.* 2007, vol. 25, no. 2.
250. Tracy, F.E; Gilliam, M.; Dodd, A.N.; Webb, A.A.R. y Tester, M. Cytosolic free Ca²⁺ in *Arabidopsis thaliana* are heterogeneous and modified by external ionic composition. *Plant Cell Environ.* In press. 2008.
251. Trinchant, J.C.; Biscari, A.; Spennato, G.; Van de Syne, G. y Lerudulier, D. Proline betaine accumaltion and metabolism in alfalfa plants under sodium chloride stress. Exploring its compartmentalization in nodules. *Plant Physiol.* 2004, vol. 135, p. 1583-1594.
252. Tukey, J.W. (1949). Comparing individual means in the analysis of variance. *Biometrics*, 5:99-114.
253. Udovenko, G.V. Resistencia de las plantas cultivadas a la salinidad (en ruso). Editorial Kolos, Leningrado, 1977, 215 p.
254. Unno, H.; Maeda, Y.; Yamamoto, S.; Okamoto, M. y Takenaga, H. Relationship between salt tolerance and Ca²⁺ retention among plant species. *Japon J. Soil Sc. Plant Nutr.* 2002, vol. 73, p. 715-718.

255. Van-Berkum, P. y Fuhrmann, J. Evolutionary relationships among the soybean bradyrhizobia reconstructed from 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequence divergence. *Internat. J. of Syst. and Evolut. Microbiol.* 2000, vol. 50, p. 2165-2172.
256. Van-Kessel, C. y Hartley, C. Agricultural management of grain legumes: has it led to an increase in nitrogen fixation? *Field Crops Res.* 2000, vol. 65, no. 2-3, p. 165-181.
257. Varela, M. Los métodos BILOT como herramienta de análisis de interacción de orden superior en un modelo lineal/bilineal. *Tesis de Doctorado*. Salamanca, España: Universidad de Salamanca, 2002. hh. 15-155.
258. Vera-Estrella, R.; Barkla, B.; Bohnert, H. y Pantoja, O. Novel regulation of aquaporins during osmotic stress. *Plant Physiol.* 2004, vol. 135, p. 2318-2329.
259. Vera-Estrella, R.; Barkla, B.J.; García-Ramírez, L. y Pantoja, O. Salt stress in *Thellungiella halophila* activates Na^+ transport mechanisms required for salinity tolerance. *Plant Physiol.* 2005, vol.139, p. 1507-1517.
260. Verdoy, D.; Coba de la Peña, T.; Redondo, F.J.; Lucas, M.M. y Pueyo, J.J. Transgenic *Medicago truncatula* plants that accumulate proline display nitrogen-fixing activity with enhanced tolerance to osmotic stress. *Plant Cell Environ.* 2006, vol. 29, p. 1913-1923.
261. Vieira, R.F.; Silva, C.M. y Silveira, A.P. Soil microbial biomass C and symbiotic processes associated with soybean after sulfentrazone herbicide application. *Plant Soil.* 2007, vol. 300, p. 95-103.
262. Vincent, J.M. Manual for the practical study of root-nodule bacteria. I.B.P. Handbook. 15. Oxford: *Blackwell Scient. Public.* 1970, 164 p.
263. Vinuesa, P.; Rojas-Jiménez, K.; Contreras-Moreira, B.; Mahna, S.K.; Prasad, B.N.; Moe, H.; Selvaraju, S.B.; Thierfelder, H. y Werner, D. Biogeography and

- evolutionary genetics of four *Bradyrhizobium* species that nodulate soybeans on the Asiatic continent, assessed by multilocus sequence analysis. *Appl. Environ. Microb.* 2008, vol.74, p. 6987-6996.
264. Vinuesa, P.; Silva, C.; Lorite, M.; Izaguirre-Mayoral, M.; Bedmar, L. y Martínez-Romero, E. Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and *Bayesian* phylogenies inferred from *rrs*, *atpD*, *recA* and *nifH* sequences, and their use in the classification of *Sesbania* microsymbionts from Venezuelan wetlands. *Syst. and Appl. Microbiol.* 2005, vol. 28, p. 702-716.
265. Weisburg, W.G.; Barns, S.M.; Pelletier, D.A. y Lane, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 1991, vol. 173, p. 697-703.
266. Weise, S.; Schrader, S.; Kleinbeck, K.; y Sharkey, T. Carbon balance and circadian regulation of hydrolytic and phosphorolytic breakdown of transitory starch. *Plant Physiol.* 2006, vol. 141, p. 879-886.
267. Wenxue, W.; Bilsborrow, P. E.; Hooley, P.; Fincham, D.A.; Lombi, E. y Forster B.P. Salinity induced differences in growth, ion distribution and partitioning in barley between the cultivar Maythorpe and its derived mutant Golden Promise. *Plant Soil.* 2003, vol. 250, p. 183-191.
268. Werner, D. y Newton, W.E. Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment. Netherlands. 2005, p. 343.
269. Wintermans, J. y De Mots, A. Spectrophotometric of chlorophyll and b their pheophytins in ethanol. *Bioch. Biophysiol. Acta.* 1965, vol. 109, p. 448-453.
270. Wolde-meskel, E.; Terefework, Z.; Frostegard, A. y Lindström, K. Genetic diversity and phylogeny of rhizobia isolated from woody legumes in southern Ethiopia. *Intern. J. System. Evolut. Microb.* 2005, vol. 55, p. 1439-1452.

271. World Reference Base (WRB). World Reference Base for Soil Resources. Class. Key. FAO AGL 2006. <http://www.fao.org/ag/agl/agll/wrb/newkey.stm>.<17-1-2007>
272. Xavier, G.R.; Martins, L.M.; Rumjanek, N.G. y Neves, M.C.P. Tolerância de rizóbio de feijão-caupi à salinidade e à temperatura em condição in vitro. *Caatinga*. 2007, vol. 20, p.1-9.
273. Xu, L.M.; Ge, C.; Cui, Z.; Li J. y H. Fan. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1995, vol. 45, no. 706-711.
274. Yao, Z.Y.; Kan, F.L.; Wang, E.T.; Wei, G.H. y Chen, W.X. Characterization of rhizobia that nodulate legumes species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. *Int. J. Syst. Evolut. Microb.* 2002, vol. 52, p. 2219-2230.
275. Yates, R.J.; Howieson, J.G.; Nandasena, K.G. y O'Hara, G.W. Root-nodule bacteria indigenous legumes in the north-west of Western Australia and their interaction with exotic legumes. *Soil Biol. Bioch.* 2004, vol. 36, p.1319-1329.
276. Yokoyama, T.N.; Tomooka, N.; Okabayashi, M.; Kaga, A.; Boonkerd, N. y Vaughan, D.A. Variation in the nod gene RFLPs, nucleotide sequences of 16Sr RNA genes, Nod factors, and nodulation abilities of *Bradyrhizobium* strains isolated from Thai *Vigna* plants. *Canadian J. Microb.* 2006, vol. 52, p. 31-46.
277. Yuen, G. Evaluation of a crop water stress index for detecting water stress in water wheat in the North China Plain. *Agri. Water Manag.* 2004, vol. 64, no. 1, p. 29-40.
278. Zahran, H.H. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in arid climate. Revision. *Microb. Mol. Biol.* 1999, vol. 63, p. 969-989.

279. Zamora, R.A. Comportamiento de variedades de frijol [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], cultivadas con bajos insumos en tres épocas del año. Tesis de Maestría. Universidad de Granma. *Fac. Ciencias Agrí.* 1999, p. 97.
280. Zhang, Y.F.; Wang, E.T.; Tian, C.F.; Wang, F.Q.; Han, L.L.; Chen, W. y Chen, W.X. *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium yuanmingense* and *Bradyrhizobium japonicum* are the main rhizobia associated with *Vigna unguiculata* and *Vigna radiata* in the subtropical region of China. *Microb. Letters.* 2008, vol 285, no. 2, p. 146-154.
281. Zhao, Y.; Bian, S.M.; Zhou, H.N. y Huang, J.F. Diversity of nitrogenase systems in diazotrophs. *J. Integr. Plant Biol.* 2006, vol. 48, p. 745-755.
282. Zhu, J.K. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Sc.* 2007, vol. 6, p. 66-71.
283. Zhu, J.K. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr. Op. Plant Biol.* 2003, vol. 6, p. 441-445.
284. Zilli, J.E.; Valisheski, R.R.; Freire-Filho, F.R. y Rumjanek, N.G. Assesment of cowpea *Rhizobium* diversity in cerrado areas of northeastern Brazil. *Braz. J. Microb.* 2004, vol.35, p. 281-287.
285. Zyalalov, A.A. Water flows in higher plants: physiology, evolution, and system analysis. *Russ. J. Plant Physiol.* 2004, vol. 51, no. 4, p. 547-555.

VIII. ANEXOS

VIII. ANEXOS

Anexo 1 A. Características de las variedades [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.].

Variedad	Hábito de crecimiento	Color del grano	Días a la cosecha	Masa de 100 Semillas (g)	Rendimiento (t.ha)
² IT 86 D-510	Determinado	Blanco	72-80	16,9	1,38
¹ Cubanita-666	Determinado	Negro	65-72	18,0	1,28
¹ Trópico Yarey	Determinado	Crema	65-72	16,9	1,60
¹ IITA Precoz	Determinado	Crema	64-72	15,0	1,40
¹ Viñales 144 A	Indeterminado	Negro	90-130	10,0	2,00
² Cancarro	Determinado	Blanco	72-82	13,9	1,13
² IT 86D-715	Determinado	Blanco	72-80	14,7	1,49
² IT 86 D-792	Determinado	Crema	67-74	16,4	1,31
² IT 86 D-719	Determinado	Blanco	65-72	15,7	1,36
² IT 86 D-386	Determinado	Marrón	72-80	15,2	1,47
² IT 82 E-9	Determinado	Marrón	65-72	18,3	1,09
² IT 86 D-389	Determinado	crema	72-82	15,8	1,27

¹ MINAG, 2003

² Zamora, 1999

Anexo 1 B. Características culturales de la cepa tipo de referencia *Bradyrhizobium yuanmingense* (Yao *et al.*, 2002).

Características	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> CCBAU 10071 ^T
Fuentes de carbón usadas	-
-D-Fructuosa	-
-Inositol	-
-Lactosa	-
-Maltosa/sucrosa	±
Fuentes de nitrógeno usadas	-
-Ácido Aspártico	-
-Glicina	-
Resistencia a:	
-Eritromicina (100 µg.mL)	-
-Polimicina (300 µg.mL)	+
-0,1 % verde metil/deoxycolato	-
-1,0 % NaCl	-
Crecimiento a pH 5,0	-
Crecimiento a pH 10,0	-
Reducción de nitrato	+
Tamaño de la colonia después de 7 días de inoculación (mm)	1,0-2,0
Tiempo de generación (h)	9,5-16,0
Nodulación-soya	-
Nodulación- <i>L. cuneata</i>	+

Ubicación del experimento de campo 1

Áreas de la Empresa Genética “Manuel Fajardo”

- Municipio Jiguaní
- 20° 22' 12" latitud norte y 76° 27' 56" longitud oeste
- 134 m sobre el nivel del mar
- A: Suelo no afectado por sales ($C.E=0,96 dS.m^{-1}$)
- B: Suelo afectado por sales ($5,8 dS.m^{-1}$)



Ubicación del experimento de campo 2

Áreas de la CCS Fortalecida “8º Congreso”

- Municipio Cauto Cristo
- 20° 26' 58" latitud norte y 76° 32' 15" longitud oeste
- 126 m sobre el nivel del mar
- Suelo afectado por sales ($C.E=5,55 dS.m^{-1}$)



Anexo 3. Localización geográfica de las áreas donde fueron establecidos los experimentos de campo.

Anexo 4. Efecto de la salinidad sobre la absorción de agua por la semilla, longitud y masa seca de la raíz e hipocótilo.

Variedades	CE (dS.m ⁻¹)	AAS (%)	LR(cm)	LH(cm)	MSR(g pl ⁻¹)	MSH(g pl ⁻¹)
IT 86 D-715	0	61,58a	2,54a	5,13a	0,02a	0,25a
	5	60,13b	2,45b	4,99b	0,02b	0,21b
	10	59,93b	2,27c	4,38c	0,01c	0,18c
	15	58,19c	2,18d	4,26d	0,01d	0,16d
	ESx	0,31	0,04	0,09	0,0003	0,01
Trópico Yarey	0	67,79a	6,99a	3,48a	0,01a	0,08a
	5	66,01ab	6,15ab	2,36b	0,007b	0,08a
	10	64,57b	5,48bc	2,09b	0,005c	0,05a
	15	58,11c	4,66c	1,16c	0,004c	0,05a
	ESx	0,97	0,24	0,22	0,001	0,01
Cubanita-666	0	57,33a	2,18a	3,45a	0,01a	0,14a
	5	56,75a	1,92b	3,28b	0,005a	0,11b
	10	54,97a	1,62c	2,45c	0,004a	0,09c
	15	50,59b	1,49d	1,82d	0,003a	0,07d
	ESx	0,80	0,07	0,17	0,002	0,01
IITA-Precoz	0	57,74a	2,20a	3,46a	0,035a	0,12a
	5	56,99b	2,04b	2,92b	0,025b	0,10b
	10	55,53c	1,70c	2,29c	0,019c	0,07c
	15	53,76d	1,48d	0,50d	0,012d	0,02d
	ESx	0,40	0,07	0,29	0,002	0,01
IT 86 D-510	0	67,08a	3,82a	9,19a	0,10a	0,09a
	5	66,97a	3,73ab	8,95b	0,09b	0,08a
	10	64,75b	3,58ab	8,49c	0,09c	0,08ab
	15	61,89c	3,22b	7,64d	0,08d	0,07b
	ESx	0,58	0,09	0,15	0,002	0,003
IT 86-D 792	0	64,99a	3,75a	9,51a	0,025a	0,27a
	5	63,64ab	3,28b	7,18b	0,019a	0,21b
	10	61,74b	1,96c	4,68c	0,009b	0,13c
	15	55,57c	1,76c	4,21d	0,008b	0,11c
	ESx	0,97	0,22	0,55	0,002	0,002
IT 86 D-389	0	61,74a	2,45a	5,58a	0,015a	0,27a
	5	58,17b	2,30a	4,64b	0,014a	0,14b
	10	55,64b	1,97b	3,96c	0,012a	0,13b
	15	55,34b	1,38c	1,98d	0,009a	0,090c
	ESx	0,74	0,11	0,34	0,001	0,02

Continuación

Variedades	CE (dS.m ⁻¹)	AAS (%)	LR(cm)	LH(cm)	MSR(g pl ⁻¹)	MSH(g pl ⁻¹)
IT 82 E-9	0	65,22a	2,74a	6,72a	0,027a	0,137a
	5	64,54a	2,63ab	6,49a	0,027a	0,125ab
	10	63,78ab	2,49ab	5,91b	0,025a	0,121ab
	15	61,87b	2,24b	5,61b	0,022a	0,107b
	ESx	0,40c	0,65	0,12	0,003	0,003
Viñales-144 A	0	63,10a	2,41a	4,91a	0,08a	0,08a
	5	58,82b	1,74b	4,35b	0,05b	0,06b
	10	57,02bc	1,33c	2,60c	0,02c	0,03c
	15	55,95c	0,66d	1,30d	0,01c	0,01d
	ESx	0,74	0,16	0,37	0,01	0,01
IT 86 D-386	0	62,05a	2,42a	5,48a	0,02a	0,11a
	5	57,93b	2,27a	4,57b	0,01a	0,08b
	10	56,04bc	1,49b	2,82c	0,005b	0,05c
	15	53,92c	0,74c	1,41d	0,002b	0,02d
	ESx	0,81	0,17	0,41	0,003	0,01
Cancarro	0	65,07a	2,89a	4,93a	0,75a	1,04a
	5	64,84a	2,85a	4,86a	0,73a	0,14b
	10	62,24a	2,52b	4,12b	0,68b	0,13b
	15	59,13b	2,34c	3,70c	0,62c	0,09b
	ESx	0,70	0,06	0,13	0,01	0,10
IT 86-D 719	0	61,80a	2,99a	5,10a	0,07a	0,07a
	5	58,20b	2,51b	4,25b	0,05a	0,03b
	10	55,08c	1,76c	3,18c	0,03b	0,02b
	15	53,38c	1,05d	1,91d	0,01b	0,01b
	ESx	0,89	0,19	0,31	0,01	0,01

Nota. Letras diferentes en las columnas difieren significativamente según la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$). AAS, Absorción de agua por las semillas; LR, longitud de la radícula; LH, longitud del hipocótilo; MSR, masa seca de la radícula; MSH, masa seca del hipocótilo. (Los datos mostrados constituyen la media de 50 semillas y plántulas por cada tratamiento).