



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

**BASES FISIOLÓGICAS DE LA RESPUESTA  
DIFERENCIAL AL NaCl ENTRE GENOTIPOS DE  
FRIJOL YORIMON [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de

**D o c t o r   e n   C i e n c i a s**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en Ecología)

*P r e s e n t a*

**Bernardo Murillo Amador**

La Paz, B.C.S.

Agosto de 2001



# Prefacio

El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., como requisito para obtener el grado de Doctor en Ciencias en el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales con Orientación en Ecología.

La presente tesis está basada en las siguientes dos publicaciones principales propuestas y comprometidas en el Programa de Trabajo Individual del sustentante:

1. **Murillo-Amador B**, Troyo-Diéguez E. 2000. Effects of salinity on the germination and seedling characteristics of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. **40**:433-438.

2. **Murillo-Amador B**, Troyo-Diéguez E, López-Cortés A, Jones HG, Ayala-Chairez F, Tinoco-Ojanguren CL. 2001. Salt tolerance of cowpea genotypes in the emergence stage. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. **41**:81-88.

Otras publicaciones adicionales generadas como parte integral del Programa de Trabajo Individual, se incluyen en la presente tesis:

1. **Murillo-Amador B**, Troyo-Diéguez E, López-Cortés A, Tinoco-Ojanguren CL, Jones HG, Ayala-Chairez F. 2000. Path analysis of cowpea early seedling growth under saline conditions. *PYTON. International Journal of Experimental Botany*, **67**:85-92.

2. **Murillo-Amador B**, Troyo-Diéguez E, Jones HG, Ayala-Chairez F, Tinoco-Ojanguren CL, López-Cortés A. 2000. Screening and classification of cowpea genotypes for salt tolerance during germination. *PYTON International Journal of Experimental Botany*, **67**:71-84.

3. **Murillo-Amador B**, Troyo-Diéguez E, García-Hernández, JL, Larrinaga-Mayoral JA, Nieto-Garibay A, López-Cortés A. 2001. Efecto de la salinidad en genotipos de "chicharo de vaca" *Vigna unguiculata* (L.) Walp. durante la etapa de plántula. *AGROQUÍMICA International Journal of Plant Chemistry, Soil Science and Fertilization*. En prensa.

4. **Murillo-Amador B**, Troyo-Diéguez E, Jones HG, Tinoco-Ojanguren CL, López-Cortés A, Ayala-Chairez F. 2001. Screening cowpea for salt tolerance during early vegetative growth. *Euphytica*. Enviado

5. **Murillo-Amador B**, Troyo-Diéguez E, López-Aguilar R, López-Cortés A, Tinoco-Ojanguren CL, Jones HG, Kaya C. 2001. Genotypic differences of cowpea plants in ion concentrations, transpiration, stomatal conductance and chlorophyll associated with response to salinity. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. Enviado.

Además, se generaron otras publicaciones durante el período del presente trabajo de tesis doctoral, que no se incluyen en la tesis pero que son de utilidad para la misma:

1. **Murillo-Amador B**, Cárdenas-Martínez A, Troyo-Diéguez E. Effects of NaCl pretreatment and increased salt tolerance in *Vigna unguiculata* (L.) Walp. The Association for the Advancement of Industrial Crops. Annual Meeting. International Conference in Saltillo, México. September 14-18, 1997.

2. **Murillo-Amador B**, Troyo-Diéguez E, García-Hernández JL, Landa-Hernández L, Larrinaga-Mayoral JA. El Frijol Yorimón, Leguminosa Tolerante a Sequía y Salinidad. Programa de Agricultura en Zonas Áridas. Publicación de Transferencia y Divulgación No. 2. Edit. CIBNOR, SIMAC, Fundación Produce Baja California Sur A.C. y Gobierno del Estado de Baja California Sur. ISBN: 970-18-5788-7. 27 p.

3. **Murillo-Amador B**, Troyo-Diéguez E, Jones HG, Ayala-Chairez F, Tinoco Ojanguren C, López-Cortés A. 1999. Bases fisiológicas de la respuesta diferencial al NaCl entre genotipos de cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. I. Etapa de germinación. Ponencia presentada en el 2o. Ciclo Académico Agropecuario y 1er. Ciclo de Conferencias Internacionales sobre Producción de Avestruz, celebrado del 15 al 19 de noviembre de 1999, en la UABCS, La Paz, BCS, México. Pp. 13-16.

4. **Murillo-Amador B**, Troyo-Diéguez E, López Cortés A, Hamlyn G. Jones, Tinoco-Ojanguren CL, Ayala-Chairez F. 2000. Características morfológicas de plántulas de chícharo de vaca (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) bajo condiciones salinas. In: Zavala G.F., R. Ortega P., J.A. Mejía C., I. Benítez R y H. Guillén A. (Eds.). Memorias del XVIII Congreso Nacional de Fitogenética: Notas científicas. SOMEFI. Chapingo, México. p. 271.

## Comité Tutorial

### Director de Tesis:

Dr. Enrique Troyo Diéguez.

Centro de Investigaciones Biológicas del  
Noroeste, S.C. La Paz, B.C.S., México.

### Comité Tutorial y Revisor de Tesis:

Dr. Enrique Troyo Diéguez.

Centro de Investigaciones Biológicas del  
Noroeste, S.C. La Paz, B.C.S., México.

Dr. Raúl López Aguilar

Centro de Investigaciones Biológicas del  
Noroeste, S.C. La Paz, B.C.S., México.

Dr. Alejandro López Cortés

Centro de Investigaciones Biológicas del  
Noroeste, S.C., México. La Paz, B.C.S.,  
México

Dr. Hamlyn G. Jones

University of Dundee Dundee DD1 4 HN,  
UK

Dra. Clara Leonor Tinoco Ojanguren

Instituto de Ecología, UNAM,  
Hermosillo, Sonora, México

### Comité Sinodal de Tesis:

Dr. Enrique Troyo Diéguez.

Centro de Investigaciones Biológicas del  
Noroeste, S.C. La Paz, B.C.S., México.

Dr. Alejandro López Cortés

Centro de Investigaciones Biológicas del  
Noroeste, S.C., México. La Paz, B.C.S.,  
México

Dr. Raúl López Aguilar

Centro de Investigaciones Biológicas del  
Noroeste, S.C., México. La Paz, B.C.S.,  
México

Dr. Hamlyn G. Jones

University of Dundee, Dundee DD1 4  
HN, Inglaterra

Dra. Clara Leonor Tinoco Ojanguren

Instituto de Ecología, UNAM,  
Hermosillo, Sonora, México

Dr. Jesús Manuel Luna Cisneros

Universidad Autónoma de Baja California  
Sur. La Paz, BCS, México.

**Dr. Sergio Hernández Vázquez**  
Director del Programa de Estudios de Posgrado  
CIBNOR, S.C.

# **Dedicatoria**

*Con amor, respeto, devoción...*

*Marcela, Claudia, Estefanía y Bernardo*

*Fuentes de amor, inspiración, ternura ...*

# Agradecimientos

A mi poder superior, a mis padres y hermanos, a mis compañeros y amigos.

Al Dr. Mario Martínez García, Director General del CIBNOR, S.C., por darme la oportunidad de participar en el programa de superación del personal académico del Centro. Asimismo, al Dr. Sergio Hernández Vázquez, Director de Estudios de Posgrado por todas las facilidades otorgadas para realizar exitosamente la presente investigación.

A las instituciones financieras que hicieron posible mis estudios y la presente investigación: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (proyectos AGEC-4 y AGEC-7), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Sistema de Investigación del Mar de Cortés y Fundación Produce Baja California Sur, A.C.

Al Dr. Enrique Troyo Diéguez, por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo e invitarme a realizar el presente proyecto de investigación.

A los miembros del Comité Tutorial, Revisores de tesis y Sinodales, Dr. Enrique Troyo Diéguez, Dr. Alejandro López Cortés, Dra. Clara L. Tinoco Ojanguren, Dr. Raúl López Aguilar, Dr. Félix Ayala Chairez†(q.e.p.d.), Dr. Hamlyn G. Jones y Dr. Jesús Manuel Luna Cisneros.

Al Dr. Anthony E. Hall, Dr. B.B. Singh y Dr. Creighton Miller Jr. por sus sugerencias y donación del material genético.

Al personal de la Dirección de Posgrado del CIBNOR, Lic. Leticia González Rubio, Lic. Osvelia Ibarra Morales, Sra. Lupita Sánchez, Sra. María Gómez, Sra. Beatriz Gálvez, Horacio Sandoval, José Manuel Melero.

A mis compañeros Álvaro González, Alejandra Nieto, José Luis García, Juan Larrinaga, Julio Peralta, Edgar Rueda, Andrés Orduño, Héctor Fraga, Verónica Hirales, Silvia Virgen, Lidia Hirales, Rosalía Servín, Luis Landa, Amado Cota, Juan Vega. Al personal de apoyo de la unidad de Guerrero Negro: Amado, Armando, Liz, Marcos, Eduardo, José Luis, Fabián, Juan Diego, Gladys, Gabriela.

A los estudiantes que colaboraron en diversas actividades de esta investigación: Adán Cortés, Nora Velasco, Mayrlein Cadena, Arturo Cárdenas, Israel Raya y Miguel Vélez.

Al personal técnico de apoyo, Ing. Álvaro González Michel, Biol. Carmen Mercado Guido, Ing. Mario Benson Rosas, Lic. Lidia Hirales Lucero, Ing. Alejandro Amador.

Al Dr. Arnoldo Flores Hernández, Dr. Juan Manuel Martínez Reyna, Dra. Juana López, Dr. Alfredo Ortega, Dr. José Luis Ochoa, Dr. Felipe Ascencio, Dr. Victor Barradas, Dr. Ellis Glazier, Caroline Moore, Jean Pender y demás profesores que impartieron cursos y talleres durante mi etapa formativa de doctor en ciencias.

A los compañeros del doctorado, Ramón Cepeda, Roberto Carlos Morales, Juan Larrinaga, Luis Brito, Carlos Pérez, Iván Murillo, Eduardo Ruiz, César Ruiz, Antonio Luna, Daniel Prado, Ángel Campa.

Al personal de la imprenta del CIBNOR, Margarito Rodríguez, Santiago Rodríguez y Rubén Andrade.

A todas aquellas personas que de una u otra manera colaboraron para culminar exitosamente el presente trabajo de investigación.

# Índice de Contenido

|  |             |
|--|-------------|
| <b>Prefacio</b> .....  | <b>ii</b>   |
| <b>Comité Tutorial</b> .....   | <b>iv</b>   |
| <b>Dedicatoria</b> .....   | <b>v</b>    |
| <b>Agradecimientos</b> .....   | <b>vi</b>   |
| <b>Índice de Contenido</b> .....   | <b>vii</b>  |
| <b>Índice de Tablas</b> .....  | <b>ix</b>   |
| <b>Índice de Figuras</b> .....   | <b>xi</b>   |
| <b>Lista de Abreviaturas</b> .....   | <b>xiv</b>  |
| <b>Resumen</b> .....   | <b>xv</b>   |
| <b>Abstract</b> .....  | <b>xvii</b> |
| <b>1. Antecedentes</b> .....   | <b>1</b>    |
| 1.1. El problema de la salinidad en el ámbito mundial .....                            | 1           |
| 1.2. El problema de la salinidad en México .....                                       | 1           |
| 1.3. El problema de la salinidad en Baja California Sur .....                          | 2           |
| <b>2. Introducción</b> .....   | <b>3</b>    |
| 2.1. Origen y tipos de sales .....   | 6           |
| 2.1.1. <i>Tipos de sales</i> .....   | 6           |
| 2.1.2. <i>Origen de la sal terrestre</i> .....   | 7           |
| 2.1.3. <i>Origen de la sal del océano</i> .....  | 7           |
| 2.2. Factores de inhibición del crecimiento vegetal por estrés salino .....            | 8           |
| 2.2.1. <i>Efecto osmótico</i> .....  | 8           |
| 2.2.2. <i>Efecto iónico específico</i> .....   | 9           |
| 2.2.3. <i>Efecto del sodio intercambiable</i> .....                                    | 9           |
| 2.1.2. <i>Origen de la sal terrestre</i> .....   | 7           |
| 2.3. Mecanismos de tolerancia a la salinidad .....                                     | 11          |
| 2.3.1. <i>Exclusión iónica (selectividad)</i> .....                                    | 11          |
| 2.3.2. <i>Acumulación iónica</i> .....   | 13          |
| 2.3.3. <i>Ajuste osmótico</i> .....  | 13          |
| 2.3.4. <i>Síntesis de compuestos orgánicos de bajo peso molecular</i> .....            | 14          |
| 2.3.5. <i>Uso eficiente de agua</i> .....  | 15          |
| <b>3. Objetivos</b> .....  | <b>16</b>   |
| 3.1. Objetivo general .....  | 16          |
| 3.2. Objetivos particulares .....  | 16          |
| <b>4. Resultados</b> .....   | <b>17</b>   |
| 4.1. Efecto de la salinidad en la germinación .....                                    | 22          |
| 4.1.1. <i>Efecto del tiempo de inmersión de la semilla en soluciones salinas</i> ..... | 22          |
| 4.1.2. <i>Selección y clasificación de genotipos en respuesta a la salinidad</i> ..... | 32          |
| 4.2. Efecto de la salinidad en la etapa de emergencia .....                            | 45          |
| 4.2.1. <i>Efecto de soluciones salinas en las características de plántulas</i> .....   | 45          |



|  |            |
|--|------------|
| 4.2.2. Selección y clasificación de genotipos en respuesta a la salinidad .....                          | 52         |
| 4.3. Efecto de la salinidad en la plántula y en el crecimiento vegetativo inicial .....                  | 65         |
| 4.3.1. En el crecimiento, absorción y distribución de iones en la plántula .....                         | 65         |
| 4.3.2. En la sobrevivencia, absorción y distribución de iones durante el<br>crecimiento vegetativo ..... | 78         |
| 4.3.3. En la alteración de procesos fisiológicos y concentración de iones .....                          | 95         |
| <b>5. Discusión general.....</b>   | <b>111</b> |
| 5.1. Efecto de la salinidad en la germinación .....  | 111        |
| 5.2. Efecto de la salinidad en la etapa de emergencia.....   | 118        |
| 5.3. Efecto de la salinidad en el establecimiento y crecimiento de plántulas .....                       | 121        |
| 5.4. Efecto de la salinidad en el crecimiento vegetativo .....   | 125        |
| <b>6. Conclusiones .....</b>   | <b>142</b> |
| <b>7. Perspectivas.....</b>  | <b>144</b> |
| <b>8. Referencias Bibliográficas .....</b>   | <b>145</b> |

# Índice de Tablas

|  |           |
|--|-----------|
| <b>4.1. Efecto de la salinidad en la germinación .....</b>   | <b>22</b> |
| <i>4.1.2. Selección y clasificación de genotipos en respuesta a la salinidad .....</i>   | <i>32</i> |
| Tabla 1. Origen de los genotipos de frijol yorimón .....   | 32        |
| Tabla 2. Cuadrados medios del análisis de varianza de las variables porcentaje y tasa de germinación de genotipos de frijol yorimón bajo condiciones salinas durante la etapa de germinación.....  | 36        |
| Tabla 3. Medias genotípicas de las variables porcentaje y tasa de germinación de 25 genotipos de frijol yorimón en tres niveles salinos .....  | 38        |
| Tabla 4. Predicción de niveles de salinidad que afectan el 90%, 75% y 50% del porcentaje de germinación de 25 genotipos de frijol yorimón calculados mediante la técnica de regresión inversa.....                                       | 40        |
| <b>4.2. Efecto de la salinidad en la etapa de emergencia.....</b>  | <b>45</b> |
| <i>4.2.1. Efecto de soluciones salinas en las características de plántulas .....</i>   | <i>45</i> |
| Tabla 1. Análisis de coeficientes de senderos de cada nivel salino en NAR, CGR y LAR sobre RGR, en plántulas de frijol yorimón bajo condiciones salinas.....   | 50        |
| <i>4.2.2. Selección y clasificación de genotipos en respuesta a la salinidad .....</i>   | <i>52</i> |
| Tabla 1. Genotipos de frijol yorimón evaluados para determinar el efecto de la salinidad .....   | 55        |
| Tabla 2. Cuadrados medios del análisis de varianza de porcentaje y tasa de emergencia, relación raíz-parte aérea en base a peso seco y biomasa de genotipos de frijol yorimón afectados por la salinidad en la etapa de emergencia ..... | 57        |
| Tabla 3. Media del porcentaje y tasa de emergencia de 25 genotipos de frijol yorimón en tres niveles salinos (0, 85 y 70 mmol NaCl/L) .....  | 59        |
| Tabla 4. Medias de genotipos para la relación raíz-parte aérea en peso seco y biomasa de 25 genotipos de frijol yorimón en tres niveles salinos (0, 85 y 170 mmol NaCl/L).....   | 60        |

|  |           |
|--|-----------|
| Tabla 5. Predicción de niveles de salinidad (mmol NaCl/L) que afectan el 90, 75 y 50% de emergencia, calculado mediante la técnica de la regresión inversa .....                     | 63        |
| <b>4.3. Efecto de la salinidad en la plántula y en el crecimiento vegetativo inicial.....</b>  | <b>65</b> |
| <i>4.3.1. En el crecimiento, absorción y distribución de iones en la plántula .....</i>  | <i>65</i> |
| Tabla 1. Promedio y significancia de características morfológicas de plántulas de ocho genotipos de chícharo de vaca en condiciones salinas .....                                    | 72        |
| <i>4.3.2. En la sobrevivencia, absorción y distribución de iones durante el crecimiento vegetativo .....</i>   | <i>78</i> |
| Tabla 1. Genotipos de frijol yorimón evaluados bajo condiciones salinas durante la etapa inicial del crecimiento.....  | 81        |
| Tabla 2. Clasificación de genotipos de frijol yorimón basado en el porcentaje de sobrevivencia de plántulas sometidas a 85 y 170 mmol NaCl/L durante el crecimiento vegetativo ..... | 86        |
| <i>4.3.3. En la alteración de procesos fisiológicos y concentración de iones .....</i>   | <i>95</i> |
| Tabla 1. Clasificación genotípica y país de origen de los genotipos comparados. Realizada previamente por Murillo-Amador et al (datos no publicados)....                             | 97        |

# Índice de Figuras

|   |           |
|---|-----------|
| <b>4.1. Efecto de la salinidad en la germinación .....</b>  | <b>22</b> |
| 4.1.1. <i>Efecto del tiempo de inmersión de la semilla en soluciones salinas .....</i>  | <i>22</i> |
| Figura 1 Efecto de los tiempos de inmersión y los tratamientos salinos sobre el peso de semillas tratadas, porcentaje de germinación y la relación entre el peso de semillas tratados con los tiempos de inmersión. ....  | 26        |
| Figura 2 Relación entre la biomasa total, el área foliar, longitud de parte aérea longitud de raíz, peso seco de parte aérea y de raíz con la salinidad. ....   | 30        |
| 4.1.2. <i>Selección y clasificación de genotipos en respuesta a la salinidad .....</i>  | <i>32</i> |
| <b>4.2. Efecto de la salinidad en la etapa de emergencia.....</b>   | <b>45</b> |
| 4.2.1. <i>Efecto de soluciones salinas en las características de plántulas .....</i>  | <i>45</i> |
| Figura 1 Relación de la salinidad con NAR, RGR, LAR y CGR en plántulas de frijol yorimón durante su crecimiento inicial .....   | 49        |
| Figura 2 Diagrama de la relación causal entre las variables predictoras NAR, CGR, y LAR y la respuesta de la variable RGR. ....   | 51        |
| 4.2.2. <i>Selección y clasificación de genotipos en respuesta a la salinidad .....</i>  | <i>52</i> |
| Figura 1 Efecto de la salinidad en la relación raíz-parte aérea y la relación raíz-parte aérea en base a longitud de genotipos tolerantes y sensibles a la salinidad.....   | 61        |
| Figura 2 Efecto de la salinidad sobre el porcentaje de emergencia de genotipos de frijol yorimón tolerantes y sensibles a la salinidad.....   | 64        |
| <b>4.3. Efecto de la salinidad en la plántula y en el crecimiento vegetativo inicial.....</b>   | <b>65</b> |
| 4.3.1. <i>En el crecimiento, absorción y distribución de iones en la plántula .....</i>   | <i>65</i> |
| Figura 1 Concentración de Na <sup>+</sup> y Cl <sup>-</sup> en raíz y parte aérea y efecto del incremento de la salinidad en la concentración de Na <sup>+</sup> y Cl <sup>-</sup> en raíz y parte aérea en genotipos de frijol yorimón tolerantes, intermedios y sensibles a la salinidad . .... | 71        |
| Figura 2 Relación de K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> en raíz y parte aérea y efecto del incremento  |           |

|          |   |     |
|----------|---|-----|
|          | de la salinidad en parte aérea y raíz en genotipos de frijol yorimón tolerantes, intermedios y sensibles a la salinidad.....  | 73  |
| Figura 3 | Relación de $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ en raíz y parte aérea y efecto del incremento de la salinidad en parte aérea y raíz en genotipos de frijol yorimón tolerantes, intermedios y sensibles a la salinidad.....   | 74  |
|          | <i>4.3.2. En la sobrevivencia, absorción y distribución de iones durante el crecimiento vegetativo</i> .....  | 78  |
| Figura 1 | Porcentaje de plántulas muertas en 25 genotipos de frijol yorimón bajo condiciones salinas. ....  | 85  |
| Figura 2 | Relación entre la absorción de $\text{Na}^{+}$ y $\text{Cl}^{-}$ y la tolerancia varietal a la salinidad en genotipos de frijol yorimón bajo condiciones salinas.....   | 87  |
| Figura 3 | Efecto del NaCl sobre la concentración de $\text{Na}^{+}$ y $\text{Cl}^{-}$ en diferentes partes de la planta en genotipos de frijol yorimón tolerantes, moderadamente tolerantes, moderadamente sensibles y sensibles a la salinidad.....  | 88  |
| Figura 4 | Efecto de la concentración salina externa sobre el $\text{Na}^{+}$ y el $\text{Cl}^{-}$ en raíz y parte aérea en genotipos de frijol yorimón tolerantes, moderadamente tolerantes, moderadamente sensibles y sensibles a la salinidad.....  | 89  |
| Figura 5 | Diferencias genotípicas de frijol yorimón bajo tratamientos salinos en la producción de biomasa de genotipos tolerantes, moderadamente tolerantes, moderadamente sensibles y sensibles a la salinidad. Relación entre el $\text{Na}^{+}$ y $\text{Cl}^{-}$ en parte aérea y biomasa. .... | 90  |
|          | <i>4.3.3. En la alteración de procesos fisiológicos y concentración de iones</i> .....  | 95  |
| Figura 1 | Efecto de la salinidad sobre la concentración de $\text{Na}^{+}$ , $\text{Cl}^{-}$ , $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{K}^{+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ y P en diferentes partes de la planta de genotipos que difieren en su tolerancia a la salinidad. ....   | 101 |
| Figura 2 | Efecto de la salinidad sobre la concentración de $\text{Na}^{+}$ y $\text{Cl}^{-}$ en raíz y parte aérea de genotipos de frijol yorimón tolerantes, moderadamente tolerantes, moderadamente sensibles y sensibles a la salinidad.....   | 102 |
| Figura 3 | Efecto de la salinidad sobre la concentración de $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{K}^{+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ y P en parte aérea de genotipos de frijol yorimón tolerantes, moderadamente tolerantes, moderadamente sensibles y sensibles a la salinidad.....                                     | 103 |

|                                |   |            |
|--------------------------------|---|------------|
| Figura 4                       | Efecto de la salinidad sobre la transpiración, la conductividad estomática y clorofila en genotipos de frijol yorimón tolerantes, moderadamente tolerantes, moderadamente sensibles y sensibles a la salinidad. Relación entre la transpiración y la conductividad estomática. .... | 104        |
| <b>Discusión general</b> ..... |   | <b>111</b> |
| Figura 1                       | Efecto de la salinidad en la succulencia y potencial hídrico de genotipos tolerantes (Paceño, CB-27 y CB-3) y sensibles (IT89KD-288, IT93K-34 e IT89KD-391) a la salinidad.....   | 141        |

# Lista de Abreviaturas

|                      |  |
|----------------------|--|
| TAN                  | Tasa de Asimilación Neta   |
| NAR                  | Net Assimilation Rate  |
| IAF                  | Índice de Area Foliar  |
| LAR                  | Leaf Area ratio  |
| TCC                  | Tasa de Crecimiento del Cultivo  |
| CGR                  | Crop Growth Rate   |
| TCR                  | Tasa de Crecimiento Relativo   |
| RGR                  | Relative Growth Rate   |
| NaCl                 | Cloruro de Sodio   |
| NW                   | north-west   |
| cv                   | Cultivar   |
| ANOVA                | Análisis de Varianza   |
| GLM                  | General Linear Models  |
| meq/L <sup>-1</sup>  | miliequivalentes por litro   |
| mmol/L <sup>-1</sup> | milimoles por litro  |
| FAO                  | Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación |
| SARH                 | Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (hoy SAGARPA)           |
| INEGI                | Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática                |
| dS m <sup>-1</sup>   | decisiemens por metro  |
| mM L <sup>-1</sup>   | milimoles por litro  |
| CO <sup>2</sup>      | bióxido de carbono   |
| IITA                 | International Institute of Tropical Agriculture                          |
| CA                   | California   |
| USA                  | United States of America   |
| ISTA                 | International Seed testing Association                                   |
| CIBNOR               | Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste                        |
| R <sup>2</sup>       | coeficiente de determinación   |
| r                    | coeficiente de correlación   |
| mg/L                 | miligramos por litro   |
| Mpa                  | megapascales   |
| SAS                  | Statistical Analysis System  |
| d.f.                 | degree freedom   |

# Resumen

El presente trabajo de investigación contiene estudios en los cuales se comparó la respuesta diferencial a la salinidad en las etapas de germinación, emergencia, establecimiento y crecimiento de plántulas y en el crecimiento vegetativo inicial de genotipos de frijol yorimón estresados bajo condiciones de laboratorio, cámara de crecimiento e invernadero. Para determinar la respuesta en cada una de las etapas de crecimiento seleccionadas, los diversos genotipos fueron expuestos a estrés salino mediante la adición de NaCl y se utilizaron como criterios comparativos la medición de: (A) variables morfológicas: 1) longitud, peso fresco y seco de la parte aérea, 2) longitud, peso fresco y seco de las raíces, 3) área foliar, 4) número de hojas trifoliadas y 5) biomasa total; (B) índices como: 1) tasa y porcentaje de germinación, 2) tasa y porcentaje de emergencia, 3) relación raíz / parte aérea en peso seco, 4) relación raíz / parte aérea en longitud, 5) índice de sobrevivencia; (C) parámetros fisiotécnicos: 1) tasa de asimilación neta, 2) tasa de crecimiento del cultivo, 3) tasa de crecimiento relativo, 4) transpiración, 5) conductividad estomática, 6) temperatura foliar, 7) contenido de clorofila, 8) succulencia, 9) contenido relativo de agua y 10) potencial hídrico; (D) contenido iónico: 1) absorción y distribución de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ , P y N en los diferentes órganos de la planta.

Los resultados obtenidos en las etapas de germinación y emergencia muestran que tanto la tasa como el porcentaje de germinación y emergencia se afectaron por la salinidad y que al igual que el área foliar, tamaño y producción de biomasa de los genotipos evaluados disminuyeron conforme se incrementó la concentración de NaCl en el medio de cultivo. Asimismo, se encontró que existe una gran variabilidad genética entre genotipos para tolerar la salinidad durante estas etapas y debido a que muchas especies responden diferencialmente al estrés salino de acuerdo con la edad de las plantas, el material genético fue tamizado, seleccionado y clasificado para evaluar su comportamiento en las etapas posteriores del desarrollo

Cuando los genotipos se evaluaron bajo condiciones controladas y en altas concentraciones salinas en su etapa inicial del crecimiento, se encontró que las variables: altura de planta, área foliar, peso fresco, peso seco, longitud de masa de raíces, número de hojas trifoliadas y biomasa total de las plantas, disminuyeron por efecto de la salinidad. En esta etapa, los genotipos clasificados como sensibles a la salinidad presentaron concentraciones mayores de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en la parte aérea, mientras que los más tolerantes presentaron concentraciones más bajas. La reducción del transporte de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  al follaje por parte de los genotipos tolerantes fue causado por una mayor selectividad de las membranas a la entrada de iones tóxicos y/o una mayor capacidad de retención de iones en las raíces, por lo que se considera que estos genotipos



emplean estas estrategias para excluir  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  de la parte aérea y de esta manera mantener niveles bajos de sales en las hojas.

Adicionalmente, las relaciones  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$  se consideraron buenos indicadores de la tolerancia a la salinidad, ya que los genotipos tolerantes mantuvieron valores altos en ambas relaciones, mientras que en los genotipos clasificados como intermedios y sensibles al estrés salino se encontraron valores bajos. Los genotipos clasificados como tolerantes a la salinidad en germinación también se clasificaron como tolerantes en emergencia, sin embargo, al someter a estrés salino este material en etapas más avanzadas del crecimiento, no se encontraron resultados que permitieran una clasificación similar a la efectuada en etapas anteriores, por lo que se sugiere que la tolerancia a la salinidad en frijol yorimón difiere con la edad. Las plantas tienden a ser más sensibles a la salinidad durante las etapas iniciales de su crecimiento vegetativo y la resistencia se va incrementando conforme van madurando.

El método de selección de genotipos de frijol yorimón para tolerancia a salinidad basado en la sobrevivencia de plántulas, se considera efectivo y en los genotipos clasificados como tolerantes mediante este procedimiento también se encontró que su tolerancia estuvo relacionada a una menor absorción y concentración de iones tóxicos ( $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ) en la parte aérea, mayor producción de biomasa y una reducción en la pérdida excesiva de agua al mantener potenciales hídricos y tasas de transpiración bajas en altas concentraciones salinas.

Con estos trabajos se establece que en las etapas de germinación y emergencia, el retraso y la disminución de estos procesos fisiológicos por la salinidad se debe a un efecto osmótico más que a un efecto iónico, mientras que conforme las plantas alcanzan etapas vegetativas más avanzadas y adquieren mayor madurez, la selectividad de las membranas a los iones tóxicos se incrementa y con esto se previene la absorción y movimiento de iones como el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Cl}^-$ , proporcionándoles mayor tolerancia a la salinidad. Por otro lado, es recomendable seleccionar genotipos que bajo condiciones salinas manifiesten altas tasas de crecimiento, mismos que deberán presentar una mayor producción de biomasa, característica que les permitirá diluir más efectivamente las concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en sus órganos, particularmente en las hojas.

En conclusión, los experimentos en etapas de germinación y emergencia, permitieron tamizar genotipos emparentados y seleccionar genotipos como fuente de germoplasma de manera sencilla y rápida. Sin embargo, con la evaluación de este material genético realizada en etapas más avanzadas del crecimiento, se logró seleccionar y clasificar genotipos con características morfo-fisiológicas deseables para tolerar salinidad que puedan ser manifestadas mediante mejoramiento genético para la obtención de cultivares con un mayor grado de tolerancia al estrés salino.

## Abstract

The present work of research contains studies in which the differences in response to salinity on germination, emergency, growth and establishment of seedlings, and vegetative growth stage of cowpea genotypes were compared under laboratory, growth chamber and greenhouse conditions. To determine the response in each stage of the growth, the genotypes were exposed to saline stress by means of the addition of NaCl and the next criteria were used as comparative approaches: (A) morphological variables: 1) length, fresh and dry weight of aerial part, 2) length, fresh and dry weight of roots, 3) leaf area, 4) number of trifoliolate leaves and 5) total biomass; (B) ratios as: 1) rate and percentage of germination, 2) rate and percentage of emergency, 3) root/shoot dry weight ratio, 4) root/shoot length ratio, 5) survival ratio; (C) physiological traits: 1) net assimilation rate, 2) crop growth ratio, 3) relative growth rate, 4) transpiration, 5) stomatal conductance, 6) leaf temperature, 7) chlorophyll content, 8) succulence, 9) relative water content and 10) water potential; (D) ionic content: 1) absorption and distribution of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ , P and N in the different organs of the plant.

The results obtained in the germination and emergency stages showed that as much the rate as the percentage of germination and emergency were affected by the salinity and that same that leaf area, size and production of biomass of the genotypes evaluated, decreased as concentration of NaCl increased in the culture medium. In the same way, it was found that a great genetic variability exists among genotypes to tolerate the salinity during these stages and because many species respond differentially to the saline stress agreement with the age of the plants, the genetic material was screened, selected and classified to evaluate their response to salinity in the later growth stages.

When the genotypes were evaluated under controlled conditions and in high saline concentrations in their initial growth, it was found that the variables: plant height, leaf area, fresh weight, dry weight, length of root mass, number of trifoliolate leaves, and total biomass, decreased for effect of the salinity. In this stage, the genotypes classified as sensitive to the salinity showed higher concentrations of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  in the aerial part, while the most tolerant showed lower concentrations. The reduction of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  transport to the foliage on the tolerant genotypes was caused by a bigger selectivity of the membranes to the entrance of toxic ions and/or a bigger capacity to retention of these ions in the roots, therefore is considered that these genotypes use these strategies to exclude  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  to the aerial part and of this way maintain low levels of salts in the leaves.

Additionally, the  $K^+/Na^+$  and  $Ca^{2+}/Na^+$  ratios were considered as good indicators of the tolerance to the salinity, since the tolerant genotypes maintained high values in both ratios, while in the genotypes classified as intermediate and sensitive to the saline stress showed the contrary. The genotypes classified as tolerant to the salinity in germination were also classified as tolerant in emergency. However, when were subjected to saline stress in more advanced stages of the growth, they were not results that they allowed a similar classification to the actual one in previous stages, therefore is suggested that the tolerance to the salinity in cowpea differs with the age. The plants tend to be more sensitive to the salinity during the initial vegetative growth and the resistance increasing in agreement they go maturing.

The selection method of cowpea genotypes for tolerance to salinity based on the seedlings surviving, it is considered effective and in the genotypes classified as tolerant by means of this procedure was found also that its tolerance was related to a smaller absorption and concentration of toxic ions ( $Na^+$  and  $Cl^-$ ) in the aerial part, high biomass production and a reduction in the excessive loss of water maintaining water potential and low transpiration rates in high saline concentrations.

Considering the above it is possible to establish that in the germination and emergence stages, the delay and the decrease of these physiologic processes by the salinity is due to an osmotic effect more than even ionic effect, while it conforms the plants they reach more advanced vegetative stages and they acquire bigger maturity, the selectivity of the membranes to the toxic ions it is increased and prevent the absorption and movement of ions like the  $Na^+$  and the  $Cl^-$ , providing bigger tolerance to the salinity. On the other hand, it is advisable to select genotypes that under saline conditions show high growth rates, because they will show a high biomass production, characteristic that will allow them to dilute the concentrations of  $Na^+$  and  $Cl^-$  more indeed in their organs, particularly in the leaves.

In conclusion, the experiments in germination and emergency stages, allowed to screen related genotypes and to select genotypes a simple and quick way like a source of germplasm. However, with the evaluation of this genetic material carried out in more advanced stages of the growth, it was possible to select and to classify genotypes with characteristic morpho-physiologic desirable to tolerate salinity that can be manifested by means of genetic improvement for the obtaining of cultivars with a bigger degree of tolerance to the saline stress.

# 1. Antecedentes

## 1.1. El problema de la salinidad en el ámbito mundial

La salinidad afecta alrededor de 1 billón de hectáreas del área total de tierras del mundo; aproximadamente el 60% de las tierras cultivadas, las cuales incluyen 1/3 del área de suelo irrigado (Epstein *et al.* 1980; Chowdhury *et al.* 1993; Ramagopal, 1993). Por tal motivo, es como un sueño y una tarea formidable del hombre poder sembrar diferentes cultivos en las vastas áreas de tierras salinizadas (El-Saidi, 1997). Se han realizado esfuerzos para superar este problema, principalmente modificando el ambiente salino, por ejemplo, la recuperación de suelos, drenaje, uso de fracciones con alto drenaje, aplicación de enmiendas al suelo y el mejoramiento o selección de cultivares tolerantes a la salinidad (Chowdhury *et al.* 1993; Grover *et al.* 1993). De cualquier manera, mucho de lo que se ha hecho para modificar estas tecnologías tiene un costo efectivo y viable (Singh *et al.* 1997).

El problema de la salinidad se presenta en todos los continentes, según López (1995), en la India existen casi 11,234,600 hectáreas afectadas por la sal [2,023,500 contienen sodio ( $\text{Na}^+$ ), carbonato ( $\text{CO}_3$ ), bicarbonato ( $\text{HCO}_3$ ) y sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ); aproximadamente, 1,207,100 se afectaron por los riegos salitrosos de las cuales poco más o menos 526,010 hectáreas fueron severamente dañadas]. África tiene alrededor de 121,410 hectáreas afectadas. Europa 637,588 hectáreas dañadas. Australia tiene serios problemas con el sodio además del sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y del sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ ) que daña extremadamente al suelo. En América del Norte (Canadá, Estados Unidos, línea costera del golfo de México) existen entre 8 y 12 millones de hectáreas afectadas por la sal; en Sudamérica (río Amazonas, zona árida del Pacífico, áreas del Ecuador, Perú, Argentina, Chile y norte de Brasil) se observan, aproximadamente, 25,000 hectáreas afectadas y en Norteamérica (lago de Texcoco, Mexicali, Río Grande, Ciudad Juárez y el sur de El Paso, Texas, en Estados Unidos) el  $\text{Na}^+$  se presenta a razón de 90%.

## 1.2. El problema de la salinidad en México

Desde 1984, la SARH reportó que en México se tienen áreas agrícolas afectadas por sales y que con el tiempo reducirán su productividad. Para ese año, se reporta un total de 465

mil hectáreas (18% del total) afectadas por salinidad en el agua o en el suelo, principalmente en los distritos de riego del país. Por otro lado, Aceves (1981) reporta que el 33% de la superficie bajo riego en México, se encuentra afectada en mayor o menor grado, disminuyendo notablemente la productividad en algunos distritos de riego y causando pérdidas económicas considerables al país. Recientemente, se reporta que en México, entre 1.8 y 4.0 millones de los 12 millones de hectáreas de tierras bajo riego tienen altas concentraciones de sales que reducen el rendimiento de los cultivos (Madrigal *et al.* 1996).

### **1.3. El problema de la salinidad en Baja California Sur**

En el Estado de Baja California Sur el agua es escasa y está en función directa de las precipitaciones que se presentan, gran porcentaje de éstas se evapotranspiran y escurren al mar y el agua escasa que permanece en el continente se infiltra al subsuelo para recarga de acuíferos (INEGI, 1996). Este Estado está enmarcado en cuatro regiones hidrológicas, (i) Baja California Centro-Oeste (Vizcaíno), (ii) Baja California Sur-Oeste (Magdalena), (iii) Baja California Centro-Este (Santa Rosalía) y (iv) Baja California Sur-Este (La Paz), las cuales forman parte de la vertiente del Océano Pacífico y Golfo de California. La calidad del agua subterránea de éstas regiones varía en un rango promedio de 100 a 6000 mg/l de sólidos totales disueltos y se ubica de dulce a salada (INEGI, 1996). La región de mayor importancia es la denominada Baja California Sur-Oeste (Magdalena) en la cual se encuentra ubicado el valle de Santo Domingo que es considerado el área agrícola más importante del Estado de Baja California Sur. Este valle enfrenta la problemática del constante aumento en la concentración de sales del suelo y agua, producto, principalmente de la intrusión salina, ocasionando un deterioro en la calidad de este recursos y una reducción en la productividad de los cultivos. En la mayoría de los casos, las aguas son de tipo C3\* y C4\*\*, por lo que deben utilizarse en zonas con buen drenaje en el suelo y con cultivos de buena tolerancia a la salinidad (Escolero, 1998). Los parámetros que comúnmente rebasan son (i) sólidos totales disueltos, (ii) magnesio, (iii) sodio y (iv) cloro (Escolero, 1998; Navejas, 1995).

---

\* C3= Agua altamente salina. No puede usarse en suelos cuyo drenaje sea deficiente. Aun con drenaje adecuado se pueden necesitar prácticas especiales de control de la salinidad, debiendo por lo tanto, seleccionar únicamente aquellas especies vegetales muy tolerantes a sales.

\*\* C4= Agua muy altamente salina. No es apropiada para riego bajo condiciones ordinarias, pero puede usarse ocasionalmente en circunstancias muy especiales. Los suelos deben ser permeables, el drenaje adecuado, debiendo aplicarse un exceso de agua para lograr un buen lavado; en este caso, se deben seleccionar cultivos altamente tolerantes a sales.

## 2. Introducción

Uno de los múltiples problemas que día a día se presentan como un reto a la humanidad es la salinidad (López, 1995), que al igual que la sequía permanece como uno de los problemas ambientales más antiguos y más graves del mundo, principalmente en regiones áridas y semiáridas (McWilliam, 1986). La acumulación de sales altamente solubles en un suelo puede disminuir significativamente el valor de la productividad de las tierras agrícolas (Pessaraki, 1999). La salinidad no sólo ocasiona descensos en la producción de los cultivos, sino que además transforma en zonas estériles grandes áreas terrestres que antaño eran terrenos productivos (López, 1995).

La FAO (1996) estima que de los 237 millones de hectáreas de tierras de regadío, alrededor de 30 millones están gravemente afectadas por la sal. Otros 80 millones de hectáreas se han visto afectados en cierta medida y cada año se pierden cerca de 1.5 millones de hectáreas de tierras de riego debido al anegamiento y la salinidad.

La salinidad es la principal causa de la reducción del rendimiento de las plantas (Boyer, 1982; Shannon, 1996), además, disminuye la calidad de frutos y hortalizas (Shannon, 1996). La disminución del rendimiento por la salinización se conoce desde hace mucho tiempo; así, desde los inicios de 1900, varias investigaciones de los efectos de las sales sobre el crecimiento de las plantas se han llevado a cabo cubriendo un rango de aspectos desde la respuesta de la planta a la salinidad hasta el comportamiento de la sal en los suelos. Los estudios fisiológicos han revelado que los mayores efectos de la salinidad sobre el crecimiento de las plantas son osmóticos y efectos por iones específicos; asimismo, las diferencias en la tolerancia a la salinidad entre especies de plantas también han sido muy reconocidos (Pessaraki, 1999).

Aunque la agricultura científica inició estudiando la tolerancia de las plantas a la salinidad hace casi 50 años al principio de los 50's (Ayers *et al.*, 1952; Bernstein y Hayward, 1958; Mehta y Desai, 1959), existe un gran interés en seguir trabajando sobre este tema (Pessaraki, 1999). En este sentido, se han realizado muchas investigaciones en diferentes especies de plantas sobre la absorción de minerales bajo condiciones salinas; se ha buscado cultivar especies de pastos tolerantes a la salinidad para recuperar los suelos salinos (Qadir *et*

al. 1996); se han utilizado cianobacterias fijadoras de nitrógeno tolerantes a la salinidad durante el crecimiento de las plantas y parece ser que son una posibilidad atractiva para la recuperación y el mejoramiento de los suelos salinos (Apte y Thomas, 1997); asimismo, se ha encontrado que las especies perennes parecen estar mejor adaptadas para propósitos de rehabilitación de suelos bajo condiciones salinas (De Villiers *et al.* 1997).

Históricamente, se han estado realizando muchos esfuerzos para manejar la salinidad alta en el agua o en el suelo, los cuales han sido orientados principalmente a la sustitución de cultivos y el manejo agrícola (Shannon, 1996). La sustitución de cultivos o el reemplazo de cultivos sensibles a la salinidad con cultivos más tolerantes, se ha practicado desde los inicios de la agricultura (Shannon, 1987) y es aún, probablemente una de las estrategias más fáciles y más prácticas para ocuparse del problema de la salinidad. A pesar de todos los esfuerzos realizados, el papel que juega la tolerancia a la salinidad en causar las diferencias en el crecimiento y desarrollo, absorción de nutrientes, el metabolismo entre varias plantas, entre especies de plantas y en las diferentes etapas del crecimiento, es aún la mayor preocupación e interés entre los investigadores y no está del todo entendido (Pessarakli, 1999).

Cuando no hay disponibilidad de agua de buena calidad para riego o para drenaje, la sustitución de cultivos ha sido la principal aproximación para ocuparse del problema de la salinidad. Así, muchos cultivos tolerantes a la salinidad han sido sustituidos por especies sensibles a la salinidad. Por ejemplo, la cebada puede ser sustituida por el trigo, el algodón por maíz, la remolacha por lechuga, etc. (Shannon, 1996); sin embargo, la gran mayoría de especies cultivadas son extremadamente sensibles a la salinidad y hay grandes diferencias entre especies y/o variedades en su crecimiento como respuesta a la salinidad (Maas y Hoffman, 1977; Greenway y Munns, 1980); por lo que el uso de especies tolerantes o moderadamente tolerantes a la salinidad es una necesidad apremiante y surge como otra posible solución para enfrentar el problema de la salinidad.

En este sentido, en el presente trabajo de tesis se eligió trabajar ante todo con una especie similar, moderadamente tolerante a la salinidad y con posibilidades de sustituir al frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), el cual está clasificado como sensible a la salinidad (Ayers y Westcot, 1985), además, el hecho de descubrir o estudiar las bases fisiológicas de la tolerancia a la salinidad en la especie bajo estudio y el uso de este conocimiento para obtener más cultivares tolerantes a la salinidad, mediante métodos y procedimientos de mejoramiento genético

convencional y modernos, podrá resultar en un incremento sustancial en la producción de alimentos principalmente en las regiones áridas y semiáridas. Finalmente, se eligió trabajar también con esta especie porque los efectos de la salinidad en el crecimiento, absorción y utilización de nutrientes, métodos de selección de genotipos y relaciones hídricas de estas plantas bajo condiciones de estrés salino no han sido estudiados ni documentada con suficiencia.

La especie propuesta y bajo estudio es el frijol yorimón (*Vigna unguiculata* L. Walp.) conocido internacionalmente como "cowpea". El frijol yorimón, se siembra ampliamente en diferentes partes del mundo para diversos propósitos, por ejemplo, en el oeste de África (Hall y Dancette, 1978; Lush, 1979), en la India (Balasubramanian y Sinha, 1976) y en Estados Unidos de América (Turk *et al.* 1980) se consume su grano seco; en el este de África (Imbamba, 1973; Lush, 1979) se consume como una hortaliza o como verdura; en Australia (Molnar, 1961; Russell, 1976) se utiliza como cultivo forrajero para la alimentación del ganado.

En Estados Unidos de América, las semillas verdes se tuestan como si fueran cacahuates y se consumen de ésta manera. En Sudán y Etiopía, las raíces se consumen como hortaliza y ocasionalmente los granos quemados o tostados se usan como sustitutos del café. En el Norte de Nigeria, los pedúnculos son usados como fibra. En México, el frijol yorimón, también es conocido como morado, gelatina y plateado. La región de mayor importancia abarca los municipios de Río Bravo, Valle Hermoso y Matamoros, Tamaulipas, México y su producción de vaina se exporta para la industria y el mercado en fresco de los Estados Unidos de América (Díaz y Ortegón, 1997). Esta especie se siembra en un rango amplio de condiciones climáticas que van desde las semiáridas hasta las subhúmedas y como cultivo de secano (Lush y Rawson, 1979); también se ha reportado que tiene buena tolerancia al calor y a la sequía (Rachie y Roberts, 1974), asimismo, es moderadamente tolerante a la salinidad, con mayor tolerancia que el maíz, pero menor que el trigo, cebada, remolacha y algodón (Hall y Frate, 1996). Aunque se ha adaptado muy bien a zonas con condiciones de sequía (Hall y Dancette, 1978; Turk y Hall, 1980a, 1980b, 1980c; Turk *et al.* 1980) también esta especie presenta un potencial alto de rendimiento bajo condiciones de riego (Turk *et al.* 1980; Rachie y Roberts, 1974).



Por otro lado, es bien conocido que la tolerancia de las plantas a la salinidad no solamente difiere entre especies, sino que también cambia durante su crecimiento y desarrollo (Maas y Hoffman, 1977). Por tal motivo, para utilizar con mayor eficiencia los suelos afectados por sales y las aguas salobres o de mala calidad, es esencial determinar la tolerancia de los cultivos en cada una de las etapas del crecimiento. Así, la información que se genere, será de gran utilidad, ya que les permitirá a los agricultores tener un conocimiento para un adecuado manejo de sus recursos suelo y agua, asimismo servirá para futuras investigaciones relacionadas con el desarrollo de modelos de simulación del crecimiento de cultivos, mismos que permitirán predecir la respuesta de los cultivos cuando la salinidad del suelo o del agua difiera a través de la estación de crecimiento y desarrollo del cultivo. En este sentido, se sabe que un cultivo empieza a ser mucho más tolerante después de que ha fijado su semilla, por lo tanto, el riego con agua considerada como no aceptable, puede usarse sin provocar daño alguno durante la parte tardía de la estación de crecimiento.

Muchos estudios han mostrado que si la salinidad se aplica en las etapas iniciales del crecimiento de la planta, los efectos detrimentales sobre el rendimiento serán mayores (Kaddah y Ghowail, 1964; Lunin *et al.* 1963; Maas *et al.* 1983; Pasternak *et al.* 1986). Sin embargo, uno no puede estar seguro de éstos estudios si las plantas rindieron menos porque fueron más sensibles durante las etapas iniciales del crecimiento o porque se sometieron al estrés salino por un período prolongado de tiempo cuando se salinizó inicialmente.

## **2.1. Origen y tipos de sales**

### **2.1.1. Tipos de sales**

Las sequías largas en las zonas áridas ocasionan que los ríos solamente lleven agua esporádica o periódicamente. Si la evaporación es mayor que la precipitación, se forman hondonadas sin desagüe. El agua de dichos lugares se evapora. Las sales se acumulan cada vez más en el transcurso del tiempo. Si se forma una solución saturada de sal, se cristaliza. La mayor parte de la sal se forma por el NaCl; aunque también se presentan Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (sulfato de sodio), MgCl<sub>2</sub> (cloruro de magnesio) y MgSO<sub>4</sub> (sulfato de magnesio), entre otras. El calcio se deposita en forma insoluble como CaCO<sub>3</sub>; el caso CaSO<sub>4</sub> (yeso) es algo más soluble, pero aparece también en forma de pequeños cristales.

### 2.1.2. Origen de la sal terrestre

La salinidad puede tener diversos orígenes, dentro de los cuales se consideran: el origen de sal terrestre y el de la sal del océano. El cloruro de sodio (NaCl) de los suelos salinos de las regiones áridas tiene diferentes orígenes: (a) dada la sedimentación de los mares, se origina sal marina que está en las rocas. En el fenómeno de meteorización de dichas rocas, la sal se disuelve por el agua de la lluvia y se transporta a las hondonadas sin desagüe. Por esta razón, los desiertos (Sahara y Egipto) tienen carácter salobre, pues la roca que tiene como base es, precisamente de sedimentación marina (rocas jurásicas, cretácicas y terciarias). Por otro lado, las regiones áridas que tienen como base rocas magmáticas y areniscas casi no tienen suelos salinos; (b) contienen salinidad las regiones áridas que durante su pasado geológico eran cuencas marinas que se secaron lentamente; por ejemplo: Great Salt Lake (Utah), el mar Caspio, mar Aral (Asia Central), Tuz Gölü (Anatolia Central), etc.; (c) las costas marinas son golpeadas por fuertes olas; el agua se pulveriza y el polvo se dispersa por el viento. Por la lluvia y niebla suelen depositarse en la superficie, o bien, penetran al suelo. Dicho fenómeno también se da en regiones húmedas, pero en éstas, la sal es elevada continuamente y se transporta al mar (sal cíclica). Sin embargo, en regiones áridas sin corrientes de agua superficiales, la sal forma cada vez depósitos mayores.

### 2.1.3. Origen de la sal del océano

El agua para actuar sobre las montañas, mesetas y llanuras, es auxiliada por oxígeno, plantas, dióxido de carbono, bacterias y actividades del hombre. No existe sobre la Tierra, roca ni mineral que toleren los esfuerzos combinados de tales elementos; se resquebrajan en fragmentos, se derrumban, se desmoronan y llegan a los mares. El mar contiene aproximadamente 3.5% de iones sólidos disueltos, llamados sales. Mucho de los iones de sal común (NaCl) y otras sales de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  no se han extraído aún de las rocas, minerales y suelos de la corteza terrestre. En los lagos y suelos salinos gran parte de las sales son  $\text{CaSO}_4$  y  $\text{MgSO}_4$  y menores cantidades de  $\text{MgCl}_2$ . El cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) de los desiertos proviene del mar, al que llegó por las erupciones volcánicas y emanaciones de ácido clorhídrico (HCl) a lo largo de la historia terrestre. El  $\text{Na}^+$ , así como  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y carbonatos disueltos por el agua, llega al mar por las corrientes terrestres. Con frecuencia, el riego es el causante de los problemas de acumulación de sales. Se ha estimado que entre el 50 y 60% de

los suelos salinos se ha originado como consecuencia del riego. Un exceso de sal en el agua de riego o en el suelo puede ocasionar la ruina de las plantas o que su follaje tome una coloración verde-azul. Dicho efecto se observa cuando los cultivos pueden subsistir, pero disminuye su producción. El daño ocasionado por la sal depende del tipo de ésta así como de la concentración de sal que exista en las partículas de líquido que mojen las partículas del suelo que entran en contacto con las raíces del cultivo.

## **2.2. Factores de inhibición del crecimiento vegetal por estrés salino**

El estrés por salinidad es uno de los factores más importantes que limitan la productividad y la distribución de las plantas. Pese al hecho de que los estudios por estrés de sal se han realizado durante mucho tiempo, los mecanismos de resistencia a la salinidad en plantas no está completamente entendido (Mansour, 1997). Los efectos que producen las sales sobre las plantas se han estudiado ampliamente (Bernstein y Hayward 1958; Waisel, 1972). Se debe diferenciar entre un efecto osmótico, un efecto de toxicidad causada por un ión específico y un efecto indirecto derivado de la abundancia de sodio en el complejo de cambio del suelo.

### **2.2.1. Efecto osmótico**

*Estrés hídrico:* pérdida de turgencia, inhibición de la extensión celular, inhibición de la acumulación de clorofila en hojas, pérdida de regulación estomática, etc.; inhibición del crecimiento.

*Modificación de la conformación proteica:* inactividad enzimática, inhibición del crecimiento.

*Cambio en la permeabilidad de la membrana:* déficit nutritivo, inhibición del crecimiento.

En primer lugar, la presencia de sales en la solución del suelo reduce la disponibilidad hídrica para la planta al aumentar la presión osmótica de dicha solución (efecto osmótico). Llega un momento en que será tal la cantidad de sales que, a pesar de que el suelo contenga agua, la planta no podrá extraerla y sufrirá un estrés hídrico (sequía fisiológica). Si tradicionalmente se considera que las plantas con exceso de sal adolecen de una insuficiente absorción de agua, que está osmóticamente inhibida, en realidad los síntomas de la tensión salina son muy diferentes de los provocados por una tensión hídrica. Las plantas con tensión salina se muestran atrofiadas pero turgentes y su aspecto no es marchito. La planta es capaz de mantener el gradiente osmótico con respecto al medio e incluso puede mejorarlo en

condiciones de salinidad moderada. Actualmente el crecimiento reducido de éstas plantas no se atribuye a la tensión osmótica, sino a que la salinidad inhibe la asimilación al reducir el estado energético de la planta, ocasionado por alteraciones de la membrana celular, especialmente en su permeabilidad, que exigen un mayor consumo de energía metabólica. Parece que también existe otra razón por la que se explica el elevado consumo energético: la eliminación activa del sodio de las células vegetales. Se han descrito procesos de reajuste osmótico, por ejemplo, por la síntesis de sustancias orgánicas osmóticamente activas, que les permiten a algunos cultivos mantener cierto grado de tolerancia a la salinidad. Este reajuste osmótico es completo para la cebada y el trigo pero incompleto para el algodón, la cebolla y la judía (Badía, 1996).

### **2.2.2. Efecto iónico específico**

*Competencia en la absorción de nutrientes:* de potasio por el sodio y de nitrato por el cloro, déficit nutritivo.

*Cambio estructural en la membrana:* exceso de sulfato.

Sobreimpuesto al efecto osmótico, debido a la actividad conjunta de las sales en solución, hay que añadir la acción tóxica de determinados iones. Este efecto puede ser debido a la toxicidad directa causada por la acumulación de un determinado ión, por la formación de productos tóxicos para la planta o bien por interacción en el equilibrio nutritivo de la misma. Los principales elementos con efecto iónico específico son: el sodio, el cloruro y el boro pero su efecto varía incluso entre especies vegetales cercanas. Así, el tomate silvestre (*Lycopersicon cbeesmanii*) no tolera altas concentraciones de sodio pero sí de potasio, mientras que en el tomate cultivado (*L. esculentum*) sucede lo contrario. En el guisante o chícharo (*Pisum sativum*) se observa alteraciones inducidas por cloruros pero no por sulfatos. Por otro lado, se admite que el sodio y el cloruro provocan fenómenos de competencia a nivel de absorción con el potasio y los nitratos, respectivamente (Kafkafi, 1987; Silberbush y Ben Asher, 1987).

### **2.2.3. Efecto del sodio intercambiable:**

*Deterioro de las propiedades físicas del suelo:* reducción del porcentaje de germinación anoxia, etc.

La abundancia del sodio frente al calcio y magnesio absorbido en las arcillas del suelo puede determinar la individualización y dispersión de estas partículas (suelo alcalino o sódico). Bajo

éstas condiciones, la aireación puede ser deficiente, lo puede conllevar a problemas de germinación o podredumbre en las plantas. Entonces, cómo se explica esa individualización de las partículas del suelo? Según la teoría de la doble capa de Gouy-Chapman (Poljakoff y Gale, 1975), las partículas de arcilla compensan sus cargas negativas rodeándose de cationes, los cuales se ven sometidos a dos tendencias opuestas; éstas son: una fuerza electrostática de atracción y una de difusión, desde la superficie de la arcilla donde la concentración catiónica es menor. Esta situación es similar a la de la atmósfera terrestre, en la que las moléculas de aire están sujetas a dos tendencias opuestas: la atracción gravitacional hacia el centro de la Tierra y la repulsión por difusión. El resultado de éstas dos tendencias es una distribución "atmosférica, donde la concentración de las moléculas de gas es más alta cerca de la superficie terrestre y su concentración decrece con el incremento de la distancia.

La configuración de la doble capa difusa puede modificarse tanto por la relación entre iones divalentes: monovalentes (básicamente, calcio sodio) como por la concentración electrolítica (CE) en la solución del suelo. En un sistema con idéntica CE, es decir, con semejante tendencia a la difusión del sodio que el calcio, este último, como divalente, presenta una fuerza electrostática de atracción doble al primero, monovalente. En un sistema monoiónico (por lo tanto, con idéntica fuerza de atracción para los iones), por ejemplo un sistema arcillo-sódico, un incremento en la concentración de sales provoca una disminución de la tendencia a difundir hacia fuera de la arcilla y, por lo tanto, una doble capa difusa más comprimida hacia su superficie.

Con una gran concentración de sodio de cambio (PSI alto) las fuerzas electrostáticas de repulsión entre partículas del suelo predominan sobre las de atracción, produciéndose dicha dispersión, salvo que exista una CE elevada de la solución. Así, cuando la relación PSI suelo/CE agua es suficientemente alta como para superar la capacidad de estabilidad de las arcillas se produce su individualización y movimiento, colapsándose la porosidad. Con ello se desmoronan los agregados del suelo, la porosidad se vuelve ineficaz, degradándose la estructura edáfica. A nivel superficial, se puede producir un encostramiento que condiciona una baja infiltración hídrica. Esto, a su vez, provoca escorrentía, erosión, ineficacia en el uso del agua y daños al cultivo por encharcamiento temporal (Poljakoff y Gale, 1975); una vez que la costra se seca, puede ser lo suficientemente dura como para no poder ser atravesada por la plántula recién germinada (Agassi *et al.* 1981).

## **2.3. Mecanismos de tolerancia a la salinidad**

La salinidad ejerce un efecto complejo en la planta, como resultado de una interacción iónica, osmótica y nutricional, aunque el mecanismo fisiológico exacto del estrés por salinidad es aún desconocido. La tolerancia a la salinidad frecuentemente depende de la complejidad anatómica y fisiológica de la planta organizada. Este hecho hace difícil encontrar los caminos para incrementar la tolerancia a la salinidad a un grado mayor. Sin embargo, nos da esperanzas de que la tolerancia a la salinidad puede incrementarse mediante el descubrimiento del factor que está más limitado por el estrés salino durante el crecimiento y desarrollo. Se han realizado muchas investigaciones y han demostrado que los mecanismos de tolerancia a la salinidad se basan en factores tales como la acumulación de iones, exclusión de iones, producción de solutos compatibles, maduración tardía y esterilidad de polen. Muchos investigadores han sugerido que algunos de estos factores pueden seleccionarse en una reingeniería individual, un proceso referido a los caracteres piramidales. La respuesta de las plantas a la salinidad y a otros estreses ambientales ha sido de suma importancia para estudiantes de agronomía, ecología y fisiología, desde que estas disciplinas fueron definidas (Cheeseman, 1988). Sin embargo y de acuerdo con otros autores, considero que lo más frustrante de esto, es que a pesar de años y años de investigaciones, los mecanismos fundamentales que determinan las respuestas de las plantas a la salinidad continúan aún sin entenderse. A continuación, se hará una breve explicación de cada uno de los mecanismos de tolerancia a salinidad, que han encontrado investigadores dedicados al estudio del estrés salino; además, se hace una mención limitada de la información que se encontró relacionada con el frijol yorimón, especie bajo estudio.

### **2.3.1. Exclusión iónica (selectividad)**

Dentro de las legumbres de grano, destaca el frijol yorimón y otras especies como el frijol, garbanzo, cacahuate, etc. como reconocidas por ser sensibles o solamente con resistencia moderada a la salinidad. La respuesta general de estas especies y de otras especies en general a la salinidad, es extremadamente compleja y una serie de mecanismos parece estar involucrado en esta tolerancia. Si consideramos estas legumbres, dos rasgos o características son relevantes; (1) existe variabilidad en la resistencia a salinidad entre las legumbres y (2) muchas de éstas responden a las condiciones salinas mediante la exclusión de la sal, esto es, la exclusión de sodio y/o de cloro de las hojas. La sensibilidad a la sal en algunos cultivos se

atribuye al fracaso de las plantas de mantener el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Cl}^-$  fuera del flujo de transpiración y consecuentemente, el citoplasma de los tejidos del tallo. Una planta bajo estrés por sales debería absorber nutrientes y restringir la absorción de iones tóxicos en potenciales bajos de agua que los normales. Las plantas que limitan la absorción de iones tóxicos y mantienen rangos normales de iones nutrientes podrán ser más tolerantes a la salinidad que aquellas que no restringen la acumulación de iones y pierden el balance nutricional. El mecanismo selectivo del ion capaz de discriminar entre iones químicamente similares tales como  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  podría tener un valor adaptativo. Los mecanismos responsables para la discriminación del ion probablemente están localizados en los tejidos de las membranas y varios organelos por toda la planta (Bliss *et al.* 1984).

El mejoramiento para la eficiencia en la absorción de los nutrientes o acumulación baja de iones bajo estrés salino, puede ser uno de los caminos simples para mejorar tolerancia a salinidad en variedades sensibles de algunas especies. Esto también puede acompañarse mediante el descubrimiento de la tolerancia a la toxicidad de un ion específico asociado con el estrés salino. En análisis minerales de hojas de frijol yorimón de plantas que se sometieron a tratamientos salinos, se encontró que el  $\text{Cl}^-$  es el único ión que afecta significativamente; el  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cl}^-$  se incrementan mientras que las concentraciones de  $\text{K}^+$  y P disminuyen con el incremento en las concentraciones salinas. El  $\text{Na}^+$  aparentemente se excluye de las hojas, sin importar las concentraciones salinas de los tratamientos, sin embargo se han encontrado diferencias de un año a otro. Con estos resultados, en una primera instancia se podría decir que el frijol yorimón presenta un mecanismo de resistencia a través de la exclusión de este mineral. Esto último coincide con López *et al.* (1999) quien menciona que la mayoría de las leguminosas (como el yorimón) presentan estos mecanismos de resistencia, por lo general, fácilmente translocan el  $\text{Na}^+$  a las hojas a través del xilema, sin embargo, lo regresan vía floema nuevamente a la raíz, de esta manera mantienen bajos niveles de  $\text{Na}^+$  en las hojas, desencadenando así el mecanismo de exclusión del ión  $\text{Na}^+$ . Con relación al  $\text{Mg}^{2+}$ , el cual no presenta cambios de un año a otro en que se han realizado las investigaciones, la tendencia es disminuir conforme se incrementan los niveles de salinidad (West y Francois, 1982). En análisis químicos realizados en semilla seca de frijol yorimón, los resultados indican que el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Cl}^-$  se excluyen de la semilla cuando se incrementa la salinidad. Otros minerales determinados en la misma semilla fueron  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ , P, S y N, sin embargo el  $\text{Na}^+$  y el P

son los iones que se encuentran en mayor concentración en la semilla con relación a las concentraciones en las hojas.

### **2.3.2. Acumulación iónica**

Con frecuencia se reporta que la restricción iónica dentro de las raíces o vástagos es una de las diferencias entre las variedades tolerantes y sensibles a la salinidad. Además, se sabe perfectamente que las halófitas toman concentraciones altas de iones como una adaptación a los ambientes salinos, sin embargo, algunas pueden secuestrar iones tóxicos no solamente en las vacuolas sino que también en órganos especializados tales como las glándulas y vejigas de sal. Por otro lado, la acumulación de sal en la planta o su excreción a la superficie foliar (mangles, zacate salado, por ejemplo) se cree que reduce los requerimientos para incrementar la expansión de la pared que podría de otra manera requerirse para mantener un crecimiento positivo y turgencia en bajos potenciales de agua en el suelo. Algunas especies reportadas (como el tomate silvestre, *Lycopersicon cheesmanii*) se consideran tolerantes a salinidad debido a su capacidad para acumular iones, tales como el  $\text{Na}^+$ . Tanto en glicófitas como halófitas, la acumulación de sal se realiza preferentemente en las vacuolas, en los compartimentos intersticiales y en tallos y hojas viejas. Desafortunadamente, los factores físicos y genéticos que influyen en la acumulación y distribución de iones dentro de la planta son aún desconocidos. Solo una especie de planta cultivada se considera como una halófitas, ésta es la remolacha azucarera. Lo bueno y positivo, es que en la actualidad, muchos investigadores alrededor del mundo, muestran muchísimo interés en desarrollar el potencial agronómico de las halófitas silvestres como un cultivo nuevo y además útil con tolerancia a salinidad, tal es el caso de Israel, Australia, entre otros países, donde tanto la sequía como la salinidad son efectos abióticos sumamente impactantes en la producción de alimentos.

### **2.3.3. Ajuste osmótico**

El ajuste osmótico se define como una disminución en el potencial osmótico de la planta a través de un incremento en el contenido de solutos (o una disminución del contenido hídrico) en respuesta a una disminución en el potencial hídrico externo hasta el punto de que el potencial de turgencia sea mantenido. Se encontraron algunas controversias de que si la osmoregulación ocurre en plantas superiores (Munns y Termaat, 1986). Sin embargo, se



reportan diferencias muy marcadas en su capacidad de osmoregulación entre genotipos de trigo, por ejemplo (Morgan, 1977). Por otro lado, se tiene que a humedad alta se mejora la tolerancia a salinidad en maíz, frijol, cebolla, rábano y cebada, pero no en algodón, trigo y betabel. La sensibilidad de los cultivos al estrés osmótico puede variar con las concentraciones externas de sal. Esto puede indicar que ciertos cultivos pueden beneficiarse de presiones de selección, lo cual mejora su capacidad a ajustarse osmóticamente o mantener relaciones hídricas más favorables bajo estrés salino. Por lo general, un ajuste osmótico pobre, conduce a una pérdida de turgencia y cierre estomático, el cual es seguido de inmediato por la reducción del intercambio de gas y la fotosíntesis y en definitiva, la pérdida de turgencia, puede también tener efectos perjudiciales en la división celular y la elongación. En trabajos realizados en el frijol yorimón en el mejoramiento de la especie para adaptación a sequía, se encontró que éste presenta un ajuste osmótico pequeño en las hojas (Shackel y Hall, 1993) además, no se han detectado diferencias genotípicas en el potencial osmótico de hojas. Sin embargo, se reporta que se encuentran algunas diferencias genotípicas en la habilidad del frijol yorimón para sobrevivir a la sequía impuesta al principio de la etapa de crecimiento vegetativo, ésta habilidad está asociada con la respuesta sensible de sus estomas al déficit de agua en el suelo y al mantenimiento de altos potenciales de agua en las hojas. De acuerdo al comportamiento de la especie bajo condiciones de sequía, se asume también un mecanismo evidente de ajuste osmótico cuando ésta especie se somete a estrés por salinidad, sin descartar, por supuesto, otros mecanismos de tolerancia que pudieran desencadenarse en la planta, como los mencionados anterior y posteriormente a este párrafo.

#### **2.3.4. Síntesis de compuestos orgánicos de bajo peso molecular**

Azúcares, prolina, glicinbetaina y otros solutos orgánicos son considerados para incrementar la tolerancia a salinidad mediante la contribución del balance osmótico y preservando la actividad enzimática en presencia de iones tóxicos. Según Rather (1984) la salinidad causa mayor incremento de sacarosa en el follaje en especies sensibles a salinidad que en aquellas especies tolerantes; asimismo, sugirió que la sacarosa en el follaje y la concentración de almidón podría usarse como un índice de selección para tamizar o seleccionar para mejoramiento de tolerancia a salinidad. Con relación a la betaína, en genotipos de cebada con contenido alto de este soluto, éstos mantienen potenciales de soluto

bajos, comparados con aquellos genotipos con contenido bajo de betaína, sometidos a las mismas concentraciones salinas; de ésta manera se abre la posibilidad de que la betaína pueda usarse como un índice de selección para mejoramiento de la tolerancia a la salinidad, aunque estos caracteres por sí solos pueden ser un criterio inadecuado si otras características de tolerancia a salinidad se mantienen (Grumet y Hanson, 1986).

### **2.3.5. Uso eficiente de agua**

Otros mecanismos que podrían prevenir la pérdida de turgencia y mejorar la eficiencia en el uso del agua son el incremento de la resistencia foliar (pocos estomas, incremento en la resistencia del mesófilo y el incremento en el espesor de la cutícula) o una relación alta raíz / tallo. La diversidad de plantas proporciona evidencias de que cada una de éstas estrategias pueden acompañarse de varias maneras. Muchas de éstas estrategias, están asociadas con algunos aspectos de crecimiento y metabolismo que son perjudiciales para la producción máxima de un cultivo. Muchas mediciones de relaciones hídricas no son exactas o lo suficiente fidedignas para ser usadas en técnicas de selección para tolerancia a salinidad. Tal vez en avances futuros en instrumentación y entendimientos más minuciosos y profundos de los mecanismos de las relaciones hídricas podrán algún día mejorar la habilidad de los mejoradores para seleccionar genotipos basados en el mantenimiento óptimo de las relaciones hídricas durante el estrés salino.

# 3. Objetivos

## 3.1. General

Determinar los mecanismos morfológicos y/o fisiológicos de la tolerancia a la salinidad de frijol yorimón (*Vigna unguiculata* L. Walp.) en las primeras etapas del crecimiento y desarrollo.

## 3.2. Particulares

1. Determinar la sensibilidad a la salinidad de una línea genéticamente avanzada de frijol yorimón, en la etapa de germinación a diferentes tiempos de inmersión en soluciones salinas de NaCl y evaluar las características morfológicas de plántulas en diferentes concentraciones salinas de NaCl.
2. Relacionar parámetros fisiotécnicos (TAN, IAF, TCC, TCR) mediante la técnica del análisis de senderos, determinados en plántulas de frijol yorimón bajo condiciones salinas.
3. Comparar la germinación de 25 cultivares de frijol yorimón evaluando tasa y porcentaje de germinación bajo condiciones salinas (NaCl), seleccionar y clasificar los genotipos por su respuesta al estrés salino.
4. Comparar la emergencia y cantidad de biomasa de plántulas de 25 cultivares de frijol yorimón bajo diferentes condiciones salinas (NaCl), seleccionar y clasificar los cultivares de acuerdo a su tolerancia a la salinidad.
5. Comparar el efecto de la salinidad en el establecimiento y crecimiento de plántulas de 8 genotipos de frijol yorimón bajo condiciones controladas.
6. Comparar el efecto de la salinidad en la etapa inicial de plántulas de 25 cultivares de frijol yorimón mediante un método de selección basado en el porcentaje de sobrevivencia, composición mineral y producción de materia seca para seleccionar y clasificar los cultivares de acuerdo a su tolerancia a la salinidad.
7. Relacionar características fisiológicas y concentración de iones en genotipos de frijol yorimón con la tolerancia a la salinidad en la etapa de crecimiento vegetativo inicial.
8. Comparar la absorción de agua (relaciones hídricas), concentración de iones y su distribución en la planta de genotipos de frijol yorimón tolerantes (3) y sensibles (3) a la salinidad en la etapa de crecimiento vegetativo inicial bajo condiciones salinas (NaCl).

# 4. Resultados

En este apartado se presentan los resultados de cada uno de los experimentos realizados, mismos que culminaron en artículos publicados y/o enviados a revistas internacionales. A continuación se presenta un bosquejo de cada uno de los resultados obtenidos.

## 4.1. Efecto de la salinidad en la germinación

### 4.1.1. Efecto del tiempo de inmersión de la semilla en soluciones salinas

En este primer estudio se realizaron dos experimentos: (1) en el primer experimento se evaluó el efecto de la salinidad en la germinación y en el peso de las semillas de una línea avanzada de frijol yorimón, las cuales se sometieron a diferentes niveles salinos y diferentes tiempos de inmersión; (2) en el segundo experimento se seleccionaron plántulas obtenidas con el tratamiento control del primer experimento y se sometieron también a diferentes niveles de salinidad. Las variables medidas fueron: peso de semilla posterior a la inmersión salina, peso seco y longitud de parte aérea, peso seco y longitud de tallo, peso seco total (biomasa) y área foliar. Los resultados de ambos experimentos mostraron que el peso de semillas disminuyó linealmente conforme los tiempos de inmersión se incrementaron. Asimismo, el porcentaje de germinación disminuyó cuadráticamente al incrementarse los tiempos de inmersión y los niveles de salinidad. Todas las variables medidas en las plántulas disminuyeron cuadráticamente al incrementar la salinidad.

### 4.1.2. Selección y clasificación de genotipos en respuesta a la salinidad

En este estudio se seleccionaron y clasificaron genotipos de frijol yorimón con tolerancia a la salinidad en la etapa de germinación. Se utilizaron 25 genotipos y tres niveles de salinidad (0, 85 y 170 mmol NaCl/L). Se utilizaron dos criterios para clasificar los genotipos como tolerantes: (1) genotipos con más del 70% de germinación en 170 mmol NaCl/L y con más del 90% en 85 mmol NaCl; (2) genotipos con menos del 40% de germinación en 170 mmol NaCl/L pero más del 75% en 85 mmol NaCl/L comparado con el control. Los genotipos clasificados como tolerantes fueron: UCR 109 CB3, H-8-27, UCR 158 CB88, UCR 188 CB5 y CB 46 de la Universidad de California, Riverside y Paceño de México. El criterio para

seleccionar los genotipos sensibles fue: todos aquellos genotipos que presentaron menos del 30% de germinación en 170 mM NaCl y menos del 15% en 85 mmol NaCl/L con respecto al control. Los genotipos sensibles fueron: IT96D-733, IT89KD-391, IT95K-1088-4, IT95K-1090-12, e IT90K-277-2 del IITA, Nigeria y Sonorense de México. UCR 109 CB3 fue el más tolerante, mientras que H8-8-27, UCR 158 CB88, Paceño, UCR 118 CB5, CB46 e IT89KD-288 mostraron tolerancia intermedia. El resto de genotipos se consideraron como sensibles a la salinidad en la etapa de germinación.

## **4.2. Efecto de la salinidad en la etapa de emergencia**

### **4.2.1. Efecto de soluciones salinas en las características de plántulas**

En este estudio se usaron los datos de las variables morfológicas de plántulas del primer estudio, con el objetivo de estudiar los efectos de la salinidad en los parámetros de crecimiento usando la técnica de análisis de senderos, la cual describe *a priori* la relación causa-efecto entre las variables. Los parámetros de crecimiento determinados fueron: tasa de asimilación neta (TAN), tasa de crecimiento del cultivo (TCC), índice de área foliar (IAF) y tasa de crecimiento relativo (TCR), todos ellos calculados mediante fórmulas teóricas de acuerdo con Radford y Hunt. Los resultados mostraron que conforme los niveles de salinidad se incrementaron, todos los parámetros disminuyeron cuadráticamente debido a una reducción de los principales componentes: materia seca (biomasa) y área foliar. El análisis de senderos reveló que TAN y IAF tienen un efecto directo positivo en TCR en los niveles de salinidad de 7.8 y 15.6 dS/m. Estos parámetros de crecimiento son importantes en la selección de plántulas de frijol yorimón con alto crecimiento relativo bajo condiciones salinas.

### **4.2.2. Selección y clasificación de genotipos en respuesta a la salinidad**

El presente experimento se realizó para medir el efecto de la salinidad (0, 85 y 170 mmol NaCl/L) en 25 genotipos de frijol yorimón en la etapa de emergencia. El criterio usado para clasificar los genotipos de acuerdo a su tolerancia a la salinidad se basó en el porcentaje de germinación en ambos niveles salinos. El genotipo ‘CB27’ se agrupó en ‘A’ y presentó la mayor tolerancia. ‘Paceño’, ‘CB88’, ‘CB3’, ‘CB5’, ‘Tardón’, ‘Cuarenteño’ y ‘CB46’ se agruparon en ‘B’, éstos genotipos mostraron porcentajes de emergencia superiores a 75% en

ambos niveles salinos. Los otros genotipos se agruparon en 'C' y mostraron los porcentajes de emergencia más bajos en los niveles salinos. En general, se encontraron diferencias entre genotipos, entre niveles salinos y la interacción de ambos factores para las variables porcentaje y tasa de emergencia, relación raíz / tallo en peso seco y biomasa. Esto evidencia las diferencias de la respuesta a la salinidad entre genotipos de la misma especie. Se concluye que la selección y clasificación de genotipos de yorimón para tolerancia a salinidad es exitosa en la primera etapa de desarrollo de plántulas, ya que coincide con la clasificación realizada en la etapa de germinación.

### **4.3. Efecto de la salinidad en la plántula y en el crecimiento vegetativo inicial**

#### **4.3.1. En el crecimiento, absorción y distribución de iones en la plántula**

Aquí se estudió la tolerancia a la salinidad de ocho genotipos de frijol yorimón (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) durante la etapa de plántula bajo condiciones controladas (cámara de crecimiento). Los tratamientos de NaCl fueron 0, 85 y 170 mmol/L. Se midieron las variables altura de planta, área foliar total, peso fresco y seco de raíz y parte aérea, longitud de masa de raíces, número de hojas, número de hojas trifoliadas y biomasa total, las cuales disminuyeron en todos los genotipos al aumentar la salinidad. Basados en el análisis de éstas variables, los genotipos se clasificaron como tolerantes ('IT89KD-288' y 'CB'), intermedios ('CB5', 'IT95R-52-80' y 'CB88') y sensibles ('IT86D-719', 'IT96D-666' y 'CB27') a la salinidad. La concentración de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en raíz y parte aérea se incrementó al aumentar la salinidad y fue más baja en los genotipos tolerantes, por lo que se concluye que la exclusión de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  contribuye a la tolerancia de la salinidad en yorimón. Las relaciones  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$  se consideraron buenos indicadores de la tolerancia a la salinidad en yorimón, debido a que los genotipos tolerantes mantuvieron valores altos en ambas relaciones, los genotipos intermedios y sensibles mostraron lo contrario. Los resultados demostraron que existen diferencias considerables de la tolerancia a la salinidad entre genotipos de yorimón. Se sugiere realizar otros estudios utilizando un número mayor de genotipos en etapas más avanzadas del crecimiento de la especie.

### **4.3.2. En la sobrevivencia, absorción y distribución de iones durante el crecimiento vegetativo**

En este experimento se utilizaron 25 genotipos de frijol yorimón con el objetivo de probar su tolerancia a la salinidad en la etapa temprana del crecimiento de plántula. El experimento se realizó en invernadero y se utilizaron tres concentraciones de NaCl (0, 85 y 170 mmol/L). Los genotipos se seleccionaron y clasificaron por su tolerancia a la salinidad utilizando como criterio principal la sobrevivencia de plántulas. Otros criterios utilizados fueron medir la concentración de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> (en raíz y parte aérea) y la materia seca total (biomasa). Los resultados mostraron que cuatro genotipos locales: ('Paceño', 'Tardón', 'Sonorense' y 'Cuarenteño'), tres genotipos de California ('CB46', 'CB27' y 'CB3') y un genotipo del IITA (Nigeria) ('IT82D-889'), mostraron habilidad para resistir la salinidad en comparación con los genotipos sensibles 'IT96D-666', 'IT89KD-288' y 'IT93K-734' del IITA. Un genotipo local ('Sesenteño'), tres genotipos del IITA ('PEPH-V Wes-85', 'IT86D-719' y 'IT95K-1090-12') y un genotipo de California ('CB5') se clasificaron como moderadamente tolerantes a la salinidad. Ocho genotipos del IITA ('IT96D-733', 'IT90K-277-2', 'IT91K-93-10', 'IT91K-118-20', 'IT90K-284-2', 'IT95K-1088-4', 'IT89KD-391' e 'IT94K-437-1') y uno de California ('CB88') se clasificaron como moderadamente sensibles a la salinidad. La concentración de iones mostró que Na<sup>+</sup> se incrementó con la salinidad en todos los genotipos agrupados y fue mayor en raíz que en parte aérea en los genotipos tolerantes y moderadamente tolerantes, mientras que en los sensibles y moderadamente sensibles fue mayor en parte aérea que en raíz. La concentración del Cl<sup>-</sup> fue mayor en parte aérea que en raíz en todos los genotipos agrupados e incrementó conforme la salinidad se incrementó. La biomasa se afectó en ambas concentraciones salinas en todos los genotipos agrupados, sin embargo, los genotipos tolerantes y moderadamente tolerantes mostraron mayor biomasa que los sensibles y que los moderadamente sensibles.

### **4.3.3. En la alteración de procesos fisiológicos y concentración de iones**

Este apartado se desarrolló al dividir el experimento en donde se utilizaron 25 genotipos de frijol yorimón con el objetivo de probar su tolerancia a la salinidad en la etapa temprana del crecimiento de plántula. El experimento se realizó en invernadero y se utilizaron tres concentraciones de NaCl (0, 85 y 170 mmol/L). Los genotipos se seleccionaron y clasificaron

previamente por su tolerancia a la salinidad utilizando como criterio principal la sobrevivencia de plántulas. Se compararon características fisiológicas tales como el contenido de clorofila total, la conductividad estomática y la transpiración, así como la acumulación de iones, P, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> y K<sup>+</sup>. Los resultados indicaron diferencias significativas entre genotipos para algunas variables. Con relación a la absorción y distribución de iones, en los genotipos tolerantes y moderadamente tolerantes a la salinidad, la concentración de Na<sup>+</sup> fue mayor en raíces que en parte aérea, mientras que en los genotipos sensibles y moderadamente sensibles, fue mayor en parte aérea que en raíces. Asimismo, la tendencia mostrada por otros iones fue variable. En muchos casos, las concentraciones de Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> y P se redujeron con el incremento en los niveles salinos, sin embargo, ninguno de los genotipos mostró síntomas de deficiencias nutricionales. Con este estudio se confirma que en la variabilidad entre genotipos de frijol yorimón es posible encontrar genotipos tolerantes a la salinidad usando características fisiológicas para comparación. Se observaron grandes diferencias en respuesta a la salinidad en los 25 genotipos, particularmente entre los genotipos de diferente origen, incluyendo los de Ibadan (Nigeria), Riverside CA (USA) y La Paz (México), aunque ocho de ellos mostraron ser tolerantes a la salinidad ('Paceño', 'Tardón', 'Sonorense', 'Cuarenteño', 'CB46', 'CB27', 'CB3' e 'IT82D-889').



## 4.1. Efecto de la salinidad en la germinación

### 4.1.1. Efecto del tiempo de inmersión de la semilla en soluciones salinas

#### Artículo publicado:

**Murillo-Amador B**, Troyo-Diéguez E. 2000. Effects of salinity on the germination and seedling characteristics of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. **40**:433-438.

#### Abstract

Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], a species with wide adaptation in arid and semi-arid zones, is grown from green seeds and pods, and is tolerant to salinity. It is a hardy species capable of developing in soils of low fertility. In this study, the effects of different salinities and different submersion times on the germination and weight of seeds of cowpea treated previously were evaluated. The effect of the irrigation with saline solutions of seedlings on the shoot length and dry weight, stem height and dry weight, total dry weight, and leaf area was also studied. The results show that the weight of pretreated seeds decreases linearly when submersion times were increased. Germination decreased quadratically when submersion times and salinity increased. Seedling total dry weights, leaf area, shoot length and dry weight, stem height and dry weight all decreased quadratically significantly when salinity increased.

#### Introduction

Baja California Sur (BCS) is an arid region of Mexico where the bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a traditional crop grown from green seeds to yield pods and dried seeds for human consumption. Currently, its growth is restricted to certain areas because it is very susceptible to saline conditions (Navejas, 1995). Another crop with similar characteristics to the bean is the cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. Cowpea is grown in BCS to obtain seeds and pods for human consumption, and as a source of green manure organic material on naturally poor soils or in the recovery of those soils depleted from intensive use in this arid region. This species is widely grown elsewhere for different purposes, e.g. as a fodder crop for livestock, as a green vegetable, for dry beans (West and Francois, 1982), and is cultivated as a dryland crop under different climatic conditions ranging from semiarid to sub humid (Lush

and Rawson 1979). Cowpea is reported to have a good tolerance to heat and drought (Rachie and Roberts, 1974), and it has a high yield potential under irrigation (Turk *et al.* 1980). Cowpea has been reported to be moderately tolerant to salinity (Maas, 1986; Maas and Poss, 1989; West and Francois, 1982). On the other hand, agriculture in some areas of BCS faces big problems. Year by year an increase in the salinity of irrigation water by saline intrusion and concurrent salinization of soils, are causing growers to leave their farms because the majority of crops cannot produce under these environmental conditions. In this sense, a research priority is the search for alternative crops to produce at these areas. In BCS, cowpea is not a main crop at present with only small production areas in the middle and the south of the peninsula. Preliminary salt studies with cowpea have been conducted in BCS. The results show that cowpea has been relatively tolerant to salinity during germination, vegetative growth, flowering, and pod-filling stages. It has been shown to yield well in field plots irrigated with 3.5 dS/m (Murillo, 1992); plots irrigated with 3.7 dS/m (Hernández and Troyo, 1985), during germination and seedling stages at 0, 6, 9, and 13.5 dS/m (Ruiz, 1993), and in germination, seedling, flowering, and production stages in field plots irrigated with 4.5 dS/m (Torres, 1992). The objective of this study was to determine the sensitivity of cowpea to salinity during germination at different submersion times in saline solutions (NaCl) under laboratory conditions, and to evaluate seedling characteristics over a range of salinities (NaCl). Submersion times was considered important character because of it has not been studied and because preliminary studies showed that concentrations especially NaCl on the irrigation water had inhibitory effects on germination.

## **Materials and Methods**

The study was carried out at the Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR) located in an arid zone of Baja California Sur, 17 km NW of La Paz, Mexico (24°08'N 110°24'W). Germination of nontreated seeds of an advanced line (CIB-001 cultivar) of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] selected in CIBNOR under salinity and drought conditions was measured according to ISTA methodology (1985).

### ***Experiment 1: Germination***

Homogeneous (in size and shape) cowpea seeds were selected and their individual weights (weight without treatment) were recorded. To test germination response of seeds at different salinities, 4 replicates of 25 seeds each were imbibed in sterilized Petri dishes (150 x

15 mm) in solutions containing equivalent weights of NaCl to produce salinities of 0 (control), 3.9, 7.8, 11.7, and 15.6 dS/m, with submersion times of 0, 6, 12, 18, and 24 hours. After these treatments, the seeds were dried at room temperature (25 °C) to constant weight and the weight of the treated seeds was taken. The seeds were then placed in Jiffy-7 peat pellets (Jiffypots, Jiffy Products (N.B.) LTD, Shippegan, Canada), which were placed into Petri dishes (six Jiffypots per Petri dish) and germinated at 25 °C. Germination counts were taken after 7 days. Germination for each treatment was calculated as an absolute germination percentage, considering the total number of seeds included in the experiment in each treatment. The experimental design consisted of 25 treatments replicated 4 times in a factorial completely randomized design, with submersion times as factor "A" (with 5 levels) and salinity as factor "B" (with 5 levels). The experiment was analyzed using a factorial ANOVA with the treatments expressed as orthogonal polynomials, according with the Sokal and Rohlf (1994) methodology. We used this methodology because linear regression is not always sufficient to account for the difference between sample means and a curvilinear regression expressed as a polynomial function could be better express the effects of the 5 levels used in each factor on the variables studied. We test for successively higher orders of polynomials (linear, quadratic, and cubic) and determined if the data showed significant curvilinear regression and to what degree. For most biological work, terms of independent variable no higher than cubic term are used, and when there are 5 means to be regressed, the highest-order polynomial that can be fitted is a cubic. Analysis of variance for germination percentage was performed with data modified according to angular transformation ( $\arcsin \sqrt{x}$ ) used for percentages (Little and Hills, 1989; Steel and Torrie, 1995).

### ***Experiment 2: Seedling characteristics***

The seedlings previously germinated in treatment 1 (0 dS/m and 0 hours of submersion time) used in the first experiment, were used for the second experiment. About 3 days after plant emergence (about 4 cm tall) 72 seedlings from the first experiment of similar size and leaf area were selected and transplanted with their Jiffypots into plastic cylindrical pots 7.5 cm diameter and 18 cm high (a single seedling per pot). The pots were filled with a mixture 1:1 of sand and vermiculite. After 3 days in the pots (irrigated with tap water), the effects of salinity (NaCl) on seedling characteristics at 3 different salinities were tested. Eight replicates of 3 seedlings each were irrigated with solutions containing an equivalent weight of NaCl to

produce salinity levels of 0 (control), 7.8, and 15.6 dS/m. The pots were placed at an ambient temperature (natural conditions) outside the laboratory at CIBNOR. The pots were irrigated with the saline solutions once day. After 3 weeks, some of the seedlings irrigated with 15.6 dS/m began to die. The rest of the seedlings irrigated with 0, 7.8, and 15.6 dS/m (seedling survivors) were harvested, washed with water and foliage and roots separated. The following were recorded: fresh and dry matter and length of shoot; fresh and dry matter and length of roots; leaf area and total dry matter (shoots and roots dry matter). Shoots and roots were dried in a forced-air dryer at 80 °C for 48 hours for dry weight determination. The leaf area was determined using the portable leaf area meter LI-Cor Model Li-3000 (LI-Cor Lincoln, Nebraska, USA). Because in this experiment only 1 factor was considered (3 salinity treatments: 0, 7.8 and 15.6 dS/m), the experimental design consisted of a completely randomized block replicated 8 times. All treatment effects were tested for statistical significance by analysis of variance and treatments were expressed as orthogonal polynomials. The analyses were performed using ANOVA and GLM procedures in SAS (SAS Institute, 1988). The figures from both experiments were performed with STATISTICA computer program (1996).

## **Results and Discussion**

### *Experiment 1: Effects of NaCl on germination percent and seed weight*

The weight of treated seeds was significantly reduced by submersion times ( $P=0.0001$ ) and salinity ( $P=0.0001$ ). Weight decreased linearly when submersion times and salinity treatments were increased (Fig. 1a). The analysis of orthogonal polynomials detected a highly significant difference ( $P=0.0001$ ) of the linear component regression between weight of treated seeds in both factors, submersion times and salinity treatments. Lineal component explained 94% of the variability in weight of treated seeds, with the rest of the variability explained by residual, and other nonsignificant regression components. The multiple correlation coefficient described the amount of variation accounted by the total model and was -0.9688, this analysis indicated that the weight of treated seeds decreased linearly 1.6 mg and 0.60 mg/h and per each unit of dS/m increase in the average of submersion times and salinity levels, respectively (Fig. 1a). On the separate analysis of linear regression by factors, submersion times and salinity treatments, this indicated that the weight of treated seeds was reduced 1.6 mg per each hour increase in average of submersion times (Fig. 1c) with

correlation coefficient of -0.9421. The weight of treated seeds was reduced 0.60 mg per each unit of dS/m with multiple correlation coefficient of -0.2259 ( $P = 0.0240$ ).

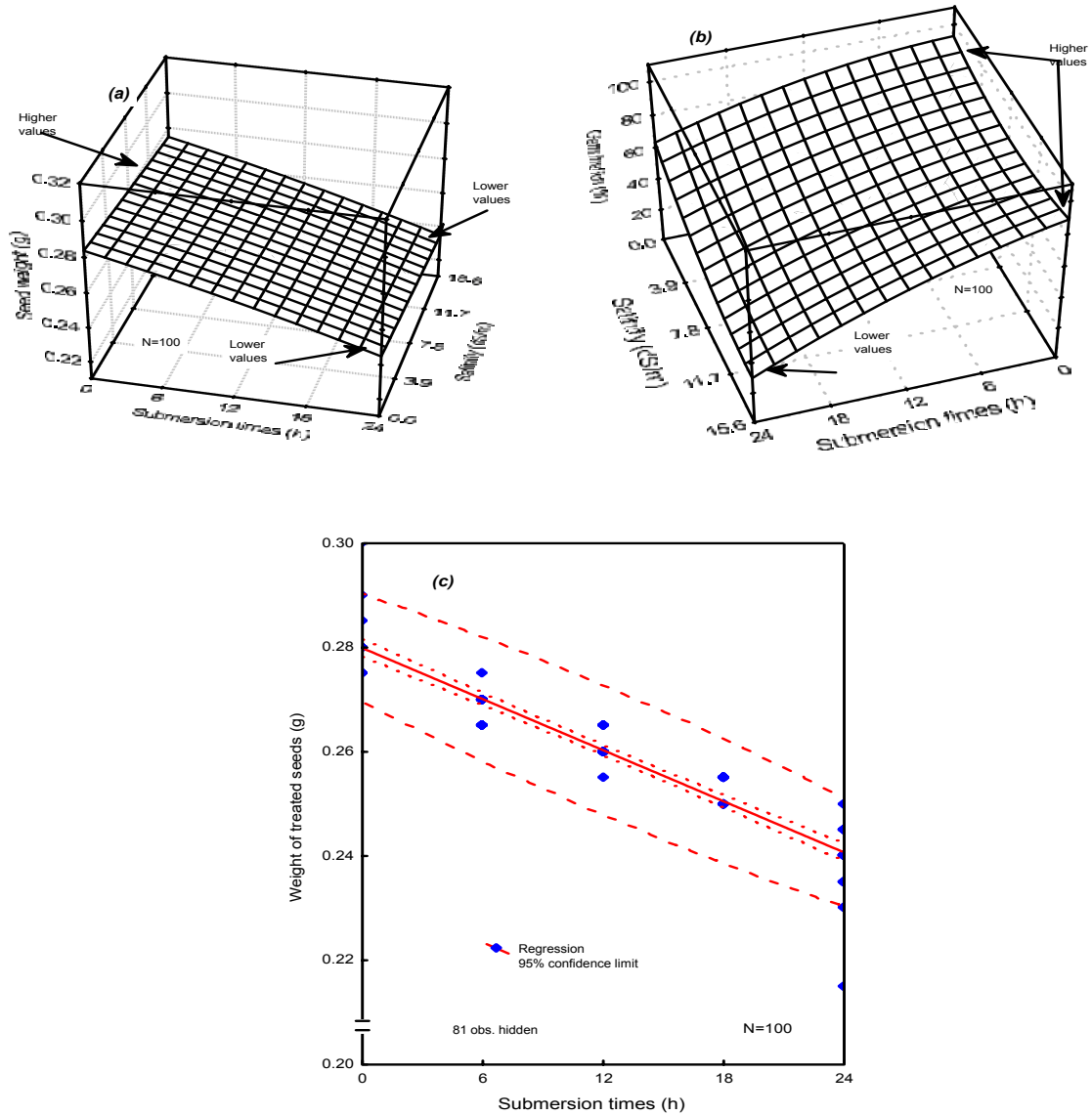


Figure 1. Effects of submersion times and salinity treatments on (a) weight of treated seeds, (b) percentage germination and (c) relation between weight of treated seeds with submersion times. The equations of the response surfaces are:  
 (a)  $Z = 0.284 - 0.0016 X - 0.000603 Y$  ( $R^2 = 94\%$ ) (correlation:  $r = -0.969$ )  
 (b)  $Z = 93.142 - 0.209 X - 2.352Y - 0.043 X^2 - 0.077 XY + 0.134 Y^2$ .  
 The equation of the line is:  
 (c)  $Y = 0.2799 - 0.0016 X$  ( $R^2 = 89\%$ ) (correlation:  $r = -0.942$ ).

Germination was significantly reduced by submersion times ( $P = 0.0001$ ) and salinity treatments ( $P= 0.0001$ ). The analysis of orthogonal polynomials detected a highly significance difference ( $P=0.0001$ ) in the quadratic regression (Fig. 1b) on germination in both factors (submersion times and salinity treatments). This also implies that there was an interaction between the period of submergence and salinity. Therefore, the differences in germination percentage were induced by varying salinities and also there was sufficient evidence for submersion times differences in germination percentage. The quadratic component explained 92% of the variability of germination; the rest of variability was explained by residual and nonsignificant regression components. Germination was better with less time of submersion and lower salinity levels. It averaged 100% and 84% on 0 hours and 0 dS/m, respectively. When submersion times and salinity levels were increased (Fig. 1b), germination decreased quadratically more than 30%, inclusively until 0% at 24 hours and 15.6 dS/m. Decreased germination in cowpea as a function of submersion times has not been reported previously, but Pandey (1990) mentioned that excess water delays the germination of seeds by causing an oxygen deficiency, and eventually the seeds get mouldy and rot. The excellent germination (average 100%) demonstrated in the present study after 6 h of submersion has not been previously reported for cowpea seeds. In *Salicornia bigelowii* Torr., García and Troyo (1993) reported that submersion times (16, 27, 36, and 48 days) did not affect the viability of the seeds, on the contrary, the germination increased quickly, being efficient when salinity levels were decreased.

Germination averaged 84% at 0 dS/m and decreased with increasing salinity to 68% at 15.6 dS/m. Data presented here provide a convincing argument that cowpea is affected by higher salinity and, according to Waisel (1972) salts in the seed bed may cause osmotic or specific toxicity effects on the seeds and can result in a reduced or retarded germination. West and Francois (1982) found that germination of cowpea was significantly reduced when electrical conductivity in sand cultures exceeds 12.0 dS/m. These authors found that with salinities up to 12 dS/m there was a delay in germination, but no significant reduction in final germination percentage. However, EC levels of 16 and 20 dS/m significantly reduced final germination by about 80% and 5%, respectively. Similar results were obtained in our study because germination was reduced to 68% at 15.6 dS/m and 0 h and 0% when the seeds were exposed to 24 h at 15 dS/m. More comparative literature concerning response of germination

in different salinity levels for cowpea was not found, however Manohar (1966) studied the response in *Pisum sativum* L. In beans and maize, Navejas (1995) reported that germination was reduced significantly when NaCl concentrations were increased from 8.33 dS/m. Prisco and O'Leary (1970) reported that germination in bean was inhibited by an osmotic effect of NaCl greater than -0.8 Mpa, but both osmotic and toxic effects of NaCl inhibited germination at osmotic potentials less than -1.2 Mpa. Other researches (Ayers, 1952; Bole and Wells, 1979; Gill and Dutt, 1982) note that salinity can produce a decrease in germination and can delay germination and emergence. Chapman *et al.* (1978) and Ayers (1952) affirm that a decrease in the water absorption ratio of seeds during germination stages can occur. McCarty and Dudeck found that total and rate germination in bentgrass (*Agrostis* spp.) decreased linearly or quadratically for specific cultivars as salinity increased from 0, 4000, 8000, 12,000 or 16,000 mg/L. Salt accumulation in the soil has been found to limit water absorption by seedlings seeds or roots (Bal and Chattopadhyay, 1985). These researches conclude that the adverse effect of salinity is due to specific ions and affirm that germination in rice decreases with the lessening of osmotic potential in NaCl solutions. Finally, they mentioned that the adverse effect of NaCl on germination was because of the specific ion more than an osmotic effect. In *Cucumis melo* L., Nerson and Paris (1984) found that salinity of 10000 and 15000 mg/L delayed germination appreciably in all susceptible cultivars, however, at up to 10000 mg/L, the final percentage of germination (6 days of incubation) was unaffected in tolerant cultivars. With regard to the practical implications of our study, the information presented here is very important to the growers because, if they have saline conditions in the water and soils on their farms, they may have to increase the seeding rate to ensure a good plant population. Pandey (1990) mentioned that cowpea seeds should have a 70% germination to ensure a good plant population. In the present study, it is possible to assure a 68% germination percentage under 15.6 dS/m salinity, consequently, the genotype used here is considered a good genotype for growers at this area. It is important to remember that this germination percentage resulted from this saline condition in the laboratory and does not necessarily represent germination under field conditions.

#### *Experiment 2: Effects of NaCl on seedlings characteristics*

The reduction in vegetative growth, associated with increasing salinity levels was represented by a reduction in all seedling characteristics. The analysis of variance confirmed

that the effect of salinity levels on the seedling characteristics was highly significant ( $P=0.0001$ ). Fig. 2 *a - f* shows that all seedling characteristics, leaf area, shoot and root dry matter, shoot and root length, and total dry matter, were reduced quadratically in accordance with the increase in salinity levels. Similar results have been reported in cowpeas and other species such as beans. Younis *et al.* (1993) observed that increasing salinity induced a marked reduction in plant growth, though bean seedlings tolerated salinity up to 120 mmol NaCl/L. In cowpea, West and Francois (1982) found that vegetative yield was decreased more by increasing soil salinity than was dry seed yield. Vegetative growth was reduced 9% for each unit increase in electrical conductivity of the soil saturation extract beyond a threshold value of 1.6 dS/m. Dry seed yield was reduced 12% for each unit increase beyond 4.9 dS/m. Maas and Poss (1989) observed that pod and seed yields from plants stressed during either the vegetative, flowering, or pod-filling stages indicated that cowpea was the most sensitive to salinity during the vegetative stage and that it became less sensitive the later plants were stressed. Although cowpea in preliminary studies in BCS has been relatively tolerant to salinity, in the study described here, the results show a reduction in vegetative growth (similar results were found by Maas and Poss) concluding that this crop is more sensitive to salt stress at this stage. We are developing others studies related to the effects of salinity on cowpea at various growth stages using 35 genotypes from different germplasm banks around the world.

The relations between seedling characteristics and salinity levels were analyzed. The analysis of orthogonal polynomials detected a highly significant difference ( $P= 0.0001$ ) in the quadratic component regression between total dry-matter, leaf area, shoot length, root length, shoot dry-matter, and root dry-matter with salinity treatments (Fig. 2*a-f*). The quadratic component of regression explained 86, 79, 83, 87, 86 and 85% of the variability of these variables, respectively, the rest of variability was explained by residual effects.



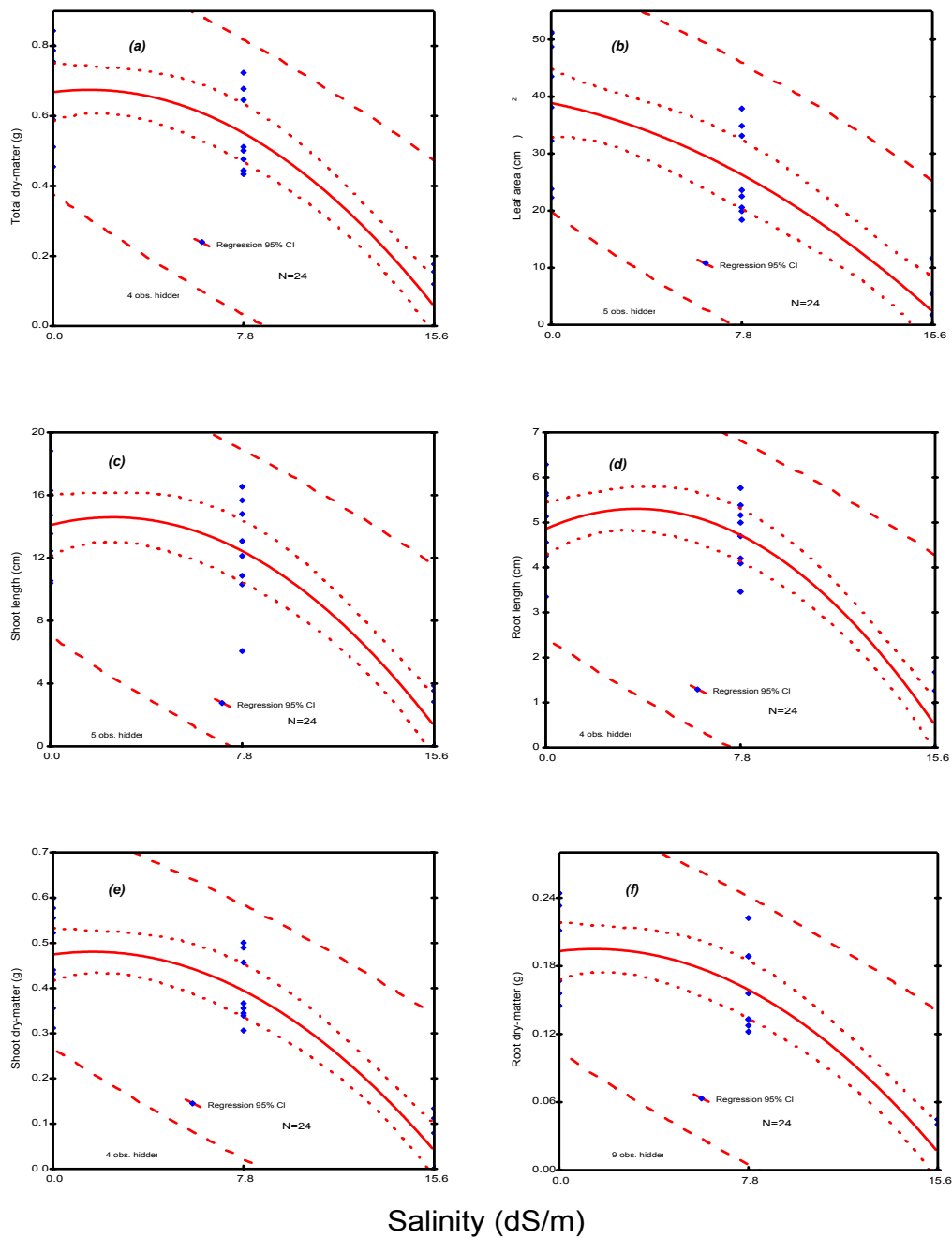


Figure 2. Relationship between (a) total dry matter, (b) leaf area, (c) shoot and (d) root length, (e) shoot and (f) root dry-matter with salinity (dS/m).

The equations of the lines are:

(a)  $Y = 0.688 + 0.009X - 0.003X^2$  ( $R^2 = 85\%$ ) (correlation:  $r = -0.9231$ )

(b)  $Y = 38.882 - 0.876X - 0.094X^2$  ( $R^2 = 78\%$ ) (correlation:  $r = -0.8816$ )

(c)  $Y = 14.089 + 0.398 - 0.078X^2$  ( $R^2 = 81\%$ ) (correlation:  $r = -0.9015$ )

(d)  $Y = 4.857 + 0.245X - 0.034X^2$  ( $R^2 = 83\%$ ) (correlation:  $r = -0.9132$ )

(e)  $Y = 0.474 + 0.007X - 0.002X^2$  ( $R^2 = 85\%$ ) (correlation:  $r = -0.9238$ )

(f)  $Y = 0.193 + 0.003X - 0.0008949X^2$  ( $R^2 = 84\%$ ) (correlation:  $r = -0.9145$ )

The equations, correlation and determination coefficients to total dry matter, leaf area, shoot and root lengths, shoot and root dry-matter are shown in Fig. 2*a-f*. These data show that the response to salinity was non-linear, and that the quadratic regression seems adequate to describe the relation between these variables with salinity. This implies that the response to salinity apparently declined somewhere between 7.8 and 15.6 dS/m, consequently, it is necessary to undertake further studies to determine the threshold for vegetative growth of this genotype under saline conditions. The practical implication of this study is that growers who want to maximize yields under saline environments should consider the threshold where plants suffer no significant damage, causing a reduction in plant population or yields.

## 4.1.2. Selección y clasificación de genotipos en respuesta a la salinidad

### Artículo Publicado:

**Murillo-Amador B**, Troyo-Diéguez E, Jones HG, Ayala-Chairez F, Tinoco-Ojanguren CL, López-Cortés A. 2000. Screening and classification of cowpea genotypes for salt tolerance during germination. *PYTON International Journal of Experimental Botany*, 67:71-84.

### Abstract

Twenty-five cowpea genotypes were tested to determine salt tolerance during germination to three salinity levels (0, 85, and 170 mM NaCl). Germination percentage decreased as salinity increased. Salt concentration affects cowpea genotypes seeds by delaying start of germination. Salinity lowered both germination rate and germination percentage. Two criteria were used to classify genotypes as tolerant: 1) genotypes with more than 75% germination compared to the control at 170 mM NaCl and genotypes with more than 90% germination compared to the control at 85 mM NaCl, and 2) genotypes with more than 40% germination compared to the control at 170 mM NaCl and more than 75% compared to the control at 85 mM NaCl. Tolerant genotypes were UCR 109 CB3, H-8-27, UCR 158 CB88, UCR 188 CB5, and CB 46 from University of California Riverside and Paceño from México. The criteria for sensitivity was less than 30% germination with respect to the control at 170 mM NaCl and less than 15% germination with respect to the control at 170 mM NaCl. Sensitive genotypes were IT96D-733, IT89KD-391, IT95K-1088-4, IT95K-1090-12, and IT90K-277-2 from IITA, Nigeria, and Sonorensis from México. UCR 109 CB3 was the most salt tolerant genotype, while H8-8-27, UCR 158 CB88, Paceño, UCR 118 CB5, CB 46 and IT89KD-288 were intermediate in the salt tolerance. The rest were considered salt-sensitive genotypes.

### Introduction

Germination is a critical stage in the plant growth cycle because of its obvious effects on plant stand and eventual yield. Salinity stress during this crucial phase can greatly increase plant mortality (9). Because significant reductions in yield could result when plant population density is less than optimum, it is important to know the salt tolerance of crops during germination in soils with high salt content. According to Maas and Grieve (1990), germination refers to rupture

of the seed coat and radicle and plumule emergence from the seed. High soil and water salinity has been implicated in inhibition in seed germination, growth and dry matter accumulation. Salt inhibits germination for two reasons. First, the gradient of water potential between the seed and the external medium is reduced (osmotic effect), which leads to a decreased water intake (Uhvits, 1960). Second, seed metabolism is affected, causing immobilization of seed reserves (Prisco and Vieira, 1976; Prisco *et al.* 1981; Gomes-Filho *et al.* 1983). The metabolic effects could be the result of an osmotic or toxic effect or a combination of both (West and Francois, 1982), but the biochemistry of salt inhibition of germination is not fully understood (13).

Screening and selection for any character are desired at the earliest developmental stage as possible. Tolerance to salt at germination is a highly desirable trait for selection purposes (Cony and Trione, 1998; Tal, 1985) as germplasm sources, screening parental varieties in breeding and selecting genotypes to improve genetically the tolerance to salt. A better understanding of this physiological stage may help improve selection techniques for breeding salt-tolerant crops. Plant breeders have searched for salt-tolerance sources in several crops as expressed at germination and early growth of the seedling. The basic assumption of this strategy was that the plant having the highest tolerance early in development is also most likely to be tolerant later. In Kentucky bluegrass seeds percentage and rate of germination may be efficient criteria for selection for salt tolerance at germination or later (Horst, 1982). In melon though, response to salinity did not correlate with early growth rate (Nerson and Paris, 1984). Little is known about the processes involved in cowpea tolerance to salt during germination. Selection for salt tolerance during germination of cowpea has not been reported. We believe that screening of cowpea must first include the evaluation of the degree of salinity tolerance at the germination stage, which is one of the most sensitive stages in most species (Maas and Grieve, 1990). The objectives of this research were to evaluate the effect of NaCl concentration on cowpea germination and to determine the behavior of these genotypes under this stress. Screening for salt tolerance at this physiological stage may help determine, in the following physiological stages, the initial steps of salt tolerance.

## **Materials & Methods**

This study was done at the Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR) located in an arid zone of Baja California Sur, 17 km NW of La Paz, Mexico (24°08'N 110°24'W). Twenty-five cowpea genotypes from different origins were used (Table

1). Since seed vigor is also affected by the environment of the seed, a previous field screening was done in which 38 genotypes were planted at the same time and environmental conditions to get enough seeds with the same vigor and the same lot for this and subsequent experiments, but only 25 genotypes were selected with same or similar maturation time conditions of the seeds at harvest.

Seeds were previously disinfected by immersion in Ca hypochlorite solution, (containing 5% active chlorine), for 5 min. The seeds were then washed three times with sterilized distilled water. Germination tests were done in sterilized Petri dishes [(150 x 15 mm) lined at the bottom with a cotton layer] that had been autoclaved. Each dish was moistened with 5 ml of the appropriate NaCl solution (0, 85, or 170 mM). Germination tests were done in a dark growth chamber (Convicon Model CMP 3244) at  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Because the Petri dishes were not covered, the relative humidity was maintained at  $80\% \pm 1\%$  to prevent evaporation of the medium. The appropriate solutions were added (3 ml once daily) to each dish. Seeds were considered germinated when the radicle reached at least 2 mm in length. The percentage of germinated seeds was recorded daily, and final germination was determined after 7 days. The germination rate was calculated using Maguire's (Maguire, 1962) equation:  $M = n_1/t_1 + n_2/t_2 + \dots + n_7/t_7$ ; where  $n_1, n_2, \dots, n_7$  are the number of germinated seeds at times  $t_1, t_2, \dots, t_7$  (in days).

The experimental design for germination percentage and germination rate was a factorial treatment set of 25 genotypes and three salt levels arranged in a completely randomized design with four replications of 20 seeds per replicate [(we used 20 seeds because of the limited number of available seeds); other workers have used similar or smaller number of seeds (Aziza *et al.* 1997; Horst and Taylor, 1983; Kurban *et al.* 1998; Mukherjee and Choudhuri, 1981; Singh *et al.* 1990). Data from the experiment were initially analyzed by a factorial analysis of variance but germination rates, which are the sum of the average germination counts per day, were not transformed before analysis. Germination percentages were arcsine transformed (Sokal and Rohlf, 1988).

Means were separated using Duncan's Multiple Range test ( $P = 0.05$ ). For all genotypes, two regression analyses were done, (1) salt level (independent variable) vs germination percentage and vs germination rate, and (2) salt level (independent variable) with genotypes to identify germination percentage response models. However, with only three salt levels, the

power of regression analysis was poor. After get genotypes response models to salinity at germination percentage, inverse regression analysis a useful method when we know the value of Y (germination percentage: 90, 75 or 50%) for an individual and wish to estimate the corresponding value of X (salinity levels: mM of NaCl) within genotypes was used to predict 10%, 25%, and 50% reductions in germination percentages, which were calculated as a percentage of germination in the control (0 mM NaCl) for this analysis. For statistical treatment of data, SAS computer program (SAS, 1996) was used.

Table 1. Origin of cowpea genotypes.

| Cowpea Genotypes     | Origin                                       | Salinity Tolerance |
|----------------------|--|--------------------|
| 1 Paceaño (CIB-0001) | La Paz, B.C.S. México                        | partially tolerant |
| 2 Tardón             | San Isidro, B.C.S. México                    | NIA                |
| 3 Sonorense          | Hermosillo, Sonora, México                   | NIA                |
| 4 Cuarenteño         | Todos Santos, B.C.S. México                  | partially tolerant |
| 5 CB 46              | California cultivar, Univ. Calif., Riverside | NIA                |
| 6 UCR 158 CB88       | California cultivar, Univ. Calif., Riverside | NIA                |
| 7 H8-8-27            | Breeding lines, Univ. Calif., Riverside      | NIA                |
| 8 UCR 109 CB3        | California cultivar, Univ. Calif., Riverside | NIA                |
| 9 UCR 118 CB5        | California cultivar, Univ. Calif., Riverside | partially tolerant |
| 10 IT95R-52-80       | Nigerian accesion, IITA, Ibadan, Nigeria     | NIA                |
| 11 IT86D-719         | Nigerian accesion, IITA, Ibadan, Nigeria     | NIA                |
| 12 IT96D-666         | Nigerian accesion, IITA, Ibadan, Nigeria     | NIA                |
| 13 IT89KD-288        | Nigerian accesion, IITA, Ibadan, Nigeria     | NIA                |
| 14 IT82D-889         | Nigerian accesion, IITA, Ibadan, Nigeria     | NIA                |
| 15 IT93K-734         | Nigerian accesion, IITA, Ibadan, Nigeria     | NIA                |
| 16 IT96D-733         | Nigerian accesion, IITA, Ibadan, Nigeria     | NIA                |
| 17 IT89KD-391        | Nigerian accesion, IITA, Ibadan, Nigeria     | NIA                |
| 18 IT90K-277-2       | Nigerian accesion, IITA, Ibadan, Nigeria     | NIA                |
| 19 IT91K-93-10       | Nigerian accesion, IITA, Ibadan, Nigeria     | NIA                |
| 20 IT94K-437-1       | Nigerian accesion, IITA, Ibadan, Nigeria     | NIA                |
| 21 IT95K-1090-12     | Nigerian accesion, IITA, Ibadan, Nigeria     | NIA                |
| 22 IT95K-1088-4      | Nigerian accesion, IITA, Ibadan, Nigeria     | NIA                |
| 23 IT91K-118-20      | Nigerian accesion, IITA, Ibadan, Nigeria     | NIA                |
| 24 IT90K-284-2       | Nigerian accesion, IITA, Ibadan, Nigeria     | NIA                |
| 25 Sesenteño         | Todos Santos, B.C.S., México                 | partially tolerant |

NIA= no information available

## Results & Discussion

### Germination percentages and germination rates

The analysis of variance indicated that germination percentage and germination rate were affected by genotype, salinity, and genotype-salinity interaction (Table 2). The interaction indicated that salt effect on germination varied according to genotypes. Because one of the main objectives was to select and classify genotypes tolerant or sensitive to salt, six tolerant and six sensitive genotypes were chosen. Two criteria were used to classify genotypes as tolerant: 1) more than 75% germination compared to the control at 170 mM NaCl and more than 90% germination compared with the control at 85 mM NaCl, and 2) more than 40% germination rate compared with the control at 170 mM NaCl and more than 75% germination rate compared with the control at 85 mM NaCl. Genotypes classified as tolerant were UCR 109 CB3, H-8-27, UCR 158 CB88, UCR 188 CB5, and CB 46 from University of California Riverside and Paceño from México. The main criteria for classification of sensitive genotypes was to identify genotypes that had less than 30% germination percentage with respect to the control at 170 mM NaCl and less than 15% germination rate with respect to the control at 170 mM NaCl. Genotypes classified as sensitive were IT96D-733, IT89KD-391, IT95K-1088-4, IT95K-1090-12, and IT90K-277-2 from International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria, and Sonorensense from México.

Table 2. Mean squares from the analysis of variance on germination percentage and germination rate of cowpea genotypes as influenced by salinity during germination stage.

| Source              | df  | Germination Rate | Germination Percentage |
|---------------------|-----|------------------|------------------------|
| Genotype            | 24  | 72.00***         | 1322.88***             |
| Salinity            | 2   | 4850.56***       | 48674.05***            |
| Genotype x Salinity | 48  | 22.98***         | 382.86***              |
| Error               | 225 | 1.50             | 47.66                  |
| Total               | 299 |                  |                        |

\*\*\* Significant at  $P = 0.001$

All genotypes were grouped into one of four patterns (Table 3) according to their germination percentage and germination rate responses to salt. One genotype was grouped in A (UCR 109 CB3), which was classified as tolerant because it showed no drastic reduction of final germination percentage and germination rate at 170 mM NaCl compared with the rest of genotypes. UCR 109 CB3 averaged 95% germination percentage with respect to the control and 73% germination rate with respect to the control both at 170 mM NaCl. The rest of three

patterns exhibited decline in mean germination percentage and germination rate under salinity but all patterns of decline varied between germination percentage and germination rate. Six genotypes (H8-8-27, UCR 118 CB5, UCR 158 CB88, Paceaño, CB46, and IT89KD-719) were grouped in B. These genotypes had a range of 70-85% germination percentage compared with the control at 170 mM NaCl and a range of 42-55% of germination rate compared with the control at 170 mM NaCl. Seven genotypes were grouped (IT86D-719, IT82D-889, Tardón, IT96D-666, IT95R-52-80, Cuarenteño, and IT91K-118-20) in C. These genotypes showed a range of 51-67% germination percentage compared with the control at 170 mM NaCl and a range of 23-34% germination rate compared with the control at 170 mM NaCl. Eleven genotypes were grouped (IT90K-284-2, IT91K-93-10, IT94K-437-1, Sesenteño, IT93K-734, IT96D-733, IT89KD-391, IT95K-1088-4, IT95K-1090-12, Sonoreense, and IT90K-277-2) in D, which showed less of 50% of germination percentage compared with the control at 170 mM NaCl and less of 20% germination rate compared with the control at 170 mM NaCl. These genotypes showed the classical effects of an almost linear reduction of mean in both variables with increasing salinity (Horst, 1982).

The general regression analysis performed including all genotypes indicated that germination percentage and germination rate for all genotypes decreased linearly with increasing salinity (Fig. 1). However, when individual regression analyses were performed for each genotype to determine the response-model to salinity in germination percentage, most cowpea genotypes decreased linearly or quadratically with increasing salinity. These models were used to estimate X (salinity in mM NaCl) from Y (reduction in germination percentage) in the inverse regression analysis (Table 4), which showed that the highest average salt concentration (140 mM NaCl) was required to reduce germination percentage to 90% in UCR 109 CB3. The rest of genotypes were intermediate in the salt level required to reduce total germination to 90% (67 to 94 mM NaCl). Similar tendency was shown in reducing germination to 75% (Table 4); UCR 109 CB3 required the highest salt concentration (195 mM NaCl) to reduce total germination to 75%.



Table 3. Genotype means for germination rates and germination percentages of 25 cowpea genotypes at three salinity levels.

| Cowpea<br>Genotypes | Pattern <sup>¶</sup> | Germination Rate<br>Salinity (mM NaCl) |                          |               | Germination Percentage<br>Salinity (mM NaCl) |            |            |
|---------------------|----------------------|--|--------------------------|---------------|--|------------|------------|
|                     |                      | 0                                      | 85                       | 170           | 0  | 85         | 170        |
| UCR 109 CB3         | A                    | 19.75a                                 | 18.75a (95) <sup>†</sup> | 14.41a (73)   | 100a <sup>‡</sup>                            | 98.75a     | 95.00a     |
| H8-8-27             | B                    | 19.62a                                 | 16.11bcd (82)            | 10.76b (55)   | 100a   | 97.50a     | 85.00ab    |
| UCR 118 CB5         | B                    | 19.50a                                 | 16.27bc (83)             | 9.67bc (50)   | 100a   | 100.00a    | 81.25abc   |
| UCR 158 CB88        | B                    | 19.50a                                 | 18.17ab (93)             | 8.39cde (43)  | 100a   | 98.75a     | 81.25abc   |
| Paceño              | B                    | 19.37a                                 | 16.48bc (85)             | 8.79bcd (45)  | 100a   | 93.75ab    | 80.00abc   |
| CB 46               | B                    | 19.12a                                 | 14.39cde (75)            | 8.18cdef (43) | 100a   | 97.50a     | 75.00bcd   |
| IT89KD-288          | B                    | 19.75a                                 | 13.82de (70)             | 8.23cdef (42) | 100a   | 97.50a     | 70.00bcde  |
| IT86D-719           | C                    | 19.50a                                 | 10.80fgh (55)            | 6.62defg (34) | 100a   | 72.50defg  | 67.50bcde  |
| IT82D-889           | C                    | 19.12a                                 | 13.05ef (68)             | 6.13efgh (32) | 100a   | 87.50abcd  | 65.00cdef  |
| Tardón              | C                    | 19.12a                                 | 12.45ef (65)             | 6.41efg (34)  | 100a   | 90.00abc   | 62.50cdef  |
| IT96D-666           | C                    | 19.25a                                 | 14.50cde (75)            | 5.97fgh (31)  | 100a   | 96.25a     | 60.00def   |
| IT95R-52-80         | C                    | 19.620a                                | 9.62ghi (49)             | 5.77gh (29)   | 100a   | 85.00abcde | 56.25defg  |
| Cuarenteño          | C                    | 19.12a                                 | 15.39cd (80)             | 5.94fgh (31)  | 100a   | 87.50abcd  | 51.25efghi |
| IT91K-118-20        | C                    | 19.50a                                 | 8.29ijk (43)             | 4.53ghi (23)  | 100a   | 77.50cdefg | 53.75efgh  |
| IT90K-284-2         | D                    | 19.62a                                 | 6.35klm (32)             | 2.73ijk (14)  | 100a   | 67.50fghi  | 41.25ghijk |
| IT91K-93-10         | D                    | 19.37a                                 | 7.04jkl (36)             | 3.27ijk (17)  | 100a   | 52.50ijkl  | 37.50hijkl |
| IT94K-437-1         | D                    | 19.50a                                 | 9.85ghi (51)             | 3.93hij (20)  | 100a   | 66.25fghi  | 35.00ijklm |
| Sesenteño           | D                    | 19.50a                                 | 4.10m (21)               | 3.85hij (20)  | 100a   | 46.25ijkl  | 33.75ijklm |
| IT93K-734           | D                    | 19.37a                                 | 8.43hijk (44)            | 2.99ijk (15)  | 100a   | 55.00hijk  | 28.75jklmn |
| IT96D-733           | D                    | 19.50a                                 | 9.66ghi (50)             | 2.58ijk (13)  | 100a   | 80.00bcdef | 27.50klmn  |
| IT89KD-391          | D                    | 19.37a                                 | 9.16ghij (47)            | 2.81ijk (15)  | 100a   | 70.00efgh  | 25.00klmn  |
| IT95K-1088-4        | D                    | 19.50a                                 | 6.64kl (34)              | 1.98 jk (10)  | 100a   | 50.00jkl   | 22.50klmn  |
| IT95K-1090-12       | D                    | 19.50a                                 | 5.81lm (30)              | 2.29ijk (12)  | 100a   | 41.25klm   | 21.25lmn   |
| Sonoreense          | D                    | 19.25a                                 | 11.05fg (57)             | 2.16ijk (11)  | 100a   | 63.75ghij  | 17.50mn    |
| IT90K-277-2         | D                    | 19.50a                                 | 4.09m (21)               | 1.18k (6)     | 100a   | 38.75lm    | 11.25n     |

<sup>‡</sup> Comparisons between genotypes for both variables. Means followed by the same letter are not significantly different at the 0.05 level. Comparisons were made within columns using Duncan's Multiple Range Test.

<sup>†</sup> Numbers in parentheses within columns are percentages of the control.

<sup>¶</sup> Pattern criteria are explained in the text.

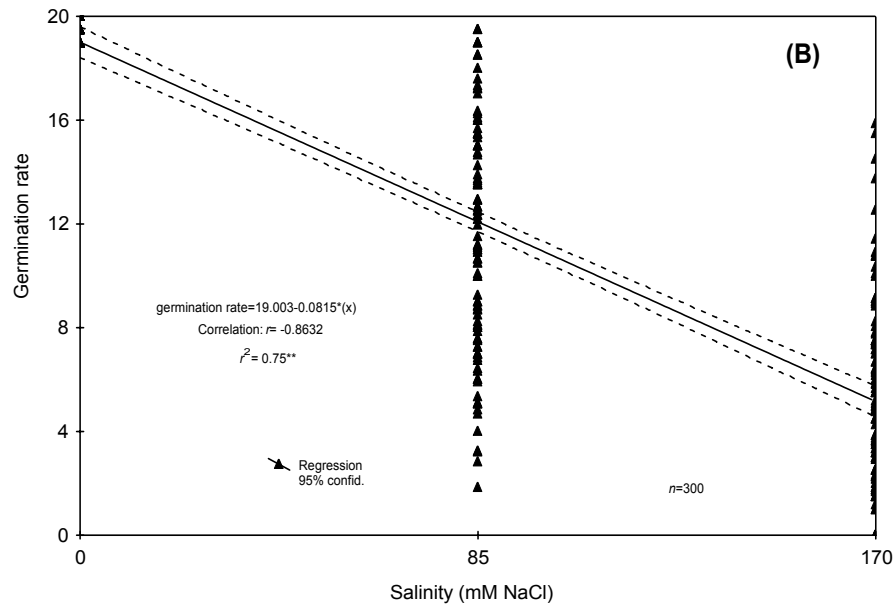
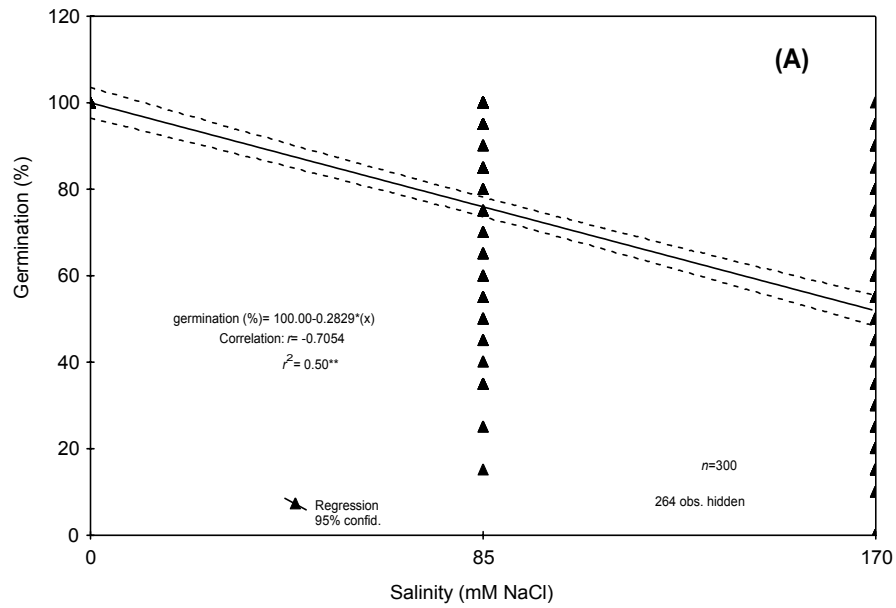


Figure 1. Relation between salinity and germination percentage (A) and between salinity and germination rate (B) in cowpea genotypes at germination stage.

Table 4. Predicted salinity levels to effect 90%, 75%, and 50% germination percentages for 25 cowpea genotypes as calculated from inverse regression analysis.

| Cowpea Genotypes | Salinity level (mM NaCl) |         |             |
|------------------|--------------------------|---------|-------------|
|                  | Germination (%)          |         |             |
|                  | 90                       | 75      | 50          |
| UCR 109 CB3      | 140 a <sup>¶</sup>       | 195 a   | 452 a       |
| H8-8-27          | 75 b                     | 192 b   | 442 b       |
| UCR 158 CB88     | 76 b                     | 166 b c | 361 c       |
| Paceño           | 81 b                     | 152 b c | 350 c       |
| UCR 118 CB5      | 74 b                     | 144 c d | 337 c       |
| CB 46            | 78 b                     | 139 c d | 272 d       |
| IT89KD-288       | 70 b                     | 102 d e | 218 d e     |
| IT82D-889        | 72 b                     | 90 e    | 184 e f     |
| Tardón           | 73 b                     | 85 e    | 166 e f g   |
| IT86D-719        | 87 b                     | 79 e    | 157 e f g   |
| IT96D-666        | 67 b                     | 89 e    | 154 e f g   |
| IT95R-52-80      | 79 b                     | 79 e    | 135 f g h   |
| Cuarenteño       | 69 b                     | 83 e    | 130 f g h i |
| IT96D-733        | 94 b                     | 91 e    | 114 g h i   |
| IT91K-118-20     | 72 b                     | 66 e    | 103 g h i   |
| IT90K-284-2      | 78 b                     | 67 e    | 78 h i      |
| IT89KD-391       | 72 b                     | 64 e    | 72 h i      |
| IT94K-437-1      | 77 b                     | 66 e    | 71 h i      |
| IT91K-93-10      | 90 b                     | 77 e    | 70 h i      |
| Sonorese         | 75 b                     | 65 e    | 68 h i      |
| IT90K-277-2      | 89 b                     | 80 e    | 67 h i      |
| IT95K-1090-12    | 92 b                     | 81 e    | 67 h i      |
| Sesenteño        | 94 b                     | 81 e    | 65 i        |
| IT95K-1088-4     | 86 b                     | 75 e    | 64 i        |
| IT93K-734        | 84 b                     | 73 e    | 61 i        |

<sup>¶</sup> Comparisons between genotypes. Means followed by the same letter are not significantly different at the 0.05 level. Comparisons were made within columns using Duncan's Multiple Range Test at  $P = 0.05$ .

Genotypes H8-8-27, UCR 158 CB88, Paceño, UCR 118 CB5, CB 46, and IT89KD-288 were intermediate (ranging from 102 to 192 mM NaCl), while the rest required the least salt concentration (less than 91 mM NaCl). An average of 452 mM NaCl is required to reduce germination percentage by 50% in UCR 109 CB3, while that 442, 361, 350, 337, 272 and 218 mM NaCl is required to reduce it by 50% total germination of H8-8-27, UCR 158 CB88, Paceño, UCR 118 CB5, CB 46, and IT89KD-288, respectively (Table 4). IT82D-889, Tardon, IT86D-719, IT96D-666, IT95R-52-80, Cuarenteño, IT96D-733, and IT91K-118-20 were intermediate (ranging from 103 to 184 mM NaCl). The rest required the least average salt concentration to

reduce germination to 50% (less than 80 mM NaCl). Salt concentrations affect cowpea genotypes seed germination by delaying the start of germination (Fig. 2). Increasing salinity lowered germination rate (Fig. 3), and germination percentage (Fig. 4). Data presented here provide a convincing argument that cowpea seed germination is severely affected by high salinity. Similarly, it was reported that germination of California Blackeye No. 5 cowpea seed was delayed by salt up to 12 dS/m, but with no significant reduction in final germination percentage. Salinity of 16 and 20 dS/m did significantly reduce final germination percentage. It may be concluded that salt reduces germination percentage and rate of cowpea seeds.

Because germinating seeds respond differently to salinity than established plants (Freeman, 1973), the greater tolerance to salt of some cowpea genotypes during germination would be an adaptative feature of this species to saline environments. We conclude [as did Horst, (1983)], that in cowpea, germination percentage and germination rate are good classification criteria to determine salt tolerant genotypes. Marked differences in salt tolerance were noted among genotypes.

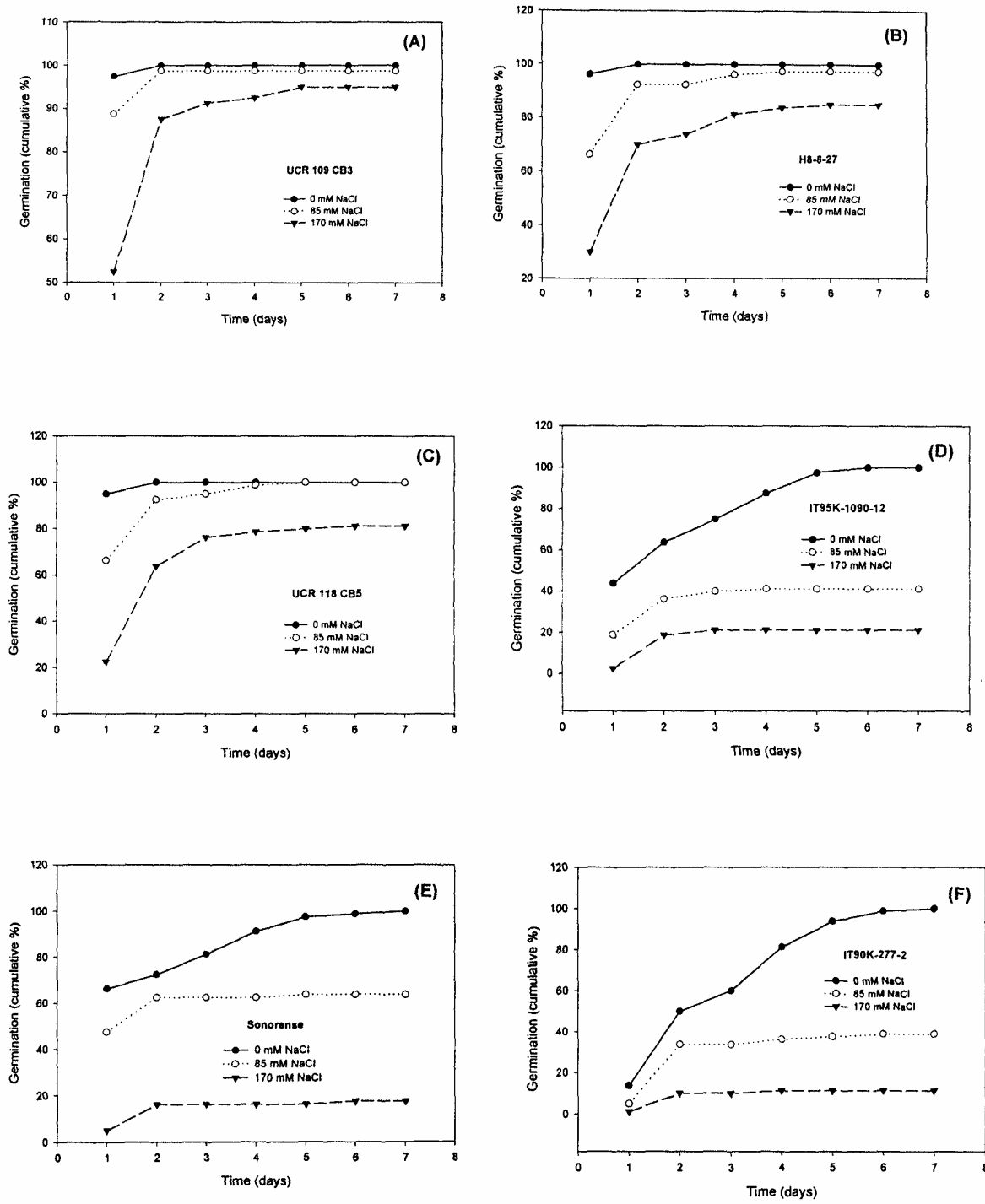


Figure 2. Effect of salinity on germination percentage of three tolerant cowpea genotypes UCR 109 CB3 (A), H8-8-27 (B), and UCR 118 CB5 (C) and three sensitive genotypes IT95K-1090-12 (D), Sonorens (E) and IT90K-277-2 (F).

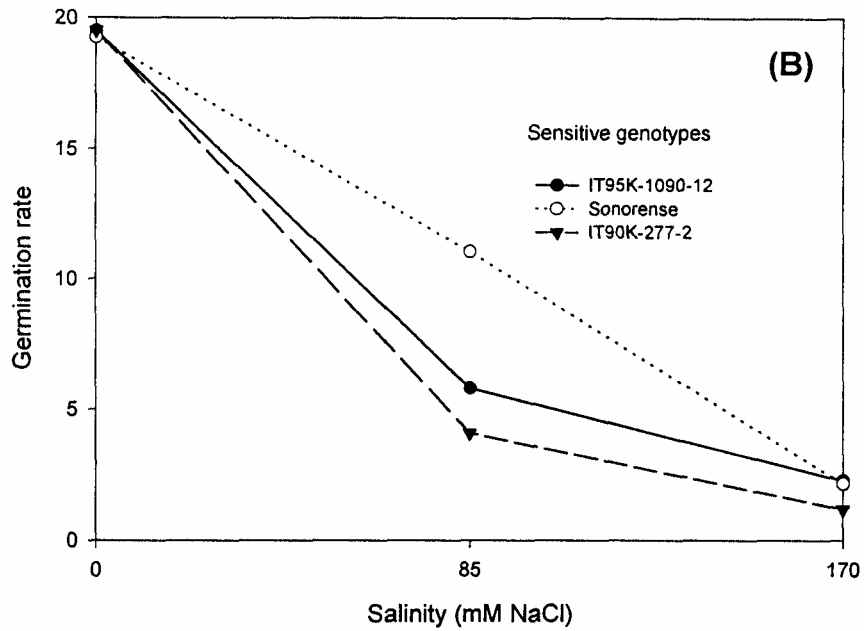
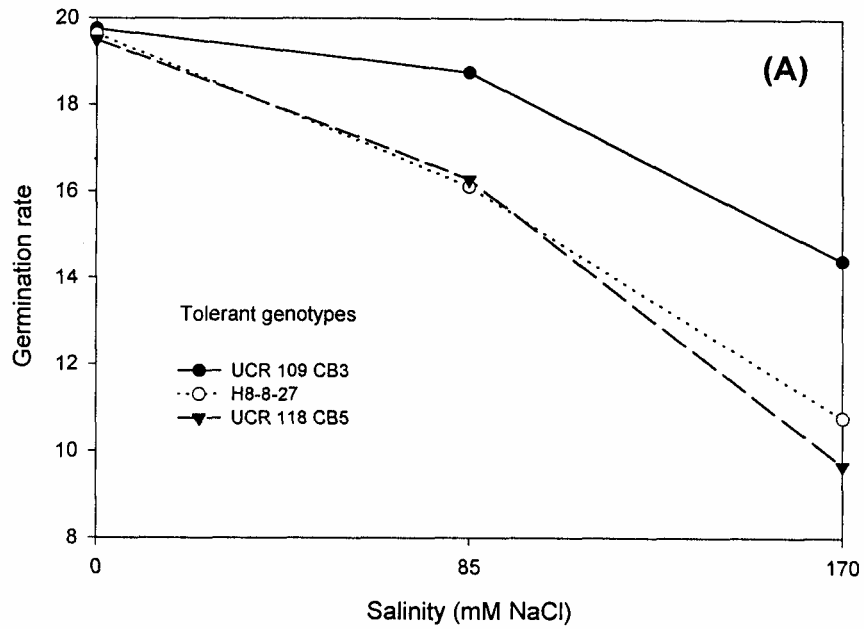


Figure 3. Effect of salt concentration on germination rate of tolerant (A) and sensitive (B) cowpea genotypes.

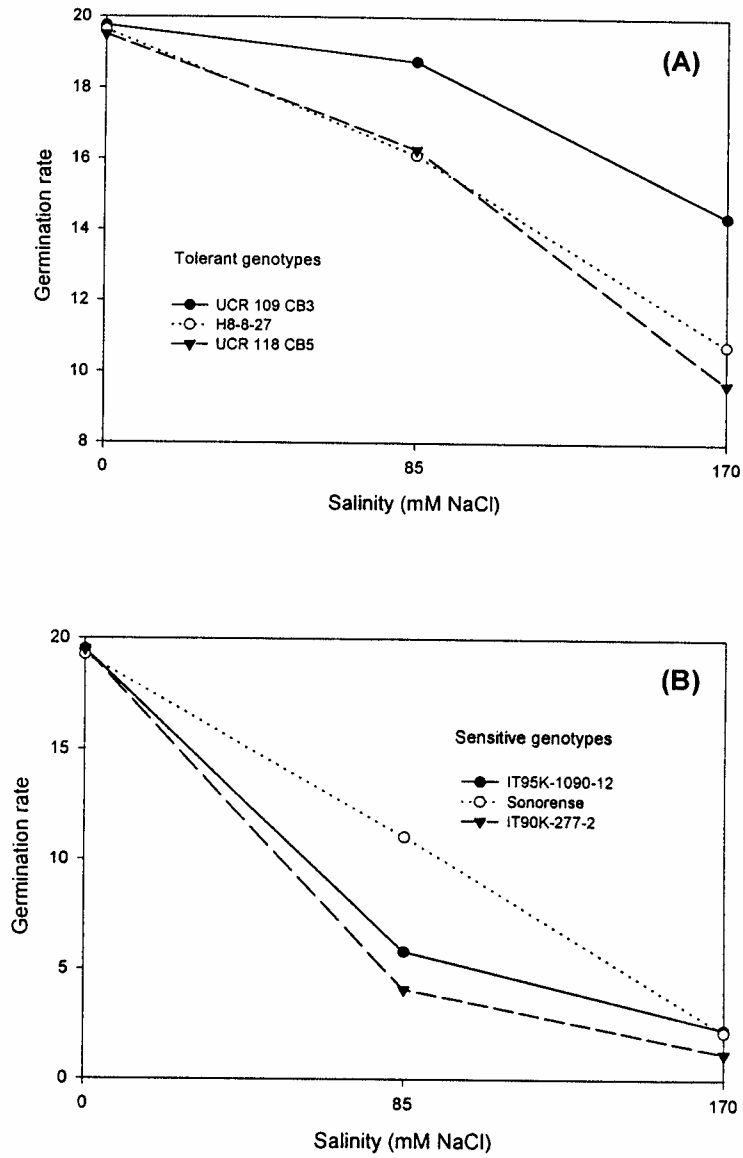


Figure 4. Effect of salt concentration on germination percentage of tolerant (A) and sensitive (B) cowpea genotypes.

## 4.2. Efecto de la salinidad en la etapa de emergencia

### 4.2.1. Efecto de soluciones salinas en las características de plántulas

#### Artículo publicado:

**Murillo-Amador B**, Troyo-Diéguez E, López-Cortés A, Tinoco-Ojanguren CL, Jones HG, Ayala-Chairez F. 2000. Path analysis of cowpea early seedling growth under saline conditions. *PYTON. International Journal of Experimental Botany* **67**:85-92.

#### Abstract

Our objective was to study the effects of salt on growth parameters of cowpea using path-coefficient analysis that describes *a priori* cause-and-effect relationships. We used three salt levels with electrical conductivities of the irrigation treatments of 0, 7.8 and 15.6 dS/m. Net assimilation rate (NAR), crop growth rate (CGR), leaf area ratio (LAR), and relative growth rate (RGR) were measured according to Radford & Hunt. The results show that as salt levels increased, all growth parameters decreased quadratically by a reduction of the main components of growth: dry matter and leaf area. Path-coefficient analysis revealed that NAR and LAR had positive direct effects on RGR at the 7.8 and 15.6 dS/m salt levels. These growth parameters are important in selecting for higher relative early growth rate of cowpea seedlings under saline conditions.

#### Introduction

The cowpea has many uses: fodder for livestock, green vegetables, dry beans (West and Francois, 1982). It is cultivated in different climates ranging from semiarid to subhumid as a dryland crop (Lush and Rawson, 1979). In Baja California Sur (BCS), México, cowpea has good development and satisfactory yields (Murillo-Amador, 1992; Ruiz, 1993; Torres, 1992; Hernández and Troyo, 1988) under the agroecological conditions of this arid region, where salinity problems already exist. BCS is considered an agricultural zone with difficulties in establishing crops; beans (*Phaseolus vulgaris* L.) a traditional crop in México, are currently restricted here because of their susceptibility to salt in water and soils (Navejas, 1995).



Cowpea is grown in BCS for human consumption (seeds and pods), for green manure, as organic material for naturally poor soils, or for the recovery of abused soils.

There are studies of cowpea under saline conditions (Plaut *et al.* 1990; Abdel-Rahman and Abdel-Hadi, 1984; Blis *et al.* 1984; Gomes-Filho and Prisco, 1978; Gomes-Filho and Sodek, 1988). For many plants species the seedling is the most sensitive stage to salt (Maas and Grieve, 1990). Screening for salt tolerance has been accomplished in several crops, using characteristics as germination and emergence, survival, growth rate, chlorosis leaf damage. The relative growth rate (RGR) is a good measure of dry-matter production, allows estimation of net photosynthesis, and can be used to compare behaviour toward any type of treatment under defined conditions: drought, salinity, temperature. Studies on germination, emergence and survival of seedlings are important because final plant population density below optimum produces significant yield reduction (Maas and Grieve, 1990). Cowpea has been shown to be moderately sensitive to salt (Maas and Poss, 1989; West and Francois, 1982; Maas, 1986; Hernández and Troyo, 1988) and moderately tolerant to boron (Francois, 1989). Information from correlation coefficients can be augmented by partitioning correlations into direct and indirect effects for a given set of *a priori* cause-and-effect interrelations (Gravois and Helms, 1992). Correlation between growth variables and path analysis can provide important multiple selection criteria for crops in early growth. The objective of this study was to determine the response of cowpea to salt during the seedlings stage, by evaluating: mean relative growth rate (RGR), net assimilation rate (NAR), crop growth rate (CGR) and leaf area ratio (LAR), over a range of water salinities (NaCl) by using path-coefficient analysis.

## **Materials & Methods**

We did the experiment at Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), located 17 km NW of La Paz, BCS, México (24°08'N. 110°24'W), using healthy and uniform cowpea seeds (cv. Paceño). Cowpea seeds were germinated in Jiffy-7 peat pellets (Jiffypots, Jiffy Products (N.B.) Ltd, Shippegan, Canada) that were placed into Petri dishes (six Jiffypots per Petri dish) at a constant 25° C, and 80% RH, and irrigated with distilled water.

Three days after plant emergence, 72 seedlings were selected for uniform size and leaf area and transplanted into plastic cylindrical pots 7.5-cm diameter and 18-cm high (a single seedling per pot). The pots contained sand: vermiculite mixture. Eight replicates of three seedlings each were irrigated with solutions containing an equivalent weight of NaCl to

produce salinity levels of 0 (control), 7.8 and 15.6 dS/m. Five days after transplanting, the once daily application of saline solutions began. The experiment was conducted outdoors.

Growth variables were calculated following the method of Radford (1967). Twenty-four plants were harvested immediately before adding the saline solutions. The last harvest was done three weeks after applying the treatments. To calculate all growth values, 24 plants were used. Seedlings irrigated with 0, 7.8, and 15.6 dS/m (survivor seedlings) were harvested, washed with water, and foliage separated from roots. To calculate growth variables, the following were recorded: weight of fresh and dry matter (leaves and shoots) and leaf area [determined using the portable leaf area meter LI-Cor Model Li-3000A (Li-Cor Lincoln, Nebraska, USA)]. For dry matter determination, plant samples were dried in a forced-air dryer at 80 °C for 48 h. Dry matter was used at each harvest to calculate growth parameters such as mean relative growth rate (RGR), according to the equations (Radford, 1967):

$$\text{RGR} = (\log_e W_2 - \log_e W_1) / (t_2 - t_1) = [\text{wt. wt.}^{-1}] \text{ time}^{-1} \dots\dots\dots(1)$$

$$\text{NAR} = [(W_2 - W_1 / L_{A2} - L_{A1}) (\log_e L_{A2} - \log_e L_{A1} / t_2 - t_1)] = \text{wt. area}^{-1} \text{ time}^{-1} \dots\dots\dots(2)$$

$$\text{LAR} = [(L_{A1} / W_1) + (L_{A2} / W_2)] / (2) = \text{area wt.}^{-1} \dots\dots\dots(3)$$

$$\text{CGR} = (1/P)(W_2 - W_1 / t_2 - t_1) = \text{wt. area}^{-1} \text{ time}^{-1} \dots\dots\dots(4)$$

Where  $W_2$  and  $W_1$  are the total dry weights at  $t_2$  and  $t_1$ ;  $L_{A1}$  and  $L_{A2}$  are total leaf area at  $t_1$  and  $t_2$ ;  $P$  is the ground area.

The experimental design consisted of three treatments replicated eight times in a completely randomized design. All treatment effects were tested for statistical significance by ANOVA, assuming treatments had a logical structure and were continuous; orthogonal polynomials were used. All values were transformed using  $\sqrt{x+0.5}$  (square-root transformation). Analysis for specific effects of salt on RGR, NAR, LAR, and CGR were analyzed by the ANOVA and GLM procedure in SAS (SAS, 1988), Multiple Regression Analysis Module in STATISTICA. Partial correlation coefficients obtained for each variable were subjected to path-coefficient analysis, and the direct and indirect effects on RGR from NAR, CGR, LAR, and salinity were estimated, and analyzed using the MATLAB computer program agreeing with the conditions of Kempthorne (Kempthorne, 1969).

## Results & Discussion

After two weeks of treatments, the leaves of seedlings in 15.6 dS/m started to die, implying an inflexion in response somewhere between 7.8 and 15.6 dS/m. After three weeks,

some leaves of seedlings in 15.6 dS/m dried up and some died. Salt levels differed significantly ( $P=0.0001$ ) for all growth variables, NAR, RGR, CGR and LAR, were reduced quadratically and significantly as salinity increased. A decreased NAR in cowpea has been previously reported by (Plaut *et al.* 1990) using saline solutions of 0, 43, 87, 130, and 173 mM NaCl. The authors concluded that NAR change much more gradual throughout the entire salinity range. However, a decrease was already found one day after salinization and proceeded up to 4 days when it was inhibited by 50% at 43 mM NaCl and up to 85% at 173 mM. The relationships between growth variables and salinity levels were analyzed. All growth variables had a high, significant and negative correlation coefficient with salinity; all parameters decreased quadratically as salt levels increased (Fig. 1, a-d).

According to Radford (1967) there is a close relationship of NAR, LAR, and CGR, with RGR. We found a strong correlation between these physiological traits. Considering this relationship, the path-coefficient analysis of cause-and-effect relation among three predictor variables, NAR, CGR, and LAR and the criterion variable RGR was studied (Fig. 2).

Direct and indirect effects of NAR, CGR and LAR on RGR are shown in Table 1. The three-predictor variables show some direct effects above one; this suggests that inflation was caused by multicollinearity. The direct effects of NAR showed two positive values in 7.8 and 15.6 dS/m and of greater magnitude than the direct effects for the other two growth variables. A negative value was shown at 0 dS/m. This seems to be caused by the nonsignificant correlation between NAR and RGR shown at this salinity level. At 7.8 and 15.6 dS/m, the indirect effect of NAR on RGR through its association with CGR was -0.96 and -3.00. This shows an inverse relationship between NAR and CGR at these salinity levels. At 0 dS/m, the effect was positive, because a significant correlation was shown at this salt level. The indirect effect of NAR through its association with LAR was negative (-0.31) at 0 dS/m, indicating an inverse relation between these two variables probably caused by a nonsignificant correlation between the two variables at this salinity level.

The direct effect of CGR on RGR was positive at 0 dS/m, and negative at 7.8 and 15.6 dS/m, indicating an inverse relation between variables at these salt levels. Compared with the direct effects of NAR on RGR, it was considered of little importance. The indirect effects of CGR via NAR and LAR, showed negative effects at 0 dS/m, and positive at 7.8 and 15.6 dS/m.

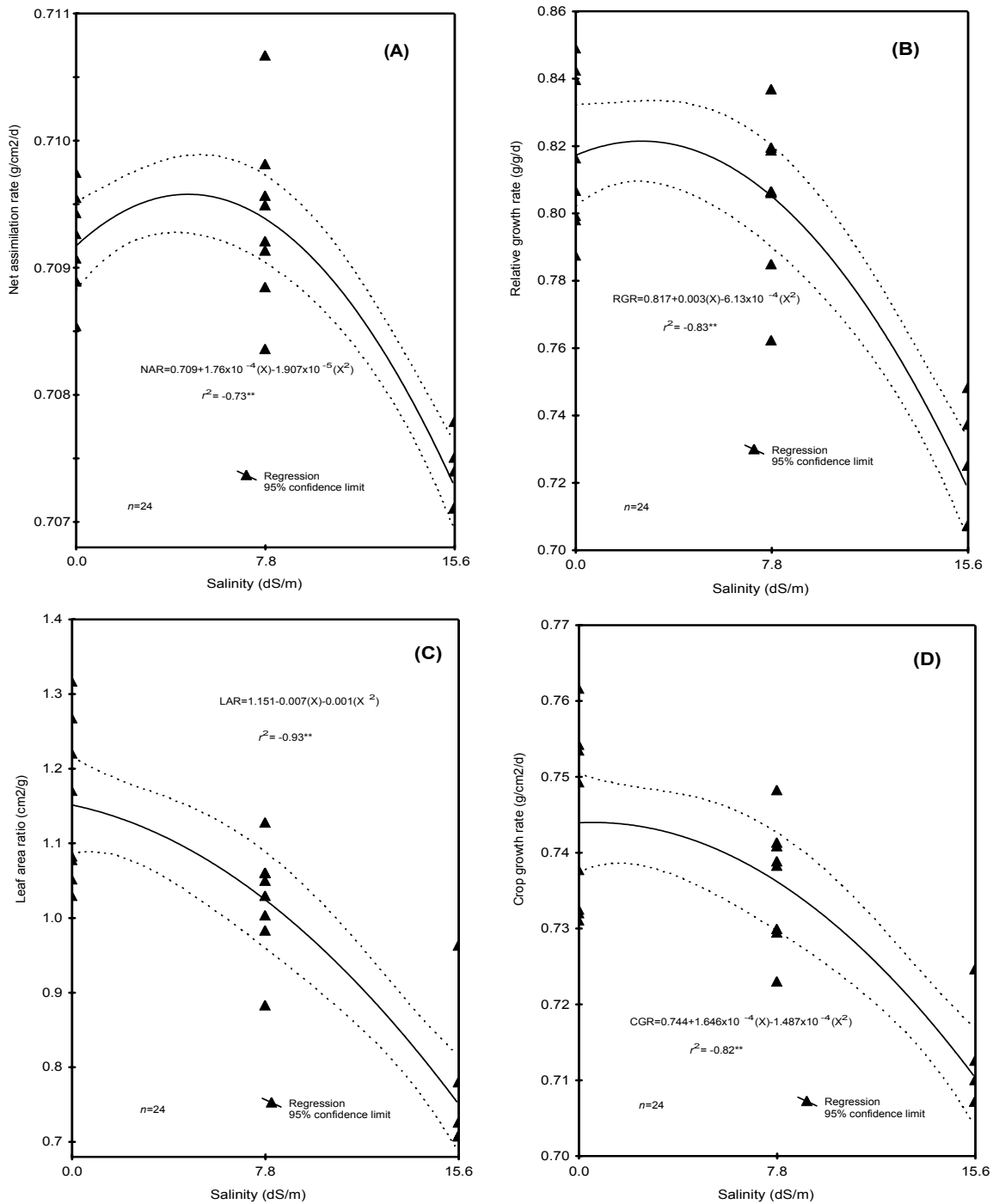


Figure 1. Relation of salinity to NAR (A), RGR (B) LAR (C) and CGR (D) on cowpea at seedling early growth stage.

Table 1. Path-coefficient analysis for each salinity level of NAR, CGR and LAR on RGR of cowpea seedlings under saline conditions.

| Pathway   | Salinity levels (dS/m) |       |       |
|---|------------------------|-------|-------|
|   | 0                      | 7.8   | 15.6  |
| Net assimilation rate → relative growth rate                |                        |       |       |
| Direct effect, $P_{21}$                                     | -0.52                  | 1.46  | 1.93  |
| Indirect effect via crop growth rate, $r_{23}, P_{31}$      | 1.43                   | -0.96 | -3.00 |
| Indirect effect via leaf area ratio, $r_{24}, P_{41}$       | -0.31                  | 0.43  | 2.06  |
| Correlation, $r_{21}$                                       | 0.59                   | 0.93  | 0.99  |
| Residual: 0.2110  |                        |       |       |
| Crop Growth Rate → relative growth rate                     |                        |       |       |
| Direct effect, $P_{31}$                                     | 1.92                   | -1.06 | -3.16 |
| Indirect effect via net assimilation rate, $r_{23}, P_{21}$ | -0.39                  | 1.30  | 1.82  |
| Indirect effect via leaf area ratio, $r_{34}, P_{41}$       | -0.58                  | 0.63  | 2.25  |
| Correlation, $r_{31}$                                       | 0.95                   | 0.88  | 0.91  |
| Residual: 0.1560  |                        |       |       |
| Leaf Area Ratio → relative growth rate                      |                        |       |       |
| Direct effect, $P_{41}$                                     | -0.63                  | 0.78  | 2.27  |
| Indirect effect via net assimilation rate, $r_{24}, P_{21}$ | -0.26                  | 0.80  | 1.75  |
| Indirect effect via crop growth rate, $r_{34}, P_{31}$      | 1.75                   | -0.86 | -3.14 |
| Correlation, $r_{41}$                                       | 0.86                   | 0.72  | 0.87  |
| Residual: 0.0103  |                        |       |       |

The direct effects of LAR on RGR were negative at 0 dS/m, and positive at 7.8 and 15.6 dS/m. They were considered of secondary importance compared to the direct effects of NAR on RGR. NAR showed negative indirect effect at 0 dS/m, and positive indirect effects at 7.8 and 15.6 dS/m, whereas CGR showed the contrary. According to Long and Baker (1986), the reduction in relative growth rate at salinities just beyond optimum is caused by reduced LAR, but as salinity increases further the reduction in RGR becomes increasingly the result of a reduced NAR. Some studies show salt affects carbon assimilation via smaller leaf area rather than by reduced rate of photosynthesis; both limit growth (Munns, 1983). There are other effects that can modify RGR (e.g. net photosynthesis rate, available soil nitrogen, etc.). In addition, the seedling stage seems to be one of the most sensitive stages of growth for many crops, even more sensitive than germination (Maas and Grieve, 1990). The residual term is an artificial variable that includes other variables that can be relevant to predicting RGR or variables that do not have linear effects of the predictor variables. All residual terms at each salinity level, had low values, indicating the growth variables considered in the present study were sufficient for making predictions and that selections based on NAR and LAR would increase RGR. However, we assumed that we could find other relevant effects to determine the RGR response.

According to several authors (Sidwell *et al.* 1976; Milligan *et al.* 1990; Kang *et al.* 1983), the path-coefficient analysis is useful for selection criteria. Although no information was found, probably this technique can be useful for screening or selecting genotypes for salt tolerance in early seedling growth.

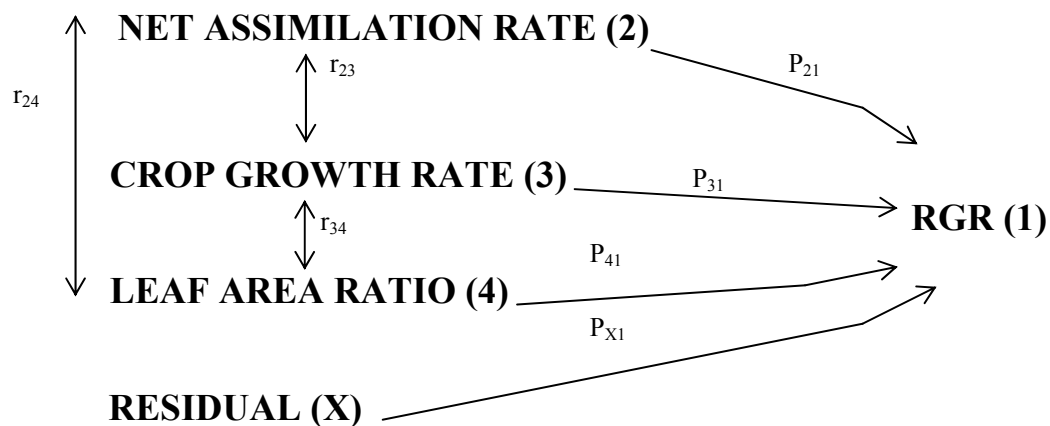


Figure 2. Path diagram showing causal relationship between the three-predictor variables, NAR, CGR, and LAR, and the response variable, RGR.

## 4.2.2. Selección y clasificación de genotipos en respuesta a la salinidad

### Artículo publicado:

**Murillo-Amador B**, Troyo-Diéguez E, López-Cortés A, Jones HG, Ayala-Chairez F, Tinoco-Ojanguren CL. 2001. Salt tolerance of cowpea genotypes in the emergence stage. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. **41**: 81-88.

### Abstract

The effect of NaCl salinity (0, 85, and 170 mmol/L) during emergence of 25 genotypes of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] was studied under growth chamber conditions. Seed emergence percentage and rate, root:shoot dry-weight ratio, and biomass per plant were affected by genotype, salinity and genotype x salinity interaction; this interaction showed that salinity effects differed among genotypes. The criterion used to classify genotypes with respect to their salt tolerance was based on their emergence percentages in both 85 and 170 mmol NaCl/L. One genotype was grouped into class “A” (‘CB27’) which had the highest salt tolerance at emergence, and was classified as salt tolerant. Another group consisting of ‘Paceño’, ‘CB88’, ‘CB3’, ‘CB5’, ‘Tardón’, ‘Cuarenteño’ and ‘CB46’ was placed into class “B”; these genotypes showed total emergence percentages up to 75% in both 85 and 170 mmol NaCl/L. A third group of genotypes was placed into class “C” which had the lowest emergence percentage in both 85 and 170 mmol NaCl/L. It was confirmed that salinity treatments affect the emergence of cowpea, delaying both emergence percentage and rate. We conclude that selection and classification for salt tolerance in cowpea genotypes can be successfully undertaken at early seedling stages, because the same genotypes were classified similarly during the germination stage in previous research.

### Introduction

Differences in salt tolerance exist not only between species but also among genotypes of a certain species. According to Epstein and Norlyn (1977) this latter aspect attracts increasing interest for both biochemical studies on the mechanism of salt tolerance and applied research such as adaptation of crop species to saline soils. The success of selection depends on the amount of genetic variation distinguishable from environmental variation in the screening process. In salt tolerance, the genotypic differences within species can be the result of different

regulation mechanisms in mineral nutrition (Marschner *et al.* 1981). Screening and selection for any character are desired at the earliest developmental stage possible.

Seedling emergence is used to denote the emergence of a seedling through the soil surface, which is a critical stage in the plant growth cycle because of its obvious effects on plant stand and eventual yield of crop (Maas and Grieve, 1990). In many crops, research has focused on germination and emergence; however, tolerance to salinity during these stages and early seedling development is not always positively correlated with growth or yield (Dewey 1962; Francois and Bernstein 1964).

Cowpea is a species widely grown in different parts of the world for different purposes, for example as a fodder crop for livestock, as a green vegetable and as a dry beans (West and Francois 1982). Also it is cultivated as a dryland crop under climatic conditions ranging from semi-arid to subhumid (Lush and Rawson 1979). Cowpea has a higher tolerance to salinity than maize but lower than wheat, barley, sugarbeet and cotton (Ravikovitch and Porah 1967; West and Francois 1982; Maas 1986; Hall and Frate 1996). According to the divisions for classifying crop tolerance to salinity, cowpea is a moderately sensitive crop (Maas and Hoffman 1977) but exhibits greater salt tolerance during later stages of plant growth (Maas and Poss, 1989). Cowpea has exhibited no yield losses until salinity in the root zone exceeded an electrical conductivity of 4.9 dS/m. For each increase of 1 dS/m above this threshold, yields reduce by 12%. However, if sources of water of different salinity are available, it is preferable to keep salinity low during germination and early vegetative growth, when the crop is most sensitive, and then to use the poorer quality water during pod filling (Hall and Frate, 1996).

Literature concerning the effect of salinity on cowpea at emergence is not abundant. However, some studies have been conducted using NaCl and CaCl<sub>2</sub> to determine the salt stress (0, 4, 8, 12, 16, and 20 dS/m) effect on cowpea seeds (West and Francois 1982). Germination decreased at 16 and 20 dS/m. This reduction was caused by either an osmotic or a toxic effect or a combination of both, but no tests were undertaken using iso-osmotic solutions of permeating and non-permeating solutes to test this phenomenon. Gomes and Prisco (1978), using water and 0.1 mol/L NaCl solutions, reported that seedling growth and protein reserve mobilization were delayed by the NaCl treatment. Gomes and Sodek (1988) used iso-osmotic solutions (-4.6 Mpa) of NaCl (0.1 mol/L) and mannitol (0.19 mol/L) during germination of cowpea and determined that these treatments inhibited the growth of seedlings to a similar



degree, suggesting that the salt effect is mainly osmotic; however, they focused their research on the RNase activity of the cotyledons.

The objectives of this research were to evaluate the effects of NaCl salinity on cowpea emergence and seedling biomass of a diverse set of cowpea cultivars and lines, and classify them according to their tolerance to salinity.

## **Materials and Methods**

This study was carried out at the Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR), located in an arid zone of Baja California Sur, 17 km north-west of La Paz, Mexico (24°08'N, 110°24'W). Previous research at the germination stage using the same genotypes (except genotype PEPH-V Wes-85) and salinity levels was carried out at CIBNOR. Twenty-five genotypes of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) from different origins were used (Table 1). Assuming that seed vigor is also affected by the environment associated with the seed, a field screening was previously conducted, where 38 genotypes were planted at the same time and under the same environmental conditions to obtain sufficient seeds with a similar vigour from the same lot, for this and subsequent experiments. Only 25 genotypes were selected with the same or similar maturity length and harvesting conditions of the seeds.

Seeds were disinfected by immersion in calcium hypochlorite solution containing 5% active chlorine, for 5 min. They were then washed 3 times with sterilized distilled water. Emergence tests were performed in sterilized peat pellets 'Jiffy-7' [Jiffy-pots, Jiffy Products (N.B.) Ltd, Shippegan, Canada], which were placed in sterilized Petri dishes (150 by 15 mm). For saline treatments, each jiffy pot was placed on a plastic tray containing the respective saline solution (0, 85, and 170 mmol NaCl /L) and was maintained moistened during the experiment by adding 5 mL of the appropriate solutions daily. This test were carried out in 2 growth chambers (CONVIRON CMP 3000, Controlled Environments Limited, Canada R3H OS13000 and Percival, Model MB-60B, Controlled Environment, Percival Manufacturing Company, USA) at 25 C ± 1 °C, and a day/night period of 12/12 h. The relative humidity was maintained at 80% to prevent high evaporation of the saline medium. Seeds were considered to have emerged when the seedling emerged through the jiffy-pot surface. The percentage of emerged seeds was recorded daily (emergence rate), and the total emerged seedlings counted after 10 days. The emergence rate was calculated according to Maguire's equation (Maguire, 1962):

$$M = n_1/t_1 + n_2/t_2 + \dots n_{10}/t_{10}$$

Where  $n_1, n_2, \dots, n_{10}$  are the number of emerged seeds at times  $t_1, t_2, \dots, t_{10}$  (in days). After 10 days, the dry weight was determined after drying the seedlings in a forced-air dryer at 80°C for 48 h. The dry weights of the stem, leaves and roots were used to calculate root:shoot (stem + leaves) dry-weight ratio. Root and shoot lengths (cm) were determined with a digital caliper (GENERAL, No. 143, GENERAL Tools, Manufacturing Co., Inc. New York, USA) and were used to calculate root:shoot length ratio.

Table 1. Cowpea genotypes evaluated for the effect of NaCl salinity.

| Cowpea Genotypes     | Origin                                       |
|----------------------|--|
| 1 Paceño (CIB-0001)  | La Paz, B.C.S. México                        |
| 2 Tardón             | San Isidro, B.C.S. México                    |
| 3 Sonorense          | Hermosillo, Sonora, México                   |
| 4 Cuarenteño         | Todos Santos, B.C.S. México                  |
| 5 CB-46              | California cultivar, Univ. Calif., Riverside |
| 6 CB-88              | California cultivar, Univ. Calif., Riverside |
| 7 CB-27 <sup>¶</sup> | Breeding lines, Univ. Calif., Riverside      |
| 8 CB-3               | California cultivar, Univ. Calif., Riverside |
| 9 CB-5               | California cultivar, Univ. Calif., Riverside |
| 10 PEPH-V Wes-85     | Texas cultivar, Univ. Texas A. & M.          |
| 11 IT86D-719         | Nigerian accession, IITA, Ibadan, Nigeria    |
| 12 IT96D-666         | Nigerian accession, IITA, Ibadan, Nigeria    |
| 13 IT89KD-288        | Nigerian accession, IITA, Ibadan, Nigeria    |
| 14 IT82D-889         | Nigerian accession, IITA, Ibadan, Nigeria    |
| 15 IT93K-734         | Nigerian accession, IITA, Ibadan, Nigeria    |
| 16 IT96D-733         | Nigerian accession, IITA, Ibadan, Nigeria    |
| 17 IT89KD-391        | Nigerian accession, IITA, Ibadan, Nigeria    |
| 18 IT90K-277-2       | Nigerian accession, IITA, Ibadan, Nigeria    |
| 19 IT91K-93-10       | Nigerian accession, IITA, Ibadan, Nigeria    |
| 20 IT94K-437-1       | Nigerian accession, IITA, Ibadan, Nigeria    |
| 21 IT95K-1090-12     | Nigerian accession, IITA, Ibadan, Nigeria    |
| 22 IT95K-1088-4      | Nigerian accession, IITA, Ibadan, Nigeria    |
| 23 IT91K-118-20      | Nigerian accession, IITA, Ibadan, Nigeria    |
| 24 IT90K-284-2       | Nigerian accession, IITA, Ibadan, Nigeria    |
| 25 Sesenteño         | Todos Santos, B.C.S., México                 |

<sup>¶</sup> This genotype was released as the new cultivar (CB-27) in 1999, and registered in ‘Crop Science’ (Ehlers *et al.* 2000).

Experimental design for emergence percentage and emergence rate was a factorial treatment set of 25 genotypes and 3 salinity levels arranged in a completely randomized design with 4 replications of 10 seeds per treatment and replication. Data were subjected to analysis

of variance, using the ANOVA and GLM procedure in SAS (SAS 1996). Before ANOVA, emergence percentages were transformed using arcsine transformation (Sokal and Rohlf 1988). Emergence rates, which are the sum of the average emergence counts per day, were not transformed before analysis. The least significant differences between means of genotypes were separated by Duncan's Multiple Range test at  $P=0.05$ .

Since the power of the regression analysis might be poor with only 3 salinity levels, we performed 2-regression analysis: (i) salinity levels against emergence percentages and against emergence rates, and (ii) salinity levels against genotypes. Inverse regression analysis within replicates of genotypes was used to predict 10, 25, and 50% reductions in emergence percentage, which was calculated as a decrease in percentage of emergence compared with the control (0 mmol NaCl/L). The SAS computer program (SAS 1996) was used for all statistical analyses.

## **Results & Discussion**

Analysis of variance showed that emergence percentage, emergence rate, root:shoot dry-weight ratio and biomass per plant were affected by genotype, salinity and genotype x salinity interaction (Table 2). This interaction indicates that the salinity effect varied among genotypes. Most genotypes did not emerge at 170 mmol NaCl/L. The most reliable criterion used to classify genotypes in relation to their salt tolerance was based on their emergence percentage in both 85 and 170 mmol NaCl/L. Based on this criterion; all genotypes were ranked into 3 classes (Table 3). One genotype ('CB27') was grouped into class 'A', which had the highest salt tolerance at emergence. This genotype was classified as salt tolerant because it showed the highest total emergence percentage in both 85 and 170 mmol NaCl/L. Moreover, this genotype showed no drastic reduction in emergence percentage (45% compared with the control) and emergence rate (17% compared with the control) at 170 mmol NaCl/L. At 85 mmol NaCl/L, it showed 80% emergence and 52% emergence rate (compared with the control). A second group of genotypes consisting of 'Paceño', 'CB88', 'CB3', 'CB5', 'Tardón', 'Cuarenteño' and 'CB46' was placed in class 'B' (Table 3); these genotypes showed total emergence percentages of up to 75% in both 85 and 170 mmol NaCl/L. Although these genotypes had low emergence percentage (<15%) and low emergence rate (<6% compared with the control) at 170 mmol NaCl/L, they had >65% emergence and >20% emergence rate (compared with the control) at 85 mmol NaCl/L. The remaining genotypes were grouped in class 'C' (Table 3)

because they showed the lowest total emergence percentages in both 85 and 170 mmol NaCl/L (Table 3). These genotypes showed 0% emergence (except Sonorensense) and 0 emergence rate at 170 mmol NaCl/L. They had <50% emergence percentage and <30% emergence rate (compared with the control) at 85 mmol NaCl/L.

Table 2. Mean squares for the analysis of variance on emergence percentage, emergence rate, root:shoot dry-weight ratio and biomass of cowpea genotypes as influenced by salinity at emergence.

| Source              | d.f. | Emergence rate | Emergence percentage | Root:shoot dry-weight ratio | Biomass |
|---------------------|------|----------------|----------------------|-----------------------------|---------|
| Genotype            | 24   | 0.80***        | 902.83***            | 0.28***                     | 0.03*** |
| Salinity            | 2    | 580.46***      | 227662.33***         | 3.08***                     | 1.13*** |
| Genotype x salinity | 48   | 0.55***        | 479.0***             | 0.18***                     | 0.01*** |
| Error               | 225  | 0.039          | 66.11                | 0.01                        | 0.00053 |
| Total               | 299  |                |                      |                             |         |

\*\*\*  $P = 0.0001$

Based on the main criterion to classify the genotypes in relation to their salt tolerance at the emergence stage, genotypes classified as salt tolerant were ‘CB27’, which had the greatest salt tolerance at emergence followed by a group consisting of ‘CB88’, ‘CB3’, ‘CB5’ and ‘CB46’ from California (USA), and ‘Paceño’, ‘Tardón’ and ‘Cuarenteño’ from Mexico (Table 3). The rest of the genotypes were classified as salt sensitive and showed the classical effects of an almost linear reduction of the mean in emergence percentage and emergence rate with increasing salinity (Maas and Hoffman 1977). Moreover, these genotypes had <50% emergence at 85 mmol NaCl/L (except ‘IT96D-666’) with respect to the control, and were classified as salt-sensitive genotypes during the germination stage (Murillo *et al.* 2000). Most salt-sensitive genotypes are from the International Institute of Tropical Agriculture (IITA, Ibadan, Nigeria), and 2 genotypes are from Mexico (‘Sesenteño’ and ‘Sonorensense’).

Additionally 3 criteria were used to confirm the above classification based on the root:shoot dry-weight ratio, biomass (Table 4), and root:shoot length ratio (Fig. 1). Genotype ‘CB27’, classified as salt tolerant, showed the highest root:shoot dry-weight ratio at 170 mmol NaCl/L compared with the control, followed by the next group consisting of ‘Paceño’, ‘CB-3’, ‘CB88’, ‘Tardón’, ‘Cuarenteño’, ‘CB5’ and ‘CB46’, which had the highest values of root:shoot dry-weight ratio at 170 mmol NaCl/L, compared with the control. The genotypes ‘CB27’, ‘Paceño’ and ‘CB3’ decreased at 85 but increased at 170 mmol NaCl/L, and were

superior to the control (Fig. 1a). In the same way, ‘CB88’ and ‘Tardón’ decreased at 85 mmol NaCl/L and increased at 170 mmol NaCl/L, but they were not superior to the control (Table 4). Genotypes ‘Cuarenteño’, ‘CB5’ and ‘CB46’ showed a high root:shoot dry weight ratio at 0 mmol NaCl/L, decreasing at 85 and 170 mmol NaCl/L (Table 4). Root:shoot length ratio in genotypes classified as salt tolerant increased as salinity increased (Fig. 1a) as a result of salt stress; this was due to the greater inhibition of shoot growth compared with root growth. This ratio has been used previously as a criterion for determination of varietal differences in response to increasing salinity (Gomes-Filho 1985). Based on these results and because a higher root:shoot dry-weight ratio has been used as an index of water or salt-stress tolerance (Kramer 1983), apparently the genotypes classified as salt tolerant showed a higher salt tolerance when compared with the genotypes classified as salt sensitive. The root:shoot dry-weight ratio decreased in the sensitive genotypes as salinity increased; however, the root:shoot length ratio increased as salinity increased from 0 to 85 mmol NaCl/L, but at 170 mmol NaCl/L decreased to 0 because no plants were available for evaluation (Fig. 1b).

Biomass (Table 4) decreased in all genotypes as salinity increased; however, genotypes classified as tolerant had higher biomass values at 170 mmol NaCl/L than the other genotypes. In contrast, only 5 genotypes (‘CB27’, ‘Paceño’, ‘CB88’, ‘CB3’ and ‘CB46’), classified as salt tolerant at germination (Murillo *et al.* 2000), were also classified as salt tolerant at emergence. Genotype ‘Cuarenteño’, which was classified as intermediate salt tolerant during germination and as salt tolerant at emergence, showed that a comparison of salt tolerance during germination and emergence is difficult because different criteria must be used to evaluate plant response (Maas 1986).

The regression analysis, including all genotypes, indicated that emergence percentage and emergence rate for all genotypes decreased linearly with increasing salinity levels. When individual regression analysis was done for each genotype to determine the response model of emergence percentage to salinity, the genotypes ‘CB27’, ‘Paceño’, ‘CB88’, ‘CB3’, ‘CB5’, ‘Tardón’, ‘Cuarenteño’ and ‘CB46’ were classified as salt tolerant. For the genotypes classified as salt sensitive, the emergence percentage decreased linearly as salinity increased. Models obtained from all genotypes were used to determine ‘ $X$ ’ (salinity in mmol NaCl/L) from ‘ $Y$ ’ (reduction in emergence percentage) in the inverse regression analysis (Table 5).

Table 3. Mean emergence rate and emergence percentage of 25 cowpea genotypes at three salinity levels (0, 85 and 170 mmol NaCl/L).

| Cowpea genotype | Class | Emergence rate (number of emerged seeds/day at (mmol/L) |               |              | Emergence (%) at (mmol/L) |          |          |        |
|-----------------|-------|---|---------------|--------------|---------------------------|----------|----------|--------|
|                 |       | 0   | 85            | 170          | 0                         | 85       | 170      | 85+170 |
| CB-27           | A     | 4.75 a  | 2.44 b (52)   | 0.79 a (17)  | 100 a <sup>†</sup>        | 80.0 abc | 45.0a    | 125.0  |
| Paceño          | B     | 4.75 a  | 1.82 cd (38)  | 0.24 b (5)   | 100 a                     | 87.5 ab  | 15.0 b   | 102.5  |
| CB-88           | B     | 4.71 a  | 3.62 a (77)   | 0.09 bc (2)  | 100 a                     | 95.0 a   | 7.5 bcd  | 102.5  |
| CB-3            | B     | 4.75 a  | 2.43 b (51)   | 0.18 bc (4)  | 100 a                     | 80.0 abc | 10.0 bcd | 90.0   |
| CB-5            | B     | 4.75 a  | 2.09 bc (44)  | 0.082 bc (2) | 100 a                     | 87.5 ab  | 2.5 cd   | 90.0   |
| Tardón          | B     | 4.75 a  | 1.46 de (31)  | 0.15 bc (3)  | 100 a                     | 72.5 bcd | 12.5 bc  | 85.0   |
| Cuarenteño      | B     | 4.75 a  | 1.48 de (31)  | 0.075 bc (2) | 100 a                     | 70.0 bcd | 7.5 bcd  | 77.5   |
| CB-46           | B     | 4.71 a  | 0.97 efg (21) | 0.10 bc (2)  | 100 a                     | 67.5 cde | 7.5 bcd  | 75.0   |
| IT96D-666       | C     | 4.71 a  | 1.22 efg (26) | 0.0 c (0)    | 100 a                     | 55.0 def | 0.0 d    | 55.0   |
| IT93K-734       | C     | 4.71 a  | 1.21 efg (26) | 0.0 c (0)    | 100 a                     | 50.0 ef  | 0.0 d    | 50.0   |
| IT95K-1090-12   | C     | 4.67 a  | 1.25 efg (27) | 0.0 c (0)    | 100 a                     | 47.5 fg  | 0.0 d    | 47.5   |
| IT96D-733       | C     | 4.71 a  | 1.03 efg (22) | 0.0 c (0)    | 100 a                     | 45.0 fg  | 0.0 d    | 45.0   |
| IT95K-1088-4    | C     | 4.71 a  | 1.02 efg (22) | 0.0 c (0)    | 100 a                     | 45.0 fg  | 0.0 d    | 45.0   |
| IT91K-118-20    | C     | 4.71 a  | 1.03 efg (22) | 0.0 c (4)    | 100 a                     | 42.5 fg  | 0.0 d    | 42.5   |
| IT89KD-391      | C     | 4.75 a  | 1.01 efg (21) | 0.0 c (1)    | 100 a                     | 42.5 fg  | 0.0 d    | 42.5   |
| IT94K-437-1     | C     | 4.79 a  | 0.98 efg (21) | 0.0 c (0)    | 100 a                     | 42.5 fg  | 0.0 d    | 42.5   |
| PEPH-V Wes-85   | C     | 4.71 a  | 0.88 fg (19)  | 0.0 c (0)    | 100 a                     | 42.5 fg  | 0.0 d    | 42.5   |
| IT86D-719       | C     | 4.67 a  | 0.92 fg (20)  | 0.0 c (0)    | 100 a                     | 40.0 fg  | 0.0 d    | 40.0   |
| IT89KD-288      | C     | 4.75 a  | 0.93 fg (20)  | 0.0 c (0)    | 100 a                     | 40.0 fg  | 0.0 d    | 40.0   |
| IT82D-889       | C     | 4.75 a  | 1.00 efg (21) | 0.0 c (0)    | 100 a                     | 40.0 fg  | 0.0 d    | 40.0   |
| IT90K-277-2     | C     | 4.71 a  | 0.87 fg (19)  | 0.0 c (0)    | 100 a                     | 40.0 fg  | 0.0 d    | 40.0   |
| IT90K-284-2     | C     | 4.75 a  | 1.06 efg (22) | 0.0 c (1)    | 100 a                     | 40.0 fg  | 0.0 d    | 40.0   |
| Sesenteño       | C     | 4.75 a  | 0.71 g (15)   | 0.0 c (0)    | 100 a                     | 40.0 fg  | 0.0 d    | 40.0   |
| IT91K-93-10     | C     | 4.75 a  | 0.96 efg (20) | 0.0 c (0)    | 100 a                     | 37.5 fg  | 0.0 d    | 37.5   |
| Sonorensense    | C     | 4.75 a  | 0.86 fg (18)  | 0.087 bc (2) | 100 a                     | 27.5 g   | 7.5 bcd  | 35.0   |

<sup>†</sup> Comparisons between genotypes for both variables. Means followed by the same letter are not significantly different at  $P = 0.05$  ; comparisons were made within columns using Duncan's Multiple Range Test. Values in parentheses are percentages of the control.

Table 4. Genotype means for root:shoot dry-weight ratio and biomass of 25 cowpea genotypes at three salinity levels (0, 85 and 170 mmol NaCl/L).

| Cowpea Genotypes | Class | Root:shoot dry-weight ratio at (mmol/L) |                |                | Biomass (g dry weight/plant) at (mmol/L) |               |              |
|------------------|-------|---|----------------|----------------|--|---------------|--------------|
|                  |       | 0                                       | 85             | 170            | 0  | 85            | 170          |
| CB-27            | A     | 0.27 b                                  | 0.22 cde (82)  | 0.35 ab (131)  | 0.15 ijkl <sup>†</sup>                   | 0.12 c (77)   | 0.03 b (17)  |
| Paceño           | B     | 0.33 b                                  | 0.26 bcde (79) | 0.40 a (123)   | 0.25 cde                                 | 0.15 b (62)   | 0.06 a (22)  |
| CB-88            | B     | 0.30 b                                  | 0.19 de(62)    | 0.25 abc (81)  | 0.16 hijkl                               | 0.13 bc (80)  | 0.013 bc (8) |
| CB-3             | B     | 0.25 b                                  | 0.24 cde (96)  | 0.26 abc (104) | 0.19 efghi                               | 0.15 b (76)   | 0.011 bc (6) |
| CB-5             | B     | 0.30 b                                  | 0.26 bcde (85) | 0.12 bcd (38)  | 0.28 c                                   | 0.08 def (28) | 0.007 bc (3) |
| Tardón           | B     | 0.32 b                                  | 0.18 de (57)   | 0.25 abc (80)  | 0.20 defghi                              | 0.13 c (62)   | 0.025 b (12) |
| Cuarenteño       | B     | 0.34 b                                  | 0.21 cde (61)  | 0.17 bcd (49)  | 0.43 b                                   | 0.14 bc (32)  | 0.020 bc (5) |
| CB-46            | B     | 0.31 b                                  | 0.23 cde (75)  | 0.07 cd (21)   | 0.52 a                                   | 0.12 c (24)   | 0.01 bc (2)  |
| IT96D-666        | C     | 0.27 b                                  | 0.23 cde (86)  | 0.0 d (0)      | 0.12 kl                                  | 0.07 efg (59) | 0.0 c (0)    |
| IT93K-734        | C     | 0.38 b                                  | 0.25 bcde (68) | 0.0 d (0)      | 0.23 cdef                                | 0.05 hi (20)  | 0.0 c (0)    |
| IT95K-1090-12    | C     | 0.31 b                                  | 0.26 bcde (83) | 0.0 d (0)      | 0.26 cd                                  | 0.12 c (46)   | 0.0 c (0)    |
| IT96D-733        | C     | 0.41 b                                  | 0.36 b (89)    | 0.0 d (0)      | 0.13 jkl                                 | 0.04 ij (28)  | 0.0 c (0)    |
| IT95K-1088-4     | C     | 0.45 b                                  | 0.32 bc (71)   | 0.0 d (0)      | 0.16 hijkl                               | 0.06 fgh (36) | 0.0 c (0)    |
| PEPH-V Wes-85    | C     | 1.36 a                                  | 1.09 a (80)    | 0.0 d (0)      | 0.16 hijkl                               | 0.04 hi (26)  | 0.0 c (0)    |
| IT89KD-391       | C     | 0.30 b                                  | 0.20 cde (69)  | 0.0 d (0)      | 0.21 defgh                               | 0.07 def (35) | 0.0 c (0)    |
| IT94K-437-1      | C     | 1.27 a                                  | 0.26 bcd (21)  | 0.0 d (0)      | 0.17 ghijk                               | 0.02 j (12)   | 0.0 c (0)    |
| IT91K-118-20     | C     | 0.25 b                                  | 0.22 cde (86)  | 0.0 d (0)      | 0.23 cdef                                | 0.08 def (33) | 0.0 c (0)    |
| IT86D-719        | C     | 0.20 b                                  | 0.21 cde (104) | 0.0 d (0)      | 0.13 jkl                                 | 0.09 de (69)  | 0.0 c (0)    |
| IT89KD-288       | C     | 0.35 b                                  | 0.25 bcde (73) | 0.0 d (0)      | 0.22 cdefg                               | 0.06 fgh (28) | 0.0 c (0)    |
| IT82D-889        | C     | 0.21 b                                  | 0.16 de (77)   | 0.0 d (0)      | 0.11 l                                   | 0.10 d (88)   | 0.0 c (0)    |
| IT90K-277-2      | C     | 1.31 a                                  | 0.27 bcd (20)  | 0.0 d (0)      | 0.18 fghij                               | 0.04 hi (24)  | 0.0 c (0)    |
| IT90K-284-2      | C     | 0.20 b                                  | 0.22 cde (112) | 0.0 d (0)      | 0.39 b                                   | 0.38 a (99)   | 0.0 c (0)    |
| Sesenteño        | C     | 0.33 b                                  | 0.20 de (60)   | 0.0 d (0)      | 0.12 kl                                  | 0.05 ghi (43) | 0.0 c (0)    |
| IT91K-93-10      | C     | 0.24 b                                  | 0.15 e (61)    | 0.0 d (0)      | 0.24 cde                                 | 0.08 def (33) | 0.0 c (0)    |
| Sonorens         | C     | 0.42 b                                  | 0.26 bcde (62) | 0.13 cd (30)   | 0.24 cdef                                | 0.10 d (40)   | 0.03 b (11)  |

<sup>†</sup> Comparisons between genotypes for both variables. Means followed by the same letter are not significantly different at  $P = 0.05$ ; comparisons were made within columns using Duncan's Multiple Range Test. Values in parentheses are percentages of the control.

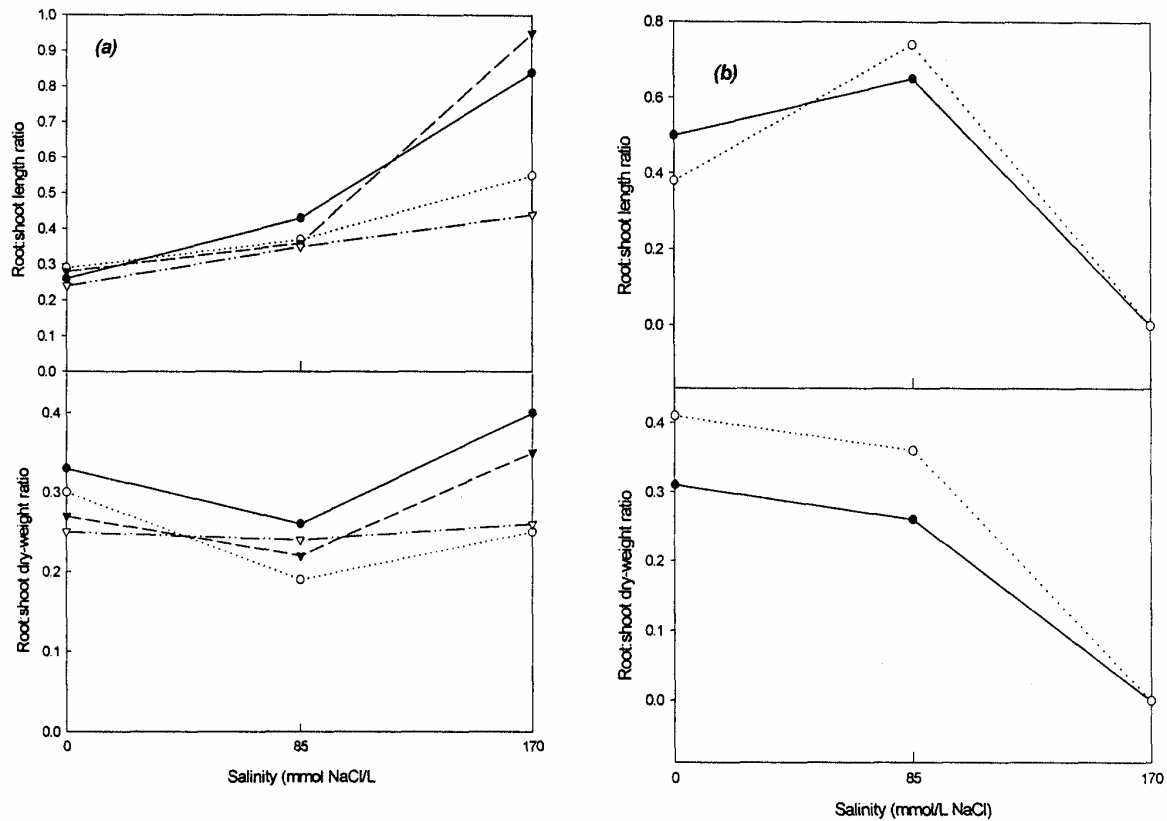


Figure 1. Effects of salinity on root:shoot dry-weight ratio and root:shoot length ratio in (a) salt-tolerant genotypes (● Paceño, ○ CB88, ▼ CB27, ▽CB3) and (b) salt-sensitive genotypes (● IT95K-1090-12, ○ IT96D-733).

Inverse regression analysis (Table 5) showed that for the group of genotypes classified as salt tolerant, genotype ‘CB88’ required the highest average salinity concentration (38 mmol NaCl/L) to reduce emergence to 90%, followed by ‘Paceño’, ‘CB5’, ‘CB27’, ‘CB3’, ‘Tardón’, ‘Cuarenteño’ and ‘CB46’; the last-mentioned genotype requiring the lowest average salinity concentration to reduce emergence to 90% (Table 5). The other genotypes required the least average salinity (10-25 mmol NaCl/L) for the same reduction in emergence percentage reduction. Although genotype Sonorensis required 25, 30 and 123 mmol NaCl/L to reduce



emergence to 90, 75 and 50%, respectively, it had the lowest total emergence percentage in both 85 and 170 mmol NaCl/L.

Similar trends were observed in the group of genotypes classified as salt tolerant (Table 5). Genotype 'CB27', with the greatest salt tolerance at emergence, required the highest average salinity concentration (88 mmol NaCl/L) to reduce emergence to 75%, followed by 'CB88', 'Paceño', 'CB5', 'CB3', 'Tardón', 'Cuarenteño' and 'CB46'. The other genotypes required the lowest salinity concentration (30-45 mmol NaCl/L) for the same emergence reduction. For the genotypes in the same group classified as salt tolerant, an average of 189 mmol NaCl/L is required to reduce emergence by 50% in 'CB27', followed by 'CB88', 'Paceño', 'CB3', 'CB5', 'Tardón', 'Cuarenteño' and 'CB46'. The remaining genotypes required the lowest average salt concentration (78-88 mmol NaCl/L) to reduce total emergence to 50%.

Salinity treatments affected emergence of cowpea genotypes, with increasing salinity delaying both emergence percentage (Fig. 2) and emergence rate (Table 3). The decrease in both rate and percentage of emergence is the result of inhibition of embryo-axis growth due to delayed reserve mobilization and membrane disturbance caused by salinity, evidenced by increased leakage of materials from embryo-axis (Prisco, 1987).

Since genetic variability for salt tolerance exists within this species, we expect that the screening and classification for salt-tolerant genotypes using emergence rate and emergence percentage could be good selection criteria in cowpea. In addition, root:shoot dry-weight ratio and biomass data can corroborate the results. We conclude that the selection and classification for salt tolerance in cowpea genotypes can be done successfully at early seedling stages because the same genotypes classified as salt tolerant and salt sensitive during germination (Murillo *et al.* 2000) were classified as salt tolerant and salt sensitive during emergence stage. The observed salt tolerance of cowpea genotypes during the germination (Murillo *et al.* 2000) and emergence stages provides us with the possibility of developing a simple, good technique and quick screening method for salt tolerance. Still, the most important agronomic question is whether the observed differences in salt tolerance during germination and emergence are representative of the salt tolerance of the genotypes during the whole growth cycle.

Table 5. Predicted salinity levels (mmol NaCl/L) to effect 90, 75 and 50% emergence as calculated from inverse regression analysis

| Cowpea Genotypes | Class | Emergence (%) |                   |        |
|------------------|-------|---------------|-------------------|--------|
|                  |       | 90            | 75                | 50     |
| CB-27            | A     | 27 ab         | 88 a <sup>¶</sup> | 189 a  |
| Paceño           | B     | 31 ab         | 75 abc            | 148 b  |
| CB-88            | B     | 38 a          | 79 ab             | 149 b  |
| CB-3             | B     | 23 ab         | 69 abc            | 145 b  |
| CB-5             | B     | 30 ab         | 73 abc            | 144 b  |
| Tardón           | B     | 15 bc         | 63 abc            | 143 b  |
| Cuarenteño       | B     | 14 bc         | 61 abc            | 140 b  |
| CB-46            | B     | 10 c          | 58 abc            | 138 b  |
| IT96D-666        | C     | 20 abc        | 45 abc            | 88 c   |
| IT93K-734        | C     | 17 bc         | 43 abc            | 81 c   |
| IT95K-1090-12    | C     | 16 bc         | 41 abc            | 84 c   |
| IT96D-733        | C     | 14 bc         | 40 bc             | 82 c   |
| IT95K-1088-4     | C     | 14 bc         | 40 bc             | 82 c   |
| PEPH-V Wes-85    | C     | 13 bc         | 38 bc             | 81 c   |
| IT89KD-391       | C     | 13 bc         | 38 bc             | 81 c   |
| IT94K-437-1      | C     | 13 bc         | 38 bc             | 81 c   |
| IT91K-118-20     | C     | 13 bc         | 38 bc             | 81 c   |
| IT86D-719        | C     | 11 c          | 37 bc             | 79 c   |
| IT89KD-288       | C     | 11 c          | 37 bc             | 79 c   |
| IT82D-889        | C     | 11 c          | 37 bc             | 79 c   |
| IT90K-277-2      | C     | 11 c          | 37 bc             | 79 c   |
| IT90K-284-2      | C     | 11 c          | 37 bc             | 79 c   |
| Sesenteño        | C     | 11 c          | 37 bc             | 79 c   |
| IT91K-93-10      | C     | 10 c          | 35 bc             | 78 c   |
| Sonorensense     | C     | 25 ab         | 30 c              | 123 bc |

<sup>¶</sup>Comparisons between genotypes. Means followed by the same letter are not significantly different at the  $P= 0.05$ ; comparisons were made within columns using Duncan's Multiple Range Test.

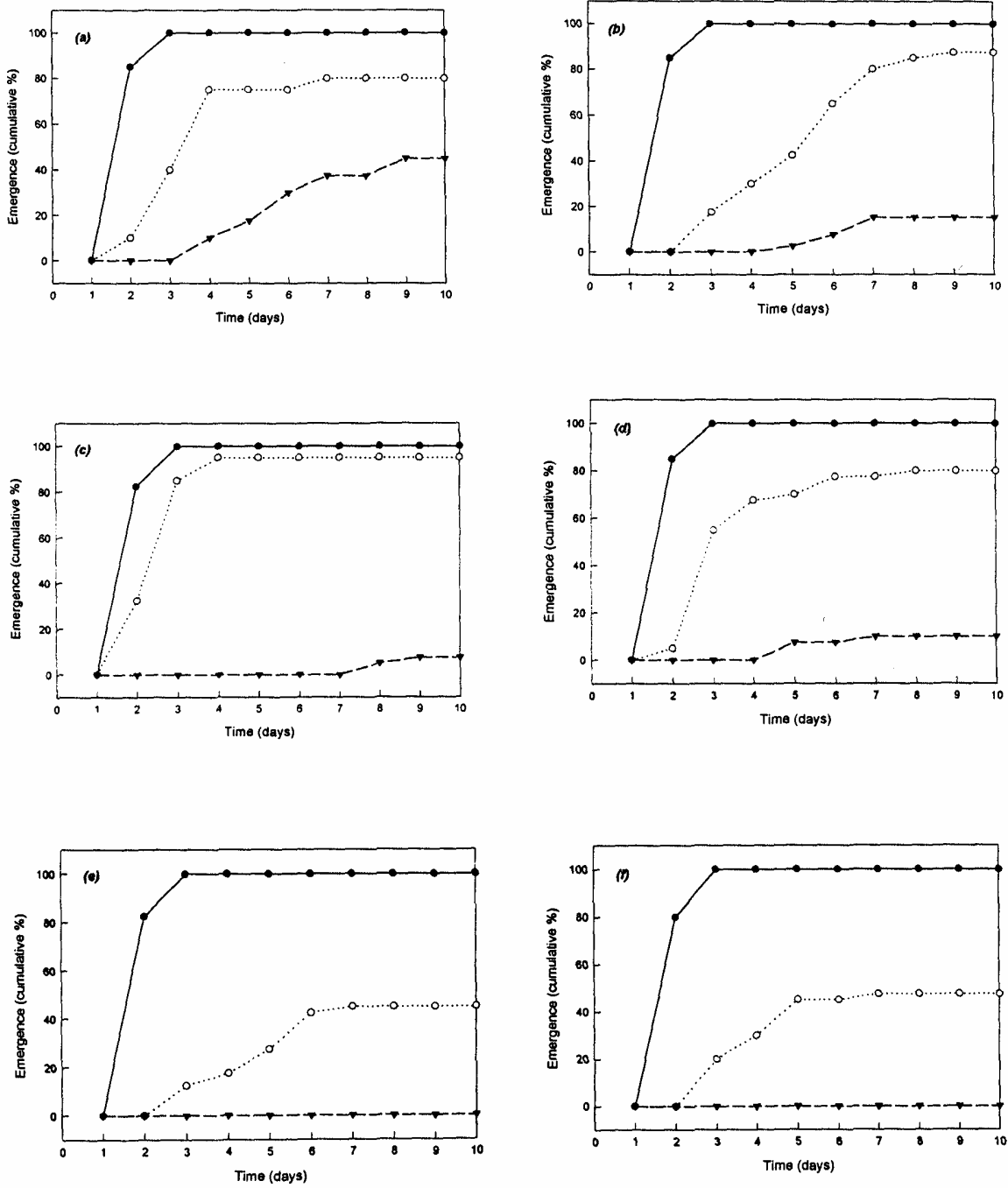


Figure 2. Effect of salinity (● 0 mmol NaCl/L, ○ 85 mmol NaCl/L, ▼ 170 mmol NaCl/L) on emergence percentage of 4 salt-tolerant genotypes (a) 'CB27', (b) 'Paceño', (c) 'CB88' and (d) 'CB3', and 2 salt-sensitive genotypes (e) 'IT96D-733' and (f) 'IT95K-1090-12'

## 4.3. Efecto de la salinidad en la plántula y en el crecimiento vegetativo inicial

### 4.3.1. En el crecimiento, absorción y distribución de iones en la plántula

Artículo en prensa:

**Murillo-Amador B**, Troyo-Diéguez E, García-Hernández JL, Larrinaga-Mayoral JA, Nieto-Garibay A, López-Cortés A. Efecto de la salinidad en genotipos de “chícharo de vaca” *Vigna unguiculata* (L.) Walp. durante la etapa de plántula. 2001. AGROCHIMICA.

#### Resumen

Se estudió la tolerancia a la salinidad de ocho genotipos de yorimón [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] durante la etapa de plántula. Los tratamientos salinos consistieron en regar las plántulas con 0, 85 y 170 mmol NaCl/L. Las variables evaluadas fueron altura de planta, área foliar total, peso fresco y seco de raíz y parte aérea, longitud de masa de raíces, número de hojas, número de hojas trifoliadas y biomasa total, las cuales disminuyeron en todos los genotipos al aumentar la salinidad. Sobre la base del análisis de éstas variables, los genotipos se clasificaron como tolerantes ('IT89KD-288' y 'CB3'), intermedios ('CB5', 'IT95R-52-80' y 'CB88') y sensibles ('IT86D-719', 'IT96D-666' y 'CB27') a la salinidad. La concentración de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en raíz y parte aérea se incrementó al aumentar la salinidad y fue más baja en los genotipos tolerantes, por lo que se concluye que la exclusión de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  contribuye a la tolerancia de la salinidad en yorimón. Las relaciones  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$  se consideraron buenos indicadores de la tolerancia a la salinidad en yorimón, debido a que los genotipos tolerantes mantuvieron valores altos en ambas relaciones, los genotipos intermedios y sensibles mostraron lo contrario. Los resultados demostraron que existen diferencias considerables de la tolerancia a la salinidad entre genotipos de frijol yorimón. Se sugiere realizar otros estudios utilizando un número mayor de genotipos en etapas más avanzadas del crecimiento de la especie.

#### Introducción

La salinidad al igual que la sequía, representa uno de los problemas más importantes con respecto a los factores ambientales que afectan la productividad de los sistemas agrícolas

alrededor del mundo (McWilliam, 1986). La tolerancia de una planta a la sal puede ser definida como la capacidad de la planta para soportar el efecto del exceso de sales en el crecimiento regular de la raíz (Maas, 1986). Esta tolerancia es apreciada en una de las formas siguientes: (i) la habilidad de una planta para sobrevivir en suelos salinos, (ii) el crecimiento o rendimiento absoluto de una planta, y (iii) el crecimiento o rendimiento relativo en un suelo salino comparado con un suelo no salino. Aunque la sobrevivencia en un suelo salino es útil para los ecólogos, dicho criterio está limitado al uso de los agricultores, porque con frecuencia tiene poca relación con la reducción del rendimiento dentro de los límites comercialmente aceptables (Maas, 1990). Esta tolerancia no solo varía considerablemente entre especies, sino que depende también de las condiciones culturales en que un cultivo es sembrado. Una de las etapas más sensibles del crecimiento de numerosos cultivos es la etapa de plántula, aunque existe poca información disponible para esta etapa comparada con la existente para germinación y emergencia. Algunos reportes indican que la etapa de plántula es más sensible que la etapa de germinación en trigo (Ayers *et al.* 1952; Maas y Poss, 1989; Udovenko y Alekseeva, 1973), cebada (Ayers *et al.* 1952), algodón (Abul-Naas y Omran, 1974), arroz (Kaddah, 1963; Pearson *et al.* 1966), tomate (Dumbroff y Cooper, 1974), maíz (Maas *et al.* 1983) y cacahuete (Shalhevet *et al.* 1969). Desde el punto de vista del mejoramiento genético, la selección de materiales con alta tolerancia a la salinidad es preferible en las primeras etapas del crecimiento, que es cuando está correlacionado positivamente con la no-reducción en cantidad o calidad del producto a comercializar (Nerson y Paris, 1984). Estos trabajos se han enfocado sobre germinación, aunque la tolerancia al estrés por salinidad durante dicho evento o las etapas iniciales del desarrollo no está siempre positivamente correlacionado con los siguientes eventos del desarrollo o con un rendimiento alto (Dewey, 1960; Francois y Bernstein, 1964).

Históricamente, los esfuerzos para manejar la alta salinidad en el suelo o el agua han sido a través de la sustitución de cultivos y prácticas agronómicas. El reemplazo o sustitución de cultivos sensibles a la salinidad por aquellos más tolerantes, ha sido practicado desde los inicios de la agricultura (Shannon, 1987) y es probablemente una de las estrategias más fáciles y prácticas para tratar con la salinidad. Diversos cultivos sensibles a la salinidad son sustituidos por cultivos tolerantes a la salinidad; en este sentido, la cebada puede ser sustituida por trigo, algodón por maíz, remolacha por lechuga y otras posibilidades (Shannon, 1996). En

este contexto, uno de los cultivos de importancia internacional por sus usos es el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) el cual está considerado como un cultivo sensible a la salinidad (Navejas, 1995). Uno de los cultivos moderadamente tolerante a la salinidad y con características similares al frijol común es el yorimón (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) el cual se siembra en diferentes partes del mundo para diversos propósitos. Se consume como grano seco, la vaina fresca como hortaliza y como cultivo para forraje de animales (Lush y Rawson, 1979). Se siembra en condiciones climáticas que van desde las semiáridas hasta las subhúmedas y es considerado un cultivo de temporal. Se reporta que tiene tolerancia a altas temperaturas y a la sequía (Rachie y Roberts, 1974; Turk *et al.* 1980); también es moderadamente sensible a la salinidad, exhibiendo mayor tolerancia en etapas avanzadas del crecimiento (Maas, 1986; Maas y Poss, 1989; West y Francois, 1982). El objetivo del presente trabajo fue cuantificar y especificar las diferencias de tolerancia a la salinidad de ocho genotipos de yorimón durante la etapa de plántula con respecto a su crecimiento y composición mineral en dicha etapa, que es una de las primeras etapas del crecimiento recomendadas para medir la tolerancia a la salinidad.

## **Materiales y Métodos**

**Descripción del sitio de estudio.** La presente investigación se realizó en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR), el cual se localiza en los terrenos costeros de El Comitán, en la porción meridional de la península de Baja California, a 24° 08' latitud norte y 110° 24' longitud oeste, 17 km al oeste del puerto de La Paz, Baja California Sur, México. La península se ubica en la franja limitada por los paralelos 19° y 31° norte, donde se localizan los principales desiertos y zonas de mayor aridez en el mundo (Aguilera y Martínez, 1996).

**Material genético.** Se utilizaron ocho genotipos de yorimón, cuatro de ellos, 'CB-88', 'CB-27', 'CB-3' y 'CB-5', provienen de la Universidad de California (Riverside, EUA) y los demás, 'IT95R-52-80', 'IT86D-719', 'IT96D-666', 'IT89KD-288', provienen del Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA), Ibadan, Nigeria. Las soluciones salinas que se utilizaron fueron, 0, 85 y 170 mmol NaCl/L. La semilla se germinó en cajas Petri, en una cámara de crecimiento (Conviron CMP3244) bajo condiciones controladas de temperatura (25±1°C), humedad (80%) y en oscuridad. Las plántulas obtenidas se transplantaron en macetas de polietileno de 13 x 8 cm de diámetro superior e inferior, respectivamente y 10 cm de

profundidad, con un orificio central en la porción inferior para fines de drenaje. Se utilizó peat-moss (Sunshine, Sun Gro Horticulture Canada, Ltd.) como sustrato. Las macetas se colocaron en una cámara de crecimiento bajo condiciones controladas,  $25\pm 5^{\circ}\text{C}$ , 80% de humedad y 12 horas luz, proporcionada por lámparas fluorescentes con  $500\text{ mmol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$  de densidad de flujo fotónico. Después del transplante, las plántulas se regaron durante tres días con agua libre de sales y posteriormente se aplicaron diariamente los tratamientos de salinidad durante 35 días, la cual además del tratamiento salino contenía una solución nutritiva (composición en ppm: 220 N, 40 P,  $200\text{ K}^{+}$ ,  $140\text{ Ca}^{2+}$ ,  $42\text{ Mg}^{2+}$ ,  $4\text{ Fe}^{3+}$ ,  $1.25\text{ Mn}^{4+}$ , 0.18 B,  $0.23\text{ Zn}^{2+}$  y  $0.25\text{ Cu}^{2+}$ ). Esta última solución se aplicó tres veces por semana a cada una de las plantas en los tratamientos salinos y repeticiones respectivamente.

**Variables estudiadas.** Se evaluaron las variables morfológicas altura de plántula, longitud de masa de raíces, peso fresco y seco de raíces, peso fresco y seco de parte aérea (tallos + hojas), biomasa total (peso seco de raíz, tallo y hojas), número de hojas verdaderas, número de trifolios y área foliar (medida con un medidor portátil de área foliar Li-Cor Modelo 3000A, Li-Cor Lincoln, Nebraska, USA). Asimismo, se calculó la relación "raíz"/"parte aérea" sobre la base de peso seco y la longitud. Los datos son el promedio de cinco evaluaciones (7, 14, 21, 28 y 35 días) posteriores al transplante. Las plántulas se separaron en raíz y parte aérea para la determinación del peso seco, el cual se obtuvo al secar el material vegetal en un horno de circulación de aire (BLUE-M UL 543H, BLUE Island Illinois, USA), durante 48 horas a  $80^{\circ}\text{C}$ .

**Composición mineral.** El material seco se pulverizó finamente, utilizando un molino con adaptador para muestras pequeñas (Braun tipo 4-041 Modelo KSM-2) y se mezcló para determinar los análisis minerales tanto de raíz como de parte aérea.  $\text{Cl}^{-}$  se determinó por cromatografía de iones, usando un cromatógrafo (Shimadzu modelo HIC-GA). Los iones  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^{+}$  se determinaron mediante una digestión ácida, midiendo su concentración en un espectrofotómetro de absorción atómica (Shimadzu AA-660). Debido a que la cantidad de materia seca en raíz fue insuficiente para la mayoría de los genotipos, el  $\text{Cl}^{-}$  no se determinó en dicho órgano; asimismo, el resto de minerales en raíz no se determinó para los genotipos 'IT86D-719' y 'CB5'.

**Diseño experimental.** El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial considerando a los genotipos como factor principal (factor A) y a las concentraciones salinas

como factor 'B', con cuatro repeticiones por tratamiento. Se realizaron análisis de varianza y pruebas de rango múltiple (Duncan  $P=0.05$ ). Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SAS (1996).

## Resultados

**Variabes morfológicas.** Se encontraron diferencias significativas entre genotipos y tratamientos salinos para las variables morfológicas analizadas. Los resultados muestran que al incrementarse las concentraciones salinas, afectaron significativamente las variables del crecimiento estudiadas. En 85 mmol NaCl/L, 'IT89KD-288' fue superior para casi todas las variables, a excepción de la variable relación "raíz"/"parte aérea" en peso seco y en longitud (Tabla 1). 'IT86D-719' mostró los valores inferiores en comparación con los demás genotipos para longitud de masa de raíces, peso fresco y seco de raíces, peso fresco y peso seco de parte aérea, área foliar, biomasa total, relación "raíz"/"parte aérea" en peso seco y "raíz"/"parte aérea" en base a longitud; 'IT96D-666' mostró valores inferiores en número de hojas verdaderas y número de trifolios. 'IT96D-666' y 'CB27' fueron superiores para la relación "raíz"/"parte aérea" en peso seco mientras 'CB88' fue superior para la relación "raíz"/"parte aérea" en longitud.

En 170 mmol NaCl/L, 'CB3' e 'IT89KD-288' (Tabla 1) fueron superiores y estadísticamente iguales entre sí para altura de plántula, peso fresco y seco de raíces, peso fresco y seco de parte aérea, área foliar, biomasa total, número de hojas verdaderas y número de trifolios y la relación "raíz"/"parte aérea". Los genotipos 'IT96D-666' e 'IT86D-719' mostraron los valores inferiores en la mayoría de las variables anteriormente mencionadas. El resto de los genotipos mostraron igualdad estadística a los genotipos superiores en algunas variables o presentaron valores intermedios (Tabla 1). 'IT96D-666' mostró el valor mayor en la relación "raíz"/"parte aérea" en peso seco. Considerando los resultados de cada variable morfológica en las concentraciones salinas y como un criterio de clasificación de tolerancia a la salinidad en plántula, los genotipos se clasificaron de la siguiente manera: (i) genotipos tolerantes: 'IT89KD-288' y 'CB3', (ii) genotipos intermedios: 'CB5', 'IT95R-52-80' y 'CB88' y, (iii) genotipos sensibles: 'IT86D-719', 'IT96D-666' y 'CB27'.

**Composición mineral.** De acuerdo al criterio de clasificación anterior, basado en variables morfológicas, los resultados muestran que en genotipos tolerantes, la concentración de  $\text{Na}^+$  fue mayor en raíz que en parte aérea, mientras que en los intermedios y sensibles, el  $\text{Na}^+$  fue



mayor en parte aérea que en raíz (Fig. 1a). En los tres grupos de genotipos, la concentración de  $\text{Na}^+$  en raíz (Fig. 1b) y parte aérea (Fig. 1c) se incrementó linealmente al aumentar la salinidad.

Para la concentración de  $\text{Cl}^-$ , los resultados muestran que los genotipos tolerantes mostraron la concentración menor mientras que en los genotipos intermedios y sensibles fue mayor (Fig. 1d). Asimismo, en los tres grupos de genotipos, la concentración de  $\text{Cl}^-$  se incrementó linealmente en parte aérea al aumentar la salinidad (Figura 1e).

Los resultados muestran que  $\text{K}^+$  fue el catión más abundante en raíz y parte aérea. En este sentido, los genotipos tolerantes mostraron valores mayores de la relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ , mientras que los valores medios disminuyeron en los genotipos intermedios y sensibles (Fig. 2a). Asimismo, los valores de ésta relación disminuyeron en los tres grupos de genotipos en parte aérea (Fig. 2b) y raíz (Fig. 2c) conforme se incrementó la salinidad.

La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en los genotipos fue menor que la mostrada por los cationes monovalentes. Sin embargo y de acuerdo a la clasificación de los genotipos por su tolerancia a la salinidad, los genotipos tolerantes mostraron los valores mayores en la relación  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$  en parte aérea y raíz (Fig. 3a) y al igual que el resto de las variables, ésta disminuyó en los tres grupos de genotipos en parte aérea (Fig. 3b) y raíz (Fig. 3c) conforme se incrementó la salinidad.

## Discusión

El presente trabajo confirma las diferencias que existen en respuesta a la salinidad, no solo entre especies, sino también entre genotipos de una misma especie (Maas, 1986; Ayers *et al.* 1952; Maliwal y Paliwal, 1982; Pearson *et al.* 1966). La disminución de las variables morfológicas es común que se presente en plantas leguminosas bajo condiciones salinas (Imamul Huq y Larher, 1983; Nukaya *et al.* 1982) y está asociada a una tasa baja de división celular (Nieman, 1965). Basado en el análisis de las variables morfológicas se clasificaron los genotipos de yorimón tolerantes, intermedios y sensibles a la salinidad en la etapa de plántula, considerando que ésta especie muestra mayor tolerancia en etapas avanzadas de su desarrollo (Maas y Poss 1989; Hall y Frate 1996). El genotipo 'IT89KD-288' se clasificó como moderadamente tolerante en germinación (Murillo *et al.* 2000), sin embargo, en emergencia se clasificó como sensible (Murillo *et al.* 2001). Los genotipos 'CB3', 'CB5' y 'CB27' se clasificaron como tolerantes en las dos etapas mencionadas, mientras que 'IT95R-52-80',

'IT96D-666' e 'IT86D-719' se clasificaron como moderadamente sensibles en germinación y sensibles en emergencia.

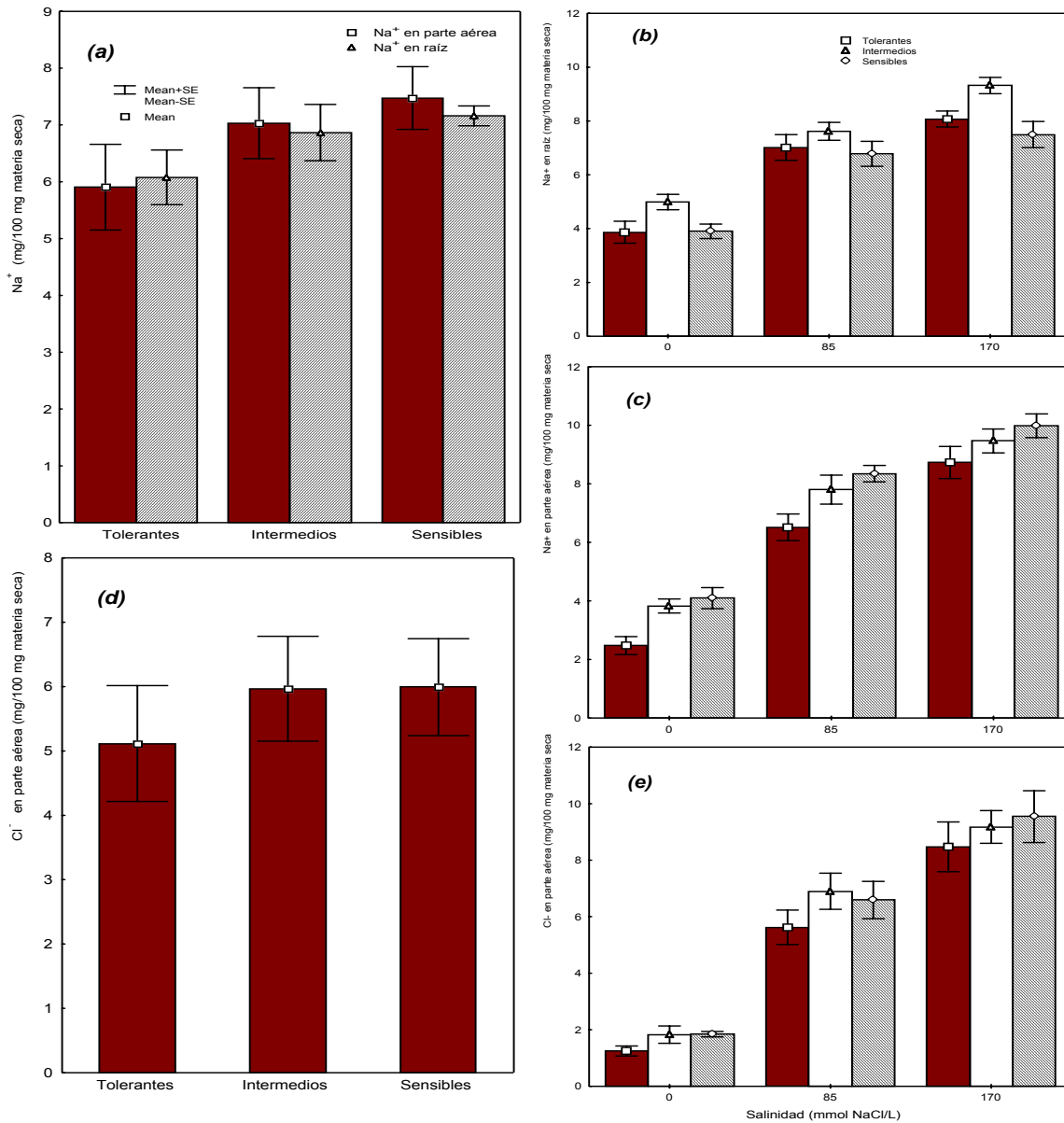


Figura 1. Concentración de Na<sup>+</sup> en raíz y parte aérea (a) y efecto del incremento de la salinidad en la concentración de Na<sup>+</sup> en raíz (b) y parte aérea (c). Concentración de Cl<sup>-</sup> en parte aérea (d) y efecto del incremento de la salinidad en la concentración de Cl<sup>-</sup> en parte aérea (e) en genotipos tolerantes, intermedios y sensibles de yorimón.

Tabla 1. Promedio y significancia de características morfológicas de plántulas de ocho genotipos de yorimón en condiciones salinas.

| Genotipos   | Altura de plántula (cm)<br>(mmol/L NaCl)        |         |          | Longitud de masa de raíces<br>(cm)<br>(mmol/L NaCl) |          |         | R a í c e s                                 |        |         |                                      |          |          | P a r t e a é r e a                              |         |         |   |         |         |
|-------------|---|---------|----------|---|----------|---------|---|--------|---------|--------------------------------------|----------|----------|--|---------|---------|---|---------|---------|
|             |   |         |          |   |          |         | Peso fresco (g)<br>(mmol/L NaCl)            |        |         | Peso seco (g)<br>(mmol/L NaCl)       |          |          | Peso fresco (g)<br>(mmol/L NaCl)                 |         |         | Peso seco (g)<br>(mmol/L NaCl)                  |         |         |
|             | 0   | 85      | 170      | 0   | 85       | 170     | 0   | 85     | 170     | 0                                    | 85       | 170      | 0  | 85      | 170     | 0   | 85      | 170     |
| IT89KD-288  | 32.6 a <sup>¶</sup>                             | 22.6 a  | 15.6 abc | 6.6 a   | 5.9 a    | 4.4 bc  | 0.8 a                                       | 0.6 a  | 0.22 ab | 0.07 a                               | 0.045 a  | 0.025 ab | 6.7 a  | 3.6 a   | 1.8 a   | 0.64 a  | 0.35 a  | 0.17 a  |
| CB-88       | 18.2 bc   | 13.8 e  | 14.1 bcd | 6.7 a   | 5.8 ab   | 4.5 ab  | 0.5 b                                       | 0.3 b  | 0.2 b   | 0.03 b                               | 0.02 b   | 0.020 ab | 3.3 b  | 1.5 bc  | 1.2 b   | 0.27 b  | 0.12 bc | 0.09 cd |
| CB-3        | 20.1 b  | 18.4 b  | 17.6 a   | 6.3 a   | 5.4 abc  | 5.0 ab  | 0.3 bc                                      | 0.2 b  | 0.29 a  | 0.03 b                               | 0.025 b  | 0.027 a  | 2.5 c  | 1.6 bc  | 1.5 a   | 0.17 c  | 0.12 bc | 0.13 b  |
| CB-5        | 18.5 bc   | 17.3 bc | 17.3 a   | 6.1 a   | 4.7 cd   | 5.5 a   | 0.3 bc                                      | 0.2 bc | 0.27 ab | 0.02 b                               | 0.017 bc | 0.020 ab | 1.9 cde  | 1.4 bcd | 1.5 a   | 0.13 c  | 0.12 bc | 0.12 bc |
| IT95R-52-80 | 17.4 c  | 17.3 bc | 16.5 a   | 6.0 a   | 5.0 bc   | 4.9 ab  | 0.3 bc                                      | 0.3 b  | 0.2 b   | 0.02 b                               | 0.025 b  | 0.025 ab | 2.0 cde  | 1.7 b   | 1.2 b   | 0.15 c  | 0.15 b  | 0.11 bc |
| CB-27       | 19.0 bc   | 15.7 cd | 16.0 ab  | 5.6 a   | 5.6 ab   | 4.8 ab  | 0.3 bc                                      | 0.2 bc | 0.2 b   | 0.02 b                               | 0.02 b   | 0.020 ab | 2.2 cd   | 1.2 cd  | 1.2 b   | 0.14 c  | 0.09 c  | 0.09 cd |
| IT86D-719   | 18.2 bc   | 14.7 de | 13.5 cd  | 3.5 b   | 3.5 e    | 3.1 d   | 0.1 c                                       | 0.1 c  | 0.1 c   | 0.01 b                               | 0.010 c  | 0.01 c   | 1.4 e  | 0.7 e   | 0.6 c   | 0.11 c  | 0.06 c  | 0.05 e  |
| IT96D-666   | 18.5 bc   | 15.5 de | 12.4 d   | 5.84 a  | 4.1 de   | 3.5 cd  | 0.29 bc                                     | 0.2 bc | 0.1 c   | 0.02 b                               | 0.02 b   | 0.017 b  | 1.6 de   | 1.0 de  | 0.7 c   | 0.12 c  | 0.09 c  | 0.07 de |
| Genotipos   | Area foliar (cm <sup>2</sup> )<br>(mmol/L NaCl) |         |          | Biomasa total (g)<br>(mmol/L NaCl)                  |          |         | Número de hojas verdaderas<br>(mmol/L NaCl) |        |         | Número de trifolios<br>(mmol/L NaCl) |          |          | Raíz / parte aérea en peso seco<br>(mmol/L NaCl) |         |         | Raíz / parte aérea en longitud<br>(mmol/L NaCl) |         |         |
|             | 0   | 85      | 170      | 0   | 85       | 170     | 0   | 85     | 170     | 0                                    | 85       | 170      | 0  | 85      | 170     | 0   | 85      | 170     |
| IT89KD-288  | 138.0 a   | 75.4 a  | 28.0 a   | 0.7 a   | 0.39 a   | 0.19 a  | 1.8 ab                                      | 1.95 a | 1.95 ab | 3.8 a                                | 2.3 a    | 1.3 a    | 0.10 bc  | 0.13 c  | 0.15 d  | 0.20 b  | 0.26 cd | 0.27 ab |
| CB-88       | 99.0 b  | 23.0 bc | 8.9 cd   | 0.3 b   | 0.14 bc  | 0.11 c  | 1.8 ab                                      | 1.92 a | 2.0 a   | 2.3 bc                               | 0.9 bcd  | 0.1 d    | 0.11 bc  | 0.16 bc | 0.20 bc | 0.34 a  | 0.42 a  | 0.32 a  |
| CB-3        | 68.2 c  | 20.0 bc | 16.9 b   | 0.2 c   | 0.14 bc  | 0.15 b  | 1.9 ab                                      | 1.96 a | 1.97 a  | 2.7 b                                | 1.3 b    | 1.0 ab   | 0.17 a   | 0.20 ab | 0.21 b  | 0.33 a  | 0.29 c  | 0.29 a  |
| CB-5        | 38.0 de   | 16.0 bc | 17.4 b   | 0.1 c   | 0.14 bc  | 0.14 bc | 1.8 ab                                      | 1.96 a | 1.95 ab | 2.0 cd                               | 0.8 cd   | 0.9 bc   | 0.16 a   | 0.16 bc | 0.17 cd | 0.33 a  | 0.27 cd | 0.31 a  |
| IT95R-52-80 | 43.0 de   | 29.0 b  | 15.0 bc  | 0.1 c   | 0.18 b   | 0.14 bc | 2.0 a                                       | 1.83 a | 1.9 ab  | 1.6 de                               | 1.2 bc   | 0.6 c    | 0.14 ab  | 0.16 bc | 0.20 bc | 0.35 a  | 0.29 c  | 0.29 a  |
| CB-27       | 59.0 cd   | 13.0 c  | 11.6 bcd | 0.1 c   | 0.12 bcd | 0.11 c  | 1.8 ab                                      | 1.93 a | 1.84 ab | 2.3 bc                               | 1.0 bcd  | 0.9 bc   | 0.14 ab  | 0.24 a  | 0.22 ab | 0.29 a  | 0.35 b  | 0.30 a  |
| IT86D-719   | 47.1 cde  | 11.0 c  | 4.6 d    | 0.1 c   | 0.07 d   | 0.06 d  | 1.8 ab                                      | 1.85 a | 1.69 b  | 2.0 cd                               | 0.9 bcd  | 0.1 d    | 0.08 c   | 0.14 c  | 0.15 d  | 0.19 b  | 0.23 d  | 0.23 b  |
| IT96D-666   | 26.0 e  | 11.4 c  | 7.4 d    | 0.1 c   | 0.10 cd  | 0.08 d  | 1.6 b                                       | 1.80 a | 1.78 ab | 1.1 e                                | 0.75 d   | 0.1 d    | 0.17 a   | 0.22 a  | 0.24 a  | 0.31 a  | 0.26 cd | 0.28 ab |

<sup>¶</sup> Medias en misma columna seguidas por la misma literal no difieren significativamente ( $P>0.05$ ). La comparación de medias se realizó utilizando la prueba de rango múltiple de Duncan. Los valores representan la media de  $n=4$ .

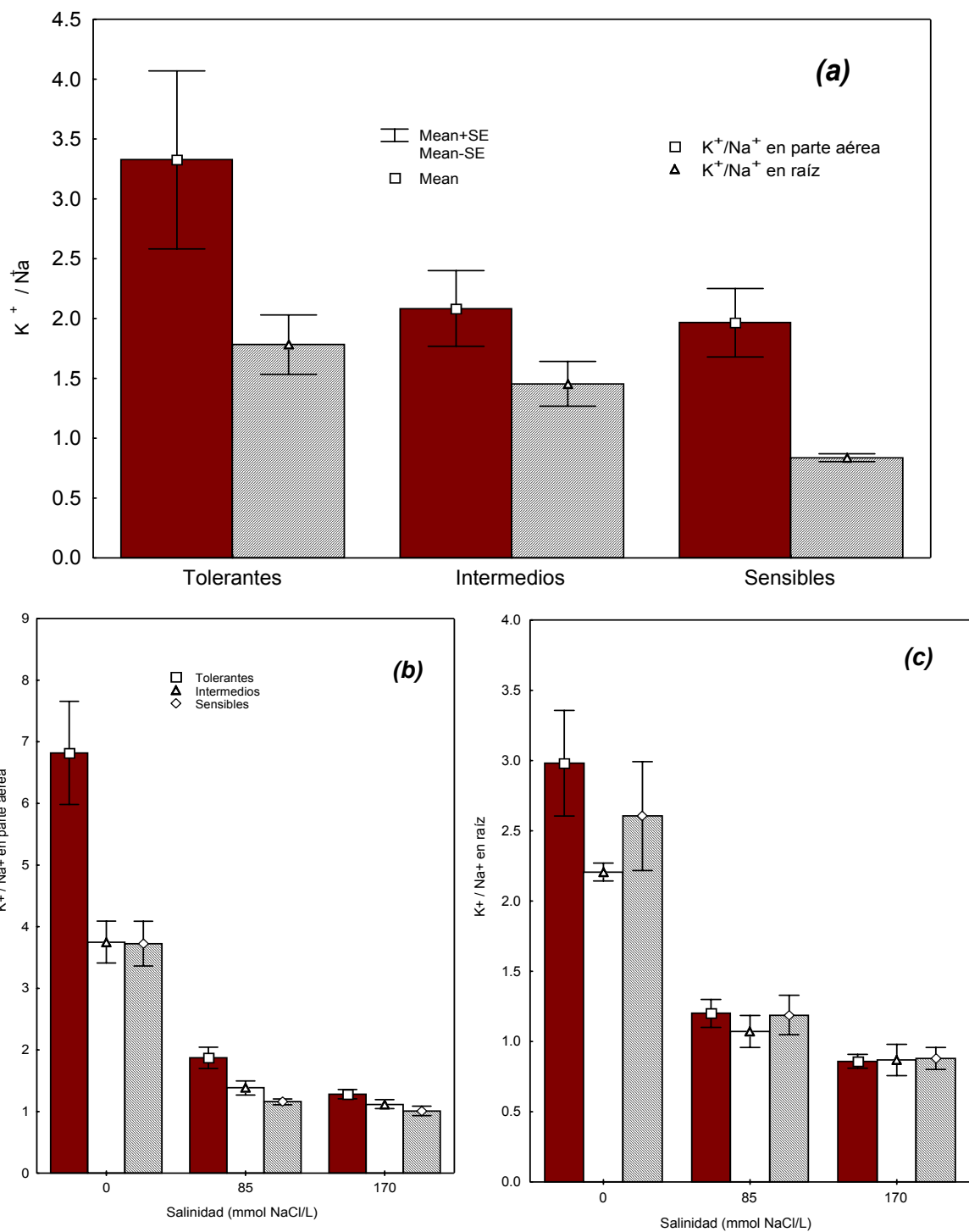


Figura 2. Relación  $K^+/Na^+$  en raíz y parte aérea (a) y efecto del incremento de la salinidad en parte aérea (b) y raíz (c) en genotipos tolerantes, intermedios y sensibles de yorimón.

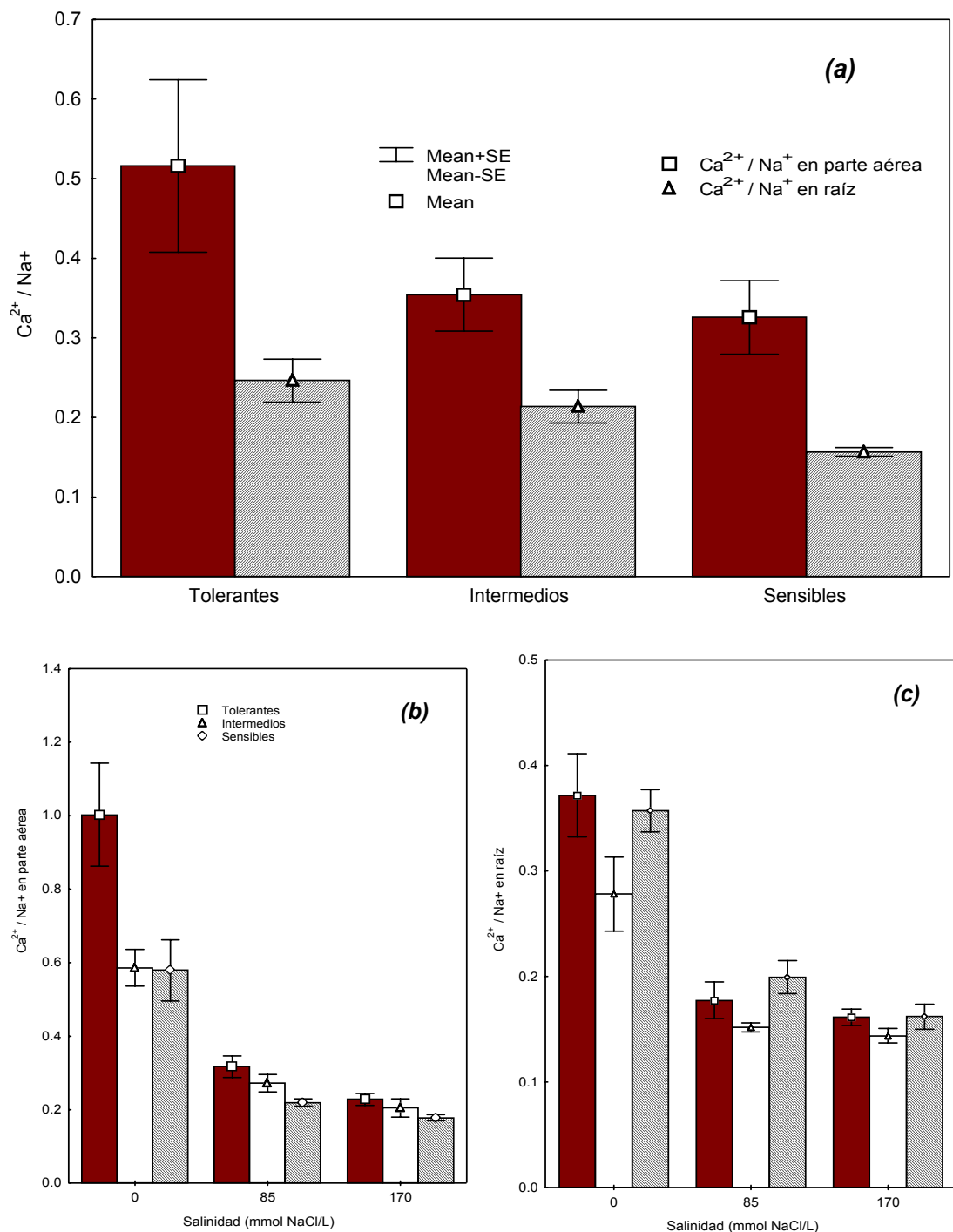


Figura 3. Relación  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$  en raíz y parte aérea (a) y efecto del incremento de la salinidad en parte aérea (b) y raíz (c) en genotipos tolerantes, intermedios y sensibles de yorimón.

En este sentido, es difícil realizar una comparación de la tolerancia a salinidad durante germinación y emergencia con etapas posteriores como plántula y otras más tardías, ya que se emplean diferentes criterios para evaluar la respuesta de la planta (Maas, 1986). Las relaciones

"raíz"/"parte aérea" en longitud y peso seco se utilizan como criterio para determinar las diferencias entre variedades en respuesta a la salinidad y sequía (Gomes Filho, 1996; Babalola, 1980; Kramer, 1983). Para la relación "raíz"/"parte aérea" con base a peso seco, 'IT96D-666' presentó valores superiores en las tres salinidades, mientras que 'IT89KD-288' mostró las medias inferiores. Para la misma relación en base a longitud de órganos, 'IT96D-666' fue superior a 'CB88' en 0 mmol NaCl/L y en 85 mmol NaCl/L. En 170 mmol NaCl/L las diferencias entre genotipos no fueron marcadas, aunque 'IT96D-666' e 'IT89KD-288' fueron estadísticamente iguales a los superiores. Ambos se clasificaron en emergencia como sensibles porque disminuyeron los valores en la relación 'raíz'/ 'parte aérea' en base a peso seco y longitud conforme se incrementó la salinidad (Murillo *et al.* 2001). En el presente estudio, 'IT89KD-288' no mostró valores superiores en la relación 'raíz'/ 'parte aérea', posiblemente debido a que la translocación de fotosintatos a la raíz fue el factor limitante para el desarrollo de éste órgano bajo los tratamientos de salinidad. Aunque no se midió el comportamiento ni la densidad estomática, puede surgir la hipótesis de que dicho genotipo regule la apertura estomática o tenga un número reducido de estomas para ahorrar mayor cantidad de agua, disminuyendo su desarrollo radicular en respuesta positiva al estrés salino. Resultados similares reportan Babalola (1980) en cultivares de yorimón.

De acuerdo con Greenway y Munns (1980), la sensibilidad a la salinidad de ciertas variedades es debido a la absorción de la raíz a la parte aérea de cantidades relativas de  $\text{Cl}^-$  y/o  $\text{Na}^+$ , estas variedades presentan un exceso de iones en sus hojas expandidas. Tanto la comparación entre variedades como entre especies muestra que la sensibilidad a las altas concentraciones de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  en las hojas es mucho mayor en la glicófitas que en las halófitas y esta diferencia está siempre basada en un compartimiento celular inadecuado de iones en las hojas de las glicófitas. Nuestros resultados mostraron una variación alta en la concentración de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en los genotipos tolerantes, intermedios y sensibles (Fig. 1 *a* y *d*). Resultados similares encontraron en arroz Flowers y Yeo (1981, 1986), en arroz, soya, frijol, frijol adzuki, calabacita y pepino (López *et al.* 1999), lechuga (Shannon *et al.* 1983), frijol mungo (Salim y Pitman, 1988), halófitas dicotiledóneas (Glenn y O'Leary, 1984), pastos (Marcum y Murdoch, 1990), remolacha azucarera (Marschner *et al.* 1981), en la halófito *Salvadora persica* (Maggio *et al.* 2000), pepino (Jones *et al.* 1989), chile (Chartzoulakis y Klapaki, 2000) y maíz (Schubert y Läuchli, 1990). Los genotipos intermedios y sensibles mostraron una

concentración menor de  $\text{Na}^+$  en raíz pero mayor en parte aérea, mientras que los tolerantes mostraron lo contrario (Fig. 1 *a*). En este sentido, los genotipos tolerantes secuestraron el  $\text{Na}^+$  principalmente en la raíz, sin descartar que otro mecanismo pueda secuestrar el  $\text{Na}^+$  en la porción baja del tallo (hipocotilo) para proteger al epicotilo y a la parte aérea, ya que ésta característica se ha presentado en otras especies de plantas (Jacoby, 1964; Lessani y Marschner, 1978; Fernandes de Melo *et al.* 1994). Se considera entonces que genotipos tolerantes de *V. unguiculata*, igual que otros tipos de frijol (Seeman y Critchley, 1985) pueden considerarse excluidores de  $\text{Na}^+$  (West y Francois, 1982; Fernandes de Melo *et al.* 1994). El hecho de que la concentración de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en los tres grupos de genotipos se incrementó linealmente cuando la salinidad aumentó (Fig. 1 *b, c, e*), puede relacionarse con la reducción de la tasa fotosintética. Sin embargo, esta aseveración requiere demostrarse sobre la relación de la concentración iónica y las variables fisiológicas tales como la fotosíntesis, la transpiración y el contenido de clorofila en yorimón. El incremento de  $\text{Cl}^-$  más que de  $\text{Na}^+$  o la interacción de ambos iones afectó el desarrollo de plántulas de todos los genotipos, especialmente en aquellos genotipos sensibles. Estos resultados son similares a los encontrados por West y Francois (1989) en el cultivar 'CB5', el cual acumuló más  $\text{Cl}^-$  que  $\text{Na}^+$  en las hojas y por lo tanto afectó el crecimiento vegetativo y rendimiento de grano.

Los niveles altos de  $\text{K}^+$  que mostraron los genotipos tolerantes en raíz y parte aérea se reflejaron en el mantenimiento de la relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  cercano o superior a 1.0, que mostraron en ambos órganos (Fig. 2 *a*) por lo que en estos genotipos, el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Cl}^-$  disminuyeron su translocación a la parte aérea debido a la selectividad de la absorción de  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ , ya que las concentraciones menores de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en parte aérea se presentaron en estos genotipos (Fig. 1 *a* y *d*), por lo que se considera que la relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  es un indicador adecuado de la tolerancia a la salinidad en genotipos de yorimón. Resultados similares se han obtenido en otros cultivares de yorimón tolerantes a salinidad (Fernandes De Melo *et al.* 1994). No se descarta la posibilidad de que algunos genotipos de yorimón presenten glándulas epidérmicas especiales que secretan la sal (Kramer, 1983). Por otro lado, la relación  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$  se considera un buen indicador de la tolerancia a salinidad, ya que un valor alto de esta relación, está asociado a la reducción de la permeabilidad del  $\text{Na}^+$  (Greenway y Munns, 1980; La Haye y Epstein, 1969). En este sentido, los genotipos clasificados como tolerantes mostraron valores altos en raíz y parte aérea (Fig. 3 *a*). En otras especies como frijol (La Haye y Epstein, 1971) y

soya (Wieneke y Läubli, 1980), se encontró que un incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , inhibe la absorción de  $\text{Na}^+$  y es un factor importante en el control de la respuesta a la salinidad en vegetales. Aunque el efecto iónico se considera estar relacionado con la tolerancia a salinidad (Abel y Mackenzie, 1964; Ashraf *et al.* 1989), la evaluación del contenido iónico es un proceso intensivo, especialmente cuando se realiza bajo condiciones controladas y condiciones de salinidad para estimar los valores relativos. Por lo anterior, la determinación de las relaciones  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ , los contenidos de  $\text{Cl}^-$ , entre otros minerales, limita el valor que pudiera tener en los programas de mejoramiento genético para tolerancia a salinidad, por lo que en estos casos, el uso de marcadores genéticos, tales como las isoenzimas o RFLPs pueden ser más eficientes y útiles al método (Saranga *et al.* 1993).

Considerando el criterio de clasificación que se usó en el presente estudio para tolerancia a salinidad en plántula y corroborando con los otros dos criterios basados en la concentración de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  y en las relaciones  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ , los genotipos 'IT89KD-288' y 'CB3' se clasificaron como tolerantes, 'CB88', 'IT95R-52-80' y 'CB5' se clasificaron como intermedios, mientras que 'CB27', 'IT96D-666' e 'IT86D-719' se clasificaron como sensibles. Los genotipos utilizados en el presente estudio y que mostraron tolerancia, son promisorios para futuros trabajos de mejoramiento genético. Sin embargo, se requiere incrementar el número de genotipos, realizar experimentos en germinación y las etapas subsecuentes hasta cosecha, tanto en invernadero como en campo; asimismo, se debe considerar un mayor intervalo de salinidades hasta alcanzar 170 mmol NaCl/L.



### 4.3.2. En la sobrevivencia, absorción y distribución de iones durante el crecimiento vegetativo

**Artículo sometido (en revisión):**

**Murillo-Amador B**, Troyo-Diéguez D, Jones HG, Tinoco Ojanguren CL, López-Cortés A, Ayala-Chairez F. 2001. Genotypic differences of cowpea for salt tolerance during vegetative growth. Sometido a: *EUPHYTICA*.

#### **Abstract**

Twenty-five (25) genotypes of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] were tested for salt-tolerance at the vegetative growth stage in pot in the greenhouse experiments at salinity levels of 0, 85 and 170 mmol NaCl/L. Plant survival was the main criterion for classifying genotypes. Other criteria included the ion concentration ( $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$ ) in root and shoot and biomass accumulation. Four local accessions ('Paceño', 'Tardón', 'Sonorense' and 'Cuarenteño'), three accessions from California ('CB46', 'CB27' and 'CB3') and one accession from the International Institute of Tropical Agriculture (IITA) ('IT82D-889'), survived at concentrations of both 85 and 170 mmol NaCl and were classified as salt-tolerant, while 'IT96D-666', 'IT89KD-288' and 'IT93K-734' from IITA were classified as salt-sensitive. One local accession ('Sesenteño'), three accessions from IITA ('PEPH-V Wes-85', 'IT86D-719' and 'IT95K-1090-12') and one accession from California ('CB5') were classified as moderately salt-tolerant. Eight accessions from IITA ('IT96D-733', 'IT90K-277-2', 'IT91K-93-10', 'IT91K-118-20', 'IT90K-284-2', 'IT95K-1088-4', 'IT89KD-391' and 'IT94K-437-1') and one from California ('CB88') were classified as moderately salt-sensitive. Biomass was affected by both 85 and 170 mmol NaCl/L in all groups of genotypes, however, salt-tolerant and moderately salt-tolerant genotypes showed higher biomass than genotypes classified as moderately and salt-sensitive. In all genotypes  $\text{Cl}^-$  concentration was higher in shoots than roots and increased as salinity increased. Similarly  $\text{Na}^+$  concentration increased with increasing salinity. However, in salt-tolerant and moderately salt-tolerant genotypes,  $\text{Na}^+$  concentration was more in roots than shoots, while in moderately salt-sensitive and salt-sensitive genotypes,  $\text{Na}^+$  was higher in shoots than roots.

## Introduction

Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) is an important grain legume crop used as a fodder crop for livestock, as a green vegetable, and for dry beans (West and Francois, 1982). Many varieties are grown in tropical and sub-tropical agricultural areas of the world, where soil salinity is a yield-limiting factor. It is also cultivated as a dryland crop under different climatic conditions ranging from semiarid to subhumid (Lush and Rawson, 1979). Cowpea is reported to have a good tolerance to heat and drought (Rachie and Roberts, 1974; Vasquez - Tello et al, 1990), and it has a high yield potential under irrigation (Turk et al. 1980). Cowpea is grown to obtain seeds and pods for human consumption; as a source of green manure and organic material on unproductive soils, primarily in semi-arid regions. The effect of salinity on the germination, vegetative growth, or yield of cowpea has been studied [West and Francois (1982), Imamul Huq and Larher (1983), Maas and Poss (1989), Kannan and Ramani (1988), Plaut *et al.* (1990), Larcher *et al* (1990), Fernandes de Melo *et al.* (1994), Murillo-Amador *et al.* (2000), Murillo-Amador *et al* (2001) however there is no data about screening or selection criteria on the effect of salinity on the early seedling growth. Screens are designed differentiate genetic effects from random environmental effects, and few attempts have been developed which had resulted in the selection of salt tolerance varieties. Unfortunately few screening and selection procedures have proven successful for salt tolerance as changes occur in specific tissues throughout the plant's life cycle (Shannon, 1997). The few screens methods for salt tolerance has been accomplished on a number of crops, using various parameters including germination and emergence, survival, growth rate, chlorosis or leaf damage and the genotypic differences within species (Shannon, 1997). According to Flowers and Yeo (1997) developing the procedure may itself be a difficult option, due to the complexity of environment by genotype interactions and ontogenetic drift in the response to salt, but the procedure is conceptually simple: to expose a group of genotypes to salinity, in order to choose the ones that perform the best. On the other hand, screening and selection for any character are desired at a developmental stage as early as possible because plant growth is positively correlated with quantity or commercial quality of the marketed product. In this sense, a screening technique was recently developed to screen cowpea genotypes for salt tolerance during germination and emergence stages (Murillo-Amador *et al.* 2000, 2001). However, the effectiveness of such screens varies but the main emphasis seems to be in balance with a controlled environment, so

that the screening techniques are reliable, against the uncertainty of variation in natural conditions in the field. The objective of this research was to evaluate the effect of salinity on the early vegetative growth of cowpea genotypes and develop a greenhouse screening method, based on the survival percentage, ion composition and dry matter production which allows a quick and easy-to-measure screening tool for genotypic differences in salinity tolerance.

## **Materials and Methods**

### ***Plant material, treatments and growth conditions***

The experiment was conducted under greenhouse conditions at the Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR), 17 km NW of La Paz, Mexico (24°08'N 110°24'W) located in a semiarid zone of Baja California Sur. Because seed vigor is might be affected by the storage and germinating environment, a field screening was done previously, where the 38 genotypes studied were planted at the same time and under the same environmental conditions to get enough seeds with the same vigor and the same lot, for this and subsequent experiments. Only 25 genotypes were selected with the same or similar maturity length, color and other seed parameters (Table 1). Two previous studies at the germination and emergence stages using the same genotypes and salinity levels were developed at CIBNOR.

For seedlings emergence seeds were previously disinfected by immersion in calcium hypochlorite solution containing 5% active chloride during 5 min, after they were then washed three times with sterilized distilled water. Afterwards seeds were placed in sterilized peat pellets -Jiffy-7 (Jiffypots, Jiffy Products (N.B.) LTD, Shippegan, Canada), inside sterilized Petri dishes (150 x 15 mm) and were watered with distilled water during seven days. Seedling emergence stage was conducted in a growth chamber (Percival, Model MB-60B, Controlled Environment, Percival Manufacturing Company, U.S.A.) at 25° C ± 1° C, 12 h of day length, and 80% of relative humidity to prevent high evaporation of the saline medium. Seeds were considered to be emerged when the seedling appeared through the Jiffypots surface. Three days after emergence, seedlings were moved to a greenhouse and transferred to a plastic pots (13 cm top diameter, 8 cm bottom diameter by 10 cm deep, with one hole in the bottom) filled with peat-moss (Sunshine, Sun Gro Horticulture Canada, Ltd.). We maintained water potential values of -0.1, -0.5 and -0.8 Mpa for 0, 85 and 170 mmol NaCl/L, respectively, which was

measured psychometrically using a Wescor Model HR-33T microvoltmeter (Wescor Inc., Logan Utah).

Table 1. Cowpea genotypes evaluated for the effect of NaCl salinity during vegetative growth.

| Genotypes     | Origin  |
|---------------|---|
| Paceño        | traditional variety, La Paz, B.C.S. México        |
| Tardón        | traditional variety, San Isidro, B.C.S. México    |
| Sonorense     | traditional variety, Hermosillo, Sonora, México   |
| Cuarenteño    | traditional variety, Todos Santos, B.C.S. México  |
| CB46          | California cultivar, Univ. Calif., Riverside, USA |
| CB88          | California cultivar, Univ. Calif., Riverside, USA |
| CB27          | California cultivar, Univ. Calif., Riverside, USA |
| CB3           | California cultivar, Univ. Calif., Riverside, USA |
| CB5           | California cultivar, Univ. Calif., Riverside, USA |
| PEPH-V Wes-85 | Texas cultivar, Univ. Texas A. & M., USA          |
| IT86D-719     | Nigerian breeding line, IITA, Ibadan, Nigeria     |
| IT96D-666     | Nigerian breeding line, IITA, Ibadan, Nigeria     |
| IT89KD-288    | Nigerian breeding line, IITA, Ibadan, Nigeria     |
| IT82D-889     | Nigerian breeding line, IITA, Ibadan, Nigeria     |
| IT93K-734     | Nigerian breeding line, IITA, Ibadan, Nigeria     |
| IT96D-733     | Nigerian breeding line, IITA, Ibadan, Nigeria     |
| IT89KD-391    | Nigerian breeding line, IITA, Ibadan, Nigeria     |
| IT90K-277-2   | Nigerian breeding line, IITA, Ibadan, Nigeria     |
| IT91K-93-10   | Nigerian breeding line, IITA, Ibadan, Nigeria     |
| IT94K-437-1   | Nigerian breeding line, IITA, Ibadan, Nigeria     |
| IT95K-1090-12 | Nigerian breeding line, IITA, Ibadan, Nigeria     |
| IT95K-1088-4  | Nigerian breeding line, IITA, Ibadan, Nigeria     |
| IT91K-118-20  | Nigerian breeding line, IITA, Ibadan, Nigeria     |
| IT90K-284-2   | Nigerian breeding line, IITA, Ibadan, Nigeria     |
| Sesenteño     | traditional variety, Todos Santos, B.C.S., México |

Eight pots were used for each genotype and each saline treatment with one plant per pot. The salt treatments were: 0, 85 and 170 mmol NaCl/L. These treatments were selected because one of the basis of the screening method is exposure seeds or plants to a lethal NaCl concentrations in order in order to determine the mortality and survival percentage in each saline level. Besides, literature reports that cowpea beans have a moderate tolerance to salinity but does not exist sufficient data to adequately describe the salt tolerance of this species. We use NaCl because it is the most abundant salt in the saline and brackish water (due to sea water intrusion) in northwest of México where it is commonly used for irrigation. Salinity treatments were applied after transferred to a naturally illuminated greenhouse when the seedlings had the

primary leaves developed. All plants were watered daily with excess solution of appropriate saline solutions to flush the pots, allowing draining the excess of solution to maintain the level of salinity. Average temperature inside greenhouse was 16/33°C (night/day); humidity was 29% in average during the day and 59% at night. Plants were grown in a 12-h photoperiod of  $279 \pm 23 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  photosynthetically active radiation. Pots were watered to saturation and percolated with a nutrient solution (220 N, 40 P, 200 K<sup>+</sup>, 140 Ca<sup>2+</sup>, 42 Mg<sup>2+</sup>, 4 Fe<sup>3+</sup>, 1.25 Mn<sup>4+</sup>, 0.18 B, 0.23 Zn<sup>2+</sup> and 0.25 Cu<sup>2+</sup> ppm).

#### **Experimental design and statistical analysis**

Experimental design was a factorial treatment set of 25 genotypes and three salinity treatments were arranged in a completely randomized design with four replicates of two plants (600 plants in total, 200 plants per treatment). Data were subjected to analysis of variance, using the ANOVA and GLM procedure in SAS (SAS Institute, 1988). Least significant differences among means of genotypes were compared by Duncan's Multiple Range Test at  $P=0.05$ . Also a correlation and regression analyses were also performed.

#### **Selection criteria for salt- tolerant and salt-sensitive genotypes**

The plant survival percentage at 85 and 170 mmol NaCl/L was used to classify the genotypes as salt-tolerant, salt-sensitive, moderately salt-tolerant and salt-sensitive, following the next criteria: when the 70% (140 plants) of the total of 200 plants were dead at 170 mmol NaCl/L, the number of dead plants of each genotype and the genotype with major plant survival, were selected and classified as salt-tolerant. On the other hand, the main criterion to select salt-sensitive genotypes was based on the mortality percentage at 85 mmol NaCl following the next criteria: when 10% (20 plants) of a total of 200 plants were dead at 85 mmol NaCl/L, we counted the number of dead plants of each genotype; those genotypes with the biggest number of dead plants were chosen and selected as salt-sensitive genotypes. All genotypes were grouped in four categories according to their response to the effects of salinity on plant survival at 85 and 170 mmol NaCl/L following the next criteria: (1) salt-tolerant genotypes.- those genotypes which showed more than 50% of plant survival in both 85 and 170 mmol NaCl/L; (2) moderately salt-tolerant.- genotypes which showed more than 25% and less than 50% of plant survival at 170 mmol NaCl/L and more than 50% of plant survival at 85 mmol NaCl/L; (3) moderately salt-sensitive.- genotypes which showed more than 75% of plant survival at 85 mmol NaCl/L and 0% of plant survival at 170 mmol NaCl/L, and (4) salt-

sensitive genotypes.- those genotypes which showed less than 70% of plant survival at 85 mmol NaCl/L and 0% of plant survival at 170 mmol NaCl/L. Finally, to corroborate this classification, Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> concentration in both roots and shoots and dry matter production (biomass) at each group of genotypes were evaluated.

### **Tissue analysis**

Plants were separated into roots and shoots and dry weight was determined. Length of root and shoots, number of trifoliate leaves (data not showed) and biomass (dry weight of roots and shoots) were determined when a study plant died in each saline treatment. Dry weight was estimated after drying at 80°C for 48-h. Dry plant material was ground in a blender (Braun 4-041 Model KSM-2) for mineral analysis. Cl<sup>-</sup> content was determined by anion chromatography (Shimadzu HIC-6A) and Na<sup>+</sup> was determined by atomic absorption spectrophotometry (Shimadzu AA-660).

## **Results**

### **Plant survival**

The time course of seedling death in the two saline treatments is shown in Fig. 1. After one week of salt application, the leaves of plants of some genotypes subjected to 170 mmol NaCl/L started showing necrosis and wilting and the plants eventually began to die after 13 days. The primary leaves showed more damage than the first and second trifoliate leaves. After two weeks, the leaves of plants of some genotypes in 85 mmol NaCl/L started showing necrotic spots which slightly spread, wilting and leaves of plants of some genotypes dried up and plants began to die. During the course of the experiment, a gradual death of leaves in both 85 and 170 mmol NaCl/L continued to reach 70% of mortality at 170 mmol NaCl/L, after 62 days of applying this saline treatment, while 10% of mortality at 85 mmol NaCl/L was reached after 45 days. Thirteen of 25 genotypes showed some survival of seedlings at the end of the experiment (62 days) at 170 mmol NaCl/L (Table 2). Seedlings of only 10 genotypes showed mortality percentage of 12.5 to 62.5% at 85 mmol NaCl/L (Table 2). According to the selection criteria used for salt-tolerant genotypes, 'Sonorens', 'CB3', 'CB27', 'Cuarenteño', 'CB46', 'Paceño', 'IT82D-889' and 'Tardón' showed more than 50% of surviving seedlings in both 85 and 170 mmol NaCl/L and were classified as salt-tolerant (Table 2). 'PEPH-V Wes-85', 'IT86D-719', 'CB5', 'IT95K-1090-12' and 'Sesenteño' showed 25 to 49% of seedlings surviving at 170 mmol NaCl/L and more than 50% at 85 mmol NaCl/L and these genotypes

were classified as moderately salt-tolerant (Table 2). One group of nine genotypes showed more than 75% of seedlings surviving at 85 mmol NaCl/L and 0% at 170 mmol NaCl/L and were classified as moderately salt-sensitive (Table 2). Finally, the genotypes classified as salt-sensitive were 'IT93K-734', 'IT96D-666' and 'IT89KD-288' and had less than 70% of seedlings surviving at 85 mmol NaCl/L (Table 2).

### **Biomass**

Biomass decreased more drastically at 170 mmol NaCl/L than in 85 mmol NaCl/L in all groups of genotypes (Fig. 5 a) and decreased as salinity increased (Fig. 5 b). There was a strong and significant linear correlation between either Na<sup>+</sup> or Cl<sup>-</sup> concentrations in shoots and biomass with a strong reduction in biomass in response to a significant increase in both Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> concentration in shoots (Fig. 5 c & d).

### **Sodium and chloride concentration and survival**

The relationship between sodium concentration and seedling survival in cowpea at 85 mmol NaCl/L (45 days after treatment application) was low and not statistically significant ( $r=-0.21$ ,  $p=0.30$ ,  $n=25$ ) (Fig. 2 a). However, Cl<sup>-</sup> uptake showed a significant relationship with seedling survival ( $r = -0.60$ ,  $p=0.002$ ,  $n=25$ ) (Fig. 2 b). On the other hand, both Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> uptake at 170 mmol NaCl/L (after 62 days of treatment application) showed a high relationship with varietal (Na<sup>+</sup>,  $r = -0.58$ ,  $p= 0.003$ ; Cl<sup>-</sup>,  $r = -0.62$ ,  $p = 0.0001$ ,  $n=25$ ) (Fig. 2 c & d). According to the classification of genotypes, Na<sup>+</sup> concentration was higher in roots than shoots in salt-tolerant and moderately salt-tolerant genotypes (Fig. 3 a), while in moderately salt-sensitive and salt-sensitive genotypes; Na<sup>+</sup> was higher in shoots than roots (Fig. 3 a). In all grouped genotypes, Na<sup>+</sup> increased in both roots and shoots as salinity increased (Fig 4 a & b). On the other hand, Cl<sup>-</sup> concentration was higher in shoots than in roots in all grouped genotypes, being higher in most cases in moderately and salt-sensitive genotypes (Fig. 3 b) and Cl<sup>-</sup> concentration in both roots and shoots increased with increasing salinity in all grouped genotypes (Fig. 4 c & d). Average Na<sup>+</sup> content in both roots and shoots of all four groups of genotypes was higher than Cl<sup>-</sup> content in both roots and shoots (Fig. 3 a & b).

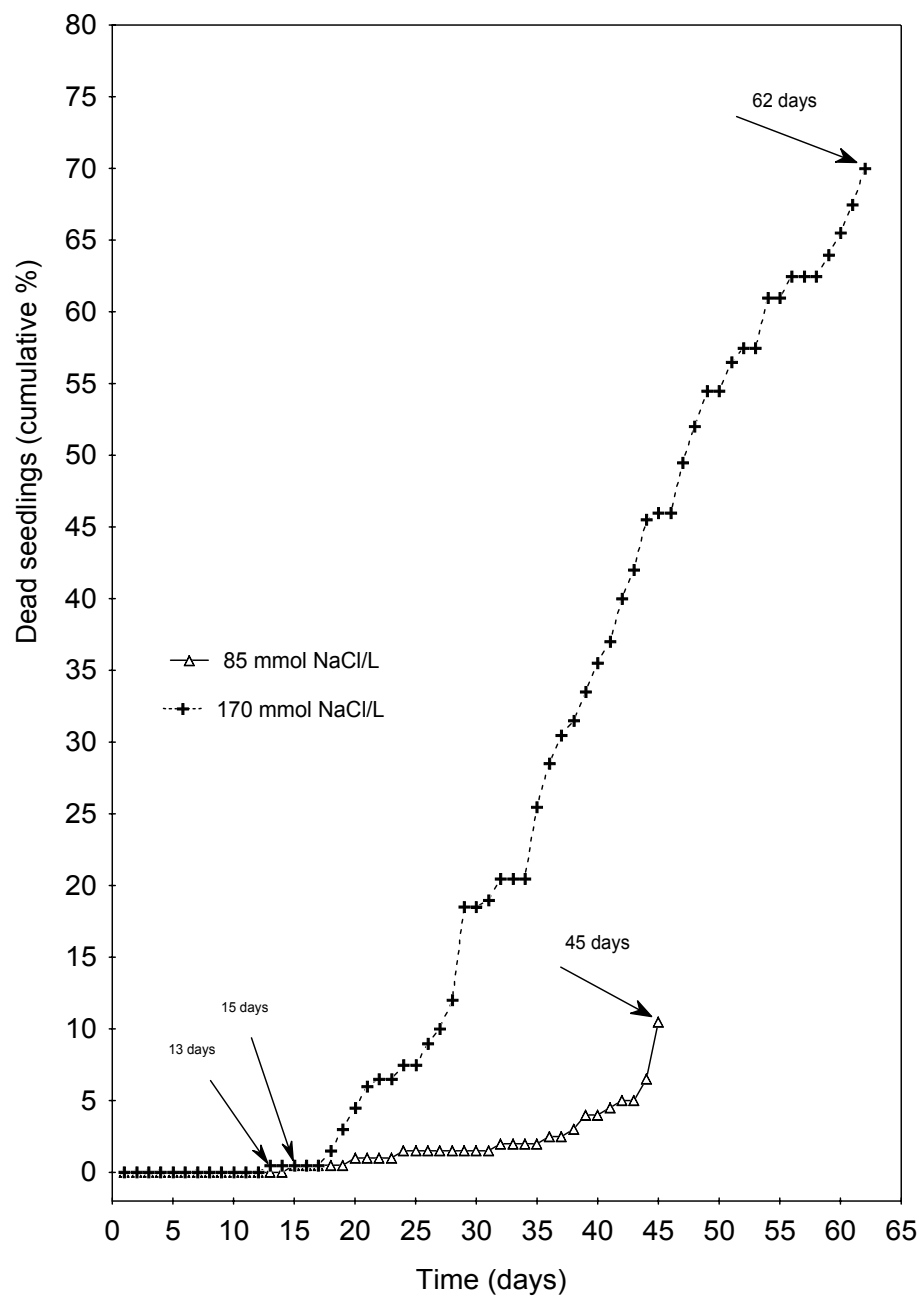


Figure 1. Progress of percentage of dead seedlings of 25 cowpea genotypes under two saline treatments.



Table 2. Classification of cowpea genotypes based on the percentage of surviving seedlings at 85 and 170 mmol NaCl/L during vegetative growth.

| <b>Group 1</b>       | Surviving (%)<br>at mmol NaCl/L |       | <b>Group 2</b>                  | Surviving (%)<br>at mmol NaCl/L |      | <b>Group 3</b>                   | Surviving<br>(%)<br>at mmol<br>NaCl/L |     | <b>Group 4</b>        | Surviving (%)<br>at mmol<br>NaCl/L |     |
|----------------------|---------------------------------|-------|---------------------------------|---------------------------------|------|----------------------------------|---------------------------------------|-----|-----------------------|------------------------------------|-----|
|                      | 85                              | 170   |                                 | 85                              | 170  |                                  | 85                                    | 170 |                       | 85                                 | 170 |
| <b>Salt-tolerant</b> |                                 |       | <b>Moderately Salt-tolerant</b> |                                 |      | <b>Moderately Salt-sensitive</b> |                                       |     | <b>Salt-sensitive</b> |                                    |     |
| Sonorensense         | 100.0                           | 100.0 | PEPH-V Wes-85                   | 100.0                           | 37.5 | IT96D-733                        | 100.0                                 | 0.0 | IT93K-734             | 62.5                               | 0.0 |
| CB3                  | 100.0                           | 100.0 | IT86D-719                       | 100.0                           | 37.5 | IT90K-277-2                      | 100.0                                 | 0.0 | IT96D-666             | 50.0                               | 0.0 |
| CB27                 | 100.0                           | 87.5  | CB5                             | 100.0                           | 25.0 | IT91K-93-10                      | 100.0                                 | 0.0 | IT89KD-288            | 37.5                               | 0.0 |
| Cuarenteño           | 100.0                           | 75.0  | IT95K-1090-12                   | 100.0                           | 25.0 | IT91K-118-20                     | 100.0                                 | 0.0 |                       |                                    |     |
| CB46                 | 100.0                           | 62.5  | Sesenteño                       | 87.5                            | 25.0 | IT90K-284-2                      | 100.0                                 | 0.0 |                       |                                    |     |
| Paceño               | 100.0                           | 62.5  |                                 |                                 |      | IT95K-1088-4                     | 87.5                                  | 0.0 |                       |                                    |     |
| IT82D-889            | 87.5                            | 62.5  |                                 |                                 |      | CB88                             | 87.5                                  | 0.0 |                       |                                    |     |
| Tardón               | 87.5                            | 50.0  |                                 |                                 |      | IT89KD-391                       | 87.5                                  | 0.0 |                       |                                    |     |
|                      |                                 |       |                                 |                                 |      | IT94K-437-1                      | 75.0                                  | 0.0 |                       |                                    |     |

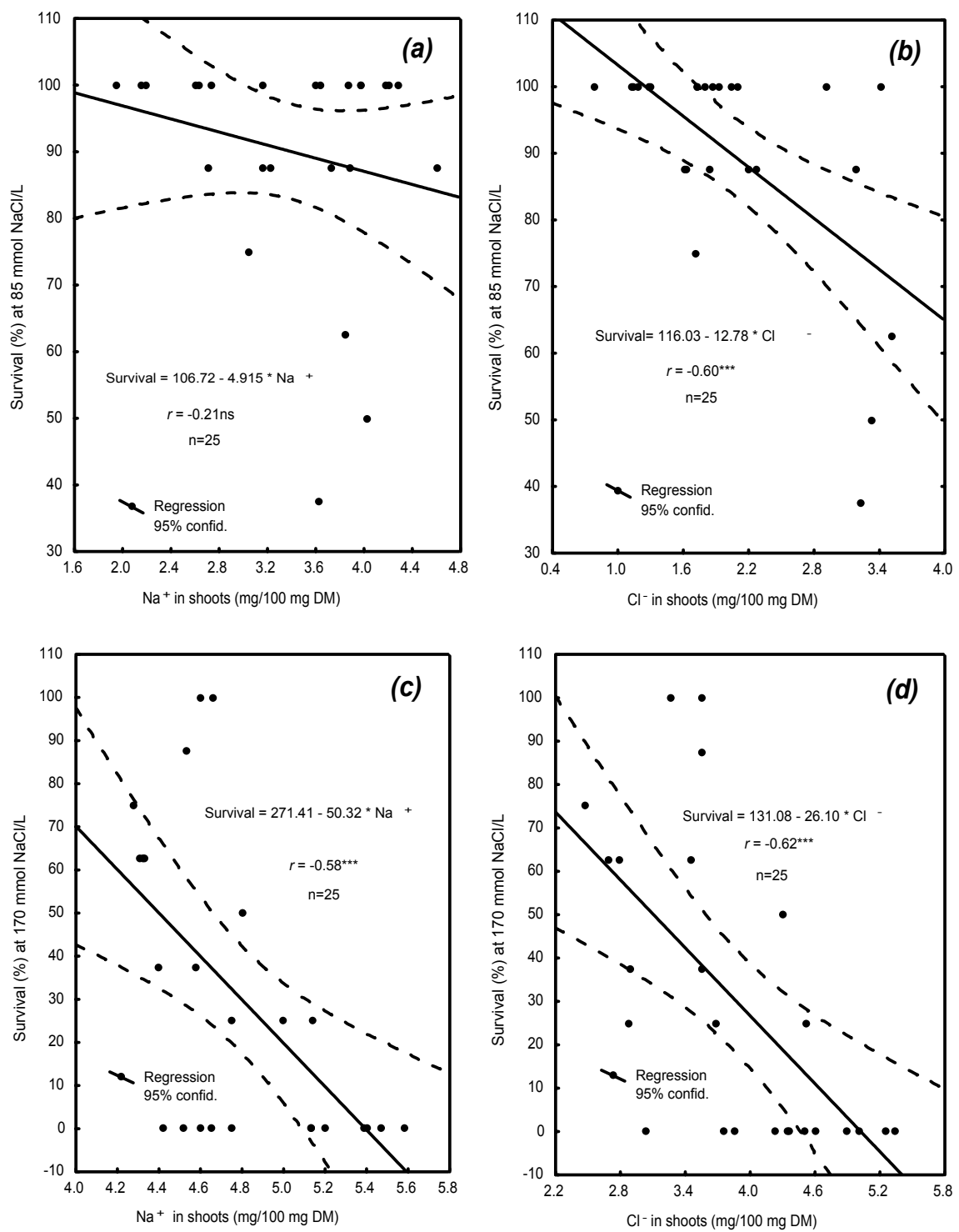


Figure 2. Relationship between sodium and chloride concentration and varietal tolerance in cowpea genotypes under two saline treatments.

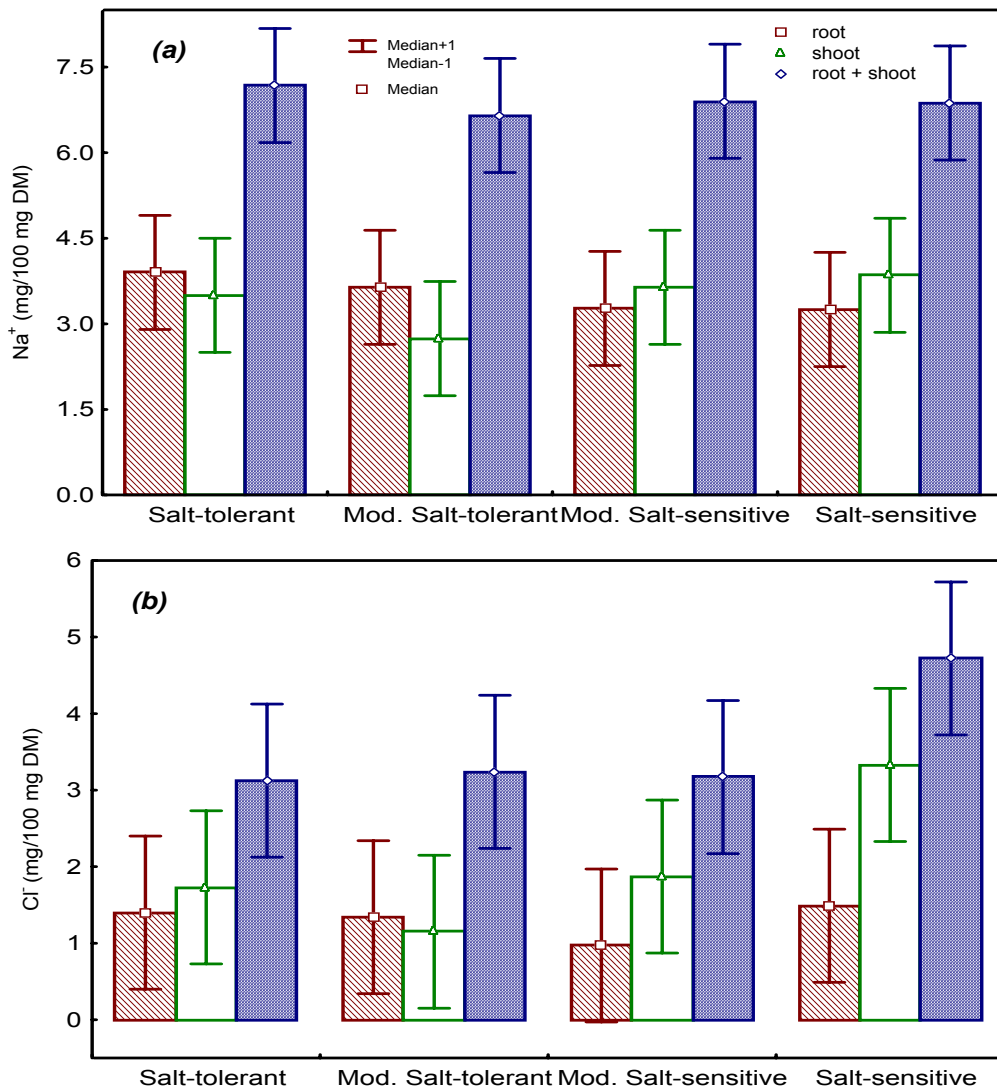


Figure 3. Effect of NaCl salinity (mmol/L) on (a) Na<sup>+</sup> and (b) Cl<sup>-</sup> concentration in different plant tissues of salt-tolerant, moderately salt-tolerant, moderately salt-sensitive and salt-sensitive cowpea genotypes.

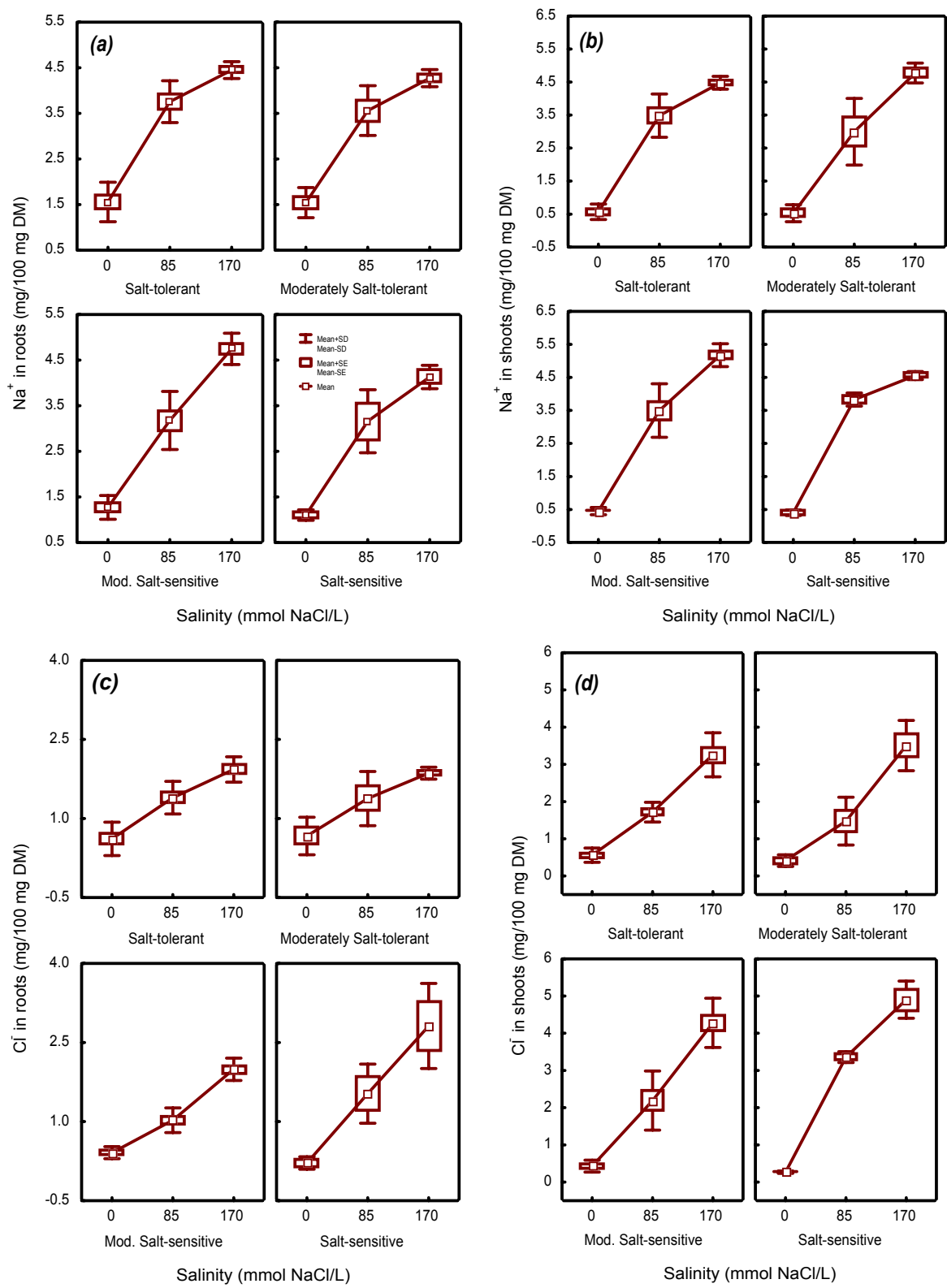


Figure 4. The effect of external NaCl salinity (mmol/L) on (a) Na<sup>+</sup> in roots, (b) Na<sup>+</sup> in shoots, (c) Cl<sup>-</sup> in roots and (d) Cl<sup>-</sup> in shoots of salt-tolerant, moderately salt-tolerant, moderately salt-sensitive and salt-sensitive cowpea genotypes.

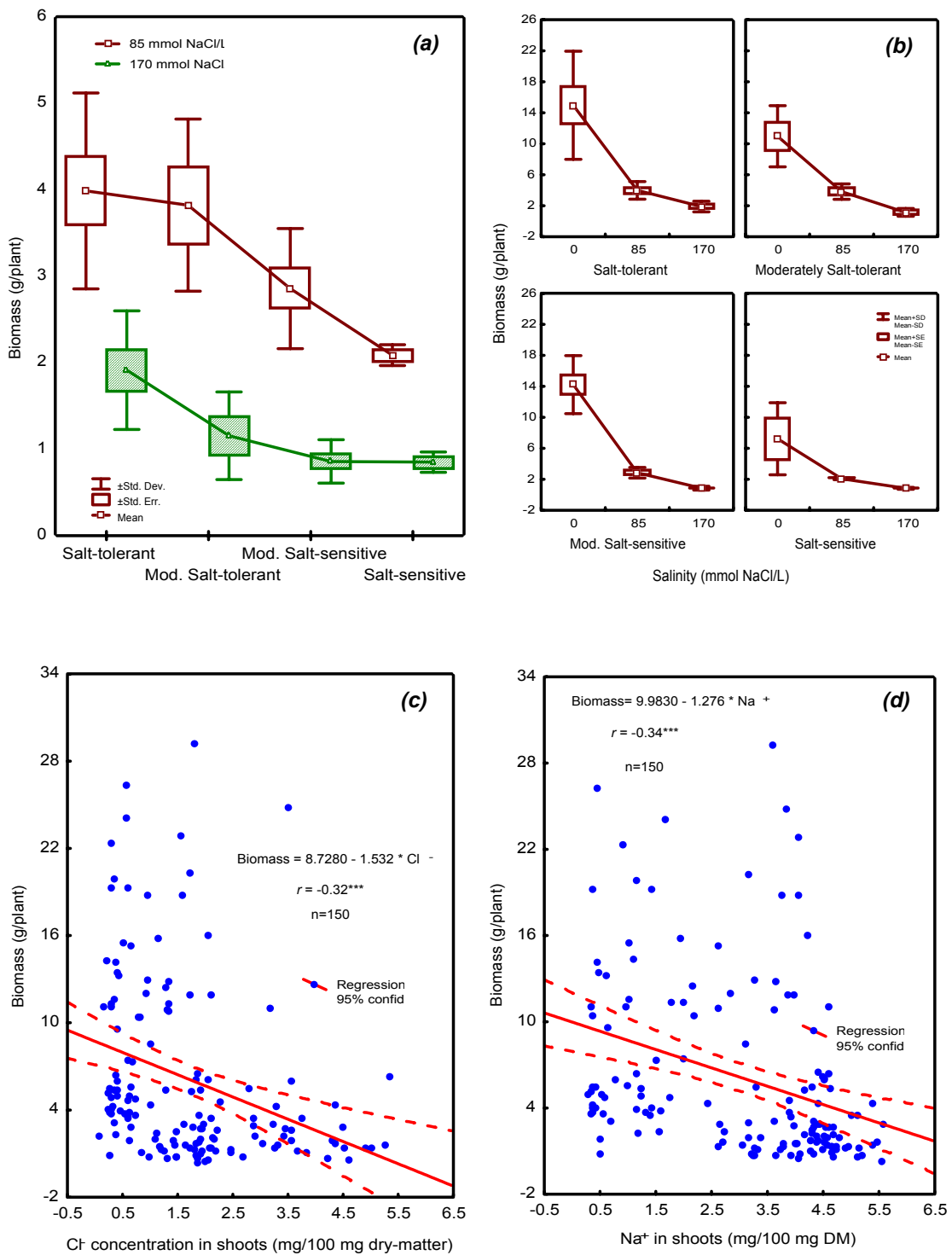


Figure 5. Genotypic differences of cowpea genotypes under saline treatments on (a) dry matter production (biomass), (b) effects of external NaCl salinity on biomass of salt-tolerant, moderately salt-tolerant, moderately salt-sensitive and salt-sensitive, (c) relationship between Cl<sup>-</sup> in shoots and biomass and (d) relationship between Na<sup>+</sup> in shoots and biomass.

## Discussion

### Plant survival

The present work has confirmed the tolerance and sensitivity to salt treatment of 25 genotypes of *V. unguiculata*, based on the plant survival as a main criterion. Four genotypes ('Paceño', 'CB46', 'CB27' and 'CB3') classified as salt-tolerant at the germination stage (Murillo et al. 2000) were selected as salt-tolerant in the early vegetative growth stage. Three genotypes ('Paceño', 'CB27' and 'CB3') classified as salt-tolerant at the emergence stage (Murillo et al. 2001) were selected as salt-tolerant in the early vegetative growth stage. Therefore, 'Paceño', 'CB27' and 'CB3' could be considered as salt-tolerant genotypes because they showed tolerance at the three growth stages evaluated. Genotype 'CB46' was tolerant at two growth stages (germination and early vegetative growth stage); 'Cuarenteño' was tolerant at emergence and early vegetative growth stage, while 'CB88' and 'CB5' were salt-tolerant at germination and emergence stage. Results evidenced the sensitivity of cowpea to salinity changes during its growth and development, and that these differences may include the effect of environmental factors as temperature, soil moisture content, and some other variables as oxygen concentration, light, and soil temperature which may affect any evaluated stage. Plant survival was more sensitive to salinity than other stages such as germination and emergence evaluated by Murillo et al (2000, 2001). This is obvious from plant counts over a prolonged period (45 and 62 days at 85 and 170 mmol NaCl/L, respectively), which showed a high mortality due to build up of salinity. According to Maas and Grieve (1990), a comparison of salt tolerance during germination, emergence and early vegetative growth with later growth stages is difficult because different criteria are used to evaluate plant responses to salinity during these different stages of plant development. Our results showed that the plants of some genotypes could grow at moderately high salinity of 170 mmol NaCl/L for few weeks but probably did not survive up to maturity, therefore further studies in advanced stages of their plant growth are required.

We found that salt-tolerance during germination, emergence and seedling growth varies considerably among crops (Maas and Grieve, 1990) but also among genotypes of a certain species as cowpea, e.g. 'Sonorense' was salt-sensitive at germination and emergence stage but was tolerant at the early vegetative growth stage. The results also suggest that 'CB88' and 'CB5' were salt-tolerant at germination and emergence but 'CB88' was salt-sensitive at the

early vegetative growth stage and 'CB5' was moderately salt-tolerant at the early vegetative growth stage. This evidence shows that some genotypes of certain crops are tolerant, at the germination stage as at later stages. Nevertheless, there are some known exceptions including cotton, sugarbeet, sorghum, and safflower, which are more sensitive during germination; others crops as barley, corn, rice, and wheat, are most sensitive during early seedling growth and then become increasingly tolerant during later stages of growth and development (Maas, 1986).

Cowpea has a moderate tolerance to salinity, with a greater tolerance than corn but less than wheat, barley, sugarbeet, or cotton (Hall and Frate, 1996). During germination and early vegetative growth this crop is most sensitive to salinity but exhibit most tolerance during pod filling (Hall and Frate, 1996). Maas and Poss (1989) found that cowpea is more sensitive to salt stress prior the floral bud formation than at later stages. In this sense, although plant survival to the farmer has little value because this parameter does not consider economic yield, plant survival on saline soil has been widely used by ecologists to evaluate the tolerance of native species growing on uncultivated lands; indirectly this criterion is potentially useful, because plant breeders can use it as the basis for selecting salt-tolerant lines and cultivars (Maas, 1981).

### **Biomass**

In all four groups of genotypes, dry matter production was affected by both 85 and 170 mmol NaCl/L, with an average reduction for all groups of 28 and 10% as compared to the control at 85 and 170 mmol NaCl/L, respectively. This reduction could be a combined effect of osmotic stress (Greenway and Munns, 1980), which is more harmful to plants during the succulence seedling stage and the higher ion uptake (Dumbroff and Cooper, 1974). Reduction of dry matter of cowpea under different levels of salinity was previously reported by Egeh and Zamora (1992). In our study, genotypes classified as salt-tolerant and moderately salt-tolerant showed higher biomass than genotypes classified as moderately salt-tolerant and salt-sensitive in both 85 and 170 mmol NaCl/L. This confirms that the first criteria based on plants survival enable cowpea genotypes to be ranked for salinity tolerance according to plant survival and dry matter production during an early vegetative growth stage. Therefore our results confirm the utility of plants survival as an early screening tool for salt-tolerance in cowpea genotypes during this growth stage. Similar results were found by Murillo *et al.* (2001) because

genotypes classified as tolerant had higher biomass values at 170 mmol NaCl/L than the other genotypes classified as salt-sensitive during emergence stage. In all groups of genotypes dry matter decreased linearly as salinity increased (Fig. 5 b). This reduction could be due to a higher accumulation of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> in shoots but seemingly more due to Cl<sup>-</sup> than Na<sup>+</sup> as shown in Fig. 5 c & d, where reduction in biomass is more affected at low Cl<sup>-</sup> concentration than higher Na<sup>+</sup> concentration. These results are confirmed because the genotypes classified as salt-sensitive ('IT93K-734', 'IT96D-666', and 'IT89KD-288') showed the highest values of Cl<sup>-</sup> absorption. Similar results were found by West and Francois (1982) who showed that Cl<sup>-</sup> was the ion that significantly affected salinity. In this sense, high Cl<sup>-</sup> concentrations in shoots of some species are associated with chlorosis and death, and these injuries occur even when Na<sup>+</sup> in the shoots is low, *e.g.* in avocado (Bingham et al. 1968), grapevines (Bernstein et al. 1969), in fruit trees and many other woody plants (Bernstein, 1975).

#### **Sodium and chloride concentration and survival**

According to Greenway and Munns (1980) there is evidence that in several species the salt sensitivity of certain varieties is due to the absorption of relatively high amounts of Cl<sup>-</sup> and/or Na<sup>+</sup>, *i.e.* these varieties suffer from ion excess in their expanded leaves. Our results showed a high variation in both individual and varietal in Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> transport in both saline levels 85 and 170 mmol NaCl/L (Fig. 2). Similar results were found in rice by Flowers and Yeo (1981, 1986), in rice, soybean, field bean, adzuki bean, pumpkin and cucumber (López *et al.* 1999), lettuce (Shannon *et al.* 1983), mungbean (Salim and Pitman, 1988), dicotyledonous halophytes (Glenn and O'Leary, 1984), turfgrasses (Marcum and Murdoch, 1990), sugar beet (Marschner *et al.* 1981), in the halophyte *Salvadora persica* (Maggio *et al.* 2000), cucumber (Jones et al. 1989), pepper (Chartzoulakis and Klapaki, 2000), and maize (Schubert and Läubli, 1990). On the other hand, ion effects have been considered to be related to salt tolerance (Abel and Mackenzie, 1964; Ashraf et al. 1989). For the relationship between salt tolerance and ion effects, it was suggested that plant species differ in the degree of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> toxicity affecting their growth. In this study, significant differences among the four groups of genotypes were found in the mineral distribution in both organs roots and shoots (Fig. 3 a & b). Moderately salt-sensitive and salt-sensitive genotypes decreased level of Na<sup>+</sup> in roots but increased Na<sup>+</sup> in the shoots, whereas salt-tolerant and moderately salt-tolerant genotypes displayed a different behaviour with a higher Na<sup>+</sup> content in roots but a lower Na<sup>+</sup> content in



this tissue (Fig. 3 a). In this sense, salt-tolerant and moderately salt-tolerant genotypes sequestered  $\text{Na}^+$  ions mainly in the roots to protect the aerial part (shoots and leaves). Such a result agrees with those of Jacoby (1964), Lessani and Marschner (1978), Fernandes de Melo *et al* (1994). Consequently, *V. unguiculata*, similar to other beans (Seeman and Critchley, 1985) could be an effective excluder of  $\text{Na}^+$  (West and Francois, 1982; Fernandes de Melo *et al.* 1994). The results showed that moderately salt-sensitive and salt-sensitive genotypes increased  $\text{Na}^+$  content in shoots, so these genotypes could be considered as includer of  $\text{Na}^+$ . Although in the present study  $\text{Na}^+$  content was higher than  $\text{Cl}^-$  in both roots and shoots (Fig. 3 a & b), the salt-tolerant and moderately salt-tolerant genotypes seemed to prevent the transport of  $\text{Na}^+$  to the aerial part in order to avoid the deleterious effects of salt on plant metabolism (Marschner, 1986; Fernandes de Melo *et al.* 1994). On the other hand, although both  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  increased linearly as salinity increased (Fig. 4), all groups of genotypes showed a higher  $\text{Cl}^-$  content in shoots than roots (Fig. 3 b) showing that cowpea is unable to exclude  $\text{Cl}^-$  ions from the shoots. The increased concentration of both  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  in roots and shoots in all groups of genotypes as salinity increased (Fig. 4 a,b,c & d) may be related to the reduced rates of photosynthesis because in our study, there was partial closure of stomata as salinity increased (data not shown). On the other hand, the maintenance of a higher dry matter production in both 85 and 170 mmol NaCl/L of salt-tolerant and moderately salt-tolerant genotypes seemed to be a good indicator of the salt tolerance of this genotypes.

The present study confirms that in the genetic variability among cowpea genotypes, it is possible to find salt-tolerant and salt-sensitive genotypes, based on the plant survival, ions content and dry matter production. In addition, there are wide differences in responses to salinity among the cowpea genotypes under study and previous growth stages, particularly between the genotypes from different origin (International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria, from University of California, Riverside, USA, and from Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, México). However, our results provide guidelines for the selection of salt-tolerant cowpea genotypes and this information is relevant and very important to breeders and plant physiologists interested in improving salt-tolerance of cowpea and to the farmers that grow cowpea in the areas where the soil and groundwater has high content of NaCl, such as in the northwest region of Mexico. A refinement of current screening tool could be desirable to facilitate germplasm evaluation.

### 4.3.3. En la alteración de procesos fisiológicos y concentración de iones

#### Artículo sometido (en revisión):

**Murillo-Amador B**, Troyo-Diéguez E, López-Aguilar R, López-Cortés A, Tinoco-Ojanguren CL, Jones HG, Kaya C. 2001. Matching physiological traits and ions concentration in cowpea genotypes associated to salt stress. Sometido a: *Australian Journal of Agricultural Research*.

#### Abstract

Soil salinity affects several areas of the world; in northwest Mexico, near 50% of agricultural areas have some problems related to salinity, but almost 25% of them are considered as highly saline. Cowpea is a promising salt tolerant crop, with a potential to be used in saline soils. In this study, we compared the physiological performance of 25 cowpea genotypes (*Vigna unguiculata* L. Walp.), studying P accumulation, ion concentration ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , and  $\text{K}^+$ ), chlorophyll content, stomatal conductance, and transpiration, under NaCl salt treatments. Results indicate significant differences among genotypes, for most variables. In relation to the absorption and allocation of ions and nutrients, Na concentration was higher in roots than in shoots in salt-tolerant and moderately salt-tolerant genotypes, while in moderate salt-sensitive and salt-sensitive genotypes, was higher in shoots than in roots. Similarly, the tendency shown by the other ions was variable. In several cases  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  and P concentrations were reduced by an increase in salinity, but none of the genotypes appeared to suffer any nutrient deficiency. We confirm that in the genetic variability among cowpea genotypes, it is possible to find salt-tolerant genotypes using physiological traits for comparison. We observed wide differences in responses to salinity in 25 cowpea genotypes, particularly between genotypes from different origin, including Ibadan (Nigeria), Riverside CA (USA), and La Paz (Mexico), but 8 of them showed to be tolerant to NaCl salinity ('Paceño', 'Tardón', 'Sonorense', 'Cuarenteño', 'CB46', 'CB27', 'CB3', and 'IT82D-889' cultivars).

#### Introduction

Salinity is considered a major factor in limiting plant development and crop productivity; this problem has risen as salinization of irrigated and surrounding areas has

increased, particularly in arid and semiarid regions (Rus *et al.* 2000). Thus, biochemical studies on the mechanism of salt tolerance and applied research such as adaptation of crop species to saline soils have become more important (Epstein and Norlyn, 1977). Differences in salt tolerance exist not only among species but also among genotypes of a certain species. Genotypic differences in salt tolerance can be the result of quite different regulation mechanisms in mineral nutrition. Higher salt tolerance in barley, soybean, and grape vine has been correlated with restricted chloride translocation into the shoot (Greenway, 1965; Abel, 1964; Läuchli and Wieneke, 1979; Kuiper 1968; Downton, 1977).

Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] is an important grain legume crop; several cultivated forms of the same are grown in tropical and sub-tropical agricultural areas of the world, where soil salinity is a wide-spread yield-limiting factor. Cowpea is also cultivated in poor soils that occur naturally or produced by an intensive use. It is also used for different purposes, e.g. as a fodder crop for livestock, as a green vegetable, for dry beans (West and Francois, 1982), and also it is cultivated as a dryland crop under different climatic conditions ranging from semiarid to subhumid (Lush and Rawson, 1979). Cowpea is reported to have a good tolerance to heat and drought (Rachie and Roberts, 1974; Vasquez -Tello *et al.* 1990), and it has a high yield potential under irrigation (Turk *et al.* 1980). The effect of salinity on the germination, vegetative growth, or yield of cowpea has been studied (West and Francois, 1982, Imamul Huq and Larher, 1983, Maas and Poss, 1989, Kannan and Ramani, 1988, Plaut *et al.* 1990, Larcher *et al.* 1990, Fernandez de Melo *et al.* 1994, Murillo-Amador *et al.* 2000, 2001). However there are few data and studies on its response to salinity during vegetative growth and how it varies among accessions. Our objective was to compare the differences of 25 cowpea genotypes in the ions concentration, chlorophyll content, transpiration and stomatal conductance at high NaCl concentrations under greenhouse conditions, during the vegetative growth stage.

## **Materials and Methods**

### **Plant material, treatments and growth conditions**

The experiment was conducted under greenhouse conditions at the Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR), 17 km NW La Paz (Mexico) at 24°08'N and 110°24'W, located in a semiarid zone of Baja California Sur. Because seed vigor is affected by the seed storage conditions and germinating environment, a field screening was

done previously. For such screening, 38 genotypes were grown at the same time and under the same environmental conditions, in order to get enough seeds with the same vigor and from the same lot, for this and subsequent experiments. Only 25 genotypes of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) were selected with the same or similar maturity length and color (Table 1).

Table 1. Genotype classification and country of origin. Previous classification was done by Murillo-Amador *et al* (unpublished data).

| Genotypes     | Group               | Origin  |
|---------------|---------------------|---|
| Paceño        | Salt-tolerant       | traditional variety, La Paz, B.C.S. México        |
| Tardón        | Salt-tolerant       | traditional variety, San Isidro, B.C.S. México    |
| Sonorense     | Salt-tolerant       | traditional variety, Hermosillo, Sonora, México   |
| Cuarenteño    | Salt-tolerant       | traditional variety, Todos Santos, B.C.S. México  |
| CB46          | Salt-tolerant       | California cultivar, Univ. Calif., Riverside, USA |
| CB27          | Salt-tolerant       | California cultivar, Univ. Calif., Riverside, USA |
| CB3           | Salt-tolerant       | California cultivar, Univ. Calif., Riverside, USA |
| IT82D-889     | Salt-tolerant       | Nigerian breeding line, IITA, Ibadan, Nigeria     |
| CB5           | Mod. Salt-Tolerant  | California cultivar, Univ. Calif., Riverside, USA |
| PEPH-V Wes-85 | Mod. Salt-Tolerant  | Texas cultivar, Univ. Texas A. & M., USA          |
| IT86D-719     | Mod. Salt-Tolerant  | Nigerian breeding line, IITA, Ibadan, Nigeria     |
| IT95K-1090-12 | Mod. Salt-Tolerant  | Nigerian breeding line, IITA, Ibadan, Nigeria     |
| Sesenteño     | Mod. Salt-Tolerant  | traditional variety, Todos Santos, B.C.S., México |
| IT96D-733     | Mod. Salt-sensitive | Nigerian breeding line, IITA, Ibadan, Nigeria     |
| CB88          | Mod. Salt-sensitive | California cultivar, Univ. Calif., Riverside, USA |
| IT89KD-391    | Mod. Salt-sensitive | Nigerian breeding line, IITA, Ibadan, Nigeria     |
| IT90K-277-2   | Mod. Salt-sensitive | Nigerian breeding line, IITA, Ibadan, Nigeria     |
| IT91K-93-10   | Mod. Salt-sensitive | Nigerian breeding line, IITA, Ibadan, Nigeria     |
| IT94K-437-1   | Mod. Salt-sensitive | Nigerian breeding line, IITA, Ibadan, Nigeria     |
| IT95K-1088-4  | Mod. Salt-sensitive | Nigerian breeding line, IITA, Ibadan, Nigeria     |
| IT91K-118-20  | Mod. Salt-sensitive | Nigerian breeding line, IITA, Ibadan, Nigeria     |
| IT90K-284-2   | Mod. Salt-sensitive | Nigerian breeding line, IITA, Ibadan, Nigeria     |
| IT93K-734     | Salt-sensitive      | Nigerian breeding line, IITA, Ibadan, Nigeria     |
| IT96D-666     | Salt-sensitive      | Nigerian breeding line, IITA, Ibadan, Nigeria     |
| IT89KD-288    | Salt-sensitive      | Nigerian breeding line, IITA, Ibadan, Nigeria     |

For seedlings emergence, seeds were previously disinfected by immersion in calcium hypochlorite solution containing 5% active chloride during 5 min, then they were washed three times with sterilized distilled water. Disinfected seeds were placed in sterilized peat pellets -Jiffy- No. 7 [Jiffypots, Jiffy Products (N.B.) LTD, Shippegan, Canada], inside sterilized Petri dishes (150 x 15 mm) and were watered with distilled water during seven days. During the period of germination and seedling emergence they were placed in a growth

chamber (Percival, Model MB-60B, Controlled Environment, Percival Manufacturing Company, USA) at  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , 12 h of daylength, and 80% of RH to prevent high evaporation of the saline medium. Seeds were considered to be emerged when the seedling appeared through the jiffypot surface. Three days after emergence, seedlings were moved to a greenhouse and transferred to a plastic pots (13 cm top diameter, 8 cm bottom diameter by 10 cm deep, with one hole in the bottom) filled with peat-moss (Sunshine, Sun Gro Horticulture Canada, Ltd.). We maintained soil water potential values at -0.1, -0.5 and -0.8 Mpa using saline solutions with 0, 85 and 170 mmol NaCl L<sup>-1</sup>, respectively. The water potential was measured psychrometrically using a Wescor Model HR-33T microvoltmeter (Wescor Inc., Logan Utah). Eight pots were used for each genotype and each saline treatment (0, 85 and 170 mmol NaCl L<sup>-1</sup>), with one plant per pot. After transferred to a naturally illuminated greenhouse and once the primarily leaves were developed, the salt treatments were applied. Average temperature inside greenhouse was 16/33°C (night/day); during the day average relative humidity was 29% and 59% at night. Plants were grown in a 12-h photoperiod of  $279 \pm 23 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  photosynthetically active radiation. Pots were watered to saturation and percolated with a nutrient solution (220 N, 40 P, 200 K<sup>+</sup>, 140 Ca<sup>2+</sup>, 42 Mg<sup>2+</sup>, 4 Fe<sup>2+</sup>, 1.25 Mn<sup>4+</sup>, 0.18 B, 0.23 Zn<sup>2+</sup> and 0.25 Cu<sup>2+</sup> ppm). All plants were watered daily with an excess application of appropriate saline solutions to flush the pots, allowing to drain the excess of solution to maintain the level of salinity.

#### **Experimental design and statistical analysis**

A factorial experimental design with 25 genotypes and three salinity levels were arranged in a completely randomized design with four replicates of two plants (600 plants in total, 200 plants per treatment). Data were analyzed through ANOVA tests, using the ANOVA and GLM procedures in SAS (SAS Institute, 1988). Least significant differences among means of genotypes were compared by Duncan's Multiple Range Test at  $P=0.05$ . A correlation and regression analyses were also performed.

#### **Tissue analysis**

Plants were separated into roots and shoots and then dry weight was determined after drying at 80°C for 48-h. Dry plant material was finely ground in a blender (Braun 4-041 Model KSM-2). Cl<sup>-</sup> content was determined by anion chromatography (Shimadzu HIC-6A). H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:HNO<sub>3</sub>:HClO<sub>4</sub> (1:10:4, respectively) was used for digestion to determine P by

molybdovanadate-yellow colorimetry.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{K}^+$  were determined by atomic absorption spectrophotometry.

### **Physiological variables**

Chlorophyll content (SPAD-readings) was measured periodically every week during five weeks on fully expanded leaves using a non-destructive method with a handheld chlorophyll meter (SPAD 502, Minolta Camera Co., Ltd., Japan). Relative chlorophyll content ( $\text{mg g}^{-1}$ ) of leaves was estimated using a model of linear regression (Gratani, 1992):  $y=0.031 x -0.188$  where  $y$ =estimated chlorophyll content and  $x$ = numerical SPAD value, which is proportional to the quantity of chlorophyll present in the leaf. Transpiration ' $E$ ' ( $\mu\text{g cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), stomatal conductance ' $g_s$ ' ( $\text{cm s}^{-1}$ ), relative humidity (%), leaf temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ), and photosynthetically active radiation (PAR,  $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ) were determined with a portable porometer (Steady State Porometer, Model Li-1600, Li-COR Inc.). Measurements were made every week between 10:00 a.m. to 12:00 p.m. on fully expanded mature leaves.

## **Results**

### **Tissue analysis**

There were differences among genotypes with different salt sensitivity in the total amount of Na in plants and its concentration in roots and shoots and Na concentration was higher in roots than shoots in salt-tolerant and moderately salt-tolerant genotypes, while in moderately salt-sensitive and salt-sensitive genotypes, was higher in shoots than roots (Fig. 1a). In the same way, Cl concentration was higher in shoots than roots in all grouped genotypes, being higher in moderately and salt-sensitive genotypes (Fig. 1b). For all genotypes Na and Cl concentrations increased in both roots and shoots as the salinity treatments increased (Fig. 2); Cl concentration in both shoots and roots was higher in moderately and salt-sensitive genotypes.

In general,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^+$ , and P concentration was higher in shoots, in comparison to roots in all grouped genotypes (Fig. 1c,d,e,f). Although in some cases  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  and P concentrations were reduced by increased salinity, none of the studied genotypes appeared to suffer any nutrient deficiencies. Considering all genotypes,  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in shoots and roots decreased as salinity increased (shoots:  $r= -0.62$ ,  $P= 0.0001$ ; roots:  $r= -0.31$ ,  $P= 0.0001$ ,  $n=225$ ). However, individual grouped genotypes showed that  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in shoots decreased linearly in moderately salt-tolerant and moderately salt-sensitive genotypes as

salinity increased, while in salt-tolerant and salt-sensitive genotypes decreased or increased quadratically as salinity increased (Fig. 3a).  $Mg^{2+}$  concentration in shoots and roots was similar between grouped genotypes, but this ion decreased at 85 mmol NaCl L<sup>-1</sup> in all grouped genotypes except in salt-sensitive genotypes. For the last group of genotypes,  $Mg^{2+}$  increased linearly as salinity increased, while the rest of grouped genotypes increased  $Mg^{2+}$  concentration at 170 mmol NaCl L<sup>-1</sup> (Fig. 3b).  $K^+$  concentration in shoots and roots (data for roots not shown) decreased linearly as salinity increased in all grouped genotypes (Fig. 3c). P concentration in shoots and roots (data for roots not shown), increased in both organs linearly in all grouped genotypes, except in salt-sensitive genotypes, where it increased from 0 to 85 mmol NaCl L<sup>-1</sup> but decreased at 170 mmol NaCl L<sup>-1</sup> (Fig. 4d). Salt-sensitive genotypes showed similar P concentration in roots and shoots (Fig. 1f).

#### **Stomatal conductance and transpiration rate**

Stomatal conductance ( $g_s$ ) and transpiration ( $E$ ) were inhibited in all genotypes by salinity. The higher values of  $g_s$  and  $E$  were shown in moderately salt-sensitive and salt-sensitive genotypes at 0 mmol NaCl/L, but in 85 mmol NaCl/L stomatal conductance and transpiration were stimulated by salinity in salt-tolerant and moderately salt-tolerant genotypes. On the other hand, both  $g_s$  and  $E$  in all genotypes decreased as salinity treatments increased at 170 mmol NaCl/L (Fig. 4 a,b). The observed results found in  $E$  under saline conditions were expected because of a decrease in  $g_s$ , due to the highly significant correlation between these variables (Fig. 4d).

#### **Relative chlorophyll content**

Relative Chl content was affected in all genotypes by salinity treatments. Average Chl content was higher in moderately salt-tolerant and salt-sensitive genotypes than salt-tolerant and moderately salt-sensitive genotypes. Chl in salt-tolerant genotypes was similar at 0 and 85 mmol NaCl L<sup>-1</sup> but increased at 170 mmol NaCl L<sup>-1</sup>; it increased in moderately salt-tolerant genotypes at 85 but decreased at 170 mmol NaCl L<sup>-1</sup>. On the other hand, it decreased in moderately salt-sensitive to about the control value at 85 but increased at 170 mmol NaCl L<sup>-1</sup>, and the salt-sensitive genotypes decreased as salinity treatments increased (Fig. 4c).

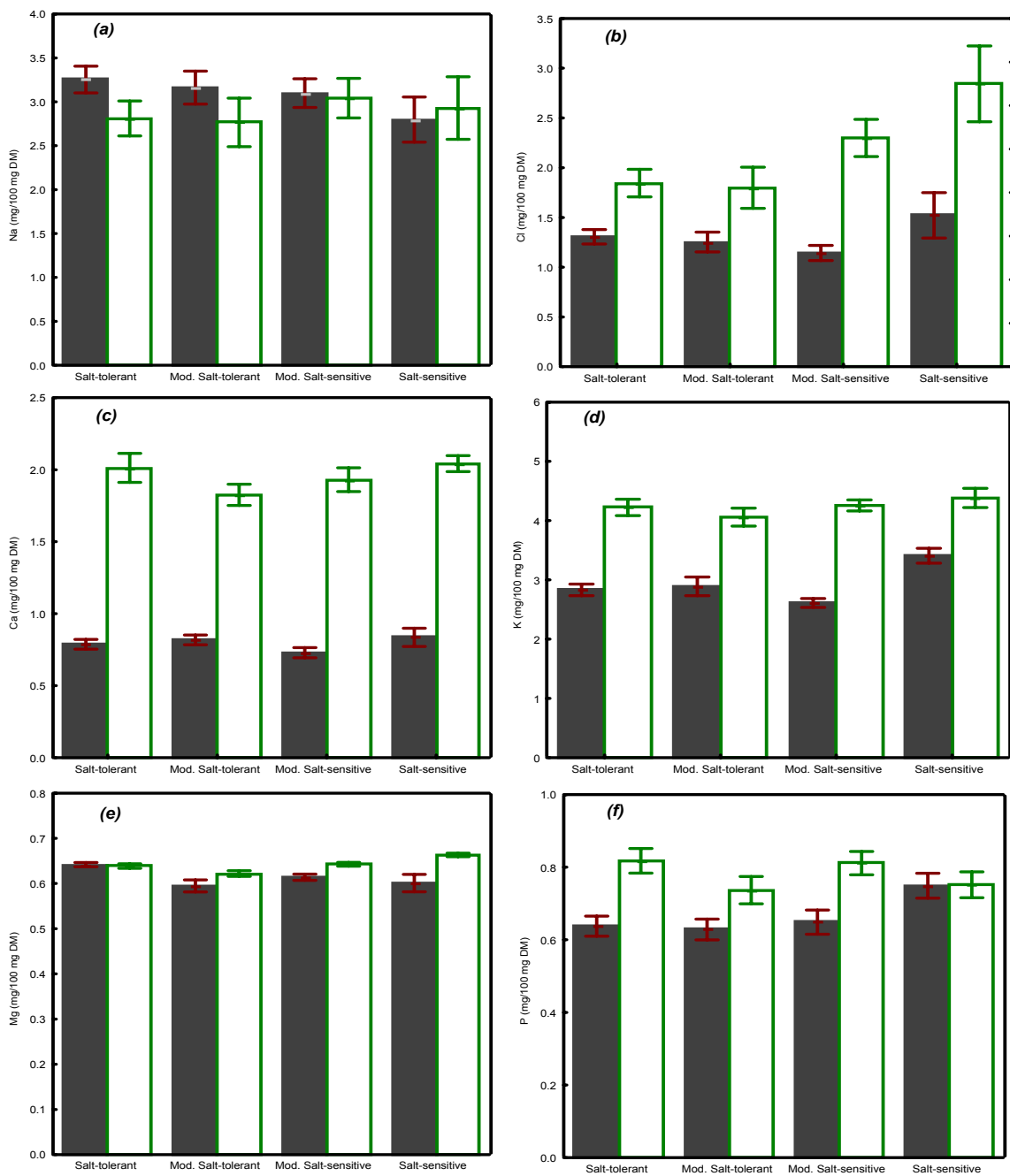


Figure 1. Effect of NaCl salinity on (a) Na<sup>+</sup>, (b) Cl<sup>-</sup> (c) Ca<sup>2+</sup>, (d) K<sup>+</sup>, (e) Mg<sup>2+</sup> and (f) P concentration of different plant tissues: roots (■) and shoots (□) of cowpea genotypes differing in salt tolerance. Bars represent mean ± S.E.



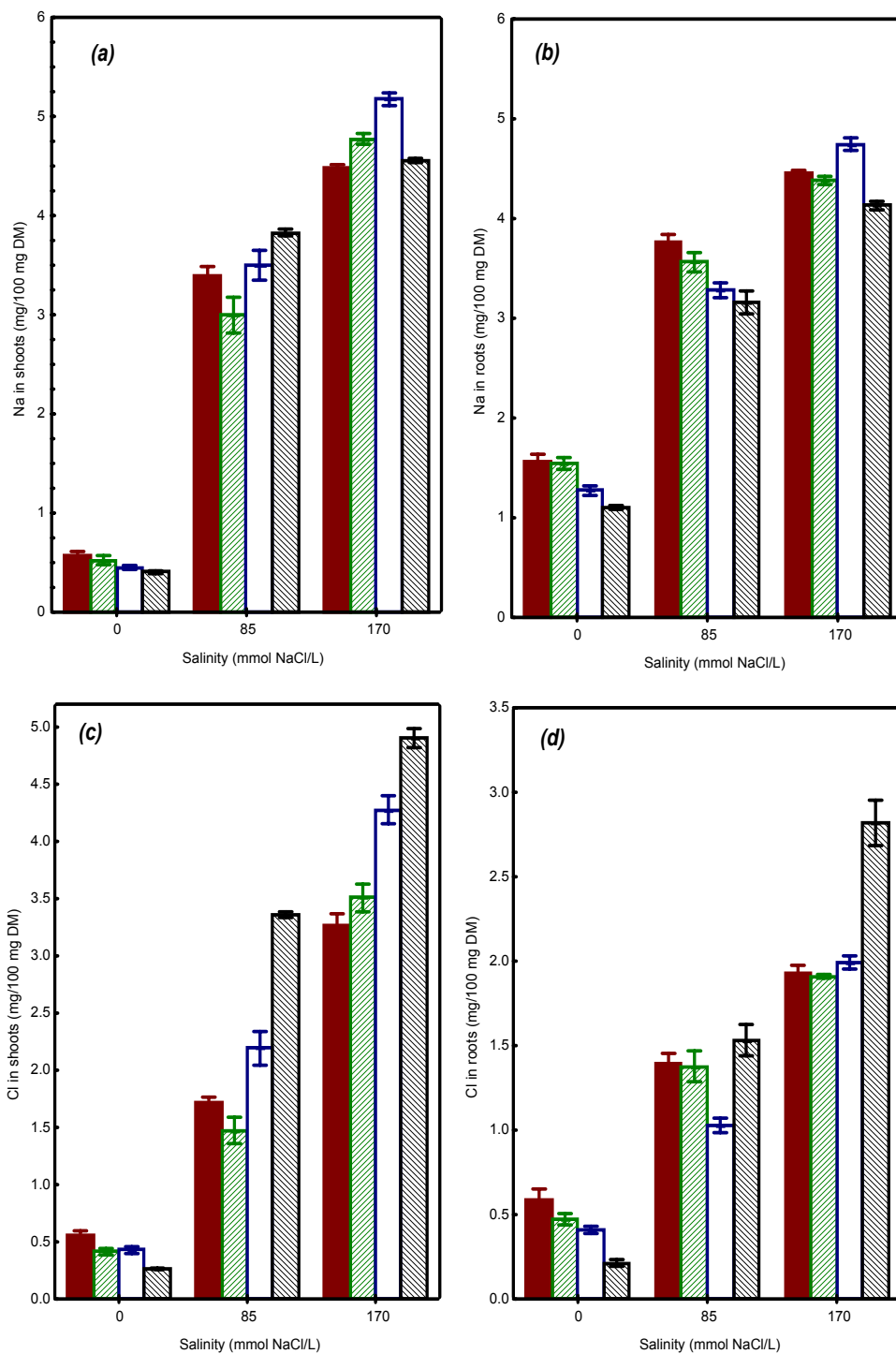


Figure 2. Effect of NaCl salinity (0, 85 and 170 mmol/L) on Na<sup>+</sup> concentration in shoots (a), (b) roots and Cl concentration in shoots (c) and roots (d) of salt-tolerant (■), moderately salt-tolerant (▨), moderately salt-sensitive (□) and salt-sensitive (□) cowpea genotypes. Bars represent mean ± S.E.

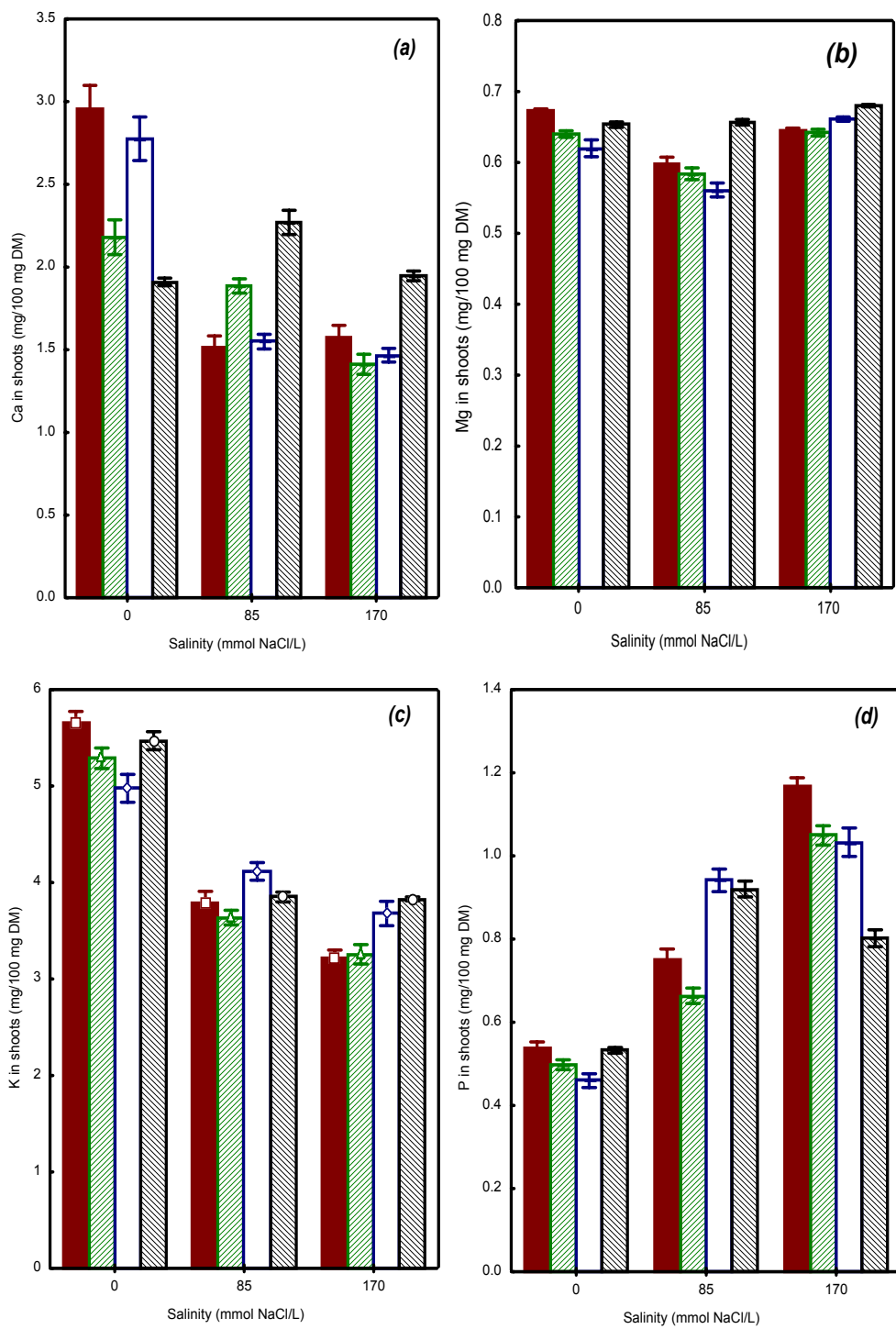


Figure 3. Effect of NaCl salinity (0, 85 and 170 mmol/L) on (a)  $\text{Ca}^{2+}$ , (b)  $\text{Mg}^{2+}$ , (c)  $\text{K}^+$  and (d) P concentration in shoots of salt-tolerant (■), moderately salt-tolerant (□), moderately salt-sensitive (▨) and salt-sensitive (▩) cowpea genotypes. Bars represent mean  $\pm$  S.E.

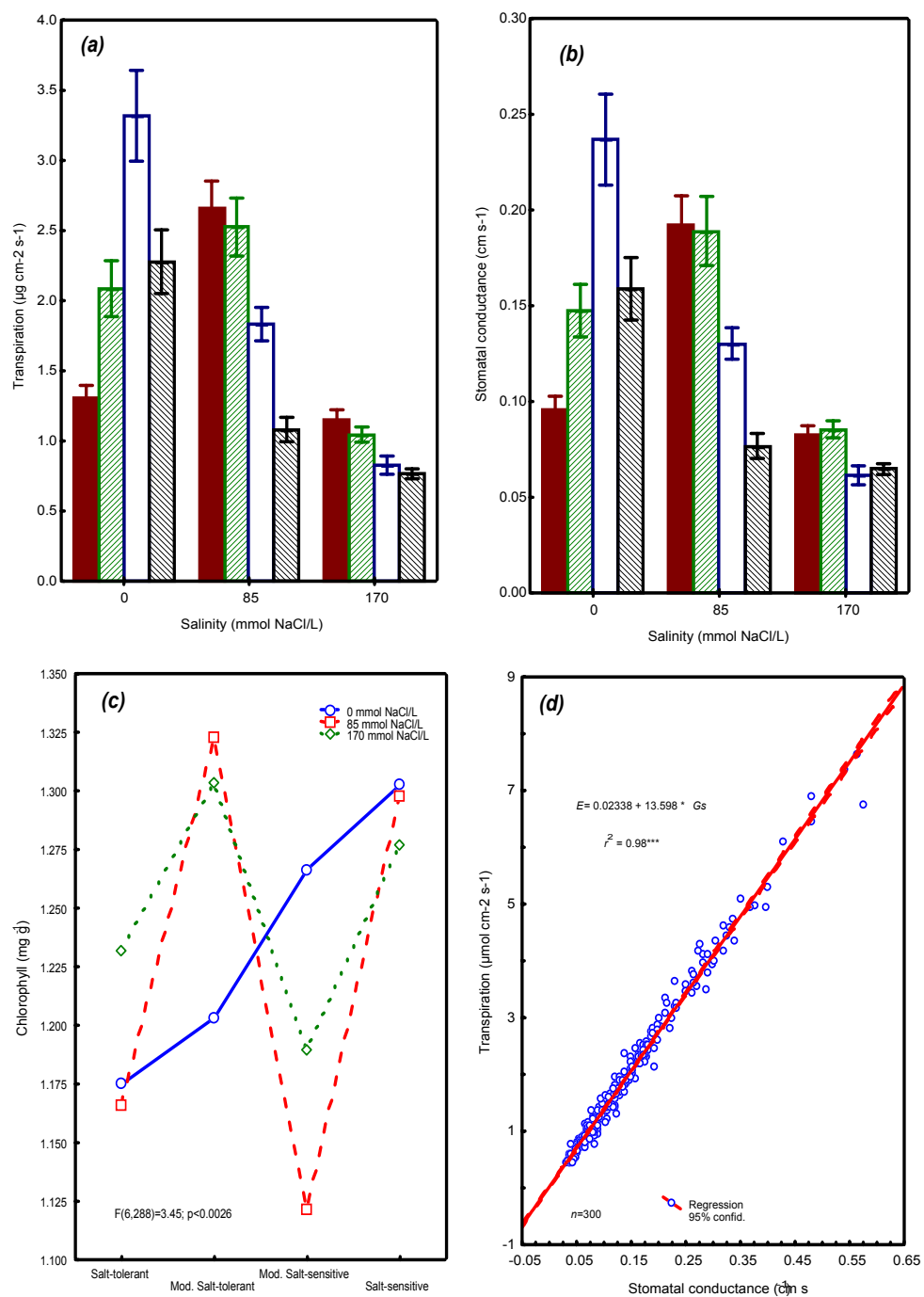


Figure 4. Effect of NaCl salinity (0, 85 and 170 mmol/L) on (a) transpiration, (b) stomatal conductance (c) chlorophyll of salt-tolerant (■), moderately salt-tolerant (□), moderately salt-sensitive (□) and salt-sensitive (□) cowpea genotypes and (d) relationship between transpiration and stomatal conductance. Bars represent mean  $\pm$  S.E.

## Discussion

### Tissue analysis

Salt tolerance in glycophytes is associated with the ability to limit uptake and/or transport saline ions (mainly  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$ ) from the root to aerial parts (Greenway and Munns, 1980). Our results showed a high variation in both individual and grouped genotypes in Na and  $\text{Cl}^-$  concentration, in both saline levels 85 and 170  $\text{mmol NaCl L}^{-1}$  (Fig. 2). Similar results were found in rice by Flowers and Yeo (1981, 1986), soybean, field bean, adzuki bean, pumpkin and cucumber (López *et al.* 1999), lettuce (Shannon *et al.* 1983), mungbean (Salim and Pitman, 1988), dicotyledonous halophytes (Glenn and O'Leary, 1984), turfgrasses (Marcum and Murdoch, 1990), sugar beet (Marschner *et al.* 1981), in the halophyte *Salvadora persica* (Maggio *et al.* 2000), cucumber (Jones *et al.* 1989), pepper (Chartzoulakis and Klapaki, 2000), and maize (Schubert and Läuchli, 1990). Plant species differ in the degree to which high  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  concentrations affect their growth. This characteristic has been considered to be related to salt tolerance (Abel and Mackenzie, 1964; Ashraf *et al.* 1989). In this study, significant differences among the four groups of genotypes were found in the mineral distribution in both organs roots and shoots (Fig. 1). Moderately salt-sensitive and salt-sensitive genotypes decreased level of  $\text{Na}^+$  in roots but increased  $\text{Na}^+$  in shoots, whereas salt-tolerant and moderately salt-tolerant genotypes displayed a higher  $\text{Na}^+$  content in roots but a lower  $\text{Na}^+$  content in shoots. Thus, salt-tolerant and moderately salt-tolerant genotypes sequestered  $\text{Na}^+$  ions mainly in the roots to protect the aerial part. Similar results have been found in other studies (Jacoby, 1964, Lessani and Marschner, 1978, Fernandes de Melo *et al.* 1994). Therefore, salt-tolerant genotypes of *V. unguiculata*, similar to other beans, could be considered as an effective excluders of  $\text{Na}^+$  (Seeman and Critchley, 1985, West and Francois, 1982, Fernandes de Melo *et al.* 1994). This study showed that moderately salt-sensitive and salt-sensitive genotypes increased  $\text{Na}^+$  content in shoots, so these genotypes could be considered as includers of  $\text{Na}^+$ . Although in the present study,  $\text{Na}^+$  content was higher than  $\text{Cl}^-$  in both roots and shoots (Fig. 1 *a,b*), the salt-tolerant and moderately salt-tolerant genotypes seemed to prevent the transport of  $\text{Na}^+$  to the aerial part in order to avoid the deleterious effects of salt on plant metabolism (Marschner, 1986; Fernandes de Melo *et al.* 1994). Although both,  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  increased linearly as salinity increased, all groups of genotypes showed a higher  $\text{Cl}^-$  content in shoots than roots (Fig. 2) showing that cowpea is unable to

exclude  $\text{Cl}^-$  ions from the shoots. However, moderately and salt-sensitive genotypes showed the highest  $\text{Cl}^-$  concentration in shoots and roots. The increased concentration of both  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  in roots and shoots in all grouped genotypes as salinity increased (Fig. 2) may be related to the reduced rates of photosynthesis because in this study, there was partial closure of stomata as salinity NaCl increased ( $r = -0.39$ ,  $P = 0.0001$ ,  $n = 300$ ), which is associated with a large reduction in stomatal conductance at increased salinity levels (Chartzoulakis and Klapaki, 2000). In the same way,  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  concentration can be associated to a reduction in the growth of plants in saline conditions (Meneguzzo *et al.* 2000).

The results of the present study showed that  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in shoots decreased linearly in moderately salt-tolerant and moderately salt-sensitive genotypes as salinity increased, while in salt-tolerant and salt-sensitive genotypes decreased or increased quadratically as salinity increased (Fig. 3a). Similar differences in  $\text{Ca}^{2+}$  between cultivars have been described in cowpea (Horts *et al.* 1992) in tomato (Behling *et al.* 1989) and in cauliflower (Hochmuth, 1984). On the other hand, West and Francois (1982) found that  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in leaves of cowpea increased with an increase in salinity, while the opposite was found by Kurban *et al.* (1998). Even under non-saline conditions, significant economic losses of horticultural crops have been linked to inadequate calcium nutrition (Grattan and Grieve, 1999).

Salt tolerance has been associated with high shoot  $\text{K}^+$  concentrations in relation to  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  in some species (Storey and Wyn Jones, 1979; Shannon, 1978). In this sense, our results showed that all genotypes maintained higher  $\text{K}^+$  in shoots than roots, and concentration was higher than  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ , P and  $\text{Cl}^-$  (Fig. 1d). On the other hand, the reduction of  $\text{K}^+$  concentration in both, roots and shoots as salinity increased, may have resulted from substitution of  $\text{Na}^+$  for  $\text{K}^+$ , or increased  $\text{K}^+$  efflux out of the roots to the surrounding medium (Lynch and Lauchli, 1984; Cramer *et al.* 1985). Our results agree with Greenway and Munns (1980) who reported that  $\text{K}^+$  content in many glycophytes is severely reduced, likewise West and Francois (1982), Kurban *et al.* (1998), and Abdel-Rahman and Abdel-Hadi (1984) who reported that  $\text{K}^+$  in cowpea decreased with increasing salinity. In the same way, in several studies related to a wide variety of horticultural crops, Francois (1984), Subbarao *et al.* (1990) Izzo *et al.* (1991), Graifenberg *et al.* (1995), and Pérez-Alfocea *et al.* (1996) showed that  $\text{K}^+$

concentration in plant tissue, expressed on a dry mass basis, declines as the NaCl salinity in the root media is increased.

Increases in salinity are not always associated with decreases in leaf  $Mg^{2+}$  (Grattan and Grieve, 1999); in this sense, our results showed that  $Mg^{2+}$  concentration increased at the highest level of NaCl salinity; this tendency could be due to the plant mechanisms to compensate the ionic unbalance caused by the excess of salts on the substrate and to unchain a non-balance ionic absorption. Similar results were found by Kurban *et al.* (1998) in *Vigna radiata* and *Alhagi pseudoalhagi*. Contrary to our results, some studies in halophytes and nonhalophytes show that  $Mg^{2+}$  concentration decreased as salinity increased (West and Francois, 1982; Francois *et al.* 1990; Khan *et al.* 2000; Maggio *et al.* 2000; Meneguzzo *et al.* 2000). On the other hand, Bernstein *et al.* (1974) found that increases in salinity only reduced leaf  $Mg^{2+}$  concentration in beet and had little or no effect in leaves from five other vegetable crops under study. In the same way, Saranga *et al.* (1993) did not detect a consistent correlation between this ion with salt tolerance because  $Mg^{2+}$  concentration in the leaves and the stems of tomato genotypes were not significantly affected by salinity in any of the trials.

The interaction between salinity and phosphorus (P) nutrition of plants is as complex as that between salinity and N,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ . The results of the present study showed that P in shoots and roots (data for roots not shown) increased by increasing salinity (Fig. 3d) except for salt-sensitive genotypes. In contrast, West and Francois (1982), and Kurban *et al.* (1998) found that P concentration in cowpea under saline conditions decreased as salinity increased. Our results agree with most studies which demonstrated that salinity increases P concentration in tissues, but those studies were conducted in sand or solution culture, not in soils (Grattan and Grieve, 1994), because P concentration in solution cultures are oftenly based on orders of magnitude higher than that in soil solutions (e.g. 2 mM vs. 2  $\mu$ M). Some studies conducted in solution cultures have shown that P concentrations that are optimal in non-saline solutions may adversely affect growth or even they could be toxic to corn (Bernstein *et al.* 1974; Nieman and Clark, 1976), as well as other agronomic crops under saline conditions. The results found in the present study could be associated with this characteristic because we use an inert substrate (peat-moss), not soil. In these cases, salinity may cause some unknown mechanism in the plant to lose control of phosphate uptake (Roberts *et al.* 1984) and its transport to the shoot. The increased P accumulation in the shoot is presumably controlled at

the root level and it is independent of the salt composition (Grattan and Mass, 1985). However, further studies on the salinity relation with phosphorus supply should be conducted to investigate the role of phosphorus in the salt tolerance of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.).

### **Transpiration and stomatal conductance**

In the present study, the reduction of ' $E$ ' under saline conditions was due to the close stomata as a response to the high significant correlation between ' $E$ ' and ' $g_s$ '. Similar results were found by Sing *et al.* (1989), Ayala and O'Leary (1994), Zecri *et al.* (1990), Elhaak *et al.* (1997), Sánchez *et al.* (1982), and Plaut *et al.* (1990). A linear or quadratic reduction of ' $E$ ' and ' $g_s$ ' was observed for most cowpea genotypes due to increases in salinity. These tendencies show that some genotypes are able to reduce leaf  $g_s$  to conserve water as salinity stress increased. Our data are consistent and agree with Sharma (1977), Werner (1990), Gordon (1993), and Aziz and Khan (1998); likewise, genotypes evidenced a low stomatal conductance under drought stress. This low stomatal conductance decreased the rate of CO<sub>2</sub> accumulation and the uptake of it (Ball and Farquhar, 1984). Reduction in stomatal conductance due to NaCl has been associated with accumulation of Na<sup>+</sup> in the leaves (Walker *et al.* 1986). It is possible that high amounts of Na<sup>+</sup> replaced K<sup>+</sup> in the vacuoles and guard cells and caused stomata to close (Behboudian *et al.* 1986). Results of the present study showed that reduction in stomatal conductance was associated negatively with accumulation of Na<sup>+</sup> in the leaves ( $r=-0.22$ ,  $P=0.001$ ,  $n=225$ ). It was expected that stomatal conductance could be associated with root length (Zekri, 1987), but our data showed that stomatal conductance and root length were not associated ( $r = -0.078$ ,  $P = 0.17$ ,  $n = 300$ ). The present study demonstrates that different responses of transpiration rate and stomatal conductance to salinity can be found in the same species at different salinity levels.

### **Chlorophyll content**

Linear or quadratic reduction of the grouped genotypes showed that cowpea could have similar Chl content than some halophytic species such as *Salicornia brachiata*, where chlorophyll content increased as salinity increased, while the chlorophyll type  $a:b$  ratio decreased (Reddy *et al.* 1992). Ch content of *Chlorella* grown in saline media increased with salinity; the increase was more evident in Chl  $b$  than Chl  $a$ . The increase in synthesis of Chl  $b$  under salinity is postulated to be a cellular adaptation in order to meet the increasing demand

of energy for NaCl toxicity (Allen, 1959). According to the results of the present study, we could consider that some genotypes of cowpea with higher values of Chl content at higher salinity showed a facultative halophytic behaviour at the early vegetative growth stage. Similar results have been found in tobacco cells adapted to grow under salinity (Motsan *et al.* 1988), in alfalfa (Winicov and Seeman, 1991) and cabbage (Paek *et al.* 1988). However, further studies of Chl *a* and *b* determination under salinity conditions by laboratory methods are required. Comparisons among genotypes showed that 'IT86D-719' and 'IT95K-1088-4' had the highest Chl content in the early vegetative growth stage. The first mentioned genotype was classified as moderately salt-tolerant, these results agree with Joshi (1976), Tiku (1976), and Reddy *et al.* (1992). They mentioned that in salt tolerant species, chlorophyll content is increased by salinity. The second genotype mentioned above was classified as moderately salt-sensitive and therefore agree with Joshi (1976). The differences observed for the synthesis of chlorophyll in different plant species and genotypes under saline conditions may be due to the existence of different pathways for chlorophyll synthesis monitored by different enzymes, which may have varied their response to salinity. The genotypes 'IT91K-93-10' and 'IT90K-284-2' had the lowest Chl content and were classified as moderately salt-sensitive, these results agree with Rao and Rao (1981), Garg and Garg (1980), Robinson *et al.* (1983), Reddy and Vora (1986), and Salma *et al.* (1994). They mentioned that Chl content decreased in salt-sensitive species and genotypes. The reduction in pigments contents observed in these genotypes with the increase of salinity treatments supported the view of Prisco and O'Leary (1972) on *Phaseolus vulgaris*; other authors suggested that an osmotically induced water stress enhances the decay of chlorophyll on this crop and on *Vigna sinensis* (Abdel-Rahman and Abdel-Hadi, 1984). In other study, Velegaleti *et al.* (1990) mentioned that a reduction of chlorophyll is more evident in salt-sensitive species and that this reduction is correlated with Cl<sup>-</sup> ion accumulation, our results agree with their data, because a negative and significant correlation ( $r = -0.13$ ,  $P = 0.01$ ,  $n = 300$ ) of chlorophyll content with Na<sup>+</sup> concentration was found. In the same way, Kannan and Ramani (1988) mentioned that a general reduction in the growth of cowpea and tobacco plants following NaCl treatment is due to a decrease in the total chlorophyll and a reduced rate of photosynthesis. The present study demonstrates that different responses of Chl content to salinity can be found in the same species at different salinity levels, which coincides with Kirchoff *et al.* (1989), who mentioned that chlorophyll



content of leaves varies among genotypes of the same species. The Minolta chlorophyll meter (SPAD-502) is useful as a diagnostic aid; the meter is fast and repeatable as a nondestructive estimation of Chl and N content of shoot rather than a tool for Chl content in plants under saline stress. On the other hand, some genotypes of the same species are greener than others and will have higher readings; in this sense, it is clear that the stage of growth affects the readings, and that anything that causes the plant stress will affect the amount of chlorophyll in the plant and thereby affect the readings (Murdock, 2000).

The present study confirms that in the genetic variability among cowpea genotypes it is possible to find salt-tolerant and salt-sensitive genotypes, based on ions content and physiological traits, as transpiration, stomatal conductance and chlorophyll content. Besides, there are wide differences in responses to salinity among the cowpea genotypes studied, particularly between the genotypes from different origin, such as the International Institute of Tropical Agriculture (Ibadan Nigeria) genotypes from the University of California, Riverside, (USA), and genotypes from the Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (Mexico). However, our results provide guidelines for the selection of salt-tolerant cowpea genotypes, this information is relevant and very important to breeders interested in improving salt-tolerance and to the farmers that grow cowpea in the areas where the soil and groundwater has high content of NaCl, as it is the case of the northwest region of Mexico.

## 5. Discusión General

### 5.1. Efecto de la salinidad en la germinación

Definitivamente los efectos de la salinidad en las plantas en todas las etapas del desarrollo y de algunos cultivos, especies, variedades, etc. varía grandemente de una etapa de crecimiento a la otra y también depende en gran medida de las condiciones bajo las cuales el cultivo se siembra. Por este motivo, es necesario que las investigaciones relacionadas a evaluar los efectos de la salinidad en los cultivos y sobre todo con fines de selección de materiales con tolerancia a dicho estrés, se realice en cada una de las etapas de crecimiento de la especie en estudio.

La tolerancia de una planta a la salinidad puede ser definida como la capacidad de la planta para resistir el efecto del exceso de sales en el crecimiento regular de la raíz (Maas, 1990). Implícita en ésta definición es la idea que una planta puede resistir a una cantidad precisa de sal sin presentar efectos adversos. En realidad, la tolerancia de una planta a la salinidad no es un valor exacto. Esta depende de muchos factores, condiciones y límites. En primer lugar, la sal o sales involucradas deberán especificarse. En segundo término, deben especificarse las condiciones en la cual el cultivo se está desarrollando, las cuales pueden causar tolerancia y variar mucho. Por otro lado, también deberá especificarse la edad y la variedad de la planta, la cual también afecta la tolerancia de las plantas.

Con relación al frijol yorimón [*Vigna unguiculata* (L.) Walp], si bien las investigaciones relacionadas con el efecto de la salinidad en esta especie no son tan abundantes como en otras especies como el frijol común, trigo, cebada, etc., en algunas fuentes de información (Hall y Frate, 1996) se menciona de manera general, que es moderadamente tolerante a la salinidad, con mayor tolerancia que maíz pero menos que trigo, cebada, remolacha azucarera y algodón, sin embargo, Läuchli (1984) ubica al género *Vigna* y dos de sus especies (*sinensis* y *unguiculata*) como moderadamente sensibles a la salinidad, con datos estimados a partir de crecimiento en hojas y tallos de plantas bajo soluciones conteniendo 50 mM de NaCl por tres a siete semanas. Otras especies de este mismo género, tales como *V. aureus* y *V. radiata*, se consideran como especies con resistencia intermedia, bajo las mismas condiciones mencionadas.

El presente trabajo muestra y confirma algunos aspectos relacionados con la sensibilidad y la tolerancia a la salinidad de genotipos de frijol yorimón (*Vigna unguiculata* L. Walp.). Se realizaron experimentos para comparar diversas respuestas de frijol yorimón a diferentes tratamientos (NaCl) bajo condiciones controladas y semicontroladas en las etapas de: germinación, emergencia, establecimiento de plántulas y crecimiento inicial de plántulas y crecimiento vegetativo inicial. Como una primera aproximación, se evaluó el efecto de la salinidad (NaCl) en la germinación, así como las características morfológicas de plántulas de un genotipo (línea avanzada) que se ha reproducido y seleccionado durante más de siete años en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., todo esto bajo condiciones de campo e irrigado con agua salobre. Una modalidad que no se ha reportado en el frijol yorimón, es la de someter la semilla, a diferentes niveles salinos en diferentes periodos de inmersión, lo cual se utilizó en el presente estudio. La idea de pretratar la semilla surgió porque se ha reportado que la adaptación exitosa de líneas de células a la salinidad (Watad *et al.* 1985; Binzel *et al.* 1985) sugiere que un potencial genético para la tolerancia a la salinidad está presente en las células de las plantas de las cuales las líneas se derivaron, y que la exposición de esas células a la salinidad desencadena la expresión de ésta información. Por ejemplo, la adaptación de células de *Nicotiana* a 500 mol m<sup>-3</sup> de NaCl mediante un incremento gradual de la concentración salina en el medio, requiere de alrededor de 50 generaciones (Watad *et al.* 1985). Lo anterior indica que el fenómeno no es debido a un evento raro y sugiere que posiblemente la adaptación es el resultado de una modulación de la expresión del genoma (Watad *et al.* 1985). En sorgo (Amzallag *et al.* 1990) se ha intentado la adaptación completa de la planta mediante incrementos subsecuentes del medio salino y se propone que ésta adaptación resulta de una modulación de la expresión del genoma que ocurre durante la exposición prolongada de concentraciones no letales de NaCl.

Los resultados del presente estudio mostraron que el peso de la semilla pretratada disminuyó linealmente conforme los tiempos de inmersión (Fig 1c, apartado 4.1.1) y los niveles de salinidad incrementaron, además se tuvo un efecto lineal con ambos factores (Fig. 1a, apartado 4.1.1). Investigaciones similares con frijol yorimón no han sido reportadas previamente, sin embargo, García y Troyo (1993) reportaron que los tiempos de inmersión (16, 27, 36 y 48 horas) no afectaron la viabilidad de semillas de la halófito *Salicornia bigelovii*, por el contrario, funcionaron como un pretratamiento para obtener una germinación

acelerada y eficiente cuando disminuyeron los niveles de salinidad a 0 y 9 ppm. La disminución del peso de las semillas de frijol yorimón sometidas a los niveles de salinidad, se debe a que existe una reducción de la imbibición de agua por parte de la semilla debido al bajo potencial osmótico del medio salino en que se colocaron (Wahid *et al.* 1999).

La germinación es un fenómeno complejo que involucra muchos cambios bioquímicos y fisiológicos que conducen a la activación del embrión (Waid *et al.* 1999). Básicamente, se refiere a la ruptura de la cubierta de la semilla (Maas y Grieve, 1990) y es un proceso mediante el que un embrión adquiere el metabolismo necesario para reiniciar el crecimiento y transcribir las porciones del programa genético que lo convertirán en una planta adulta (Jann y Amen, 1977). En términos prácticos, se dice que la semilla ha germinado cuando en siembras de laboratorio emite la radícula, o cuando emerge del suelo en siembras realizadas en tierra (Hartmann y Kester, 1971; Orchard, 1977). Desde el punto de vista productivo, es una de las etapas más críticas en el ciclo del crecimiento de una planta porque afecta a la planta y eventualmente el rendimiento del cultivo (Mass y Grieve, 1990).

Los resultados del presente trabajo con respecto al porcentaje de germinación indican que ésta se redujo de forma cuadrática por el efecto de ambos factores, tiempos de inmersión y tratamientos salinos y por la interacción de ambos (Fig. 1b, apartado 4.1.1.). Los porcentajes mayores de germinación se presentaron en los períodos de inmersión y niveles salinos más bajos. Una causa por la que la germinación se redujo a mayor tiempo de inmersión, es debido a que el exceso de agua ocasiona una deficiencia de oxígeno (elemento indispensable para el proceso) y por lo tanto un retardo en la germinación (Pandey, 1990) y en ocasiones un enmohecimiento con la consecuente pudrición de la semilla. Con respecto al efecto de la salinidad sobre la germinación de semillas de frijol yorimón, West y Francois (1982) reportan que la germinación de ésta especie mostró dos tipos de efectos al incrementar los niveles salinos; en el nivel salino de 12 dS/m, existió un retraso en la germinación pero no hubo una reducción significativa del porcentaje final de germinación, sin embargo, en los niveles de 16 y 20 dS/m, el porcentaje final se redujo significativamente.

Otros estudios de germinación con semillas de yorimón bajo tratamientos salinos (agua de mar diluida: 50, 25 y 12.5%) revelan que el porcentaje de germinación se redujo en todas las diluciones, siendo más afectado en 50% de agua de mar, incluso se eliminaron algunos genotipos de frijol yorimón que no germinaron y por lo tanto no existieron datos para analizar (Ruiz, 1993).

Por otro lado, Murillo-Amador (1992) en un trabajo realizado en campo, utilizando los mismos genotipos usados por Ruiz (1993), encontró que los genotipos que con éxito germinaron y emergieron a nivel laboratorio, en campo mostraron lo opuesto. A pesar de que el objetivo de esta última investigación no fue evaluar el efecto de la salinidad, se utilizó agua para riego considerada como de mala calidad (3.29 dS/m). Con relación a lo encontrado por estos dos autores, es importante destacar, que las investigaciones para tolerancia a ambientes desfavorables, tanto la germinación como la emergencia, no están correlacionadas con otras etapas del crecimiento y que además es importante simular las condiciones de laboratorio en lo más posible a las de campo, para obtener resultados cercanos a ésta última condición, que finalmente será la que nos represente de manera real el efecto de la salinidad en la planta y su relación con el rendimiento y producción.

Otro trabajo realizado con frijol yorimón en el ámbito local es el de Torres (1992) quien reporta la evaluación del efecto del estrés hídrico. Algunas parcelas estuvieron sometidas al efecto de la salinidad en el agua de riego, siendo ésta mayor de 12 mmhos/cm, valor que se reporta como el máximo aceptado para que ésta especie sobreviva, concluyendo que posiblemente el frijol yorimón tolera una mayor salinidad, lo cual es promisorio cuando se compara con otros cultivos. Al respecto, Hernández (1991) menciona que además de éstas características en frijol yorimón, se logró identificar algunos materiales de frijol yorimón como promisorios para producción de ejote y grano en el Valle de La Paz, BCS, bajo las condiciones agro ecológicas del área de estudio. Asimismo, Hernández y Troyo (1985) evaluaron seis variedades de frijol yorimón de diferentes regiones de México, en dos localidades consideradas con problemas de salinidad y sodicidad en el suelo, determinaron que el yorimón es una leguminosa potencialmente productora de grano, ejote y forraje y constituye un recurso factible de explotarse en zonas con problemas de sodio y salinidad en general.

Por otro lado, si el agua para riego presenta diferentes niveles salinos, es recomendable desarrollar una condición baja de sales durante la germinación y el crecimiento vegetativo inicial de frijol yorimón (Hall y Frate, 1996), etapas en que ésta especie es más sensible a la salinidad, sugiriendo aplicar el agua con salinidad durante el llenado de vainas. Otros estudios han demostrado que otras especies de frijol yorimón (*Vigna sinensis*) no presentan dificultad (o es muy poca) para germinar en presencia de altas concentraciones de sales (150 mM NaCl + 30 mM CaCl<sub>2</sub>) confirmando que la presencia de sales en el medio tiene un efecto adverso

mínimo en el proceso de la germinación (Imamul-Huq y Larher, 1984). Por otro lado, reportes con *Vigna radiata* señalan que se obtuvo una mejor germinación y establecimiento de plántulas cuando se aplicó agua de riego no salina (Minhas *et al.* 1990). Como primera clasificación, el frijol yorimón según Maas (1981) se ubica como una especie moderadamente sensible a la salinidad, esto de acuerdo al criterio del umbral de salinidad (1.3 dS/m) que tolera sin reducir su rendimiento por abajo del rendimiento que se obtiene bajo condiciones no salinas y bajo el criterio del porcentaje de reducción de rendimiento (14.0%) por cada incremento en la salinidad (conductividad eléctrica del extracto de saturación) por arriba del umbral. Como comentario final de este primer experimento (apartado 4.1.1.) considerado como una primera aproximación para determinar la posible tolerancia de la especie en la etapa de germinación, es importante destacar desde el punto de vista práctico o productivo, que el genotipo utilizado (CIB-001 o Paceño), podrá en un futuro liberarse como una variedad adaptada a las condiciones agro ecológicas de la región, ya que se obtuvieron porcentajes de germinación altos en salinidades por arriba del umbral recomendado. Aunque este porcentaje es un resultado de condiciones de laboratorio y no necesariamente representa la germinación bajo condiciones de campo, desde otro punto de vista práctico, ésta información será de gran utilidad para futuras investigaciones con la especie y para los productores que en sus predios agrícolas presenten problemas de salinidad en el agua o en el suelo y quieran incrementar sus rendimientos bajo éstas condiciones, mismos que deberán considerar la variedad adecuada y el umbral de salinidad donde la planta no presenta daños severos por efecto de la salinidad, que pudiera ocasionar una densidad de plantas menor a la óptima con la consecuente reducción del rendimiento.

La salinidad durante la germinación puede incrementar en gran medida la mortalidad de plantas, resultando en una densidad poblacional baja, menor a la óptima y consecuentemente una reducción en el rendimiento de grano, por lo que es muy importante conocer la tolerancia de los cultivos a la salinidad durante ésta etapa y sus etapas subsecuentes (Mass y Grieve, 1990). En este sentido y con el objetivo de evaluar el efecto de la salinidad en la germinación para determinar el comportamiento de 25 genotipos de frijol yorimón y al mismo tiempo realizar una selección y clasificación de genotipos tolerantes y sensibles a la salinidad durante esta etapa, se realizó un experimento bajo condiciones de laboratorio utilizando tres concentraciones salinas (0, 85 y 170 mmol NaCl/L).

Los resultados muestran que el porcentaje y la tasa de germinación de todos los genotipos se afectaron por la salinidad, asimismo, se encontraron diferencias significativas entre los genotipos y la interacción de ambos factores (Tabla 2 , apartado 4.1.2). La salinidad retardó el inicio de la germinación de todos los genotipos, esto debido a que uno de los efectos primarios del estrés por sales es retardar la germinación y la emergencia de plántulas (Maas y Grieve, 1990). En general, la salinidad induce numerosos desordenes en las semillas durante la germinación; primeramente reduce la imbibición de agua debido a un potencial osmótico bajo del medio; causa toxicidad, esto es, cambios en la actividad enzimática, perturba el metabolismo de las proteínas, causa trastornos en el balance de los reguladores del crecimiento de la planta y reduce la utilización de reservas de la semilla (Wahid *et al.* 1999). El retraso en la germinación y las tasas bajas de germinación presentadas en el presente estudio, también han sido mostradas y reportadas en otros cultivos por varios investigadores (Uhvits, 1946; Mayer y Poljakoff-Mayber, 1963; Ungar, 1967). Se ha demostrado que la inhibición de la emergencia de la radícula es principalmente debido a una disminución del gradiente de potencial hídrico entre el medio externo y la semilla (Enéas-Filho *et al.* 1995). Esto ocasiona una menor absorción de agua de las semillas causando un retraso en los cambios metabólicos necesarios para la emergencia de la radícula (Uhvits, 1946; Prisco y O'Leary, 1970). Asimismo, la salinidad también puede afectar la germinación al facilitar la absorción de iones tóxicos, los cuales pueden ocasionar cambios en algunas actividades hormonales o enzimáticas de la semilla (Smith y Comb, 1991). En frijol yorimón, West y Francois (1982) asumen que la reducción en el porcentaje final de semillas obtenido en las concentraciones salinas mayores, puede ser un efecto osmótico o en efecto tóxico (iónico) o la combinación de ambos, sin embargo, no realizaron pruebas usando soluciones isoosmóticas para probar ésta aseveración. En este sentido, los resultados de un experimento desarrollado por Murillo-Amador *et al* (manuscrito en preparación) en condiciones controladas, utilizando dos genotipos de yorimón, NaCl y Polietilenglicol (PEG-8000) con diferentes potenciales osmóticos, se encontró que la disminución de la tasa y el porcentaje final de germinación se afectaron mayormente por el uso de PEG-8000, por lo que se concluye que bajo las condiciones y los genotipos utilizados, el efecto fue de tipo osmótico, más que de tipo iónico. Sin embargo, se requiere realizar trabajos adicionales utilizando una mayor cantidad de genotipos, de tal manera que se incluyan

genotipos tolerantes y sensibles a la salinidad para determinar más acertadamente este fenómeno.

Las diferencias encontradas en la tasa y el porcentaje final de germinación de los diferentes genotipos (apartado 4.1.2) como respuesta al estrés salino, confirma que ésta respuesta varía entre variedades o genotipos de la misma especie (Figs. 2, 3, 4, apartado 4.1.2) y depende en gran medida de las condiciones culturales bajo las cuales se desarrollan (Maas, 1986). El presente trabajo, además, confirma la gran variabilidad que existe entre genotipos de frijol yorimón en respuesta al estrés salino, misma que ha sido reportada previamente en genotipos sometidos a dicho estrés (Fernandes de Melo *et al.* 1994; Ruiz, 1993). Esta variabilidad es clave para el mejoramiento genético con respecto a cualquier carácter de la planta que se desee mejorar (Shannon, 1997). En el caso de la variabilidad en la tolerancia a la salinidad es importante realizar la selección y clasificación de genotipos por su tolerancia en las primeras etapas del crecimiento, porque básicamente se asume que si la planta presenta tolerancia en las primeras etapas de su crecimiento y desarrollo, también las presentará en las etapas tardías o subsecuentes (Nerson y Paris, 1984). El criterio de selección de genotipos para tolerancia a salinidad durante la etapa de germinación fue efectivo en pasto Kentucky (Horst y Taylor, 1983); sin embargo, en el cultivo del melón, la situación es diferente ya que no fue efectivo (Nerson y Paris, 1984). En este sentido, uno de los objetivos principales fue realizar una selección y clasificación de genotipos por su tolerancia o sensibilidad a la salinidad durante las primeras etapas del crecimiento del frijol yorimón, ya que una comparación de la tolerancia a la salinidad durante la germinación y la emergencia con las subsecuentes etapas fenológicas es muy difícil, porque se utilizan diferentes criterios y condiciones para realizar la evaluación de la respuesta a la planta (Maas, 1986). Asimismo, es importante considerar que los criterios potenciales y mejores de selección para tolerancia a salinidad son la evaluación del porcentaje de germinación, el porcentaje de emergencia de plántulas y la sobrevivencia de plántulas (Tal, 1985).

Los genotipos de frijol yorimón clasificados como tolerantes en la etapa de germinación y bajo los criterios de selección y clasificación utilizados fueron: 'CB3', 'CB-27', 'CB88', 'CB5' y 'CB46' de la Universidad de California, mientras que de México solo 'Paceño' presentó ésta característica. Los genotipos clasificados como sensibles a la salinidad fueron: 'IT96D-733', 'IT89KD-391', 'IT95K-1088-4', 'IT95K-1090-12' e 'IT90K-277-2' del IITA, Nigeria. El



genotipo 'Sonorense' de México también se ubicó dentro de los sensibles. El genotipo 'CB3' fue el más tolerante, mientras 'CB27', 'CB88', 'Paceño', 'CB5', 'CB 46' e 'IT89KD-288' se clasificaron como moderadamente tolerantes. El resto de los genotipos (Tabla 1, apartado 4.1.2) se clasificaron como sensibles a la salinidad. La tolerancia a la salinidad mostrada por algunos genotipos en ésta etapa puede ser derivada de la capacidad de los genotipos para excluir iones tóxicos, principalmente  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , ya que estudios químicos realizados en semillas de ésta especie muestran que ambos iones son excluidos de la semilla al incrementar la salinidad (West y Francois, 1982). Desafortunadamente, las semillas no germinadas de los genotipos comparados en el presente estudio, no se sometieron al análisis químico respectivo. Otra posible causa de la tolerancia mostrada en éstos genotipos pudiera estar relacionada con la capacidad de los genotipos tolerantes para iniciar el proceso del desarrollo embrionario con la mínima cantidad de agua absorbida, cuando fueron sometidos al estrés salino, ya que como menciona Murillo-Amador *et al* (manuscrito en preparación), los porcentajes bajos de germinación en frijol yorimón son causa de un efecto osmótico, más que de un efecto tóxico por iones. Ambos procesos bajo condiciones salinas afectan la germinación de la semilla al disminuir la facilidad con la cual las semillas toman el agua y facilitar la absorción de iones tóxicos (Smith y Comb, 1991). El hecho de que el frijol yorimón se siembre en un rango amplio de condiciones climáticas, desde las semiáridas hasta las subhúmedas y como un cultivo de temporal (Lush y Rawson, 1979) y que esté reportado como una especie tolerante a las temperaturas altas y a la sequía (Rachie y Roberts, 1974), es un indicio más de que los genotipos tolerantes muestren una capacidad para germinar en condiciones de baja disponibilidad de agua.

## **5.2. Efecto de la salinidad en la etapa de emergencia**

Otro problema abordado en el presente trabajo, fue comparar la respuesta al estrés salino de genotipos de frijol yorimón en la etapa de emergencia, considerando los criterios propuestos por Shannon (1997); Maas (1986); Nerson y Paris (1984) en relación a que es recomendable realizar selección y clasificación de genotipos por su tolerancia a la salinidad en cada una de las etapas del crecimiento y desarrollo de una especie que se desee mejorar genéticamente para el carácter deseado, ya que es bien conocido que la sensibilidad de los cultivos a la salinidad cambia durante su crecimiento y desarrollo y deberá ser medida durante

todas las etapas fenológicas del cultivo (Nieman y Shannon, 1976; Jones y Qualset, 1984), además, se debe considerar que la disminución en el número de plantas por efecto de la salinidad durante la etapa de emergencia, puede reducir significativamente el rendimiento, siendo importante conocer su tolerancia durante esta etapa (Maas y Grieve, 1990).

Básicamente, la emergencia se refiere a la emergencia de la plántula a través de la superficie del suelo y al igual que la germinación, es una etapa crítica. Pruebas sistemáticas de cultivos para tolerancia a la salinidad durante la emergencia no se reportan con frecuencia y en muchos cultivos no se han emprendido; sin embargo, numerosos estudios se han realizado bajo diferentes condiciones (Maas y Grieve, 1990).

Los resultados del presente estudio muestran diferencias tanto en la tasa como el porcentaje final de emergencia por efecto de la salinidad, los genotipos y por la interacción de ambos factores (Tabla 2, apartado 4.2.2). Resultados similares reportó Ruiz (1993) trabajando en condiciones de laboratorio, quien encontró que conforme se incrementaron los niveles de salinidad en el agua de riego (de 6.09 dS/m a 26.5 dS/m), aumentó el tiempo para lograr la emergencia de plántulas. La tolerancia relativa de frijol yorimón en la etapa de emergencia mostró que se requieren alrededor de 16 dS/m para reducir el porcentaje de emergencia hasta en un 50% (Maas, 1986). En el presente estudio, al incrementar la salinidad, ambas variables disminuyeron (Tabla 3, apartado 4.2.2), posiblemente por la inhibición del crecimiento del eje embrionario debido a un retraso de la movilización de reservas (Prisco y Vieira, 1976; Gomes-Filho y Prisco, 1978; Prisco *et al.* 1981; Gomes-Filho *et al.* 1983; Prisco, 1987) y a los disturbios de la membrana causado por la salinidad, el cual es evidenciado por el incremento de la pérdida de materiales del eje embrionario (Prisco, 1987). Aunque la mayoría de las reservas de movilización de los tejidos de la semilla ocurren después de la emergencia de la radícula (Gomes-Filho y Prisco, 1978; Bewley y Black, 1978), existen reservas de movilización de diferentes partes de la semilla durante la imbibición inicial (Bewley y Black, 1978; Ashford y Gubler, 1984; Murray, 1985), sobre todo la movilización del almidón, el cual ocurre en las semillas de legumbres principalmente durante el establecimiento de la plántula (Bewley y Black, 1978; Murray, 1984) y es altamente sensible a la salinidad (Prisco *et al.* 1981).

Las diferencias entre genotipos demuestran que también en la etapa de emergencia existe una gran variabilidad entre genotipos en respuesta al estrés salino (Fig. 2, apartado

4.2.2), que es una característica que desde el punto de vista del mejoramiento genético debe aprovecharse. Este hecho demuestra que la tolerancia de plantas a la salinidad no solo varía entre especies, sino que también entre genotipos de la misma especie y que además cambia durante el crecimiento y desarrollo del cultivo (Maas y Hoffman, 1977). Asimismo, se demostró que la tolerancia a la salinidad durante la emergencia, varía considerablemente entre los cultivares, sin embargo, no está bien correlacionada con los parámetros de tolerancia determinados como funciones de la respuesta del rendimiento (Maas, 1990). En este sentido, el genotipo seleccionado y clasificado como tolerante a la salinidad en la etapa de emergencia fue 'CB27'; otro grupo ubicado con tolerancia moderada estuvo compuesto por 'CB88', 'CB3', 'CB5' y 'CB46' de la Universidad de California, USA; 'Paceño', 'Tardón' y 'Cuarenteño' de México. El resto de los genotipos presentaron sensibilidad a la salinidad (Tabla 3, apartado 4.2.2). Aunque una comparación de la tolerancia a la salinidad entre las etapas de germinación y emergencia es difícil debido a los diferentes criterios que se usan para evaluar la respuesta de la planta (Maas, 1986), el presente trabajo mostró que los genotipos 'CB27', 'Paceño', 'CB88', 'CB3' y 'CB46' clasificados como tolerantes en la etapa de germinación (apartado 4.1.2), también se clasificaron como tolerantes en la etapa de emergencia; indicando con esto que la selección y clasificación de genotipos en las etapas iniciales del crecimiento son de utilidad y permiten el desarrollo de técnicas y/o métodos simples y efectivos para realizar selecciones rápidas de una cantidad considerable de genotipos para comparar tolerancia a la salinidad (Tal, 1985). El hecho de que el genotipo 'Cuarenteño' se haya clasificado como moderadamente tolerante en la etapa de germinación, pero en emergencia se clasificó como tolerante, corrobora el criterio mencionado por Maas (1986) el cual menciona que es difícil realizar comparaciones de la tolerancia a la salinidad entre las distintas etapas del crecimiento. Además, se considera que los cultivos son más tolerantes por lo general en la etapa de germinación que en etapas posteriores del crecimiento, aunque una excepción es la remolacha azucarera, la cual es más sensible durante la germinación (Maas, 1986).

Con relación a las ecuaciones de predicción, los resultados del presente trabajo señalan que para reducir el porcentaje de emergencia de plántulas de los genotipos con mayor tolerancia a la salinidad al 90, 75 y 50% se requieren 38, 88 y 189 mmol NaCl/L, respectivamente. Por su lado, West y Francois (1982) utilizando la variedad 'CB5' de frijol yorimón y realizando observaciones durante 13 días, encontraron que se requieren 14, 16 y 18

dS/m del extracto de saturación, para reducir el porcentaje de emergencia de plántulas a 90, 75 y 50%. Es evidente que investigadores encuentren resultados diferentes para la misma especie, las cuales pueden reflejar las diferencias debidas a las condiciones de evaluación, tales como la temperatura, la humedad del suelo, algunas otras variables no controlables como la viabilidad de las semillas, la cual depende de la edad, la latencia, la permeabilidad de la testa, inhibidores internos, etc., la variedad o el genotipo (Maas, 1990). Además, no se debe descartar que los valores predictivos son meramente teóricos y que muchas veces, sobre todo cuando el tamaño de muestra es apenas el óptimo, no reflejan lo que sucede en la realidad.

### **5.3. Efecto de la salinidad en el establecimiento y crecimiento de plántulas**

Una de las etapas del crecimiento de muchos cultivos es el establecimiento y crecimiento inicial de plántulas. Algunas especies cultivadas como trigo (Ayers *et al.* 1952; Udovenko y Alekseeva, 1973; Maas y Poss, 1989; Meneguzzo *et al.* 2000; Noaman, 2000), cebada (Ayers *et al.* 1952), algodón (Abul-Naas y Omran, 1974), arroz (Kaddat, 1963; Pearson *et al.*, 1966; Yeo y Flowers, 1986), tomate (Dumbroff y Cooper, 1974) maíz (Maas *et al.* 1983), cacahuete (Shalhevet *et al.* 1969), frijol guar (Francois *et al.* 1990), melón (Nerson y Paris, 1984), chile (Chartzoulakis y Klapaki, 2000), indican que son más sensibles a la salinidad durante la etapa de plántula que durante la germinación, incluso, las plántulas son más sensibles que las plantas de mayor edad (Maas, 1990). Los primeros resultados con respecto al establecimiento y crecimiento de plántulas de frijol yorimón del presente trabajo, el cual se realizó en condiciones no controladas, mostraron que todas las variables morfológicas (área foliar, longitud de raíz, longitud de parte aérea, peso seco de raíz, peso seco de parte aérea y biomasa total) de plántulas de frijol yorimón de una línea avanzada, disminuyeron conforme los niveles de salinidad incrementaron (Fig. 2, apartado 4.1.1). Resultados similares encontraron Imamul Huq y Larher (1984) en plántulas de *Vigna sinensis*, las cuales disminuyeron su altura a partir de los 50 mM de NaCl; sin embargo, contrariamente a los resultados presentes, encontraron que el peso fresco fresco y seco de plántulas se incrementaron en presencia de 50 mM de NaCl o niveles salinos superiores. Este fenómeno podría estar ligado a que ésta especie muy posiblemente se beneficie con el Na<sup>+</sup>, lo cual podría ser el

resultado de un efecto estimulador del  $\text{Na}^+$  sobre algunas enzimas (Turner y Turner, 1980) o el resultado de una osmoregulación parcial por el reemplazo del  $\text{K}^+$ . En frijol yorimón, Ruiz (1993) realizando su investigación hasta la etapa de plántula en condiciones de laboratorio, observó que a medida que aumentan los niveles de salinidad en el agua de riego (de 6.09 dS/m a 26.5 dS/m), el crecimiento de plántulas se reduce severamente.

El hecho de que las plántulas hayan disminuido su altura bajo el estrés salino, coincide con otras plantas leguminosas, lo cual se considera un fenómeno común de ésta familia (Imamul Huq y Larher, 1983a, 1983 b; Nukaya *et al.* 1982a, 1982b) y está asociada principalmente con una tasa baja de división celular (Nieman, 1965). Los resultados también coinciden con los encontrados por Eneas-Filho *et al.*(1995) en frijol yorimón, los cuales señalan que una solución de 100 mM de NaCl fue suficiente para reducir en 65.5% la longitud de plántulas de frijol yorimón. La inhibición del establecimiento de plántulas de frijol yorimón reportadas por Eneas-Filho y los resultados del presente estudio, son consistentes también con los resultados observados previamente por Prisco y Vieira (1976), Gomes-Filho y Prisco (1978) y Prisco *et al* (1981). Asimismo, similar inhibición fue reportada en *Phaseolus vulgaris* (Prisco y O'Leary, 1970). Eneas-Filho *et al.*(1995) señalan también que las diferencias encontradas entre el control y los tratamientos salinos en las actividades de las alfa y beta galactosidasas tanto en germinación como en el establecimiento de plántulas, sugiere que la salinidad retrasa la solubilización/activación o el movimiento de ésta enzima. Otras investigaciones señalan que el establecimiento de plántulas de frijol yorimón es afectado por la salinidad (Gomes-Filho *et al.*1996) y que durante el crecimiento vegetativo inicial, la altura de la plántula, la longitud de la raíz y la producción de materia seca se reducen al incrementar la salinidad por arriba de 7 dS/m (Abdulahi y Egeh, 1988). Como se mencionó anteriormente, la etapa de emergencia y establecimiento de plántula es una de las más sensibles a la salinidad, por lo que la selección y clasificación de genotipos para tolerancia a la salinidad se ha realizado usando características tales como la germinación, emergencia, sobrevivencia de plántulas, tasa de crecimiento, daños por clorosis foliar, etc. En el presente trabajo se incluyó a la tasa de crecimiento relativo (TCR) por ser un buen indicador de la producción de materia seca, la cual permite estimar la fotosíntesis neta y puede usarse para comparar comportamientos respecto a cualquier tipo de tratamientos bajo condiciones definidas (sequía, salinidad, temperatura). Asimismo, se incluyeron otros parámetros fisiotécnicos como la tasa

de asimilación neta (TAN), la tasa de crecimiento del cultivo (TCC) y el índice de área foliar (IAF), los cuales mediante la técnica del análisis de senderos se correlacionaron con la TCR para determinar cual (es) de ellos son los que al parecer, resultan más importantes en la determinación del crecimiento de plántulas de frijol yorimón bajo condiciones salinas. Los resultados indicaron que todos los parámetros del crecimiento disminuyeron conforme los niveles salinos se incrementaron (Fig. 1a-d, apartado 4.2.1), asimismo, se encontró una relación muy estrecha entre TAN, IAF, TCC con TCR, coincidiendo con los resultados mostrados por Radford (1967). Considerando ésta relación, se realizó el análisis de senderos de la relación causa-efecto entre las variables predictoras y la variable criterio (Fig. 2, apartado 4.2.1) estudiando los efectos directos e indirectos (Tabla 1, Capítulo 2). Finalmente se determinó que TAN e IAF mostraron un efecto directo y positivo sobre TCR en las concentraciones salinas de 7.8 y 15.6 dS/m, los cuales se consideraron como parámetros importantes del crecimiento en la selección de tasas de crecimiento relativo altas en plántulas de frijol yorimón bajo condiciones salinas. La técnica del análisis de senderos en frijol yorimón en la etapa de plántula no ha sido reportada previamente, sin embargo, Kumar *et al* (1983) utilizaron esta técnica con 50 genotipos y encontraron que el número de granos por vaina fue el carácter más asociado con el rendimiento de grano. Otros caracteres relacionados con el rendimiento fueron, longitud y ancho de vaina, longitud de pedúnculo, rendimiento de materia seca y días a 50% de madurez, los cuales son importantes en la selección para rendimientos altos en frijol yorimón.

Muchos factores edáficos y ambientales interactúan con la salinidad para influir sobre la tolerancia a la salinidad en un cultivo. La temperatura, la humedad relativa y la contaminación del aire, son factores climáticos importantes que tienen influencia sobre la respuesta de la planta a la salinidad. En este contexto, otro problema abordado en el presente trabajo, fue comparar la tolerancia a la salinidad de ocho genotipos de frijol yorimón (apartado 4.3.1.) bajo condiciones controladas (cámara de crecimiento) para comparar la respuesta a la salinidad bajo éstas condiciones. Los resultados confirmaron de nuevo la variabilidad y las diferencias que existen en respuesta a la salinidad, no solo entre especies, sino también entre genotipos de una misma especie (Maas, 1986; Ayers *et al.* 1952; Maliwal y Paliwal, 1982; Pearson *et al.* 1966). Las variables morfológicas disminuyeron, corroborando lo expresado anteriormente

con respecto a que es común que se presente ésta disminución en plantas leguminosas bajo condiciones salinas, misma que se asocia a una tasa baja de división celular.

Considerando que para realizar mejoramiento genético, la selección de materiales con tolerancia a la salinidad se debe realizar de preferencia en las primeras etapas del crecimiento, que es cuando se correlaciona positivamente con la nula reducción en cantidad o calidad del producto a comercializar (Nerson y Paris, 1984), el análisis de resultados de variables morfológicas del presente trabajo, permitió clasificar los genotipos de frijol yorimón tolerantes, intermedios y sensibles a la salinidad en la etapa de plántula. Los genotipos tolerantes en ésta etapa y bajo las condiciones de evaluación fueron 'IT89KD-288' y 'CB3'; el primero se clasificó como moderadamente tolerante en germinación (Murillo-Amador *et al.* 2000) mientras que en emergencia se clasificó como sensible (Murillo-Amador *et al.* 2001); el segundo genotipo se clasificó como tolerante en germinación (Murillo-Amador *et al.* 2000) y en emergencia se clasificó como moderadamente tolerante (Murillo-Amador *et al.* 2001). Los genotipos 'CB5', 'CB88' e 'IT95R-52-80' mostraron tolerancia intermedia, los dos primeros se clasificaron como moderadamente tolerantes en germinación y en emergencia, mientras que el tercero, sólo se comparó en germinación y se clasificó como moderadamente sensible. Los genotipos clasificados como sensibles en ésta etapa fueron 'CB27', 'IT86D-719' e 'IT96D-666'; el primero se clasificó como moderadamente tolerante en germinación, mientras que en emergencia se clasificó como tolerante; los otros dos se clasificaron como moderadamente sensibles en germinación (Murillo-Amador *et al.* 2000) y en emergencia se clasificaron como sensibles (Murillo-Amador *et al.* 2001). En este sentido, los resultados son acordes en cuanto a que es difícil realizar una comparación de la tolerancia a salinidad en las diferentes etapas del crecimiento, ya que se emplean diferentes criterios para evaluar la respuesta de la planta (Maas, 1986), además, algunos genotipos incrementan su tolerancia o la disminuyen conforme avanzan en las etapas más tardías del crecimiento. Asimismo, se debe considerar que muchos cultivos o genotipos de la misma especie son más sensibles a la salinidad bajo condiciones cálidas y secas que bajo condiciones frías o húmedas; como ejemplo, se citan los genotipos 'IT89KD-288' (de origen Africano, Ibadan, Nigeria) y 'CB27' (de origen Americano, California, USA) los cuales respondieron de distinta manera en comparación con las etapas anteriores bajo las condiciones de evaluación. La contaminación del aire es otro factor a considerar, el cual incrementa la aparente tolerancia a la salinidad de cultivos oxido-sensibles.

Por ejemplo, el ozono, el contaminante más importante del aire, disminuye más el rendimiento de algunos cultivos bajo condiciones no salinas que bajo condiciones salinas. Las plantas cultivadas en suelos infértiles pueden ser más tolerantes que aquellas cultivadas con fertilidad adecuada, porque la fertilidad, más que la salinidad, es el principal factor limitante del crecimiento. Una fertilización adecuada incrementa los rendimientos si el suelo es o no salino, pero proporcionalmente más si no fue salino. Al extraer las plantas el agua del suelo, el agua remanente del suelo comienza a estar más concentrada, consecuentemente, las plantas sufren un incremento por el estrés salino tanto como el estrés por agua cuando el agua del suelo es reducida (Maas, 1986).

La tolerancia de las plantas a la salinidad se basa generalmente en uno de los siguientes criterios: (1) la habilidad de la planta para sobrevivir en suelos salinos, (2) el crecimiento absoluto de la planta o el rendimiento y (3) el crecimiento relativo rendimiento en un suelo salino comparado con un suelo no salino (Maas, 1986). En este sentido y tomando en cuenta la gran variabilidad de los genotipos de frijol yorimón, otro problema abordado en el presente trabajo fue desarrollar una técnica y/o método rápido de selección de genotipos tolerantes y sensibles a la salinidad en la etapa de plántula [(apartado 4.3.2.) el cual es un prerrequisito para mejorar la tolerancia a la salinidad en especies cultivadas, aparte de la variabilidad genética y otros prerrequisitos (Tal, 1985)] basado en el criterio de sobrevivencia de plántulas. Aunque la sobrevivencia de plántulas en suelos salinos es útil para ecólogos, éste criterio está limitado al uso de los agricultores porque frecuentemente tiene poca relación con la reducción del rendimiento dentro de los límites comercialmente aceptables (Maas, 1986). Sin embargo, esta información es de un valor alto para los fitomejoradores interesados en realizar mejoramiento para tolerancia a salinidad, asimismo, para los productores que deseen sembrar frijol yorimón en áreas ligeramente salinas.

#### **5.4. Efecto de la salinidad en el crecimiento vegetativo**

El estrés por salinidad durante la etapa vegetativa suprime el crecimiento de todos los órganos de la planta, aunque el crecimiento de la raíz es menos afectado que el crecimiento de la parte aérea (Bernstein y Hayward, 1958; Strogonov, 1964). El número de hojas, el tamaño de hojas, el crecimiento de tallos y brotes se reducen por efecto de la salinidad. Aunque los datos son limitados para corroborar ésta aseveración, generalmente se acepta que las plantas



favorecen su tolerancia a la salinidad conforme van envejeciendo, es decir, en las etapas más tardías del crecimiento y desarrollo (Maas, 1990). La salinidad reduce el número y el tamaño de hojas, el crecimiento de tallos y ramificaciones. En esta etapa la altura de plantas de yorimón se reduce drásticamente bajo niveles altos de salinidad, asimismo, el crecimiento vegetativo, la longitud de raíz y la producción de materia seca se reducen por arriba de conductividades eléctricas de 7 dS/m, en la etapa de floración (Egeh y Zamora, 1992). Cuando las plantas jóvenes se someten a un estrés, existe una mayor reducción en el crecimiento vegetativo (Kaddah y Ghowail, 1964; Lunin *et al*, 1961; Lunin *et al*, 1963). Para determinadas plantas, la proporción de biomasa que está sujeta a la reducción del crecimiento llega a ser menor cuando las plantas son estresadas en etapas más avanzadas, así, el incremento de la salinidad con la edad, se ha observado en algunos cultivos como frijol yorimón (Maas y Poss, 1989) y espárrago (Francois, 1987). Por lo general y de acuerdo con Maas y Poss (1989), en el frijol yorimón ocurre que las vainas inmaduras en condiciones de no-estrés por salinidad (control) constan de menos del 8% del total del peso de vaina. Solamente cuando las plantas han sido estresadas durante la etapa de floración la salinidad incrementa el número de vainas inmaduras en la cosecha. Generalmente, el estrés salino disminuye el peso de vainas inmaduras en plantas estresadas durante las etapas de floración y llenado de grano, pero el peso se incrementa cuando son estresadas con salinidad en la etapa de floración.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo en las etapas de germinación, emergencia, establecimiento y crecimiento de plántulas de frijol yorimón, ayudaron a demostrar que existe una gran variabilidad genética entre los genotipos de yorimón para tolerancia a la salinidad y fue un estimulante para realizar investigaciones más intensivas dirigidas a la fisiología de los cultivares que difieren en la tolerancia a la salinidad. En este sentido, un primer análisis de variables fisiológicas (apartado 4.3.3) se realizó en los 25 genotipos que se sometieron a 0, 85 y 170 mmol NaCl/L en invernadero a los cuales se les midió la transpiración, conductividad estomática y la distribución de minerales en la planta (raíz y follaje o parte aérea). En este contexto, Hayward y Spurr (1943) reportaron que la transpiración se reduce bajo condiciones salinas, más probablemente debido a un cierre parcial de los estomas y que esto, tiende a disminuir la fotosíntesis neta. Después de éstas aseveraciones, la literatura menciona que se han realizado muchos trabajos sobre el efecto de la salinidad en la fotosíntesis y en la conductancia estomática (Greenway y Munns, 1980;

McCree, 1986; Pasternak, 1987). Las conclusiones han sido muy variables, ya que los trabajos se han realizado con diferentes especies de diferentes sensibilidades, en diferentes niveles salinos y diferentes condiciones ambientales. En el presente trabajo, aunque no se midió la fotosíntesis, los resultados sobre transpiración y conductividad estomática indican que éstas se redujeron en todos los genotipos de frijol yorimón conforme los niveles de salinidad incrementaron (Fig. 4 *a & b*, apartado 4.3.3). En este sentido, el presente estudio demuestra que diferentes respuestas de éstas variables a la salinidad pueden encontrarse en la misma especie en diferentes niveles de salinidad y no meramente entre especies, como ha sido mostrado por Kaiser *et al.* (1983), Yeo *et al.* (1985), Lloyd *et al.* (1987). La disminución de la conductividad estomática y la transpiración en respuesta al incremento de niveles salinos, ya ha sido mostrada en frijol yorimón por West *et al.* (1986) y Plaut *et al.* (1990) usando el genotipo 'CB5'. Esta disminución está asociada con una reducción de la presión del CO<sub>2</sub> intercelular, la cual se relaciona con un incremento en el uso eficiente de agua (Plaut *et al.* 1990) y se ha demostrado que éste a su vez, está asociado con la reducción de la asimilación de carbono de algunas especies bajo condiciones salinas, lo cual se atribuye a una disminución mayor de la tasa de pérdida de agua que la ganancia de carbono (McCree, 1986; Richardson y McCree, 1985). Resultados similares bajo condiciones salinas se han encontrado en otras especies (Sing *et al.* (1989), Ayala y O'Leary (1994), Zecri *et al.* (1990), Elhaak *et al.* (1997) y Sánchez *et al.* (1982). La reducción lineal o cuadrática de la transpiración observada en algunos genotipos de frijol yorimón debido al incremento de los niveles salinos, muestra que algunos genotipos son capaces de reducir la conductividad estomática para conservar el agua en condiciones de estrés. Estos resultados también se presentan en otras especies (Sharma, 1977; Werner, 1990; Gordon, 1993; Aziz y Khan; 1998) bajo condiciones de estrés por sequía.

Por otro lado, los cloroplastos son los organelos que contienen los pigmentos que absorben la luz y se encuentran en las hojas en concentraciones de alrededor de 1.5 mg/g de materia fresca y la clorofila *a* está presente generalmente dos veces más que la concentración de la clorofila *b* (Parker y Biggins, 1964). La salinidad en la rizósfera o en el agua de riego, da como resultado cambios cuantitativos y cualitativos de la composición del pigmento fotosintético dependiendo de las especies bajo estudio y la calidad y cantidad de sales usadas para lograr la salinidad (Reddy *et al.* 1997). Aunque las determinaciones de clorofila en éste primer trabajo no se realizaron en laboratorio, los resultados muestran una gran variabilidad

con respecto al contenido de clorofila total en genotipos de frijol yorimón; de tal manera, que de acuerdo a la metodología de evaluación (SPAD-502), algunos genotipos incrementaron el contenido total de clorofila conforme los niveles de salinidad se incrementaron (Fig. 4c, apartado 4.3.3), principalmente aquellos genotipos clasificados como tolerantes a la salinidad; otros disminuyeron cuadrática o linealmente conforme los niveles de salinidad incrementaron. Así, en especies sensibles a la salinidad, se ha determinado que el trastorno de la estructura fina de los cloroplastos y la inestabilidad del complejo proteína-pigmento (Strogonov, 1974) así como el aumento de la actividad de la clorofilaza, produce la disminución en la síntesis de clorofila bajo condiciones salinas (Rao y Rao, 1981; Reddy y Vora, 1986a, 1986b). Asimismo, las diferencias observadas para la síntesis de clorofila en diferentes especies de plantas bajo condiciones salinas pueden ser debido a la existencia de diferentes rutas para la síntesis de clorofila controladas por diferentes enzimas, las cuales pueden tener una respuesta variable a la salinidad (Joshi, 1976).

El frijol yorimón, se encuentra ubicado dentro de las legumbres, las cuales son especies agrícolas muy importantes, ya que se consume su grano, se usa como cultivo forrajero o componentes de los alimentos para ganado y se extienden geográficamente desde regiones frías hasta los trópicos. Dentro de las legumbres de grano, la más importante es la soya, sin embargo, otras de no menor importancia son el chícharo, el frijol común, las habas, el cacahuate, el garbanzo y por supuesto el frijol yorimón. Por su lado, de las legumbres forrajeras, la alfalfa es la mejor, seguida del trébol, los cuales son los componentes principales de las raciones alimenticias del ganado (Läuchli, 1984). Durante mucho tiempo, las legumbres han estado reconocidas por ser sensibles o moderadamente tolerantes a la salinidad (Maas y Hoffman, 1977). Las respuestas de los cultivos a la salinidad han sido extremadamente complejas y una serie de mecanismos parece estar involucrado en la tolerancia de las plantas a la salinidad (Maas y Nieman, 1978; Läuchli, 1979; Greenway y Munns, 1980; Wyn Jones, 1981). Considerando a las legumbres, dos características son relevantes: existe variabilidad en la tolerancia a la salinidad entre legumbres y muchas de ellas responden a las condiciones de salinidad por medio de la exclusión de la sal, esto es, la exclusión del sodio y/o cloro de las hojas (Läuchli, 1984).

La salinidad ejerce efectos complejos en la planta como resultado de una interacción iónica, osmótica y nutricional, aunque el mecanismo fisiológico exacto del estrés por sales se

desconoce aún (Shannon, 1997b). La tolerancia a la salinidad depende con frecuencia de la complejidad anatómica y fisiológica de la planta organizada. Este hecho hace difícil encontrar la manera de incrementar la tolerancia a la salinidad en un mayor grado. Sin embargo, esto da una esperanza de que la tolerancia a la salinidad puede incrementarse encontrando los factores que están más limitados por el estrés salino durante el crecimiento y desarrollo (Shannon, 1997b). Por otro lado, la sensibilidad a la salinidad en algunos cultivos se ha atribuido al fallo de las plantas para mantener al  $\text{Na}^+$  y al  $\text{Cl}^-$  fuera del flujo de la transpiración y consecuentemente del citoplasma de los tejidos de la parte aérea (Flowers *et al.* 1977; Harvey, 1985). Bajo estrés salino, una planta puede absorber nutrientes y restringir la absorción de iones tóxicos en potenciales de agua menores que los normales. Las plantas que limitan la absorción de iones tóxicos y mantienen rangos normales de nutrientes iónicos pueden ser más tolerantes a la salinidad que aquellas que no restringen la acumulación de iones y el balance nutricional (Shannon, 1997b). Asimismo, Greenway y Munns (1980) mencionan que la tolerancia a la salinidad en glicófitas está asociada a la habilidad de absorber y/o transportar iones (principalmente  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ) de la raíz a la parte aérea.

En este sentido, los resultados del experimento realizado bajo condiciones controladas utilizando ocho genotipos de frijol yorimón (apartado 4.3.1) muestran una variación alta en la concentración de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en los genotipos tolerantes, intermedios y sensibles durante la etapa de plántula (Fig. 1a & d, apartado 4.3.1). Se encontró también que la concentración de  $\text{Na}^+$  fue mayor en raíz que en parte aérea en los genotipos tolerantes, mientras que en los intermedios y sensibles sucedió lo contrario, asimismo, ambos,  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  incrementaron su concentración en raíz y parte aérea en todos los genotipos conforme los niveles de salinidad incrementaron (Fig. 1b, c & e, apartado 4.3.1). Resultados similares con respecto a las concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  se encontraron en otro experimento realizado en condiciones de invernadero como parte del presente trabajo (Figs. 3 & 4, apartado 4.3.2). Sin embargo, Abdulahi y Egeh (1988) reportan que el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Cl}^-$  se incrementaron en el frijol mungo conforme los niveles salinos se aumentaron, no sucediendo así en soya y frijol yorimón. Además, éstas dos especies mantuvieron valores mayores de la relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ , mientras que el frijol mungo presentó lo contrario. Las razones de las diferencias encontradas en los resultados de Abdulahi y Egeh y el presente estudio no son claras, pero posiblemente se deban a que en primer lugar, no se utilizaron los mismos materiales genéticos ni la misma especie de

frijol yorimón, ellos trabajaron en condiciones de campo y no se utilizaron las mismas concentraciones salinas.

Por otro lado, en presencia de concentraciones elevadas de NaCl en el medio nutritivo, las plantas superiores, particularmente especies de frijol, pueden absorber iones en diferentes órganos para mantener el potencial del agua celular (Bernstein, 1963). Consecuentemente, sufren cambios en la absorción del transporte selectivo de iones (Rains, 1972). En este sentido, a nivel celular, la tolerancia al NaCl requiere la compartimentación de iones (especialmente  $\text{Na}^+$ ) (Fernandes De Melo *et al.* 1994). Según Kannan y Ramani (1988) el frijol yorimón es una de las pocas plantas en las cuales se ha encontrado que se ajusta con niveles bajos de salinidad obtenidos en suelos costeros recuperados y la tolerancia se debe quizá a la capacidad de mantener la turgencia celular.

Resultados similares a los del presente estudio reporta Hernández *et al.* (1993) quienes encontraron que la concentración de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  se incrementaron en hojas de frijol yorimón conforme los niveles salinos (35 y 100 mM de NaCl) se aumentaron. Diferencias entre genotipos con respecto a la absorción de iones ( $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ) en raíz, hipocotilo, epicotilo y hojas, también han sido reportadas previamente en frijol yorimón por Fernandez de Melo *et al.* (1994) quienes reportan que la concentración de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en ambos órganos de la planta se incrementó conforme los niveles salinos aumentaron, sin embargo, el contenido de  $\text{Cl}^-$  en parte aérea fue mayor que el de  $\text{Na}^+$ . Los resultados de éstos autores también coinciden con los del presente estudio, ya que por igual, reportan que la distribución de  $\text{Na}^+$  en los diferentes órganos de la planta fue diferente entre los genotipos, observándose una mayor concentración de este ion en las raíces del genotipo tolerante a la salinidad, mientras que el genotipo sensible presentó una mayor concentración en raíz, hipocotilo, epicotilo y hojas. Las diferencias que se detectan entre genotipos de frijol yorimón en cuanto a la absorción de iones tóxicos tales como el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Cl}^-$ , radica básicamente en que los genotipos que muestran tolerancia secuestran el  $\text{Na}^+$  principalmente en las raíces y también en las partes bajas del tallo (cuello) sobre todo para proteger al epicotilo y a las hojas. Estos resultados coinciden con Jacoby (1964) y Lessani y Marschner (1978).

En este sentido, el frijol yorimón, similar a otras especies de frijol, es un excluidor efectivo del  $\text{Na}^+$  y los genotipos tolerantes, como se mencionó anteriormente, parece ser que previenen el transporte de  $\text{Na}^+$  a la parte aérea para evitar los efectos perjudiciales de las sales

sobre el metabolismo de la planta (Marschner, 1986). Los resultados encontrados por Larcher *et al.* (1990) son un argumento más de que las concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  se incrementan en el tejido de la planta conforme la concentración salina externa incrementa. Además, muestran que la concentración de  $\text{Cl}^-$  en hojas fue mayor que la concentración de  $\text{Na}^+$ , éste último fue retenido principalmente en los tallos basales y en la raíz (Imamul Huq y Larher, 1985).

Por otro lado, Plaut *et al.* (1989) afirman que las concentraciones de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  no fueron diferentes entre los tratamientos de 43 y 130 mM de NaCl, esto puede ser atribuido a la exclusión de éstos iones, la cual fue más efectiva en hojas jóvenes y más predominante en el caso del  $\text{Na}^+$ . Esta exclusión aparentemente no fue suficiente en 173 mM de NaCl, concentración en la cual se inhibió más la fijación de  $\text{CO}_2$ . El frijol yorimón, al igual que el frijol común *Phaseolus vulgaris* L. parece que excluye el  $\text{Na}^+$  pero acumula  $\text{Cl}^-$  en las hojas (Plaut *et al.* 1990) y en frijol común, se observó que en 100 mM de NaCl, el contenido de  $\text{Na}^+$  de la hoja fue solamente un décimo del contenido de  $\text{Cl}^-$  (Seeman y Critchley, 1985).

Maas y Poss (1989) reportaron que las plantas de frijol yorimón sometidas a estrés salino, no mostraron síntomas de un exceso de acumulación de sales, sin embargo, no realizaron análisis minerales para verificar la cantidad de sales absorbidas, sino que se basaron en las conclusiones realizadas por West y Francois (1982) en el sentido de que el análisis mineral en hojas de frijol yorimón sometido a estrés salino, mostró que el  $\text{Cl}^-$  fue el ion más afectado por la salinidad, ya que éste se incrementó conforme los niveles de salinidad aumentaron. El  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{Cl}^-$  incrementaron, mientras que las concentraciones de  $\text{K}^+$  y P disminuyeron con el incremento de la salinidad. El  $\text{Na}^+$  fue excluido de las hojas en todos los niveles salinos, aunque las concentraciones fueron más altas en una primera evaluación con respecto a la otra. La concentración de  $\text{Mg}^{2+}$  no mostró cambios en el primer año de evaluación, sin embargo, en el segundo año de evaluación, la tendencia fue disminuir con el incremento de la salinidad. Otros resultados similares con respecto a un incremento mayor del  $\text{Cl}^-$  que  $\text{Na}^+$  en hojas de frijol yorimón fueron mostrados por Plaut *et al.* (1990) quienes reportan que el contenido de  $\text{Cl}^-$  en hojas de frijol yorimón sometido a 43 mM de NaCl durante 13 días, incrementó. Asimismo, contenidos similares de  $\text{Cl}^-$  se encontraron en hojas de todas las edades y en todos los niveles salinos superiores a 130 mM. Los contenidos de  $\text{Na}^+$  fueron menores que los de  $\text{Cl}^-$  en los niveles salinos inferiores, sin embargo, fueron similares en 130 mM de NaCl. Aunque estos resultados son contundentes, una comparación realizada

entre legumbres, muestra que la concentración de  $\text{Cl}^-$  fue menor en frijol yorimón y en soya que en frijol mungo (Abdulahi y Egeh, 1988). Por otro lado, Larcher *et al.* (1990) reportan que el  $\text{Cl}^-$  se acumuló más que el  $\text{Na}^+$  en las hojas de frijol yorimón, éste último ión se retuvo más en la parte basal del tallo y en las raíces.

Aunque la exclusión del  $\text{Cl}^-$  se reporta en algunas legumbres (Läuchli, 1984), los resultados del presente estudio con relación al incremento de la concentración de  $\text{Cl}^-$  en los genotipos sensibles a la salinidad (Fig. 1 *d*, apartado 4.3.1; Fig. 1 *b*, apartado 4.3.3) y el incremento de éste ion conforme aumentaron los niveles salinos (Fig. 1 *e*, apartado 4.3.1; Fig. 2 *c* y *d*, apartado 4.3.3) demuestra que el frijol yorimón es incapaz de excluir el  $\text{Cl}^-$ , tal como excluye el  $\text{Na}^+$ . La exclusión del  $\text{Cl}^-$  ha sido correlacionada con variedades de soya resistentes a la salinidad, las cuales controlaron el contenido de  $\text{Cl}^-$  en tallos y hojas en niveles bajos (Abel y MacKenzie, 1964). Posteriormente, Abel (1969) mostró que el transporte de  $\text{Cl}^-$  a la parte aérea de variedades de soya se encuentra bajo control genético, en particular, la exclusión de  $\text{Cl}^-$  en la variedad 'Lee' está controlada por un simple par de genes dominantes, mientras que la acumulación del  $\text{Cl}^-$  en hojas de la variedad 'Jackson' parece estar regulado por un par de genes recesivos. Otras legumbres como *Lupinus angustifolius* (Steveninck *et al.* 1982) y *Trifolium alexandrinum* (Winter y Läuchli, 1982) excluyen ambos,  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ . Sin embargo, frijol y alfalfa solamente excluyen el  $\text{Na}^+$ .

Literatura comparativa con respecto a la absorción y/o exclusión de iones tóxicos en otras especies del género *Vigna*, señala que en *V. radiata* los síntomas por efecto de altas concentraciones salinas ( $28.2 \text{ dS m}^{-1}$ ) ocasionan que el peso fresco de parte aérea disminuya y el crecimiento se inhiba drásticamente, asimismo, la salinidad tiene un efecto muy notorio en la concentración de iones, incrementando la concentración de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  conforme las concentraciones salinas se incrementan (Kurban *et al.* 1998). En ésta misma especie, Salim y Pitman (1988) observaron que los contenidos de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en los tallos de ésta especie fueron 6 y 2 veces mayores que los contenidos de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en las hojas, respectivamente. Asimismo, encontraron una correlación negativa y significativa entre el rendimiento de grano y la acumulación de  $\text{Cl}^-$  en las hojas. Por otro lado, en *V. sinensis*, se ha mostrado que también el  $\text{Na}^+$  se incrementa en los niveles altos de salinidad y además, la aplicación de hormonas (ácido indolacético) no induce a cambios significativos de ésta respuesta en ningún nivel salino

estudiado, concluyen por lo tanto que la translocación del  $\text{Na}^+$  no está bajo el control de ésta hormona en particular (Abdel-Rahman y Abdel-Hadi, 1984).

La variabilidad entre genotipos de frijol yorimón con respecto a la concentración de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en parte aérea y raíz en el presente estudio, puede ser debido a varios factores entre los que destacan la respuesta de cada uno de los genotipos de acuerdo a su información genética y la retranslocación de diferentes iones (principalmente  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ) de las hojas a diferentes tasas [como lo reportó Greenway *et al.* (1965) en cebada y Lessani y Marschner, (1978) en frijol]. Posiblemente el tallo haya funcionado como un sumidero para el  $\text{Cl}^-$  y el  $\text{Na}^+$  (retranslocado de las hojas o transportado hacia arriba por las raíces) como sucede en *V. radiata* (Salim y Pitman, 1988) y en frijol *Phaseolus vulgaris* donde la acumulación del  $\text{Na}^+$  se da en la parte basal del tallo (Jacoby, 1964). Desafortunadamente, no fue posible realizar la estimación correcta de las tasas de retranslocación de diferentes iones de una parte de la planta a otra en los diferentes genotipos de frijol yorimón. En otras especies: arroz (Flowers y Yeo, 1981, 1986), arroz, soya, frijol, frijol adzuki, calabacita y pepino (López *et al.* 1999), lechuga (Shannon *et al.* 1983), halófitas dicotiledóneas (Glenn y O'Leary, 1984), pastos (Marcum y Murdoch, 1990), remolacha azucarera (Marschner *et al.* 1981), en la halófita *Salvadora persica* (Maggio *et al.* 2000), pepino (Jones *et al.* 1989), chile (Chartzoulakis y Klapaki, 2000) y maíz (Schubert y Läuchli, 1990) se han encontrado resultados similares al presente trabajo con respecto a las diferencias en la concentración de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en raíces y parte aérea en condiciones de salinidad (Figs. 3 & 4, apartado 4.3.2).

Considerando que la salinidad tiene efectos adversos sobre los contenidos de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  (Läuchli, 1984) y que además, la tolerancia a la salinidad también se asocia con las concentraciones de  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  en parte aérea con relación a la concentración de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en algunas especies (Wyn Jones, 1979; Shannon, 1978), los resultados del presente estudio revelan que todos los genotipos mantuvieron altas concentraciones de  $\text{K}^+$  en parte aérea (Fig. 1 *d*, apartado 4.3.3), sin embargo, ésta disminuyó en todos los genotipos conforme se incrementaron las concentraciones salinas (Fig. 3 *c*, apartado 4.3.3). Los niveles altos de  $\text{K}^+$  que mostraron los genotipos tolerantes en raíz y parte aérea se reflejaron en el mantenimiento de la relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  cercano o superior a 1.0, que mostraron en ambos órganos (Fig. 2 *a*, apartado 4.3.1). En estos genotipos, el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Cl}^-$  disminuyeron su translocación a la parte aérea debido a la selectividad de la absorción de  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ , ya que las concentraciones menores



de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en parte aérea (Fig. 1 *a* y *d*, apartado 4.3.1), considerando que la relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  es un indicador adecuado de la tolerancia a la salinidad en genotipos de frijol yorimón. Resultados similares se han obtenido en otros cultivares de frijol yorimón tolerantes a salinidad (Fernandez de Melo *et al.* 1994). Asimismo, en *V. radiata* Salim y Pitman (1988) reportan menores contenidos de  $\text{K}^+$  en semilla que en tallos y hojas en todos los niveles salinos estudiados. Además, el  $\text{NaCl}$  tuvo un efecto pequeño sobre el contenido de iones en la semilla, siendo el  $\text{K}^+$  el principal ion en las semillas de plantas cultivadas en 50 y 100 mM de  $\text{NaCl}$ . Resultados similares fueron reportados en semilla de cebada en condiciones salinas por Greenway *et al.* (1965). Por su lado, Abdel-Rahman y Abdel-Hadi (1984) mencionan que el  $\text{K}^+$  en hojas de *V. radiata*, disminuye progresivamente con la salinización, mostrando además, que la concentración de  $\text{K}^+$  en las hojas de las plantas sin estrés, disminuyó progresivamente con el incremento en la concentración de ácido indolacético; esto podría indicar que éste ácido inhibe la translocación de  $\text{K}^+$  en cualquiera de las dos formas, directa o indirectamente mediante un desbalance hormonal. En esta misma especie, Kurban *et al.* (1988) encontraron que la concentración de  $\text{K}^+$  tiende a disminuir en un 13% en la salinidad de 16.2 dS/m. Sin embargo, Abdulahi y Egeh (1988) reportan que la concentración de  $\text{K}^+$  en frijol yorimón, frijol mungo y soya, no se afectó por la salinidad, aunque el contenido total de nutrientes disminuyó. Resultados similares a los encontrados en frijol mungo y en frijol yorimón en el presente estudio, se han encontrado también en otras especies como maíz (Kaddah y Ghowail, 1964), en tomate (Bierhuizen y Ploegman, 1967; Rush y Epstein, 1976), con algunos otros cultivos agrícolas (Mehrotra, 1971) como en girasol, cártamo, trigo y rábano (Heikal, 1977).

Respecto a las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , los resultados del presente estudio muestran una gran variabilidad bajo condiciones de estrés salino entre los genotipos estudiados (Fig. 1*c*, apartado 4.3.3). Como se mencionó anteriormente, la relación  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$  se considera un buen indicador de la tolerancia a salinidad, ya que un valor alto de esta relación, está asociado a la reducción de la permeabilidad del  $\text{Na}^+$  (Greenway y Munns, 1980; La Haye y Epstein, 1969). En el presente estudio, los genotipos clasificados como tolerantes mostraron valores altos de ésta relación en raíz y parte aérea (Fig. 3*a*, apartado 4.3.1). En otras especies como frijol (La Haye y Epstein, 1971) y soya (Wieneke y Läuchli, 1980), se encontró que un incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , inhibe la absorción de  $\text{Na}^+$  y es un factor importante en el control de la respuesta a la salinidad en vegetales. Diferencias en la concentración de éste ion en cultivares

de frijol yorimón se reportaron previamente por Horts *et al.* (1992), sin embargo, el experimento no se realizó bajo condiciones salinas. Por otro lado, Salim y Pitman (1988) reportan que las hojas de las plantas de frijol mungo acumularon una gran cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  en el tratamiento control, pero éste disminuyó cuando se incrementó la salinidad en la zona de la raíz; asimismo, las hojas mostraron mayor contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  comparado con el contenido en los tallos en todos los niveles salinos. Kurban *et al.* (1998) reportan que en *V. radiata*, las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  disminuyeron por efecto de los tratamientos salinos. Por otro lado, en *V. sinensis* se reporta que algunos parámetros del crecimiento fueron mejores en las plantas estresadas con sales, siendo aún más marcado cuando se mantuvo constante la relación  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , lo cual claramente indica que la reducción observada en el crecimiento de ésta planta no halófito en presencia de un exceso de NaCl, se atribuye principalmente a un efecto por exceso de iones (Imamul-Huq y Larher, 1984).

La evidencia de que el estrés hídrico es el principal factor de la inhibición del crecimiento de la planta debido a las sales solubles presentes en el medio de cultivo, además de los efectos tóxicos de éstas sales, proviene de muchos estudios (Greenway, 1973; Flowers *et al.* 1977; Greenway y Munns, 1980; Wyn Jones *et al.* 1984). Cuando la concentración de sal incrementa en la solución del suelo, el potencial hídrico disminuye, el potencial de turgencia de las células de la planta disminuye y las células por último, cesan de crecer (Ashraf, 1997). Bajo éstas condiciones de estrés hídrico, en general, los estomas se cierran resultando en una reducción de la fotosíntesis. Las proteínas interrumpen su síntesis y las plantas muestran un crecimiento raquítico. Considerando que las características de las respuestas fisiológicas son un importante paso para saber porque algunas especies o genotipos de especies sobreviven mientras que otras fracasan [particularmente en ambientes bajo estrés (Kramer, 1980)], asimismo, basados en los criterios de las respuestas fisiológicas tales como los efectos osmóticos (estrés hídrico), toxicidad por iones específicos y el estrés por la reducción en la disponibilidad de nutrientes, en el presente trabajo de tesis, se realizó un último experimento en invernadero. En éste se sometieron tres genotipos de frijol yorimón tolerantes y tres genotipos sensibles a la salinidad a cinco concentraciones salinas (0, 30, 60, 90 y 120 mmol NaCl/L). Las variables principales medidas fueron el contenido relativo de agua, el potencial hídrico de las hojas (bomba de Scholander), la succulencia, la concentración de minerales ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ , P, S y N) en los diferentes órganos de la planta (raíz, tallo, hojas y

pecíolo). Adicionalmente se midió el contenido de clorofila por el método indirecto (SPAD-502) y de laboratorio (Arnon, 1949), la transpiración, la conductividad estomática, la temperatura de la hoja, las cuales se midieron durante diferentes horas del día. Dado los problemas que se tuvieron al realizar las mediciones del potencial hídrico y la determinación de las curvas volumen-presión y que las determinaciones de minerales aún no se realizan, se presentan los resultados de las variables succulencia y potencial hídrico de las hojas, como una primera aproximación para fines comparativos al usar los criterios fisiológicos de relaciones hídricas y determinar el mecanismo posible de la tolerancia y sensibilidad de los genotipos; sin embargo, es necesario realizar nuevamente éste experimento para tener una mayor confiabilidad en los resultados. Los resultados del análisis de varianza para succulencia, mostraron diferencias significativas para todos los factores, excepto para la interacción de los factores genotipos por horas. En general, todos los genotipos incrementaron los valores de succulencia conforme se incrementaron los niveles salinos (Fig. 1a); sin embargo, los tres genotipos sensibles disminuyeron la succulencia en la mayor concentración salina. Por el contrario, los genotipos tolerantes, a excepción del 'CB3', continuaron incrementando la succulencia, incluso en el nivel mayor de salinidad. El hecho de que los genotipos tolerantes hayan presentado esta característica, permite aseverar que esta variable está relacionada con la tolerancia a la salinidad, ya que normalmente, la sal penetra a la planta, pero en todo caso, como las hojas se hinchan absorbiendo agua, las concentraciones no aumentan mucho, dando lugar al desarrollo de la succulencia (una proporción elevada de volumen / superficie), característica morfológica común a las halófitas, tales como la escarchada o planta de hielo (*Mesembryanthemum crystallinum*) (Flowers *et al.* 1977). De acuerdo con los resultados mostrados, es posible argumentar que los genotipos tolerantes a la salinidad pueden ajustarse y esta tolerancia es quizás debido a la capacidad de mantener la turgencia celular como se ha mostrado en el presente estudio y otros como el de Kannan y Ramani (1988), quienes encontraron que existe una evidencia de que el frijol yorimón presenta una disminución inicial y normalización rápida de la turgencia relativa. Esta característica morfológica, juega un papel muy importante en el mecanismo de la tolerancia a la salinidad en especies silvestres de tomate y por lo tanto, se le debe de dar una atención especial durante el mejoramiento genético. Las plantas silvestres de tomate, están caracterizadas por un gran incremento en la succulencia de todas sus partes bajo condiciones salinas (Tal, 1985). Esta característica además

de la habilidad para retranslocar el exceso de iones de la parte aérea a la raíz vía el floema, fue propuesta como un componente importante del mecanismo que regula la concentración de iones en la parte aérea de las halófitas (*Suaeda* –suculencia en las hojas, *Salicornia* –suculencia en el tallo) que carecen de glándulas y vejigas de sal (Jennings, 1968; Jennings, 1976; Munns *et al.* 1983; Ungar, 1991). En otras especies tales como tabaco (Kannan y Ramani, 1988), la suculencia se ha asociado también con la tolerancia a la salinidad y según Jennings (1976), las hojas de las plantas tratadas con sales son más delgadas que aquellas del control y tienen un incremento en el contenido de agua por unidad de peso seco; también recomienda el uso de ambos, el contenido de agua o peso fresco por unidad de área como una medida de la suculencia. Los genotipos de tabaco tolerantes a la salinidad mostraron un incremento en el peso fresco por unidad de área, mientras que los genotipos sensibles mostraron lo contrario (Kannan y Ramani, 1988). Un incremento en la suculencia al incrementar la salinidad, se ha encontrado en especies halófitas y no halófitas tales como el frijol (Greenway, 1968) y algodón (Jennings, 1976; Longstreth y Nobel, 1979). En frijol yorimón algunos experimentos revelan que las hojas de las plantas tratadas con NaCl muestran una disminución en la turgencia relativa, la cual es más significativa en hojas primarias; sin embargo, es interesante notar que conforme las plantas crecen, la turgencia relativa entre las primeras y segundas hojas trifoliadas no difiere entre las plantas tratadas con NaCl y las del control, sugiriendo que las plantas se han reajustado al estrés salino. Por otra parte se podría afirmar que es posible que el NaCl tenga un efecto significativo menor en trifolios más nuevos, los cuales crecen con más vigor (Kannan y Ramani, 1988). Otros estudios (Larcher *et al.* 1990) reportan que las hojas de las plantas de frijol yorimón expuestas al nivel salino mayor (200 mM de NaCl), fueron más suculentas que aquellas que se sometieron a niveles salinos inferiores (100 y 0 mM de NaCl).

Los resultados del análisis de varianza para el potencial hídrico de las hojas, mostraron diferencias significativas para todos los factores (genotipos, niveles salinos y horas de evaluación), excepto para las interacciones de salinidad y horas y la triple interacción de genotipos, salinidad y horas. En general, todos los genotipos mostraron una reducción de tipo cuadrático en el potencial hídrico al incrementarse los niveles salinos, sin embargo, los genotipos tolerantes incrementaron el potencial hídrico en el nivel salino mayor, mientras que los genotipos sensibles mostraron lo contrario (Fig. 1b). Aunque sí existen datos sobre la

respuesta fisiológica de frijol yorimón al déficit hídrico (Hall y Schulze, 1980; Shouse *et al.* 1981; Turk y Hall, 1980; Ziska *et al.* 1985; Petrie y Hall, 1992*abc*), muy poca información se ha publicado sobre la regulación de la pérdida de agua y otras características fisiológicas de la especie bajo condiciones salinas. La disminución del potencial hídrico en plantas de frijol yorimón en altas concentraciones salinas se reportó previamente por West *et al.* (1986) utilizando el genotipo ‘CB5’, el cual mantuvo potenciales hídricos foliares altos bajo condiciones salinas moderadas, mostrando además que en general, el curso diurno del potencial hídrico total y sus componentes fueron similares a otras especies. Por otro lado, la recuperación de la asimilación neta y de la transpiración en plantas de frijol yorimón (‘CB5’) después de eliminar el estrés salino, se le atribuye a la dilución del contenido iónico y a la restauración del estado hídrico de la hoja, ya que la disminución del potencial hídrico en plantas de frijol yorimón bajo condiciones salinas fue de -0.77, -0.90 y -1.137 en los niveles salinos de 43, 87 y 130 mM de NaCl L<sup>-1</sup> con respecto al nivel salino control que fue de -0.50 Mpa, lo que implica que la disminución en la asimilación neta durante el estado estable no puede atribuirse solamente a un efecto iónico directo porque el estado hídrico de la planta, juega también un papel importante cuando las plantas ya se han ajustado osmóticamente (Plaut *et al.* 1990). Literatura comparativa respecto al potencial hídrico para otras especies del mismo género tales como *V. radiata*, muestran que la salinidad (agua de mar diluida) causa una disminución del potencial hídrico hasta -1.07 MPa conforme los niveles salinos se incrementan (Kurban *et al.* 1998). Los valores comparativos de la presente investigación de los valores mayores y menores de potenciales hídricos muestran que el valor menor de potencial hídrico (-1.65 MPa) se presentó en el genotipo clasificado como sensible (‘IT89KD-288’), mientras que el valor mayor (-0.38 MPa) lo mostró uno de los genotipos clasificados como tolerante (‘CB3’) a la salinidad. El promedio general considerando todos los genotipos y los niveles salinos fue de  $-0.86 \pm -0.23$  MPa. Se ha observado que en plantas de frijol yorimón con incremento en los niveles de Ca<sup>2+</sup>, el estado hídrico (medido como el contenido relativo de agua) es mayor y la tasa de pérdida de agua es menor, asimismo, la acumulación baja de prolina en éstos tejidos podría ser debido a que el Ca<sup>2+</sup> induce la integridad de la membrana y/o mantiene un potencial hídrico alto en los tejidos (Cari *et al.* 1986). Además del papel del Ca<sup>2+</sup> en mantener la integridad de la membrana, otras razones posibles para mantener un estado hídrico alto en los tejidos por el Ca<sup>2+</sup>, puede ser la condensación de la bicapa de lípidos

haciéndola impermeable al agua y a los electrolitos, manteniendo la pared celular del plasmalema y aumentando el espesor de las membranas (Cari *et al.* 1986). En éste sentido, aunque los análisis minerales del presente estudio no se han realizado, en una primera instancia y de acuerdo a los resultados obtenidos (apartados 4.3.1 y 4.3.3), los cuales indican que los genotipos de frijol yorimón tolerantes a la salinidad mostraron una mayor concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  o una relación  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$  mayor a la de los genotipos sensibles, es posible afirmar que éste ión juega un papel muy importante en mantener potenciales hídricos altos y la integridad de la membrana en genotipos tolerantes a la salinidad bajo estrés salino. Por otro lado, la disminución mayor del potencial hídrico de los genotipos de frijol yorimón sensibles a la salinidad, puede indicar que la parte aérea de éstos genotipos fueron menos capaces de resistir la reducción del potencial hídrico inducido por la salinidad, sin embargo, también puede ser debido a un mecanismo de adaptación que le permite una absorción continua de agua del suelo, cuyo potencial hídrico disminuye con la presencia de sales solubles (Meneguzzo *et al.* 2000). Los datos mostrados en el presente estudio proporcionan un argumento convincente de que el potencial hídrico es una variable de alto valor para estudiar y ofrecer una aproximación del mecanismo de tolerancia de ciertas especies y/o genotipos de una misma especie, sobre todo aquellas donde la variabilidad genética está presente, la cual también ofrece una herramienta útil para estudiar estos mecanismos.

Finalmente, es importante destacar, aunque en el presente trabajo no se haya realizado un experimento hasta la tercera etapa del crecimiento en el frijol yorimón (la cual comprende lo que es el desarrollo del fruto y finaliza con la cosecha del grano en seco), que esta etapa es particularmente crítica para la producción de fruto, grano y semilla en los cultivos. En trabajos realizados con frijol yorimón, West y Francois (1982) encontraron que el índice de cosecha se incrementó al incrementar los niveles de salinidad esto debido a que la media de rendimiento fue menos afectada que producción de materia seca de la planta sobre el rango de salinidades probados (0, 4, 8, 12, 16 y 20 dS/m). El promedio del peso de semilla y el peso de 100 semillas no se afectaron significativamente al incrementarse los niveles de salinidad, sin embargo, la variación del número de vainas por planta se redujo conforme se incrementaron los niveles de salinidad. Otros componentes como peso seco de planta (sin semilla), número de semillas por vaina, también se redujeron conforme se incrementaron los niveles de salinidad. Esta especie no presenta reducción en su rendimiento cuando la salinidad en la zona radicular

excede una conductividad eléctrica de 4.9 dS/m y por cada incremento de 1 dS/m por arriba de este umbral, los rendimientos se reducen en un 12%. Si se tienen fuentes de agua para riego con diferentes niveles de salinidad, es necesario regar con agua de una condición baja de sal durante la germinación y en las etapas tempranas del crecimiento, que es cuando este cultivo es más sensible a la salinidad y después se puede continuar regando con agua de mala calidad durante el llenado de vainas (Hall y Frate, 1996). De acuerdo con Maas Poss (1989) el número y peso seco de vainas maduras disminuye significativamente con el incremento de los niveles de salinidad (rango de -0.05 a -1.05 Mpa, equivalente a conductividades eléctricas de 1.4 a 28 dS/m). En estas mismas condiciones, relacionando las etapas del crecimiento en el frijol yorimón, la salinidad afecta de manera muy similar al rendimiento de grano, sin embargo, la reducción en el rendimiento es más significativa en la etapa de crecimiento vegetativo que en las etapas de floración y llenado de vainas y entre éstas dos últimas no existen diferencias significativas. Sin embargo, el rendimiento de grano se afecta más por la salinidad cuando las plantas se estresan antes de la floración.

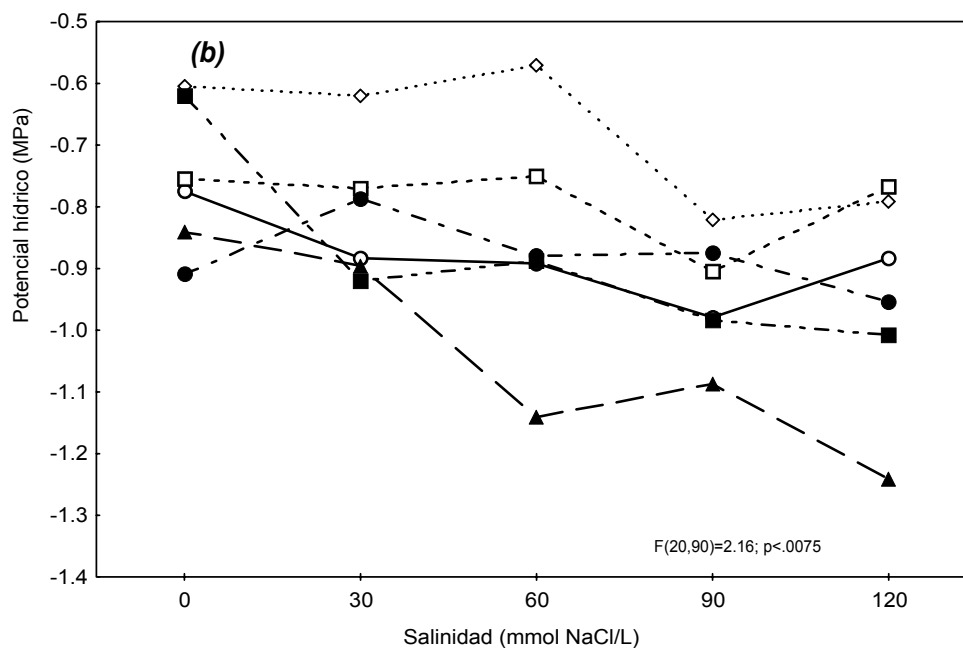
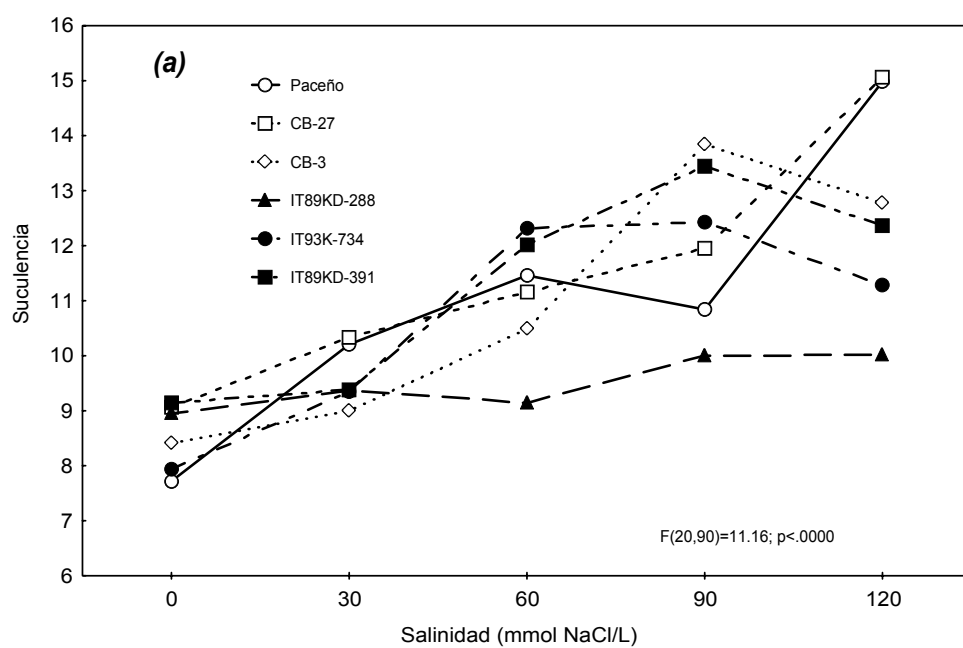


Figura 1. Efecto de la salinidad en la (a) suculencia y (b) potencial hídrico de genotipos tolerantes ('Paceño', 'CB27' y 'CB3') y sensibles ('IT89KD-288', 'IT93K-734' e 'IT89KD-391') a la salinidad.



## 6. Conclusiones

- La tasa y el porcentaje de germinación y otras variables como biomasa total, área foliar, longitud de parte aérea y longitud de raíz de plántulas disminuyeron conforme se incrementaron los niveles de salinidad. En esta etapa del crecimiento, existe una gran variabilidad genética de ésta especie en cuanto a la respuesta de éstas variables a la salinidad, permitiendo con ello, realizar un tamizado, una selección efectiva, así como una clasificación de los materiales genéticos promisorios para futuros trabajos de mejoramiento genético para estrés salino, así como su comparación con otras etapas del crecimiento de la especie bajo condiciones salinas. Se determinó que en ésta etapa del crecimiento, el retraso y la disminución del porcentaje de germinación, se debe a un efecto osmótico, más que a un efecto iónico.
- Los parámetros del crecimiento (tasa de asimilación neta, índice de área foliar y tasa de crecimiento del cultivo) determinados en plántulas de frijol yorimón bajo condiciones salinas, son parámetros efectivos para seleccionar genotipos con altas tasas de crecimiento relativo, mismos que deberán presentar una mayor producción de biomasa en condiciones salinas.
- La tasa y el porcentaje de germinación, son variables que permiten tamizar genotipos emparentados, seleccionar genotipos como fuente de germoplasma para su posterior mejoramiento genético para tolerancia a salinidad y para clasificar genotipos por su tolerancia y sensibilidad a este estrés en altas concentraciones salinas. Son variables que pueden medirse con mayor rapidez, facilidad y efectividad dada la expresión fenotípica aunada a la variabilidad genética mostrada por los materiales de frijol yorimón comparados en esta etapa del crecimiento.
- La salinidad retrasó la tasa de emergencia, disminuyó el porcentaje de emergencia, así como la relación raíz / parte aérea y biomasa total de los genotipos de yorimón evaluados en esta etapa. La tasa y el porcentaje de emergencia, también son variables que permiten tamizar, seleccionar y clasificar genotipos de frijol yorimón para tolerancia y sensibilidad a la salinidad. Al igual que en germinación, en emergencia, también los materiales comparados mostraron una gran variabilidad genética bajo condiciones salinas. Dado que

los genotipos clasificados como tolerantes a la salinidad en germinación, también se clasificaron como tolerantes en emergencia, esto determina que la selección de materiales tolerantes y sensibles a la salinidad en las etapas iniciales del crecimiento de frijol yorimón, puede efectuarse exitosamente y proporcionar una técnica efectiva para realizar tamizados, selecciones y clasificaciones rápidas de material genético para tolerancia a este estrés.

- Las variables altura de planta, área foliar, peso fresco y seco de raíz y parte aérea, longitud de masa de raíces, número de hojas trifoliadas y biomasa total también disminuyeron en plantas de frijol yorimón evaluadas en la etapa inicial del crecimiento bajo condiciones controladas y en altas concentraciones salinas. Las concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  fueron menores en parte aérea que en raíz en los genotipos clasificados como tolerantes, por lo que esta especie puede considerarse como excluidor del  $\text{Na}^+$  pero no del  $\text{Cl}^-$ , reteniendo el  $\text{Na}^+$  en las raíces para proteger la parte aérea; la concentración del  $\text{Cl}^-$  fue mayor en parte aérea en los genotipos clasificados como sensibles a la salinidad. Las relaciones  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$  se consideran también variables indicadoras para realizar selección de materiales tolerantes y sensibles a la salinidad. La tolerancia a la salinidad en frijol yorimón responde de manera diferencial de acuerdo a las condiciones ambientales de evaluación y a la etapa fenológica, sin descartar la influencia del efecto genético de cada uno de los materiales. No se presentó una relación respecto a los genotipos clasificados como tolerantes en germinación y emergencia con los tolerantes en la etapa inicial del crecimiento bajo condiciones controladas y aparentemente la tolerancia a la salinidad en frijol yorimón difiere con la edad, las plantas tienden a ser más sensibles durante las etapas iniciales de su crecimiento vegetativo y se va incrementando esa tolerancia conforme van madurando.
- El método de selección de genotipos de frijol yorimón para tolerancia a salinidad basados en la sobrevivencia de plántulas, es efectivo, dado que los genotipos clasificados como tolerantes por mostrar mayor sobrevivencia en concentraciones salinas altas, también mostraron tolerancia debido a una absorción y concentración menor de iones tóxicos ( $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ) en los diferentes órganos de la planta, mayor cantidad de biomasa y una reducción en la pérdida excesiva de agua al mantener potenciales hídricos y tasas de transpiración bajas en altas concentraciones salinas.

## 7. Perspectivas

- ◆ Es necesario someter una mayor cantidad de genotipos de frijol yorimón (tolerantes y sensibles) a diferentes soluciones osmóticas utilizando NaCl y PEG-8000 para evaluar ésta respuesta en las etapas de germinación, emergencia y establecimiento de plántulas para corroborar si el efecto es de tipo osmótico, iónico o la interacción de ambos.
- ◆ Es deseable determinar la tolerancia de genotipos de frijol yorimón en las etapas subsecuentes (floración, llenado de vainas y finalmente el rendimiento y sus componentes principales), así como en la germinación, emergencia y crecimiento vegetativo inicial, los cuales deberán realizarse bajo condiciones de campo.
- ◆ Como una posible liberación de variedades, se deben comparar los genotipos de frijol yorimón en condiciones de campo en otros ambientes agro ecológicos de la región durante dos o más fechas de siembra, para evaluar la estabilidad de cada uno de ellos a través del tiempo y el espacio.
- ◆ Se requiere realizar estudios adicionales principalmente en condiciones de campo, sobre el efecto de la salinidad en el metabolismo del carbono, específicamente el proceso de la fotosíntesis, la transpiración, conductividad estomática y pigmentos como clorofila y carotenoides.
- ◆ Debido a que en los procesos fisiológicos de las plantas intervienen enzimas, es deseable realizar estudios en ésta especie sobre la respuesta enzimática bajo estrés salino en cada una de las etapas fenológicas del cultivo.
- ◆ Se deben evaluar los efectos de la acumulación de iones en todas las etapas fenológicas a través del tiempo en genotipos de frijol yorimón tolerantes y sensibles a la salinidad.
- ◆ Es necesario realizar trabajos sobre la absorción y retranslocación de iones (principalmente  $\text{Na}^+$ ) en las diferentes partes de la planta en las etapas del crecimiento vegetativo y reproductivo de genotipos tolerantes y sensibles a la salinidad.

## 8. Referencias Bibliográficas

- Abdel-Rahman AM, Abdel-Hadi AH. 1984. Possibilities to reduce adverse effects of salinity by indole-3-acetic-acid. *Biologia Plantarum* **26**:81-87.
- Abdulahi S, Egeh AO. 1988. Growth, yield and nutrient content of mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek], soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] and cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] under different levels of salinity and nitrogen. Thesis (M.S. in Agronomy). Philippines Univ., Los Baños, College, Laguna (Philippines).
- Abel GH, MacKenzie AJ. 1964. Salt tolerance of soybean varieties (*Glycine max* L. Merrill) during germination and later growth. *Crop Sci* **4**:157-161.
- Abel GH. 1969. Inheritance of the capacity for chloride inclusion and chloride exclusion by soybeans. *Crop Sci* **9**:697-698.
- Abul-Naa AA, Omran MS. 1974. Salt tolerance of seventeen cotton cultivars during germination and early seedling development. *Aker und Pflanzenbau* **140**:229-236.
- Aceves NLA. 1981. Los terrenos ensalitrados y los métodos para su recuperación. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Estado de México, México. 244 p.
- Agassi M, Shainberg I, Morin J. 1981. Effect of electrolyte and soil sodicity on infiltration rate and cost formation. *Soil Sci Soc Am J* **45**:848-851.
- Aguilera CM, Martínez E. 1996. Relaciones agua, suelo, planta, atmósfera. Universidad Autónoma Chapingo, México. 256p.
- Allen MB. 1959. Possible function of chlorophyll b. Studies with green algae that lack chlorophyll b. In 'Photochemical apparatus its structure and function' (Dennies R, Browns R. Eds.) Report of symposium held. June 16-18 Brookhaven Symposium.
- Amzallag GN, Lerner HR, Poljakoff-Mayber A. 1990. Induction of increased salt tolerance in *Sorghum bicolor* by NaCl pretreatment. *Journal of Experimental Botany* **41**:29-34.
- Apte SK, Thomas J. 1997. Possible amelioration of coastal soil salinity using halotolerant nitrogen-fixing Cyanobacteria. *Plant Soil* **189**:205-211.
- Arnon DI. 1949. Cooper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* **24**:1-15.
- Ashford AE, Gubler F. 1984. Mobilization of polysaccharide reserves from endosperm. In 'Seed physiology' (Ed. Murray DR). New York, Academic Press, USA, Vol. 2, pp. 117-162.

- Ashraf M, McNeilly T, Braddshaw AD. 1989. The potential for evolution of tolerance to NaCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> and seawater in four grasses species. *New Phytol* **112**, 245-254.
- Ashraf M. 1997. Improvement of salt tolerance in some native pulse crops. In: Strategies for improving salt tolerance in higher plants. Jaiwal PK, Singh RP, Gulati A (Ed.). Science Publishers, Inc. USA. pp. 413-434.
- Ayala CF, O'Leary JW. 1995. Growth and physiology of *Salicornia bigelovii* Torr. at suboptimal salinity. *Int J Plant Sci* **156**:197-205.
- Ayers AD. 1952. Seed germination as affected by soil moisture and salinity. *Agronomy Journal* **44**:82-84.
- Ayers AD, Brown JW, Wadleigh CH. 1952. Salt tolerance of barley and wheat in soil plots receiving several salinization regimes. *Agronomy Journal* **44**:307-310.
- Ayers RS, Westcot DW. 1985. Water quality for agriculture. FAO. Irrigation and drainage paper 29 (Rev. 1), Food and Agriculture Organization of United Nations, Rome.
- Aziz I, Khan MA. 1998. Effect of seawater on the growth, nutrient, and water relations of *Ceriops tagal*. *Mangroves and Salt Marshes*.
- Aziza S, El-kholy, Hall EA, Mohsen AA. 1997. *Crop Sci* **37**:456.
- Babalola O. 1980. Water relations of three cowpea cultivars (*Vigna unguiculata* L.). *Plant and Soil* **56**:59-69.
- Badía VD. 1996. Manejo agronómico de cultivos bajo condiciones salinas. Apuntes del curso de Manejo Sustentable de Suelos Agrícolas. Universidad Autónoma de Baja California Sur, Área Interdisciplinaria de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Agronomía. La Paz, BCS, México. 57p.
- Bal AR, Chattopadhyay NC. 1985. Effects of NaCl and PEG 6000 on germination and seedling growth of rice (*Oriza sativa* L.). *Biología Plantarum* **27**:65-69.
- Balasubramanian V, Sinha SK. 1976. Effects of salt stress on growth, nodulation and nitrogen fixation in cowpea and mungo beans. *Physiol Plant* **36**:197.
- Ball MC, Farquhar GD. 1984. Photosynthetic and stomatal responses of two mangrove species, *Aegiceras corniculatum* and *Avicennia marina* to long-term salinity and humidity conditions. *Plant Physiol* **74**:1-6.
- Behboudian MH, Torokfalvy E, Walker RR. 1986. Effects of salinity on ionic content, water relations and gas exchange parameters in some citrus scion-rootstock combinations. *Sci Horti* **28**:105-116.

- Behling JP, Gabelman WH, Gerloff GC. 1989. The distribution and utilization of calcium by two tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) lines differing in calcium efficiency when grown under low-Ca stress. *Plant and Soil* **113**:189-196.
- Bernstein L. 1975. Effects of salinity and sodicity on plant growth. *Ann Rev Phytopathol* **13**:295-312.
- Bernstein L, Francois LE, Clark RA. 1974. Interactive effects of salinity and fertility on yields of grains and vegetables. *Agron J* **66**:412-421.
- Bernstein L, Hayward HE. 1958. Physiology of salt tolerance. *Ann Rev Plant Physiol* **9**:25-46.
- Bernstein L. 1963. Osmotic adjustment of plants to saline media. II. Dynamic phase. *Amer J Bot* **50**:360-369.
- Bernstein L, Ehlig CF, Clark RA. 1969. Effect of grape rootstocks on chloride accumulation in leaves. *J Am Soc Hortic Sci* **94**:584-590.
- Bewley JD, Black M. 1978. Physiology and biochemistry of seeds. New York, Springer-Verlag, Vol. 1. pp. 177-244.
- Bierhuizen JF, Ploegman C. 1967. Salt tolerance of tomato. *Meded Dir Tuinbouw Neth* **30**:302-310.
- Bingham, FT, Fenn LB, Oertli JJ. 1968. A sand culture study of chloride toxicity to mature avocado trees. *Proc Soil Sci Soc Am* **32**:249-252.
- Binzel ML, Hasegawa PM, Handa AK, Bressan RA. 1985. Adaptation of tobacco cell to NaCl. *Plant Physiology* **79**:118-125.
- Bliss RD, Platt-Aloia KA, Thompson WW. 1984. Changes in Plasmalemma organization in cowpea radicle during imbibition in water and NaCl solutions. *Plant Cell Environ* **7**: 606-606.
- Bole JB, Wells SA. 1979. Dryland soil salinity: effect on the yield and yield components of 6-row barley, 2-row barley, wheat and oats. *Canadian Journal Soil Science* 11-17.
- Boyer JS. 1982. Plant productivity and environment. *Science* **218**:443-448.
- Cari M, Gupta K, Prasad TG, Krishna-Sastry KS, Udaya-Kumar M. 1986. Enhancement of water status by calcium pretreatment in groundnut and cowpea plants subjected to moisture stress. *Plant and Soil* **109**:109-114.
- Chapman SR, Hart LR, Nardi B (1978) Rate of imbibition as a tool in screen for salt tolerance. *Cereal Research Comm.* **6**:241-247.

- Chartzoulakis K, Klapaki G. 2000. Response of two greenhouse pepper hybrids to NaCl salinity during different growth stages. *Sci Hort*, 86:247-260.
- Cheeseman JM. 1988. Mechanisms of salinity tolerance in plants. *Plant Physiol* **87**:547-550.
- Chowdhury JB, Jain S, Jain RK. 1993. Biotechnological approaches for developing salt tolerant field crops. *J Plant Biochem Biotech* **2**:1-7.
- Cony MA, SO Trione. 1998. Inter- and intraspecific variability in *Prosopis flexuosa* and *P. chilensis*: seed germination under salt and moisture stress. *J Arid Environ* **40**:307
- Cramer GR, Läuchli A, Polito VS. 1985. Displacement of Ca<sup>2+</sup> by Na<sup>+</sup> from plasmalemma of root cells. *Plant Physiol* **79**:207-211.
- De Villiers AJ, Van Rooyen MW, Theron GK, Claassens AS. 1997. Tolerance of six namaqualand pioneer species to saline soils conditions. *South Afr J Plant Soil* **14**:38-42.
- Dewey DR. 1960. Salt tolerance of twenty-five strains of Agropyron. *Agronomy Journal* **52**:631-635.
- Dewey DR. 1962. Breeding crested wheatgrass for salt tolerance. *Crop Science* **2**:403-407.
- Díaz FA, Ortégón MA. 1997. Guía para la producción de vaina y grano de chícharo de vaca en el norte de Tamaulipas. INIFAP. Centro de Investigación Regional del Noreste, Campo Experimental Río Bravo. Publicación No. 21.
- Downton WJS. 1977. Chloride accumulation in different species of grapevine. *Sci Hort* **7**:249-253.
- Dumbroff EB, Cooper A. 1974. Effects of salt stress applied in balanced nutrient solutions at several stages during growth of tomato. *Bot Gaz* **135**:219-224.
- Egeh AO, Zamora OB. 1992. Growth and nutrient content of mugbean (*Vigna radiata* L.), cowpea (*Vigna unguiculata* L.) and soybean (*Glycine max* L.) under different levels of salinity. *Philippine Journal of Crop Science* **17**:75-83.
- Ehlers JD, Hall AE, Patel PN, Roberts PA, Matthews WC. 2000. Registration of 'California Blackeye 27' cowpea. *Crop Science* **40**:854- 855.
- Elhaak MA, Migahid MM, Wegmann K. 1997. Ecophysiological studies on *Euphorbia palias* under soil salinity and seawater spray treatments. *J Arid Environ* **35**:459-471.
- El-Saidi. 1997. Salinity and its effect on growth, yield and some physiological processes of crop plants. In 'Strategies for improving salt tolerance in higher plants'. Jaiwal PK, Singh PS, Gulati A. (Eds.). Science Publishers, Inc. USA. pp. 111-127.

- Enéas-Filho J, Oliveira JOB, Prisco JT, Gomes-Filho E, Nogueira CM. 1995. Effects of salinity *in vivo* and *in vitro* on cotyledonary galactosidases from *Vigna unguiculata* (L.) Walp. during germination and seedling establishment. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* **7**:134-142.
- Epstein E, Norlyn, JD. 1977. Seawater-based crop production: a feasibility study. *Science* **197**:249-251.
- Epstein E, Norlyn JD, Rush DW, Kingsburg RW, Kelley DB, Cunningham GA, Wrena AF. 1980. Saline culture of crops: a genetic approach. *Science* **210**:399-404.
- Escolero FOA. 1998. Situación geohidrológica del valle de Santo Domingo, B.C.S. In: Primer foro de producción agropecuaria en el Noroeste de México y sus limitantes. El agua y la Comercialización. Memoria. Cd. Constitución, B.C.S. p. 11-33.
- FAO. 1996. Alimentos para todos. Cumbre mundial sobre la alimentación. 13-17 noviembre, Roma, Italia. 64 p.
- Fernandes de Melo D, Jolivet Y, Rocha Facanha A, Gomes-Filho E, Silva-Lima M, Dizengremel P. 1994. Effect of salt stress on mitochondrial energy metabolism of *Vigna unguiculata* cultivars differing in NaCl tolerance. *Plant Physiol Biochem* **32**:405-412.
- Flowers TJ, Troke PF, Yeo AR. 1977. The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annu. Rev Plant Physiol* **28**:89-121.
- Flowers TJ, Yeo AR. 1981. Variability in the resistance of sodium chloride salinity within rice varieties. *New Phytol* **88**:363-373.
- Flowers TJ, Yeo AR. 1986. Ion relations of plants under drought and salinity. *Aust J Plant Physiol* **13**:75-91.
- Flowers, TJ, Yeo AR. 1997. Breeding for salt resistance in plants. In 'Strategies for improving salt tolerance in higher plants'. (Ed. Jaiwal PK, Singh RP, Gulati A) pp. 247-264. (Science Publishers, Inc.).
- Francois LE, Bernstein L. 1964. Salt tolerance of safflower. *Agronomy Journal* **56**:38-40.
- Francois LE. 1984. Salinity effects on germination, growth, and yield of turnips. *Hort Sci* **19**:82-84.
- Francois LE. 1987. Salinity effects on asparagus yield and vegetative growth. *J Amer Soc Hort Sci* **112**:432-436.
- Francois LE. 1989. Boron tolerance of snap bean and cowpea. *J Amer Soc Hort Sci* **114**:615-619.



- Francois LE, Donovan TJ, Maas EV. 1990. Salinity effects on emergence, vegetative growth, and seed yield of guar. *Agron J* **82**:587-592.
- Freeman C. 1973. Germination response of a Texas population of Ocotillo (*Fouquieria splendens* Engelm) to constant temperature, water stress, pH and salinity. *The Amer Midl Nat* **89**:252-256.
- García-Tiburcio H, Troyo-Diéguez E. 1993. Efectos del decremento instantáneo de la salinidad sobre la germinación de *Salicornia bigelovii* Torr. en laboratorio. *PYTON, International Journal of Experimental Botany* **54**:127-137.
- Garg BK, Garg OP. 1980. Sodium carbonate and bicarbonate induced changes in growth, chlorophyll, nucleic acids and protein content in leaves of *Pisum sativum*. *Photosynth* **14**:594-598.
- Gill KS, Dutt SK. 1982. Physiological basis of salt tolerance: effect of salinity on germination, grain yield, quality and chemical composition in barley. *Science and Culture* **48**:323-325.
- Glenn EP, O'Leary JW. 1984. Relationship between salt accumulation and water content of dicotyledonous halophytes. *Plant Cell and Environ* **7**:253-261.
- Gomes-Filho E, Prisco JT. 1978. Effects of NaCl salinity *in vivo* and *in vitro* on the proteolytic activity of *Vigna sinensis* (L.) Savi cotyledons during germination. *Revista Brasileira de Botânica* **1**:83-88.
- Gomes-Filho E, Prisco JT, Campos FAP, Enéas-Filho J. 1983. Effects of NaCl salinity *in vivo* and *in vitro* on ribonuclease activity of *Vigna unguiculata* cotyledons during germination. *Physiologia Plantarum* **59**:183-188.
- Gomes-Filho E. 1985. Efeito da salinidade na actividade ribonucleasica de cotiledones de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. Pitiuba durante a germinacao. PhD thesis, Instituto de Biología/UNICAMP, Sao Paulo, Brasil.
- Gomes-Filho E, Sodek L. 1988. Effect of salinity on ribonuclease activity of *Vigna unguiculata* cotyledons during germination. *Journal of Plant Physiology* **132**, 307-311.
- Gomes-Filho E, Eneas-Filho J, Prisco JT. 1996. Effects of osmotic stress on growth and ribonuclease activity in *Vigna unguiculata* (L.) Walp. seedlings differing in stress tolerance. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* **8**:51-57.
- Gordon DM. 1993. Diurnal water relations and salt content of two contrasting mangroves growing in hypersaline soils in tropical-arid Australia. *In*: 'Towards the Rational Use of High Salinity Tolerant Plants'. Lieth H and Al Masoom, A. (Eds.), Vol. 1, pp 193-216. Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

- Grainferberg A, Giustiniani L, Temperini O, Lipucci di Paola M. 1995. Allocation of Na, Cl, K and Ca within plant tissues in globe artichoke (*Cynara scolimus* L.) under saline-sodic conditions. *Sci Hort* **63**:1-10.
- Gratani L. 1992. A non-destructive method to determine chlorophyll content of leaves. *Phosynth* **26**:469-473.
- Grattan SR, Maas EV. 1985. Root control of leaf phosphorus and chloride accumulation in soybean under salinity stress. *Agron J* **77**:890-895.
- Grattan SR, Grieve CM. 1994. Mineral nutrition acquisition and response by plants grown in saline environments. In: 'Handbook of Plant and Crop Stress'. Pessaraki M (Ed.). Marcel Dekker, New York, pp 203-226.
- Grattan SR, Grieve CM. 1999. Salinity-mineral nutrient relations in horticultural crops. *Scientia Horticulturae* **78**:127-157.
- Gravois KA, Helms RS. 1992. Path analysis of rice yield and yield components as affected by seeding rate. *Agron J* **84**:1-4.
- Greenway H. 1965. Plant response to saline substrates. VII. Growth and ion uptake throughout plant development in two varieties of *Hordeum vulgare*. *Aust J Biol Sci* **18**:763-779.
- Greenway H, Gunn A, Pitman MG, Thomas DA. 1965. Plant response to saline substrate. VI. Chloride, sodium and potassium uptake and distribution within the plant during ontogenesis of *Hordeum vulgare*. *Aust J Biol Sci* **18**:525-540.
- Greenway H. 1968. Growth stimulation by high chloride concentrations in halophytes. *Israel J Bot* **17**:169-178.
- Greenway H. 1973. Salinity, plant growth, and metabolism. *J. Aust Inst Agric Sci* **39**:24-34.
- Greenway H, Munns R. 1980. Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Ann Rev Plant Physiol* **31**:149-190.
- Gronwald JW, Suhayda CG, Tal M, Shannon MC. 1990. Reduction in plasma membrane ATPase activity of tomato roots by salt stress. *Plant Sci* **66**:145-153.
- Grover A, Pareek A, Maheshwari SC. 1993. Molecular approaches for genetically engineering plants tolerance to salt stress. *Proc Indian Nat Sci Acad* **59**:113-127.
- Grumet R, Hanson AD. 1986. Genetic evidence for an osmoregulator function of glycinebetaine accumulation in barley. *Aust J Plant Physiol* **13**:353-364.
- Hall EA, Dancette C. 1978. Analysis of fallow-farming systems in semi-arid Africa using a mode to simulate the hydrologic budget. *Agron J* **70**:816.

- Hall AE, Schulze ED. 1980. Drought effects on transpiration and leaf water status of cowpea in controlled environments. *Aust J Plant Physiol* **7**:141.
- Hall AE, Frate CA. 1996. 'Blackeye bean production in California'. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources. Publication No.21518. 23.
- Hartmann HT, Kester DE. 1971. Propagación de plantas, principios y prácticas. Trad. Marino AA. CECSA, México. 809 p.
- Harvey DMR. 1985. The effects of salinity on ion concentrations within the root cells of *Zea mays* L. *Planta* **165**:242-248.
- Hayward HE, Spurr WBN. 1943. Effects of osmotic concentration of substrate on the entry of water into corn roots. *Bot Gaz* **105**:152-164.
- Heikal MMD. 1977. Physiological studies on salinity. VI. Changes in water content and mineral composition of some plants over a range of salinity stresses. *Plant Soil* **48**:223-232.
- Hernández FC, Troyo DE. 1985. Establecimiento de yorimuni [*Vigna unguiculata* (L) Walp.] en dos localidades irrigadas con aguas subterráneas de elevados niveles de salinidad. In 'Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo'. Universidad Autónoma de Baja California Sur. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C. p. 60.
- Hernández EF, Troyo-Diéguez E. 1988. *XI Congreso Nac Fitogenética, México*. 134.
- Hernández FC. 1991. Frijol Vigna: recurso genético de México. *Hortalizas Frutas y Flores* **8**:22-31.
- Hernández JA, Almansa MS, del Río L, Sevilla F. 1993. Effect of salinity on metalloenzymes of oxygen metabolism in two leguminous plants. *J Plant Nutr* **16**:2539-2554.
- Hochmuth GJ. 1984. Variation in calcium efficiency among strains of cauliflower. *J Am Soc Hortic Sci* **109**:667-672.
- Horst WJ. 1982. Quick screening of cowpea genotypes for manganese tolerance during vegetative and reproductive growth. *Z Pflanzenernahr Bodenk* **145**:423-435.
- Horst GL, RM Taylor. 1983. Germination and initial growth of Kentucky bluegrass in soluble salts. *Agron J* **75**:679.
- Horst WJ, Currie C, Wissemeier H. 1992. Differences in calcium efficiency between cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cultivars. *Plant and Soil* **146**:45-54.

- Imamul-Huq SM, Larher F. 1983a. Effect of NaCl salinity on the growth and the nitrogen status of cowpea (*V. sinensis* L.) and mung bean (*P. aureus* L.). *Z Pflanzenphysiol* **112**:79-87.
- Imamul-Huq SM, Larher F. 1983b. Osmoregulation in higher plants: Effect of NaCl salinity on non-nodulated *Phaseolus aureus* L. I. Growth and mineral content. *New Phytol* **93**:203-208.
- Imamul Huq SM, Larher F. 1984. Osmoregulation in higher plants: effects of maintaining a constant Na:Ca ratio on the growth, ion balance and organic solute status of NaCl stressed cowpea (*Vigna sinensis* L.). *Z Pflanzenernaehr Bd* **113**:163-176.
- Imamul-Huq SM, Larher F. 1985. Dynamics of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, and proline accumulation in salt treated *Vigna sinensis* (L.) and *Phaseolus aureus* (L.). *J Plant Physiol* **119**:133-147.
- Imbamba SK. 1973. Response of cowpeas to salinity and (2-chlorethyl) trimethyl-ammonium chloride (CCC). *Physiol Plant* **28**:346.
- INEGI, 1996. Estudio hidrológico del Estado de Baja California Sur. INEGI, Gobierno del Estado de Baja California Sur. 206 p.
- International Seed Testing Association (ISTA). 1985. Rules for seed testing. *Seed Science and Technology* **13**:299-520.
- Izzo R, Navari-Izzo F, Quartacci MF. 1991. Growth and mineral absorption in maize seedlings as affected by increasing NaCl concentrations. *J Plant Nutr* **14**:687-699.
- Jacoby B. 1964. Function of bean roots and stems in sodium retention. *Plant Physiol* **39**:445-449.
- Jann RC, Amen DR. 1977. What is germination? *In*: 'Physiology and biochemistry of seed dormancy and germination'. Khan AA (Ed.). Elsevier/North Holland Biomedical Press, Holanda. 7-27.
- Jennings DH. 1968. Halophytes, succulence and sodium in plants – a unified theory. *New Phytol* **67**:899-911.
- Jennings DH. 1976. The effects of sodium chloride in higher plants. *Biol Rev* **51**:453-486.
- Jones RA, Qualset CO. 1984. Breeding crops for environmental stress tolerance. *In*: 'Applications of genetic engineering to crop improvement' (Collins GB, Petolino JG. Eds.) M Nijhoff/W Junk, Dordrecht, pp. 305-340.
- Jones RW, Pike LM, Yourman LF. 1989. Salinity influences cucumber growth and yield. *J Amer Soc Hort Sci* **114**:547-551.
- Joshi GV. 1976. Studies in photosynthesis under saline conditions, PL 480 Project Report.

- Kaddah MT, Ghowail SI. 1964. Salinity effects on the growth of corn at different stages of development. *Soil Sci* **96**:105-11.
- Kaddah MT. 1963. Salinity effects on growth of rice at the seedling and inflorescence stages of development. *Soil Sci* **96**:105-111.
- Kafkafi U. 1987. Nutrition des plantes dans des conditions de salinité. *Fertilisants et Agriculture* **95**:3-18.
- Kaiser WM, Weber H, Sauer M. 1983. Photosynthetic capacity, osmotic response and solute content of leaves and chloroplast from *Spinacia oleracea* under salt stress. *Z Pflanzenphysiol* **113**:15-27.
- Kang MS, JD Miller, PYP Tai. 1983. Genetic and phenotypic path analysis and heritability in sugarcane. *Crop Sci* **23**:643-647.
- Kannan S, Ramani S. 1988. Evaluation of salt tolerance in cowpea and tobacco: effects of NaCl on growth, relative turgidity and photosynthesis. *J Plant Nutr* **11**:435-448.
- Karaki AGN, Clark RB, Sullivan CY. 1995. Effects of phosphorus and water stress levels on growth and phosphorus uptake of bean and sorghum cultivars. *J Plant Nutr* **18**:563-578.
- Kempthorne O. 1969. 'An introduction to genetic statistics'. Iowa State Univ, P Ames Iowa.
- Khan MA, Ungar IA, Showalter AM. 2000. The effect of salinity on the growth, water status, and ion content of a leaf succulent perennial halophyte *Suaeda fruticosa* (L.) Forsk. *J Arid Environ* **45**:73-84.
- Kirchhoff WR, Hall AE, Roose ML. 1989. Inheritance of a mutation influencing chlorophyll content and composition in cowpea. *Crop Sci* **29**:105-108.
- Koyro HW, Stelzer R, Huchzermeyer B. 1993. ATPase activities and membrane fine structure of rizodermal cell from *Sorghum* and *Spartina* roots grown under mild stress. *Bot Acta* **106**:110-119.
- Kramer PJ. 1980. Drought, stress, and the origin of adaptations. In: 'Adaptations of plants to water and high temperatures stress'. Turner NC, Kramer PJ. (Eds.). John Wiley & Sons, Inc, New York, USA). pp. 7-20.
- Kramer PJ. 1983. 'Water relations of plants'. (Academic Press: New York, USA). 359 p.
- Kuiper PJC. 1968. Lipids in grape roots in relation to chloride transport. *Plant Physiol* **43**:1367-1371.
- Kumar A, Mishra SN, Verma JS. 1983. Correlation and path analysis in cowpea. *Crop Improv* **10**:36-39.

- Kumar V, Bala R, Nafees G. 1990. Correlation and path analysis in cowpea. *Acta Bot Indica* 18:290-.
- Kurban H, Saneoka H, Nehira K, Adilla R, Fujita K. 1998. Effect of salinity on growth and accumulation of organic and inorganic solutes in the leguminous plants *Alhagi pseudoalhagi* and *Vigna radiata*. *Soil Sci Plant Nutr* 44:589-597.
- La Haye PA, Epstein E. 1969. Salt toleration by plants: Enhancement with calcium. *Science* 166:395-396.
- La Haye PA, Epstein E. 1971. Calcium and salt toleration by bean plants. *Physiol Plant* 25:213-218.
- Larcher W, Wagner J, Thammathaworn A. 1990. Effects of superimposed temperature stress on *in vivo* chlorophyll fluorescence of *Vigna unguiculata* under saline stress. *J Plant Physiol* 136:92-102.
- Läuchli A, Wieneke J. 1979. Studies on the growth and distribution of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> in soybean varieties differing in salt tolerance. *Z Pflanzenernähr Bodenk* 142:3-13.
- Läuchli A. 1979. Regulation des salztransportes und salzausschließung in glyckophyten und halophyten. *Ber Deutsch Bot Ges* 92:87-94.
- Läuchli A. 1984. Salt exclusion: an adaptation of legumes for crops and pastures under saline conditions. In: 'Salinity tolerance in plants. Strategies for crop improvement'. Staples CR, Toenniessen GH (Eds.). John Wiley & Sons, Inc. pp. 171-187.
- Le Saos J. 1976. Migration du calcium vers les organes aériens chez un halophyte *Cochlearia anglica* L. I. Effects du NaCl. *Physiol Veg* 14:381-390.
- Lessani H, Marschner H. 1978. Relation between salt tolerance and long distance transport of sodium and chloride in various crop species. *Aust J Plant Physiol* 5:27-37.
- Little TM, Hills FJ (1989) 'Statistical methods in agricultural research'. Versión en español. 'Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura'. Ed. Trillas. México.
- Lloyd J, Kriedemann PE, Syvertsen JP. 1987. Gas exchange, water relations and ion concentrations of leaves on salt stressed 'Valencia' oranges, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, *Aust J Plant Physiol* 14:387-396.
- Long SP, Baker NR. 1986. In: Baker, NR. & Long, SP (ed.), Elsevier, Amsterdam. 63.
- Longstrech DJ, Nobel PS. 1979. Salinity effects on leaf anatomy. *Plant Physiol* 63:700-703.
- López AR, Yamada S, Yamanouchi M. 1999. Comparison of sodium uptake by and transport in detached plant parts among several crops. *Soil Sci Plant Nutr* 45:659-668.

- López TM. 1995. Resistencia de las plantas. Trillas, México. pp. 20-39.
- Lunin J, Gallatin MH, Batchelder AR. 1961. Effect of stage of growth at time of salinization on growth and chemical composition of beans. I. Total salinization accomplished in one irrigation. *Soil Sci* **91**:194-202.
- Lunin J, Gallatin MH, Batchelder AR. 1963. Saline irrigation of several vegetable crops at various growth stages. I. Effect on yields. *Agron J* **55**:107-114.
- Lush WM, Rawson HM. 1979. Effects of domestication and region of origin on leaf gas exchange in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] *Photosynthetica* **13**:419.
- Lush WM. 1979. Aspects of the evolution of cowpeas [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. Ph.D. thesis. Australia National University, Canberra.
- Lynch J, Läuchli A. 1984. Potassium transport in salt-stressed barley roots. *Planta* **161**:295-301.
- Maas EV, Hoffman GJ. 1977. Crop salt tolerance - current assessment. *Journal of the Irrigation and Drainage Division American Society of Civil Engineers*. **103**:115-134.
- Maas EV, Nieman RH. 1978. Physiology of plant tolerance to salinity. In: 'Crop tolerance to suboptimal land conditions'. Jung GA, Ed. American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin. Pp. 277-299.
- Maas EV. 1981. Salinity and crop productivity. California Plant and Soil Conference. New Horizons in Agriculture. Sponsored by California Chapter American Society of Agronomy, January 28-30. Sacramento Inn, Sacramento, California. 10 p.
- Maas EV, Hoffman GJ, Chaba GD, Poss JA, Shannon MC. 1983. Salt sensitivity of corn at various growth stages. *Irrig Sci* **4**:45-57.
- Maas EV. 1986. Salt tolerance of plants. *Applied Agricultural Research* **1**:12-26.
- Maas EV, Poss JA. 1989a. Salt sensitivity of wheat at various growth stages. *Irrig Sci* **10**:29-40.
- Maas EV, Poss JA. 1989b. Salt sensitive of cowpea at various growth stages. *Irrigation Science* **10**:313-320.
- Maas EV, Grieve CM. 1990. Salt tolerance of plants at different growth stages. In: 'Proceedings of the International Conference', Tando Jam, Pakistan, January 7-11, 27p.
- Maas EV. 1990. Crop salt tolerance. In: 'Agricultural Salinity and Assessment Management'. (Ed. Tanji KK), Am Soc Civil Eng, Manuals and Reports on Engineering No. 71. ASCE, NY, pp. 262-304.

- Madrigal LP, Wiegand CL, Zavaleta CR, Neck JS. 1996. Las imágenes de satélite como una alternativa para identificar la salinidad del suelo en los distritos de riego. TEKTRAN, United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service.
- Maggio A, Reddy MP, Joly RJ. 2000. Leaf gas exchange and solute accumulation in the halophyte *Salvadora persica* grown at moderate salinity. *Environm Exp Bot* **44**:31-38.
- Maguire JD. 1962. Speed of germination - aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science* **2**:176-177.
- Maliwal GL, Paliwal KV. 1982. Salt tolerance of some mungbean (*Vigna radiata*), (*Vigna mungo*) and guar (*Cyamopsis tetragonoloba*) varieties at germination and early growth stages. *Legume Res* **5**:23-30.
- Manohar MS. 1966. Effect of osmotic systems on the germination of peas (*Pisum sativum* L.) *Planta* **71**:81.
- Mansour MMF. 1997. Cell permeability under salt stress. *In*: 'Strategies for improving salt tolerance in higher plants'. Jaiwal PK, Singh PS, Gulati A. (Eds.). Science Publishers, Inc. USA. pp. 87-110.
- Marcum KB, Murdoch CL. 1990. Growth responses, ion relations, and osmotic adaptations of eleven C<sub>4</sub> turfgrasses to salinity. *Agron J* **82**:892-896.
- Marschner H, Kylin A, Kuiper PJC. 1981. Differences in salt tolerance of three sugar beet genotypes. *Physiologia Plantarum* **51**:234-238.
- Marschner H. 1986. Beneficial mineral elements. *In*: 'Mineral nutrition of higher plants', 10, Marschner H (Ed.) Academic Press, London, pp. 341-368.
- Martínez V, Läuchli A. 1993. Effects of Ca<sup>2+</sup> on the salt-stress response of barley roots as observed by in-vivo <sup>31</sup>P-nuclear magnetic resonance and in-vitro analysis. *Planta* **190**:519-524.
- Mayer AM, Poljakoff-Mayber A. 1963. The germination of seeds. New York, Pergamon Press. p. 198-199.
- McCarthy LB, Dudeck AE. 1993. Salinity effects on bentgrass germination. *HortScience* **28**:5-17.
- McCree KJ. 1986. Whole plant carbon balance during osmotic adjustment to drought and salinity. *Aust J Plant Physiol* **13**:33-43.
- McWilliam JR. 1986. The national and international importance of drought and salinity effects on agricultural production. *In*: 'Plant growth, drought and salinity. Turner NC, Passioura JB (Eds.). CSIRO, Australia. pp. 1-13.



- Mehrotra CL. 1971. Salt tolerance of some agricultural crops during early growth stages. *Indian J Agr Sci* **41**:882-888.
- Mehta BB, Desai RS. 1959. Salt tolerance studies: effect of soil salinity on the growth and chemical composition of plants. Part I. *J Soil Water Conser India* **7**:101-105.
- Meneguzzo S, Navari-Izzo F, Izzo R. 2000. NaCl effects on water relations and accumulation of mineral nutrients in shoots, roots and cell sap of wheat seedlings. *J Plant Physiol* **156**:711-716.
- Milligan SB, Gravois KA, Bischoff KP, Martín FA. 1990. Crop effects on genetic relationships among sugarcane traits. *Crop Sci* **30**:927-931.
- Minhas PS, Sharma DR, Khosla BK. 1990. Mungbean response to irrigation waters of different salinities. *Irrig Sci* **11**:57-62.
- Molnar I. 1961. A manual of agriculture. *Aust Inst of Agric Science*.
- Morgan JM. 1977. Differences in osmoregulation between wheat genotypes. *Nature* **270**:234-235.
- Motsan Z, Lerner HR, Reinhold L. 1988. Dependence of chlorophyll synthesis on NaCl or osmotic stress in NaCl-adapted tobacco cell. *Plant Physiol Biochem* **26**:29-34.
- Mukherjee SP, MA Choudhuri. 1981. *Physiol Plant* **52**:37.
- Munns R, Greenway H, DeLane R, Gibbs J. 1982. Ion concentration and carbohydrate status of the elongating leaf tissue of *Hordeum vulgare* growing at high external NaCl. II. Cause of the growth reduction. *Journal of Experimental Botany* **33**:574-583.
- Munns R, Greenway H, Kirst GO. 1983. Halotolerant eukaryotes. In: 'Encyclopedia of plant physiology'. New series, Vol. 120. Physiological plant ecology III. Eds. Lange OI, Nobel PS, Osmond CB, Ziegler H. Springer-Verlag, Berlin. pp. 59-135.
- Munns R. 1983. *Plant Cell and Environ* **16**:15.
- Munns R, Termaat A. 1986. Whole-plant responses to salinity. *Aust J Plant Physiol* **13**:143-160.
- Murdock L. 2000. Using a chlorophyll meter to make nitrogen recommendations on wheat. Univ. of Kentucky. (<http://www.ca.uky.edu>).
- Murillo-Amador B, Troyo-Diéguez E, Jones HG, Ayala-Chairez F, Tinoco-Ojanguren CL, López-Cortés A. 2000. Screening and classification of cowpea genotypes for salt tolerance during germination. *PYTON Int J Exp Bot* **67**:71-84.

- Murillo-Amador B, Troyo-Diéguez E, Jones HG, Tinoco-Ojanguren CL, López-Cortés A, Ayala-Chairez F. 2001. Screening cowpea for salt tolerance during the early vegetative growth. *Euphytica* (en revision).
- Murillo-Amador B, Troyo-Diéguez E, Nieto-Garibay A. Germinación y emergencia de dos genotipos de frijol yorimón [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] bajo condiciones de salinidad (NaCl) y sequía (PEG-8000). Manuscrito en preparación.
- Murillo-Amador B. 1992. Caracterización de tipos de frijol "chícharo de vaca" [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] para producir ejote en el Valle de La Paz. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, B.C.S., México. 91 p.
- Murillo-Amador B, Troyo-Diéguez E, López-Cortés A, Jones HG, Ayala-Chairez F, Tinoco-Ojanguren CL. 2001. Salt tolerance of cowpea genotypes in the emergence stage. *Aust J Exp Agric* **41**:1-8.
- Murillo-Amador B, Troyo-Diéguez E, Jones HG, Ayala-Chairez F, Tinoco-Ojanguren CL, López-Cortés A. 2000. Screening and classification of cowpea genotypes for salt tolerance during germination. *PYTON Int J Exp Bot* **67**:71-84.
- Murray DR. 1984. Axis-cotyledon relationships during reserve mobilization. In: Murray DR (Ed.) Seed physiology. New York, Academic Press, Vol. 2, p. 247-280.
- Navejas JJ. 1995. Respuesta del frijol y maíz a la salinidad en las etapas fenológicas de germinación y vegetativa. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. México.
- Nerson H, Paris HS. 1984. Effects of salinity on germination, seedling growth, and yield of melons. *Irrigation Science* **5**:265-273.
- Nieman RH. 1965. Expansion of bean leaves and its suppression by salinity. *Plant Physiol* **40**:156-161.
- Nieman RH, Clark RA. 1976. Interactive effects of salinity and phosphorus nutrition on the concentrations of phosphate and phosphate esters in mature photosynthesizing corn leaves. *Plant Physiol* **57**:157-161.
- Nieman RH, Shannon MC. 1976. Screening plants for salinity tolerance. In: 'Plant adaptation to mineral stress in problem soils'. Wright MJ (Ed.). A special publication of Cornell Univ. Agric Exper Station, Cornell Univ. Ithaca, NY, pp. 359-367.
- Noaman MM. 2000. Evaluation of some recombinant lines of *Triticum turgidum* L. for salt tolerance. *J. Arid Environments*
- Nukaya A, Masuis M, Ishida A. 1982a. Salt tolerance of green soybeans as affected by various salinities in sand cultures. *J Jap Soc Hort Sci* **50**:487-496.

- Nukaya A. 1982b. Salt tolerance of green soybeans as affected by various salinities in soil culture. *J Jap Soc Hort Sci* **51**:62-69.
- Orchard TJ. 1977. Estimating the parameters of plant seedling emergence. *Seed Sci Technol* **5**:61-69.
- Paek KY, Chandler SF, Thorpe TA. 1988. Physiological effects of NaSO<sub>4</sub> and NaCl on callus cultures of *Brassica campestris* (Chinese cabbage). *Physiol Plant* **72**:160-166.
- Pandey RK. 1990. A farmer's primer on growing cowpea on riceland. Version en español: Guía del agricultor para el cultivo del chícharo de vaca en arrozales Edit. LIMUSA. México. 218p.
- Parker RB, Biggins J. 1964. Quantasome: size and composition. *Science* **144**:1009-1011.
- Pasternak D, DeMalach Y, Borovic I. 1986. Irrigation with brackish water under desert conditions VII. Effect of time of application of brackish water on production of processing tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *Agric Water Manag* **12**:149.
- Pasternak D. 1987. Salt tolerance and crop production. A comprehensive approach. *Annu. Rev. Phytopath* **25**:279-291.
- Pearson GA, Ayers AD, Eberhard DL. 1966. Relative salt tolerance of rice during germination and early seedling development. *Soil Sci* **102**:151-156.
- Pérez-Alfocea F, Balibrea ME, Santa Cruz A, Estañ MT. 1996. Agronomical and physiological characterization of salinity tolerance in a commercial tomato hybrid. *Plant Soil* **180**:251-257.
- Pessarakli M. 1999. Response of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to salt stress. In: 'Handbook of plant and crop stress' Pessarakli M (Ed.) Marcel Dekker, Inc. USA. pp. 827-842.
- Petri CL, Hall AE. 1991a. Water relations in cowpea and pearl millet under soil water deficits. I. Constrasting leaf water relations. *Aust J Plant Physiol* **19**:577-589.
- Petri CL, Hall AE. 1991b. Water relations in cowpea and pearl millet under soil water deficits. II. Water use and root distribution. *Aust J Plant Physiol* **19**:591-600.
- Petri CL, Hall AE. 1991c. Water relations in cowpea and pearl millet under soil water deficits. III. Predawn equilibrium in leaf water potential. *Aust J Plant Physiol* **19**:601-609.
- Plaut Z, Grieve CM, Federman E. 1989. Salinity effects on photosynthesis in isolated mesophyll cells of cowpea leaves. *Plant Physiol* **91**:493-499.
- Plaut Z, Grieve CM, Maas EV. 1990. Salinity effects on CO<sub>2</sub> assimilation and diffusive conductance of cowpea leaves. *Physiol Plantarum* **79**:31-38.

- Poljakoff-Mayber, Gale E. 1975. Plant in saline environments. Ecological Studies, 15. New York.
- Prisco JT, O'Leary JW. 1970. Osmotic and toxic effects of salinity on germination of *Phaseolus vulgaris* L. seeds. *Turrialba* **20**:177-184.
- Prisco JT, O'Leary JW. 1972. Enhancement of intact bean leaf senescence by NaCl salinity. *Physiol Plant* **27**:95-99.
- Prisco JT, Vieira GHF. 1976. Effect of NaCl salinity on nitrogenous compounds and proteases during germination of *Vigna sinensis* seeds. *Physiologia Plantarum* **36**:317-320.
- Prisco JT, Enéas-Filho J, Gomes-Filho E. 1981. Effect of NaCl salinity on cotyledon starch mobilization during germination of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. seeds. *Revista Brasileira de Botanica* **4**:63-71.
- Prisco JT. 1987. Contribucao ao estudo da fisiologia do estresse salino durante a germinacao e estabelecimento da plantula de uma glicófito [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. Fortaleza, Universidade Federal do Ceará. Tesis de professor titular, 65 p.
- Qadir MA, Qureshi RH, Ahmad N, Ilyas M. 1996. Salt-tolerance forage cultivation on a saline-sodic field for biomass production and soil reclamation. *Land Degrad Dev* **7**:11-18.
- Rachie KO, Roberts LM. 1974. Grain legumes of the lowland tropics. *Advances in Agronomy* **26**:1.
- Radford PJ. 1967. Growth analysis formulae-their use and abuse. *Crop Sci* **7**:171-175.
- Rains DW. 1972. Salt transport in relation to salinity. *Annu Rev Plant Physiol* **23**:367-388.
- Ramagopal S. 1993. Advances in understanding the molecular biology of drought and salinity tolerance in plants - the first decade. Ad Pl Biotech Biochem. Lodha ML, Mehta SI, Ramagopal S, Srivastava GP (Eds.) Indian Soc Agril Biochemists, Kanpur, India, pp. 39-48.
- Rao GG, Rao GR. 1981. Pigment composition and chlorophyllase activity in pigeonpea (*Cajanus indica*) and Gingelly (*Sesamum indicum*) under NaCl salinity. *Indian J Exp Biol* **19**:768-770.
- Rather G. 1984. Sucrose and starch content of plants parts as a possible indicator for salt tolerance of crops. *Aust J Plant Physiol* **11**:491-495.
- Ravikovitch S, Porah A. 1967. The effects of nutrients on the salt tolerance of plants. *Plant and Soil* **26**:49-71.

- Reddy MP, Vora AB. 1986a. Changes in pigment composition, Hill reaction activity and saccharides metabolism in bajra (*Pennisetum typhoides* S & H) leaves under NaCl salinity. *Photosynthetica* **20**:50-55.
- Reddy MP, Vora AB. 1986b. Salinity induced changes in pigment composition and chlorophyllase activity of wheat. *Indian J Plant Physiol* **29**:331-334.
- Reddy MP, Sanih S, Iyengar ERR. 1992. Photosynthetic studies and compartmentation of ions in different tissues of *Salicornia brachiata* Roxb under saline conditions. *Photosynth* **26**:173-179.
- Reddy MP, Rao US, Iyengar ERR. 1997. Carbon metabolism under salt stress. In: 'Strategies for improving salt tolerance in higher plants'. Jaiwal PK, Singh RP, Gulati A (Ed.). Science Publishers, Inc. 159-190pp.
- Reed RH. 1990. Solute accumulation and osmotic adjustment. In: Biology of the red algae, Ed. Cole KM, Sheath RG. Cambridge University Press, London. p.147-170.
- Richardson SG, McKell CM. 1980. Water relations of *Atriplex canescens* as affected by the salinity and moisture percentage of processed oil shale. *Agron J* **72**:946-950.
- Richardson SG, McCree KJ. 1985. Carbon balance and water relations of sorghum exposed to salt and water stress. *Plant Physiol* **79**:1015-1020.
- Roberts JKM, Linker CS, Benoit AG, Jardetzky O, Nieman RH. 1984. Salt stimulation of phosphate uptake in maize root tips studied by <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance. *Plant Physiol* **75**:947-950.
- Robinson SP, Downton JW, John D, Millhouse JA. 1983. Photosynthesis and ion content of leaves and isolated chloroplast of salt stressed spinach. *Plant Physiol* **73**:238-242.
- Ruiz EFH. 1993. Respuesta de genotipos de frijol "chícharo de vaca" [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] con diferentes diluciones de agua de mar. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, B.C.S. México. 70 p.
- Rus A, Rios S, Olmos E, Santa-Cruz A, Bolarin M. 2000. Long-term culture modifies the salt responses of callus lines of salt tolerant and salt-sensitive tomato species. *J Plant Physiol* **157**:413-420.
- Rush DW, Epstein E. 1976. Genotypic responses to salinity. Differences between salt-sensitive and salt-tolerant genotypes of the tomato. *Plant Physiol* **57**:162-166.
- Russel JS. 1976. Comparative salt tolerance of some tropical and temperate legumes and tropical grasses. *Aust. J Exp Agric An Husb* **16**:103.
- Salim M, Pitman MG. 1988. Salinity tolerance of mung bean (*Vigna radiata* L.): seed production. *Biologia Plantarum* **30**:53-57.

- Salma S Trivedi, Busheva SM, Arafa AA, Garab G, Erdei L. 1994. Effect of NaCl salinity on growth, cation accumulation, chloroplast structure and function in wheat cultivars differing in salt tolerance. *J Plant Physiol* **144**:241-247.
- Sánchez-Díaz M, Aparicio-Tejo P, González-Murúa C, Peña JI. 1982. The effect of NaCl salinity and water stress with polyethylene glycol on nitrogen fixation, stomatal response and transpiration of *Medicago sativa*, *Trifolium repens* and *Trifolium brachycalycinum* (subclover) *Physiol Plant* **54**:361-366.
- Saranga Y, Zamir D, Marani A, Rudich J. 1993. Breeding tomatoes for salt tolerance: variations in ion concentrations associated with response to salinity. *J Amer Soc Hort Sci* **118**:405-408.
- SARH. 1984. Estadísticas de la subdirección de desarrollo de Distritos y Unidades de Riego. México.
- SAS Institute. 1988. 'SAS/STAT user's guide'. Ver. 6. SAS, Institute, Cary, N.C.
- SAS Institute. 1996. 'SAS/STAT user's guide'. Version 6.12. SAS, Institute: Cary, N.C.
- Schubert S, Läuchli A. 1990. Sodium exclusion mechanisms at the root surface of two maize cultivars. *Plant and Soil* **123**:205-209.
- Seeman JD, Critchley C. 1985. Effects of salt stress on the growth, ion content, stomatal behaviour and photosynthetic capacity of a salt-sensitive species, *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* **164**:151-162.
- Shackel KA, Hall EA. 1983. Comparison of water relations and osmotic adjustment in Sorghum and cowpea under field conditions. *Austral J Plant Physiol* **10**:423-435.
- Shalhevet J, Reiniger P, Shimshi D. 1969. Peanut response to uniform and non-uniform soil salinity. *Agron J* **61**:384-387.
- Shannon MC. 1978. Testing salt tolerance variability among tall wheatgrass populations. *Agron J* **70**:719-722.
- Shannon MC, McVreight JD, Draper JH. 1983. Screening tests for salt tolerance in lettuce. *J Amer Soc Hort Sci* **108**:225-230.
- Shannon MC. 1987. Salinity- an environmental constraint on crop productivity. p. 9-18. 4<sup>th</sup> Austral. Agron. Soc. Conf. Responding to change, La Trobe, Univ. Melbourne, Australia, 24-27 Aug.
- Shannon MC. 1996. New insights in plant breeding efforts for improved salt tolerance. Salt management workshop proceedings. *HortTech* **6**:96-99.

- Shannon MC. 1997a. Genetics of salt tolerance in higher plants. In: Strategies for improving salt tolerance in higher plants. Jaiwal PK, Singh RP, Gulati A (Eds) pp. 265-288. Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd.
- Shannon MC. 1997b. Adaptation of plants to salinity. *Advances in Agronomy* **60**:76-120.
- Sharma ML. 1977. Water use by Chenopod shrublands. In: 'Studies of the Australian Arid Zone'. III. Water in rangelands. Howes, KMW (Ed.). CSIRO. pp. 139-149
- Shimose N. 1973. Physiology of salt injury in crops. X. *Sci Rept Fac Agr Okayama Univ* **41**:69-78.
- Shouse P, Dasberg S, Jury WA, Stolzy LH. 1981. Water deficit effects on water potential, yield, and water use of cowpeas. *Agron J* **73**:333.
- Sidwell RJ, Smith EL, McNew RW. 1976. *Crop Sci* **16**:650.
- Silberbush M, Ben-Asher J. 1987. The effect of salinity on parameters of potassium and nitrate uptake of cotton. *Comm in Soil Sci Plant Anal* **18**:65-81.
- Singh MP, Pandey SK, Singh M, Ram PC, Singh BB. 1990. Photosynthesis, transpiration, stomatal conductance and leaf chlorophyll content in mustard genotypes grown under sodic conditions. *Photosynth* **24**:623-627.
- Singh RP, Choudhary A, Gulati A, Dahiya HC, Jaiwal PK, Sengar RS. 1997. Response of plants to salinity in interaction with other abiotic and biotic factors. In: 'Strategies for improvement salt tolerance in higher plants'. Jaiwal PK, Singh RP and Gulati A. (Eds.). Science Publishers Inc. USA. pp. 25-39.
- Singh SB, Chhabra R, Abrol IP. 1980. *Indian J Agric Sci* **50**:852.
- Smith PT, Comb BG. 1991. Physiological and enzymatic activity of pepper seeds (*Capsicum annuum*) during priming. *Physiol Plantarum* **82**:433-439.
- Sokal RR, Rohlf FJ. 1994. 'Biometry. The principles and practice of statistics in biological research'. W.H. Freeman & Co: New York.
- Steel GDR, Torrie JH. 1995. 'Bioestadística. Principios y procedimientos'. Ed. McGraw Hill. México.
- Stelzer R. 1984. Energy dispersive X-ray microanalysis of organelles of NaCl-treated maize roots cells. *Nucl Inst Methods Phys Res* **3**:667-669.
- Steveninck Van RFM, Steveninck Van ME, Stelzer R, Läuchli A. 1982. Studies on the distribution of Na and Cl in two species of lupin (*Lupinus luteus* and *Lupinus angustifolius*) differing in salt tolerance. *Physiol Plant* **56**:465-473.

- Storey R, Wyn Jones RG. 1979. Response of *Atriplex spongiosa* and *Suaeda monoica* to salinity. *Plant Physiol* **65**:156-162.
- Strogonov BP. 1964. Physiological basis of salt tolerance of plants (as affected by various types of salinity). Acad. Sci. translated from Russian by the Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem. 279pp.
- Strogonov BP. 1974. Structure and function of plant cells in saline habitats. New trends in the study of salt tolerance. *Israel Progr Sci Transl* Jerusalem.
- Tal M. 1985. Genetics of salt tolerance in higher plants: theoretical and practical considerations. *Plant and Soil* **89**:199-226.
- Tawfic HA, Abo El Saod IA, Maria AM. 1977. *Ann Agric Sci* **20**:171.
- Tiku BL. 1976. Effect of salinity on the photosynthesis of the halophyte *Salicornia rubra* and *Distichlis stricta*. Department of Environmental Biology, University of Guelph, Ontario, Canada, *Physiol Plant* **37**:23-28.
- Torres MM. 1992. Efectos del déficit de humedad sobre diferentes parámetros hídricos en el frijol yorimón [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] en una área árido-tropical de Baja California Sur, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 95 p.
- Turk KJ, Hall AE, Asbell CW. 1980. Drought adaptation of cowpea. I. Influence of drought on seed yield. *Agronomy Journal* **72** :413.
- Turk KJ, Hall AE. 1980a. Drought adaptation of cowpea. II. Influence of drought on plant water status and relations with seed yield. *Agron J* **72**:421.
- Turk KJ, Hall AE. 1980b. Drought adaptation in cowpea. III. Influence of drought on plant growth and relations with seed yield. *Agron J* **72**:428.
- Turk KJ, Hall AE. 1980c. Drought adaptation of cowpea. IV. Influence of drought on water use and relations with growth and seed yield. *Agron J* **72**:434.
- Turner JF, Tuner DH. 1980. The regulation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. In: 'The biochemistry of plants. Vol. 2, metabolism and respiration'. Stumpf PK, Conn EE, David D. Davies (Eds.). Academic Press. Lond. 7:279-316.
- Udovenko GV, Alekseeva LI. 1973. Effects of salinization on initial stages of plant growth. *Sov Plant Physiol* **20**:228-235.
- Uhvits R. 1946. Effect of osmotic pressure on water absorption and germination of alfalfa seeds. *American Journal of Botany* **33**:278-285.
- Uhvits R. 1960. *Amer J Bot* **33**:278.



- Ungar IA. 1967. Influence of salinity and temperature on seed germination. *Ohio Journal of Science* **167**:120-123.
- Ungar IA. 1991. *Ecophysiology of vascular halophytes*. CRC Press, Boca Raton. 209 p.
- Vasquez-Tello A, Zuily-Fodil Y, Pham-Thi AT, Vieira-Da Silva JB. 1990. Electrolyte and Pi leakages and soluble sugar content as physiological tests for screening resistance to water stress in *Phaseolus* and *Vigna* species. *J Exp Botany* **41**: 827-832.
- Velegaleti RR, Kumar D, Marsh S, Reichenbach NG and Fleischman DE. 1990. 'Some approaches to rapid and presymptoms diagnosis of chemical stress in plants'. Wang W, Gorsuch JW, Lower WR. (Eds.) *Plants for toxicity assessment ASTMSTP 1091*. American Society for Testing and Materials; Philadelphia. Pp. 333-345.
- Waid A, Rasul E, Rao AR. 1999. Germination of seeds and propagules under salt stress. *In*: 'Handbook of plant and crops stress'. 2<sup>nd</sup> Ed. Pessaraki M (Ed.). Marcel Dekker, Inc. New York, USA. 153-167.
- Waisel Y. 1972. 'Biology of halophytes'. Academic Press: New York and London.
- Walker RR, Torokfalvy E, Grieve AM, LD Prior. 1986. Water relations and ion concentrations of leaves on salt-stressed citrus plants. *Aust J Plant Physiol* **10**:265-277.
- Watad AA, Lerner RH, Reinhold L. 1985. Stability of the salt-resistance character in nicotiana cell lines adapted to grow in high NaCl concentrations. *Physiologie Végétale* **23**:887-894.
- Waysel Y. 1972. *Biology of halophytes-* Academic Press, New York.
- Werner A, Stelzer R. 1990. Physiological responses of the mangrove *Rhizophora mangle* grown in the absence and presence of NaCl. *Plant Cell and Environment* **13**:243-255.
- West DW, Francois LE. 1982. Effects of salinity on germination, growth and yield of cowpea. *Irrigation Science* **3**:169-175.
- West DW, Hoffman GJ, Fisher MJ. 1986. Photosynthesis, leaf conductance, and water relations of cowpea under saline conditions. *Irrig Sci* **7**:183-193.
- Wieneke J, Läuchli A. 1980. Effects of salt stress on distribution of Na<sup>+</sup> and some other cations in two soybean varieties differing in salt tolerance. *Z Pflanzenernaehr Bodenk* **143**:55-67.
- Winicov I, Seemann JR. 1991. Expression of genes for photosynthesis and the relationship to salt tolerance of alfalfa (*Medicago sativa*) cell. *Plant Cell Physiol* **31**:1155-1162.
- Winter E, Läuchli A. 1982. Salt tolerance of *Trifolium alexandrinum* L. I. Comparison of the salt response of *T. alexandrinum* and *T. pratense*. *Aust J Plant Physiol* **9**:221-26.

- Wyn Jones RG. 1981. Salt tolerance. *In*: 'Physiological processes limiting plant productivity'. Johnson CB (Ed.) Butterworths, London. Pp. 271-292.
- Wyn Jones RG, Gorham J, McDonnell E. 1984. Organic and inorganic solute contents and selection criteria for salt tolerance in the Triticeae. *In*: 'Salinity tolerance in plants strategies for crop improvement' (Eds. Staples RC and Toenniessen GH). John Wiley & Sons, New York, pp. 189-203.
- Yeo AR, Caporn SJM, Flowers TJ. 1985. The effect of salinity upon photosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.): gas exchange by individual leaves in relation to their salt content. *J Exp Bot* **36**:1240-1248.
- Yeo AR, Flowers TJ. 1986. Salinity resistance in rice (*Oryza sativa* L.) and a pyramiding approach to breeding varieties for saline soils. *Aust J Plant Physiol* **13**:161-173.
- Zekri M. 1987. Effects of sodium chloride and polyethylene glycol on the water relations, growth and morphology of citrus rootstock seedlings. PhD. Diss., University of Florida, Gainesville.
- Zekri M, Parsons LR. 1990. Comparative effects of NaCl and polyethylene glycol on root distribution, growth, and stomatal conductance of sour orange seedlings. *Plant and Soil* **129**:137-143.
- Ziska LH, Hall AE, Hoover RM. 1985. Irrigation management methods for reducing water use of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) and lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) while maintaining seed yield at maximum levels. *Irrig Sci* **6**:223-239.