

F. Prou 20/56

4/130

UNIVERSIDAD DE GRANADA



UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha ... 18-8-98
ENTRADA NUM. ... 2473

Estudio de la simbiosis *Mesorhizobium ciceri-Cicer arietinum*: Efectos metabólicos, fisiológicos y bioquímicos inducidos por el estrés salino.

TESIS DOCTORAL

b/1338609
i:15498402

MARIAM SOUSSI ERAKOUNI

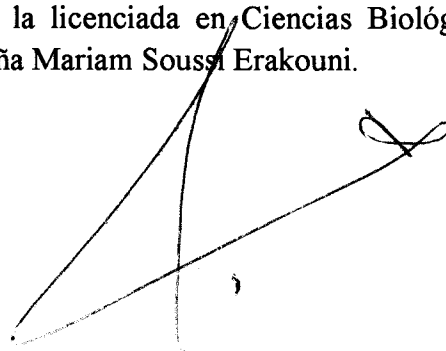
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL
FACULTAD DE CIENCIAS
1998**

UNIVERSIDAD DE GRANADA
31 JUL. 1998
COMISION DE DOCTORADO

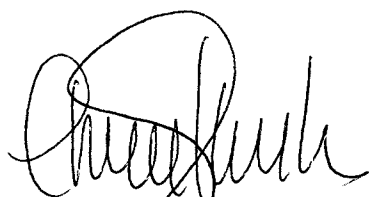
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**Estudio de la simbiosis *Mesorhizobium ciceri*-*Cicer arietinum*:
Efectos metabólicos, fisiológicos y bioquímicos inducidos por el estrés
salino.**

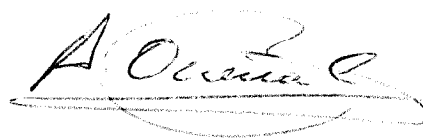
Memoria para aspirar al Grado de Doctor
por la licenciada en Ciencias Biológicas
Doña Mariam Soussi Erakouni.



Directores:



Fdo.: Dra. D.ª Carmen Lluch Plá
Catedrático de Fisiología
Vegetal. Facultad de Ciencias.
Universidad de Granada.



Fdo.: Dr. D. Antonio Ocaña Cabrera
Profesor de Fisiología Vegetal
Facultad de Ciencias.
Universidad de Granada.

A mis padres

*A Adtif y a mi hijo Sufian con cariño, y por las muchas horas que
este trabajo le han robado.*

La realización del presente trabajo ha sido posible gracias a las ayudas económicas concedidas por el Convenio de Tetuan (Beca del Plan Propio de la Universidad de Granada), la Agencia Española de Cooperación con el mundo Árabe (ICMA) (B.O.E. N°62 12- 3-96) y por el contrato con cargo a Proyectos Europeos (B.O.J.A. N°140 2- 12-98).

Parte de los resultados del experimento cinco presentado en esta Tesis Doctoral han sido publicados en la siguiente revista internacional:

Soussi, M., Ocaña, A. y Lluch, C. 1998. Effects of salt stress on growth, photosynthesis and nitrogen fixation in chick-pea (*Cicer arietinum* L.). J. Exp. Bot. **49**: 000- 000.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. La importancia del nitrógeno	3
2. Las leguminosas.	4
2.1. El garbanzo.	4
3. Interracción <i>Rhizobium</i> –leguminosa.....	6
3.1. Taxonomía del <i>Rhizobium</i>	6
3.2. Estructuras superficiales del <i>Rhizobium</i> determinantes en el desarrollo del nódulo.	6
3.3. Funcionamiento del nódulo.	9
3.3.1. Establecimiento de la simbiosis.	9
3.3.2. Tipos de nódulos.	9
3.3.3 La nitrogenasa.	10
3.4.1. Membrana peribacteroidal.....	11
3.4.2. Transportadores de la membrana peribacteroidal.....	13
4. Salinidad.....	15
4.1. Salinidad en <i>Rhizobium</i> en vida libre.	15
4.1.1. Crecimiento y fisiología.....	15
4.1.2. Mecanismos de osmoregulación.	17
4.2. Salinidad en plantas.	20
4.3. Salinidad en simbiosis.	21
4.3.1. Efecto de la salinidad en la simbiosis.	21
4.3.2. Osmoregulación en la simbiosis.....	22
OBJETO	25
MATERIAL Y MÉTODOS	31
1. Material biológico.....	33
1.1. Microorganismos.....	33

1.1.1. Medios de cultivo.	34
1.1.2. Conservación de las cepas bacterianas.	34
1.2. Material vegetal.	34
2. Cultivo de plantas.	36
2.1. Esterilización y germinación de las semillas.	36
2.2. Preparación del inóculo.	36
2.3. Siembra e inoculación.	37
2.4. Condiciones de la cámara de cultivo.	37
3. Experimentos realizados.	37
3.1. Estudio de <i>Rhizobium ciceri</i> en vida libre: Efecto del NaCl.	37
3.1.1. Tolerancia al NaCl de diferentes cepas de <i>Rhizobium ciceri</i>	37
3.1.2. Curvas de crecimiento del <i>Mesorhizobium ciceri</i> Ch-191 con diferentes dosis de NaCl.	38
3.1.3. Caracterización de <i>Mesorhizobium ciceri</i> Ch-191 en condiciones de salinidad.	39
3.1.4. Mecanismos de tolerancia al NaCl.	39
3.2. Germinación de diferentes cultivares de <i>Cicer arietinum</i> en condiciones de estrés salino.	39
3.2.1. Valoración de la germinación.	39
3.2.2. Fisiología de la germinación.	40
3.3. Simbiosis <i>Cicer arietinum</i> - <i>Mesorhizobium cicer</i> en condiciones de estrés salino.	41
3.3.1. Tolerancia a la salinidad de distintos cultivares de <i>Cicer arietinum</i>	41
3.3.2. Estudio comparativo de dos cultivares de <i>Cicer arietinum</i> con distinta sensibilidad a la sal.	42
3.3.3. Efecto del NaCl aplicado en el crecimiento vegetativo en la simbiosis ILC1919-Ch-191.	42
3.3.4. Metabolismo de los bacteroides aislados de nódulos de <i>Cicer arietinum</i> en condiciones de sal.	43

4. Metodología empleada.....	43
4.1. Perfil de proteínas.....	43
4.1.1. Perfil de proteínas en bacterias.....	43
4.1.2. Perfil de proteínas en radículas.....	45
4.2. Perfil de lipopolisacáridos en bacterias.....	46
4.3. Análisis del crecimiento de las plantas.....	48
4.4. Actividad nitrogenasa: Actividad reductora de acetileno.....	49
4.3. Aislamiento de la fracción soluble de nódulos y bacteroides.....	49
4.3.1. Obtención de la fracción citosólica y bacteroidal de los nódulos.....	49
4.3.2. Obtención de la fracción soluble de los bacteroides.....	50
4.3.3. Respiración bacteroidal.....	50
4.5. Actividades enzimáticas del metabolismo carbonado.....	51
4.5.1. Actividad sacarosa sintasa.....	53
4.5.2. Actividad invertasa alcalina.....	53
4.5.3. Actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa.....	54
4.5.4. Actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa.....	54
4.5.5. Actividad malato deshidrogenasa.....	54
4.5.6. Actividad alcohol deshidrogenasa.....	55
4.5.7. Actividad isocitrato deshidrogenasa.....	55
4.6. Actividades enzimáticas del metabolismo del amonio.....	55
4.6.1. Actividad glutamina sintetasa.....	56
4.6.2. Actividad glutamato sintasa.....	57
4.6.3. Actividad glutamato deshidrogenasa.....	57
4.7. Actividad Rubisco.....
4.8. Determinaciones analíticas.....	60
4.8.1. Determinación de proteína soluble.....	60
4.8.2. Determinación de prolina.....	61
4.8.3. Determinación de glutamato.....	62
4.8.4. Determinación de azúcares solubles totales.....	63

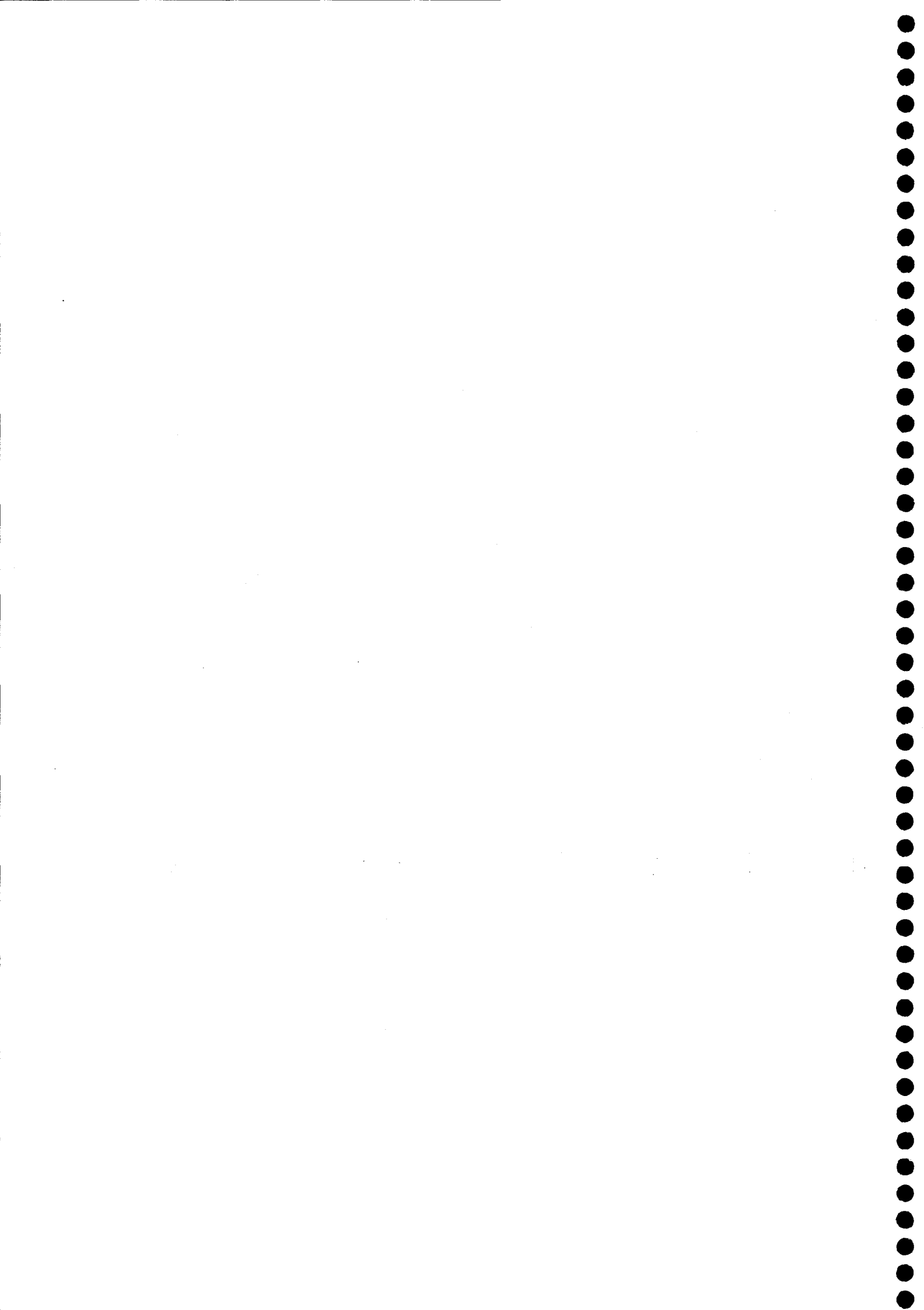
4.8.5. Determinación de aminoácidos libres.....	64
4.8.6. Determinación de malato.....	64
4.8.7. Determinación de clorofilas totales.....	66
4.8.8. Determinación de nutrientes en parte aérea y raíz.....	66
5. Presentación y estudio estadístico de los resultados.....	67
RESULTADOS.....	69
1. Caracterización de la cepa Ch-191 de <i>Mesorhizobium ciceri</i> en condiciones de salinidad.....	71
1.1. Perfil de lipopolisacáridos (LPS).....	71
1.2. Patrón electroforético de proteínas.....	72
2. Germinación de diferentes variedades de <i>Cicer arietinum</i> en condiciones de estrés salino.....	77
2.1. Tolerancia al NaCl de diez variedades de <i>Cicer arietinum</i> : Parámetros de germinación.....	77
2.2. Fisiología del proceso de germinación.....	86
2.2.1. Patrón electroforético de proteínas.....	86
2.2.2. Análisis de crecimiento.....	86
2.2.3. Contenido en prolina, aminoácidos y azúcares totales solubles.....	89
2.2.4. Contenido en amonio.....	91
2.2.5. Metabolismo del carbono.....	91
2.2.6. Metabolismo nitrogenado.....	94
3. Crecimiento y fijación de nitrógeno en diferentes cultivares de <i>Cicer arietinum</i>	
3.1. Análisis del crecimiento.....	96
3.2. Fijación de nitrógeno.....	101
3.3. Determinaciones analíticas: Nutrición mineral.....	106
4. Estudio comparativo entre dos simbiosis con distinta tolerancia a la salinidad: Efecto de la sal aplicada en el momento de la inoculación.....	113
4.1. Crecimiento.....	113

4.2. Procesos estudiados en hoja.....	116
4.2.1. Fotosíntesis.....	116
4.2.2. Actividades enzimáticas.....	119
4.2.3. Contenido de solutos intracelulares.....	121
4.3. Procesos estudiados en nódulos.....	123
4.3.1. Fijación de nitrógeno.....	123
4.3.2. Actividades enzimáticas.....	126
4.3.3. Contenido en solutos intracelulares.....	132
4.4. Contenido de nutrientes.....	134
4.4.1. En parte aérea.....	134
4.4.2. En raíz.....	137
5. Efecto del estrés salino en la simbiosis: Aplicación al final del crecimiento vegetativo.....	141
5.1. Análisis del crecimiento.....	141
5.2. Procesos estudiados en hojas.....	143
5.2.1. Fotosíntesis.....	143
5.2.2. Actividades enzimáticas.....	144
5.2.3. Contenido de metabolitos.....	147
5.3. Procesos estudiados en nódulos.....	150
5.3.1. Fijación de nitrógeno.....	150
5.3.2. Actividades enzimáticas.....	152
5.3.3. Contenido de metabolitos.....	157
5.4. Determinaciones analíticas: Contenido en macronutrientes.....	160
6. Efecto de la salinidad sobre la capacidad respiratoria de los bacteroides.....	167
6.1. Resultados de crecimiento y fijación de nitrógeno.....	167
6.2. Capacidad respiratoria de los bacteroides.....	168
DISCUSIÓN.....	171
1. Germinación de diferentes cultivares de <i>Cicer arietinum</i> : efecto de la sal.....	173

2. Crecimiento y fijación de nitrógeno en diferentes cultivares de <i>C. arietinum</i> en condiciones de salinidad.....	175
3. Efecto del estrés salino en la simbiosis ILC1919-Ch191: aplicación en el periodo de crecimiento vegetativo.....	175
CONCLUSIONES.....	181
BIBLIOGRAFÍA.....	187



INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1. La importancia del nitrógeno

El nitrógeno es el elemento mineral esencial para el desarrollo de la vida. El nitrógeno molecular está presente en altas proporciones en la atmósfera, aproximadamente $4 \cdot 10^{15}$ T, sin embargo, las plantas sólo pueden utilizar la forma combinada del elemento. Por tanto, el nitrógeno es el elemento más limitante a la producción de los cultivos. El proceso de Haber-Bosch, mediante el cual el nitrógeno es convertido en amonio, proceso básico en la industria de los fertilizantes nitrógenados comerciales, requiere un alto coste energético: se necesita 1.5 Kg de combustible fósil para cada 1 Kg de fertilizantes producido. Por otra parte, esta transformación industrial del dinitrógeno en amoníaco produce dióxido de carbono, lo que es tóxico para el medio ambiente, además de contribuir al llamado efecto invernadero. Por otra parte, las pérdidas de los fertilizantes aplicados es significativa, en este sentido, si la nitrificación del suelo y los lixiviados de los nitratos tóxicos contaminan las aguas subterráneas, la desnitrificación a compuestos volátiles como el óxido nitroso conducen al agotamiento del ozono.

La fijación de nitrógeno puede producirse de forma natural, por reacciones fotoquímicas o mecanismos biológicos. Siendo, la fijación biológica del nitrógeno la forma más eficaz en la producción del N_2 , representando el doble de nitrógeno fijado industrialmente, y un 65% de la cantidad de nitrógeno utilizado en la agricultura.

La fijación simbiótica del nitrógeno en la agricultura está fundamentalmente confinada a las especies de leguminosas que establecen asociaciones con bacterias que forman nódulos de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* y *Sinorhizobium*, conocidos colectivamente como *rhizobia*. También, constituye el segundo proceso en importancia después de la fotosíntesis en el crecimiento y desarrollo de la planta. La gran mayoría de las 17.000 especies de leguminosas descritas, tienen la habilidad de establecer la fijación de nitrógeno en simbiosis, pero pocas de éstas tienen un interés económico.

2. Las leguminosas:

La importancia económica, social, ecológica y agrícola de las leguminosas es un hecho ampliamente aceptado, que se cimienta sobre ciertos aspectos que determinan el interés de estas plantas, su potencialidad para la producción de proteínas vegetales para el consumo animal y humano, el efecto benéfico en el medio ambiente al poder utilizar el nitrógeno atmosférico como alternativa a los fertilizantes químicos, su capacidad para colonizar ecosistemas naturales mejorando la fertilidad del suelo y permitiendo el asentamiento de otras especies vegetales, ya que el nitrógeno fijado quedará finalmente incorporado a la materia orgánica del suelo. Este aspecto hace que las leguminosas sean potencialmente importantes en la recuperación de suelos marginales como en la lucha contra la desertificación. Muchos organismos, como la FAO, han argumentado en favor del desarrollo y potenciación de las leguminosas como posibles cultivos sustitutivos de la proteína animal o en la lucha contra la desertización.

2.1. El garbanzo.

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es la segunda leguminosa grano en importancia del mundo y la primera en la región mediterránea. Su principal aprovechamiento se deriva de su utilización como alimento humano preparado de muy diversas formas de acuerdo con las costumbres de cada país. Su área de cultivo comprende zonas situadas entre los 15° y los 40° de latitud norte, sometida a muy diferentes regímenes termo y fotoperiódicos. Actualmente se pueden distinguir cuatro grandes zonas de producción. Se cultiva en invierno en la India, Etiopía y Sudamérica y en primavera en la región mediterránea, siendo en general un cultivo de secano, aunque se riega en un 10% de la superficie total cultivada. La superficie mundial supera los 10 millones de hectáreas, de las cuales más de 7 millones se concentran en la India. En España no se llega a las 90.000 ha, con un rendimiento medio de 663 kg/ha, habiendo sufrido una enorme reducción en la superficie cultivada en los últimos años. En principio, el género *Cicer* se clasificó incluido en la tribu *Viciae*. Posteriormente, y

dado que sus características eran suficientemente diferenciadas, fue considerado como por sí solo: *Ciceræ*. El género incluye tanto especies anuales como perennes.

En algunos casos las plantas son de tipo arbustivo, aunque rara vez llegan a alcanzar el metro de altura. Presentan pubescencia en toda la planta, con pelos de tipo glandular y no glandular. Las **raíces** son fuertes y desarrolladas y, según la especie de que se trate, el sistema radicular será profundo o superficial. Los **tallos** son ramificados, flexibles o rectos, erectos o rastreros con el colénquima muy desarrollado y la cutícula bastante gruesa. Las **estípulas** son generalmente dentadas y con concrecentes, con el tallo, resultando muy útiles para su clasificación taxonómica. La morfología de la **hoja** muestra una gran sensibilidad a las distintas condiciones ambientales. La hoja, en general, es pseudoimparipinnada, con el foliolo terminal situado en posición subterminal, es decir, su vena central es oblicua al raquis, dado que el otro foliolo terminal abortó. Los raquis tienen una longitud entre 3 y 7 cm y llevan de 10 a 15 foliolos insertados en pequeños pedicelos. Los foliolos son típicamente dentados, tienen forma de oval a elíptica presentan una gran variación incluso dentro de la misma hoja. Las **vainas** son pubescentes, puntiagudas e hinchadas, llegando a alcanzar hasta los 3 cm de longitud. Pueden contener de 1 a 10 semillas. En el caso del garbanzo (*C. arietinum*) se encuentran genotipos que tienen hasta 3 semillas por vaina. Las **semillas** tienen formas que varían entre globular y biglobular, siendo en algunos casos casi esféricas. Presentan un pico característico, recto o curvo, que cubre la radícula.

Desde el punto de vista de la mejora, el garbanzo se clasifica en dos grupos principales: el tipo **kabuli** (granos de tamaño medio a grande, más o menos redondeados y arrugados de color claro con forma de cabeza carnero) y el **desi** (granos de tamaño pequeño, de formas angulares y de color amarillo o negro). Un tercer tipo ha sido recientemente identificado, el llamado gulabi o intermedio (granos de tamaño pequeño a medio, lisos y redondos de color claro, muy parecidos a los guisantes). El garbanzo kabuli es propio de la cuenca Mediterránea, donde llegó hace 5.000 a 6.000 años. Posteriormente en el siglo XVI, los españoles y portugueses lo introdujeron en América central y Sudamérica. El desi se extendió hace unos 4.000 años sobre el

subcontinente indio, siendo también cultivado en la actualidad en España, Irán y México. El tipo Gulabi tiene muy poca difusión a nivel de agricultores, aunque su comportamiento parece prometedor. Los cultivares españoles en su totalidad pertenecen al tipo kabuli y se utilizan para la alimentación humana. Entre los cultivares más destacados se encuentran Castellano, Mejicano, Blanco Lechoso, Pedrosillano, Venoso andaluz.

La proteína del garbanzo es considerada como la de mayor valor biológico entre las leguminosas grano destinadas al consumo humano, los niveles de aminoácidos azufrados metionina y cisteína son bastantes elevados y, sólo para los tipos castellano y mejicano constituyen los primeros aminoácidos limitantes. El alto contenido en hidratos de carbono (alrededor de un 60%), con un porcentaje elevado de almidón, mejora la textura y plasticidad del garbanzo, haciéndola suave y mantecosa. Si comparamos su composición en aminoácidos con los estandar establecidos por la FAO, se observa que los aminoácidos sulfurados, metionina y cisteína son los limitantes. En el caso del triptófano, aunque sus niveles parecen satisfactorios, su contenido es muy variable en los diferentes genotipos. Les siguen en importancia la treonina y la valina al tener sus niveles bajos respecto al patron FAO, sobre todo teniendo en cuenta que muchos cereales son pobres en treonina y esto podría afectar el valor nutritivo de la dieta cereal- garbanzo.

3. Interracción *Rhizobium* –leguminosa.

3.1. Taxonomía del *Rhizobium*.

3.2. Estructuras superficiales del *Rhizobium* determinantes en el desarrollo del nódulo.

Las células de rhizobia cuentan con una serie de componentes de superficie necesarios para el desarrollo del nódulo e importantes en el establecimiento de la simbiosis. Estos componentes son: polisacáridos extracelulares (EPS), polisacáridos capsulares (CPS) y lipopolisacáridos (LPS). Los mutantes defectuosos son incapaces de invadir las células corticales de la raíz de la planta huésped de una manera normal e iniciar el cordón de infección ya que aborta antes de la invasión de las células corticales (Leigh y Walker, 1994).

a) **Exopolisacáridos:** Generalmente, las especies del género *Rhizobium* producen exopolisacáridos (EPS) que son importantes en el desarrollo de los nódulos fijadores de nitrógeno (Long, 1989). Sin embargo, Chen *et al.* (1996) demostraron que cepas mutantes Exo⁻ que nodulan *Astragalus* indujeron nódulos fijadores de nitrógeno normales, en comparación a cepa silvestre. Stacey *et al.* (1991) señalan que tanto los EPS como los lipopolisacáridos (LPS) tienen diferentes funciones en la formación de nódulos determinados e indeterminados. Sin embargo, López-Lara *et al.* (1993) sugieren que los EPS sólo son requeridos por los nódulos indeterminados y no por los determinados. Putnoki *et al.* (1990) señalan que ambos polisacáridos (EPS y LPS) juegan el mismo papel en la interacción planta-bacteria.

Las posibles funciones del EPS son: protección frente a posibles reacciones de defensa de la planta; formar parte de la matriz del canal de infección y actuar como transportadores de enzimas extracelulares; o actuar como señal para inducir una respuesta de la planta, en algún estadio crítico del desarrollo del nódulo.

b) **Lipopolisacáridos:** Los lipopolisacáridos son compuestos químicos fundamentales de la membrana externa de las bacterias gram negativas (Yokota, 1996). Russa *et al.* (1995) caracterizaron diferentes cepas de *Rhizobium* mediante el estudio de los lipopolisacáridos. Los LPS constan de dos partes diferenciadas, el lípido A y el polisacárido que a su vez presenta dos partes, polisacárido central y polisacárido lateral o también denominado antígeno-O. El lípido A es la parte hidrofóbica de la molécula que ancla el LPS a la membrana externa, mientras que la parte polisacáridica se proyecta hacia el exterior de la célula.

Los LPS mutantes que han perdido el antígeno O son simbióticamente defectuosos lo que implica que la integridad de los LPS es esencial para la simbiosis. Además se ha visto, utilizando anticuerpos monoclonales, que la estructura del LPS dañada cambia durante la simbiosis (Carlson y Krishnaiah, 1992). El polisacárido lateral presenta unidades repetitivas de oligosacáridos de 3 a 5 unidades cada una, que son variables según la especie y el serogrupo. La pérdida del antígeno-O provoca una alteración de la carga de superficie que altera el carácter hidrofóbico de las bacterias gram negativas (Palomar *et al.* 1995, Making y Beveridge 1996).

Cuando los LPS de *Rhizobium leguminosarum* se analizan mediante electroforesis de SDS-PAGE, aparecen dos bandas, una que migra lentamente y se denomina LPS 1 que corresponde a la molécula de LPS completa, y una segunda banda de migración más rápida, llamada LPS 2 que corresponde a la molécula de LPS que carece de antígeno-O (Carlson *et al.*, 1987). Las mutantes con sus LPS severamente alterados, pierden su capacidad de infección (Perotto *et al.*, 1994). Incluso se ha descrito que cuando estas mutantes forman nódulos, las células vegetales presentan una gran desorganización citoplásmica que provoca su envejecimiento prematuro. Los exudados de *Phaseolus vulgaris* pueden provocar cambios en los LPS de *R. etli* CFN42 (Noel *et al.*, 1996), los cuales pueden ser importantes en la capacidad de infección en la planta. En otros casos se ha descrito que ciertas mutantes en LPS pueden establecer simbiosis efectivas, aunque existe un retraso en la nodulación (Putnoky *et al.*, 1990). Algunas condiciones de crecimiento como bajo pH, limitaciones en O₂ o fosfato, stress térmico o salino (Zahran *et al.*, 1996) induce alteraciones en los LPS.

Las funciones de los LPS en la infección simbiótica son desconocidas. Sin embargo, pueden estar involucradas en la regulación de la respuesta defensiva de la planta huésped, invasión de las células (endocitosis) y/o son requeridos en los intercambios de metabolitos entre la planta huésped y la bacteria.

3.3. Funcionamiento del nódulo.

3.3.1. Establecimiento de la simbiosis.

El establecimiento de nódulos radicales fijadores de N₂ en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa es una interacción compleja y con múltiples pasos entre la bacteria y la planta hospedadora específica. El primer acontecimiento que inicia esta interacción planta-microbio consiste en un intercambio de señales entre ambas simbiosis que condicionan el proceso de reconocimiento. En este proceso la planta segrega flavonoides y isoflavonoides que activan específicamente a la proteína *nod D*, un activador de los llamados genes de nodulación bacterianos *nod nol*, responsables de la síntesis de las moléculas señales ó factores de nodulación identificados como lipoquitinolicacáridos (LCO).

La infección del pelo radicular curvado está caracterizada por la formación y desarrollo del cordón de infección, donde la bacteria se multiplica y crece para iniciar simultáneamente el meristemo nodular en el interior de la corteza radical (Hirsch, 1992). Existe una diversidad en los mecanismos de infección y en la anatomía de los nódulos y estos caracteres son controlados por la planta, lo que indica que la función de la bacteria sería activar el programa genético de la planta por medio de señales.

3.3.2. Tipos de nódulos.

Los nódulos radicales son estructuras altamente organizadas que pueden mostrar importantes diferencias en cuanto al desarrollo, la forma, su anatomía, la organización histológica y fisiología. En base a estas diferencias, se pueden observar dos tipos de nódulos: los nódulos indeterminados y determinados.

En los nódulos indeterminados, el meristemo nodular es la parte más distal del nódulo y las células de esta región se dividen constantemente pero no son infectadas. La actividad persistente del meristemo asegura el alargamiento del nódulo (Vance *et al.*, 1990). En estos nódulos, el crecimiento y funcionamiento se producen simultáneamente. Esto hace posible que en una sección longitudinal de

este tipo de nódulo, se puedan observar todas las fases de la formación del nódulo y de la diferenciación del bacteroide. Los nódulos indeterminados transportan el nitrógeno fijado en forma de amida, y son típicos de leguminosas de clima templado como el guisante, el garbanzo, la alfalfa, y trébol entre otras.

Los nódulos de tipo determinado carecen de un meristemo indeterminado, quedando la actividad meristemática restringida a un período corto. Todo ello da lugar a nódulos esféricos, típicos de leguminosas tropicales como soja, y judía. El tejido central contiene células infectadas y no infectadas, encontrándose todas en el mismo estado de desarrollo. Las células no infectadas están especializadas en la asimilación y transporte de ureídos procedente del nitrógeno fijado (Newcomb y Tandom, 1981).

3.3.3 La nitrogenasa.

Cada uno de los participantes de la simbiosis constituye para el otro una fuente de un elemento clave de su metabolismo: el nitrógeno molecular reducido por los bacteroides, es recuperado y asimilado por la planta huésped. En contra partida, ésta alimenta los bacteroides en sustratos carbonados, fotosintetizados por las hojas y transportado por el floema hasta los nódulos. El nódulo es un órgano complejo que se forma para reunir condiciones muy particulares para el funcionamiento de la nitrogenasa.

La nitrogenasa es un complejo enzimático con dos componentes: la dinitrogenasa reductasa, se trata de una ferroproteína dimérica de unos 65 Kd, y la dinitrogenasa que es una proteína tetramérica de 200 a 270 Kd según los microorganismos, y contiene generalmente hierro y molibdeno. La nitrogenasa de algunos fijadores de nitrógeno, como *Azotobacter* puede funcionar sin molibdeno, este metal puede ser remplazado por el vanadio (Bishop *et al.*, 1990). En *Klebsiella pneumoniae*, modelo de referencia para la organización de genes de la fijación, la síntesis de la nitrogenasa requiere la expresión de 20 genes adjacentes llamados *nif*, agrupados en una región de 25 Kb. Tres de estos genes (*nif A*, *B* y *C*) codan para

los precursores polipeptídicos de los dos componentes de la nitrogenasa. 14 de estos genes son comunes a los fijadores en vida libre, y al *Rhizobium* que presenta otros genes indispensables a la fijación de nitrógeno, los genes *fix* (Merrck, 1992). En el *Rhizobium*, la síntesis de la enzima está reprimida por el oxígeno que actúa sobre la pareja de genes llamada *fix* LJ que controla la transcripción de genes *nif* según un mecanismo en cadena desbloqueado a baja presión de oxígeno (Fischer *et al.*, 1992).

El nitrógeno molecular se fija a nivel de los cofactores con hierro y molibdeno de la dinitrogenasa (Rees *et al.*, 1992) donde es reducido por desprotonaciones sucesivas. La producción de una molécula de amoníaco se hace siempre con un despredimiento de al menos una molécula de hidrógeno. La proporción de hidrógeno producido por molécula de nitrógeno reducido es inversamente proporcional al flujo de electrones que alimenta el sitio activo de la dinitrogenasa. La velocidad de este flujo depende de la disponibilidad en poder reductor y en ATP, como en Mg^{++} .

3.4.1. Membrana peribacteroidal.

Recibe el nombre de membrana peribacteroidal aquella originada por endocitosis de la membrana de la célula vegetal hospedadora y que se encuentra posicionada en la interfase rodeando al microsimbionte, es decir el bacteroide. Dependiendo de la naturaleza de la simbiosis, la membrana debe actuar como mediador del mutuo intercambio de nutrientes o como una barrera pasiva (Day y Udvardi., 1992). Esta membrana es de principal importancia para el establecimiento de la simbiosis pero se conoce poco sobre su estructura y origen, transporte y propiedades enzimáticas. Hay claras indicaciones de que la MPB tiene distinta estructura y función en cada estadio de desarrollo (Lynne *et al.*, 1997). El desarrollo de la membrana peribacteroidal puede ser dividida en tres fases: El origen: Se asume que la MPB deriva de la misma que forma el canal de infección (MCI). Ésta es físicamente continua con la membrana plasmática, lo cual parece indicar que la MPB inicial y la membrana plasmática son idénticas (Verma *et al.*,

1978 Roth y Stacy, 1989).

El proceso de biogénesis se realiza de la misma forma que en el plasmalema y/o del tonoplasto, mediante procesos de endocitosis con vesículas procedentes del retículo endoplasmático y aparato de Golgi (Hoblein *et al*, 1994). En estudio de criofacturación de membranas se ha revelado una fuerte similitud entre las partículas de superficie de ambos tipos de membrana (Tu *et al*, 1975). Con anticuerpos han mostrado similitud en los epitopos presentes en la MPB y el plasmalema (Perotto *et al*, 1991, 1995). La Proliferación: y/o adecuamiento suele ir acompañado de la división bacteroidal en el caso de leguminosas de origen tropical como soja y judía. El microsimbionte puede contribuir a la proliferación de la MPB bien suministrando proteínas para su formación o bien secretando señales que dirigen el flujo MPB (Pal *et al*, 1996). Según Verma (1995) estas señales podrían tratarse de isoformas específicas de proteínas. Se sabe que a través de los factores NOD se pueden formar nódulos en ausencia de bacteroides (Verma., 1992), sin embargo estos factores no participan en el proceso de proliferación de la PBM sino otro grupo de señales que desencadenarían la endocitosis que conlleva el enclaustramiento de la bacteria. Esas señales se denominan factores EDO (factores de endocitosis) y reconocen la membrana vacuolar y/o plasmalema.

Roth y Stacey (1989) estiman que la proliferación de la MPB es siete veces superior a la del plasmalema de la célula infectada. El papel de la MPB durante esta fase es, presumiblemente, mediar el transporte de nutrientes para la división de la bacteria. Estas bacterias son totalmente diferentes de la forma diferenciada y sus necesidades nutricionales son completamente diferentes. Consecuentemente cabe esperar que la permeabilidad de la MPB sea diferente a la que presenta en su estado de madurez.

La composición de la PBM en su estado de madurez viene determinada por la funcionalidad del bacteroide. Su localización como interfase entre la planta y el microorganismo favorece el control de intercambios nutricionales entre ambos simbioses. El contenido de lípidos, esteroides y fosfolípidos determinados por

Cooke (1996) la asemeja más a una endomembrana, como el retículo endoplasmático, que al plasmalema. También se ha comprobado que el perfil de proteínas es distinto al de las otras membranas celulares (Mellor y Werner., 1986) habiéndose identificado algunas proteínas glucosiladas (Perotto *et al*, 1991) por la función o por vía genética. La mayoría de las proteínas de la MPB son sintetizadas por la planta (Verma *et al*, 1978), sin embargo, los lipopolisacáridos de la MPB son sintetizados por el bacteroide (Brewin *et al*, 1995). La reacción cruzada que se establece entre anticuerpos de *Rhizobium leguminosarum* (Berwin *et al*, 1995) y la MPB de nódulos de guisante puede ser debida a la asociación entre los polisacáridos de la membrana externa del bacteroide (MEB) y las glucoproteínas de la MPB (Bradley *et al*, 1986). La función de esta membrana durante esta fase es compartimentalizar la bacteria y mediar el intercambio de nutrientes entre ambos simbioses.

3.4.2. Transportadores de la membrana peribacteroidal.

Los principales nutrientes intercambiados entre la planta y la bacteria, es el nitrógeno fijado por parte de la bacteria y suplemento de carbono reducido por parte de la planta. Los azúcares como glucosa, fructosa y sacarosa no sirven como fuente directa para el bacteroide puesto que la MPB es impermeable a estos compuestos y carecen de invertasa alcalina (Reibach y Streeter., 1981). Además los niveles de enzimas oxidativos de la glucoísis y del ciclo de las pentosas fosfato son muy bajos (Copeland., 1989). Hay sólo una excepción en *Phaseolus vulgaris*. Herrada *et al*. (1989) demostraron que la glucosa estimula la actividad nitrogenasa en bacteroides aislados de judía.

Esta estimulación/inhibición del transporte de malato coincide con la fosforilación/defosforilación de algunas proteínas de la MPB, y en concreto la nodulina 26 (Ou Yang *et al*, 1991). La MPB contiene una proteína-kinasa dependiente de calcio (Verma 1992), insensible a la calmodulina y estimulada por la presencia de fosfolípidos (Mtao *et al*, 1992) cuyo papel parece ser regular el

intercambio de metabolitos a través de la membrana

Transportador de amonio a través de la PBM: El amonio producido por la nitrogenasa atraviesa la MPB por difusión pasiva a favor de un gradiente de concentración. Aún así se requiere un transportador específico para el rápido movimiento de este ión. Estudios iniciales, usando como análogo el amonio, el metilamonio, sirvieron para encontrar evidencias de la existencia de este transportador (Udvardi y Day, 1990). Más recientemente el movimiento de amonio en simbiosomas aislados ha sido reinvestigado usando la técnica de " patch clamp " habiéndose identificado un canal de cationes monovalentes capaz de transportar el amonio a través de la MPB (Tyerman et al, 1995).

Los simbiosomas aislados de diversos tipos de leguminosas pueden captar una gran variedad de sustratos carbonados reducidos y sin excepción son capaces de acumular dicarboxilatos y con alta afinidad. Por este motivo no fue ninguna sorpresa que el transportador de dicarboxilatos fuese encontrado en la MPB (Udvardi *et al*, 1988 Herrada, 1989). La absorción de ácidos dicarboxílicos al interior del bacteroide se puede llevar a cabo por un doble sistema, uno a favor de la elevada concentración de estos metabolitos en el citosol nodular y otro activo mediante una proteína transportadora. En el transporte pasivo, el malato es conducido dentro del simbiosoma por un potencial eléctrico a través de la MPB y subsecuentemente metabolizado en los bacteroides (Udvardi *et al*, 1991). El sistema de transporte activo para los ácidos dicarboxílicos se localiza en la membrana interna del bacteroide. Es constitutivo e idéntico para el malato, succinato y fumarato (Banliste et al, 1985) ya que está formado por una única permeasa codificada por el gen Dct A (San Francisco y Jacobson., 1985). Este sistema Dct está codificado por el gen dct A (Udvardi, 1988). El sistema Dct emplea tres genes, dct A, dct B y dct C. El gen dct A codifica al transportador que es una proteína de membrana. El producto de los otros dos genes, dct B y dct C forman un sistema regulador con dos componentes que dirigen la disponibilidad de carbohidratos e interaccionan con el factor Ntr A que regula la transcripción de dct

A (Ferduy, 1994).

4. Salinidad.

Un factor limitante importante en el desarrollo vegetal dentro del estrés abiótico o ambiental, lo constituye la salinidad (Boyer, 1982). La salinidad de los suelos es un importante problema de la agricultura, especialmente, en las áreas más productivas del mundo, sin embargo, la existencia de plantas halofitas que toleran concentraciones superiores a 0.5 M de NaCl (Flowers *et al.*, 1988) justifica que no hay incompatibilidad absoluta entre planta y sal, y por tanto hay un potencial genético que permite tolerar la salinidad. Este potencial genético no está presente en cultivos de plantas glicofitas, siendo interesante la identificación y selección de genotipos tolerantes, para posteriormente obtener los marcadores que confieren la tolerancia que contribuirá a producir cultivos más resistentes, son necesarios en un programa de mejora. Por tanto, la alternativa razonable a los altos costes económicos de la ingeniería tecnológica es el desarrollo de cultivos tolerantes a la sal.

Definir la tolerancia a la sal es difícil, por la naturaleza compleja del estrés salino y por el amplio rango de respuesta de la planta. Una definición extensa sería, que la tolerancia a la salinidad es un rasgo multigénico que permite a las plantas crecer y mantener su producción económica en presencia de niveles de sal, en particular el cloruro de sodio, no fisiológicos y relativamente constantes (Hurkman, 1992).

4.1. Salinidad en *Rhizobium* en vida libre.

4.1.1. Crecimiento y fisiología.

La tolerancia a la salinidad de diferentes especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* es amplia. En efecto, la literatura muestra que el límite de tolerancia en rhizobia varía de 0.09 a 0.34 M NaCl (Rai *et al.*, 1985) aunque, se ha descrito cepas que toleran hasta 0.65 M NaCl. Así, en algunas el crecimiento se inhibe con 100 mM de NaCl (Zhang *et al.*, 1991), aunque el crecimiento a concentraciones salinas

superiores a 300 mM ha sido descrito en cepas de *R. meliloti* (Yelton et al., 1983; Breedveld et al., 1991), de *R. tropici* (Graham, 1992; Zuniga, 1997), y en cepas que infectan alfalfa, *Acacia*, *Prosopis*, y *Leucaena* que toleran hasta 500 mM de NaCl (Zhang et al., 1991). Observaciones similares han sido obtenidos en *Mesorhizobium* sp. que infecta *Cicer arietinum* cuando sales de potasio, calcio o de magnesio son adicionadas al medio de crecimiento. También se observó que la proporción de cepas sensibles a la salinidad entre los miembros del género *Bradyrhizobium*, de crecimiento lento, es superior a los del género *Rhizobium* de crecimiento rápido (Elsheikh y Wood, 1990).

Respecto a la influencia que los distintos tipos de sales ejercen sobre el crecimiento del *Rhizobium* se señala que, el acetato de sodio es más nocivo que el KCl y NaCl (Botsford, 1984) y el NaCl es más benigno que el CaCl₂. El efecto de la sal está relacionado a la especificidad del ión. Los sales de cloruro son más tóxicos que los sulfatos de sodio, potasio, y magnesio (Elsheikh y Wood, 1990). El ión Mg inhibe el crecimiento a concentraciones más bajas que el ión sodio o potasio (Elsheikh y Wood, 1990). El efecto adverso de las sales ha sido atribuido a la inhibición de la actividad de enzimas específicas por iones minerales específicos (Greenway y Munns, 1980).

La salinidad induce cambios morfológicos y ultraestructurales en la célula bacteriana. Un examen por microscopía revela modificaciones en la estructura del rhizobia. Las células se ven espesas, dilatadas, curvadas, en forma de espirales y alargadas formando una estructura filamentosa (Zahran et al., 1992). En la deformación de células de *R. meliloti* por el estrés osmótico descrita por Busse y Bottomley (1989), también se aprecia que las células se dilatan y aparentan una forma irregular. Esta elongación anormal de rhizobia como la disposición en cadena como, en otras bacterias, *E. coli* por ejemplo (Meury y Kohiyama, 1991) se explica en base a la inhibición de la división celular por el estrés salino.

La estructura interna de las células de rhizobia también se ve gravemente dañada por el estrés salino. Un rasgo de tal desorganización es la separación del contenido celular en zonas claras y otras oscuras (Zahran et al., 1997). Similar

disrupción del citoplasma ha sido descrito por Mendonça *et al.* (1994) en células de *E.coli* y *Salmonella enteritidis* cuando el medio de cultivo es altamente alcalino. Estos autores atribuyen la división del citoplasma en zonas claras y oscuras a la difusión de nucleolos, que corresponden a filamentos de DNA, a través del citoplasma y/o a la precipitación del material celular y macromoléculas. La alta osmolaridad del medio disminuye la frecuencia de replicación del DNA (Meury y Kohijama, 1991). También el DNA se ha visto estar separado como fase líquida del resto del citoplasma en condiciones altamente alcalina (Mendonça *et al.*, 1994).

4.1.2. Mecanismos de osmoregulación.

Muchas células vivas responden a los cambios extracelulares, ajustando su osmolaridad citoplásmica regulando el nivel citoplásmico de solutos particulares. Los mecanismos osmoreguladores, mejor caracterizados están relacionados con la regulación de estos solutos controlando su biosíntesis, su catabolismo, su absorción o flujo. La acumulación de estos solutos depende de la severidad del estrés, de la fase de crecimiento de las células, de la fuente de carbono y de la presencia o ausencia de osmolitos en el medio de crecimiento (Smith *et al.*, 1994.) Los osmoprotectores son solutos exógenos que estimulan el crecimiento bacteriano en medios con alta osmolaridad. Muchos son transportados dentro del citoplasma donde actúan como tal, o son convertidos como solutos compatibles, estos últimos son osmolitos que tienen la facultad de variar sus niveles en un rango amplio, hasta concentraciones molares, sin desorganizar las funciones celulares.

La osmoregulación puede llevarse a cabo por compuestos que pueden servir de osmoprotectores, de solutos compatibles y/o como fuente de carbono o nitrógeno dependiendo del microorganismo (Miller y Wood, 1996). En este sentido, en *R. meliloti*, la prolina puede servir como fuente de nitrógeno y no tiene ninguna función osmoprotectante ni como soluto compatible (González-González *et al.*, 1990; Fujihara y Yoneyama, 1993; Smith *et al.*, 1994). En contraste, la prolina puede ejercer las tres funciones en *Azospirillum brasilense* (Madkour *et al.*, 1990; Hartmann *et al.*, 1991)

como en *E. coli* (Csonka y Hanson, 1991). La prolina betáina como la ectoína no han sido descritas en *A. brasilense* (Madkour *et al.*, 1990). A la ectoína, se le corresponde una función osmoprotectante en *R. leguminosarum*, *Rhizobium* sp. y *B. japonicum* (Talibart *et al.*, 1995). En *E. coli*, la prolina betáina es un soluto osmoprotector (Haardt *et al.*, 1995). La glicina betáina en este microorganismo es un osmoprotector como un soluto compatible (Lucht y Bremer, 1994), en *R. meliloti* además, es un fuente constitutiva de nitrógeno ((Le Rudulier *et al.*, 1991).

Un aporte exógeno de trehalosa estimula la acumulación de ésta en cultivos adicionados de NaCl (Smith *et al.*, 1994). Sin embargo no se ha descrito el efecto de la trehalosa exógena en el índice de crecimiento (Miller y Wood, 1996). En lo que se refiere al posible papel de la trehalosa como soluto compatible en *A. brasilense* hay un conflicto en la literatura: si Madkour *et al.* (1990) observaron que en bacterias diazotroficas la trehalosa puede actuar como soluto compatible las observaciones de Hartmann *et al.* (1991), al contrario, no le asignan tal función. En *R. meliloti* (Botsford y Lewis, 1990; Gonzalez-Gonzalez *et al.*, 1990) como en *A. brasilense*, el glutamato puede acumularse en grandes cantidades sin dañar la célula, por otra parte puede constituir una fuente de nitrógeno para los mismos.

Pocos mecanismos osmoreguladores presentes en rizobacterias han sido ampliamente definidos. La regulación osmótica en *Rhizobium* en vida libre ha sido estudiada fundamentalmente y particularmente en la especie *R. meliloti*. La mayoría de los organismos gram negativos responden al estrés salino incrementando la concentración intracelular del potasio (Yap y Lim, 1983; Fujihara y Yoneyama, 1993). El potasio juega un papel especial, como primera respuesta al aumento de la osmolaridad del medio (Bostfor y Lewis, 1990; Miller y Wood, 1996), es el único soluto inorgánico implicado en la osmoregulación hasta ahora, y actua como un osmoregulador putativo. Esta estimulación del potasio interno a menudo favorece el "pool" de aminoácidos intracelular para mantener la neutralidad eléctrica (Yap y Lim, 1983).

Además, de la acumulación del K, Yap y Lim (1983) observaron que en

Rhizobium sp. bajo condiciones de salinidad, el ácido glutámico es el aminoácido mayoritario representando el 56% del total del pool de aminoácidos. Resultados similares han sido obtenidos en *Rhizobium* sp. WR1001 donde el glutamato aproxima niveles del 88% del contenido total de aminoácidos cuando las células son sometidas a 0.5 M NaCl (Hua et al., 1982). Esta correlación entre acumulación de glutamato y incremento de potasio tiene como objetivo mantener la neutralidad eléctrica (Yap y Lim, 1983).

La producción intracelular del glutamato, en condiciones de estrés salino o osmótico en *Rhizobium*, está bien documentada. La exposición de rizobios que infectan *Prosopis* y *Medicago* a la sal desencadena una acumulación del glutamato (Botsford y Lewis, 1990). También la sobreproducción de glutamato en la cepa WR1001 de *Rhizobium* sp. tolerante a la salinidad (Hua y al., 1982), como en recombinantes de USDA110 que contienen DNA de una cepa de *R. fredii* tolerante a la salinidad (Yang y Li, 1989) ha sido descrita, cuando las células crecen a elevada osmolaridad. Aunque, esta sobreexpresión en la biosíntesis del ácido glutámico es sorprendente Botsford y Lewis (1990) insisten que este exceso de producción sólo representa el 10% de la capacidad celular. Pequeños cambios en la actividad específica de las enzimas de la síntesis del glutamato pueden desencadenar la acumulación del glutamato. Las enzimas involucradas en la producción del glutamato son, la glutamato sintasa (transaminasa), la glutamato deshidrogenasa (desaminasa), glutamina sintetasa. Las investigaciones proponen que la vía GS/GOGAT es importante para la síntesis del glutamato durante el estrés salino. En este sentido, Yap y Lim (1983), demostraron que los niveles de GS y GOGAT de extractos crudos de *Rhizobium* sp. UMKL20 se multiplicaron por 7 y 10 respectivamente. En contraste, el efecto limitado de la salinidad sobre las enzimas del ciclo GS/GOGAT en *R. Meliloti* han sido descritos por Gonzalez-Gonzalez et al. (1990).

Los experimentos de inhibición de la GOGAT por inhibidores como la azaserina (Botsford y Lewis, 1990) sugieren que el glutamato puede sintetizarse por transaminación del 2-cetoglutarato utilizando nitrógeno asimilado de otros

aminoácidos. En *R. meliloti*, González-González *et al.* (1990), observaron que la aminotransferasa más activa es el ácido 2-oxiglutarato aminotransferasa.

4.2. Salinidad en plantas.

El efecto adverso de la salinidad sobre el crecimiento de las plantas se debe a la combinación de dos componentes de este estrés: el estrés hídrico o presión osmótica y la toxicidad iónica relacionada con una excesiva absorción de sodio y/o cloro que desencadenaría un desequilibrio nutricional iónico de la planta. Estos efectos conllevan un rango de respuestas que van desde la disminución del contenido de agua, inhibición de determinadas funciones enzimáticas, hasta la disminución de la fotosíntesis. La consecuencia de todos estos efectos es la reducción del crecimiento, que en casos extremos puede llevar a la muerte de la planta.

La respuesta de las plantas a la salinidad depende del tipo de planta, de la especie, del grado de estrés, y del estado de crecimiento (Waisel *et al.*, 1991). En *Cicer arietinum* el proceso de germinación es menos sensible a la salinidad (Sharma *et al.*, 1992), y esta expresión de resistencia no puede correlacionarse con la tolerancia en el periodo vegetativo (Waisel *et al.*, 1991). En cambio, el estado vegetativo se afecta más adversamente por la sal que el estado reproductor, y la floración es más sensible que el proceso de maduración (Dua, 1992). Las plantas glicofitas, como las leguminosas, reducen rápidamente su crecimiento bajo condiciones salinas, afectándose más la parte aérea que la raíz, aumentando la relación raíz/parte aérea, en garbanzo (Elsheikh y Wood, 1990), en haba (Cordovilla *et al.*, 1994), y en judía (Delgado *et al.*, 1992). En tomate la limitación del crecimiento se ha relacionado con la menor capacidad de la raíz en extraer el agua del suelo y su habilidad de transportar ésta a la parte aérea (Alarcón *et al.*, 1993, 1994). La cantidad de agua que se mueve de la raíz a la parte aérea como su velocidad determinan el contenido y la concentración de las sustancias que llegan a la parte aérea (Mark Hart y smil, 1990). Así, el crecimiento de la parte aérea estaría regulado por el estado hídrico de la raíz. Hay evidencias que sugieren que, a parte de las señales hídricas que comunican el estatus hídrico del suelo con la parte aérea,

podrían darse señales de naturaleza química. Se discute la posible mediación de hormonas vegetales como el ácido abscísico, inducidas por el efecto osmótico (Kefu *et al.*, 1991; Davies y Zhang, 1991). Sin embargo, en plantas de tomate, la disminución del contenido en agua como la inhibición del crecimiento foliar, han sido atribuidas a la reducción de la conductividad hídrica en la raíz causada por el estrés salino (Rodríguez *et al.*, 1997).

En contraste, Cramer y Browman (1991) han observado una reducción en el crecimiento de la hoja de maíz independientemente de la raíz. Este efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la parte aérea ha sido atribuido por algunos autores a la reducción de fotosasimilados, a través de la inhibición de la fotosíntesis (Sing *et al.*, 1990).

En *Phaseolus vulgaris*, la inhibición de la fotosíntesis por la salinidad, parece relacionada en parte, con el cierre estomático que limita el dióxido de carbono disponible a nivel de las células del mesófilo (Brugnoli y Leuteri, 1991), de las alteraciones directas de los procesos fotoquímicos, de las reacciones enzimáticas del ciclo de Calvin o por la acumulación de iones Na y Cl (Bethke y Drew, 1992). A más largo plazo, se produce una desorganización de la estructura del cloroplasto (Shannon *et al.*, 1994).

4.2. Salinidad en simbiosis.

Las leguminosas son cultivos sensibles a las condiciones salinas (Maas y Hoffman, 1977). En particular, el garbanzo muestra una alta sensibilidad (Lauter y Munns, 1986; Elsheikh y Wood, 1990) a este estrés.

4.2.1. Efecto de la salinidad en la simbiosis.

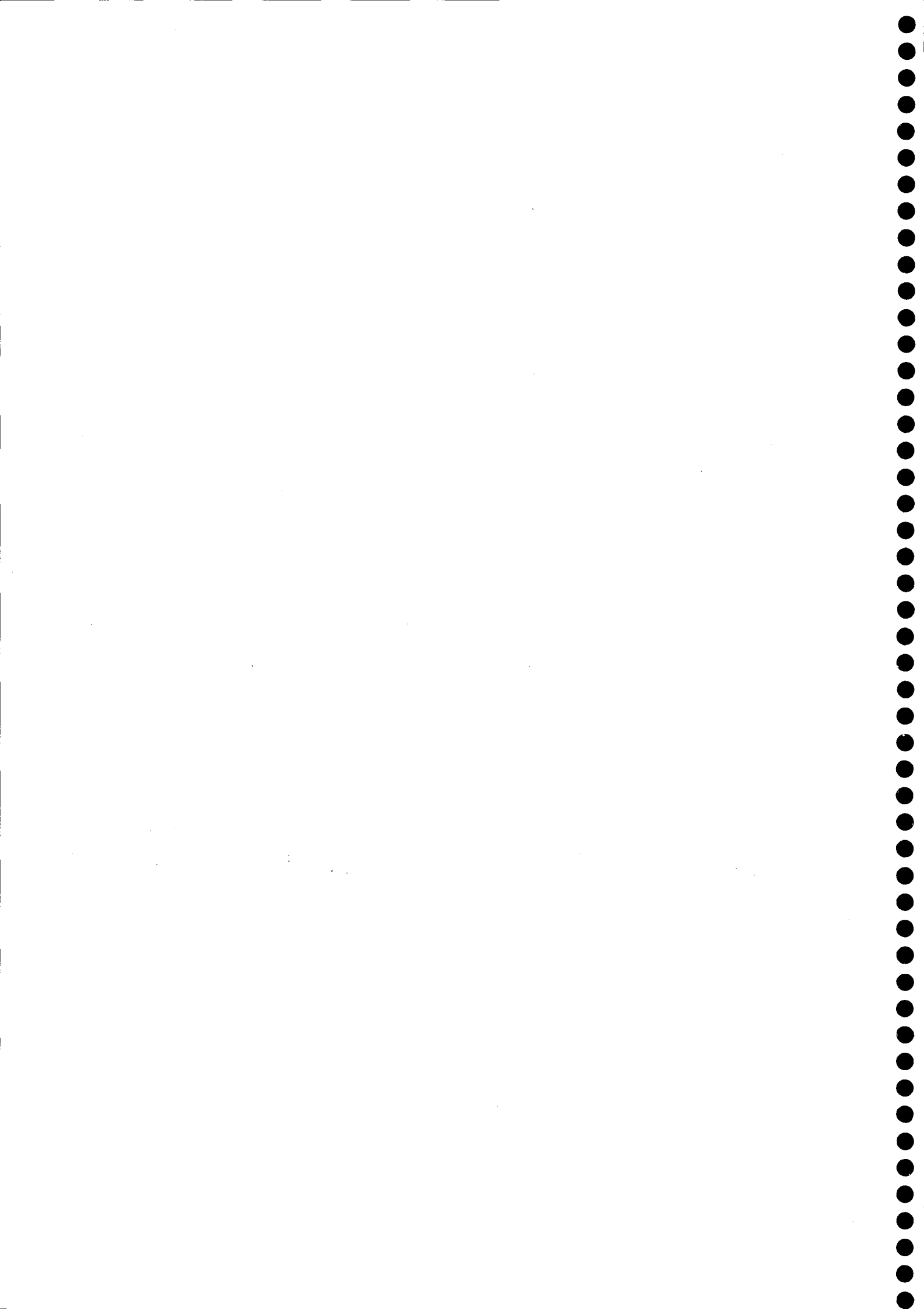
La salinidad afecta el establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. El ambiente osmótico dentro de la rizosfera puede afectar la colonización radical, el desarrollo del cordón de infección, el desarrollo del nódulo, y a la actividad funcional del nódulo. Las condiciones ambientales dentro del hilo de infección son desconocidas.

Sin embargo, se ha sugerido que la presión de turgencia en esta estructura es elevada para favorecer el crecimiento hacia el interior de la corteza radical Nagpal *et al.* (1992). Los bacteroides una vez liberados en las células radicuales de la corteza, experimentan probablemente la alta osmolaridad. Numerosas investigaciones han estudiado el efecto del estrés salino sobre la colonización radical por varios *Rhizobium* y posteriormente el desarrollo del nódulo. Estos estudios han revelado que el estrés salino provoca una alteración en la estructura del pelo radicular Tu, (1981), Zahran y Sprent, (1986), inhibición de los puntos de unión de rhizobios a los pelos radiculares, (Zahran y Sprent, 1986), disminución en el número de nódulos Craig *et al.* (1991), disminución del tamaño del nódulo, (Hafeez *et al.*, 1988; Craig *et al.*, 1991). Además, la asimilación de N₂ fijado por peso de nódulo decae con el estrés salino (Delgado *et al.*, 1993; Cordovilla *et al.*, 1996).

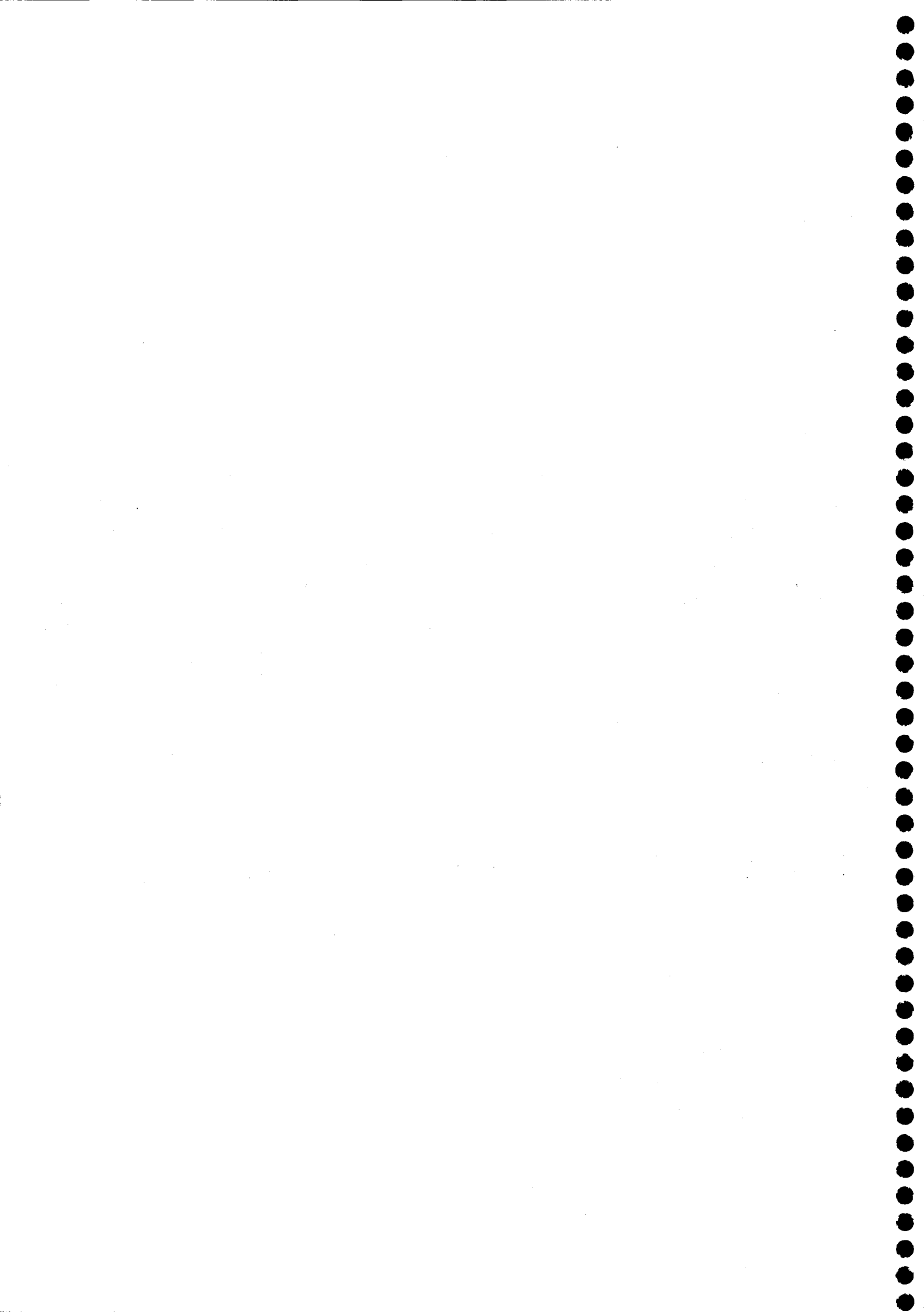
4.2.2. Osmoregulación en la simbiosis.

La concentración de la prolina libre se incrementa ocho veces en bacteroides de *R. meliloti* aislados de nódulos radicuales de alfalfa bajo estrés salino (Fougère *et al.*, 1991). De manera similar Kohl *et al.* (1991) describen un incremento en la concentración de la prolina de cuatro veces en bacteroides aislados de nódulos de *B. japonicum* aislados de nódulos radicuales de soja en condiciones de sequía. Sin embargo la concentración de la prolina dentro del citosol bacteroidal no parece contribuir sustancialmente a la presión osmótica intracelular. Efectivamente, en bacteroides de *R. meliloti* aislados de nódulos de alfalfa sometidos a la salinidad la prolina libre representa aproximadamente y solamente el 12% del "pool" total de aminoácidos (Fougère *et al.*, 1991) y el nivel celular de estos últimos puede ser estimado en el rango de milimolar. Los mutantes de *R. meliloti*, que carecen de actividad prolina deshidrogenasa inducen menos nódulos en alfalfa y son menos competitivos que las células silvestres en estudios de coinoculación. Sin embargo, Chien *et al.*, 1991 observaron que en mutantes de *R. leguminosarum*, donde la prolina deshidrogenasa no se expresa, la habilidad de

nodular al guisante no se ve afectada. En este sentido, Glenn *et al.*, 1991, observaron que los bacteroides aislados de nódulos de "snakebean" pierden la capacidad de catabolizar la prolina. Estas observaciones desencadenados por la falta de la prolina deshidrogenasa durante la nodulación de alfalfa por el *R. meliloti* pueden relacionarse a una función metabólica de la prolina más que a un papel de osmoprotección de esta (Kohl *et al.*, 1994).



OBJETO



OBJETO

El déficit mundial generalizado de proteínas de origen vegetal para satisfacer el constante crecimiento de la población, unido a la crisis energética actual que restringe la disponibilidad de fertilizantes, ha despertado un nuevo interés por las leguminosas, entre las que, naturalmente, se incluye el garbanzo. La mayor limitación de las leguminosas grano cultivadas en los países del área mediterránea son el bajo nivel y la inestabilidad de su producción, lo cual junto con el intenso laboreo y la variabilidad de los productos contribuyen a hacer poco competitivos frente a otros cultivos.

La salinidad es un problema que afecta a más del 40% de los suelos cultivables en diversas partes del mundo incluyendo los países limítrofes del Mediterráneo, debido a que durante décadas se ha utilizado agua de riego con abundantes sales disueltas y éstas se han acumulado en la superficie del suelo en zonas donde la evaporación excede a la precipitación de lluvias. Ello ha llevado a muchos gobiernos, tanto de países ricos como en vías de desarrollo, a asumir esfuerzos encaminados a la obtención de plantas con alto potencial productivo y buena respuesta a los consumos agronómicos. La selección de plantas tolerantes a la salinidad es una alternativa que ha de ser considerada en todos los programas de mejora vegetal. Si los criterios agronómicos de selección o la ingeniería genética son fundamentales e imprescindibles en estos programas, el conocimiento de la respuesta fisiológica y bioquímica de las plantas a la sal no es menos importante.

La tolerancia a la sal es un fenómeno complejo que implica cambios en la morfología, en el desarrollo y en el metabolismo. Los criterios de tolerancia a la sal que frecuentemente se usaban en programas de selección y mejora se basan en: aspectos agronómicos (cosecha, supervivencia, deterioro de la hoja y relación raíz/parte aérea), fisiológicos, donde están implicados los mecanismos de exclusión o tolerancia a la sal, cambios de actividad enzimática, acúmulo de osmoreguladores, exclusión o acumulación de Na^+ ó Cl^- entre otras y la identificación de genes cuya expresión induzca adaptación o tolerancia a la sal.

Objeto

Las leguminosas, debido a su capacidad de formar simbiosis con *Rhizobium* y fijar el nitrógeno atmosférico han sido propuestas como cultivos que pueden aumentar su productividad así como ampliar su desarrollo en zonas marginales y ser utilizados tanto en el desarrollo de la agricultura sostenible como en la rotación de cultivos.

Los objetivos de este trabajo han sido:

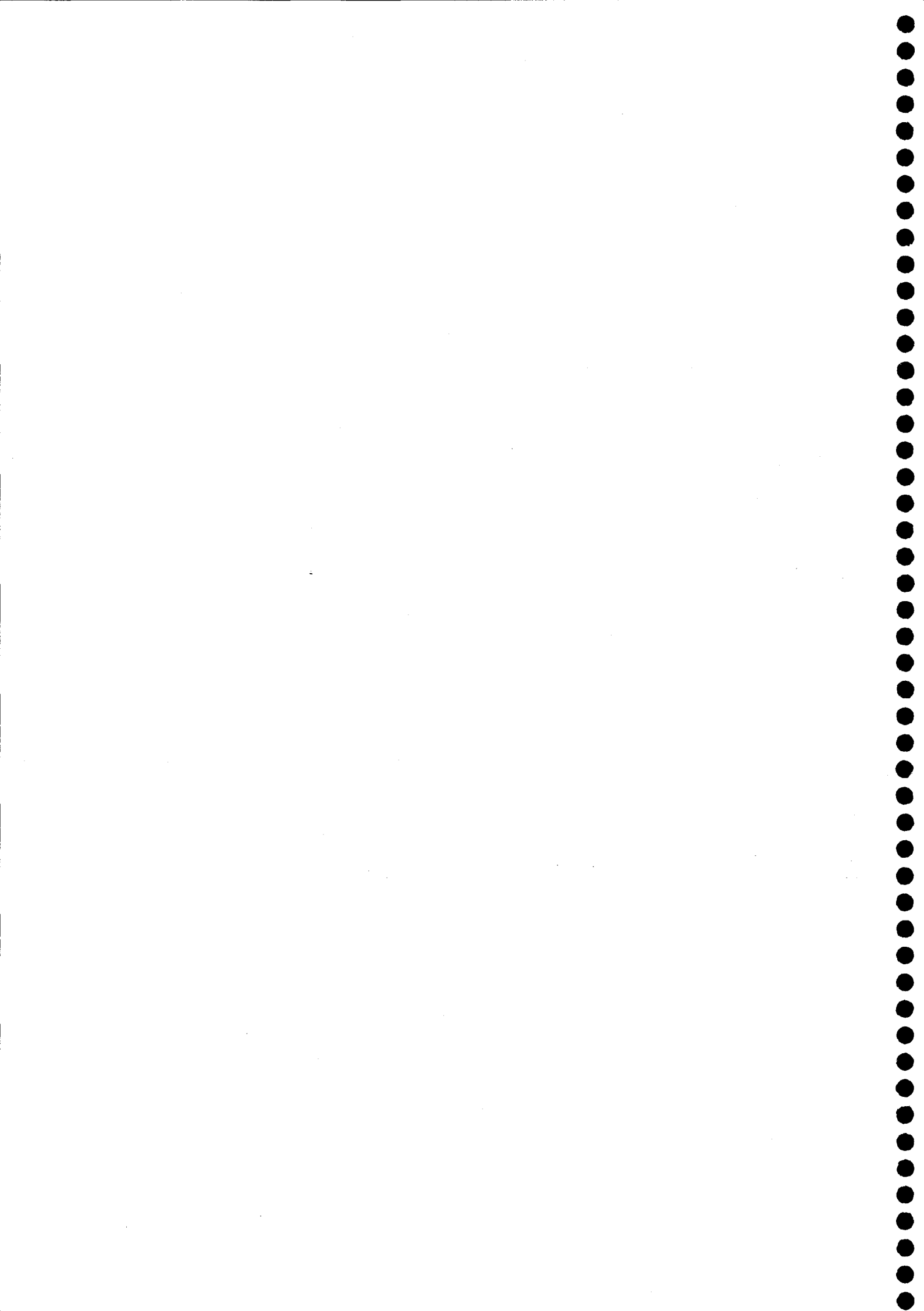
- 1.- Estudiar la biodiversidad de las cepas de *Mesorhizobium ciceri* en su tolerancia a la sal seleccionando y procediendo a estudiar los procesos fisiológicos y los mecanismos de tolerancia.
- 2.- Identificación de cultivos de garbanzo incluyendo variedades locales que toleran la salinidad y sean efectivos en la fijación de nitrógeno.
- 3.- Estudiar los mecanismos de tolerancia a la sal en la simbiosis *Rhizobium ciceri arietinum*.
- 4.- Conocer los mecanismos de adaptación de la simbiosis en el nódulo radical: estudios fisiológicos en el citosol vegetal y en el bacteroide.

Para cumplir estos objetivos se ha llevado a cabo el siguiente plan de trabajo:

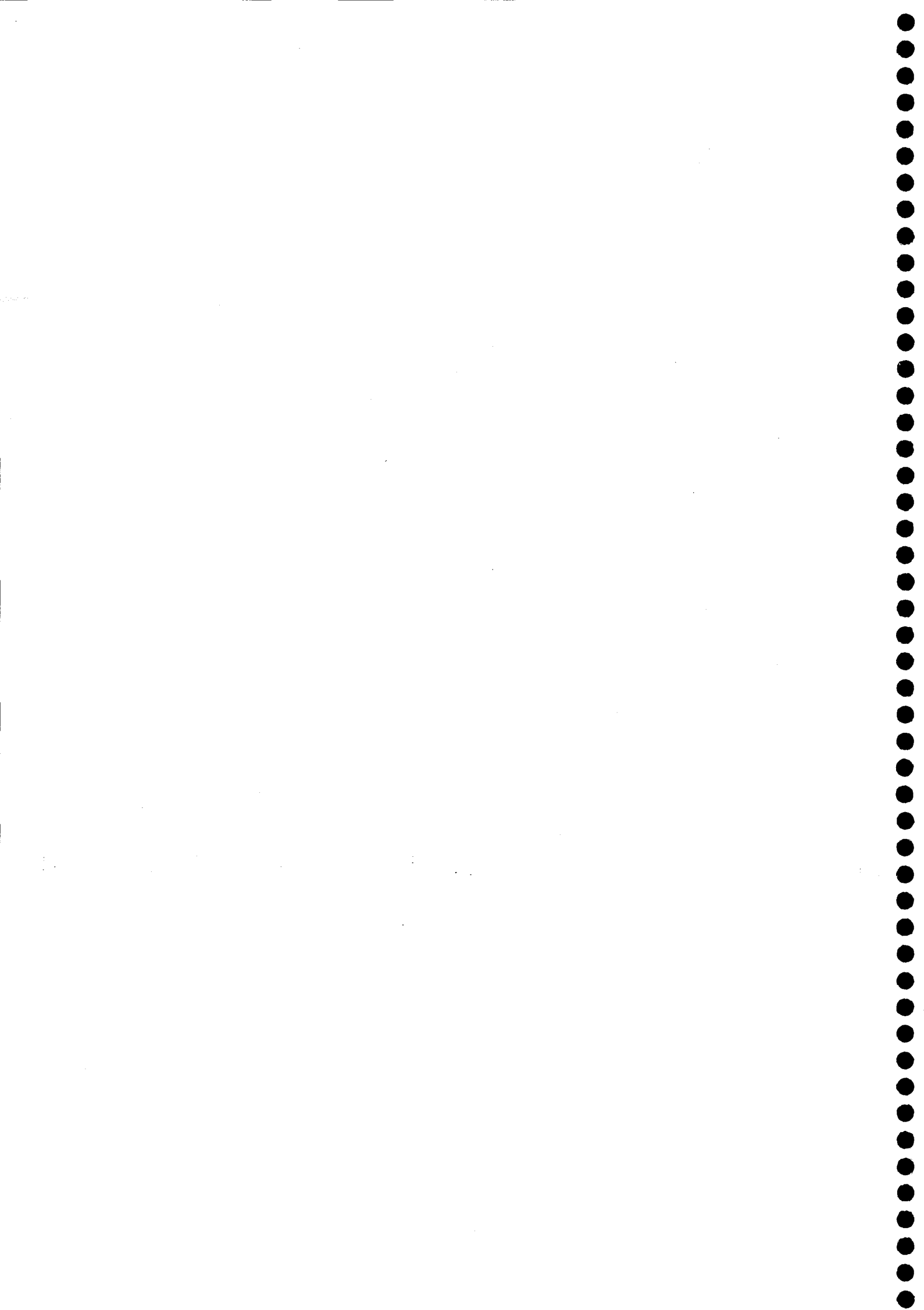
- 1.- Tolerancia a la sal en 25 cepas de *Mesorhizobium ciceri* crecidos en medio YEM (en placa) y TY (en fluido).
 - a) Estudios de la curva de crecimiento bacteriano.
 - b) Perfiles de proteínas y lipopolisacáridos.
 - c) Acumulación de osmolitos en condiciones de salubridad.
 - d) Metabolismo nitrogenado.
- 2.- Selección de cultivares *Cicer arietinum*: germinación.
 - a) Parámetros de germinación.
 - b) Modificaciones en radícula y/o hipocotiles de semilla: perfil de proteínas, actividades enzimáticas y contenido en solutos intracelulares.
- 3.- Influencia del estrés salino en la simbiosis *Mesorhizobium ciceri* y *Cicer arietinum*.

- a) Estudio de cinco variedades de garbanzo con adición de sal al inicio del crecimiento (Efecto "long-term").
- b) Estudio comparativo entre dos variedades de garbanzo, con adición de sal al inicio del crecimiento (efecto "long-term").
- c) Estudio de la simbiosis ILC1919-Ch191: efecto de la sal aplicada una vez la simbiosis esté establecida (efecto "short term")

4.- Respiración y metabolismo enzimático del bacteroide nodular:
sustratos respiratorios.



MATERIAL Y MÉTODOS



MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material biológico.

1.1. Microorganismos.

Las cepas de *Rhizobium* utilizadas en este trabajo proceden de diferentes colecciones: Departamento de Microbiología de la ETSIA (Dr. Ruíz Argüeso), Laboratoire de Recherches sur les Symbiontes des Racines, INRA Montpellier (Dr. Cleyet Marel), Departamento de Microbiología de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC) Granada.

Tabla 1. Denominación, colección y país de procedencia de las cepas de *Rhizobium* utilizadas.

Cepa	Colección	País
*IC2008	ICRISAT	Gran Bretaña
*IC2091	ICRISAT	Gran Bretaña
*USDA3231	USDA	USA (California)
*IC2002	ICRISAT	India
*IC2018	ICRISAT	Turquía
*USDA3279	USDA	USA (California)
*CP48A	ICRISAT	Gran Bretaña
*829	ETSIA	España (Caceres)
*835	ETSIA	España (Cáceres)
*IC60	ICRISAT	India
*H45	IARI	India
Ch-191	ICARDA	Desconocido
Ch-183	ICARDA	Siria
Ch-185	ICARDA	Siria
Ch-178	ICARDA	Siria
UPM820	3HOa5	U. Wisconsin
UPM821	DHOa6	Nueva York
UPM838	43b	Israel
UPM928	IC6 ICRISAT	India
UPM826	CC549a	Australia (CSIRO)
UPM865	Ca116	España (Córdoba)
UPM842	522	Ucrania
UPM863	UMCa36	España (León)

* J.C. Cleyet Marel, INRA, Montpellier.
UPM de T. Ruíz-Argüeso, ETSIA, Madrid.

Los estudios de homología de DNA revelaron que la cepa Ch-191 pertenece al género *Mesorhizobium* y que la especie es *ciceri* (Noel Amarguer, INRA, Dijon). En la tabla 1 se recoge el origen y procedencia de las cepas bacterianas.

1.1.1. Medios de cultivo.

Medio YEM

K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	0.2 g
NaCl.....	0.1 g
Manitol.....	10.0 g
Extracto de levadura.....	1.0 g
Agar (medio sólido).....	15.0 g
Agua destilada.....	1000 ml

Se ajusta el pH a 7.0 -7.2 y se esteriliza a 115°C durante 20 min.

Medio TY

Triptona.....	5.0 g
Extracto de levadura.....	3.0 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O.....	0.9 g
Agar (medio sólido).....	15.0 g
Agua destilada.....	1000 ml

Se ajusta el pH a 7.0 y se esteriliza a 115°C durante 20 min.

1.1.2. Conservación de las cepas bacterianas.

El medio de cultivo empleado en la conservación de los microorganismos fue el medio sólido YEM (Vincent, 1970) que se distribuyó en tubos inclinados. En ellos se conservaron las cepas de uso rutinario manteniéndose a 4°C y resemebrándose cada 2 ó 3 meses. Para evitar la pérdida de caracteres genéticos por sucesivas resiembras, los cultivos líquidos microbianos en fase logarítmica de crecimiento, se guardaron a -80°C adicionados de glicerol al 20% (v/v).

1.2. Material vegetal.

La especie vegetal utilizada ha sido el garbanzo (*Cicer arietinum* L.). El garbanzo es una leguminosa grano de interés agrícola y económico, de gran

implantación en el área mediterránea. Se han utilizado varios cultivares de *Cicer arietinum* de distintos orígenes que se reflejan en la tabla 2.

Tabla 2. Denominación y algunas características de los cultivares de *C. Arietinum* utilizados en el presente trabajo.

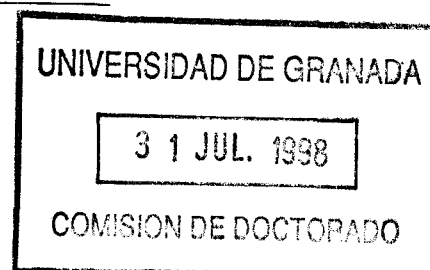
Cultivares	Características	Procedencia	Origen geográfico
Pedrosillano	Marrón, liso, pequeño	Sierra Nevada	España (Salamanca)
Mejicano	Beige, liso, grande.		Mejico
Castellano Garbanzilla	Beige, liso, mediano.		España (León)
Castellano Alhama.	Beige, rugoso, mediano.		España (Alcalá)
Lechoso	Blanco, rugoso, grande		España (Granada)
Gulavi	Beige, liso, mediano.		
Sirio	Marrón, liso, pequeño.		
Nacional	Beige, rugoso, grande.	El Labrador	España (Granada)
Alhama	Beige, rugoso, mediano.	El Labrador	España (Granada)
ILC1919	Beige, liso, mediano.	ICARDA	Siria

1.2.1. Solución nutritiva para plantas.

La solución nutritiva utilizada para el cultivo de las plantas ha sido la descrita por Rigaud y Puppo (1975), siendo su composición la que se expone en la tabla 3.

Tabla 3. Composición de la solución nutritiva utilizada para el cultivo de plantas (Rigaud y Puppo, 1975).

Macronutrientes		Micronutrientes	
KH_2PO_4	0.200 g	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.004 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.200 g	$\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.002 g
KCl	0.200 g	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.002 g
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.120 g	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.003 g
Na_2FeEDTA	0.025 g	H_3BO_3	0.018 g
		$\text{CoCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.12 mg
Agua		1000 ml	



2. Cultivo de plantas.

El cultivo de las plantas se llevó a cabo mediante cultivo hidropónico en jarras Leonard modificadas (Leonard, 1943) de 1.5 l de capacidad, con vermiculita como sustrato inerte, que permite un adecuado desarrollo radical gracias a su porosidad. Las jarras Leonard constan de dos partes de vidrio que encajan perfectamente: la parte superior contiene el sustrato y la inferior la solución nutritiva. A través de una mecha de papel secante asciende la solución por capilaridad, manteniéndose de esta forma el grado de humedad del sustrato. Las jarras se esterilizan en autoclave a 117°C durante 1 h y 30 minutos.

2.1. Esterilización y germinación de las semillas.

Las semillas se esterilizaron en superficie con agua oxigenada 30% (p/v) durante 2 min. y medio (Somasegaran *et al.*, 1988), lavando después con abundante agua destilada estéril con objeto de eliminar los restos de agua oxigenada. Tras la esterilización se dejaron en imbibición durante 90 min. Transcurrido este tiempo, se colocaron en semilleros de vermiculita estéril y convenientemente humedecida. La esterilización de semillas y la preparación de los semilleros se llevó a cabo en cámara de flujo laminar (Micro H Telstar) para prevenir contaminaciones. Los semilleros se cubrieron con bolsas de polietileno a fin de evitar la pérdida de humedad y se mantuvieron en oscuridad durante 48 h a 26°C en estufa de germinación.

2.2. Preparación del inóculo.

El inóculo se desarrolló a 28°C en agitación a 170 rpm, en matraces de 250 ml con medio YEM líquido, inoculados al 1% a partir de preinóculos crecidos durante 48 h. Este inóculo crece durante 72 h hasta obtener una suspensión bacteriana de aproximadamente 10^9 células/ml.

2.3. Siembra e inoculación.

En cada jarra Leonard estéril se siembran, en condiciones axénicas, dos semillas pregerminadas (1-3 cm de radícula) aplicándose a cada una 1 ml de inóculo. Una vez inoculadas se cubren con vermiculita y sobre la superficie de la vermiculita se coloca una capa de perlita estéril, que disminuye el riesgo de contaminación y reduce las pérdidas de agua por evaporación (Caba *et al.*, 1990). Antes de trasladar las jarras Leonard a la cámara de cultivo se revisten con papel confitero a fin de mantener la raíz en oscuridad.

2.4. Condiciones de la cámara de cultivo.

En todos los experimentos realizados, las plantas fueron cultivadas en una cámara KOXKA (SA8/17-27/R) con las siguientes condiciones ambientales:

- Fotoperiodo: 16h luz/ 8h oscuridad
- Temperatura: 23°C día/ 17°C noche $\pm 1^\circ\text{C}$
- Humedad relativa: 55% día/ 75% noche
- Intensidad luminosa: $450 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (400-700 nm) en la superficie de las macetas, suministrada por fluorescentes Sylvania Cool-White (F72T12-CW-VHO) y lámparas incandescentes de 40 watos (30% del total de watos).

Las jarras Leonard se distribuyeron sobre la mesa de cultivo completamente al azar, cambiándose de forma periódica de lugar. Cada siete días al principio y cada tres a partir de la tercera semana, se cambió el recipiente inferior de la jarra Leonard por otro con solución nutritiva fresca y estéril.

3. Experimentos realizados.

3.1. Estudio de *Rhizobium ciceri* en vida libre: Efecto del NaCl.

3.1.1. Tolerancia al NaCl de diferentes cepas de *Rhizobium ciceri*.

La determinación del crecimiento en condiciones salinas, de las 24 cepas de *Rhizobium ciceri* expuestas en la tabla I, se llevó a cabo adicionando al medio de

cultivo YEM sólido diferentes concentraciones de NaCl. El "screening" se realizó en placas de petri, a razón de 3 repeticiones por tratamiento. El crecimiento o no crecimiento se determinó a las 72 h de incubación a 28°C, y su valoración se realizó mediante la visualización del crecimiento en placa.

3.1.2. Curvas de crecimiento del *Mesorhizobium ciceri* Ch-191 con diferentes dosis de NaCl.

Un estudio más profundo del crecimiento de la cepa Ch-191 en condiciones salinas ha sido abordado. Los cultivos se incubaron a 28°C, en agitación a 170 rpm en matraces de 250 ml que contenían 100 ml de medio YEM líquido, inoculados al 1% a partir de un preinóculo crecido durante 48 h. El tratamiento salino se realizó adicionando al medio de cultivo diferentes concentraciones de NaCl (100, 200, 300, y 400 mM) manteniendo un control sin sal. El crecimiento fue determinado mediante la lectura de la absorbancia (D.O) a 600 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro Spectronic 301. Las lecturas fueron hechas durante 72 h con intervalos de 6 y 12 h.

Simultáneamente, se retiraron alícuotas de cada matraz para determinar el número de células viables y contenido de proteínas. El número de células viables se realizó mediante la preparación de diluciones seriadas al décimo y siembra de 0.1 ml de las diluciones adecuadas en placas de petri (2 placas/dilución) con medio TY. Las placas de petri se incubaron a 28°C durante 48 h.

Se determinó el tiempo de generación (G), definido como el tiempo necesario para duplicar la población. La fórmula utilizada es la que sigue:

$$G = t \times \log(2) / [\log(b) - \log(a)]$$

Donde:

t = tiempo en horas transcurrido desde el inicio hasta el final de la fase logarítmica de crecimiento,

2 representa la multiplicación por escisión de las bacterias,

b = número de células viables/ml al final de la fase logarítmica

a = número de células viables/ml al inicio de la fase logarítmica.

3.1.3. Caracterización de *Mesorhizobium ciceri* Ch-191 en condiciones de salinidad.

La cepa Ch-191 de *Mesorhizobium ciceri* por sus características de halotolerancia se eligió para el estudio de la respuesta de la bacteria en medio salino. Para ello, se procedió al análisis de: a) Perfiles de proteínas; b) Perfiles de lipopolisacáridos.

3.1.4. Mecanismos de tolerancia al NaCl

Se procedió a estudiar los mecanismos que genera el *Mesorhizobium ciceri* cepa Ch-191 ante el estrés salino para ello se valoró: a) Contenido en prolina, aminoácidos y glutamato. b) Metabolismo del nitrógeno: glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (NADH-GOGAT) y glutamato deshidrogenasa (GDH)

3.2. Germinación de diferentes cultivares de *Cicer arietinum* en condiciones de estrés salino.

3.2.1. Valoración de la germinación.

La respuesta a la sal en el proceso de germinación fue estudiada con diez cultivares de garbanzo cuyas características y procedencias se presentaron en la tabla II. Para realizar los ensayos de germinación, previamente las semillas se esterilizaron en superficie con H₂O₂ al 30 % durante 2.5 minutos, luego se lavaron rápidamente con agua destilada y se colocaron en placas petri de 10 cm de diámetro con tres capas de papel Whatman 3MM. A continuación las semillas fueron germinadas en presencia de 0, 50, 100, 150 y 200 mM de NaCl disuelto en agua destilada estéril. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento y en cada placa se colocaron 10 semillas a las que se les adicionó 6 u 8 ml del tratamiento respectivo dependiendo del tamaño de la semilla. Todo el experimento se llevó a cabo en una cámara de germinación a una temperatura de 25°C. El número de semillas germinadas fueron contadas a las 48 y 96 horas. Se consideró una semilla

germinada cuando la radícula emergió 2 mm (Ashraf y Wahed, 1990). Los índices de germinación valorados fueron:

a) Porcentaje de germinación (%G):

$$\%G = \frac{\text{N}^\circ \text{de semillas germinadas}}{\text{N}^\circ \text{total de semillas}} \times 100$$

b) Índice de germinación (GRI): siguiendo el procedimiento descrito por Bouton *et al.* (1976) modificado por Fowler (1991) según la fórmula:

Donde, G2 y G4 son los porcentajes de germinación a los 2 y 4 días de la siembra.

c) Tasa de germinación (TG): La tasa de germinación se aplicó según la fórmula de Zaiter *et al.* (1994).

$$TG = \Sigma(n_i/t_i)$$

Donde, n_i es el número de semillas que germinan en el día i y t_i el tiempo en días en que germinan, todo ajustado en base a 100 semillas.

3.2.2. Fisiología de la germinación.

En las radículas emergidas de la germinación se llevó a cabo un estudio fisiológico y bioquímico con objeto de evaluar el efecto que el NaCl ejerce en el proceso germinativo. Se valoró: a) Crecimiento de las radículas: peso seco, peso fresco y contenido de agua. b) Perfil proteico de las radículas. c) Contenido en prolina, aminoácidos, azúcares totales solubles y amonio. d) Actividades enzimáticas del metabolismo nitrogenado: glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (NADH-GOGAT). e) Metabolismo carbonado: fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), malato deshidrogenasa (MDH), alcohol deshidrogenasa

(ADH), 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), isocitrato deshidrogenasa (ICDH).

3.3. Simbiosis *Cicer arietinum*-*Mesorhizobium cicer* en condiciones de estrés salino.

Una vez estudiado el efecto del NaCl en bacterias en vida libre y en el proceso de germinación de la planta, se abordó el estudio de la simbiosis *Cicer arietinum*-*Mesorhizobium ciceri* Ch-191 en condiciones de salinidad, en cuatro experimentos diferentes.

3.3.1. Tolerancia a la salinidad de distintos cultivares de *Cicer arietinum*.

Se utilizaron cinco cultivares de garbanzo inoculados con la cepa Ch-191 de *Mesorhizobium ciceri*. Las plantas crecieron en jarras Leonard con solución nutritiva adicionada de 2 mM de KNO₃. Se ensayaron cuatro niveles de NaCl (0, 50, 75 y 100 mM). Las plantas se recogieron al final del periodo vegetativo, cuando aparecen los primeros botones florales (28-34 días). En cada tratamiento se utilizaron 9 jarras (18 plantas). El experimento se realizó dos veces, determinándose los siguientes parámetros:

- a) Análisis de crecimiento: Peso seco de parte aérea, raíz y total por planta y relación raíz/parte aérea.
- b) Nodulación y fijación de nitrógeno: Peso seco de nódulos, peso normalizado de nódulos, actividad reductora de acetileno específica y por planta.
- c) Análisis nutricional: Contenido en N, K, P, Ca, Na y Mg en raíz y parte aérea

3.3.2. Estudio comparativo de dos cultivares de *Cicer arietinum* con distinta sensibilidad a la sal.

Los experimentos se realizaron con Pedrosillano, cultivar sensible y ILC1919, tolerante. Se aplicaron tres concentraciones de NaCl de 50, 75 y 100 mM a la solución nutritiva. Las plantas control se mantuvieron a lo largo del cultivo en una solución libre de sal. Las plantas se recogieron al final del periodo vegetativo, marcado por la aparición de los botones florales. El experimento se repitió al menos una vez para cada cultivar y se determinaron los siguientes parámetros:

- a) Análisis de crecimiento: Peso seco de parte aérea, raíz y total por planta, y relación raíz/parte aérea.
- b) Nodulación y fijación de nitrógeno: Peso seco de nódulos y peso normalizado de nódulos, actividad reductora de acetileno específica y por planta.
- c) Fotosíntesis: Actividad ribulosa 1.5 bifosfato carboxilasa (Rubisco) y contenido en clorofilas totales.
- d) Actividades enzimáticas del metabolismo carbonado: Sacarosa sintasa, invertasa alcalina, 6-fosfogluconato deshidrogenasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa, malato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa, y isocitrato deshidrogenasa en distintos órganos vegetales.
- e) Actividades enzimáticas del metabolismo nitrogenado: Glutamina sintetasa y glutamato sintasa.
- f) Determinaciones analíticas: Contenido en proteínas solubles, prolina, aminoácidos, azúcares totales solubles y malato.
- g) Análisis nutricional: Contenido en N, K, P, Ca, Na y Mg en raíz y parte aérea.

3.3.3. Efecto del NaCl aplicado en el crecimiento vegetativo en la simbiosis ILC1919-Ch-191.

Se utilizaron planfas del cv. ILC1919 inoculados con la cepa Ch-191. Se aplicaron 3 niveles de NaCl 50, 75 y 100 mM de NaCl, en el periodo de crecimiento vegetativo, cuando la simbiosis está establecida, empleándose un diseño experimental de 4 tratamientos salinos, con 9 jarras Leonard por tratamiento, utilizándose tres en cada recogida. Los muestreos fueron a los 4, 7, 11 y 14 días después de la aplicación de la sal. En los dos primeros, las plantas estaban en crecimiento vegetativo, en el tercero se inició la floración y en la última recogida las plantas se encontraban en plena floración. Los datos son la media de dos experimentos. Las determinaciones realizadas fueron las mismas que las del experimento anterior.

3.3.4. Metabolismo de los bacteroides aislados de nódulos de *Cicer arietinum* en condiciones de sal.

Se utilizaron bacteroides aislados de nódulos de garbanzo (cv. ILC1919) en simbiosis con la cepa Ch-191 estudiando las alteraciones que ejerce el estrés salino en la respiración bacteroidal y en su metabolismo. Se ensayaron dos niveles de NaCl 0 y 50 mM. Se prepararon 50 jarras por tratamiento, realizándose una sola recogida a los 28 días, al final del periodo vegetativo, marcada por la aparición de los botones florales. El experimento se repitió al menos una vez y se determinaron los siguientes parámetros:

- a) Respiración bacteroidal: efecto de distintos substratos energéticos.
- b) Actividades enzimáticas del citosol bacteroidal: malato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa e isocitrato deshidrogenasa.

4. Metodología empleada.

4.1. Perfil de proteínas.

4.1.1. Perfil de proteínas en bacterias.

El estudio del perfil de proteínas, se realizó utilizando geles de poliacrilamida-SDS, siguiendo el sistema de Laemmli (1970), con algunas

modificaciones. La cubeta de electroforesis utilizada fue una BIORAD y la fuente de alimentación LKB Multi Drive XL (Pharmacia). Los geles se prepararon en placas de 10 x 8 cm con espaciadores de 0.75 mm. Se utilizó un gel separador del 15% de acrilamida (acrilamida 29.2% - bisacrilamida 0.8%) en Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, con SDS al 0.1% (p/v) y como catalizadores de la polimerización, persulfato amónico (0.1%) y TEMED (0.06%). Antes de añadir los catalizadores, la solución se desgasificó al vacío en agitación durante 5 min. El gel concentrador fue del 5% de acrilamida en Tris-HCl 240 mM pH 6.8, SDS 0.1%, persulfato amónico 0.05% y TEMED 0.05%. Antes de añadir los catalizadores, la solución de acrilamida se desgasificó del mismo modo descrito para el gel separador.

Se centrifugan 10-30 ml de cultivo bacteriano crecido en medio YEM con o sin sal hasta el final de la fase logarítmica, el sedimento se lava con 1 ml 50 mM Tris HCl, pH 7.5, y se resuspende en 200 µl de la misma solución. Las células se rompen por sonicación (sonicador Vibra-cell 100 Watt model, Sonic & Materials INC. USA), aplicando tres pulsos de 15 segundos. Las muestras fueron preparadas mezclándolas con el doble de su volumen de una solución compuesta de Tris-HCl 0.1 M pH 6.8, glicerol 10% (v/v), SDS 1% (p/v), azul de bromofenol 0.01% (p/v) y β-mercaptoetanol 1.5% (v/v), para dotar a las proteínas de una carga neta negativa. Posteriormente se mantuvieron durante 3 min. en ebullición para desnaturalizar las proteínas. El tampón de desarrollo estaba constituido por Tris-HCl 25 mM pH 8.3, glicina 0.192 M y SDS 0.1% (p/v). El desarrollo de la electroforesis tuvo lugar a 150 voltios.

Para la determinación del peso molecular se han utilizado las siguientes proteínas como marcadores: anhidrasa carbónica (29 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), seroalbúmina (66 kDa), fosforilasa b (97.4 kDa), b-galactosidasa (116 kDa) y miosina (205 kDa). Todas las proteínas formaban parte de un kit de calibración comercial (Sigma). Los marcadores fueron disueltos en el mismo medio en que se prepararon las muestras y se procesaron de igual modo, cargando entre 5 y 10 mg de cada marcador.

El gel se tiñó con nitrato de plata, para ello se siguió la metodología de Blum *et al.* (1987). Todas las soluciones deben prepararse al momento de usarlas, todo el proceso de tinción se realiza en agitación y consta de varias etapas: (1) fijación durante 2 horas en una solución que contiene 50% metanol, 12% ácido acético glacial y 50 μ l de formaldehído al 37%; (2) tres lavados de 20 min. en etanol al 50%; (3) oxidación durante 1 min. en 100 ml de tiosulfato sódico 0.8 mM; (4) cuatro lavados de 20 s en agua destilada; (5) tinción durante 20 min. en solución de nitrato de plata 2 g/l y formaldehído al 37% 0.75 ml/l, este paso se realiza protegido de la luz; (6) dos lavados de 20 s en agua destilada; (7) revelado de 3 a 8 min en 100 ml de una solución de carbonato de sodio (60 g/l), 0.5 ml/l de formaldehído al 37% y 4 mg/l de tiosulfato sódico; (8) dos lavados de 1 min. en agua destilada; (9) las bandas de proteínas se fijan en una solución de 50% metanol y 12% ácido acético glacial durante 15 min.

La movilidad relativa de cada proteína (R_f) se determinó dividiendo la distancia de migración de la proteína por la del frente. El cálculo del peso molecular se realizó por medio de las rectas de calibrado construidas representando en el eje de abcisas el R_f de las proteínas patrón y en el eje de ordenadas, los logaritmos de sus pesos moleculares, calculándose la ecuación de la recta por un ajuste de mínimos cuadrados.

El gel fue analizado en un densitómetro Shimadzu CS-9000 donde se registran los picos máximos y mínimos de las proteínas presentes, así como la integración de los mismos expresados en porcentaje.

4.1.2. Perfil de proteínas en radículas.

El estudio de perfil de proteínas en radículas se realizó utilizando geles de poliacrilamida-SDS, según el sistema de Laemmli (1970), siguiendo básicamente el mismo protocolo descrito en el apartado anterior con estas modificaciones: el gel separador es del 12% de acrilamida y el desarrollo de la electroforesis tuvo lugar a 100 voltios.

Las muestras para la electroforesis fueron preparadas según la técnica descrita por Zaiter *et al.* (1994). 0.5 g de raíces se maceraron en tampón Hepes 100 mM pH 7.5 que contenía 10 mM KCl, 2 mM Ditiotetriol (DTT), 1 mM ácido etilen diamino tetraácetico (Na₂-EDTA), 1 mM MgCl y 0.4 mM de sacarosa. El macerado se centrifugó a 30.000 g durante 20 min. A continuación, en el sobrenadante resultante se cuantificaron las proteínas solubles por el metodo Bradford (1975), y posteriormente se procedió a la precipitación de estas con acetona durante una hora y a temperatura ambiente. El precipitado de proteínas se recuperó por centrifugación 10 min. a 2500 g. Las proteínas totales se resuspendieron finalmente en 200 µl de tampón de muestra de la electroforesis descrito en el apartado anterior.

La detección de las proteínas presentes en las muestras sometidas a electroforesis se llevó a cabo por inmersión del gel en una mezcla metanol:ácido acético:agua (en proporciones 5:1:4) que contenía azul de Coomassie R-250 al 0.125% (p/v) e incubando el gel en agitación suave a temperatura ambiente durante 1-2 h. La destinción del gel se realizó mediante lavados sucesivos con la misma mezcla utilizada en la tinción, pero sin el colorante. El gel fue analizado según el apartado anterior.

4.2. Perfil de lipopolisacáridos en bacterias.

Las muestras para la electroforesis fueron preparadas según la técnica descrita por Hitchcock y Brown (1983), con las modificaciones descritas por Santamaría *et al.* (1997). A partir de las bacterias liofilizadas se realizó una suspensión de cada una en agua destilada, ajustando a una densidad óptica (λ , 600 nm) de 1.0. Se centrifugó 1 ml de la anterior suspensión, y el sedimento se resuspendió en 500 µl de tampón de lisis (2% SDS, 5% ditiotreitól, 10% glicerol, y 0.017% de azul de bromofenol, en tampón Tris 0.5M, pH 8.0). Se calentaron las muestras a 100°C durante 10 minutos. A 250 µl de cada muestra se les añadieron 10 µl de proteinasa K (*Tritirachium album*, Boheringer), preparada a una

concentración de 2.5 µg/µl en tampón de lisis. La mezcla fue incubada a 60°C durante 1 hora, agitándose cada 15 minutos; las muestras se centrifugaron y los sobrenadantes se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Las electroforesis fueron llevadas a cabo según el método de electroforesis discontinua para proteínas con SDS de Laemmli (1970), sin ninguna variación. Se prepararon geles planos de 0.75 mm de espesor al 12.5% (p/v) de poliacrilamida en el gel de separación. Se aplicaron volúmenes de 5µl de muestra en cada pocillo. Las electroforesis se realizaron a temperatura ambiente y corriente constante (20 mA por placa). Para la tinción de los geles, es imprescindible que el agua empleada en todos los pasos de este proceso tenga la menor conductividad posible.

Los lipopolisacáridos se tiñeron con plata según el método de Tsai y Frasch (1982), con algunas variaciones: al terminar la electroforesis se trató el gel con la solución fijadora (etanol-acético-agua, 40:5:55 en vol.) y se mantuvieron en agitación un mínimo de una hora, cambiando varias veces la disolución fijadora. A continuación se oxidaron con ácido periódico al 0.7% en disolución fijadora durante 5 minutos, lavándose seguidamente con agua las veces necesarias hasta alcanzar pH neutro. Una vez eliminado el ácido, se añaden 150 ml de reactivo de tinción, que se preparó de la siguiente forma: se mezclaron 2 ml de NH₄OH concentrado con 28 ml de NaOH 0.1 M recién preparado. Se añadieron lentamente, y siempre agitando, 5 ml de AgNO₃ al 20% en agua destilada, lo que origina la aparición de un precipitado oscuro transitorio. Una vez redissuelto éste, se añadieron 115 ml de agua desionizada. El reactivo de tinción se dejó actuar a temperatura ambiente, bajo constante agitación, durante 10 minutos. seguidamente se lava hasta alcanzar nuevamente pH neutro. Por último, se añade el revelador (100 µl de formaldehído al 37%, 10 mg de ácido cítrico en 200 ml de agua desionizada) que se deja reaccionar a temperatura ambiente hasta que se observen las bandas con nitidez. Las reacción se detuvo lavando el gel varias veces con agua desionizada. El secado y densitometrado se llevó a cabo según Santamaría *et al.* (1998).

Para el densitometrado se empleó un densitómetro Pharmacia-LKB Ultrosan, utilizando como software para la comparación de los perfiles densitométricos el programa Gel Scan Analysis Software (Pharmacia-LKB). La comparación de los perfiles supuso los siguientes pasos:

- 1) Normalización de los perfiles hasta una longitud fija.
- 2) Agrupación de los perfiles según sus características generales y comparación directa de los perfiles en cada grupo por superposición de las trazas densitométricas normalizadas.
- 3) Integración de las áreas de los picos normalizados.

4.3. Análisis del crecimiento de las plantas.

En el momento de la recogida se procedió a sacar las plantas de las jarras Leonard y a lavar las raíces abundantemente con agua para eliminar los restos de vermiculita. Posteriormente, se lavaron con agua destilada, secando el exceso con papel de filtro. Tras la toma de muestras para la determinación de la actividad nitrogenasa (apartado 4.4) los nódulos de cada planta se aislaron, registrándose inmediatamente su peso fresco. A continuación, se mezclaron de modo uniforme por tratamiento y se guardaron a -80°C hasta su posterior utilización.

Posteriormente se separó parte aérea y raíz, disponiéndose ambos en estufa de corriente forzada de aire a 70°C durante 24 h. Pasado este tiempo, fue determinado el peso seco de cada órgano. El peso seco de los nódulos se calculó mediante la obtención de un factor PS/PF calculado a partir de varias muestras pesadas cada día antes y después del secado.

Para los nódulos se calculó su peso normalizado (PNN):

$$\text{PNN} = \frac{\text{PSN}}{\text{PSPA}}$$

resultado de dividir el PS de nódulos (en mg) por el de parte aérea (en g), expresándose en $\text{mg PS nódulos por (g PSPA)}^{-1}$.

4.4. Actividad nitrogenasa: Actividad reductora de acetileno.

La reducción de acetileno por la nitrogenasa (EC 1.7.99.2) se determinó en muestras de raíz (2 g) constituidas por fragmentos de 2 a 4 cm con nódulos adheridos (Herdina y Silsbury, 1991).

El flujo total de electrones a través de la nitrogenasa fue evaluado por el test de reducción de acetileno mediante cromatografía gaseosa (Burris, 1972), según la metodología descrita por Hervás (1988). Tras la adición de acetileno (10% v/v) se tomaron muestras a los 10 y 20 min. de la atmósfera que rodea a la raíz para cuantificar el etileno producido, y la actividad se expresó en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 (\text{g PSN})^{-1} \text{h}^{-1}$.

Para esta determinación se utilizó un cromatógrafo de gases Perkin Elmer 8600, equipado con un detector de ionización de llama y una columna de acero inoxidable de 2 mm x 2 m empaquetada con un polímero poroso de 80-100 mesh. El gas portador fue nitrógeno a un flujo de 75 ml A min^{-1} . Las temperaturas del horno, detector e inyector fueron 74, 105 y 120°C respectivamente.

4.3. Aislamiento de la fracción soluble de nódulos y bacteroides.

4.3.1. Obtención de la fracción citosólica y bacteroidal de los nódulos.

El aislamiento de los bacteroides, se realizó en condiciones microaeróbicas tras homogeneizar los nódulos en el medio de extracción que consistió en:

- Tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.4
- $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 1 mM
- DTT 10 mM
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5 mM
- Albúmina de suero bovina (BSA) 1mg ml^{-1}
- Glicerol 10%

Al objeto de eliminar los fenoles, a ésta mezcla se le adicionó polivinilpo-

lipirrolidona (PVPP) insoluble, en una cantidad equivalente a 1/3 del peso de tejido fresco utilizado. Tras la maceración, el homogenado se filtró a través de 4 capas de gasa y se centrifugó a 250 g durante 5 min. a 4°C para eliminar el PVPP y los residuos vegetales más gruesos. A continuación, el sobrenadante se centrifugó a 10.000 g durante 10 min. para sedimentar la fracción bacteroidal.

El sedimento de bacteroides resultante del proceso anterior, se sometió a un doble lavado con tampón fosfato sódico 50 mM pH 7.4, MgSO₄ 2 mM y sacarosa 0.3 M. Los bacteroides se resuspendieron finalmente en un volumen determinado de tampón fosfato sódico 25 mM pH 7.5.

4.3.2. Obtención de la fracción soluble de los bacteroides.

Una vez aislados los bacteroides, estos se rompieron por sonicación. Las células se trataron durante 5 min. a intervalos de 5 segundos en un circuito refrigerado a 4°C. Posteriormente, el extracto celular se centrifugó a 30.000 g durante 30 min. utilizándose el sobrenadante como fracción soluble.

4.3.3. Respiración bacteroidal.

La capacidad respiratoria de los bacteroides se determinó midiendo el oxígeno consumido por estos según la técnica descrita por Pérez-Ramírez (1989). Esta técnica se adaptó y optimizó en bacteroides de *Cicer arietinum* para estudiar el efecto del NaCl sobre la capacidad respiratoria de éstos. Tras el aislamiento de los bacteroides, se incubaron a 25°C, adicionando diferentes substratos respiratorios, en una cámara de reacción que contenía el siguiente medio saturado de oxígeno: 850 µl de tampón fosfato sódico 25 mM pH 7.5 adicionado o no de substrato 10 mM y 50 µl de suspensión bacteroidal

Las medidas de consumo de oxígeno se realizaron utilizando un electrodo de oxígeno Hansatech D.W. (Hansatech limited), conectado a un microprocesador Hanna H14818 (Hanna Instruments) que registra lecturas en mV. La disminución de la lectura debida a la desaparición del oxígeno disuelto en la cámara de reacción se registró a intervalos de 1 minuto, resultando ser tras 1 minuto estableciendose

linealmente durante al menos 12 min. Se estableció un tiempo de registro de 5 min. y se realizaron 3 repeticiones en todos los ensayos. La respiración se expresó como $\mu\text{moles O}_2$ consumidos $(\text{mg proteína})^{-1} \text{ h}^{-1}$

4.5. Actividades enzimáticas del metabolismo carbonado.

a) Preparación de extractos.

La preparación de extractos citosólicos se realizó con la misma técnica para hojas, nódulos y radículas procedentes de la germinación de las semillas. Se utilizaron tres medios de extracción, según la actividad enzimática a determinar: a) tampón maleico-KOH 100 mM pH 6.8, adicionado de sacarosa 100 mM, β -mercaptoetanol 2% (v/v) y etilenglicol 20% (v/v), usado para las actividades, 6PGDH, PEPC, MDH, ADH, ICDH. b) tampón fosfato potásico 50 mM pH 8, adicionado de 1 mM EDTA y 20% etilenglicol, usado para la extracción de la actividad sacarosa sintasa. c) tampón ácido sulfónico 3-N morfolino propano (MOPS) 50 mM pH 7 adicionado de 10 mM de DTT y 4 mM de MgCl_2 , usado para la extracción de la actividad invertasa alcalina.

El tejido fresco se homogeneizó en mortero con medio de extracción en una proporción de peso/volumen que varió según la enzima, y polivinilpirrolidona (PVPP) insoluble en una cantidad equivalente al 33% del peso fresco de la muestra fresca. El homogeneizado se filtró a través de 4 capas de gasa, a continuación se clarificó por centrifugación, a 2500 g durante 5 min. para eliminar restos de tejido y células, y posteriormente a 30.000 g durante 20 min., en una centrífuga refrigerada Sorvall Superspeed RC-5B (DuPont Instruments) a 4°C. Se obtuvo así una solución nítida con las proteínas solubles del citosol, que se empleó como fuente de las enzimas. Todo el proceso de extracción se llevó a cabo en baño de hielo picado a una temperatura entre 0 y 4°C.

b) Valoración de las actividades enzimáticas.

Las actividades enzimáticas estudiadas en este trabajo se han valorado por medio de la oxidación o reducción de NAD(P)H/NAD(P)⁺ producida en la propia reacción o en una reacción acoplada. La valoración de la actividad en reacciones enzimáticas en las que se produce oxidación o reducción de piridín nucleótidos, se realiza siguiendo la variación de absorbancia a 340 nm debida a la aparición o desaparición de la forma reducida, que presenta un máximo de absorción a dicha longitud de onda, con un coeficiente de extinción molar que es igual para el NADH y el NADPH.

La mezcla de reacción utilizada varió para cada enzima. La reacción se inicia con la adición del extracto. Tras una fase lag de 10 min., salvo en el caso de la MDH que fue de solo 6 min., la variación de absorbancia, lineal durante al menos 6 minutos más, se registró durante 4 min. Se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu UV-1604, termostaticado a 30°C. En todos los casos se prepararon 4 repeticiones y un control sin sustrato para corregir las posibles oxidaciones o reducciones endógenas de NAD(P)H/NAD(P)⁺ según los casos.

El cálculo de las actividades enzimáticas acopladas a una reacción de oxido-reducción NAD(P)H/NAD(P)⁺ se realiza según la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad } (\mu\text{mol min}^{-1}) = \frac{(\Delta \text{D.O. min}^{-1}) V V_T}{10^{-6} g d v}$$

Donde:

$\Delta \text{D.O. min}^{-1}$ = incremento medio de D.O. por minuto (valor absoluto).

V = volumen total de la mezcla de reacción en ml

V_T = volumen total de extracto en ml

g = coeficiente de extinción molar del NAD(P)H = $6.22 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$

d = ancho de la cubeta = 1 cm

v = volumen de extracto añadido a la mezcla en ml

10^{-6} = para expresar la actividad en micromoles

Las actividades se expresaron en $\mu\text{mol (g PF)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y en $\text{nmol (mg proteína)}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

4.5.1. Actividad sacarosa sintasa.

Los extractos para la valoración de esta actividad se prepararon homogeneizando los nódulos en un mortero con el medio de extracción b en una proporción 1/12 (p/v). La mezcla de reacción, optimizada a partir de la descrita por Morell y Copeland (1985), fue la siguiente:

Tampón bicina-KOH pH 8.5.....	100.0 mM
Sacarosa.....	100.0 mM
UDP.....	2.00 mM
UDPG deshidrogenasa	250.0 mg
NAD ⁺	1.5 mM

4.5.2. Actividad invertasa alcalina.

La determinación de la actividad invertasa alcalina (EC 3.2.1.26) se optimizó a partir de la metodología descrita por C. Arrese-Igor (comunicación personal). Los nódulos se homogeneizaron en un mortero a 4°C con 5 volúmenes de tampón MOPS 50 mM pH 7, tampón c. En un volumen final de 1 ml, la mezcla de reacción contiene:

Tampón imidazol HCl pH8.5	50.0 mM
MgCl ₂	5.0 mM
NAD.....	1.0 mM
ATP.....	1.0 mM
Hexokinasa	2.0 U ml ⁻¹
Fosfoglucosa isomerasa	2.0 U ml ⁻¹
Glucosa-6- fosfato deshidrogenasa	2.0 U ml ⁻¹

4.5.3. Actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa.

La actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa (EC 1.1.1.42) se determinó según la metodología descrita por Anthon y Emerich, (1990). La mezcla de reacción contenía, en un volumen total de 1 ml:

Tampón bicina-KOH pH 8.5	100.0 mM
6-fosfogluconato	2.5 mM
MgCl ₂	10.0 mM
NADP	0.5 mM

4.5.4. Actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa.

La determinación de la actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa (EC 4.1.1.31) se optimizó a partir de la metodología descrita por Vance *et al.* (1983) con la siguiente mezcla de reacción:

Tampón bicina-KOH pH 8.5	100.0 mM
NaHCO ₃	10.0 mM
MgCl ₂	5.0 mM
PEP	2.0 mM
NADH	0.2 mM

4.5.5. Actividad malato deshidrogenasa.

La actividad malato deshidrogenasa (EC 1.1.1.37) se determinó según el procedimiento seguido por Vance y Stade (1984). La mezcla de reacción fue la siguiente:

Tampón bicina-KOH pH 8.5	100.0 mM
Oxalacetato	1.0 mM
MgCl ₂	5.0 mM
NADH	0.2 mM

4.5.6. Actividad alcohol deshidrogenasa.

La actividad de la alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1) se determinó mediante el procedimiento descrito por Thynn y Werner (1990). La mezcla de reacción fue la siguiente:

Tampón bicina-KOH pH 8.5	100.0 mM
Etanol	100.0 mM
NAD	2.0 mM

4.5.7. Actividad isocitrato deshidrogenasa.

La determinación de la actividad NADP⁺ isocitrato deshidrogenasa (EC 1.1.1.42) citosólica se optimizó a partir de la metodología descrita por Chen *et al.* (1988). La mezcla de reacción fue la siguiente:

Tampón bicina-KOH pH 8.5.....	100.0 mM
Isocitrato	1.0 mM
MgCl ₂	5.0 mM
NADP ⁺	0.5 mM

4.6. Actividades enzimáticas del metabolismo del amonio

a) Preparación de los extractos

En bacterias se siguió el procedimiento de Prusiner *et al.* (1972). Las células se recogen centrifugando a 10.000 g durante 20 min. El sedimento obtenido se lava 2 veces con el tampón imidazol 50 mM pH 7. Las células se rompen por sonicación aplicando 4 pulsos de 15 segundos con intervalos de 15 segundos. Los restos celulares se eliminaron centrifugando a 15.000 g durante 20 min.

En tejidos vegetales los extractos se prepararon con el tampón a) del apartado 4.6.

b) Valoración de las actividades enzimáticas.

La cuantificación del γ -glutamil hidroxamato (γ -GH) formado se hace a

partir de una recta de calibrado obtenida con concentraciones conocidas de hidroxamato. La actividad se expresó en $\mu\text{mol } \gamma\text{-GH (g PF)}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Para la valoración de las actividades NADH-GOGAT y GDH se utilizó la fórmula descrita en el apartado 4.6.

4.6.1. Actividad glutamina sintetasa.

La actividad glutamina sintetasa (EC 6.3.1.2) se valoró mediante el ensayo semibiosintético, en el que uno de sus productos de reacción, el $\gamma\text{-GH}$, puede valorarse mediante una reacción colorimétrica. El ensayo ha sido adaptado a partir de la metodología propuesta por Farnden y Robertson (1980), Kaiser y Lewis (1984) y Lillo (1984). La mezcla de reacción contienen, en 1 ml de volumen total:

Tampón imidazol-HCl pH 7.8	0.15 M
Na ₂ -EDTA	4.0 mM
L-glutamato sódico	0.15 M
MgSO ₄ ·7H ₂ O	45 mM
Hidroxilamina	30 mM
ATP	10mM

Se adiciona 0.05 a 0.2ml de extracto, que inicia la reacción. Está se desarrolla a 30°C durante 30 min. Pasado este tiempo, se detiene por la adición de 0.5 ml de reactivo de cloruro férrico [mezcla de volúmenes iguales de: 10% (p/v) FeCl₃· 6H₂O en HCl 2 N; 24% (p/v) ácido tricloroacético en agua destilada y 50% (v/v) HCL en agua destilada, agitando vigorosamente. Las mezclas se centrifugaron a 3500 g durante 5 min y se registró la absorbancia del sobrenadante a 540 nm.

De cada extracto se prepararon 4 repeticiones, un blanco (omitiendo el glutámico y la hidroxilamina) y dos controles a tiempo cero (deteniendo la reacción inmediatamente antes de la incubación).

4.6.2. Actividad glutamato sintasa.

La actividad glutamato sintasa (EC 1.4.1.14) se determinó según el procedimiento descrito por Groat y Vance, (1981); Singh y Srivastava, (1986). La mezcla de reacción contenía, en un volumen total de 1 ml:

Tampón fosfato potásico pH7.5	50.0 mM
Na ₂ -EDTA	1.0 mM
β-mercaptoetanol	0.1% (v/v)
α-cetoglutarato	2.5 mM
aminooxiacetato	1.0 mM
NADH	0.15 mM
L-glutamina	10.0 mM
Extracto	0.05 ml

La reacción se inicia con la adición de la L-glutamina.

4.6.3. Actividad glutamato deshidrogenasa.

La actividad glutamato deshidrogenasa (EC 1.4.1.2) se determinó según el procedimiento de Groat y Vance, (1981); Singh y Srivastava, (1986). La mezcla de reacción contiene, en 1 ml de volumen total:

Tampón fosfato potásico pH7.5	50.0 mM
α-cetoglutarato	2.5 mM
NADH	0.15 mM
Extracto	0.05 ml

La reacción se inicia con la adición de la α-cetoglutarato

4.7. Actividad Rubisco

a) Preparación de extractos

La actividad ribulosa 1.5 difosfato carboxilasa (E.C.4.1.1.39) se determinó mediante la incorporación de ¹⁴C en productos ácidos estables (Lorimer *et al.*,

1977).

La extracción se realizó según la metodología descrita por Keys y Parry (1990), a partir de 0.3g de peso fresco conservado en N₂ líquido. Se añadieron 3 ml de tampón bicina-KOH pH 7.8 adicionado de 10 mM MgCl₂·6H₂O, Na₂EDTA 1 mM, DTT 5 mM, y 2% (P/V). El extracto se filtró por 2 capas de gasa y se centrifugó a 17.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante resultante se empleaba para el estudio de la actividad enzimática y para la determinación de proteína. Para asegurar una mayor exactitud, todas las disoluciones, excepto la de NaH¹⁴CO₃, deben estar exentas de CO₂. Los tampones deben ser preparados usando agua libre de CO₂ para disolver el componente ácido. Después se desgasifica la solución con N₂ durante 10 min y antes de ajustar el pH con NaOH libre de CO₂. Cualquier carbono inorgánico contaminante causará una infraestimación de la actividad.

b) Valoración de la actividad enzimática

La reacción se realizó en la cámara del electrodo de oxígeno, en el cual se preparaba el medio de ensayo, se burbujeara con nitrógeno durante la adición del tampón y MgCl₂, pero nunca durante la adición del NaH¹⁴CO₃, ya que puede tener lugar una pérdida de CO₂ que provocaría un pequeño desplazamiento del pH.

La reacción se llevó a cabo a 30°C, básicamente según el método descrito por Vu *et al.* (1984) con ligeras modificaciones. El medio de ensayo (1 ml) estaba compuesto por: 100 mM bicina pH 8.2, 20 mM MgCl₂, 0.1 mM Na₂-EDTA, 5 mM DTT, 20 mM NaH¹⁴CO₃ (0.5 Ci.mol⁻¹, ICN, Biomedicals, Inc.) y 0.5 mM ribulosa bifosfato (RuBP) (Sigma). La disolución de RuBP se prepara disolviendo la sal tetrasódica en agua; esta disolución tiene normalmente un pH cercano a 6.5 y puede almacenarse indefinidamente a -25°C. La RuBP debe añadirse justo antes de iniciar la reacción con el enzima debido a su inestabilidad a pH mayor que 7 (Keys y Parry, 1990).

La actividad inicial se determinó tras la adición del extracto enzimático (30 µl/ml ensayo) a la mezcla de reacción. La actividad total se determinó incubando 5

min. el extracto enzimático en el medio de reacción que contenía el sustrato RuBP. Paralelamente, se realizaron ensayos en los cuales se había sustituido la RuBP por agua destilada, para restar el $^{14}\text{CO}_2$ incorporada, y descontar la participación de alguna otra carboxilasa activa en el extracto crudo. La reacción finalizó al cabo de 45 segundos, tomando una alícuota de 200 μl y añadiéndola a un volumen equivalente de 6 N HCl.

Las muestras acidificadas se evaporaron hasta sequedad en una estufa de ventilación a 45°C para liberar el $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ no incorporado a ácidos estables durante el ensayo. La minúscula pastilla se resuspendió en 0.2 ml de agua destilada y se mezcló con 1.8 ml de líquido de centelleo para muestras líquidas (CoKtail T Scintran, BDH) para medirlos posteriormente por espectrometría de contaje de centelleo TRI-CARB 2000 CA (Packard Instruments Company Inc. USA), durante 5 min.

La actividad total del enzima representa la máxima actividad susceptible de activación y según está influenciada por el nivel de inhibidores de unión fuerte en la hoja. La actividad total no incluye los puntos catalíticos que contienen el inhibidor nocturno, carboxiarabinitol-1-P. La actividad inicial, además, está afectada por el estado de activación (Seeman y Kobza, 1988), y representa la actividad saturada por sustrato "*in vivo*" (Sharkey *et al.*, 1986), tal y como está afectada por los diferentes mecanismos reguladores. El proceso de activación implica una reacción reversible del CO_2 con un residuo de lisina en el sitio catalítico de la subunidad grande del enzima para formar un grupo carbonado (Anderson, 1981). El estado de activación, representa el estado de carboxilación de los centros catalíticos que no tienen ningún inhibidor unido a ellos (Kobza y Seeman, 1989). El estado de activación se expresa como:

$$\text{Estado de activación} = (\text{Actividad inicial} / \text{Actividad total}) \times 100$$

El cálculo de la actividad Rubisco se realiza según la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad } (\mu\text{moles CO}_2 \cdot \text{h}^{-1}) = V_{ti} \cdot \text{cpm} / V_a \cdot 1 \mu\text{Ci} / 2.2 \cdot 10^{10} \text{ cpm} \cdot 1 / V_e \cdot 3600 \text{ s} / \text{t} \cdot \text{hora} \cdot 1 \mu\text{moles CO}_2 / 0.5 \mu\text{Ci}$$

Donde:

Cpm = número de partículas detectadas por minuto por un dispositivo de detección

Vti = Volumen total de incubación

Va = Volumen de la alícuota tomada para el conteo en el espectrómetro de conteo de centelleo

Ve = Volumen de extracto empleado en el ensayo

T = tiempo de reacción (45 s)

$\mu\text{moles CO}_2$ 0.5 μCi = Actividad específica en el ensayo

4.8. Determinaciones analíticas.

4.8.1. Determinación de proteína soluble.

a) Método Lowry

El contenido de proteínas de las bacterias y bacteroides se determinó siguiendo el método de Lowry *et al.*, (1951) con las modificaciones introducidas por Markwell *et al.*, (1978).

A alícuotas de 50 μl de muestra se adicionan 950 μl NaOH 0.4 N y 3 ml de reactivo A. Se agita e incuba a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente, se adiciona 0.3 ml de reactivo de Folin-Cicolteau (reactivo de fenol) diluido 1:1 en agua destilada y se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se lee la absorbancia a 660 nm.

El reactivo A contiene 100 partes de reactivo B y una de reactivo C.

El reactivo B consta de:

2.0% (P/V) de Na_2CO_3

0.4% (P/V) de NaOH

0.16% (P/V) de tartrato sódico potásico

1.0% (p/V) de dodecilsulfato sódico (SDS)

El reactivo C contiene 4.0% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

b) Método Bradford.

Este método está basado en la unión del azul brillante de Coomassie G-250 a las proteínas. Se utilizó para la determinación de las proteínas solubles en nódulo, hoja, radícula, así como en citosol bacteroidal.

Se utilizaron alícuotas de 0.1 ml convenientemente diluídas para que contengan entre 10 y 50 mg de proteína, a las que se añadió 5 ml de reactivo Bradford y tras agitar se midió la absorbancia a 595 nm después de 2 min. y antes de 1 h. El cálculo de la concentración de proteínas, independientemente del método utilizado, se realizó por comparación con una curva patrón de seroalbúmina bovina (Merk, fracción V).

4.8.2. Determinación de prolina.

a) Preparación de los extractos de bacterias: Las células crecieron en 100 ml de medio YEM a 28°C y en agitación a 170 rpm, hasta una densidad de 10^9 células/ml. Para la extracción del material hidrosoluble de las células se siguió el protocolo descrito por Prusiner *et al.* (1979). Las células se recuperaron centrifugando a 15.000 g durante 10 min. Estas se lavan dos veces con una solución salina a 0.85%. El sedimento se resuspende en etanol al 70 %, la extracción transcurre en agitación a temperatura ambiente durante una hora. Transcurrido este tiempo, los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 20.000 g durante 20 min. El sobrenadante obtenido se utilizó para la determinación del contenido en prolina y aminoácidos.

b) Preparación de extractos vegetales: La extracción del material hidrosoluble procedente de hojas, raíces, nodulos y radículas de semillas germinadas se llevó a cabo por el método de Irigoyen *et al.* (1992), utilizando como medio de extracción el etanol al 96% y 70%.

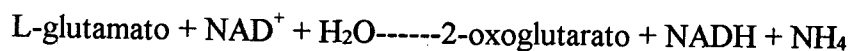
En hojas, el solvente utilizado como medio de extracción fue la mezcla etanol-cloroformo-agua (ECA) en la proporción 12:5:1 de acuerdo con Tully *et al.*

(1979), con la relación peso fresco de muestra/volumen de medio de 1/10. Tras la maceración se centrifugó a 5500 rpm durante 10 min y el sobrenadante obtenido se utilizó como extracto crudo para la determinación de prolina. El sobrenadante obtenido se le añade 1.5 ml de agua destilada y 1 ml de triclorometano, se agita y se deja en reposo hasta la aparición de dos fases, una transparente y otra verde. La fase transparente se utiliza para la determinación de la prolina. Se utilizaron alícuotas de 0.5 a 2 ml de extracto crudo, a las que se les adicionó 1.5 ml de ninhidrina, preparada 2.5% (P/V) en una solución formada por ácido acético glacial al 60% (V/V) y ácido fosfórico al 40% (V/V), 1.5 ml de ácido acético glacial. Esta mezcla se hierva durante 60 min, la reacción se detiene con hielo y a continuación se añaden 2 ml de benceno, se agita fuertemente y la fase superior se utiliza para medir la absorbancia a 520 nm. Se utilizó un blanco con agua destilada.

Para el cálculo de la concentración de prolina se preparó, siguiendo el mismo procedimiento, una curva patrón con prolina (Sigma) en cantidades comprendidas entre 0.25 y 5 mg.

4.8.3. Determinación de glutamato.

Se empleó el método descrito por Bergensen (1982) basado en que desplazando el equilibrio de la reacción a la derecha, atrapando el ácido ceto con la hidrazina, usando NAD en exceso y un medio de reacción alcalino (pH 9), el glutamato puede ser oxidado cuantitativamente a 2-oxoglutarato.



Las células de rhizobia se cultivaron y aislaron siguiendo la metodología de Prusiner *et al.* (1972) como se describe en el apartado 4.7. Después de su obtención se procedió a la precipitación de proteínas de los extractos por adición del ácido tricloroacético (TCA) hasta el 5%, dejándolo actuar 3 horas a 4°C. El precipitado obtenido se eliminó por centrifugación a 10.000 g durante 10 min. El sobrenadante resultante se neutralizó con KOH previo su utilización como extracto enzimático.

Material y métodos

El ensayo se llevó a cabo en un volumen final de 1 ml de una mezcla de reacción que contenía:

Tampón glicina-hidrazina pH 9	300/250 mM
NAD	1.6 mM
ADP	1.0 mM
GDH	4.5 U ml ⁻¹

La reacción se inició añadiendo 100 µl de extracto enzimático. La reducción de NAD⁺ se siguió a 340 nm durante un tiempo de 45 min, a 30°C en un espectrofotómetro termostatzado . Como control se adicionaron todos los reactivos de la mezcla salvo la enzima, la glutamato deshidrogenasa .

El contenido en glutamato expresado en mg glutamato (g PF)⁻¹, se calculó según las expresiones:

$$\Delta E_{\text{muestra}} =$$

$$\Delta E_{\text{control}} =$$

$$\Delta E = \Delta E_{\text{muestra}} - \Delta E_{\text{control}}$$

El NAD⁺ y hidrazina forman un compuesto que absorbe considerablemente a 340 nm.

4.8.4. Determinación de azúcares solubles totales.

Para la determinación del contenido de azúcares se utilizaron los mismos extractos que los obtenidos para la determinación de prolina. Para la valoración colorimétrica se ha seguido el método propuesto por Irigoyen et al. (1992), utilizando el reactivo de antrona. A 50 µl de extracto se le añaden, 3 ml de antrona. A continuación las muestras se agitaron vigorosamente y se llevaron a un baño en ebullición durante 10 min, tras los cuales se enfriaron rápidamente en hielo. La absorbancia debida al color verde desarrollado se midió a 620 nm.

La curva patrón se preparó del mismo modo a partir de concentraciones

conocidas de glucosa y un blanco con 1 ml de agua destilada. La concentración de azúcares se expresó en miligramos de glucosa por gramo de peso fresco de la muestra.

4.8.5. Determinación de aminoácidos libres.

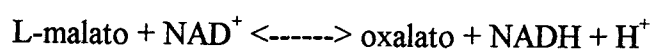
El contenido en aminoácidos libres se determinó en los extractos obtenidos en el apartado 4.8.2 siguiendo el método de Yemm y Cocking (1955).

A alícuotas de 0.5 ml de muestra se adicionan 1.5 ml de ninhidrina preparada al 2% (P/V) en una solución formada por tampón citrato 0.2 M, pH 5, y etilenglicol monometiléter. Se agita y se hierve en baño maría durante 15 min. A continuación se detiene la reacción con hielo y se añaden 5 ml de isopropanol al 50 %. Se lee la absorbancia a 570 nm.

Como referencia se construyó una curva patrón a partir de glutamina (Sigma). El contenido en aminoácidos se expresó en miligramos de glutamina por gramo de peso fresco de la muestra.

4.8.6. Determinación de malato.

La malato deshidrogenasa (MDH) cataliza la oxidación de L-malato a oxalacetato en presencia de NAD^+ según la siguiente reacción:



El equilibrio de esta reacción está normalmente desplazado a la izquierda, sin embargo, se puede cambiar la dirección a favor de una formación de NADH, siempre y cuando se eliminen los productos finales de la reacción, en definitiva, cuando se elimina el oxalacetato y los hidrogeniones resultantes de la catálisis. Este método ha sido diseñado de manera que utiliza un medio alcalino con objeto de que "amortigüe" (decrezca) la concentración de hidrogeniones producidos y además el oxalacetato resultante sea retirado por formación de derivados de la

hidrazona. Estos factores permiten poder realizar una medida cuantitativa de malato por el incremento en la absorbancia, debido a la formación de NADH y que es posible detectar espectrofotométricamente a 340 nm.

Para la determinación del contenido de malato en el citosol nodular, se utilizaron los mismos extractos que los obtenidos para la determinación de MDH y PEPC, preparados como se indica en el apartado 5.3.1. Inmediatamente después de su obtención y previo a la valoración de los azúcares se procedió a la precipitación de proteínas de los extractos mediante la adición TCA hasta el 5%, dejándolo actuar 3 horas a 4°C. Posteriormente, el precipitado se retiró por centrifugación a 10.000 g durante 10 minutos. El sobrenadante fue neutralizado con KOH al objeto de que la actividad enzimática no se viese alterada por su adición.

El ensayo se realizó a 30°C, siendo la mezcla de reacción 1 ml (variando en función del volumen de extracto utilizado) de:

Tampón hidrazina/glicina-KOH pH 9.5 ...	400/500 mM
NAD ⁺ 80 mg/ml	100 µl
MDH 10 mg/ml (780 u/mg)	100 µl
L-malato estandar 10 mM	100 µl

La reacción se inició con la adición del extracto a la mezcla de reacción. Tras agitar fuertemente, se midió el aumento de absorbancia a 340 nm durante un tiempo de 20 minutos donde la curva ya alcanzaba la fase estacionaria. Las lecturas de absorbancia se realizaron a intervalos de 30 segundos en un espectrofotómetro Shimadzu termostatzado a 30°C.

Una vez conocida la absorbancia máxima correspondiente a un patrón de concentración conocida de malato, para el cálculo de la concentración de malato de cada una de las muestras, simplemente se procedió a extrapolar la media de las absorbancias máximas de cada una de ellas con la del patrón. La cantidad de malato se expresó en mg de malato por gramo de peso fresco.

4.8.7. Determinación de clorofilas totales.

El material fresco se maceró en un mortero a 4°C para evitar la degradación de los pigmentos. La extracción se realizó con acetona al 80% hasta un volumen de 5 ml de extracto. A continuación se centrifugó a 15.000 rpm durante 15 minutos a 4°C, obteniéndose un sobrenadante en el que se hallaban las clorofilas

La determinación del contenido en clorofilas, se efectuó mediante espectrofotometría, calculando la absorbancia (A) a diferentes longitudes de onda.

La ecuación utilizada para la cuantificación de la concentración total de clorofilas (C_{a+b}) de los extractos fue la descrita por Lichtentaler (1987).

$$C_a = 12.25 A_{663.2} - 2.79 A_{646.8}$$

$$C_b = 21.50 A_{646.8} - 5.10 A_{663.2}$$

$$C_{a+b} = 7.15 A_{663.2} + 18.71 A_{646.8}$$

4.8.8. Determinación de nutrientes en parte aérea y raíz.

El material seco y molido (polvo fino y homogéneo) se sometió a un proceso de mineralización por vía húmeda, siguiendo la técnica propuesta por Peach y Tracey (1956) descrita por Lachica *et al.* (1973).

a) Determinación de nitrógeno.

El nitrógeno se valoró por el método de Kjeidahl, utilizando el sistema de Bouat (Bouat y Groucet, 1965), basado en la valoración del NH_3 formado al reaccionar el mineralizado con NaOH. El arrastre del vapor de amoníaco se lleva a cabo por corriente de aire, lo que permite además vaciar el contenido del matraz colector una vez finalizada la valoración de cada muestra. Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro de absorción molecular Beckman-25. Los valores se expresaron finalmente en $mg\ N\ planta^{-1}$ y como en el caso del crecimiento se calculó la tasa de adquisición de N, expresada en $mg\ N\ planta^{-1}\ día^{-1}$.

b) Determinación de potasio.

Se realizó por fotometría de llama, utilizando un fotómetro de llama Corning 400. Esta técnica se basa en las radiaciones que emite un determinado elemento, estimulado térmicamente, cuando vuelve a su estado inicial. Estas radiaciones se deben a que algunos de sus electrones pasan a un nivel energético superior, liberando esta energía en forma de radiación cuando vuelve a su órbita usual. La intensidad de radiación emitida es proporcional a la concentración del elemento en el material.

El cálculo de la concentración de potasio se basó en una curva patrón realizada con concentraciones conocidas de potasio.

c) Determinación de calcio y magnesio.

Estos elementos se han determinado por espectrofotometría de absorción atómica, utilizando las líneas 4224 Å (Ca) y 2852 Å (Mg) con llama oxidante aire-acetileno. Esta técnica se basa en la propiedad que tienen los átomos que se encuentran en su estado elemental de captar una radiación de frecuencia determinada. El átomo pasará por diferentes niveles energéticos, según la frecuencia del fotón que absorbe.

La determinación de magnesio se realiza directamente sobre el mineralizado, pero para el calcio debe adicionarse lantano, debido a que puede formar compuestos, difícilmente atomizables en la llama, que pueden interferir por sus características refractarias.

Las lecturas de ambos macronutrientes se realizan directamente en un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer 1100 B.

6. Presentación y estudio estadístico de los resultados.

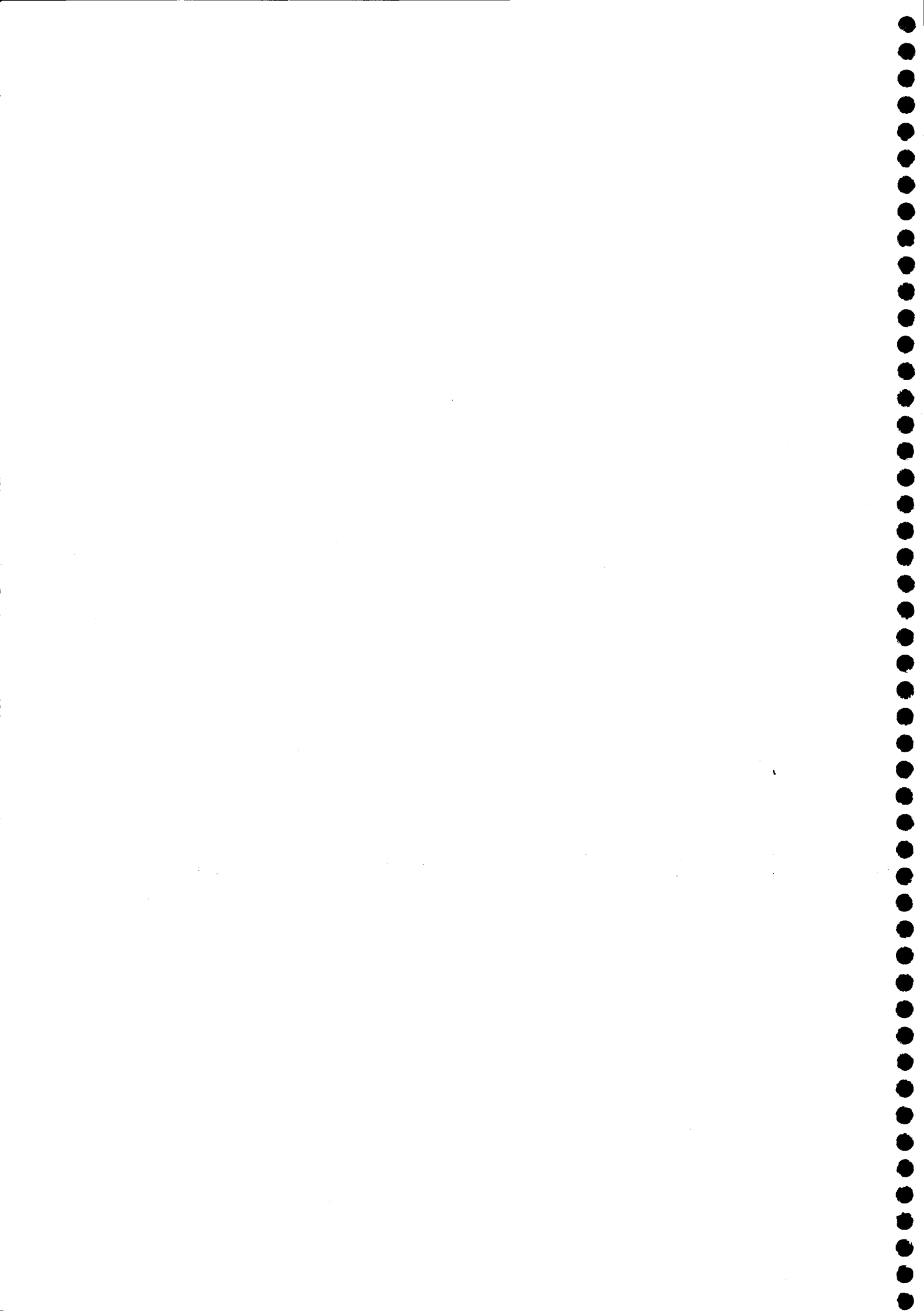
En los cuatro tipos de experimentos con plantas se utilizó un diseño completamente al azar, distribuyendo las macetas de cada tratamiento siempre de forma totalmente aleatoria por la superficie de la mesa de cultivo. Los

experimentos fueron repetidos al menos una vez, considerándose los valores más representativos. Los datos originales así obtenidos se sometieron a un análisis estadístico, asistido por ordenador con la ayuda del programa Statgraphics versión 5 (STSC Inc., Rockville, Maryland, U.S.A.) consistente en:

- Análisis de la varianza con una o dos entradas.
- Test de mínimas diferencias significativas (MDS) entre medias
- Coeficientes de correlación simple entre variables

Los resultados se presentan en gráficas, diagramas de barras o histogramas y tablas de medias.

RESULTADOS



1. Caracterización de la cepa Ch-191 de *Mesorhizobium ciceri* en condiciones de salinidad.

1.1. Perfil de lipopolisacáridos (LPS).

Como tras las primeras pruebas parecía que los cambios del perfil estaban presentes en la zona de mayor movilidad, el estudio posterior se llevó a cabo empleando geles de poliacrilamida al 17.5 %. La zona de interés corresponde al LPSI de *Mesorhizobium*. Los cambios detectados en la zona del LPSII no han sido consistentes. Cuando se estudian los geles a simple vista la información que se puede obtener es muy escasa, excepto en el caso de que alguna banda prominente aparezca o desaparezca. Por ello nos ha parecido adecuado densitometrar los geles y cuantificar las bandas. Los resultados permiten comprobar una secuencia de cambios en los LPS. La técnica tiene una limitación, y es que solo identifica las especies de LPS por su movilidad: no podemos asegurar que la banda 1 a 0 mM NaCl sea el mismo que la molécula de la banda 1 a 600 mM NaCl, aunque tengan la misma movilidad o muy parecida. De hecho, el rango de movilidades posibles es muy estrecho, están todos muy juntos y es muy difícil resolverlos más. A pesar de estas restricciones es posible identificar cambios notables entre las bandas. Por consiguiente, el rango de variaciones de los LPS que presentamos es un mínimo.

En la cepa Ch-191 la banda más lenta, banda 4 del LPSI que es mayoritaria o muy abundante en las bacterias cultivadas sin sal, desaparece al aumentar la concentración salina. Esta desaparición es muy clara y reproducible. La disminución más grande ocurre en cuanto se pone sal al medio de cultivo.

Aparecen unas bandas, 2 y 3 de movilidad intermedia. Estas bandas no se detectan en ausencia de sal, u su proporción relativa parece ser también dependiente de la cantidad de cloruro sódico en el medio.

Lo más aventurado de contar es el destino de la primera banda mayoritaria, la banda 1: podría permanecer, aunque disminuyendo su porcentaje al aumentar la salinidad. Pero también de los densitometrados podría deducirse que la banda 1 de las bacterias crecidas sin sal se ve sustituida por otra banda, mayoritaria, de movilidad algo menor y que podemos resolver adecuadamente con este sistema. El

"lomo" delantero de los picos correspondientes a la cepa Ch-191 crecida en presencia de sal, parece disminuir al aumentar la sal en el medio. Además de estos cambios importantes hay una serie de modificaciones en las bandas minoritarias. Las bandas más rápidas son de difícil interpretación, ya que coinciden con el frente y pueden estar más sujetas a artefactos.

1.2. Patrón electroforético de proteínas.

El patrón electroforético de proteínas de *Mesorhizobium ciceri* de la cepa Ch-191 en ausencia y presencia de los tratamientos de salinidad puede ser observado en la figura 1.1. Los densitogramas y el gel evidencian la presencia de al menos 30 polipéptidos en las bacterias control (segundo carril de la figura 1.1) cuyos pesos moleculares oscilan entre 48 y 247 kd.

El análisis comparativo de los carriles y los densitogramas revela que hasta 200 mM de tratamiento salino no se observaron alteraciones en el perfil de proteínas (Fig. 1.y). La concentración salina de 300 mM en el medio de cultivo afectó notablemente a numerosos polipéptidos de *Rhizobium*. Así se observó un aumento en la intensidad de las bandas polipeptídicas correspondientes a 156 y 161 kd.

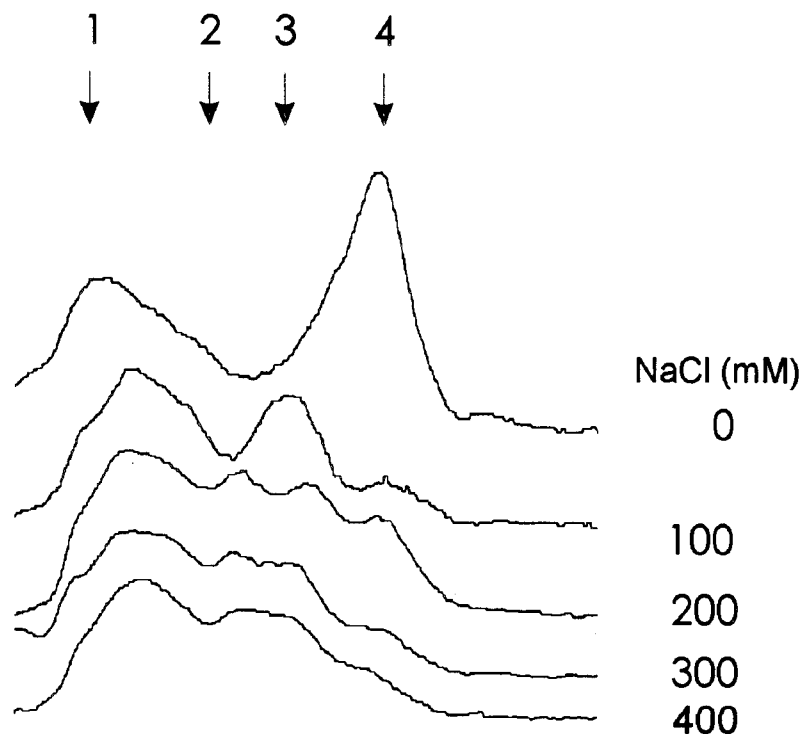


Figura 1.8. Densitograma del perfil de lipopolisacáridos de la cepa Ch 191 de *Mesorhizobium ciceri* crecida en presencia de diferentes concentraciones de NaCl.

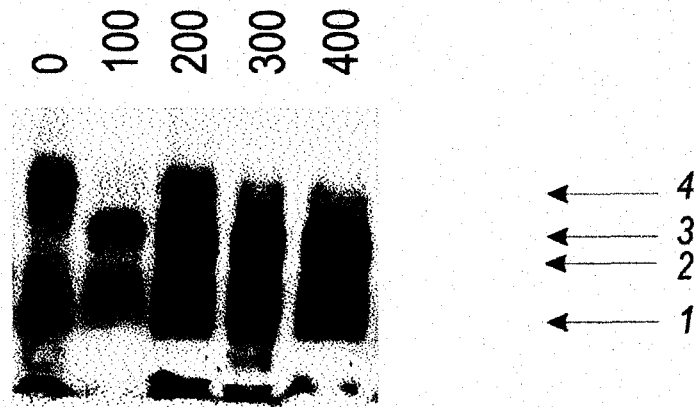


Figura 1.7. Perfil de lipopolisacáridos en SDS-PAGE de la cepa Ch 191 de *Mesorhizobium ciceri* crecida en presencia de diferentes concentraciones de NaCl.

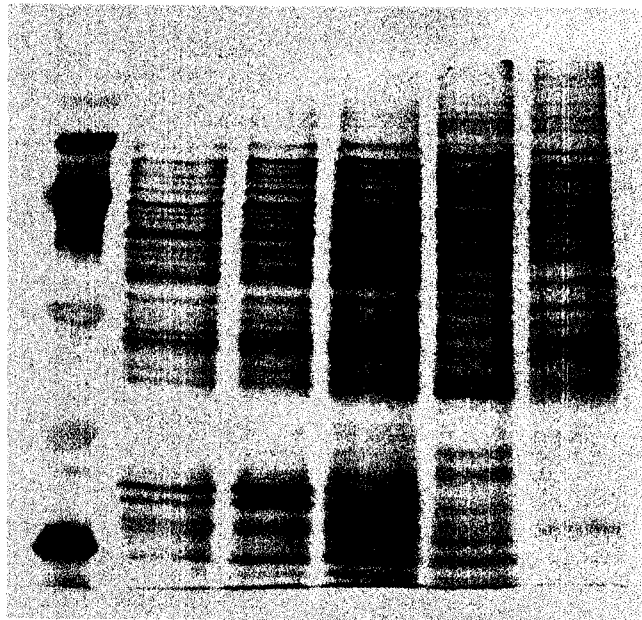


Figura 1.1. Patrón electroforético de proteínas citosólicas totales, en SDS-PAGE, de la cepa Ch 191 de *Mesorhizobium ciceri* crecida en presencia de diferentes concentraciones de NaCl.

NaCl, 0 mM

<i>pico</i>	<i>mm</i>	<i>Área</i>	<i>% área</i>
1	54,2	1609	50,6
2	NA		
3	NA		
4	70,3	1534	48,2
5	94,8	37	1,2

NaCl, 100 mM

<i>pico</i>	<i>mm</i>	<i>Área</i>	<i>% área</i>
1	55,6	1191	46,9
2	NA		
3	64,8	669	26,3
4	70,8	189	7,4
5	102,9	490	19,3

NaCl, 200 mM

<i>pico</i>	<i>mm</i>	<i>Área</i>	<i>% área</i>
1	55,6	2125	40,1
2	62,4	871	16,5
3	66,0	1036	19,5
4	70,3	630	11,9
5	105,3	640	11,9

NaCl, 300 mM

<i>pico</i>	<i>mm</i>	<i>Área</i>	<i>% área</i>
1	55,8	2037	43,2
2	61,7	651	13,8
3	64,6	931	19,7
4	70,0	397	8,4
5	104,9	702	14,9

NaCl, 400 mM

<i>pico</i>	<i>mm</i>	<i>área</i>	<i>% área</i>
1	56,6	1748	44,9
2+3	62,3	1393	35,8
4	70,2	258	6,6
5	107,8	493	12,7

2. Germinación de diferentes variedades de *Cicer arietinum* en condiciones de estrés salino.

2.1. Tolerancia al NaCl de diez variedades de *Cicer arietinum*: Parámetros de germinación.

Se utilizaron diez variedades de garbanzo cuya procedencia y característica se mostraron en la tabla 2 de Material y Métodos. La germinación es un periodo crítico para los cultivos, y puede estar afectada por el estrés salino retardando o inhibiendo el proceso. En este experimento se pretende conocer la respuesta de la germinación de los diferentes cultivares de *Cicer arietinum* en condiciones de salinidad como, "screening" previo en la selección de cultivares para posteriores estudios.

Se han determinado cuatro parámetros de germinación seleccionados en base a la bibliografía consultada. El primero de ellos es la Precocidad de germinación (PG) que se define como el porcentaje de semillas germinadas a las 24 h de siembra; el segundo viene determinado por el Porcentaje de germinación (% G) en el se indica el número de semillas germinadas respecto al total de semillas en base a 100; la Tasa de germinación (TG) es el tercer parámetro considerado y representa la suma del número de semillas germinadas en un tiempo determinado dividido por el número de horas transcurridos desde la imbibición ajustada en base a 100 semillas, y por último se estudio el índice de germinación (GRI) que viene condicionado por el porcentaje de germinación a las 48 y 96 horas después de la siembra.

La germinación de las distintas variedades de semillas de *Cicer arietinum* presentaron un amplio rango de respuestas. En general todas las semillas mostraron elevados porcentajes de germinación (tabla 2.1) en agua destilada excepto el cv Nacional que exhibió un 66% frente al 80-100% que mostraba el resto del elenco de cultivares ensayados. Este parámetro se vio apenas alterado con 50 mM en todos los cultivares. En Castellano alhama, Gulavi y Lechoso el porcentaje de germinación se reduce con 100 mM, a un 58, 46 y 37.5 %

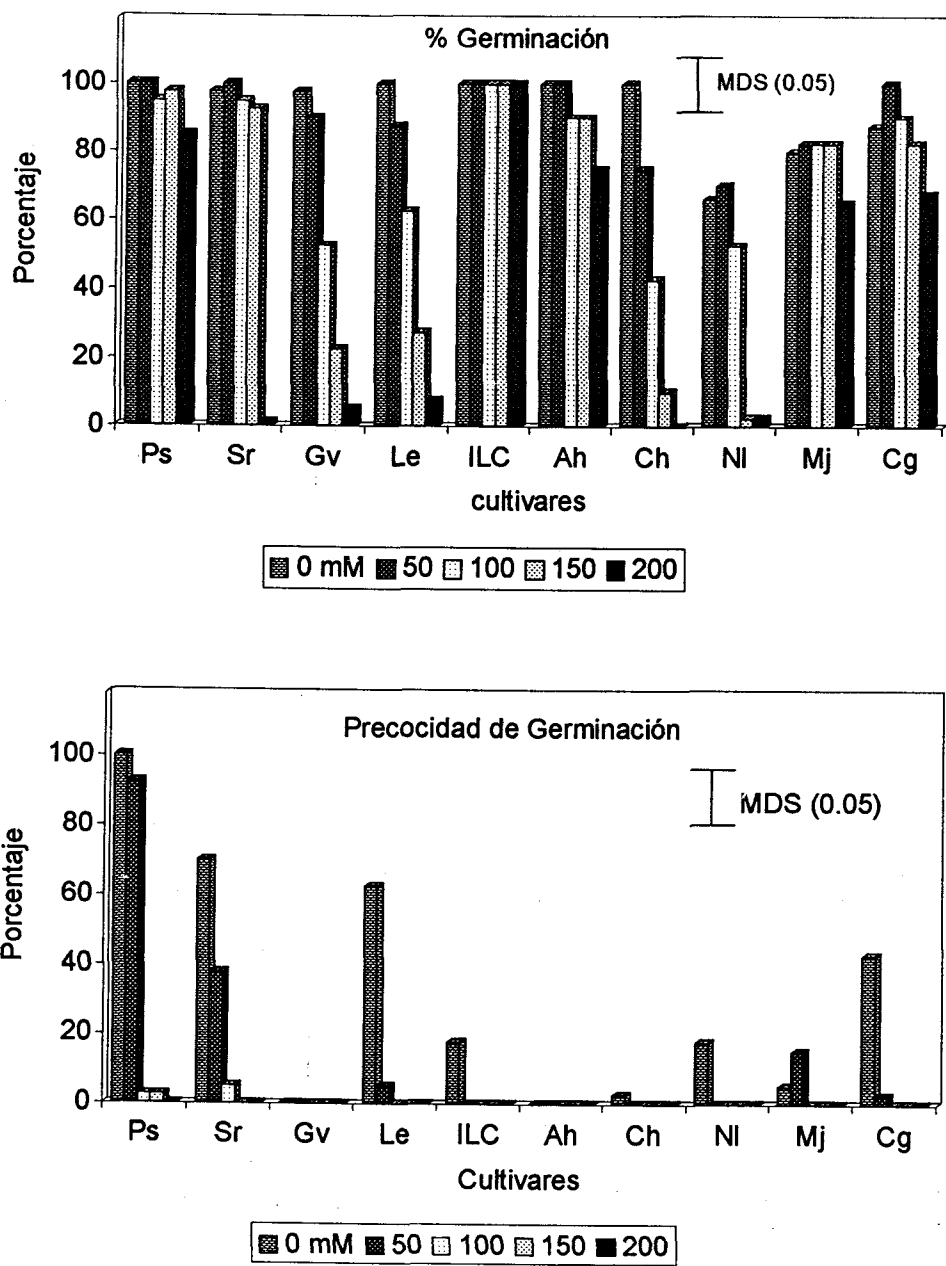


Figura 2.1. Porcentaje de germinación y precocidad de germinación, en tanto por ciento, en 10 cultivares de *Cicer arietinum* a los 5 días de germinación.

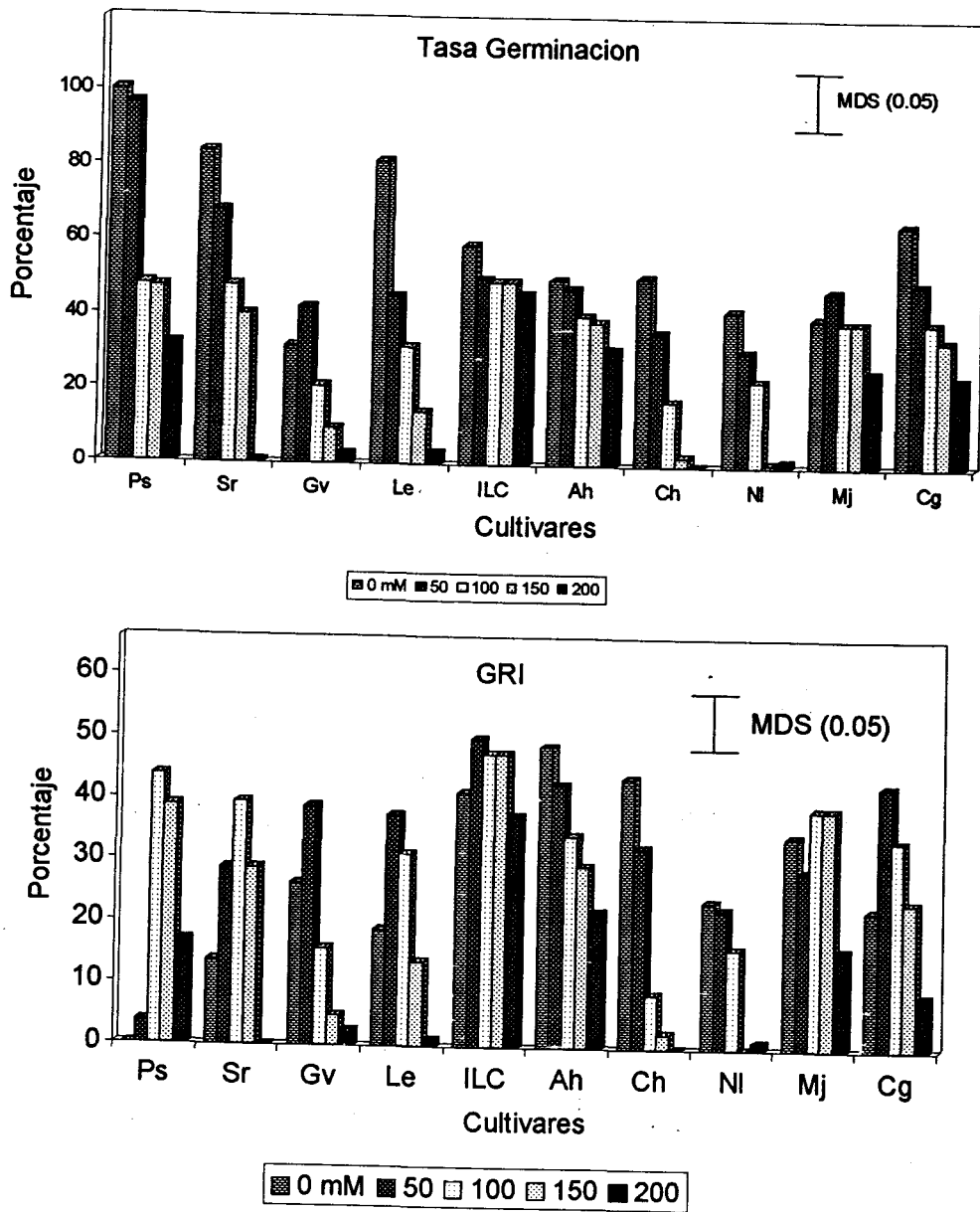


Figura 2.2. Tasa de germinación e Índice de germinación (GRI), en tanto por ciento, en 10 cultivares de *Cicer arietinum* a los cinco días de germinación.

respectivamente, mientras que en los demás cultivares este factor no se afecta significativamente con esta dosis de sal. Se observa casi un 50% de reducción de semillas germinadas en 100 mM de NaCl en los cultivares Gulavi, Lechoso y Castellano Alhama. La tasa final de germinación en presencia de 150 mM en Pedrosillano, Sirio, ILC1919, Alhama, Mejicano y Castellano garbanzilla presenta poca variabilidad respecto al control (porcentajes por encima del 80%) lo que explicaría que los valores no revelaron diferencias significativas respecto a las semillas germinadas en agua destilada. El cultivar ILC1919 destaca por presentar un porcentaje de germinación optimo (100%) en todos los tratamientos, incluido el más alto, 200 mM de NaCl.

Los datos relacionados con la Precocidad de germinación (tabla 2.2) se expresan en tasa de semillas germinadas en cajas petri. En agua destilada (Control) la tasa de las primeras semillas germinadas, 24h después de la siembra, de los cultivares Sirio, Lechoso y Castellano garbanzilla es elevada, 70, 62.5 42.5 respectivamente. La precocidad de germinación es máxima en el cultivar Pedrosillano (100%). Los cultivares Gulavi, ILC1919, Alhama, Castellano alhama, Nacional y Mejicano presentan una menor Precocidad de germinación puesto que el máximo porcentaje de germinación se alcanza a los 48h de siembra (datos no mostrados).

En presencia de sal, la precocidad a germinar de las semillas se reduce significativamente. En Pedrosillano, la respuesta de las semillas a 50 mM es significativamente más baja (92.5); el descenso es drástico con las dosis más altas de sal, 2.5, 2.5 y 0% con 100, 150 y 200 mM respectivamente. En sirio, Lechoso y Castellano garbanzilla la precocidad se reduce un 60, 95, y 98% con 50 mM respecto al control.

Resultados

Tabla 2.2: Precocidad de germinación en porcentaje en semillas de *Cicer arietinum* tratados con cinco dosis de NaCl a las 24 horas de germinación.

Cultivar	Dosis de NaCl				
	0 mM	50 mM	100 mM	150 mM	200 mM
Pedrosillano	100	92.5	2.5	2.5	0
Sirio	70	37.5	5	0	0
Gulavi	0	0	0	0	0
Lechoso	62.5	5	0	0	0
ILC1919	17.5	0	0	0	0
Alhama	0	0	0	0	0
Castellano alhama	2.5	0	0	0	0
Nacional	17.5	0	0	0	0
Mejicano	5	15	0	0	0
Castellano garbanzilla	42.5	2.5	0	0	0
MDS (0.05)			6.2		

Tabla 2.1: Porcentaje de germinación en % en semillas de *Cicer arietinum* tratados con cinco dosis de NaCl a los cinco días de germinación.

Cultivar	Dosis de NaCl				
	0 mM	50 mM	100 mM	150 mM	200 mM
Pedrosillano	100	100	95	97.5	85
Sirio	87.5	100	95	92.5	1.25
Gulavi	97.5	90	52.5	22.5	5
Lechoso	100	87.5	62.5	27.5	7.5
ILC1919	100	100	100	100	100
Alhama	100	100	90	90	75
Castellano alhama	100	75	42.5	10	0
Nacional	66	70	52.5	2.5	2.5
Mejicano	80	82.5	82.5	82.5	65
Castellano garbanzilla	87.5	100	90	82.5	67.5
MDS (0.05)			13.5		

Tabla 2.3: Tasa de germinación en porcentaje en semillas de diez cultivares de *Cicer arietinum* tratados con cinco dosis de NaCl a los cinco días de germinación.

Cultivar	Dosis de NaCl				
	0 mM	50 mM	100 mM	150 mM	200 mM
Pedrosillano	100	96.3	47.9	47.1	31.9
Sirio	83.8	67.9	47.7	40.1	0.40
Gulavi	31.3	42.1	20.6	9.2	2.5
Lechoso	81.3	45.0	31.3	13.8	2.9
ILC1919	58.8	50.0	49.2	49.2	45.8
Alhama	49.6	47.5	40.2	38.5	31.0
Castellano alhama	50.4	35.8	17.1	2.5	0
Nacional	41.6	30.8	22.9	0.80	1.3
Mejicano	39.9	47.1	38.8	38.8	25.4
Castellano garbanzilla	65.0	49.2	38.8	33.9	23.8
MDS (0.05)			5.5		

El efecto que el estrés salino ejerce en el Porcentaje de germinación muestra que 50 mM no afecta el proceso, excepto en el cultivar Castellano alhama que exhibe una reducción del 25%, pero en el resto de los cultivares el Porcentaje de germinación se mantiene (Pedrosillano, Alhama, ILC1919) o sufre reducciones (Gulavi, Lechoso, Nacional) o incrementos (Castellano garbanzilla, Sirio, Nacional, Mejicano) no significativos. La aplicación de un estrés salino más severo (100 y 150 mM) permite observar cultivares que mantienen un porcentaje de germinación adecuados en estas dosis de NaCl sin reducciones drásticas tal es el caso de Pedrosillano, Sirio, ILC1919, Alhama, Mejicano y Castellano garbanzilla, mientras que en el resto de cultivares ensayados, cuando la dosis al 100 mM reduce el porcentaje de germinación al 50% con 150 mM la caída de este parámetro es aún mayor. Con el estrés máximo experimentado (200 mM), se evidencia que existen variedades de garbanzo con un proceso de germinación tolerante a la salinidad como Pedrosillano, ILC1919, Alhama y Castellano garbanzilla, pues obtienen porcentajes de germinación que oscilan entre el 65-100 %. Se ponen de manifiesto inhibiciones de la germinación con 200 mM totales para Castellano alhama o casi totales (Sirio, Gulavi y Nacional). En la figura 2.2 y

tabla 2.3 se recoge los valores obtenidos para la Tasa de germinación de las diez cultivares. Tal como se ha definido al inicio, el máximo valor que se puede alcanzar en este parámetro es 100, lo que implicaría que todas las semillas germinan en el primer día de germinación, según este dato hay un grupo de semillas que exhiben una Tasa de germinación superior a 50, destacándose Pedrosillano, con 100 y Sirio y Lechoso con algo más de 80 y Castellano alhama, ILC1919 y Castellano garbanzilla estarían en otro grupo con tasas de germinación inferior a 50 en los tratamientos control. El estrés salino induce efectos negativos que son más aparentes en determinados cultivares. Así, con 50 mM no varía significativamente este parámetro en los cultivares Pedrosillano, ILC1919, y Castellano alhama, incrementa un 20-30% en Gulavi y Mejicano, y disminuye alrededor del 25% en Castellano garbanzilla, Nacional, y Sirio, y un 50 % en Lechoso. Sin embargo, con 100 mM se observan reducciones generalizadas del 50 % o más en todos los cultivares estudiados excepto en ILC1919, Alhama y Mejicano. Este mismo comportamiento podría describirse con dosis de sal superior (150 y 200 mM); De hecho con la dosis de 200 mM, la velocidad de germinación se reduce a niveles inferiores, más del 95 % respecto al control, en los cultivares Sirio, Gulavi, Lechoso, Castellano alhama y Nacional y en el resto de ellos la velocidad de germinación oscila entre 45.8 obtenido para el cultivar ILC1919 y 23.8 para Castellano garbanzilla.

El análisis del Índice de germinación (tabla 2.4 y figura 2.3) lleva a considerar que existen cultivares que no se afectan por la salinidad como ILC1919 y Mejicano que obtiene variaciones en los índices de germinación con las distintas dosis de NaCl no significativos excepto con el nivel más elevado (200 mM). Otros cultivares en los cuales la sal favorece el aumento del Índice de germinación, son Pedrosillano y Sirio cuyo máximo se obtiene con 100 mM o el caso de Gulavi, Lechoso y Castellano garbanzilla, que se obtiene con 50 mM de NaCl. En estos cultivares también se evidencia que cantidades superiores de sal conducen a una disminución discreta del índice de germinación, Pedrosillano y Castellano

Resultados

garbanzilla, o drástica como ocurre en Sirio, Gulavi, Lechoso y Nacional. Por último, existen otros cultivares en los cuales el máximo Índice de germinación se obtiene en el tratamiento control, es el caso de los cultivares Alhama y Castellano alhama y por tanto con la salinidad se produce una caída del índice de germinación que es proporcional y significativo con la dosis de NaCl, y más evidente en Castellano Alhama que en cultivar Alhama.

En el análisis de la varianza se aprecia que hay variación en los efectos principales de los diez cultivares y de las cinco concentraciones de sal y estas diferencias fueron altamente significativas ($P \leq 0.01$).

Tabla 2.4: Índice de Germinación (GRI) en porcentaje en semillas de *Cicer arietinum* tratados con cinco dosis de NaCl a los cinco días de germinación.

Cultivar	Dosis de NaCl				
	0 mM	50 mM	100 mM	150 mM	200 mM
Pedrosillano	0	3.75	43.75	38.75	16.88
Sirio	13.75	28.75	39.38	28.75	0
Gulavi	26.25	38.75	15.63	5.0	2.5
Lechoso	18.75	37.50	31.25	13.75	1.25
ILC1919	41.25	50.0	47.5	47.5	37.5
Alhama	48.75	42.50	34.38	29.38	21.88
Castellano alhama	43.75	32.50	8.75	2.50	0.0
Nacional	23.75	22.50	16.25	0.0	1.25
Mejicano	34.38	28.75	38.75	38.75	16.25
Castellano garbanzilla	22.5	42.5	33.75	23.75	8.75
MDS (0.05)			7.46		

Al considerar todos los parámetros de germinación estudiados se podría proponer que existen tres grupos de semillas de garbanzos. El primer grupo estaría representado por aquellos cultivares cuyas semillas son muy sensibles a la salinidad en el proceso de germinación, destacándose las semillas de Sirio, Gulavi, Lechoso y Nacional, el segundo grupo abarcaría los cultivares que soportan bien determinados dosis de sal, en este grupo se incluyen las semillas de Alhama, Mejicano y Castellano garbanzilla y se englobaran en cultivares

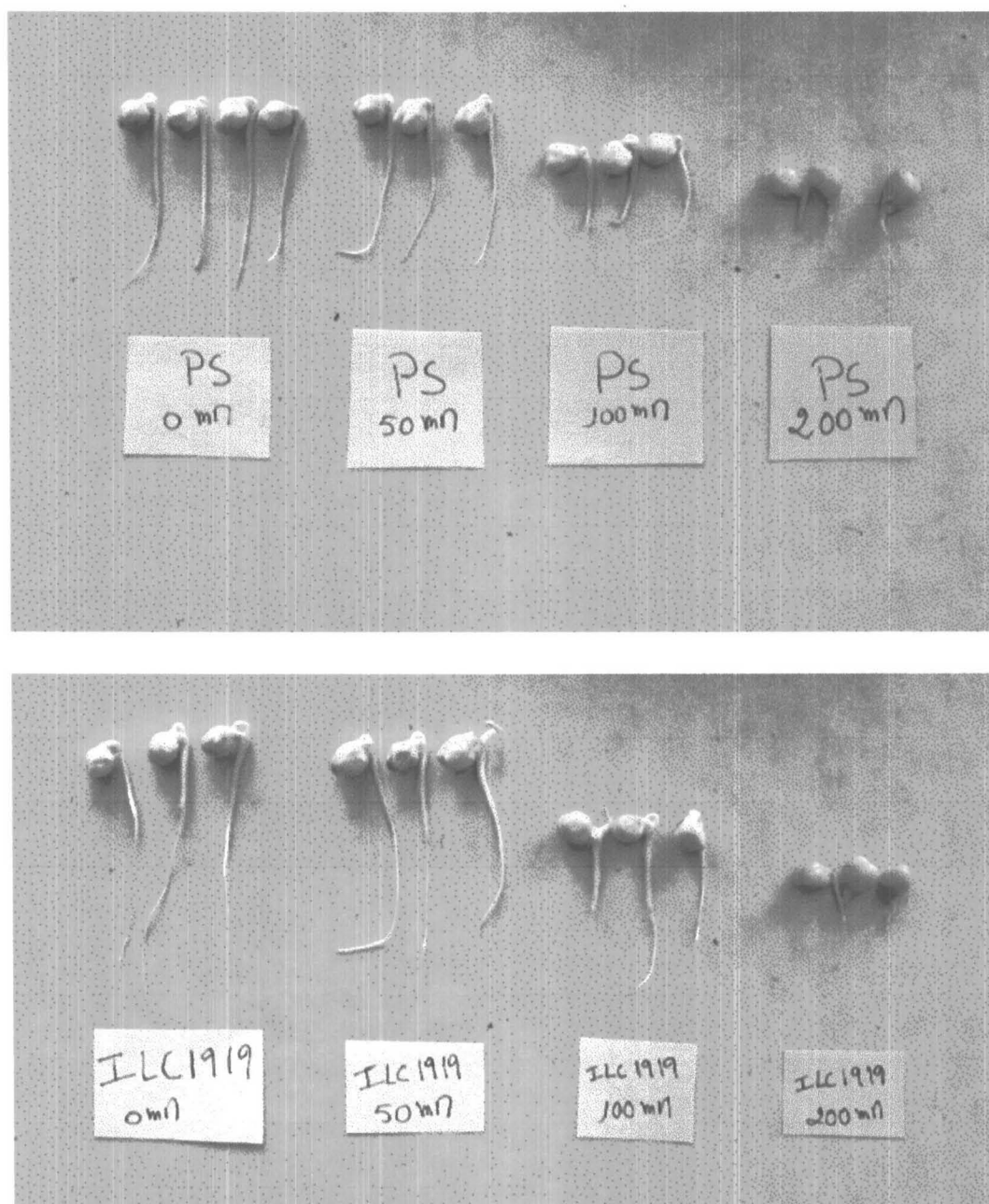


Figura 2.4. Semillas de dos cultivares de *Cicer arietinum* germinadas en presencia de diferentes concentraciones de NaCl durante 5 días.

sensibles al estrés salino, y por último un cuarto grupo que comprende cultivares que germinan en presencia de distintas dosis de sal sin sufrir un porcentaje de inhibición significativas incluyendo a los cultivares Pedrosillano e ILC1919.

2.2. Fisiología del proceso de germinación.

Se procedió a conocer diversos aspectos del metabolismo de la germinación en los dos cultivares que toleraban mejor el estrés salino ILC1919 y Pedrosillano. La germinación se llevó a cabo durante cinco días, al cabo de los cuales se estudió en la radícula determinados aspectos relacionados con el crecimiento, metabolismo nitrogenado y carbonado, y contenido en solutos, entre otros.

2.2.1. Patrón electroforético de proteínas.

El análisis electroforético de proteínas radicular se llevó a cabo a partir de radículas de semillas germinadas de dos cultivares, Pedrosillano y ILC1919. La separación electroforética de proteínas totales de la fracción soluble de las raíces se realizó en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. En el perfil de proteínas se observa que la diferencia entre los dos cultivares reside en la presencia de una banda polipeptídica correspondiente a un peso molecular de X kd en Pedrosillano y su ausencia en el cultivar ILC1919. Hasta los cinco días de tratamiento salino no se observaron cambios en el patrón electroforético de proteínas (Fig. 2.5) en ninguno de los dos cultivares en estudio. Hasta 200 mM de NaCl, máxima concentración ensayada los perfiles de proteínas no presentan alteraciones ninguna.

2.2.2. Análisis de crecimiento.

El crecimiento expresado como peso fresco y seco del hipocótilo y raíz de garbanzo de los cultivares Pedrosillano y ILC1919, en función de la severidad de

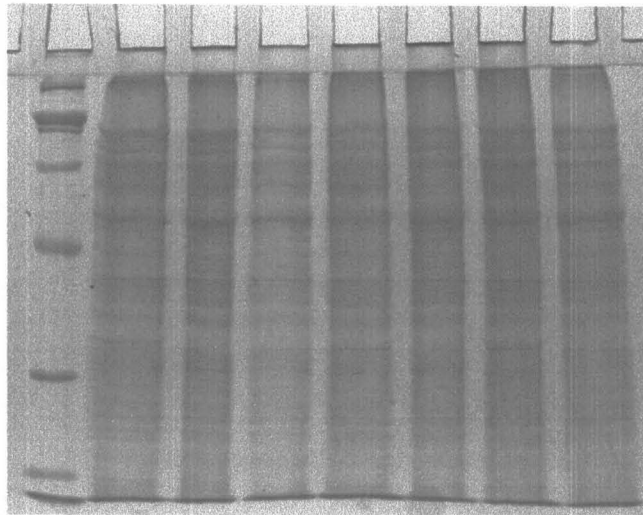


Figura 2.5. Patrón electroforético de proteínas citosólicas totales, en SDS-PAGE, de radículas de dos cultivares de *Cicer arietinum*, germinadas en presencia de diferentes concentraciones de NaCl.

los tratamientos se muestra en la tabla 2.5. Los controles de ambas cultivares presentaron un crecimiento de raíz variable. El tratamiento salino causó una reducción paulatina del desarrollo de la raíz y hipocótilo, proporcional al aumento del estrés, en función del cultivar.

Tabla 2.5. Peso fresco raíz (PFR), peso seco raíz (PSR) en g planta⁻¹, contenido en agua en radícula (CAR) en porcentaje, peso fresco hipocótilo (PFR), peso seco hipocótilo (PSH) en g planta⁻¹, contenido en agua en hipocótilo (CAH) en porcentaje en dos cultivares de *Cicer arietinum* tratados con cinco dosis de NaCl a los cinco días de germinación.

Cultivar	NaCl	PFR	PSR	CAR	PFH	PSH	CAH
Pedrosillano	0	1.43	0.150	8.59	0.99	0.085	10.63
	50	1.14	0.120	8.77	0.89	0.089	8.96
	100	0.49	0.061	7.21	0.55	0.065	7.60
	150	0.25	0.040	5.25	0.13	0.027	4.58
	200	0.13	0.017	6.84	0.10	0.019	4.37
ILC1919	0	0.70	0.053	12.2	0.78	0.089	7.77
	50	0.58	0.012	52.0	0.52	0.075	5.91
	100	0.57	0.007	79.8	0.44	0.058	6.59
	150	0.38	0.004	84.2	0.35	0.049	6.20
	200	0.19	0.001	189.5	0.14	0.046	2.06
MDS (0.05)		0.17	0.080	24.2	0.10	0.010	1.69

Así, después de 5 días de germinación con 50 mM, los pesos frescos disminuyeron entre un 10 y 40% (hipocótilo) y un 20% (radículas); la inhibición de estos fue máxima con 200 mM, entre 90 y 80% (hipocótilo) y entre 91 y 70% (radículas). Dicha inhibición fue significativamente mayor en radículas de Pedrosillano que en ILC1919. Estos datos parecen indicar que el cultivar ILC1919 es algo más tolerante a la salinidad que el cultivar Pedrosillano.

La salinidad en el medio de germinación, indujo una disminución paulatina del contenido hídrico tanto en el hipocótilo como en la radícula del cultivar Pedrosillano (Fig. 2.3). En cambio, con el incremento de la salinidad en el medio de germinación, el contenido en agua (WCR) en ILC1919 aumenta de manera espectacular, con 200 mM la hidratación es máxima, el valor de WCR es 16 veces superior al registrado en las radículas control.

Resultados

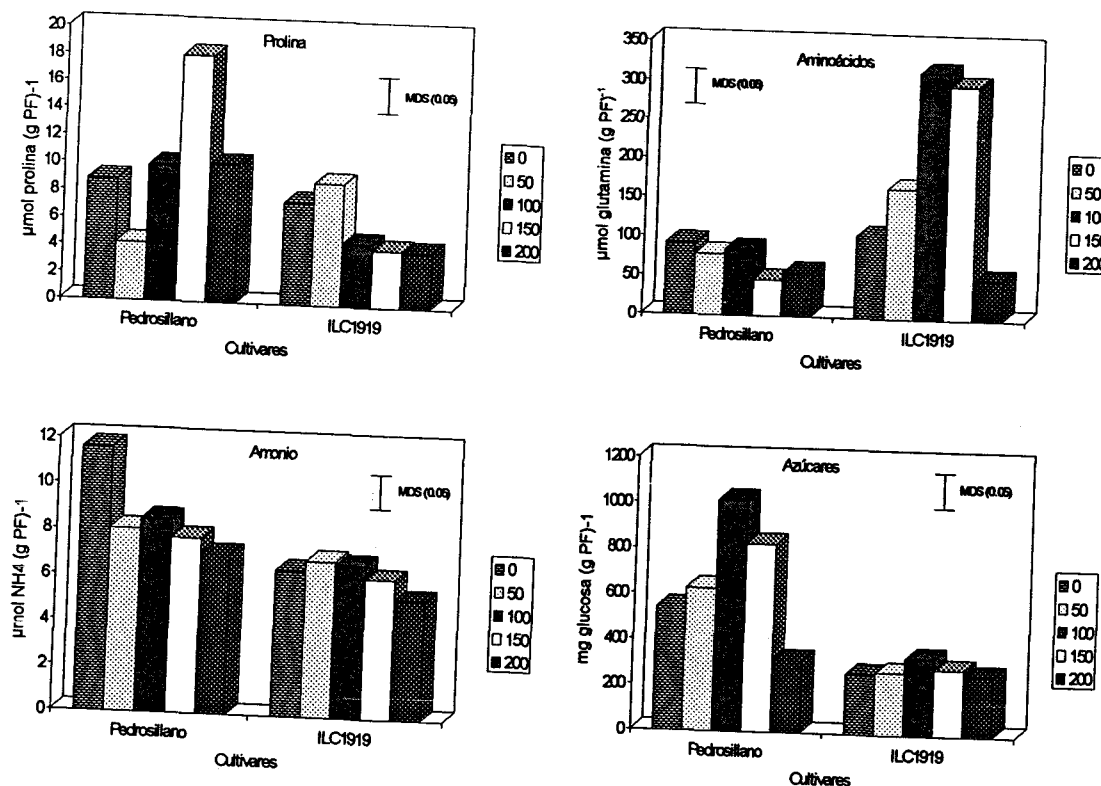


Figura 2.3. Contenido en aminoácidos, prolina, amonio en $\mu\text{mol (g PF)}^{-1}$ y azúcares solubles totales en mg (g PF)^{-1} , en radículas de dos cultivares de *Cicer arietinum* a los 5 días de germinación y tratados con cuatro dosis de NaCl.

2.2.3. Contenido en prolina, aminoácidos y azúcares totales solubles.

En la tabla 2.6 se recogen las determinaciones realizadas en radículas de cinco días de germinación procedentes de semillas no tratadas y tratadas con cloruro sódico. Una vez homogeneizados las radículas en el tampón de extracción adecuado, las determinaciones se realizaron en el citosol radical.

En la figura 2.4 se exponen los contenidos de prolina en las radículas de los cultivares de garbanzo en estudio, Pedrosillano y ILC1919, expresado en $\mu\text{mol (g PF)}^{-1}$, y en la tabla 2.6 se indican estos mismos detalles y además expresados en mg (g PF)^{-1} . La concentración en prolina expresada en mg (g PF)^{-1} aumentó en el cultivar Pedrosillano en función de las dosis de sal del medio de germinación, el incremento máximo fue del doble y se indujo con 150 mM. En

Resultados

cambio, la concentración absoluta de este aminoácido en radículas del cultivar ILC1919 se incrementa ligeramente (20%), sólo con 50 mM. Contrariamente a lo ocurrido en Pedrosillano, los tratamientos salinos elevados provocaron en ILC1919 una disminución significativa del contenido en prolina.

Tabla 2.6. Contenido en aminoácidos (AA), prolina (prl), azúcares totales solubles (ATS) en radículas de semillas con cinco días de germinación en dos cultivares de garbanzo y tratados con cinco dosis de NaCl.

Cultivar	NaCl(mM)	$\mu\text{mol (g PF)}^{-1}$				mg (g PF)^{-1}			
		AA	Prl	ATS	NH4	AA	Prl	ATS	NH4
Pedrosillano	0	92.2	8.84	542.5	11.6	13.5	1.02	542.5	624.3
	50	78.3	4.25	628.1	8.06	11.5	0.48	628.1	433.5
	100	84.2	9.94	1017.0	8.49	12.3	1.14	1017.0	456.6
	150	46.2	18.04	823.9	7.71	6.8	2.08	823.9	414.8
	200	55.8	10.1	317.0	7.03	8.2	1.16	317.0	378.3
ILC1919	0	106.0	7.47	262.4	6.44	15.5	0.86	262.4	346.7
	50	165.6	8.93	273.0	6.86	24.2	1.03	273.0	369.2
	100	316.1	4.6	336.3	6.72	46.2	0.52	336.3	361.7
	150	299.0	4.2	287.7	6.14	43.7	0.48	287.7	330.1
	200	50.6	4.1	263.5	5.27	7.4	0.47	263.5	283.5
MDS (0.05)		23.6	0.5	32.9	0.46	3.4	0.06	32.9	27.7

La salinidad incrementa significativamente el nivel de aminoácidos solubles totales en ILC1919. Así, con 100 mM de NaCl, el aumento fue algo más de 3 veces, sin embargo, en Pedrosillano los tratamientos salinos de 50 y 100 mM no influyeron en el contenido de los aminoácidos solubles; las concentraciones salinas de 150 y 200 mM provocaron una disminución de los aminoácidos solubles en ambos cultivares.

En la figura 2.4 se exponen los resultados $\mu\text{mol (g PF)}^{-1}$ relacionados con el contenido en azúcares totales solubles en la radícula de los dos cultivares en estudio, y en la tabla 2.6 en la cual se incluye los datos expresados en mg (g PF)^{-1} . El mayor contenido en radículas control correspondió al cultivar Pedrosillano $542.5 \text{ mg (g PF)}^{-1}$, ILC1919 mostró un valor menor $262.4 \text{ mg (g PF)}^{-1}$. En Pedrosillano, hubo un incremento espectacular de este parámetro con el

tratamiento salino, encontrándose un aumento del 16 y del 52% en radículas germinadas con 50 y 150 de NaCl, respectivamente. La concentración de azúcares, con 100 mM, llegó a duplicarse respecto al control: $1017 \text{ mg (g PF)}^{-1}$, una disminución de un 40% se observó cuando las radículas se sometieron a 200 mM de NaCl.

La cantidad de azúcares totales solubles en el cultivar ILC1919 resulto ser menos afectado por la salinidad, el incremento de este fue significativa solo con 100 mM de sal en el medio de germinación.

2.2.4. Contenido en amonio.

En la tabla 2.6 se contempla el contenido de amonio en radículas, expresado en $\mu\text{mol (g PF)}^{-1}$ y en mg (g PF)^{-1} . En el medio de germinación, la sal, incrementa significativamente la concentración en amonio en el cultivar Pedrosillano: 30, 28, 34 y 40% en radículas sometidas a 50, 100, 150 y 200 mM de NaCl respectivamente. Mientras se observa una suave estimulación del amonio en las radículas de ILC1919 con 50 y 100 mM, 7 y 4% respecto al control. Con 200 mM, el amonio decae significativamente (20%).

2.2.5. Metabolismo del carbono.

En la tabla 2.7 se contemplan las diversas actividades enzimáticas determinadas en radículas de los cultivares estudiados, expresadas en $\mu\text{mol (g PF)}^{-1}$. Además en la figura 2.4 se exhibe mediante un diagrama de barras las actividades 6PGDH e ICDH, en la figura 2.6 las actividades de la PEPC, ADH y en la figura 2.7 las actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo nitrogenado, GS, GOGAT y GDH. Como se puede observar en la Fig. 2.5, las radículas de las semillas del cultivar Pedrosillano tratadas con 50, 100 y 150 mM de NaCl presentaron un considerable incremento de la actividad PEPC, la cual fue respectivamente 1.5, 1.7 y 1.3 veces superior a la actividad detectadas en radículas

germinadas en agua destilada. Igualmente, el estrés salino estimuló la actividad

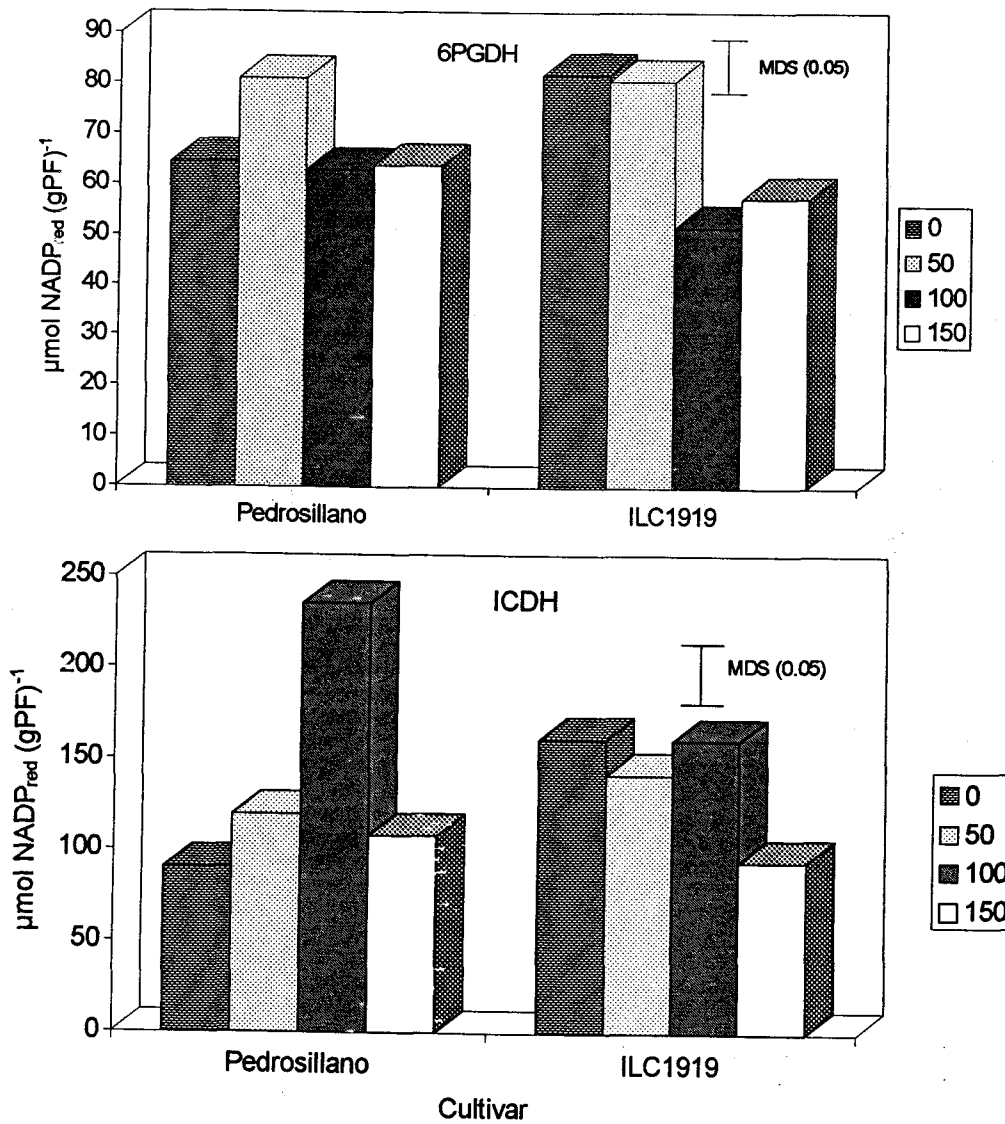


Figura 2.5. Actividad 6 fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) e isocitrato deshidrogenasa (ICDH) en $\mu\text{mol NADP}_{\text{red}} (\text{g PF})^{-1}$ en radículas de dos cultivares de *Cicer arietinum* a los 5 días de germinación y tratados con cuatro dosis de NaCl

PEPC en ILC1919, ya que fue 1.3, 1.4 y 1.5 veces mayor con 50, 100 y 150 mM respecto a la actividad control.

La aplicación de 50 mM de NaCl estimulo el patrón de actividad de la MDH (Fig 2.6) un 15% en Pedrosillano, mientras que con 100 y 150 mM los valores de MDH se mantuvieron estables respecto al control. En radículas de ILC1919, la actividad MDH disminuyó significativamente la sal respecto a las de tratamiento control: 12, 15 y 10% respectivamente.

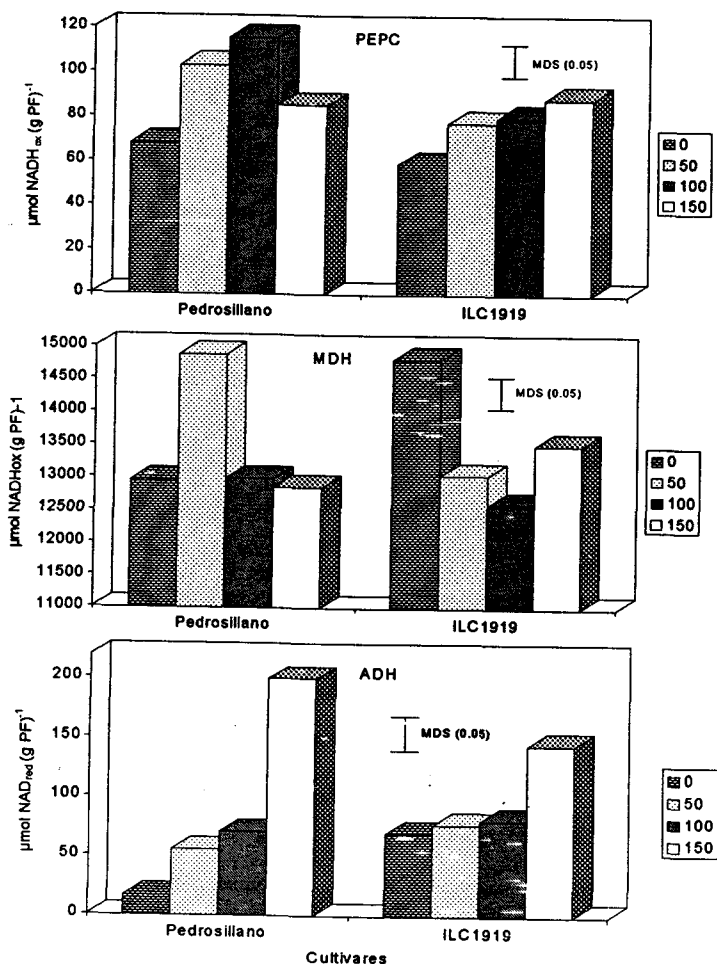


Figura 2.6. Actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), malato deshidrogenasa (MDH) y alcohol deshidrogenasa (ADH) en $\mu\text{mol}(\text{g PF})^{-1}$ en radículas de dos cultivares de *Cicer arietinum* a los 5 días de germinación y tratados con cuatro dosis de NaCl

La expresión de la actividad ADH en radículas control presentó una variabilidad entre los dos cultivares (Fig. x): $16.4 \mu\text{mol NAD}_{\text{red}} (\text{g PF})^{-1}$ en Pedrosillano, en el cultivar ILC1919 la actividad registrada fue de 4 veces más: $69.9 \mu\text{mol NAD}_{\text{red}} (\text{g PF})^{-1}$. La aplicación de cloruro sódico, estimuló la actividad ADH, siendo la magnitud del efecto más espectacular en Pedrosillano: más de 3, 4 y 12 veces con 50, 100 y 150 mM respecto al control. En ILC1919, la respuesta de este parámetro fue menos llamativa, la máxima actividad ADH registrada fue con 150 mM: $144.4 \mu\text{mol NAD}_{\text{red}} (\text{g PF})^{-1}$ o sea el doble de actividad presentada en las radículas tratadas con agua destilada.

2.5.6. Metabolismo nitrogenado.

Tanto Pedrosillano como ILC1919 mostraron niveles altos de la glutamina sintasa (GS) en la fracción citosólicas de las radículas germinadas en agua destilada: 389.2 y $128.4 \mu\text{mol } \gamma\text{GH} (\text{g PF})^{-1}$ respectivamente (Fig. 2.6). Con la sal la GS mostró un patrón de actividad enzimática diferente entre los dos cultivares en estudio: mientras la GS se inhibe significativamente con el incremento de sal entre el 90 y 67% en el cultivar Pedrosillano, ILC1919 se afectó positivamente con el estrés aplicado, con dosis más elevada (100mM), la activación observada fue máxima: más de 300%.

La NADH-GOGAT (Fig. 2.6) exhibe una estimulación con 50 mM tanto en Pedrosillano (274%) como en ILC1919 (27%). Con dosis de sal superiores, esta actividad resultó drásticamente inhibida en los dos cultivares.

La actividad GDH como NADH-GOGAT de las radículas mostraron una actividad enzimática muy baja respecto a la actividad GS registrada. Al igual que la GS, se observó una estimulación de la actividad GDH en el cultivar ILC1919 con 50 y 100 mM (47.5% y 100%). Con 150 mM de NaCl la actividad fue óptima: 145 % respecto al control. En cambio, en las radículas de Pedrosillano la salinidad inhibe fuertemente la actividad GDH (65, 72 y 81 %) con 50, 100 y 150 mM respectivamente.

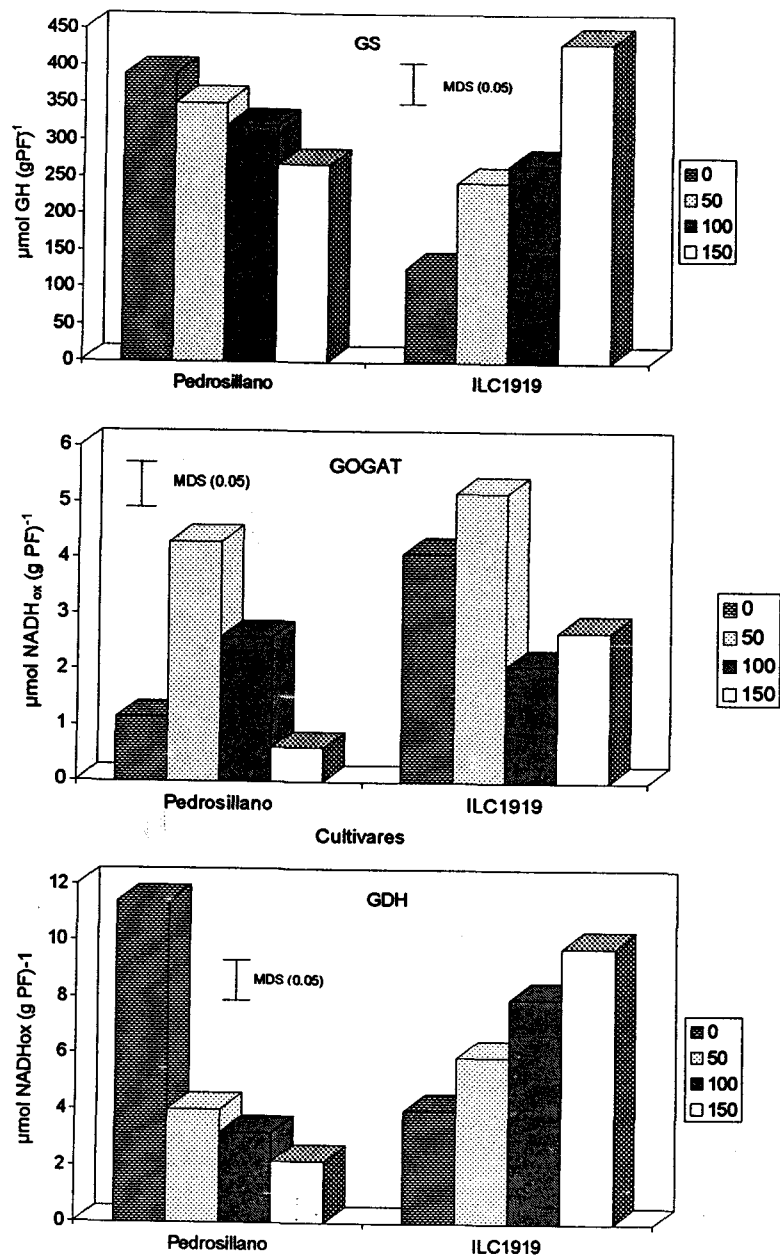


Figura 2.7. Actividad glutamina sintetasa (GS), en μmol y GH ($\text{gPF})^{-1}$, glutamato sintetasa (GOGAT) en $\mu\text{mol NADH}_{\text{ox}} (\text{g PF})^{-1}$ y glutamato deshidrogenasa (GDH) en $\mu\text{mol NADH}_{\text{ox}} (\text{gPF})^{-1}$, en radículas de dos cultivares de *Cicer arietinum* a los 5 días de germinación y tratados con cuatro dosis de NaCl.

3. Crecimiento y fijación de nitrógeno en diferentes cultivares de *Cicer arietinum*.

En este experimento se utilizaron cinco cultivares de *Cicer arietinum* de los estudiados en el experimento anterior y seleccionados según la tolerancia a sal en el proceso de germinación. La procedencia de estos cultivares y algunas características se exponen en el apartado de Material y Métodos de esta memoria. Como microsimbionte se utilizó la cepa Ch-191 de *Mesorhizobium ciceri*. Los diferentes cultivares fueron tratados con cuatro dosis de NaCl (0, 50, 75 y 100 mM). Las plantas se recogieron siempre tras la aparición de los botones florales, por lo que los datos proceden de plantas con igual estado de desarrollo fenológico, aunque la edad cronológica puede ser diferente. El inicio de la etapa reproductora de la planta se consideró como el periodo en que la simbiosis alcanza su máxima expresión y, por tanto, es adecuado para llevar a cabo estudios comparativos de fijación de nitrógeno y otros aspectos del metabolismo. El sistema de cultivo empleado permitió un desarrollo adecuado de la planta durante todo el experimento.

3.1. Análisis del crecimiento.

El peso seco de la parte aérea y raíz se expone en el diagrama de barras de la figura 3.1. El cultivar Lechoso alcanzó el mayor desarrollo y Pedrosillano el menor tanto en parte aérea como en raíz. Los otros tres cultivares presentan un crecimiento intermedio, observándose en el cultivar Gulavi un desarrollo radical superior al resto de los cultivares ensayados, puesto que en éstos el crecimiento de la parte aérea representa alrededor del 65% del peso seco total de la planta entera (Fig. 3.2) en Gulavi la parte aérea constituye el 52% del total de la planta, y el 48% la raíz.

La sal afecta negativamente al crecimiento de las plantas de garbanzo, observándose reducciones en todos los cultivares y con todas las dosis de sal, excepto en Gulavi que con 50 mM incrementó un 14% el PSP, y fue espectacular, el incremento del 50% en parte aérea.

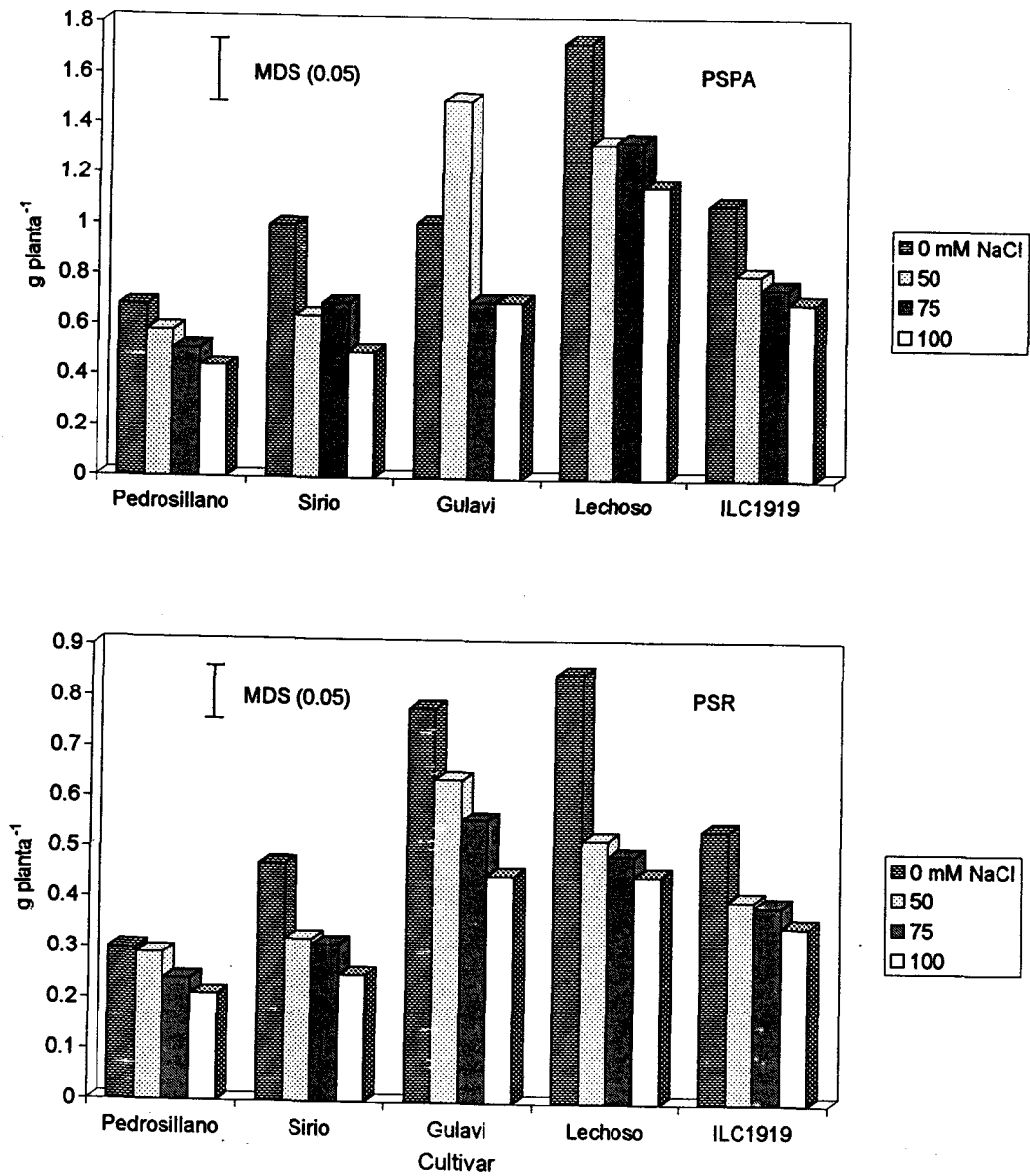


Figura 3.1. Peso seco de parte aérea y de raíz, expresado en g planta⁻¹, en cinco cultivares de *Cicer arietinum* inoculados con la cepa Ch-191 de *Mesorhizobium ciceri* y tratados con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

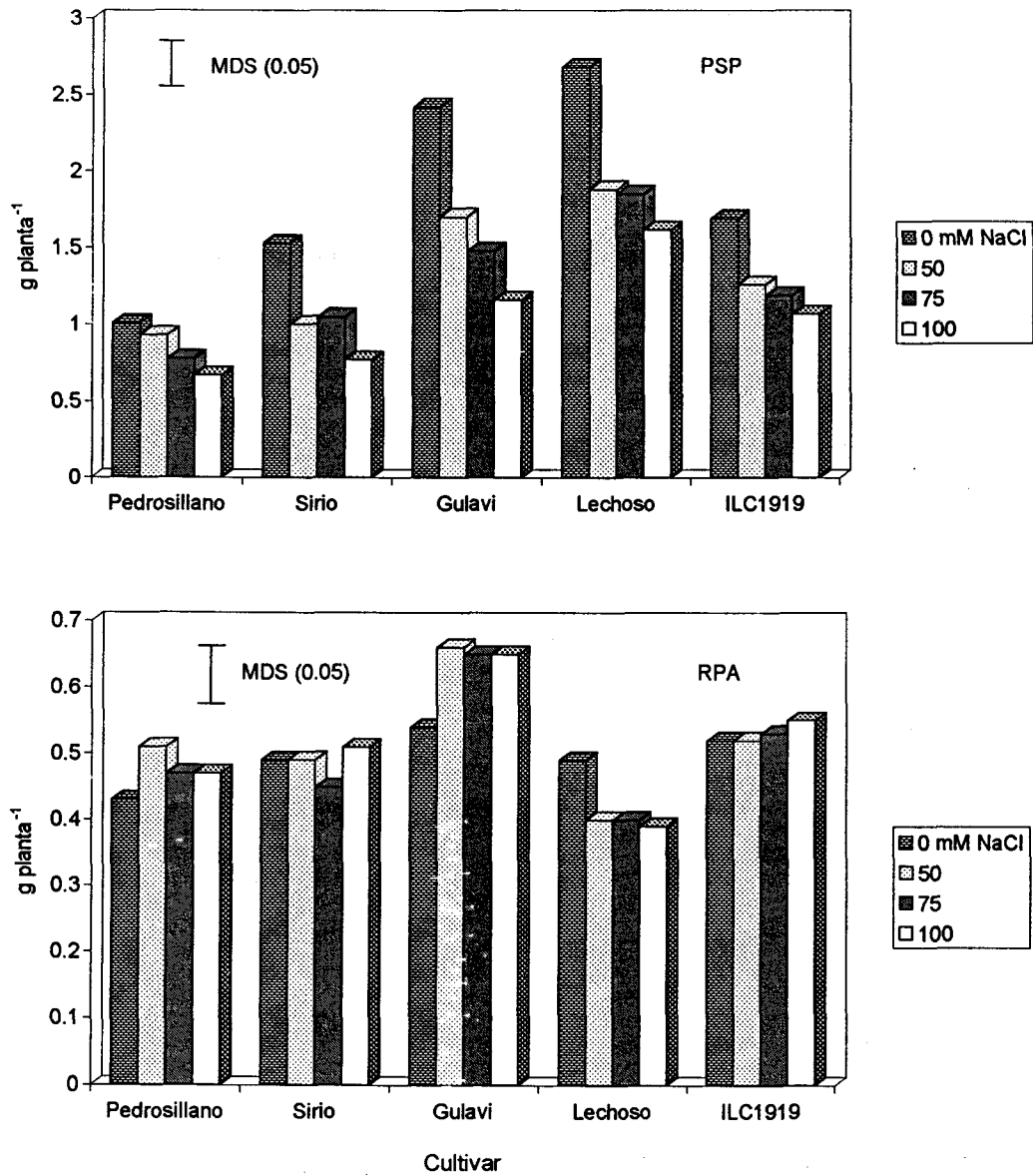


Figura 3.2. Peso seco de planta total (PSP), expresado en g planta⁻¹, y relación raíz/parte aérea (RPA) en cinco cultivares de *Cicer arietinum* inoculados con la cepa Ch-191 de *Mesorhizobium ciceri* y tratados con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

La sensibilidad a la sal de los distintos órganos vegetativos estudiados no sigue una pauta generalizada en el garbanzo y difiere según los cultivares. Así, mientras Pedrosillano exhibe una mayor sensibilidad a la sal en parte aérea que en raíz (la inhibición del crecimiento con 50 mM es del 15% en parte aérea y del 3% en raíz) en Lechoso es más sensible la raíz, ya que se reduce su crecimiento el 39%, frente al 23% en parte aérea a la misma dosis de sal. En dosis superiores de NaCl, el comportamiento es semejante en ambos cultivares. En otros dos cultivares estudiados, Sirio y Gulavi, la raíz y la parte aérea presentan una sensibilidad a la sal variable dependiendo de la dosis. Sin embargo, ILC1919 se muestra como el más tolerante a la sal, la raíz no se afecta, pues 50 y 100 mM provocan un incremento del 10% que estadísticamente no es significativo, y la parte aérea muestra reducciones de hasta el 25% con la máxima dosis de NaCl ensayada (100 mM).

De los cultivares estudiados, Pedrosillano y ILC1919 se pueden considerar los más tolerantes a la salinidad, con 100 mM de NaCl. De estos, ILC1919 responde mejor pues solo se reduce el crecimiento el 3, 4 y 16% con 50, 75 y 100 mM, respectivamente, mientras que Pedrosillano presenta reducciones mayores, del orden del 10, 24 y 34% con los mismos niveles de salinidad.

El cultivar más sensible al estrés salino es Sirio, con disminuciones en el crecimiento del algo más del 30% con 50 y 75 mM, y del 50% con 100 mM. La respuesta a la sal por parte de los cultivares Gulavi y Lechoso se puede considerar intermedia la inhibición del crecimiento, con 100 mM de NaCl es próximo al 40% y del 30% con 75 mM.

En el diagrama de barras de la figura 3.2 se puede observar el peso seco total por planta de los cinco cultivares de garbanzo estudiados en la parte superior, y la relación raíz parte aérea en la inferior. Los valores de estos gráficos (Figs. 3.1 y 3.2) se representan agrupando la respuesta de cada cultivar con las dosis de sal, pues así se evidencian mejor algunos comentarios anteriores. El cultivar de mayor crecimiento es Lechoso y el de menor Pedrosillano, y los más tolerantes a la sal ILC1919 y Pedrosillano.

Tabla 3.1. Peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de raíz (PSR), peso seco de planta (PSP) en g planta⁻¹ y relación raíz parte aérea (RPA) en cinco cultivares de *Cicer arietinum* inoculados con la cepa Ch-191 de *Mesorhizobium ciceri* y tratadas con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

Cultivar	NaCl (mM)	PSPA	PSR	PSP	RPA
Pedrosillano	0	0.68	0.30	1.02	0.44
	50	0.58	0.29	0.92	0.50
	75	0.51	0.24	0.78	0.47
	100	0.44	0.21	0.67	0.48
Sirio	0	1.00	0.47	1.53	0.47
	50	0.64	0.32	1.00	0.50
	75	0.69	0.31	1.04	0.45
	100	0.50	0.25	0.77	0.50
Gulavi	0	1.00	0.78	1.93	0.78
	50	1.51	0.64	2.20	0.43
	75	0.70	0.56	1.34	0.80
	100	0.70	0.45	1.17	0.64
Lechoso	0	1.73	0.85	2.64	0.49
	50	1.33	0.52	1.88	0.39
	75	1.34	0.49	1.85	0.37
	100	1.16	0.45	1.63	0.39
ILC1919	0	0.57	0.36	0.96	0.50
	50	0.50	0.40	0.93	0.49
	75	0.49	0.39	0.92	0.51
	100	0.43	0.35	0.81	0.50
MDS (0.05)		0.24	0.11	0.32	0.12

La relación raíz/parte aérea presenta amplias variaciones oscilando entre valores de 0.78 a 0.44 según los distintos cultivares de garbanzo, y de 0.80 a 0.37 cuando están tratados con NaCl. El comportamiento observado en cada uno de los cultivares es distinto. Así, en Lechoso la RPA disminuye con la sal como resultado de ser las raíces más sensibles, lo que condiciona que en todos los tratamientos el 70% de peso total de la planta sea parte aérea, frente al 65% en el tratamiento control. De forma semejante se comporta Gulavi, que partiendo de una RPA de 0.78 en el control, quizás condicionado por el peso de los nódulos (Fig. 3.3), llega al 0.64 con 100 mM

NaCl, siendo evidente que en este cultivar la parte aérea es más tolerante a la sal. Sin embargo, en los cultivares restantes la RPA aumenta con la sal con variaciones no significativas, en Pedrosillano de 0.49 a 0.58 y en Sirio de 0.51 a 0.57. Estos valores obtenidos indican que alrededor del 65% de peso seco de la planta es parte aérea y el 35% raíz. El cultivar ILC1919 sí presenta variaciones significativas con la sal, este parámetro se sitúa en torno al 0.80 con todas las dosis de NaCl, frente a 0.63 que presenta el tratamiento control.

Todos los datos expuestos se recopilan en la tabla 3.1, indicándose los valores medios de seis repeticiones obtenidos en cada uno de los parámetros de crecimiento estudiados, así como las MDS ($P \leq 0.05$) y el estudio estadístico realizado. Los coeficientes de correlación simple entre los diversos componentes del análisis de crecimiento fueron significativos ($P \leq 0.001$), como se muestra en la tabla 3.7.

3.2. Fijación de nitrógeno.

Los datos de los parámetros relacionados con el proceso de fijación de nitrógeno se exponen en la tabla 3.2, representándose gráficamente mediante diagrama de barras algunos de ellos como el número y peso seco de nódulos (Fig. 3.3) y el ARA y ARAP (Fig. 3.4) para facilitar estudios comparativos entre cultivares y dosis de sal. Los datos que se recopilan en la tabla 3.2 son medias de seis repeticiones, y cada cultivar se ha estudiado al menos en dos experimentos; además, los datos se han tratado por el procedimiento estadístico habitual.

La masa nodular (PSN) presenta una variabilidad entre los cultivares utilizados que oscila entre 147 y 26 mg (Tab. 3.2) con diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$). La nodulación se afecta negativamente por la sal con una intensidad variable según la dosis y el cultivar. Los cultivares más tolerantes son Pedrosillano, cuya masa nodular aumenta con 50 mM, e ILC1919 con las tres dosis de sal, siendo este aumento estadísticamente significativo. Dosis intermedias de sal (50 y 75 mM) inducen en Sirio una reducción de la masa nodular al 29%, mientras que en Gulavi y Lechoso la

reducción es superior al 50%, produciendo a 100 mM de NaCl, inhibiciones del 70-80% en estos últimos tres cultivares mencionados.

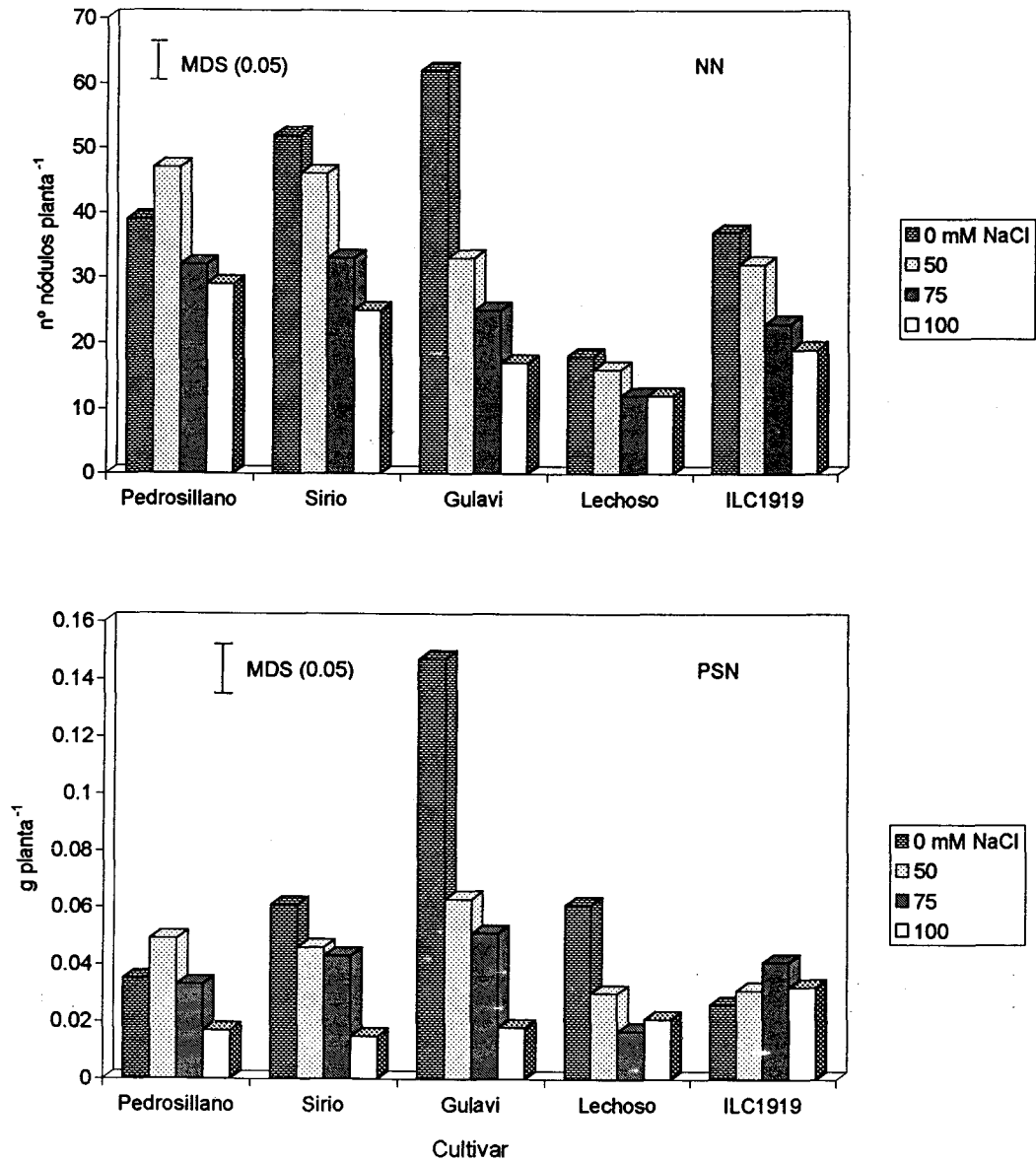


Figura 3.3. Número de nódulos (NN) y peso seco de nódulos (PSN), en g planta⁻¹, de cinco cultivares de *Cicer arietinum* inoculados con la cepa Ch-191 de *Mesorhizobium ciceri* y tratados con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

El peso normalizado de nódulos relaciona el peso de nódulos con el desarrollo de la parte aérea (Tab. 3.1). Este parámetro varió de 99.6 a 15.2 miligramos de peso seco de nódulos por gramo de peso seco de parte aérea, según el cultivar y la dosis de sal. En cada cultivar los máximos valores se obtuvieron en el tratamiento control o con 50 mM de NaCl, excepto ILC1919 que presenta un comportamiento distinto al observado en los otros, puesto que el PNN aumenta con la sal, obteniendo el tratamiento control el valor menor. También se establece una buena correlación ($r = 0.82$) con el NN y con el PSN ($r = 0.75$, Tab. 3.7).

El número de nódulos representado gráficamente en la figura 3.3 y numéricamente en la tabla 3.2, muestra que el cultivar que presenta más puntos de infección que conducen a la formación de nódulos es Gulavi, considerado también el de mayor masa radical (Tab. 3.1). El número de nódulos se reduce en un 47% (al 53%) con 50 mM y en un 60% (al 40%) con 100 mM de NaCl. Sin embargo, se evidencia que la formación de nódulos en los otros cultivares (ILC1919, Lechoso y Pedrosillano) tolera mejor la salinidad, ya que con la dosis mayor (100 mM) sólo se reduce el 50, 33 y 25% respectivamente. Este parámetro presenta una variabilidad que oscila entre 62 y 12, con diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.001$) en las interacciones cultivar por tratamiento de sal y entre cultivares. El número de nódulos, es decir la nodulación, establece una correlación positiva y significativa a $P \leq 0,001$ con todos los parámetros relacionados con la fijación de nitrógeno estudiados.

La actividad reductora de acetileno específica (ARA, fig. 3.4) varió significativamente en las plantas control entre los distintos cultivares. El cultivar ILC1919 presentó la actividad más alta, superando en un 50% a la de Pedrosillano o Sirio. Los valores más bajos fueron los de Lechoso y Gulavi. El estrés salino inhibió el ARA en todas las simbiosis estudiadas. Esta disminución sólo fue significativa en dosis altas, estableciéndose diversas opciones en cuanto a la tolerancia y/o sensibilidad a la sal. En general, la dosis de 50 mM de NaCl no afecta significativamente la actividad nitrogenasa (ARA), con reducciones que oscilan entre un 6-7% en Pedrosillano y Lechoso y del 12-13% en ILC1919 y Sirio. La dosis de 75 mM induce efectos distintos

según la simbiosis, en Pedrosillano y Sirio provoca una inhibición superior al 50% mientras que Gulavi y Lechoso muestran un incremento aunque no significativo, siendo ILC1919 el que muestra el descenso más importante con esta dosis, mientras que 100 mM provoca reducciones del 75-80% en todos los cultivares.

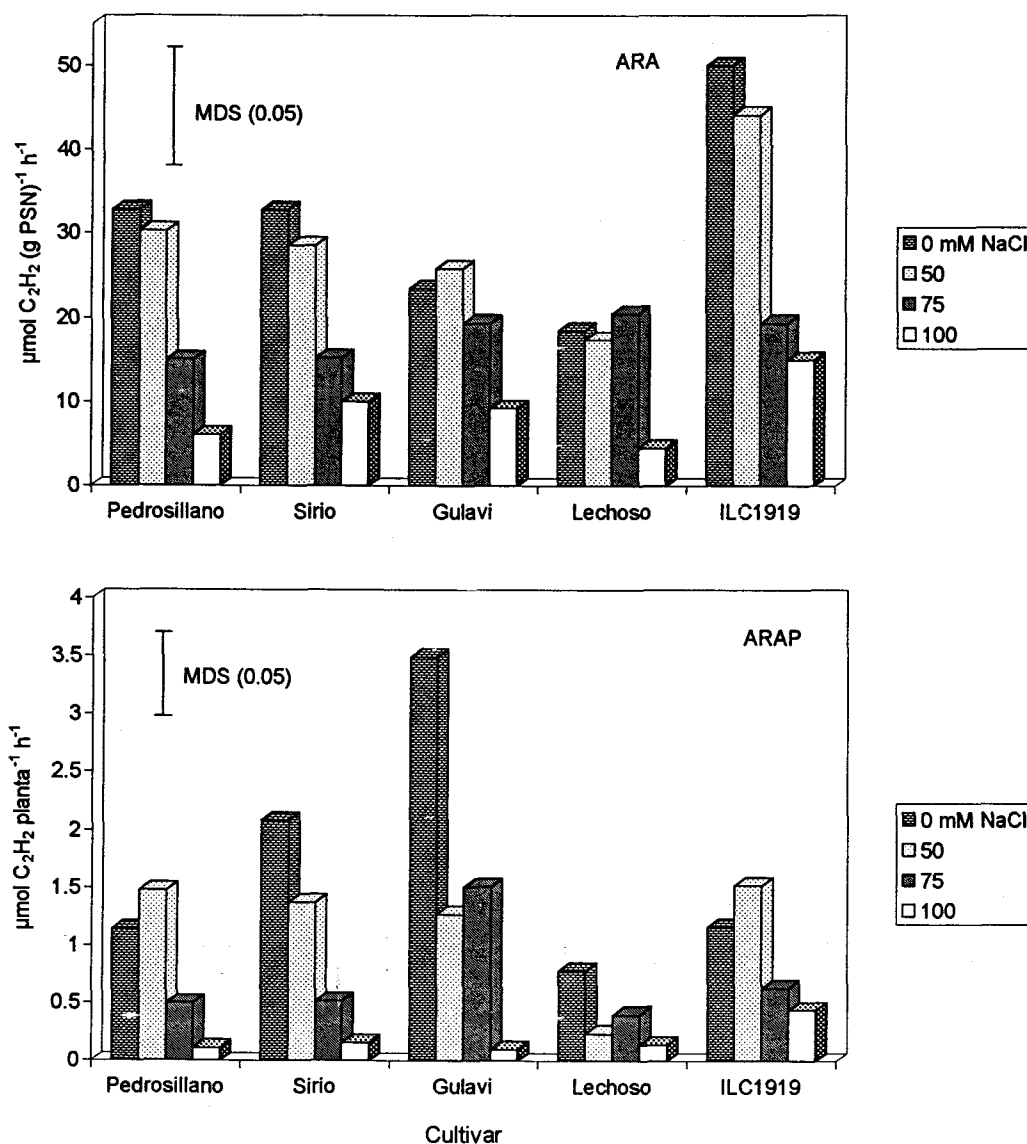


Figura 3.4. Actividad reductora de acetileno (ARA), en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 (\text{g PSN})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ y actividad reductora de acetileno por planta (ARAP), en $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ planta}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, de cinco cultivares de *Cicer arietinum* inoculados con la cepa Ch-191 de *Mesorhizobium ciceri* y tratados con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

Tabla 3.2. Número de nódulos (NN), peso normalizado de nódulos (PNN) en mg PSN (g PSPA)⁻¹, peso seco de nódulo (PSN) en g planta⁻¹, actividad reductora de acetileno en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_2$ (g PSN)⁻¹ h⁻¹ y ARA por planta (ARAP) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_2$ planta⁻¹ h⁻¹, en cinco cultivares de *Cicer arietinum* inoculados con la cepa Ch-191 de *Mesorhizobium ciceri* y tratados con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

Cultivar	NaCl (mM)	NN	PNN	PSN	ARA	ARAP
Pedrosillano	0	39	51.2	0.035	32.8	1.14
	50	47	84.5	0.049	30.3	1.48
	75	32	63.0	0.033	15.0	0.50
	100	29	38.3	0.017	6.0	0.11
Sirio	0	52	61.4	0.061	32.8	2.08
	50	46	74.7	0.046	28.5	1.37
	75	33	60.6	0.043	15.2	0.52
	100	25	31.8	0.015	10.0	0.16
Gulavi	0	62	99.6	0.147	23.4	3.49
	50	33	65.2	0.063	19.3	1.27
	75	25	58.8	0.051	25.8	1.51
	100	17	25.1	0.018	9.2	0.10
Lechoso	0	18	35.4	0.061	18.4	0.78
	50	16	22.3	0.030	17.3	0.24
	75	12	19.7	0.017	20.4	0.40
	100	12	15.2	0.021	4.5	0.14
ILC1919	0	37	45.6	0.026	50.0	1.16
	50	32	62.0	0.031	44.1	1.52
	75	23	83.7	0.041	19.3	0.63
	100	19	74.4	0.032	14.9	0.44
MDS (0.05)		12	17.6	0.017	14.0	0.81

La actividad reductora de acetileno total por planta, al implicar al ARA y al peso de nódulos total de la planta, se ve severamente afectada con dosis de 100 mM, reduciéndose entre un 82 y un 97%, salvo en ILC1919 que se reduce un 62%. Sin embargo, con 50 mM en Pedrosillano e ILC1919 se observa un ligero incremento y en Sirio la reducción no es significativa.

3.3 - Determinaciones analíticas: Nutrición mineral.

La concentración de distintos nutrientes en parte aérea y raíz de los cinco cultivares de *Cicer arietinum*, expresada como porcentaje de peso seco, se expone en las tablas 3.3 y 3.4 respectivamente, y el contenido total, expresado en mg de elemento por planta, en parte aérea en la tabla 3.5, y en raíz en la 3.6. En general, se aprecia que tanto la concentración como el contenido total por planta de nutrientes se alteró por la dosis de sal utilizada.

Tabla 3.3. Concentración en N, P, K, Na, Ca y Mg, expresada como porcentaje de peso seco de parte aérea, en cinco cultivares de *Cicer arietinum* inoculados con la cepa Ch-191 de *Mesorhizobium ciceri* y tratados con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

Cultivar	NaCl (mM)	N	P	K	Na	Ca	Mg
Pedrosillano	0	2.32	0.31	3.85	0.03	0.61	0.46
	50	2.35	0.26	3.82	0.65	0.56	0.46
	75	2.02	0.21	4.36	0.94	0.62	0.58
	100	1.98	0.32	4.80	0.50	0.61	0.55
Sirio	0	2.33	0.36	4.12	0.08	0.55	0.44
	50	2.22	0.34	4.25	0.73	0.52	0.59
	75	2.23	0.33	4.48	1.10	0.55	0.59
	100	2.15	0.33	4.51	1.60	0.60	0.68
Gulavi	0	2.26	0.39	3.85	0.03	0.65	0.07
	50	2.21	0.34	3.97	0.61	0.47	0.07
	75	2.44	0.32	4.13	0.70	0.52	0.54
	100	2.39	0.32	4.98	1.37	0.55	0.64
Lechoso	0	2.00	0.31	3.29	0.03	0.18	0.57
	50	2.29	0.29	3.36	1.13	0.49	0.54
	75	2.40	0.33	3.47	1.51	0.60	0.67
	100	2.31	0.31	3.51	1.26	0.57	0.62
ILC1919	0	2.45	0.31	3.85	0.05	0.80	0.56
	50	2.34	0.26	3.65	0.65	0.69	0.52
	75	2.43	0.21	3.81	0.64	0.60	0.42
	100	2.22	0.32	4.31	0.75	0.62	0.58
MDS(0.05)		0.03	0.04	0.23	0.17	2.04	0.09

Resultados

Tabla 3.4. Concentración de N, P, K, Na, Ca y Mg, expresada como porcentaje de peso seco de raíz, en cinco cultivares de *Cicer arietinum* inoculados con la cepa Ch-191 de *Mesorhizobium ciceri* y tratados con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

Cultivar	NaCl (mM)	N	P	K	Na	Ca	Mg
Pedrosillano	0	1.56	0.64	8.20	0.14	0.40	0.81
	50	1.49	0.50	6.70	1.97	0.48	1.07
	75	1.22	0.51	7.00	2.60	0.35	0.90
	100	1.20	0.46	7.20	2.67	0.20	0.86
Sirio	0	1.77	0.14	8.38	0.52	0.50	0.89
	50	1.61	0.09	6.59	0.83	0.44	1.21
	75	1.56	0.05	6.00	1.00	0.39	1.00
	100	1.59	0.02	7.10	0.90	0.29	0.82
Gulavi	0	1.37	0.74	9.24	0.12	0.31	0.92
	50	1.46	0.54	7.16	2.01	0.26	1.31
	75	1.54	0.55	6.35	2.19	0.25	1.27
	100	1.49	0.53	6.67	2.36	0.28	1.36
Lechoso	0	1.52	0.75	8.95	0.13	0.33	1.31
	50	1.21	0.46	5.97	1.89	0.27	1.40
	75	1.13	0.59	6.42	2.89	0.36	1.42
	100	1.12	0.40	6.54	2.00	0.29	1.00
ILC1919	0	1.62	0.71	4.81	0.38	0.34	1.04
	50	1.40	0.61	4.02	0.98	0.50	1.20
	75	1.35	0.63	3.21	2.00	0.48	0.92
	100	1.17	0.50	2.82	2.20	0.29	0.90
MDS(0.05)		0.27	0.07	1.63	0.17	0.026	0.22

La concentración de nitrógeno entre los cultivares y tratamientos, fue superior en parte aérea, con valores que oscilan entre 1.98 y 2.44%, mientras que en raíz las variaciones están entre 1.12 y 1.77%. Se evidencia que, en general, la acumulación de nitrógeno en parte aérea disminuye ligeramente, alrededor del 10% respecto al control, con el incremento de sal en el medio, excepto en los cultivares Gulavi y Lechoso en los que se observa que la dosis de sal favorece significativamente el aumento de nitrógeno en parte aérea, observándose incrementos significativos desde 50 mM. Sin embargo, el contenido de nitrógeno en raíz muestra disminuciones con la sal algo más drásticas (alrededor del 25% con 100 mM NaCl) excepto en el cultivar Gulavi que con todas las dosis de NaCl se observa una concentración de nitrógeno superior al tratamiento

control. Hay que considerar que la reducción del crecimiento de la planta provocada por la sal fue importante en algunos cultivares de garbanzo y, por tanto, los nutrientes se concentraron; por lo contrario hubo un efecto de dilución de nutrientes en plantas que tuvieron un mayor crecimiento.

La concentración de fósforo fue mayor, casi el doble, en raíz que en parte aérea de la planta excepto en el cultivar Sirio. Las variaciones en la concentración de fósforo por efecto de la sal, aunque significativas, fueron menores que para el nitrógeno. Mientras que en parte aérea la concentración de fósforo, en general, se mantiene en todos los cultivares y dosis de sal, en raíz se observan reducciones del 30% con 100 mM NaCl en los cultivares de *Cicer arietinum* ensayados, excepto en Lechoso, que la reducción es algo mayor.

Bajo condiciones de estrés salino, la concentración de potasio en parte aérea aumentó con el incremento de la sal, en cambio en raíz la tendencia fue opuesta. Se observa que en parte aérea los porcentajes de potasio oscilan entre 3.29 y 4.80, incrementándose de modo gradual con las dosis en sal en todos los cultivares, llegando a aumentos del 30% en Gulavi, 25% en Pedrosillano y 10% en el resto de cultivares con 100 mM NaCl. En cambio en raíz, con 100 mM, hay una reducción de la concentración de potasio, que vario del 12% en Pedrosillano al 41% en ILC1919.

Hay que destacar que la concentración de sodio parece ser un buen indicador del estrés en la planta ya que aumenta tanto en parte aérea como en raíz, aunque este aumento es más espectacular en raíz. Asumiendo que el porcentaje de sodio en parte aérea en el control de todos los cultivares es semejante, el incremento de Na provocado con 50 mM también es similar en todos los cultivares, excepto en Lechoso; pero con 75 y 100 mM de NaCl la respuesta es distinta según el cultivar de garbanzo considerado. En raíz todos los cultivares, excepto, Sirio, alcanzan concentraciones de sodio de 2-2.89% con 75 y 100 mM de NaCl partiendo de niveles entre 0.10 y 0.52 en los tratamientos control.

La concentración de calcio en parte aérea no se afecta significativamente con la dosis de sal en los cultivares Pedrosillano, Sirio y Gulavi, mientras que en los otros,

Lechoso e ILC1919, hay una disminución del 50 y 25%, respectivamente, con 100 mM de sal. En cambio, en raíz la reducción en el contenido de calcio es del 50% en Pedrosillano y Sirio con 100 mM NaCl y del 10% en el resto de los cultivares con la misma dosis de sal. En general, el calcio se acumula prioritariamente en parte aérea, y este efecto es más patente cuando este parámetro se expresa como contenido total en mg por planta (Tab. 3.5 y 3.6).

La variabilidad que se manifiesta en la concentración de magnesio en parte aérea entre los cultivares estudiados, en el tratamiento control, es semejante al de otros elementos. Los cultivares en estudio exhiben una respuesta a la sal muy similar. Así, aumenta la concentración de magnesio con la salinidad, obteniéndose valores parecido en cada dosis, con pocas diferencias significativas. En raíz se encontró mayor variabilidad en el contenido de magnesio de los controles, y el incremento provocado por la sal, tal como se ha comentado para la parte aérea, sólo se detecta con 50 mM de NaCl en todos los cultivares, con 75 mM en Sirio y con 75 y 100 mM en Gulavi. No obstante, hay que señalar que la raíz acumula casi el doble de magnesio que la parte aérea.

Al observar las tablas 3.5 y 3.6 que recogen el contenido de los nutrientes comentados en parte aérea y raíz respectivamente y expresados en mg por planta, se hace patente la inhibición del crecimiento por el cloruro sódico, que se traduce en que los valores obtenidos son inferiores al control independientemente de la dosis de sal utilizada, exceptuando el contenido de Na que se incrementa en todos los cultivares con el estrés salino. Considerando, el contenido de nitrógeno como un indicador de la fijación biológica de nitrógeno, se observa que Lechoso es el cultivar más eficiente y tolerante a la sal junto con Gulavi e ILC1919, mientras que en Pedrosillano y Sirio se reduce más del 50% del N total en parte aérea, aunque sólo en ILC1919 muestra tolerancia a la sal en la respuesta del contenido de nitrógeno en raíz.

Se apreció correlación negativa y significativa entre la presencia de sal y la concentración de N en raíz y positiva con el Na en parte aérea y raíz, que también se correlacionaron positivamente entre sí. La concentración de Na en parte aérea y raíz se

Resultados

correlaciona negativamente con la nodulación (NN y PSN) y la actividad nitrogenasa (ARA y ARAP). El porcentaje de Mg en raíz se correlaciona positivamente con los parámetros de crecimiento, especialmente el PSPA. La concentración de K en raíz se correlaciona positivamente con la acumulación de materia seca (PSP), mientras que el potasio en parte aérea lo hace negativamente.

Tabla 3.5. Contenido en Ca, P, Mg, N, K y Na, expresado en mg por planta, en parte aérea de cinco cultivares de *Cicer arietinum* inoculados con la cepa Ch-191 de *Mesorhizobium ciceri* y tratados con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

Cultivar	NaCl (mM)	N	P	K	Na	Ca	Mg
Pedrosillano	0	15.80	2.40	26.18	0.23	4.17	3.15
	50	13.63	1.68	22.14	3.77	3.23	2.65
	75	10.30	1.85	22.24	4.81	3.15	2.96
	100	8.71	1.72	21.12	2.20	2.68	2.42
Sirio	0	23.27	3.63	41.23	0.80	5.53	4.40
	50	14.19	2.15	27.20	4.65	3.33	3.78
	75	15.36	2.30	30.91	7.57	3.77	4.09
	100	10.73	1.65	22.53	8.00	2.98	3.38
Gulavi	0	22.63	3.37	38.53	0.30	6.53	0.73
	50	33.10	4.70	59.55	9.20	7.10	1.05
	75	17.08	2.24	28.93	4.88	3.62	3.76
	100	16.73	2.22	34.86	9.57	3.85	4.48
Lechoso	0	34.54	5.30	56.92	0.58	18.63	9.86
	50	30.50	3.81	44.73	15.07	6.56	7.14
	75	32.20	4.42	46.45	20.19	8.08	8.98
	100	26.76	3.63	40.75	14.58	6.65	7.23
ILC1919	0	13.97	1.38	21.96	0.27	4.56	3.21
	50	11.72	1.03	18.25	3.25	3.45	2.60
	75	11.91	1.30	18.67	3.14	2.94	2.06
	100	9.55	1.79	18.53	3.21	2.65	2.49
MDS(0.05)		4.07	0.20	1.44	2.14	2.84	0.64

Los parámetros de crecimiento determinados se correlacionan positiva y muy significativamente con la mayoría de los nutrientes determinados tanto en raíz como en parte aérea. También es interesante señalar los coeficientes de correlación que se obtienen entre algunos parámetros que expresan la eficacia de la fijación de nitrógeno,

Resultados

como los existentes entre a) Positiva entre el PSN y contenido en N, P, K en raíz; b) Positiva entre el contenido de N y Ca en raíz y el ARAP; c) Negativa entre el contenido de Na en parte aérea y algunos de los parámetros de fijación de nitrógeno determinados, como NN, PNN y ARAP. Por último, indicar que el contenido de Ca, P, N y K en parte aérea se correlaciona muy bien ($P \leq 0.01$) con todos los elementos determinados en raíz excepto el Na, aunque la concentración de Na en raíz si que se correlaciona ($P \leq 0.001$) con el de parte aérea. Además, existen buenas correlaciones entre los distintos elementos determinados en parte aérea y en raíz, salvo algunas excepciones (Tab. 3.7).

Tabla 3.6. Contenido de N, P, K, Na, Ca y Mg, expresado en mg por planta, en raíz de cinco cultivares de *Cicer arietinum* inoculados con la cepa Ch-191 de *Mesorhizobium ciceri* y tratados con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

Cultivar	NaCl (mM)	N	P	K	Na	Ca	Mg
Pedrosillano	0	4.67	1.92	24.60	0.42	1.20	2.43
	50	4.33	1.45	19.43	5.71	1.39	3.10
	75	2.94	1.22	16.80	6.24	0.84	2.16
	100	2.51	0.97	15.12	5.61	0.42	1.81
Sirio	0	8.32	0.66	39.40	2.44	2.37	4.20
	50	5.16	0.29	21.09	2.66	1.41	3.87
	75	4.84	0.16	18.60	3.10	1.21	3.10
	100	4.00	0.06	17.75	2.25	0.73	2.00
Gulavi	0	10.71	5.77	72.05	0.94	2.44	7.15
	50	9.34	3.46	45.81	12.89	1.69	8.32
	75	8.62	3.08	35.56	12.24	1.40	7.09
	100	6.72	2.39	30.02	10.62	1.26	6.12
Lechoso	0	12.95	6.38	76.08	1.08	2.83	11.14
	50	6.31	2.37	31.60	9.84	1.39	7.30
	75	5.54	2.89	31.46	14.16	1.76	6.96
	100	5.06	1.80	29.43	9.00	1.31	4.50
ILC1919	0	5.83	2.57	1.73	1.37	1.22	3.74
	50	5.59	2.44	1.60	3.92	2.00	4.80
	75	5.25	2.46	1.25	7.80	1.87	3.59
	100	4.10	1.75	0.98	7.70	1.02	3.15
MDS(0.05)		2.10	0.04	13.51	1.09	0.22	1.84

Tabla 3.7. Matriz de correlación simple entre variables relacionadas con el crecimiento, fijación de nitrógeno y contenido de macronutrientes, determinadas en cinco cultivares de *Cicer arietinum* inoculados con la cepa Ch-191 de *Mesorhizobium ciceri* y tratados con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo. El símbolo del elemento indica el contenido en parte aérea; con “r” indica en raíz.

	PSPA	PSR	PSP	RPA	NN	PNN	PSN	ARA	ARAP	N	P	K	Na	Ca	Mg	N _r	P _r	K _r	Na _r	Ca _r	Mg _r	
PSPA	1.00																					
PSR	0.71	1.00																				
PSP	0.79	0.94	1.00																			
RPA	-0.31	0.04	-0.28	1.00																		
NN	-0.38	-0.01	-0.03	-0.03	1.00																	
PNN	-0.37	0.02	-0.14	0.45	0.72	1.00																
PSN	0.19	0.64	0.58	0.05	0.68	0.66	1.00															
ARA	-0.24	0.02	-0.06	0.27	0.51	0.36	0.18	1.00														
ARAP	-0.08	0.42	0.35	0.10	0.84	0.65	0.84	0.61	1.00													
N	0.86	0.78	0.88	-0.38	-0.22	-0.37	0.26	-0.11	0.09	1.00												
P	0.82	0.76	0.87	-0.47	-0.14	-0.36	0.30	-0.16	0.11	0.97	1.00											
K	0.82	0.77	0.85	-0.37	-0.16	-0.33	0.30	-0.21	0.09	0.96	0.98	1.00										
Na	0.48	0.03	0.19	-0.36	-0.63	-0.62	-0.41	-0.45	-0.53	0.47	0.37	0.40	1.00									
Ca	0.78	0.78	0.84	-0.28	-0.22	-0.31	0.26	-0.07	0.06	0.79	0.83	0.77	0.07	1.00								
Mg	0.57	0.32	0.52	-0.52	-0.60	-0.72	-0.31	-0.21	-0.40	0.62	0.61	0.53	0.53	0.69	1.00							
N _r	0.57	0.95	0.86	0.07	0.15	0.09	0.66	0.15	0.52	0.69	0.69	0.72	-0.16	0.75	0.24	1.00						
P _r	0.67	0.89	0.80	0.16	-0.04	0.07	0.58	0.10	0.39	0.58	0.55	0.54	-0.12	0.72	0.21	0.81	1.00					
K _r	0.65	0.84	0.90	-0.38	0.17	-0.04	0.66	-0.17	0.41	0.73	0.81	0.80	0.01	0.75	0.34	0.84	0.69	1.00				
Na _r	0.33	0.11	0.09	0.13	-0.59	-0.30	-0.30	-0.38	-0.40	0.32	0.21	0.29	0.72	-0.07	0.19	-0.04	0.05	-0.05	1.00			
Ca _r	0.40	0.81	0.76	0.12	0.23	0.24	0.63	0.34	0.54	0.60	0.56	0.55	-0.17	0.67	0.27	0.83	0.69	0.63	-0.15	1.00		
Mg _r	0.81	0.93	0.89	0.01	-0.22	-0.17	0.40	0.00	0.20	0.83	0.79	0.82	0.23	0.80	0.48	0.88	0.82	0.76	0.31	0.70	1.00	

Valor crítico
P < 0.05 0.01 0.001
0.44 0.56 0.68

4. Estudio comparativo entre dos simbiosis con distinta tolerancia a la salinidad: Efecto de la sal aplicada en el momento de la inoculación.

4.1. Crecimiento.

En este trabajo se ha estudiado las alteraciones del metabolismo carbonado y nitrogenado, en *Cicer arietinum* en simbiosis con *Mesorhizobium ciceri* en condiciones de salinidad, en un intento de elucidar los mecanismos de tolerancia del garbanzo al estrés salino. Dicho estudio, requería con fines comparativos, la utilización de cultivares de una misma especie con un diferente grado de tolerancia a dicho estrés. Se seleccionaron los cultivares Pedrosillano (Salamanca) y ILC1919 (ICARDA), que presentaban un rendimiento de crecimiento y fijación biológica de nitrógeno diferente en respuesta a la sal. (Experimento 2 y 3). El estrés salino se aplicó desde el inicio del cultivo, en el momento de la inoculación.

El inicio de la etapa reproductora de la planta es considerado como un periodo en el que la simbiosis alcanza su máxima expresión y por tanto adecuado para llevar a cabo estudios comparativos del crecimiento de la planta y del metabolismo de diferentes asociaciones simbióticas. Los cultivos de garbanzo se llevaron hasta inicio de la floración por lo que los resultados proceden de plantas con igual estado de desarrollo. Los dos cultivares empezaron a producir flores a los 28 días de cultivo. El sistema de cultivo empleado permitió un desarrollo adecuado de las plantas durante todo el experimento.

Visualmente, la disminución del crecimiento de las plantas se hizo visible en Pedrosillano antes que ILC1919, con un acortamiento de los entrenudos que fue proporcional a la severidad y la duración del estrés. También, la sal provoca la clorosis de las hojas, que aparece gradualmente empezando por los bordes.

En la tabla 4.1 se expone los datos de crecimiento de los dos cultivares de *Cicer arietinum* estudiados. La respuesta al estrés salino ratifica que el cultivar ILC1919 es más tolerante a la sal que Pedrosillano. A los 28 días de cultivo el crecimiento de éste se reduce algo más del 25% con 50 y 75 mM de NaCl respecto al control y con la dosis más alta la disminución fue más drástica y también significativa

Resultados

(40%). Por el contrario, en el cultivar ILC1919 no se detectaron diferencias significativas en los tratamientos con 50 y 75 mM de sal respecto al control y la reducción del crecimiento (PSP) con 100 mM fue del 20%.

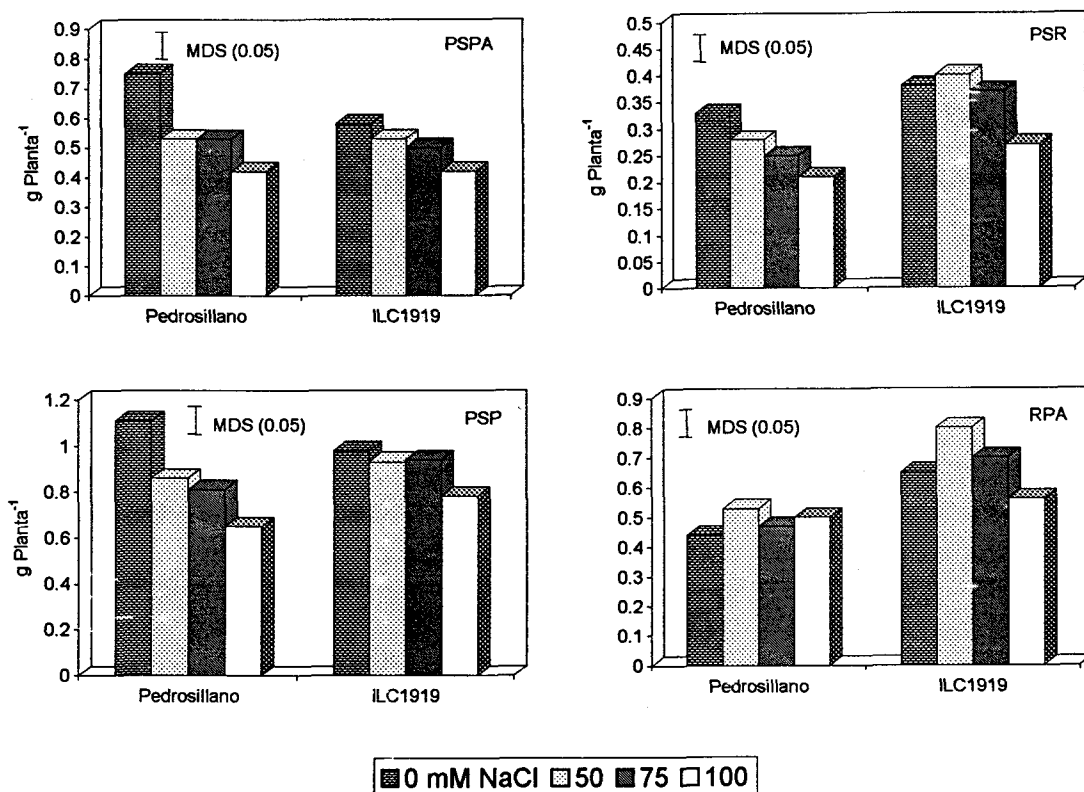


Figura 4.1. Peso seco de parte aérea (PSPA), raíz (PSR) y planta completa (PSP), expresado en g planta⁻¹, relación raíz/parte aérea (RPA), en los cultivares Pedrosillano e ILC1919 de *Cicer arietinum* inoculados con la cepa Ch-191 de *Mesorhizobium ciceri* y tratados con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

En el estudio comparativo de ambas simbiosis se aprecia que, en el cultivar más sensible a la salinidad (Pedrosillano) se afecta más la parte aérea que la raíz (Fig. 4.1), observándose reducciones del 30% con 50 y 75 mM y del 45% con 100 mM, mientras que la disminución del crecimiento radical reveló porcentajes menores. Por otra parte, en el cultivar ILC1919 la reducción del crecimiento con la máxima dosis de sal (100

Resultados

mM) fue la misma en parte aérea y raíz, mientras que las dosis intermedias mostraron variaciones no significativas en ambos órganos. Resulta interesante destacar que ILC1919 desarrolla una mayor masa radical que Pedrosillano, esto junto a la mayor tolerancia a la salinidad condiciona que los valores de relación R/PA sean muy diferentes entre ambos cultivares, mientras en Pedrosillano oscilan entre 0.44 y 0.53, en ILC1919 son superiores y se sitúan en un rango entre 0.64 y 0.76. En ambos casos la relación R/PA aumenta con la dosis de NaCl, indicando que en general la raíz es más tolerante que la parte aérea al cloruro sódico. El mayor incremento, del 20% y 15% para Pedrosillano y ILC1919 respectivamente se obtiene con 50 mM. Con las otras concentraciones salinas se dan porcentajes menores, incluso con 100 mM la relación R/PA en ILC1919 es algo inferior al control.

Tabla 4.1. Peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de raíz (PSR) y peso seco de planta (PSP) expresado en gramos; relación raíz/parte aérea (RPA), en plantas de dos cultivares de *Cicer arietinum*, a inicio floración, y tratados con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

Cultivar	NaCl (mM)	PSPA	PSR	PSP	RPA
Pedrosillano	0	0.75	0.33	1.11	0.44
	50	0.53	0.28	0.86	0.53
	75	0.53	0.25	0.81	0.47
	100	0.42	0.21	0.65	0.50
ILC1919	0	0.58	0.38	0.98	0.65
	50	0.53	0.40	0.93	0.76
	75	0.50	0.37	0.94	0.74
	100	0.42	0.27	0.78	0.64
MDS (0.05)		0.05	0.05	0.09	0.09

Una representación gráfica de la tabla 4.1 se ofrece en el diagrama de barras de la figura 4.1, en el cual se recopilan todos los parámetros de crecimiento determinados, en la parte superior PSPA y PSR, y en la inferior PSP y RPA.

El análisis de la varianza de los parámetros recogidos en la figura 4.1 muestra que hubo diferencias altamente significativas ($P \leq 0.001$) debido a los factores cultivar y tratamiento, así como a la interacción de cultivar x sal. En la acumulación de material seco (PSP) las diferencias provocadas por el cultivar, aunque notables, fueron menores y el tratamiento adquirió mayor importancia, ya que más del 60% de la variabilidad se debió al cultivar. El estudio estadístico evidencia que existe una correlación positiva y significativa ($P \leq 0.05$) entre RPA y PSR, y al 0.01 ($r = 0.77$) entre PSP y PSPA ($r = 0.88$; $P \leq 0.01$) entre otras correlaciones interesantes a mencionar de la tabla 4.4.

4.2. Procesos estudiados en hoja.

4.2.1. Fotosíntesis.

Los parámetros relacionados con el proceso fotosintético se recogen en la figura 4.2 y están representados por la actividad Rubisco y contenido en clorofila. Ambos parámetros se afectan severamente por la salinidad.

La máxima actividad Rubisco se alcanza, curiosamente, en el cultivar Pedrosillano con 50 mM. Sin embargo, en conjunto se aprecia que el cultivar ILC1919 mantiene una mayor actividad Rubisco incluso en condiciones de salinidad, presentando un 3% más de actividad en las plantas control en este cultivar respecto a Pedrosillano, y cinco veces más con 100 mM de NaCl. El porcentaje de reducción de esta actividad por la sal es muy elevado en Pedrosillano (alrededor del 90%) con niveles de 75 y 100 mM, mientras que en ILC1919 la inhibición fue del 47 y 57% con las dosis mencionadas.

El contenido de clorofila, otro parámetro determinado en relación con el proceso fotosintético, se afecta por la sal más intensamente en el cultivar Pedrosillano que en ILC1919. Los datos obtenidos con la dosis menor ensayada no presentan diferencias significativas en ninguno de los cultivares, considerando que es un parámetro que se afecta poco por la salinidad. Sin embargo, con 75 mM hay un 36% de reducción en el cultivar más sensible mientras que en el más tolerante no se altera.

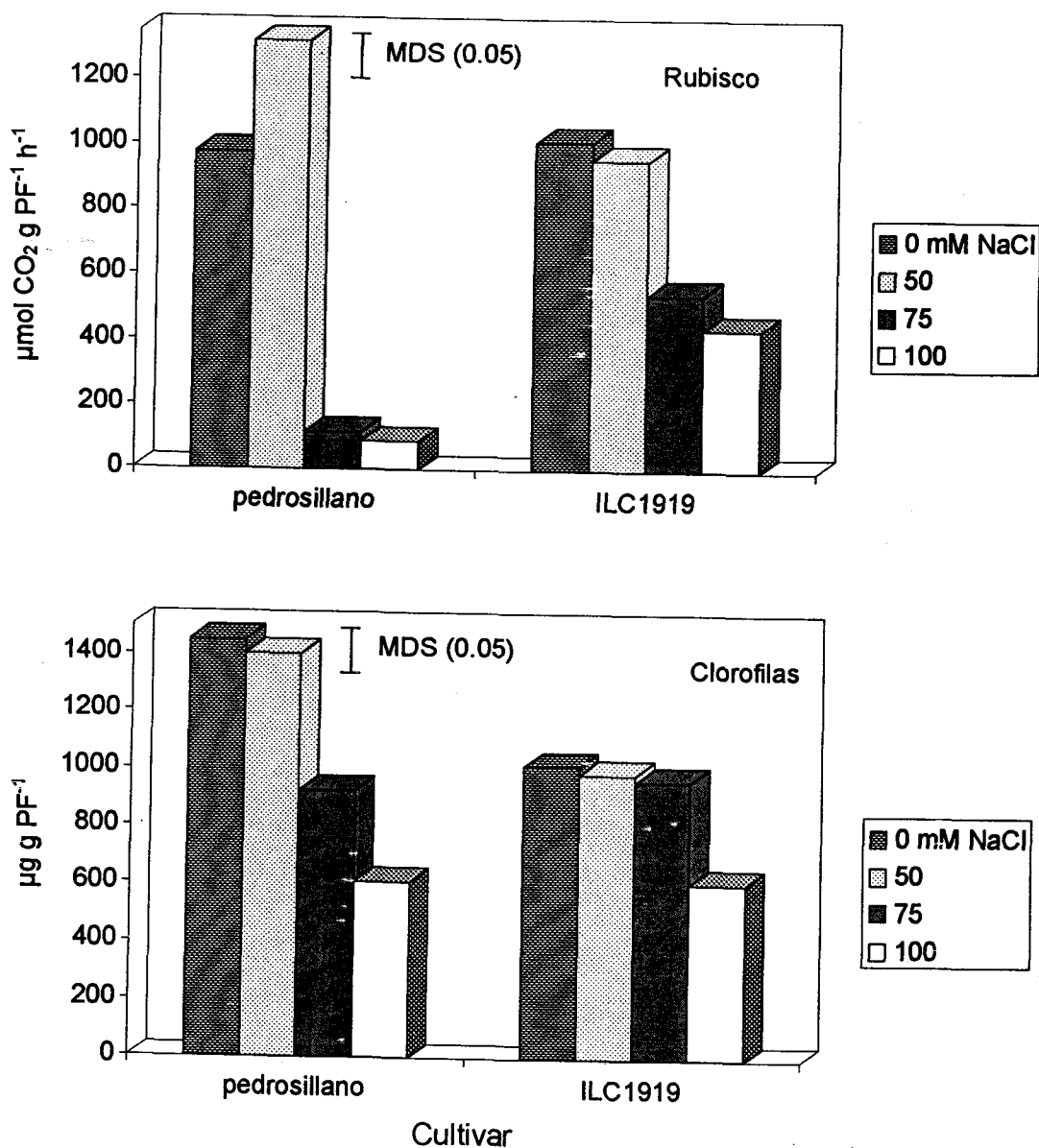


Figura. 4.2. Actividad ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa (RUBISCO) en $\mu\text{mol CO}_2 \text{ (g PF)}^{-1} \text{ h}^{-1}$, en hojas de los cultivares Pedrosillano e ILC1919 de *Cicer arietinum* inoculados con la cepa Ch-191 de *Mesorhizobium ciceri* y tratados con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

Resultados

De nuevo se comprueba que el cultivar ILC1919, aunque no presenta los elevados niveles de actividad Rubisco y clorofila que se encuentran en Pedrosillano con 0 ó 50 mM, sí que desarrolla una mayor potencialidad de tolerancia al estrés salino. La correlación positiva y significativa entre actividad Rubisco y contenido en clorofila (Tab. 4.4) y el descenso observado en ambos, evidencia la influencia negativa del estrés salino en el proceso fotosintético. De nuevo el análisis de la varianza indica que el tratamiento fue la fuente de variación que tuvo más efecto tanto en la actividad Rubisco como en el contenido de clorofila, siendo responsable del 80% de la variabilidad observada en ambos casos.

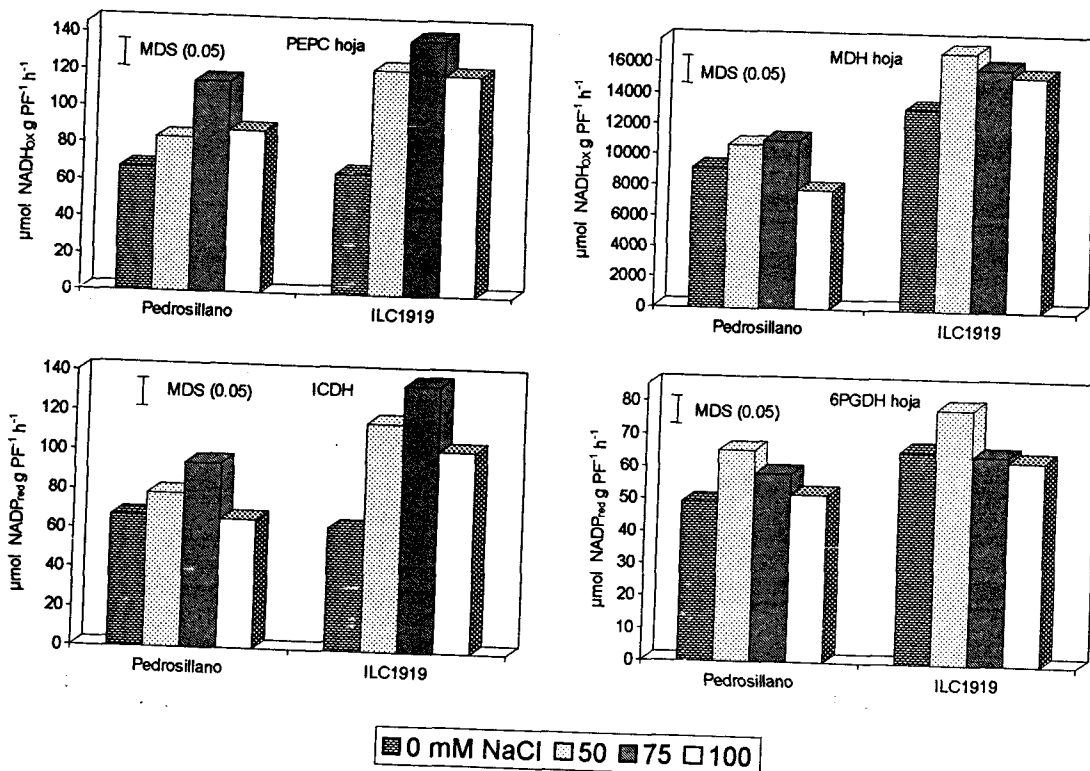


Figura. 4.3. Actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y malato deshidrogenasa (MDH) expresadas en $\mu\text{mol NADH}_{ox} \text{ (g PF)}^{-1} \text{ h}^{-1}$, isocitrato deshidrogenasa (ICDH) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), expresadas en $\mu\text{mol NADP}_{red} \text{ (g PF)}^{-1} \text{ h}^{-1}$, en hojas de los cultivares Pedrosillano e ILC1919 de *Cicer arietinum* inoculados con la cepa Ch-191 de *Mesorhizobium ciceri* y tratados con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

4.2.2. Actividades enzimáticas.

La fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), que presenta una actividad semejante en las plantas control de ambas simbiosis, se ve incrementada en un 24% con 50 mM de NaCl y un 70% con 75 mM en el cultivar Pedrosillano, mientras que ILC1919 llega a duplicar su valor con los tratamientos de sal. Sin embargo, cuando se expresa por mg de proteína y por minuto (Tab. 4.3) el porcentaje de incremento con la dosis de sal es mayor en Pedrosillano que en ILC191. Por otra parte, la actividad MDH, aún cuando guarda una correlación significativa con la PEPC (Fig. 4.3), presenta un comportamiento más estable tanto con la sal, como con los cultivares. Así, en Pedrosillano la MDH se mantiene con ligeros incrementos, que no son significativos, y en ILC1919 hay un incremento generalizado en torno al 20% con el nivel de NaCl, y esta tendencia se produce cuando esta actividad proteica se expresa en $\text{nmol (mg de proteína)}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Tab. 4.3) excepto en las plantas tratadas con 50 mM del cultivar Pedrosillano. No obstante, en ambas actividades enzimáticas, a pesar de las grandes diferencias, el tratamiento fue la fuente de variación que tuvo mayor repercusión en el análisis de varianza, sobre la variabilidad observada.

Otras enzimas del metabolismo carbonado estudiadas son las que se presentan también en la figura 4.3. La respuesta de la actividad ICDH es similar en ambos cultivares, aumenta con 50 y 75 mM para disminuir con la dosis mayor, si bien los mayores incrementos se observaron en ILC1919. Esta actividad está afectada en un 60% por el cultivar y un 40% por el tratamiento.

Los valores de la actividad 6PGDH (Fig. 4.3) fueron superiores en el ILC1919 en todos los tratamientos. En ambos cultivares la concentración de 50 mM indujo incrementos significativos, así como 75mM en Pedrosillano. Asimismo, la actividad 6PGDH es bastante semejante en ambos cultivares, así como su respuesta a la sal. Los incrementos observados en la figura 4.3 implican débiles variaciones y en algún caso no son significativas.

Las enzimas del ciclo de la glutamato sintasa (GS) y glutamina sintetasa (NADH-GOGAT) en hojas de *Cicer arietinum* presentaron un perfil de actividad dife-

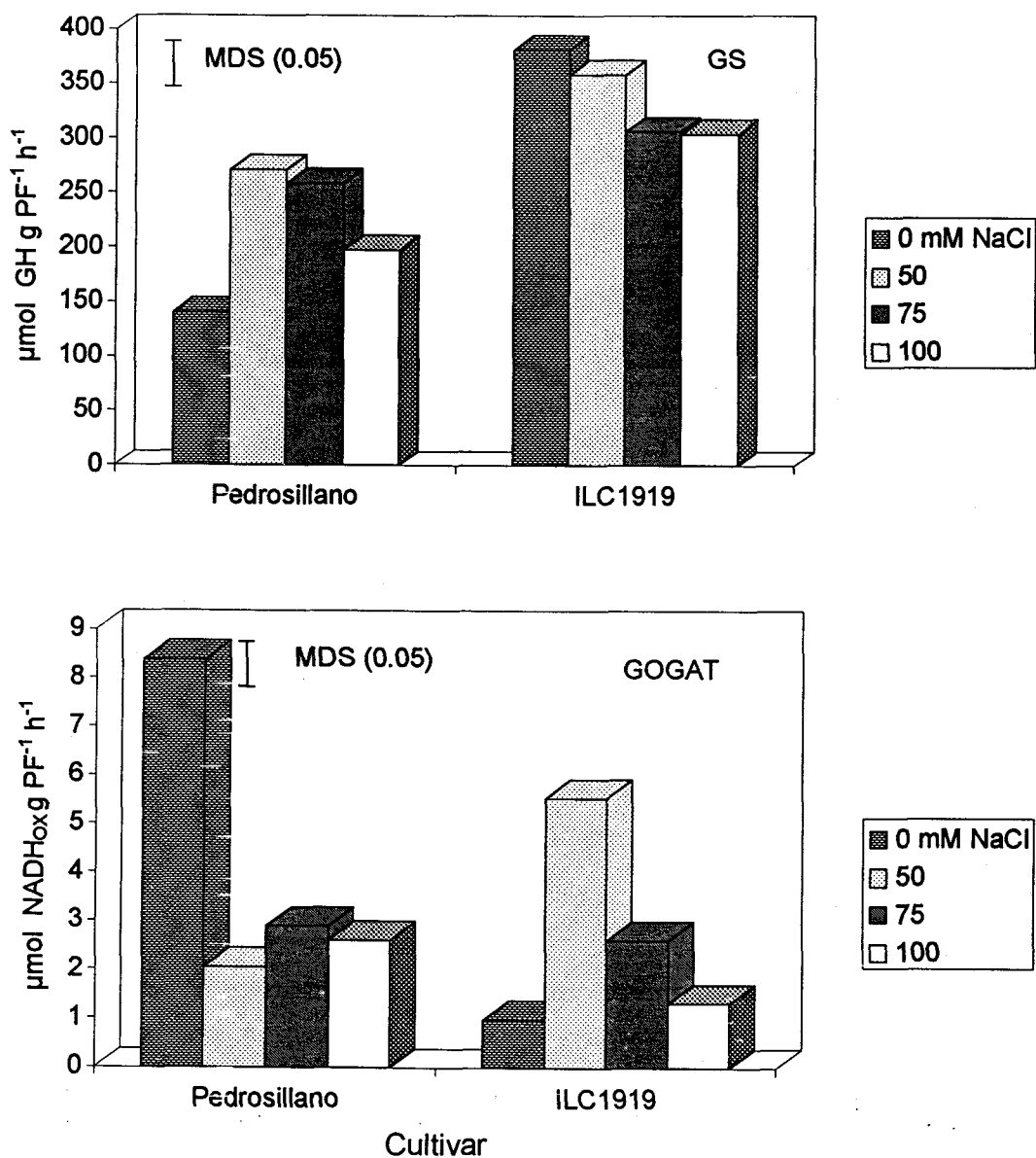


Figura. 4.4. Actividad glutamina sintetasa (GS) en $\mu\text{mol } \gamma\text{GH (g PF)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y glutamato sintasa (NADH-GOGAT) en $\mu\text{mol NADH}_{\text{ox}} \text{(g PF)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en hojas de los cultivares Pedrosillano e ILC1919 de *Cicer arietinum* inoculados con la cepa Ch-191 de *Mesorhizobium ciceri* y tratados con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

rente. Los niveles de actividad GS son superiores a los de la NADH-GOGAT tanto en plantas control como en plantas sometidas a estrés salino. Por otra parte, en función del cultivar, los enzimas presentan un desigual comportamiento frente a la salinidad: en Pedrosillano la sal estimula la actividad GS, y la inhibe en ILC1919, mientras que la respuesta de la GOGAT NADH dependiente es contraria. Este comportamiento desigual de la GS y la NADH GOGAT frente a la salinidad, implica la ausencia de correlación entre los dos patrones de actividades enzimáticas (Tabla 4.4). La interacción del tratamiento por cultivar, es responsable del 23 % de la variabilidad observada en la expresión de la glutamina sintetasa en hoja.

4.2.3. Contenido de solutos intracelulares.

Se han determinado algunos metabolitos que pueden acumularse en distintos órganos de la planta como respuesta al estrés salino. En la figura 4.5 se representa el contenido de azúcares solubles, aminoácidos y prolina detectados en hojas de *Cicer arietinum*.

El estudio de estos metabolitos en los dos cultivares inducen a pensar que el cultivar menos adaptado a la sal, es decir Pedrosillano, presenta una producción masiva de estos metabolitos con 50 e incluso con 75 mM, disminuyendo algo con 100 mM de NaCl, aun cuando los valores obtenidos con estas dosis son varias veces las detectadas en el control. En contraste, la acumulación de estos compuestos en el cultivar ILC1919 no es tan espectacular con el incremento de la salinidad en el medio de cultivo.

El estudio de cada uno de estos metabolitos lleva a comentar estos hechos:

- a) El nivel de azúcares solubles en plantas control de Pedrosillano ($9.5 \text{ mg (g PF)}^{-1}$) es menor que en ILC1919 ($13.2 \text{ mg (g PF)}^{-1}$), mientras que el contenido de aminoácidos y de prolina es mayor en Pedrosillano.
- b) El tratamiento adquirió mayor importancia ya que 79.5 % y 67 % de la variabilidad en el "pool" de azúcares solubles y aminoácidos respectivamente se debió al efecto del estrés salino.
- c) La dosis de sal en la que se obtiene mayor acumulo de todos los metabolitos estudiados y en los dos cultivares es 75 mM.
- d) Los azúcares solubles

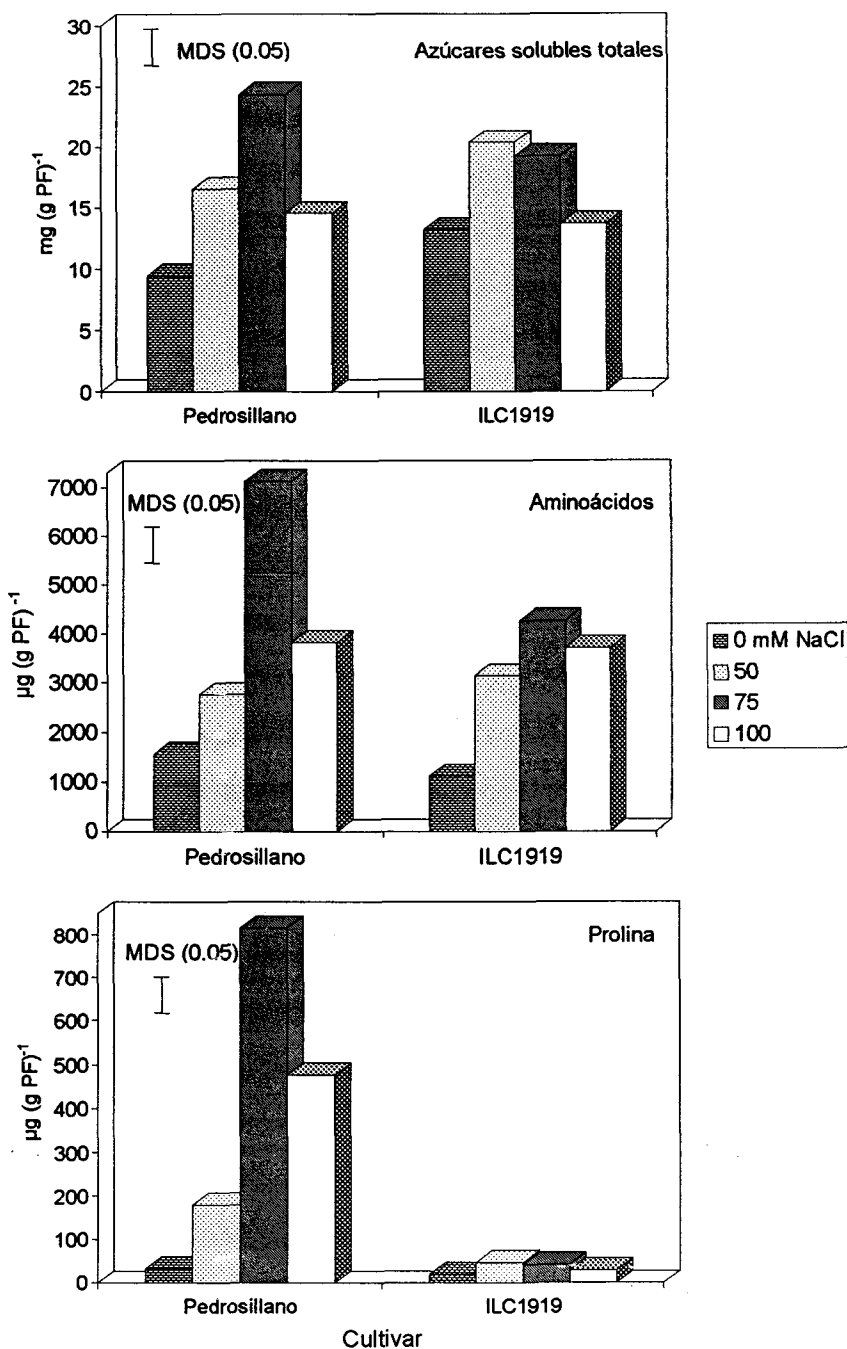


Figura. 4.5. Contenido en azúcares solubles en mg (g PF)^{-1} , aminoácidos en $\mu\text{g (g PF)}^{-1}$ y prolina en $\mu\text{g (g PF)}^{-1}$, en hojas de los cultivares Pedrosillano e ILC1919 de *Cicer arietinum* inoculados con la cepa Ch-191 de *Mesorhizobium ciceri* y tratados con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

son, de los solutos intracelulares estudiados, que se acumulan en menor cantidad por la sal, efecto observado en ambos cultivares. El incremento se establece entre 1.5-2.5 veces dependiendo de la dosis y/o cultivar, mientras que el aumento por la sal de aminoácidos es intermedio, ya que se multiplica por un factor que oscila entre 2-4.5 según la dosis y/o cultivar, siendo la prolina el metabolito que obtiene incrementos más espectaculares. e) Hay una correlación altamente positiva ($P \leq 0.001$) tanto entre el contenido de prolina y el de aminoácidos, como entre el contenido de éstos y el de azúcares solubles.

4.3. Procesos estudiados en nódulos.

4.3.1. Fijación de nitrógeno.

Los dos cultivares de *Cicer arietinum* son nodulados con la cepa Ch-191 de *Mesorhizobium ciceri* que en el estudio previo (Experimento 1) se mostró como tolerante a la sal. Los nódulos, de tamaño mediano, se localizaron esencialmente en la parte superior del sistema radical. El color de los nódulos vario de blancos a rosado claro en las plantas control y dependiendo de la dosis de sal el color se hizo más verde, indicativo de nódulos senescentes. No se apreciaron diferencias morfológicas de los nódulos entre los cultivares.

Los datos relacionados con la fijación de nitrógeno se exponen en la tabla 4.2. Alguno de ellos, como la actividad reductora de acetileno expresada por g PSN y por planta, se visualiza en diagramas de barras para facilitar los estudios comparativos (Fig. 4.8).

El número de nódulos (NN) presenta una variabilidad que oscila desde 19 a 42, siendo su valor muy semejante en las plantas control (39-37 nódulos/planta). La variación de este parámetro observada en el cultivar Pedrosillano con los tratamientos salinos no fue significativa, excepto la disminución del 25% detectada con 100 mM de NaCl. Sin embargo, en ILC1919 este parámetro se reduce significativamente con 75 mM (38%) y 100 mM (50%). Se observó que las raíces del cultivar Pedrosillano nodularon más que el otro cultivar e incluso alcanzaron

Resultados

mayor masa nodular (PSN) y, por ende, mayor peso normalizado de nódulos; no obstante en la eficacia nodular se describirán resultados diferentes.

La masa nodular presentó diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.001$) con los dos factores, tratamiento y cultivar, así como la interacción de ambos. La dosis menor empleada, 50 mM, indujo incrementos del 25% en la masa nodular de las raíces de Pedrosillano, y del 50% en las de ILC1919, mientras que dosis mayores produjeron resultados contrarios, ya que en Pedrosillano se redujo el PSN y en ILC1919 se lograron incrementos de 40 y 27%, con 75 y 100 mM de NaCl respectivamente. Es interesante destacar que ILC1919 con las dosis altas de sal (75 y 100 mM) produjo menor número de nódulos con igual o superior PSN que Pedrosillano, lo que indica que son nódulos más desarrollados.

Cuando la masa nodular de una planta se relaciona con el crecimiento de la parte aérea se obtiene lo que se denomina peso normalizado de nódulos (PNN), considerado como un índice idóneo para relacionar la posible incidencia de ciertos factores, como por ejemplo el cultivar y/o el estrés salino, sobre el crecimiento de los nódulos. Como se puede observar en la tabla 4.2 el efecto de la sal sobre este parámetro es más favorable, tanto en el incremento que se observa en el PNN de ILC1919, que es del 76% (50 mM) y del 50% (75 y 100 mM de NaCl), como la disminución del PNN en las raíces de Pedrosillano, que con 100 mM es sólo del 40% frente al 67% que se detectaba en el PSN. La correlación altamente significativa ($r = 0.897$) que se obtiene entre ambos parámetros (PNN y PSN) en la tabla 4.4 evidencia la dependencia de éstos.

El estrés salino influyó negativamente en la actividad nitrogenasa específica medida como actividad reductora de acetileno (ARA) en los dos cultivares estudiados. Sin embargo, la eficacia nodular de ILC1919 es más patente que de Pedrosillano, tal como se comprueba en la figura 4.6. Además, las reducciones observadas por la salinidad fueron más intensas en los nódulos de Pedrosillano (30, 60 y 86% para 50, 75 y 100 mM de NaCl, respectivamente) que en los de ILC1919 (12, 60 y 70%) para las mismas dosis. Si se considera el análisis de varianza realizado, la fuente de variación

que más contribuyó en este parámetro fue el tratamiento (70%).

El análisis de la actividad nitrogenasa total por planta muestra que el efecto de la sal se hace más benigno que en el caso de ARA (Fig. 4.6). Así con 50 mM de NaCl la reducción en Pedrosillano es del 8%, mientras que en ILC1919 se detecta un incremento del 31%, Además, en este cultivar con las otras dosis de NaCl (75 y 100 mM) se registra una inhibición de ARAP más leve. Sin embargo, se intensifica la reducción de ARAP, respecto a ARA en Pedrosillano con las dosis de sal más elevada. La menor incidencia de la sal sobre ARAP es debida al incremento de PSN descrito anteriormente. Es de interés destacar las buenas correlaciones positivas y significativas que se establecen entre estos dos parámetros y también con los relativos al crecimiento de la planta (Tab. 4.1) y negativas con los niveles de sal (Tab. 4.4).

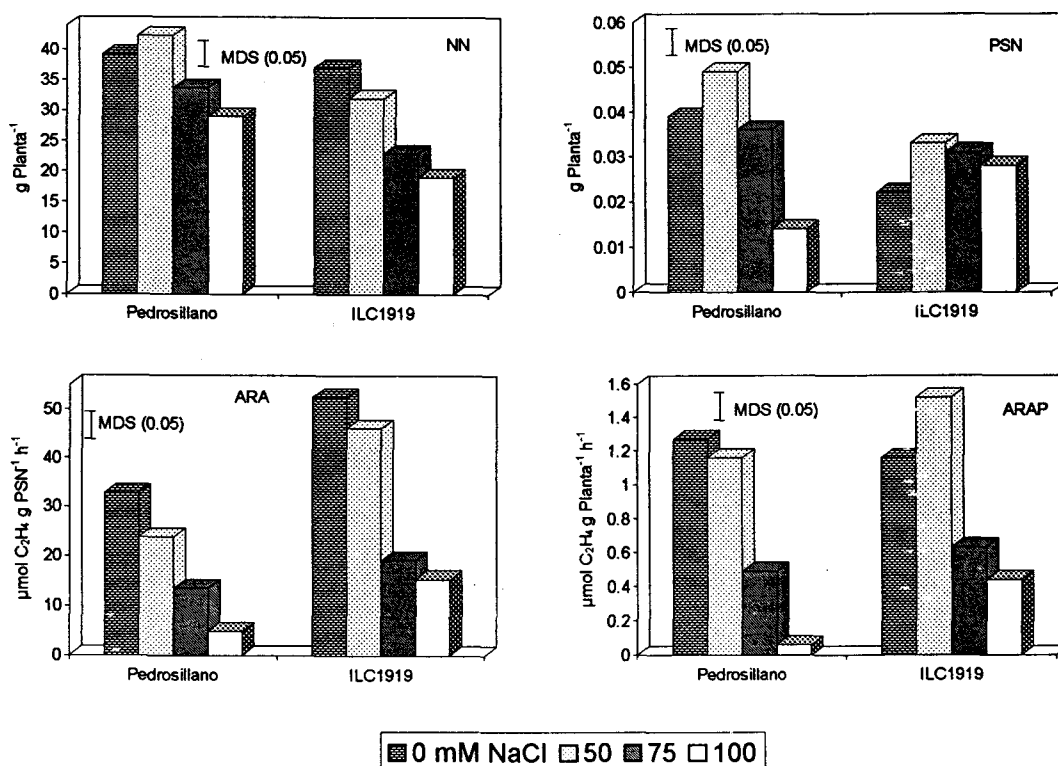


Figura. 4.6. Número de nódulos (NN), peso seco de nódulos (g planta⁻¹), actividad reductora de acetileno, en μmol C₂H₄ (g PSN⁻¹) y ARA por planta en μmol C₂H₄ (g planta⁻¹) h⁻¹, en plantas de dos cultivares de *Cicer arietinum* a inicio de floración, y tratados con cuatro dosis de NaCl desde la siembra.

Tabla 4.2. Número de nódulos (NN), peso seco de nódulos (PSN) en g planta⁻¹, peso normalizado de nódulos (PNN) en mg PSN (g PSPA)⁻¹, actividad reductora de acetileno específica (ARA) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4$ (g PSN)⁻¹ h⁻¹, ARA por planta (ARAP) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4$ (planta)⁻¹ h⁻¹, en plantas de dos cultivares de *Cicer arietinum* a inicio floración, y tratados con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

Cultivar	NaCl (mM)	NN	PSN	PNN	ARA	ARAP
Pedrosillano	0	39	0.039	52.3	32.8	1.27
	50	42	0.049	92.2	23.8	1.16
	75	33	0.036	67.7	13.5	0.49
	100	29	0.014	32.8	4.8	0.06
ILC1919	0	38	0.022	38.5	52.4	1.15
	50	33	0.033	67.2	46.0	1.52
	75	20	0.031	58.8	19.1	0.59
	100	19	0.028	58.6	15.3	0.43
MDS (0.05)		6	0.005	9.1	5.7	0.20

4.3.2. Actividades enzimáticas.

Las actividades enzimáticas estudiadas en el citosol nodular están estrechamente relacionadas con la fijación simbiótica del nitrógeno: actividades del ciclo de la glutamato sintasa, responsable de la asimilación primaria del amonio producido por los bacteroides en el nódulo; la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y malato deshidrogenasa (MDH) contribuyen significativamente al suministro de esqueletos carbonados para el metabolismo del bacteroide; la sacarosa sintasa (SS), enzima clave de la hidrólisis del fotosintato que en forma de sacarosa emana del floema; la glucosa procedente de la hidrólisis de la sacarosa puede ser metabolizada por la vía de las pentosas fosfato, donde interviene la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH); la NADP isocitrato deshidrogenasa (NADP-ICDH) detiene en leguminosas exportadoras de amidas, como el garbanzo, un papel importante en la regeneración de ketoglutarato y suministro de poder reductor, por último se ha determinado el alcohol deshidrogenasa (ADH) enzima de la vía fermentativa que, bajo determinados estrés abióticos,

tal como la salinidad, se estimula.

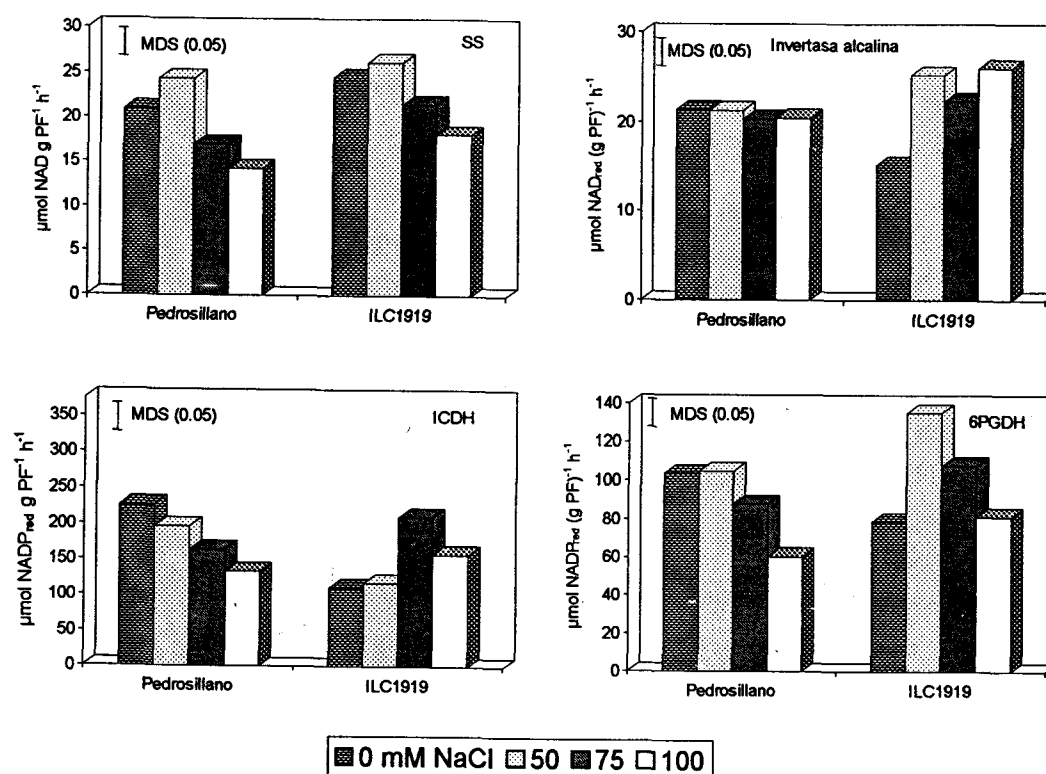


Fig. 4.7. Actividad sacarosa sintasa (SS) e invertasa alcalina (IA) en $\mu\text{mol NAD}_{\text{red}} \text{ (g PF)}^{-1} \text{ h}^{-1}$; isocitrato deshidrogenasa (ICDH) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), en $\mu\text{mol NADP}_{\text{red}} \text{ (g PF)}^{-1} \text{ h}^{-1}$, en nódulos de dos cultivares de *Cicer arietinum* a inicio floración, y tratados con cuatro dosis de NaCl desde la siembra.

Las alteraciones de las actividades sacarosa sintasa e invertasa alcalina, ambas expresadas en $\mu\text{mol (g PF)}^{-1} \text{ h}^{-1}$, con la salinidad, se han representado en la figura 4.7. La actividad SS presentó un 16% en Pedrosillano y un 7% en el ILC1919 de activación con 50 mM, con las concentraciones salinas superiores, se observó una inhibición de la SS en ambas simbiosis. La sacarosa sintasa se mostró como una enzima bastante tolerante a la sal, ya que con 50 mM se incrementó en ambos cultivares, y con la dosis más alta obtiene reducciones del 25-30% dependiendo del cultivar.

La invertasa alcalina sigue una evolución diferente (Fig. 4.7): en el cultivar

ILC1919, la salinidad incrementa la actividad IA, mientras que en Pedrosillano la sal no altera el patrón de actividad, manteniéndose los valores respecto a la planta control. Hay una correlación positiva y significativa entre la SS y ARA, y entre SS y ARAP. Una pauta semejante a la descrita para la sacarosa sintasa se puede argumentar para la 6PGDH. Se observa, en general, más actividad en los nódulos de ILC1919 que en Pedrosillano. En plantas control, la actividad 6PGDH fue superior en Pedrosillano ($103.7 \mu\text{mol NADP (g PF)}^{-1} \text{ h}^{-1}$). En el cultivar ILC1919, se observó un aumento significativo de esta enzima con 50 mM, con 75 y 100 mM la actividad 6PGDH disminuye pero los valores siguen siendo por encima del valor control registrado. En nódulos de Pedrosillano la actividad ICDH se inhibe por la sal y se estimula en los de ILC1919, observándose reducciones de 40% (100 mM de NaCl) en aquel, e incrementos del 90% (75 mM) en este. No obstante, los niveles de actividad detectados en el tratamiento control y con 50 mM fueron casi el doble en los nódulos de Pedrosillano que en ILC1919. En el análisis de varianza se aprecia que en SS, IA, 6PGDH y ICDH el tratamiento es el factor que provocó mayor variación.

En la tabla 4.3 se exponen las actividades enzimáticas en nódulos de los dos cultivares de *Cicer arietinum*, expresadas en $\text{nmol (mg proteína)}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

La fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) es una enzima muy activa en nódulos, de hecho se aprecia que su actividad casi se duplica respecto a la obtenida en hoja independientemente del cultivar y la severidad del estrés. La actividad malato deshidrogenasa guarda un paralelismo en su respuesta frente a la sal con la PEPC, incluso se obtiene un coeficiente de correlación entre ambas enzimas muy elevado ($r = 0.91$, $P < 0.001$). Al estudiar los datos del alcohol deshidrogenasa (ADH) se observa que los valores de esta actividad son mayores en ILC1919 que en Pedrosillano. La salinidad provocó aumentos de esta enzima en ambas simbiosis, siendo el incremento proporcionalmente mayor en Pedrosillano con 75 mM.

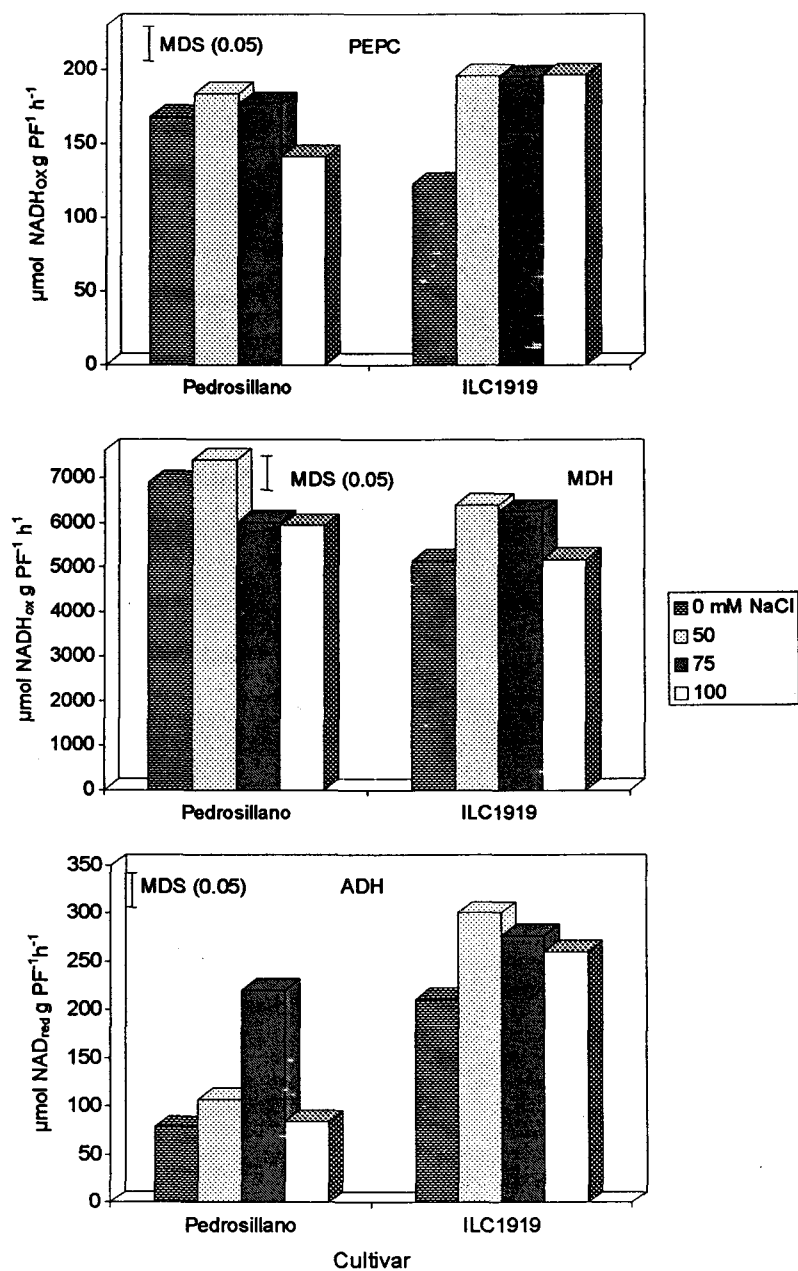


Figura 4.8. Actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y malato deshidrogenasa (MDH), en $\mu\text{mol NADH}_{ox} \text{ (g PF)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y actividad alcohol deshidrogenasa (ADH), en $\mu\text{mol NAD}_{red} \text{ (g PF)}^{-1} \text{ h}^{-1}$, en nódulos de dos cultivares de *Cicer arietinum* a inicio floración, tratados con cuatro dosis de NaCl desde la siembra.

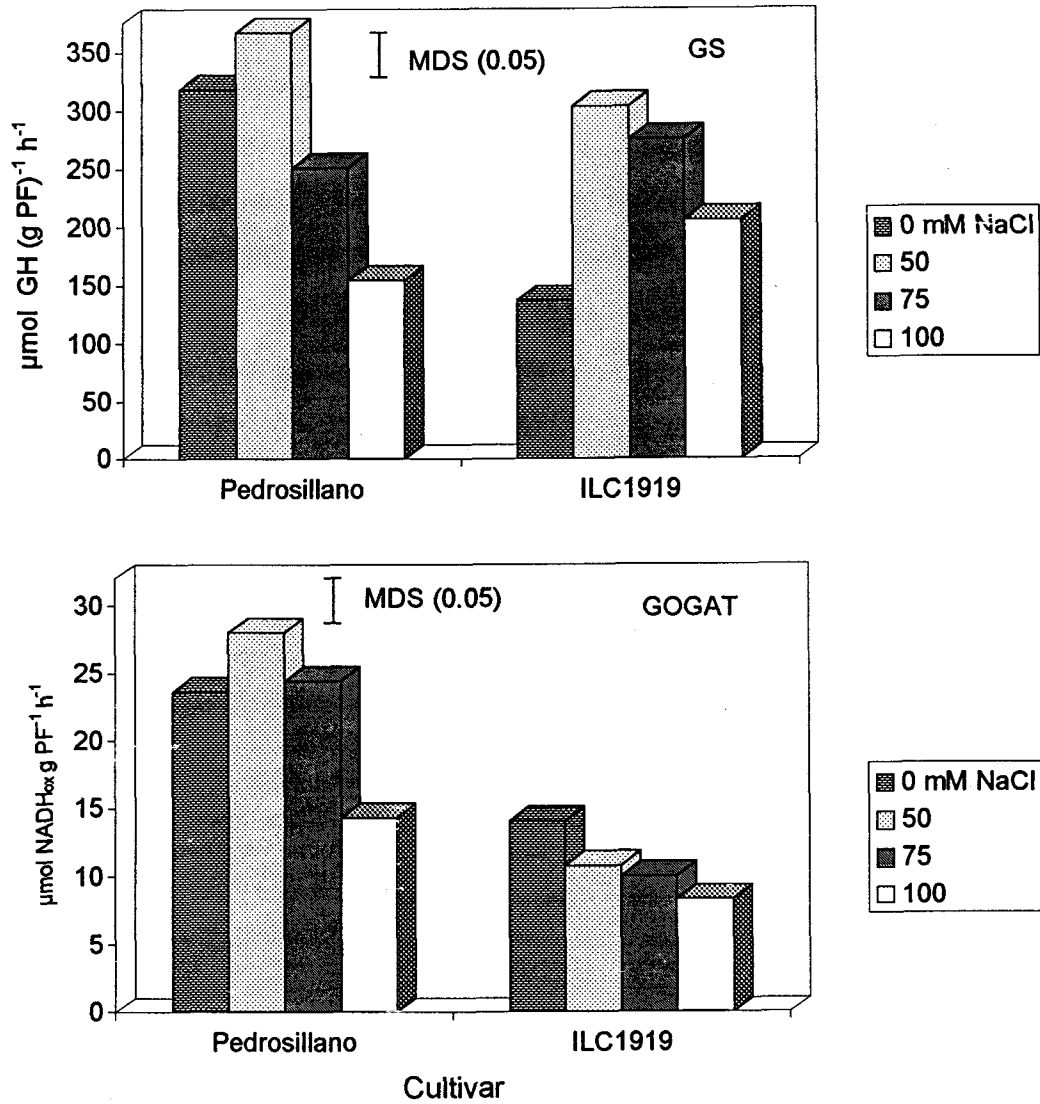


Figura 4.9. Actividad glutamina sintetasa (GS), en $\mu\text{mol } \gamma\text{GH (g PF)}^{-1} \text{ h}^{-1}$, y glutamato sintetasa (NADH-GOGAT), en $\mu\text{mol NADH}_{\text{ox}} \text{ (g PF)}^{-1} \text{ h}^{-1}$, en nódulos de dos cultivares de *Cicer arietinum* a inicio floración, tratados con cuatro dosis de sal desde la siembra.

Resultados

La contribución del nódulo en la incorporación del amonio fijado simbióticamente está mediada por la GS/GOGAT. La importancia del ciclo GS/GOGAT en el nódulo, sin duda viene condicionada por la actividad glutamato sintasa que es espectacular respecto a la registrada en hoja (Tab. 4.5). La GS nodular expresa una sensibilidad a la salinidad diferente a la descrita en hoja, es mucho más tolerante, sobre todo en el cultivar ILC1919, en el que se obtiene incrementos sustanciales frente al testigo ante todos los niveles de sal. En Pedrosillano se observa una inhibición respecto al control con 75 y 100 mM, Por tanto, la respuesta a la sal depende del cultivar, pero en general se afecta negativamente aunque sin sufrir grandes variaciones. Curiosamente ambas enzimas presentan una buena correlación con el contenido de clorofila, PSN y PNN (Tab. 4.4).

Tabla 4.3. Actividad sacarosa sintasa (SS), invertasa alcalina (IA), 6 fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), isocitrato deshidrogenasa (ICDH), fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), malato deshidrogenasa (MDH), alcohol deshidrogenasa (ADH), glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT), en $\text{nmol (mg proteína)}^{-1} \text{min}^{-1}$, en nódulos de dos cultivares de *Cicer arietinum* a inicio floración, tratados con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

	NaCl	SS	IA	6PGDH	ICDH	PEPC	MDH	ADH	GS	GOGAT
Pedrosillano	0	90.7	79.3	367.7	801.3	609.7	24213	324.3	1128.6	83.7
	50	66.2	53.9	323.5	605.9	566.4	22789	378.7	1133.4	86.3
	75	57.0	54.0	286.9	535.6	569.9	19651	768.2	820.2	79.7
	100	54.0	61.0	227.9	504.0	529.1	21900	361.1	582.6	54.3
ILC1919	0	74.2	53.8	292.0	410.5	462.3	19390	828.8	759.4	52.0
	50	75.0	78.1	341.4	296.2	508.4	16353	807.1	765.9	27.3
	75	55.5	73.2	284.6	558.5	513.4	16248	781.8	728.6	25.3
	100	53.8	99.0	241.5	470.3	584.2	15067	824.0	406.4	24.8
MDS (0.05)		4.0	4.4	13.7	28.3	25.1	952.5	67.8	34.7	6.1

4.3.3. Contenido en solutos intracelulares.

En el citosol nodular se han determinado algunos solutos intracelulares que se exponen en la figura 4.10. El estrés salino induce la acumulación de azúcares solubles en el citosol nodular de ambas simbiosis (Fig. 4.9) el máximo se registra con la dosis de 75 mM de NaCl que llegó a duplicarse en las dos simbiosis estudiadas, este incremento se mantuvo con 100 mM sólo en ILC1919. En general, los valores absolutos de la producción de azúcares solubles es mayor en nódulos de Pedrosillano y casi el doble que los valores obtenidos en hoja (Fig. 4.3).

En la figura 4.10 se expone además el contenido de aminoácidos del citosol nodular, observándose que a diferencia de los azúcares solubles, son los nódulos de ILC1919 quienes obtienen valores superiores. También, en este caso hay una mayor acumulación en el citosol nodular que en hoja, tal como se observa en la figura 4.3. El incremento máximo se obtuvo con 75 mM de NaCl y fue del 76% en nódulos de Pedrosillano y del 46% en los nódulos de ILC1919. Se observó con 100 mM, una disminución, pero el valor sigue siendo superior al control.

La salinidad induce la producción y acumulación de prolina en ambas simbiosis. Sin embargo, el incremento por la sal es más espectacular en los nódulos de Pedrosillano, la prolina aumenta hasta cuatro veces con 75 y 100 mM de cloruro sódico (Fig 4.10), que en los de ILC 1919. Esto es debido a que la producción de prolina en el citosol nodular de las plantas control es de $42.0 \mu\text{g (g PF)}^{-1}$ frente al $19.5 \mu\text{g (g PF)}^{-1}$ encontrada en el control de Pedrosillano. Es de interés destacar que el contenido de prolina nodular guarda una relación significativa y negativa con todos los parámetros de fijación de nitrógeno (PSN, ARA, etc.) como se comprueba en la tabla 4.4.

La disminución del contenido de malato por la sal es más espectacular en el citosol de los nódulos de Pedrosillano, entre 75-85% según la dosis de cloruro sódico, que la de ILC 1919, alrededor del 50% independientemente de la dosis de sal, considerando que los valores obtenidos en el tratamiento testigo de ambos cultivares

son semejantes. Es interesante destacar la buena correlación positiva que existe con la actividad MDH nodular, con parámetros de fijación de nitrógeno (ARA) y con los de crecimiento (PSP, PSR) y negativa con el cloruro sódico (Tab. 4.4).

El contenido de proteína tanto en el citosol nodular como en hoja en general, no se modifica con la sal al menos con 50 y 75 mM NaCl. En la hoja se detecta más contenido de proteína que en nódulo, registrándose variaciones leves del 10 -13% en Pedrosillano y más elevadas del 60% en ILC1919. Entre ambos cultivares, es ILC1919 quien presenta mayor contenido en proteína tanto en hoja como en nódulo.

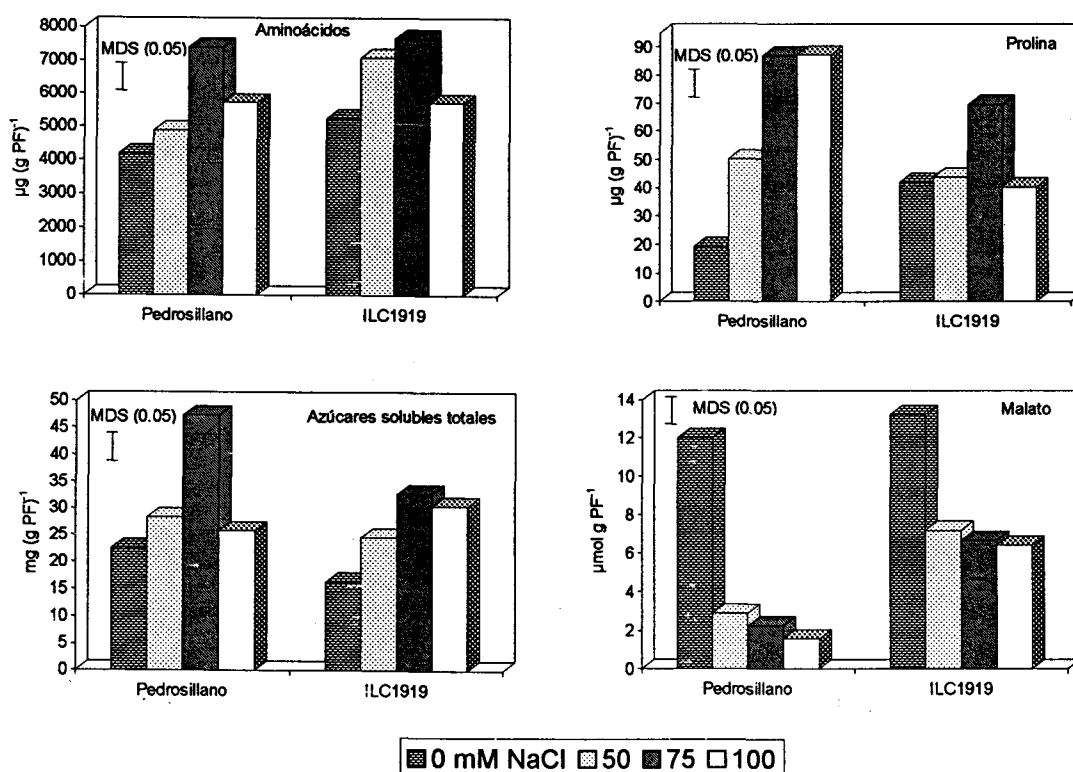


Figura. 4.10. Contenido de aminoácidos en $\mu\text{g (g PF)}^{-1}$, prolina en $\mu\text{g (g PF)}^{-1}$, azúcares solubles totales en mg (g PF)^{-1} , y malato expresado en $\mu\text{mol (g PF)}^{-1}$, en nódulos de dos cultivares de *Cicer arietinum* a inicio floración, y tratados con cuatro dosis de sal desde la siembra.

4.4. Contenido de nutrientes.

4.1. En parte aérea.

En la tabla 4.5 se observa la variación en la concentración de diversas macronutrientes expresada en porcentaje, con la salinidad en el medio de cultivo, en los dos cultivares de *Cicer arietinum*.

El cultivar influye en la acumulación de los nutrientes determinados en la parte aérea de garbanzo. Sin embargo, al estudiar los datos estadísticos se comprueba que, en general, es el NaCl en el medio de cultivo el máximo responsable del alto nivel de significación obtenido. Además, esto se intensifica en el análisis de la varianza para los datos que se ofrecen en la tabla 4. referente al contenido de nutrientes en parte aérea expresado en mg planta⁻¹.

Según estos datos, a pesar de las diferencias entre cultivares, el tratamiento fue la fuente de variación que tuvo unos efectos sobre el contenido de nutrientes en parte aérea, siendo responsable del 90% (para N, Na y Ca) y del 60% (P, K y Mg) de la variabilidad observada.

Tabla 4.4. Contenido en N, P, K, Na, Ca y Mg en porcentaje de peso seco de parte aérea en dos cultivares de *Cicer arietinum*, al inicio de floración, con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

Cultivar	NaCl	N	P	K	Na	Ca	Mg
Pedrosillano	0	2.32	0.35	3.85	0.03	0.61	0.46
	50	2.35	0.29	3.81	0.65	0.56	0.46
	75	2.43	0.36	4.36	0.94	0.62	0.58
	100	2.22	0.39	4.80	0.90	0.61	0.55
ILC1919	0	2.40	0.46	4.21	0.04	0.88	0.60
	50	2.30	0.40	3.64	0.43	0.56	0.58
	75	2.02	0.40	4.54	0.65	0.58	0.53
	100	1.98	0.47	4.86	0.78	0.32	0.55
MDS (0.05)		0.04	0.06	0.35	0.06	0.03	0.05

El cultivar ILC1919 presentó una concentración de nitrógeno algo superior a PS en las plantas control. Sin embargo, en el resto de tratamientos se observó lo contrario. En general, este parámetro presentó pocas diferencias, aunque fueron significativas (MDS 0.05), destacando el 18% de reducción por efecto de 100 mM de sal en el cultivar ILC1919 frente al 5% que se detecta a la misma dosis de NaCl en el otro cultivar. Al estudiar las correlaciones encontradas (Tabla 4), se evidencia la buena correlación positiva que exhibe con el contenido de Ca en parte aérea y negativa con el Mg en raíz.

Tabla 4.5. Contenido en N, P, K, Na, Ca y Mg en mg planta⁻¹, de parte aérea en dos cultivares de *Cicer arietinum*, al inicio de floración, con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

Cultivar	NaCl	N	P	K	Na	Ca	Mg
Pedrosillano	0	13.92	2.65	28.88	0.25	4.60	3.46
	50	12.19	1.54	20.23	3.45	2.95	2.42
	75	12.88	1.93	23.11	5.00	3.27	3.06
	100	9.32	1.64	20.16	3.78	2.56	2.31
ILC1919	0	14.21	2.64	24.42	0.27	5.10	3.48
	50	12.42	2.12	19.29	3.45	2.95	3.07
	75	10.10	1.95	22.70	3.25	2.90	2.65
	100	8.32	1.97	20.41	4.14	1.34	2.31
MDS (0.05)		0.21	0.27	1.67	0.31	0.16	0.28

Respecto a la concentración de fósforo en parte aérea se observan diferencias interesantes de destacar: a) El cultivar ILC1919 presenta un porcentaje de fósforo mayor que Pedrosillano en todos los tratamientos, incluido el control, con diferencias del 25% (0 y 50 mM), 10% (75 mM) y 17 % (100 mM de NaCl). b) Este parámetro presenta correlaciones positivas y significativas con el contenido de K y Mg en parte aérea. c) El análisis de varianza indica que el efecto observado se debió al cultivar y al tratamiento en la misma proporción.

Al igual como se ha descrito para el contenido de fósforo, el cultivar ILC1919 muestra mayor contenido de potasio en parte aérea. También se observa que, aunque

disminuye con 50 mM, este parámetro aumenta con la dosis de sal más alta (100 mM) en ambos cultivares ensayados, con incrementos del 20 y 14 % respecto al control en Pedrosillano e ILC1919 respectivamente. El cultivar apenas tuvo efecto sobre el contenido de potasio en parte aérea ya que la variabilidad observada (90%) se debió fundamentalmente a la dosis de sal.

Al realizar el estudio comparativo entre ambos cultivares en relación con el contenido de sodio en parte aérea, se observa que el cultivar ILC1919 tiene menos tendencia a acumular el sodio en parte aérea (Tab. 4.6) que Pedrosillano en condiciones de estrés salino. Ambos cultivares presentan en las plantas control la misma concentración de Na, que se incrementa cuando las plantas se cultivan con 50 mM de NaCl; el porcentaje se multiplica por 20 en Pedrosillano y por 10 en ILC1919. Con 75 y 100 mM, el nivel de sodio se incrementa aun más. Sin duda, es el tratamiento la fuente de variación a la que se atribuye la variabilidad observada (83%) según el análisis de la varianza realizado. Este parámetro exhibe una buena correlación negativa con el peso seco de la planta (Tab. 4.) así como con los parámetros de fijación de N y con la concentración de Ca en parte aérea.

No se observan variaciones del porcentaje de Ca en el cultivar Pedrosillano entre los tratamientos realizados. Sin embargo, en el otro cultivar (ILC1919) se puede comprobar que disminuye el calcio en parte aérea con el tratamiento de NaCl, y esta disminución es más acusada (del 35% con 50 y 75 mM y 65% con 100 mM de NaCl) porque este cultivar presenta un contenido elevado de Ca en el tratamiento control, superior en un 30 % al de PS. Al igual como se ha descrito para algún otro macronutriente en parte aérea (P y K) sólo la dosis de 50 mM de sal induce una ligera disminución en el contenido de Ca en Pedrosillano, variando esta tendencia con dosis de NaCl superiores.

La acumulación de Mg en la parte aérea del cultivar ILC1919 es mayor respecto a Pedrosillano con 0 y 50 mM. En Pedrosillano, con 75 y 100 mM de NaCl, se obtiene un 20% más de Mg que el control y con 50 mM, pero en ILC1919 hay descensos no significativos con la sal.

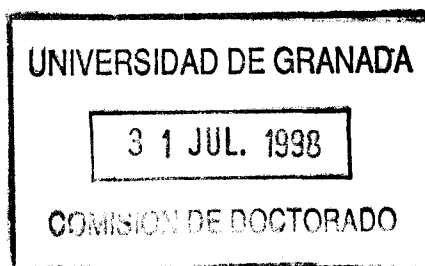
El estudio de la tabla 4.6 indica que la sal disminuye el contenido total (mg planta⁻¹) de los macronutrientes analizados en parte aérea, por efecto de la inhibición del crecimiento, excepto el contenido de sodio de PS. También se aprecia que, en general, el contenido de nitrógeno y sodio es mayor en Pedrosillano que en ILC1919, mientras que éste exhibe mayor contenido de P y Mg. El resto de macronutrientes determinados (Ca y K) muestran variaciones que, aunque significativas, no facilitan una clara definición.

4.2. En raíz.

En general, se puede decir que en ambos cultivares la raíz presenta un mayor porcentaje de fósforo, potasio, magnesio y sodio que la parte aérea, mientras que ésta obtiene mayor nivel de N y Ca que en raíz, salvo algunas excepciones que serán comentados. También se puede generalizar que la raíz del cultivar Pedrosillano alcanza una concentración de Na mayor que la raíz de ILC1919, obteniéndose en ésta el nivel más alto de calcio y magnesio (Tab. 4.7). Al intentar generalizar el efecto de la sal en el contenido de estos nutrientes en raíz, las respuestas son variadas, dependiendo del cultivar y/o la dosis de sal, aunque la respuesta es muy clara en N (disminución) y Na (aumento).

Tabla 4.6. Contenido en N, P, K, Na, Ca y Mg en porcentaje de peso seco de raíz en dos cultivares de *Cicer arietinum*, al inicio de floración, con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

Cultivar	NaCl	N	P	K	Na	Ca	Mg
Pedrosillano	0	1.57	0.61	8.24	0.11	0.46	0.75
	50	1.49	0.48	6.81	1.87	0.38	0.98
	75	1.20	0.53	6.80	2.52	0.32	0.85
	100	1.25	0.42	7.05	2.58	0.23	0.80
ILC1919	0	2.61	0.66	9.94	0.37	0.56	1.14
	50	1.73	0.60	7.82	0.81	0.62	1.31
	75	1.01	0.56	6.78	0.86	0.49	1.02
	100	1.20	0.47	6.86	0.98	0.32	0.98
MDS (0.05)		0.70	0.09	1.69	0.28	0.08	0.08



Resultados

Coincidiendo con lo descrito en la parte aérea, el cultivar ILC1919 presenta un mayor contenido de N en raíz que Pedrosillano en las plantas control. Con 50 mM se observa un fuerte descenso, pero el porcentaje sigue siendo algo superior al de PS. Con 75 y 100 mM los valores son semejantes en ambos cultivares. En la tabla 4. se aprecia que el porcentaje de nitrógeno radical se correlaciona positivamente con el contenido de Ca en raíz y con la actividad nitrogenasa (ARA y ARAP).

La concentración de P radical en las plantas control de ILC1919 es del orden de un 30% superior al de la parte aérea, a tenor de los datos obtenidos, siendo la diferencia en Pedrosillano aun mayor. El tratamiento con NaCl afectó negativa y significativamente a la concentración de P en raíz, mientras en parte aérea no se observan variaciones drásticas. Al realizar el estudio comparativo se evidencia que, en general, ILC1919 presenta mayor concentración de P radical que Pedrosillano, diferencia que se aprecia también en el contenido total (mg/g PS; Tab. 4.8). El % de P en raíz se correlaciona con el % de K radical (Tab. 4.9).

Tabla 4.7. Contenido en N, P, K, Na, Ca y Mg, en mg planta⁻¹, de raíz en dos cultivares de *Cicer arietinum*, al inicio de floración, con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

Cultivar	NaCl	N	P	K	Na	Ca	Mg
Pedrosillano	0	1.20	2.01	27.19	0.36	1.52	2.48
	50	5.95	1.34	19.07	5.24	1.06	2.74
	75	3.00	1.33	17.00	6.25	0.80	2.13
	100	1.20	0.88	14.81	5.42	0.48	1.68
ILC1919	0	9.92	2.51	37.77	1.41	2.36	4.33
	50	6.94	2.41	31.28	3.22	2.47	5.24
	75	3.74	2.07	25.09	7.33	1.81	3.77
	100	3.23	1.27	18.52	5.02	0.86	2.65
MDS (0.05)		2.75	0.35	6.43	1.05	0.33	0.31

Como ya se ha comentado, en general, el K se acumula más en raíz que en parte aérea, con diferencias superiores al 100% en las plantas control y con 50 mM. Con las dosis más altas (75 y 100 mM) las diferencias no son tan notables, pues el NaCl hizo disminuir la concentración de K en raíz en los dos cultivares, efecto que no se

Resultados

observó en parte aérea. ILC1919 mostró una concentración de K en raíz superior a Pedrosillano en el control y con 50 mM, mientras que con 75 y 100 los valores fueron parecidos. El K radical se correlaciona además de con el P (ya comentado) con el Mg radical.

En los dos cultivares de *Cicer arietinum* el contenido de Na en raíz es mayor que en parte aérea, pero Pedrosillano presenta una mayor concentración de Na que ILC1919 con todos los tratamientos, a excepción de las plantas control. La dosis de NaCl induce un aumento de este elemento en la raíz, siendo en Pedrosillano más notable desde la dosis menor (50 mM), llegando a casi multiplicarse por 20 en las plantas crecidas con 100 mM, mientras que en ILC1919 se multiplica por cinco. En la tabla 4. se comprueba que el contenido de Na en raíz se correlaciona negativa y significativamente ($P < 0.01$) con el peso seco de raíz y el peso total de planta. Cuando se estudia el contenido de este nutriente, expresado en mg/g peso seco (Tab. 4.), se pone en manifiesto que los niveles son parecidos en ambos cultivares

El contenido de Ca en raíz, disminuyó de forma notable con la sal, y este efecto fue más evidente en Pedrosillano. El estudio comparativo entre los dos cultivares indica que ILC1919 exhibe mayor contenido de Ca en raíz que Pedrosillano, tanto en el tratamiento control (18%) como en los salinos (30-40%). Estas diferencias no fueron tan evidentes en el contenido de Ca caulinar. Sin embargo, del estudio comparativo entre el contenido de Ca caulinar y radical se observa un desigual comportamiento entre ambos cultivares, ya que en Pedrosillano el calcio se acumula prioritariamente en la parte aérea de la planta, hecho que se evidencia en la tabla 4.; mientras que en ILC1919 no hay una marcada diferencia del contenido de dicho elemento entre los dos órganos. El calcio radical está correlacionado significativamente con diversos elementos ya comentados y también con los parámetros de crecimiento (PSR) de la fijación de nitrógeno (ARA y ARAP) y fotosintéticos (Rubisco) tal como se puede comprobar en la tabla 4.

Al igual como se ha descrito para el P, K y Na el contenido de magnesio es superior en raíz que en parte aérea. ILC1919 mostró concentraciones de Mg en raíz

Resultados

superiores a Pedrosillano. La concentración de Mg se incrementa con la sal respecto al control en Pedrosillano, si bien dicho incremento es menor con las dosis más altas. En cambio en ILC1919, el Mg solo incrementó con 50 mM, mientras que con 75 y 100 el porcentaje de Mg fue inferior al control. En todo caso, este elemento es el que menos disminuyó con la salinidad, con la excepción del Na.

5. Efecto del estrés salino en la simbiosis: aplicación al final del crecimiento vegetativo.

En este estudio se abordó el efecto de varias dosis de NaCl aplicado al final del periodo de crecimiento vegetativo sobre diversos procesos metabólicos de la simbiosis *Cicer arietinum-Mesorhizobium ciceri*. Se llevó a cabo el esquema de tratamiento descrito en el apartado de Material y Métodos, realizándose cuatro recogidas. En la primera y la segunda cosecha, a los 4 y 7 días de haber suministrado la sal al medio de cultivo, las plantas se encuentran en estado vegetativo; la tercera, a los 11 días después de la aplicación de la sal coincide con el inicio de la floración, y la cuarta recogida a los 14 días, se considera que las plantas se encuentran en plena floración. Con ello se sigue el efecto de la sal a lo largo de un periodo del desarrollo de la simbiosis que es clave para la eficacia de fijación de nitrógeno. Se ha realizado este estudio con el cultivar ILC1919 seleccionado sobre la base de su tolerancia al estrés salino aplicado desde la siembra (experimento 4). Como control se utilizaron plantas que crecen sin sal en la solución nutritiva.

5.1. Análisis del crecimiento.

Los parámetros de crecimiento determinados fueron: peso seco de raíz, parte aérea y planta completa, expresados en g planta^{-1} , cuya evolución a lo largo de las recogidas realizadas se exponen en la tabla 5.1 y gráficamente en la figura 5.1.

El peso seco de los órganos vegetativos se incrementa con el tiempo. El efecto de sal es más acusado en la parte aérea que en la raíz, así en el primero y segundo muestreo el peso seco de la parte aérea es inferior al control incluso con 50mM de NaCl. Sin embargo, tras un proceso de adaptación se logran los niveles del control, o incluso superiores. Se puede establecer que ILC1919 es una planta tolerante ya que el crecimiento no se afectó negativamente con 50 y 75 mM de NaCl y con 100 mM se observa una disminución en el crecimiento de la planta que puede representar en torno al 20% respecto al control. La aplicación de sal apenas tuvo efecto sobre el crecimiento y la variabilidad observada se debió fundamentalmente a los días de tratamiento (85%),

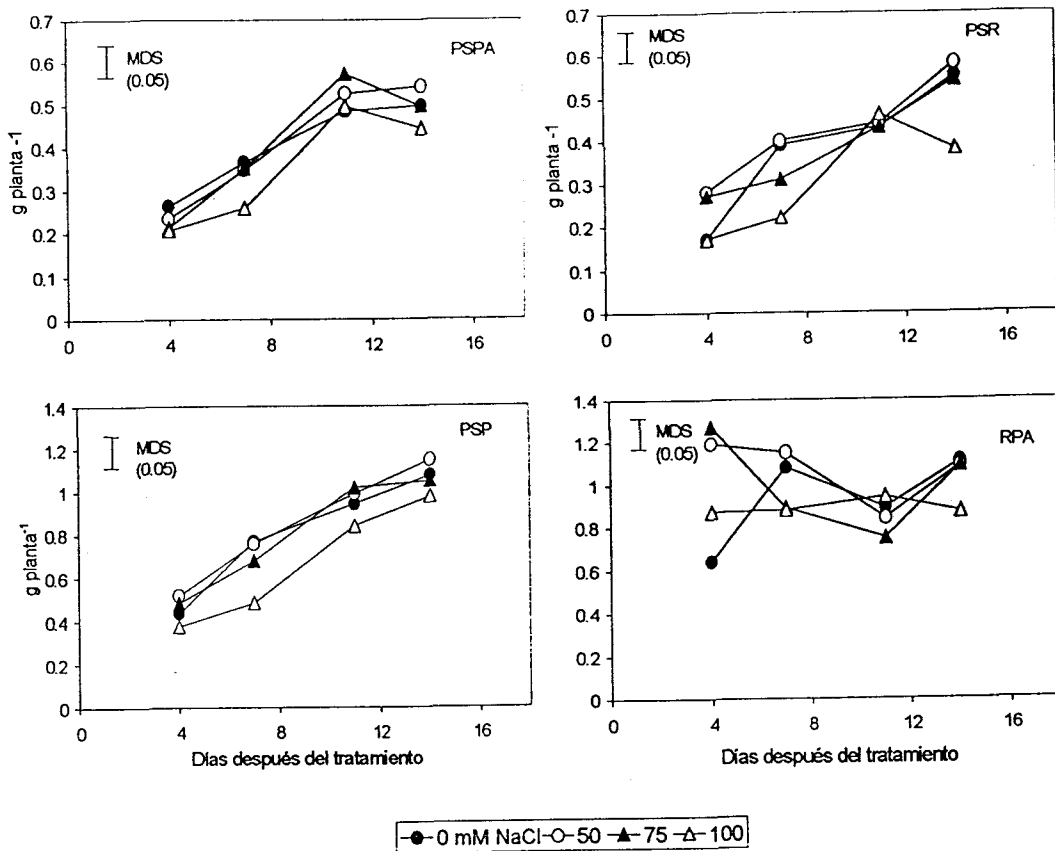


Figura. 5.1. Peso seco parte aérea (PSPA), raíz (PSR) y total por planta (PSP), expresado en g planta^{-1} , relación raíz/parte aérea, en plantas de *Cicer arietinum* cultivar ILC1919 inoculadas con *Mesorhizobium ciceri*, a lo largo de 4 cosechas y tratadas con cuatro dosis de NaCl.

es decir a la edad de la planta. También se evidencia en la tabla de correlaciones (Tab. 5.8) que no existe ninguna correlación con el NaCl y sí entre los parámetros de crecimiento estudiados.

La relación raíz/parte aérea se incrementa en la segunda recogida con 0 y 50 mM de NaCl, disminuye en la siguiente y vuelve a aumentar en la última. Las plantas con 100 mM de NaCl presenta una relación R/PA constante a lo largo del tiempo de experimentación y sólo se observa un ligero incremento en el último muestreo. La relación R/PA con 50 mM indica que en general son las que desarrollan mayor masa radical, mientras que con 75 mM presentan variaciones según el día de cultivo.

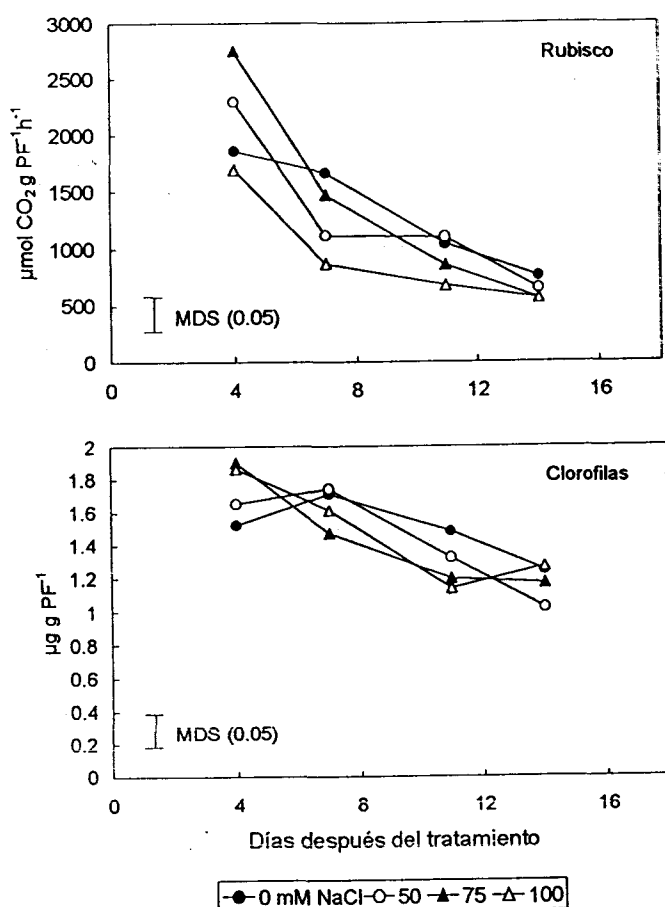


Figura 5.2. Actividad rubisco, en $\mu\text{mol CO}_2 \text{ (g PF)}^{-1}$ y contenido en clorofila, en $\mu\text{g (g PF)}^{-1}$, en hojas de *Cicer arietinum* cultivar ILC1919, inoculadas con *Mesorhizobium ciceri*, a lo largo de 4 cosechas y tratadas con cuatro dosis de NaCl.

5.2. Procesos estudiados en hojas.

5.2.1. Fotosíntesis.

La actividad ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa (Fig. 5.2) decae con el desarrollo de la planta, con reducciones durante el tiempo del experimento que oscilan entre el 60% de las plantas control hasta el 70-80% de las tratadas con NaCl dependiendo de la dosis. A los cuatro días después de la adición de la sal al medio de cultivo, esta actividad enzimática se estimuló con 50 y 75 mM de NaCl, un 48 y 23%

respectivamente, sin embargo, la dosis más alta de sal (100 mM) inhibe drásticamente la actividad Rubisco desde la primera recogida en la que solo se observa un 8% de reducción respecto al testigo y que llegó al 25% en la última recogida, se puede decir que la reducción fue más pronunciada con esta dosis sobre todo en las tres últimas cosechas. Toda la variabilidad apreciada en el estudio estadístico puede asignarse a la edad de las plantas.

La evolución del contenido en clorofilas es bastante similar a la observada para la actividad Rubisco; se observa un incremento respecto al control en las tres dosis de sal ensayadas, en la primera cosecha, que se mantiene solo con 50 mM de NaCl al igual que en el testigo para disminuir gradualmente. Las diferencias detectadas entre tratamientos no son muy significativas, y por tanto toda la variabilidad observada se debió fundamentalmente al día de cultivo.

La correlación entre actividad Rubisco y contenido en clorofilas es muy elevada ($P \leq 0.01$ $r=0.785$) así como la que exhiben estos parámetros fotosintéticos con los de crecimiento expuestos en la figura 5.1 (Tab. 5.8).

5.2.2. Actividades enzimáticas.

Los cambios de las actividades PEPC y MDH ambas expresadas en $\mu\text{mol NADH}_{\text{ox}} \text{ g PF}^{-1} \text{ h}^{-1}$, se han representado gráficamente en la figura 5.3. El máximo de la actividad se detecta en la primera recogida, cuatro días después de adicionar la sal al medio de cultivo. Ese día se alcanzan actividades en los tratamientos con sal (50, 75 y 100 mM) un 36, 19 y 13% respectivamente superiores al tratamiento control, produciéndose el máximo de actividades en las plantas tratadas con 50 mM de NaCl. En todos los tratamientos con exposición al NaCl se produce una disminución de la actividad con el tiempo que las plantas están expuestas a la aplicación de NaCl, esta disminución es bastante semejante al tratamiento sin sal, del 50% en el control y del 40-45% en los tratamientos con sal.

La alta correlación existente entre la actividad PEPC y MDH ($r = 0.92$ $P \leq 0.001$) favorece que la evolución de la MDH sea semejante a la anteriormente

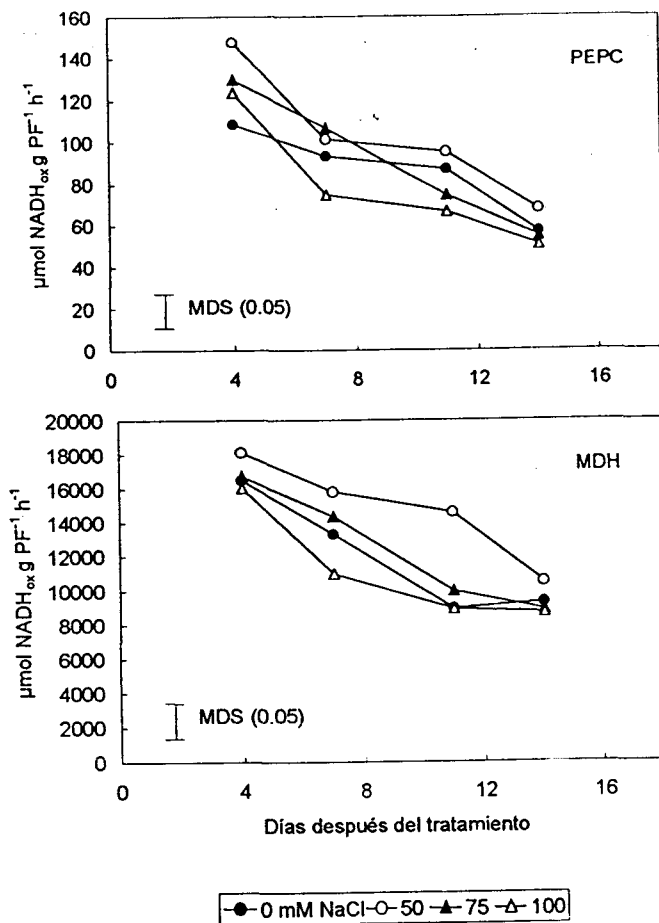


Figura 5.3. Actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa y malato deshidrogenasa, en $\mu\text{mol NADH}_{\text{ox}} (\text{g PF})^{-1} \text{h}^{-1}$, en hojas de *Cicer arietinum* cultivar ILC1919, inoculadas con *Mesorhizobium ciceri*, a lo largo de 4 cosechas y tratadas con cuatro dosis de NaCl.

descrita. Sin embargo, aun cuando con 50 y 75 mM se obtienen incrementos de actividad respecto al control prácticamente en todas los muestreos realizados, hay algunos matices que señalar: a) La caída de actividad en el tiempo no es tan drástica en el tratamiento control (3%) ni en las tratadas con NaCl (18, 1 y 7%) como lo descrito para la PEPC. b) Las variaciones existentes entre las actividades, detectadas a los 4 días de adición de la sal indican, que el control alcanza la máxima actividad mientras que

con 50 mM de NaCl se reduce un 20% y con 75 y 100 mM alrededor del 45%. El análisis de la varianza de estas dos enzimas señala que toda la variabilidad apreciada puede asignarse a la edad del cultivo (80%) además merece la pena señalar que ambas enzimas presentan una correlación significativa y negativa con los parámetros de crecimiento y positiva con los de fotosíntesis determinados (Tab. 5.8).

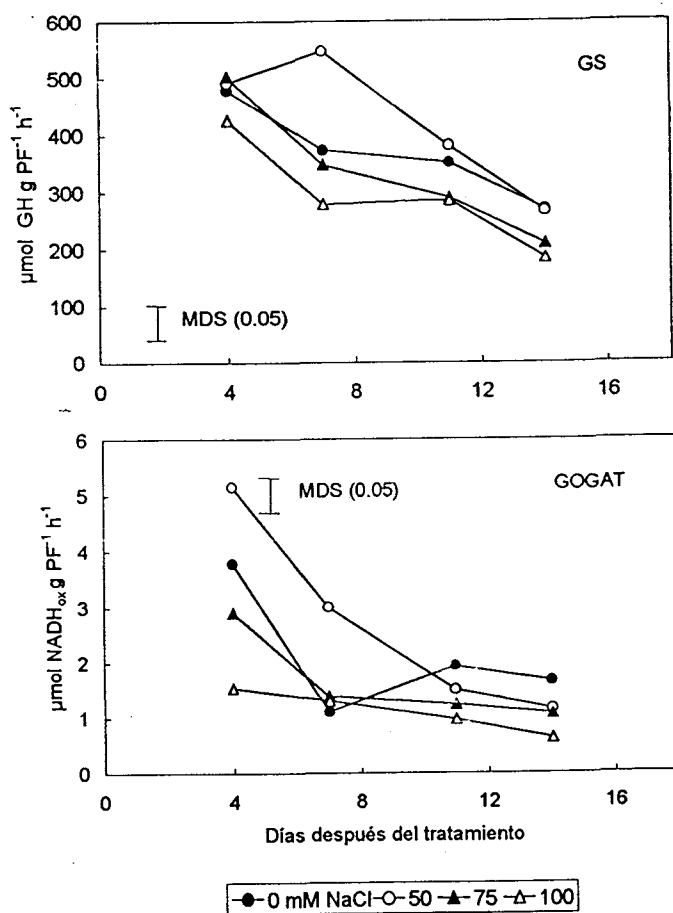


Figura 5.4. Actividad glutamina sintetasa, en $\mu\text{mol } \gamma\text{GH (g PF)}^{-1} \text{ h}^{-1}$, y glutamato sintasa, en $\mu\text{mol NADH}_{\text{ox}} \text{(g PF)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en hojas de *Cicer arietinum* cultivar ILC1919, inoculadas con *Mesorhizobium ciceri*, a lo largo de 4 cosechas y tratadas con cuatro dosis de NaCl

La actividad de los enzimas involucradas en la asimilación de amonio del ciclo de la glutamina sintasa GS/GOGAT disminuyó desde la adición de NaCl al medio de cultivo. La evolución de esta disminución en el tiempo, que fue en la actividad GS del

10% en el control y del 20-30% en los tratamiento con sal, se hizo más patente e intensa en la actividad GOGAT ya que se detectaron reducciones del orden del 60% tanto en el control como en la mayoría de los tratamientos.

La actividad GS en hojas es 5 veces mayor que en nódulos y con 50 y 75 mM de NaCl se observa un incremento que se perpetua con 50 mM hasta la tercera cosecha. Con 75 y 100 mM esta actividad no sólo decae en el tiempo de cultivo sino que siempre se obtuvieron valores inferiores a los obtenidos en las plantas testigo. Tal como se indicó para la actividad PEPC y MDH, la actividad GS presenta una correlación significativa y negativa con los parámetros de crecimiento y positiva con los de fotosíntesis. Evidentemente las enzimas del ciclo de la glutamato sintasa presentan una correlación muy significativa ($P \leq 0.001$) con las estudiadas del metabolismo carbonado (PEPC/MDH) tal como se muestra en la tabla 5.8.

Al estudiar los niveles de actividad GOGAT se observa un comportamiento similar al descrito para la GS, intensificando el efecto de 50 mM, siendo esta la dosis de sal que incrementa esta actividad en las dos primeras cosechas efectuadas, mientras que 75 y 100 mM inducen niveles de actividad inferiores al testigo. El nivel de actividad glutamato sintasa NADH dependiente (Fig. 5.4) fue varias veces inferior al detectado para la glutamina sintasa. Este hecho también se pone de manifiesto cuando se estudian estas enzimas en nódulos (Fig. 5.4) y en la tabla 5.3 cuando ambas enzimas se expresan por mg de proteínas. En esta tabla se observa que la evolución de la actividad NADH-GOGAT en el tiempo y con las distintas dosis de sal es semejante a la ya descrita. Aunque el efecto de las dosis de sal sobre la evolución de esta actividad enzimática en este periodo del ciclo de vida de la leguminosa es estadísticamente significativo, la magnitud de estas variaciones es menor si las comparamos con la variabilidad existente con los días de tratamiento.

5.2.3. Contenido de metabolitos.

En el extracto vegetal de la hoja se ha llevado a cabo la determinación del contenido en aminoácidos de prolina y de azúcares solubles totales, que expresados en

Resultados

$\mu\text{g (g PF)}^{-1}$ los dos primeros y en mg (g PF)^{-1} el último de ellos, se recogen en la figura 5.5.

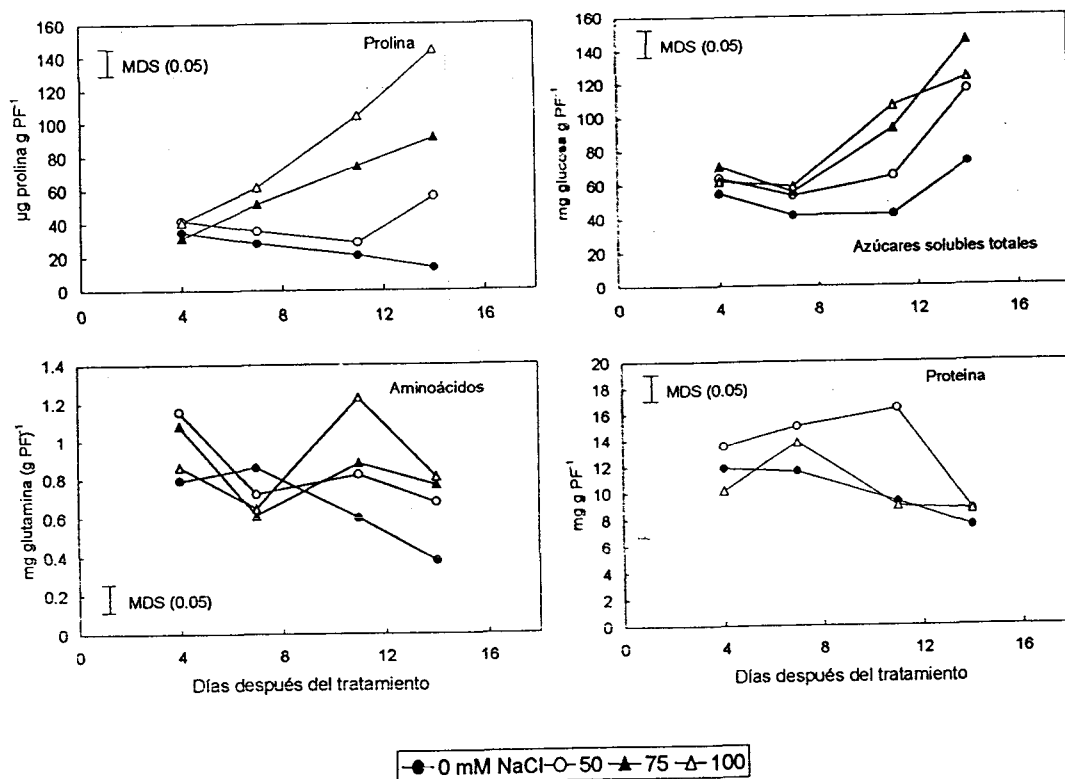


Figura 5.5. Contenido de prolina, aminoácidos, azúcares solubles y proteína en hojas de *Cicer arietinum* cultivar ILC1919, inoculadas con *Mesorhizobium ciceri*, a lo largo de 4 cosechas y tratadas con cuatro dosis de NaCl

El contenido de azúcares totales solubles se incrementa con el tratamiento de sal. Respecto al testigo se detectan incrementos que oscilan entre el 12 y el 30% según la dosis de NaCl a los cuatro días de la aplicación del tratamiento (primera recogida). A medida que transcurre el tiempo de cultivo se observa que estos solutos se acumulan más en hojas. Este hecho se comprueba por la curva ascendente que se visualiza en todos los tratamientos, registrándose los máximos valores con 75 y 100 mM, sobre todo en los últimos muestreos a los 11 y 14 días del tratamiento. En la tabla 5.8 se descubre que el contenido de azúcares solubles mantiene una correlación positiva

($P \leq 0,05$) con los parámetros de crecimiento y altamente significativa pero negativa ($P \leq 0,01$) con los parámetros fotosintéticos y las actividades enzimáticas determinadas en hojas.

Un efecto diferente se observa al observar la evolución del contenido de aminoácido en hojas, ya que disminuye en el tiempo en las plantas control a niveles del 50% a los catorce días de la aplicación del NaCl. Sin embargo, se constata que las plantas tratadas con sal a los cuatro días de tratamiento presentan un incremento del 46, 37 y 10% de aminoácido libre respecto al control (0 mM NaCl) con 50, 75 y 100 mM de NaCl respectivamente que también ira disminuyendo durante el desarrollo del cultivo, sin que se observe, una disminución tan drástica como la descrita en el control. Incluso con 75 y 100 mM, en las últimas tomas de muestras se observa un aumento y/o recuperación del contenido en aminoácidos libres. La magnitud de estos cambios se debe a la interacción edad de cultivo con el tratamiento, aún cuando todas las fuentes de variación son estadísticamente significativas.

En las plantas control el contenido de prolina disminuye significativamente con el tiempo (Fig. 5.5), detectándose que en la última recogida la acumulación de la prolina es el 62% de la existente diez días antes. La sal provoca la acumulación de este metabolito en hoja ya a los cuatro días de la adición de la sal (primer muestreo). Se detecta que los tratamientos con 50 y 100 mM de NaCl contienen un 20% más de prolina que el control. La evolución en el tiempo de los tratamientos con sal es distinta al control, puesto que se induce una acumulación que se manifiesta desde el segundo muestreo y que continua en el tercero y cuarto. Obviamente esto se constata más intensamente en las plantas con 75 y 100 mM de NaCl, que logran algo más que triplicar el contenido de prolina que se las detecta a los cuatro días de la aplicación de la sal.

5.3. Procesos estudiados en nódulos.

5.3.1. Fijación de nitrógeno.

El proceso de fijación de nitrógeno está representado por diferentes parámetros: peso seco de nódulos, expresado en g planta⁻¹, peso normalizado de nódulos en mg por g⁻¹ PSPA, actividad nitrogenasa específica evaluada mediante el test de la reducción del acetileno expresado en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ PS h}^{-1}$, y total por planta en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ planta}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Tabla 5.4). Algunos de estos datos se representan gráficamente en la figura 5.6 para observar mejor la evolución de estos parámetros en el tiempo de cultivo experimentado.

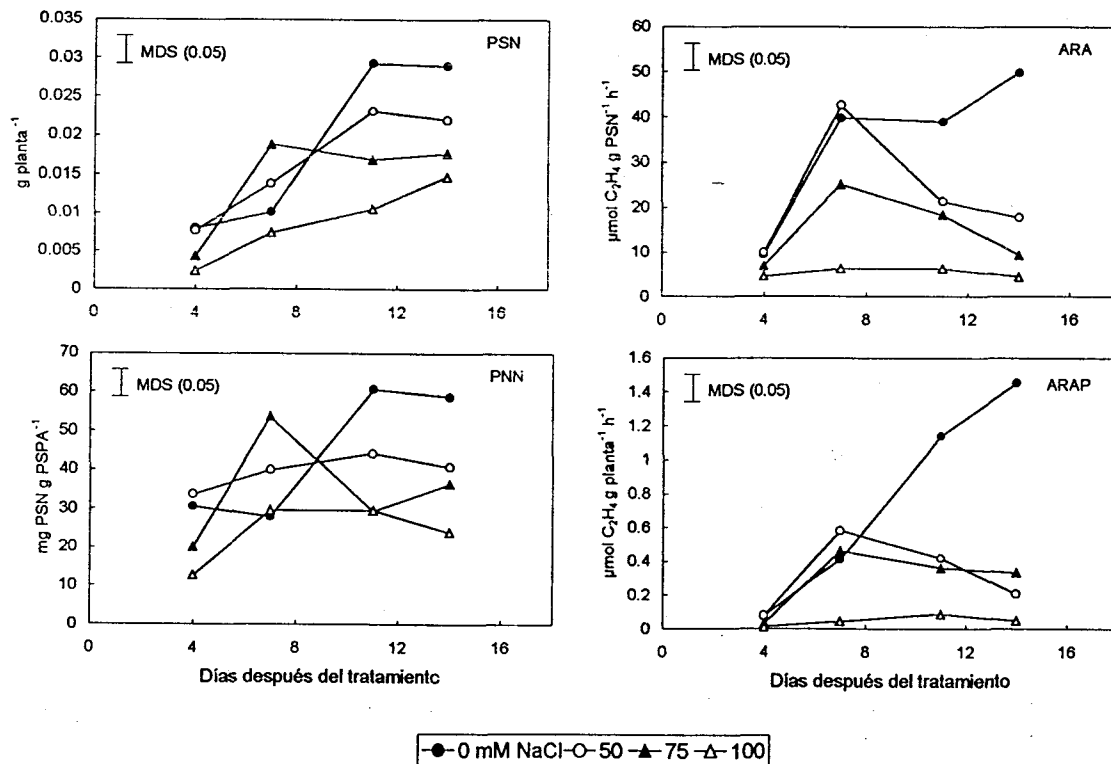


Figura 5.6. Peso seco de nódulos (PSN) en g planta⁻¹, peso normalizado de nódulos (PNN) en mg (g PSPA), actividad reductora de acetileno específica (ARA), en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ (g PS)}^{-1} \text{ h}^{-1}$, y ARA por planta, en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ planta}^{-1} \text{ h}^{-1}$, en *Cicer arietinum* cultivar ILC1919, inoculadas con *Mesorhizobium ciceri*, a lo largo de 4 cosechas y tratadas con cuatro dosis de NaCl.

Los nódulos empezaron a ser visibles a los 15 días después de la inoculación. Cuando se realizó el primer muestreo, a los 4 días después de suministrar el tratamiento, cuando las plantas tenían 21 días de cultivo se observó que los nódulos eran rosados, redondos y situados en la raíz principal.

Los datos (Fig. 5.6) indican que un efecto rápido de estrés salino induce una disminución en el peso seco que puede llegar a ser de 70% con 100 mM de NaCl pero que no es significativo con 50 mM NaCl. El avance del desarrollo de la planta produce el aumento del peso seco de nódulos que resulta ser superior al control a los 7 días después del tratamiento con 50 y 75 mM. Al final del experimento, los datos que se obtienen indican que la dosis 50 mM produce una reducción del 25% en el PSN, la de 75 mM el 40% y la más alta el 65% sobre el testigo. La amplitud de los cambios observados en el peso seco de nódulos se debe en un 60% a los días de cultivo, en un 20% al tratamiento y en un 15% a la interacción tratamientos X tiempo.

Este parámetro (PSN) se correlaciona positiva y significativamente (tabla 5.8) con los de crecimiento, con el ARA y ARAP y con determinados metabolitos que se acumulan en el nódulo con la sal (tabla 5.7 y fig. 5.10) y negativamente pero también significativamente con la PEPC y MDH nodular (Fig. 5.3) y los parámetros fotosintéticos (Fig. 5.2).

El peso normalizado de los nódulos aumenta y alcanza el máximo a los 11 días del tratamiento en el control y con 50 mM de sal y a los 7 días con 75 y 100 mM de NaCl. Este máximo es muy variable oscila entre 60 (en el control) y 30 mg (g PSN)⁻¹ de los nódulos tratados con 100 mM de la sal sódica. La disminución que se produce se refleja en los valores que son proporcionales a la dosis de sal.

La evolución de la nitrogenasa (ARA) (Fig. 5.6) indica que esta actividad fue inhibida por la sal y esta inhibición se observa desde la primera recogida (4 días después de la adición de la sal) con 75 y 100 mM. Con 50 mM este efecto se observó desde la tercera recogida (11 días después). A los 4 días de suministrar la sal, las plantas acusan el efecto negativo del medio salino inhibiendo el flujo total de electrones a través de la nitrogenasa en un 25% con 75 mM y un 50% con 100 mM de NaCl. Es interesante

señalar que la dosis de 50 mM condiciona una tolerancia a la sal ya que no se afectó significativamente ni la nodulación ni la ARA, al menos durante un periodo del crecimiento. El comportamiento que se describe para el ARAP es bastante semejante al ya comentado, no en vano existe una buena correlación ($P \leq 0.001$ $r = 0.874$) entre ambos parámetros, tal como se refleja en la tabla 5.8 de esta memoria. Además estas dos actividades ARA y ARAP se encuentran correlaciones positivas y significativas con las enzimas estudiadas en el nódulo como PEPC, MDH, GS, GOGAT, entre otras (tabla 5.8).

5.3.2. Actividades enzimáticas.

Se han determinado diversas actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo carbonado: la sacarosa sintasa, invertasa alcalina y alcohol deshidrogenasa cuya representación gráfica se expresa en la figura 5.7, la fosfoenolpiruvato descarboxilasa y malato deshidrogenasa (Fig. 5.8) y enzimas de la asimilación de amonio del ciclo de la glutamato sintasa en la figura 5.9. Los valores numéricos expresados en $\mu\text{mol gr PF}^{-1} \text{ h}^{-1}$ se exponen en la tabla 5.5 y cuando son referidos al contenido de proteínas se expresan en $\mu\text{mol por mg proteína}^{-1} \text{ min}^{-1}$ en la tabla 5.6. En todas ellas se añade los MDS a $P < 0.05$.

Las enzimas del metabolismo del carbono nodular exhiben una tendencia generalizada a disminuir durante el desarrollo del cultivo, encontrándose bastante tolerantes a la sal al menos con 50 mM. El comportamiento de la sacarosa sintasa induce a pensar en la existencia de un punto de inflexión a los 11 días de tratamiento separando el crecimiento vegetativo del reproductor. Este punto de inflexión es muy evidente en las plantas control y más suave en las tratadas con sal. Al inicio del experimento se obtienen valores muy semejantes al control en las plantas con 50 mM de NaCl y algo inferiores (entorno al 20%) en los otros tratamientos salinos. Sin embargo, en los muestreos realizados posteriormente la actividad sacarosa sintasa (SS) es mayor en las plantas tratadas con sal, independientemente de la dosis.

Otra enzima ensayada de la hidrólisis de la sacarosa en el nódulo es la invertasa

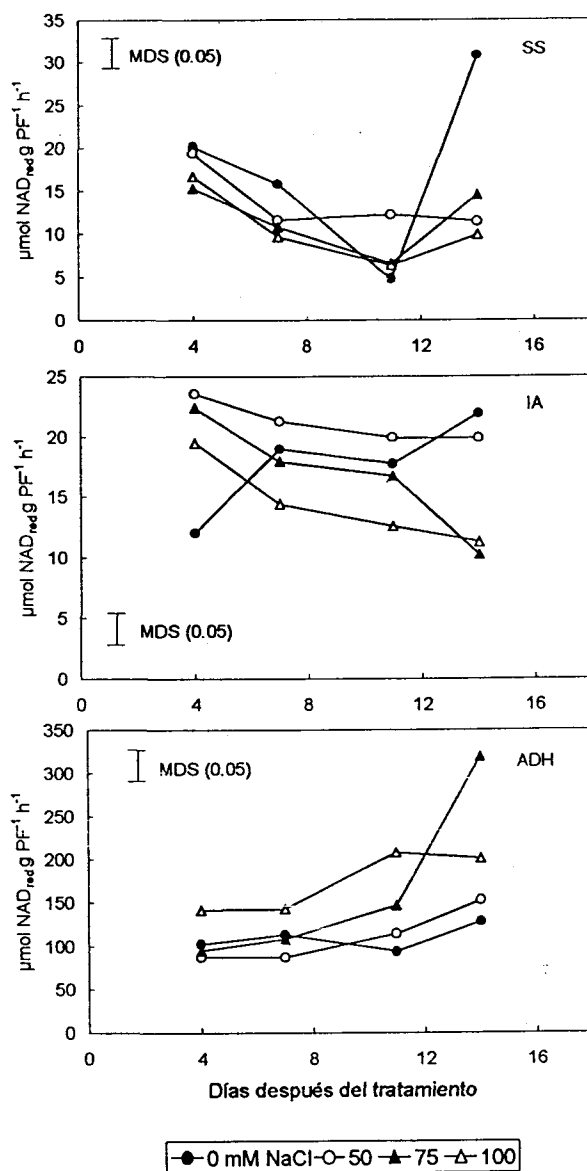


Figura 5.7. Actividad sacarosa sintasa (SS), invertasa alcalina (IA) y alcohol deshidrogenasa, en $\mu\text{mol NAD}_{\text{red}} (\text{g PF})^{-1} \text{h}^{-1}$, en citosol nodular de *Cicer arietinum* cultivar ILC1919, inoculado con *Mesorhizobium ciceri*, a lo largo de 4 cosechas, tratado con cuatro dosis de NaCl.

alcalina (IA), que expresa una actividad mayor que la sacarosa sintasa al menos en condiciones de salinidad. El estrés salino moderado afecta poco a esta actividad,

incluso se detecta que a los 4 días de aplicación de la sal hay tratamientos que duplican el valor que obtienen las plantas control y es por ello que los niveles de salinidad que se obtienen durante el experimento se mantienen en los límites que marca el control, aun con una tendencia distinta existente entre los distintos tratamientos. Las plantas control exhiben una actividad invertasa alcalina que aumenta significativamente con el desarrollo del cultivo, mientras que las plantas con 75 y 100 mM se comportan de forma opuesta, comportándose las plantas con 50 mM de forma intermedia ya que la actividad invertasa se mantienen durante el experimento después de observarse una reducción en la segunda recogida.

Al estudiar las correlaciones que presentan las dos enzimas de la hidrólisis de la sacarosa se detecta que no hay correlación entre ellas y que la invertasa alcalina exhibe una interesante correlación con la actividad Rubisco y con algún parámetro de crecimiento, entre otras correlaciones detectadas (Tab. 5.8).

Otra enzima relacionada con el metabolismo carbonado determinada ha sido la alcohol deshidrogenasa, una enzima que es muy activa en medios salinos. En las plantas control se detecta un punto de inflexión a los 11 días de tratamiento tal como se indicó para la sacarosa sintasa. Curiosamente es una enzima cuya actividad no se estimulo con la sal a los 4 días de la adición al medio, excepto cuando la dosis de sal fue elevada (100 mM), sino que se va activando durante el crecimiento del cultivo, en respuesta a un periodo de adaptación, de hecho en la segunda recogida las plantas con 50 y 75 mM de NaCl obtuvieron niveles de actividad menores que el testigo. Sin embargo, en la tercera cosecha con 100 mM y la cuarta con 75 mM la actividad alcohol deshidrogenasa en plantas con sal llegó a ser algo más del doble. Este efecto positivo de la sal en ésta actividad enzimática influye en que muchas de las correlaciones obtenidas de esta enzima sean significativas pero de carácter negativo. Así, presenta correlación negativa con los parámetros de fotosíntesis, con la IA nodular y con el contenido de algunos metabolitos foliares y positiva con la actividad MDH nodular (Tab. 5.8).

La actividad específica de la PEPC y la MDH en los nódulos de las plantas

control incrementa con el tiempo de cultivo. A los cuatro días del tratamiento la actividad PEPC se ha incrementado correlativamente con la dosis de sal (10, 32 y 86% con 50, 75 y 100 mM de NaCl). Lo mismo ocurre con la actividad MDH, que aumenta el 20, 24 y 30% con las mismas dosis de sal. El máximo de actividad PEPC se obtiene en la cuarta recogida en las plantas control, en la tercera en las plantas con 50 mM, en la segunda con 75 mM y en la primera con 100 mM de sal. Los máximos de la actividad MDH siguen un comportamiento similar. Evidentemente a partir de la obtención del máximo se observa una caída de estas actividades que con 100 mM de NaCl es del 30% en la MDH y del 70% en la PEPC respecto al control y mucho más drástica en las plantas con dosis de sal intermedias.

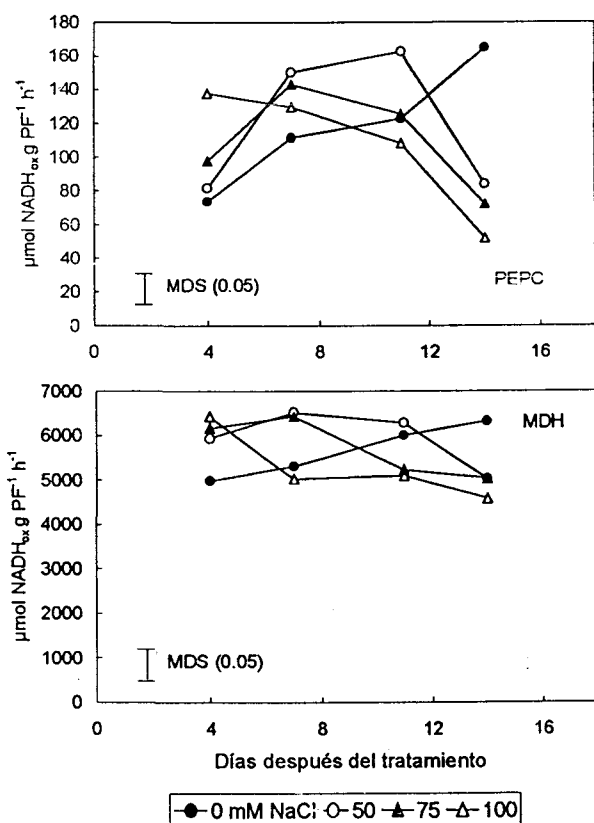


Figura 5.8. Actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y malato deshidrogenasa, en $\mu\text{mol NADH}_{\text{ox}} (\text{g PF})^{-1} \text{h}^{-1}$, en citosol nodular de *Cicer arietinum* cultivar ILC1919, inoculado con *Mesorhizobium ciceri*, a lo largo de 4 cosechas, tratado con cuatro dosis de NaCl.

En nódulos se detecta que el valor de la actividad MDH es 50 veces mayor que la PEPC aunque las variaciones inducidos por la sal fueron proporcionalmente más intensas en la actividad PEPC. Mientras los valores obtenidos para la PEPC nodular son de la misma magnitud que los obtenidos para la PEPC foliar (tabla 5.2 y/o fig. 5.3) los niveles de actividad MDH en hoja son tres veces las detectadas en extractos de nódulos.

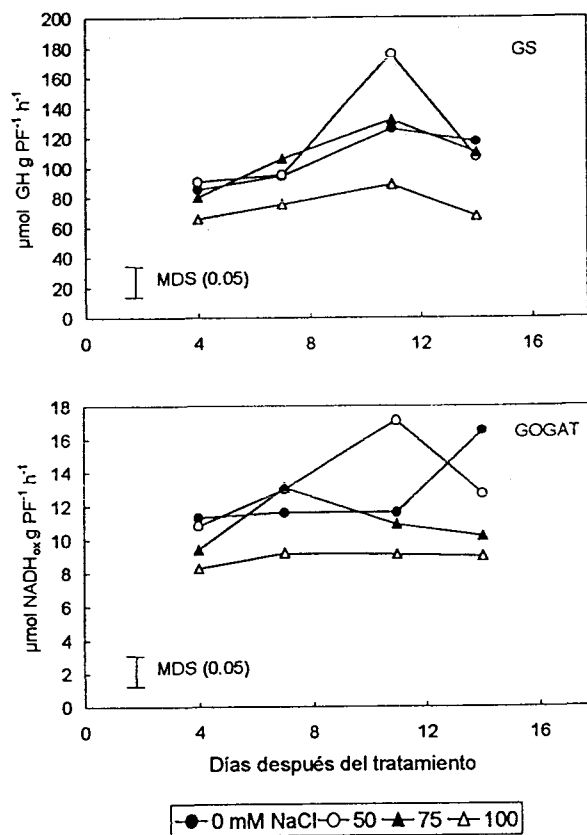


Figura 5.9. Actividad glutamina sintetasa (GS), en $\mu\text{mol } \gamma \text{ GH (g PF)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y glutamato sintasa (GOGAT), en $\mu\text{mol NAD}_{red} \text{ (g PF)}^{-1} \text{ h}^{-1}$, en citosol nodular de *Cicer arietinum* cultivar ILC1919, inoculado con *Mesorhizobium ciceri*, a lo largo de 4 cosechas, tratado con cuatro dosis de NaCl.

Las actividades glutamina sintetasa y glutamato sintasa tuvieron entre sí una correlación positiva alta y significativa ($r = 0,789$ $P \leq 0.001$ Tab. 5.8) y una proporcionalidad media de aproximadamente 9:1 GS/GOGAT (Fig. 5.9 y Tab. 5.5). La

actividad GS nodular se expresó con menor intensidad que la foliar (Fig. 5.3), manteniéndose además más tolerante a la sal al menos con 50 y 75 mM. El máximo de actividad GS nodular se produce a los 11 días después de la adición de la sal al medio de cultivo en todos los tratamientos, por tanto esta actividad incrementa con el desarrollo de la planta. Hay que destacar que los valores más altos se obtienen con 50 y 75 mM de NaCl. El estrés salino induce reducciones de actividad no significativas con 50 y 75 mM y del 12 % con 100 mM a los 4 días de aplicación de la sal y superiores (45 %) al final del experimento.

A diferencia de la GS, la actividad GOGAT-NADH dependiente nodular fue entre 3 y 4 veces más activa que la foliar y su tendencia fue de a aumentar durante el desarrollo del nódulo. El máximo se alcanza dependiendo del tratamiento de sal, así en el control es al final del experimento y la sal favorece el adelanto del mismo. Sin embargo, al igual como se ha descrito para la actividad GS, el estrés salino provoca disminuciones no significativas con 50 mM y del 17 y 25% con 75 y 100 mM de NaCl a los 4 días de su aplicación y superiores (40%) al final del experimento.

5.3.3. Contenido de metabolitos.

Se ha determinado el contenido de azúcares solubles, aminoácidos libres y prolina en distintos tiempos de cultivo en el citosol nodular. La evolución en el contenido de estos metabolitos se refleja en la figura 5.10. Además, se ha elaborado una tabla (Tab. 5.7) que refleja únicamente los datos obtenidos de estos metabolitos tanto en extractos de hojas (Fig. 5.5) y citosol nodular, encaminados a provocar el estudio comparativo. Por último, indicar que se ha adicionado a esta tabla los valores de proteína nodular y foliar obtenidos en cada tratamiento y muestreo realizado.

Los niveles de azúcares totales solubles en nódulos son muy inferiores a las detectadas en hojas (en hojas se alcanzan niveles de 4 a 5 veces más elevados que en nódulos). Las variaciones observadas indican: a) Que las plantas con sal acumulan a los cuatro días de la aplicación un 16% (50 mM), 24% (75 mM) y 60% (100 mM) más que el testigo. b) El tiempo de cultivo favorece esta acumulación llegando a duplicarse

Resultados

en la última recogida (0 y 50 mM) o a incrementarse en un 60% (75 y 100 mM). c) El tiempo de cultivo fue la fuente de variación que tuvo más efecto sobre el contenido de azúcares totales solubles, siendo responsable del 80% de la variabilidad observada. d) Existe una correlación positiva y muy significativa ($P \leq 0.001$) entre este parámetro y los del crecimiento determinados y con el contenido de aminoácidos nodulares y negativa con igual significación con los parámetros fotosintéticos y las actividades enzimáticas determinadas en hojas (Tab. 5.8).

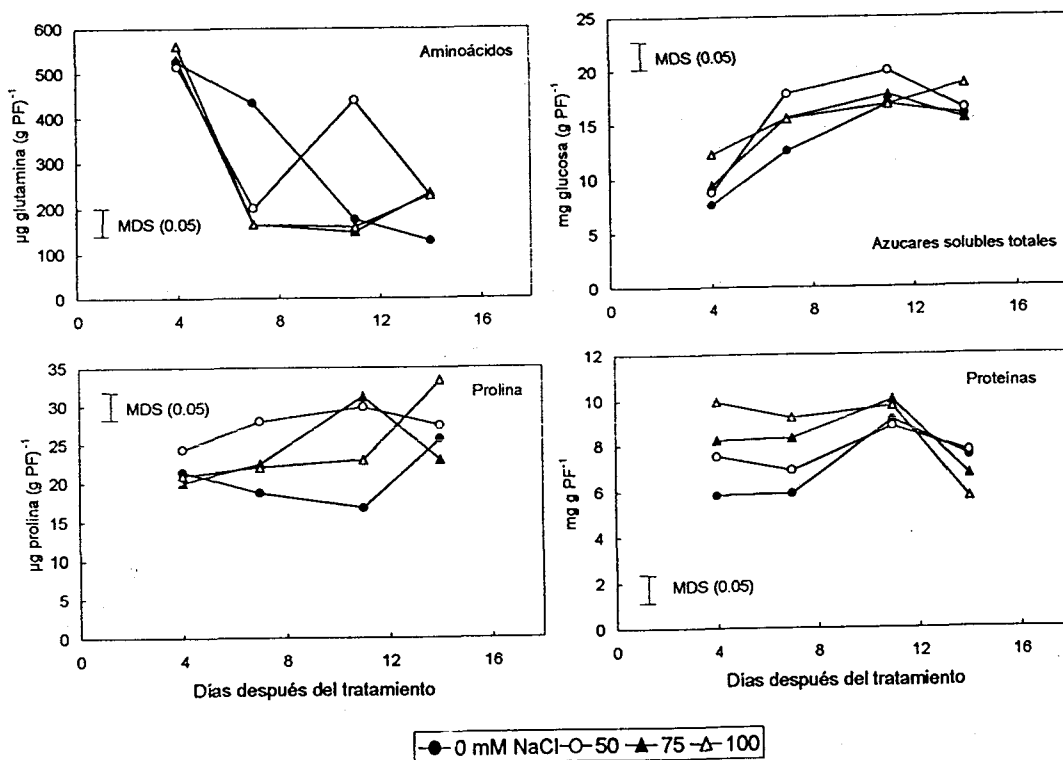


Figura 5.10. Contenido de aminoácidos en $\mu\text{g (g PF)}^{-1}$, prolina en $\mu\text{g (g PF)}^{-1}$, azúcares solubles totales en mg (g PF)^{-1} , y proteínas expresado en mg (g PF)^{-1} , en citosol nodular de *Cicer arietinum* cultivar ILC1919, inoculado con *Mesorhizobium ciceri*, a lo largo de 4 cosechas, tratado con cuatro dosis de NaCl.

El contenido de aminoácidos libres en nódulos disminuye con el tiempo de cultivo, este efecto también fue descrito en hoja (Fig. 5.5). La sal reduce drásticamente la concentración de aminoácidos libres en nódulos a los 7 días de tratamiento, esta

reducción fue del 60% con 50 mM y del 70% con 75 y 100 mM de NaCl. No obstante, con 50 mM se produjo un aumento en la tercera recogida que no se mantiene en la última. Al igual que lo descrito para los azúcares totales solubles, el contenido de aminoácidos en nódulos fue menor que en hojas, sin embargo, a los cuatro días de aplicación de la sal el contenido de aminoácidos en nódulos es prácticamente el mismo en todos los tratamientos, con variaciones no significativas, mientras en hojas se había provocado una mayor acumulación con la sal.

En las plantas control, el contenido de prolina disminuye hasta la recogida que se realiza el día 11 después de ser las plantas tratadas con sal; curiosamente, después ocurre un incremento que representa el 35 o el 20% según sea respecto a la prolina detectada en el muestreo anterior (3ª) o al realizado a los 4 días de tratamiento (1ª). Existe una fuerte acumulación de prolina nodular con el tratamiento de sal a lo largo del tiempo de cultivo, puesto que en el primer muestreo los niveles de prolina obtenidos son similares al de las plantas control. Sin embargo, el incremento con la sal no es proporcional a la dosis de NaCl ya que se obtienen incrementos superiores con 50 e incluso con 75 mM que con 100 mM; excepto en la última recogida.

De nuevo se detecta que en hojas la concentración de proteína es mayor que en nódulos (Tabla 5.7). No existe una relación clara entre salinidad y contenido de proteína ya que en hoja la sal induce una acumulación que fue especialmente significativa a los 7 y 11 días después de la adición de 50 mM, sin embargo, con 75 mM el contenido de prolina decae con el desarrollo al igual que en el control y con 100 mM hay un incremento significativo el día 7 después del suministro de sal y después disminuye. En nódulos, la evolución observada es bien distinta pues el contenido de proteína va aumentando con el crecimiento de la planta tanto en el control como en los tratamientos con sal aunque decae en la última recogida de forma drástica en los tratamientos con dosis de sal más elevadas. Estos aumentos de proteína nodular y en algunos extractos de hojas tratados con sal, en las primeras recogidas, pueden estar relacionados con el aumento de actividad que se detecta en algunas enzimas cuando se expresan en base a mg de proteína (Tab. 5.3 y 5.6), indicando que existe una

mayor inducción del enzima y no una mayor actividad enzimática.

5.4. Determinaciones analíticas: Contenido en macronutrientes.

La concentración de distintos nutrientes en parte aérea y raíz de la simbiosis *Cicer arietinum Mesorhizobium ciceri* tratada con distintos niveles de NaCl, expresados en porcentaje, se exponen en las tablas 5.8 y 5.9 respectivamente y expresada en mg de elementos por planta en las tablas 5.10 y 5.11. En general se detecta que hay una gran variabilidad de las respuestas obtenidas que comentamos a continuación.

El NaCl favoreció la acumulación de nitrógeno en parte aérea, evidenciándose que el porcentaje medio del contenido de este elemento en raíz es el 75% (Tab. 5.9) del detectado en parte aérea (Tab. 5.8). Se produce una disminución generalizada e independiente del tratamiento, en el tiempo de cultivo cuando se expresa en porcentaje. Sin embargo, cuando se expresa en mg por planta⁻¹ (Tab. 5.) se observa en el tiempo un incremento en el contenido de este elemento.

A los cuatro días de la adición de sal al medio de cultivo, se evidencia que el contenido de N en parte aérea (Tab. 5.) y en raíz (Tab. 5.) es bastante semejante en todos los tratamientos, aun cuando las diferencias detectadas son significativas (MDS=0,05), con variaciones que oscilan de 3,06 (100 mM) a 3,75 (50 mM). En el transcurso de la etapa vegetativa a la reproductora se detectan reducciones que se sitúan en torno al 30% en el tratamiento control y más intensas con sal, siendo del 70% con 100 mM. Sin embargo, en raíz no se observa esta drástica variación en el contenido de nitrógeno detectándose reducciones del 20% (control) y 25% (tratamiento con NaCl).

La positiva y alta correlación que se establece entre contenido de N en hoja y raíz condiciona que en ambos parámetros se detectan correlaciones, bastantes, semejantes como las existentes con los parámetros fotosintéticas (actividad Rubisco y contenido en pigmentos fotosintéticos) que es altamente significativa ($P < 0,001$) y con los parámetros de crecimiento (PSR, PSP y PSPA) entre otras correlaciones detectadas (Tab. 5.8).

Resultados

También es interesante señalar que en ambos parámetros toda la variación apreciada puede asignarse al efecto del tiempo de cultivo.

Tabla 5. Contenido en N, P y K, como porcentaje de peso seco en hoja y en raíz en *Cicer arietinum*, cultivar ILC1919, a lo largo de cuatro recogidas y tratados con cuatro dosis de NaCl. (DDT = días después del tratamiento).

DDT	Parte aérea				Raíz				
	NaCl (mM)				NaCl (mM)				
	0	50	75	100	0	50	75	100	
N					N				
4	3.35	3.75	3.18	3.06	2.19	2.08	2.19	2.37	
7	2.51	2.63	2.72	2.36	2.19	1.73	1.92	1.92	
11	2.43	2.14	2.07	1.93	2.00	1.80	1.61	1.73	
14	2.35	1.67	2.51	0.85	1.73	1.57	1.65	1.73	
MDS (0.05) 0.68					MDS (0.05)				
P					P				
4	0.46	0.43	0.50	0.49	0.65	0.76	0.59	0.65	
7	0.72	0.41	0.42	0.45	0.90	0.72	0.60	0.65	
11	0.40	0.35	0.39	0.42	0.84	0.61	0.67	0.66	
14	0.43	0.36	0.39	0.67	0.94	0.61	0.59	0.66	
MDS (0.05) 0.03					MDS (0.05)				
K					K				
4	5.82	5.26	4.90	4.49	7.61	8.63	6.17	8.49	
7	4.78	4.30	4.06	4.16	8.67	7.89	8.06	8.27	
11	4.33	3.78	3.66	4.08	8.33	7.83	7.50	7.22	
14	3.70	3.87	4.00	7.20	8.43	7.60	7.58	8.27	
MDS (0.05) 0.28					MDS (0.05)				

En cuanto al fósforo tuvo un comportamiento distinto al del nitrógeno, es decir que la sal favoreció la acumulación de fósforo en raíz y este se evidencia cuando el contenido de P se expresa en mg (planta)⁻¹ (Tab.). De hecho en hoja se detecta una media del 60% del contenido en P y es solo en raíz donde el tratamiento de sal fue la fuente de variación que tuvo un efecto mayoritario. En hoja ----- no se observan grandes variaciones significativas ni en tiempo de cultivo ni con la sal; los valores obtenidos oscilan entre 0,35 y 0,47, sin embargo en raíz, el contenido de fósforo

Resultados

aumenta con el tiempo de cultivo en el tratamiento control (30%) y disminuye un 20% con 50 mM de NaCl, se mantiene con 100 mM y con el tratamiento de sal intermedio (75 mM), también se mantiene aunque existe un ligero aumento difícil de explicar a los 11 días de aplicación de sal. Cuando este parámetro se expresa en mg (g planta)⁻¹ (Tab.), las diferencias en hoja y raíz comentados no se detectan pues el contenido de fósforo en general se duplica en el tiempo de cultivo independientemente del órgano estudiado y del tratamiento. Hay correlaciones interesantes que señalar, la inducida entre el contenido de P en hoja (%) con otros nutrientes como el K y Mg y del P en raíz (%) con el K, Na y Ca de raíz y el ARA ($r=0.74$; $P<0.001$).

Tabla 5 Contenido en Na, Ca y Mg, como porcentaje de peso seco en hoja y en raíz en *Cicer arietinum*, cultivar ILC1919, a lo largo de cuatro recogidas y tratados con cuatro dosis de NaCl. (DDT = días después de tratamiento).

DDT	Parte aérea				Raíz			
	NaCl (mM)				NaCl (mM)			
	0	50	75	100	0	50	75	100
	Na				Na			
4	0.11	0.41	0.59	0.55	0.15	1.27	1.62	1.79
7	0.24	0.40	2.16	0.83	0.17	1.05	1.59	2.17
11	0.19	0.55	0.73	0.85	0.13	0.91	2.19	2.36
14	0.07	0.40	0.67	0.72	0.14	0.98	2.12	2.46
	MDS (0.05) 0.48				MDS(0.05)			
	Ca				Ca			
4	0.71	0.67	0.65	0.68	0.98	1.83	1.24	0.73
7	0.84	0.69	0.70	0.68	2.52	2.64	1.46	0.97
11	0.92	0.71	0.64	0.59	2.56	2.39	1.83	1.79
14	1.02	0.72	0.65	0.38	3.32	2.67	2.25	1.72
	MDS (0.05) 0.21				MDS(0.05)			
	Mg				Mg			
4	0.66	1.80	0.85	0.64	2.49	5.65	4.28	2.62
7	0.60	0.58	0.63	0.60	6.27	6.19	4.67	3.32
11	0.63	0.60	0.57	0.58	6.01	6.36	6.36	6.03
14	0.60	0.64	0.60	2.09	7.16	9.83	13.19	6.22
	MDS (0.05) 0.28				MDS (0.05)			

El contenido de potasio en parte aérea disminuye a lo largo del tiempo de cultivo tanto en plantas control como con tratamientos de sal, excepto con 100 mM en el que se aprecia un incremento. Esta disminución que fue del 36% en el control se situó entre el 20-27% en presencia de 50 y 75 mM de NaCl. Se puede afirmar que el contenido de K en parte aérea es mucho menor, algo más de la mitad, que en raíz (Tab.). En raíz, la tendencia de este parámetro fue distinta: A los cuatro días de aplicación de sal en las plantas tratadas hay un 12% más de K que en el control, este incremento se mantiene en el tiempo obteniéndose un máximo a los 7 días de aplicación de la sal en todos los tratamientos, llegando al final del experimento con ligeros descensos que en general no son muy significativos.

El aumento del nivel de sodio por la sal respecto al control ya a los 4 días de su adición fue más espectacular en raíz, entre 9 y 12 veces más según la dosis de sal, que en parte aérea (4-5 veces). Esta respuesta se mantiene durante el tiempo de experimentación, manteniéndose una relación generalizada de 3:1 (raíz/parte aérea) durante este tiempo y con los tratamientos de sal. El contenido de Na en el control no varió significativamente tanto en raíz como en parte aérea en el tiempo, sin embargo en los tratamientos de sal se produjo un aumento máximo del 30% en parte aérea y del 37 % en raíz de las cuatro plantas con 100 mM. El contenido de Na (%) en parte aérea se correlaciona negativa y significativamente con el contenido de P y Ca (%) en raíz, y el del raíz, se correlaciona positivamente con el de parte aérea, también negativamente con estos mismos elementos y con la actividad ARA ($r = -0.71$; $P < 0.001$). Cuando el contenido de Na se expresa en mg por (g planta)⁻¹ (Tab.) se intensifican los efectos descritos como la acumulación de Na en raíz respecto a parte aérea y en el tiempo de experimentación.

Al estudiar el contenido de Ca en hoja se comprueba la poca variabilidad en el tiempo y con la salinidad. Solo el tratamiento control exhibe un incremento en el tiempo que llega a ser del 44% en la última recogida realizada, mientras que la sal impide esta tendencia y el contenido de Na en hoja se mantiene sin variaciones significativas. En raíz, se generaliza las observaciones anteriores incluso en las plantas

Resultados

control, aunque en los datos encontrados se aprecia una disminución del contenido de Ca provocado con 75 y 100 mM de NaCl desde la aplicación del tratamiento salino y la lo largo del tiempo que es significativa (MDS = 0.05), lo que implica que en estos tratamientos el contenido de Ca en raíz representa entre 65-70% del obtenido en parte aérea. Tanto el contenido de Ca en hoja como en raíz exhibe una correlación positiva y significativa con la actividad ARA (Tab.).

Tabla 5. Contenido en N, P y K, en mg planta⁻¹, en hoja y en raíz en *Cicer arietinum*, cultivar ILC1919, a lo largo de cuatro recogidas y tratados con cuatro dosis de NaCl. (DDT = días después del tratamiento).

DDT	Parte aérea				Raíz			
	NaCl (mM)				NaCl (mM)			
	0	50	75	100	0	50	75	100
	N				N			
4	8.83	8.81	6.79	6.34	3.64	5.75	5.89	3.97
7	9.19	9.13	9.52	6.11	8.60	6.85	5.97	4.24
11	11.78	11.27	11.87	9.59	8.57	7.97	6.94	8.01
14	11.70	9.03	12.46	3.78	9.52	9.20	8.84	6.63
	MDS (0.05) 3.12				MDS(0.05)			
	P				P			
4	1.21	0.99	1.06	1.00	1.08	2.11	1.59	1.08
7	1.55	1.41	1.46	1.16	3.51	2.86	1.86	1.45
11	1.94	1.85	2.22	2.09	3.62	2.68	2.89	3.08
14	2.13	1.94	1.96	2.98	5.18	3.58	3.16	2.53
	MDS (0.05) 0.14				MDS(0.05)			
	K				K			
4	15.36	12.36	10.49	9.29	12.63	23.89	21.96	14.26
7	17.50	14.92	14.25	10.77	33.99	31.30	25.07	18.28
11	20.94	19.88	20.94	20.28	35.74	32.62	32.26	33.52
14	18.39	20.99	19.88	31.19	46.45	44.44	40.63	31.77
	MDS (0.05) 1.26				MDS (0.05)			

Al igual como se describió para el contenido de potasio y fósforo, el de magnesio el mayor en raíz que en parte aérea en general e independientemente de la dosis de sal y el tiempo de cultivo, se evidencia que el contenido de Mg en raíz el doble

que en parte aérea. Mientras que las diferencias observadas según las fuentes de variación (tratamiento salino y tiempo de experimentación) en parte aérea no son significativas, en raíz se pueden realizar algunos comentarios. Con 50 mM de NaCl se detecta un incremento del 36% respecto al testigo en el contenido de Mg que no se aprecia con las otras dosis de sal a los 4 días de la aplicación del tratamiento que no se detecta ni se mantiene en los siguientes muestreos, en los cuales se obtienen valores semejantes al control e incluso a los otros tratamientos. Con 75 mM se observa un aumento de este parámetro al final del tiempo de cultivo (última recogida) del 60%.

Tabla 54 Contenido en Na, Ca y Mg, en mg planta⁻¹, en hoja y raíz en *Cicer arietinum*, cultivar ILC1919, a lo largo de cuatro recogidas y tratados con cuatro dosis de NaCl. (DDT = días después de tratamiento)

DDT	Parte aérea				Raíz			
	NaCl				NaCl			
	0	50	75	100	0	50	75	100
	Na				Na			
4	0.28	0.97	1.26	1.14	0.24	3.50	4.37	3.01
7	0.89	1.39	7.58	2.15	0.65	4.19	4.74	4.79
11	0.94	2.90	4.16	4.23	0.57	4.74	9.43	10.96
14	0.34	2.15	3.31	3.19	0.76	5.76	11.38	9.45
	MDS (0.05) 1.88				MDS(0.05)			
	Ca				Ca			
4	1.86	1.56	1.39	1.40	0.98	1.83	1.24	0.73
7	3.09	2.38	2.46	1.75	2.52	2.64	1.46	0.97
11	4.44	3.71	3.65	2.92	2.56	2.39	1.83	1.79
14	5.06	3.92	3.21	1.70	3.32	2.67	2.25	1.72
	MDS (0.05) 0.23				MDS(0.05)			
	Mg				Mg			
4	1.74	4.23	1.81	1.33	2.49	5.65	4.28	2.62
7	2.21	2.00	2.21	1.55	6.27	6.19	4.67	3.32
11	3.07	3.16	3.23	2.88	6.01	6.36	6.36	6.03
14	2.96	3.45	2.99	9.28	7.16	9.83	13.19	6.22
	MDS (0.05) 0.88				MDS (0.05)			

Resultados

Se confirma que la acumulación prioritaria del calcio es en parte aérea y del magnesio es en raíz, cuando se expresan los datos en mg por (g planta)⁻¹ (Tab.), observándose en la evolución en el tiempo un incremento de esta acumulación alcanzándose los valores máximos en las últimas recogidas dependiendo del elemento y/o tratamiento.

6. Efecto de la salinidad sobre la capacidad respiratoria de los bacteroides.

En este experimento se han cultivado plantas de *Cicer arietinum* cultivar ILC1919, inoculadas con la cepa Ch-191 de *Mesorhizobium ciceri*, crecidas con 50 mM de NaCl desde la siembra, o sin sal (plantas control), realizándose la recogida de las plantas a los 28 días, inicio de floración. Se determinaron los parámetros de crecimiento y fijación de nitrógeno habituales en los experimentos anteriores, con el fin de controlar la respuesta de la planta a las condiciones de cultivo establecidas. Se aislaron bacteroides a partir de los nódulos radicales, por el procedimiento indicado en el apartado de Material y Métodos, y la suspensión bacteroidal obtenida se usó para medir el consumo de oxígeno en los bacteroides intactos, incubados en presencia de diferentes compuestos susceptibles de ser utilizados por el microsimbionte como sustrato respiratorio.

Tabla 6.1. Peso seco de parte aérea (PSPA), raíz (PSR) y total por planta (PSP) expresado en gramos; relación raíz/parte aérea (RPA), en plantas de *Cicer arietinum*, cultivar ILC1919 a inicio floración, tratadas con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

	NaCl (mM)	PSPA	PSR	PSP	RPA
ILC1919	0	0.60	0.39	1.02	0.65
	50	0.51	0.30	0.85	0.59
	MDS (0.05)	0.11	0.076	0.18	0.095

6.1. Resultados de crecimiento y fijación de nitrógeno.

La salinidad causó un descenso del peso seco de la planta, que no fue significativo (Tab. 6.1). Los datos de crecimiento obtenidos en este experimento son similares a los obtenidos con la misma dosis de sal en experimentos anteriores en los que el tratamiento se aplicó desde la siembra.

Se observa un incremento de la nodulación (PSN; Tab.6.2) con 50 mM NaCl,

Resultados

similar al detectado en el experimento 4 con este cultivar. La actividad nitrogenasa específica (ARA) sufre un descenso no significativo (Tab. 6.2), que se ve compensado por el incremento de PSN, que da lugar a su vez a un aumento de la actividad total por planta (ARAP). Estas variaciones, si bien se encuentra al límite de la significación estadística, son similares a las observadas en el experimento 4 para este cultivar.

Tabla 6.2. Peso seco de nódulos (PSN) en g planta⁻¹, peso normalizado de nódulos (PNN) en mg PSN (g PSPA)⁻¹, actividad reductora de acetileno específica (ARA) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4$ (g PS)⁻¹ h⁻¹, ARA por planta (ARAP) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4$ planta⁻¹ h⁻¹, en plantas de *Cicer arietinum*, cultivar ILC1919 a inicio floración, tratadas con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

	NaCl (mM)	PSN	PNN	ARA	ARAP
ILC1919	0	0.027	44.9	51.39	1.41
	50	0.033	64.1	45.60	1.50
	MDS (0.05)	0.011	13.2	8.63	0.67

6.2. Capacidad respiratoria de los bacteroides.

El consumo de O₂ por los bacteroides se midió en ausencia (control) o presencia de sustratos energéticos exógenos. En el control se observó una diferencia altamente significativa entre los bacteroides de las plantas control y los de las que crecieron en salinidad (Tab. 6.3), lo que confirma que la capacidad respiratoria del bacteroide se ve severamente afectada por la sal del medio de crecimiento de la planta.

La adición de determinados sustratos incrementa significativamente el consumo de oxígeno en los bacteroides de las plantas control (Tab. 6.3). El mayor incremento lo produjeron el succinato (+88 %) y la glucosa (+63 %) seguidos de malato, fumarato, lactato y glutamato. En cambio, no produjeron efecto significativo la prolina, piruvato, etanol, betaína, oxalacetato, acetato y citrato.

Resultados

Tabla 6.3. Capacidad respiratoria de bacteroides aislados de nódulos de *Cicer arietinum* cultivar ILC1919, en $\mu\text{mol O}_2$ consumidos $(\text{mg proteína})^{-1} \text{min}^{-1}$, a inicio floración, tratadas con 0 y 50 mM de NaCl desde el inicio del cultivo, e incubados con diferentes sustratos.

Substrato	NaCl (mM)			
	0 mM		50 mM	
	$\mu\text{mol O}_2$	% del control	$\mu\text{mol O}_2$	% del control
Control	16.95	100.0	10.88	100.0
Succinato	31.88	188.1	23.87	219.0
Glucosa	27.75	163.7	18.46	169.7
Malato	19.87	117.2	10.14	93.2
Fumarato	19.51	115.1	11.44	105.2
Lactato	19.28	113.8	14.77	135.8
Glutamato	19.22	113.4	11.16	102.6
Prolina	18.66	110.1	15.77	145.0
Piruvato	17.62	104.0	13.15	120.9
Etanol	17.26	101.8	14.27	131.2
Betaina	16.88	99.6	13.35	122.7
Oxalacetato	16.78	99.0	12.52	115.1
Acetato	15.81	93.3	10.74	98.7
Citrato	13.55	79.9	10.38	95.4
MDS (0.05)		2.03 (12 %)		

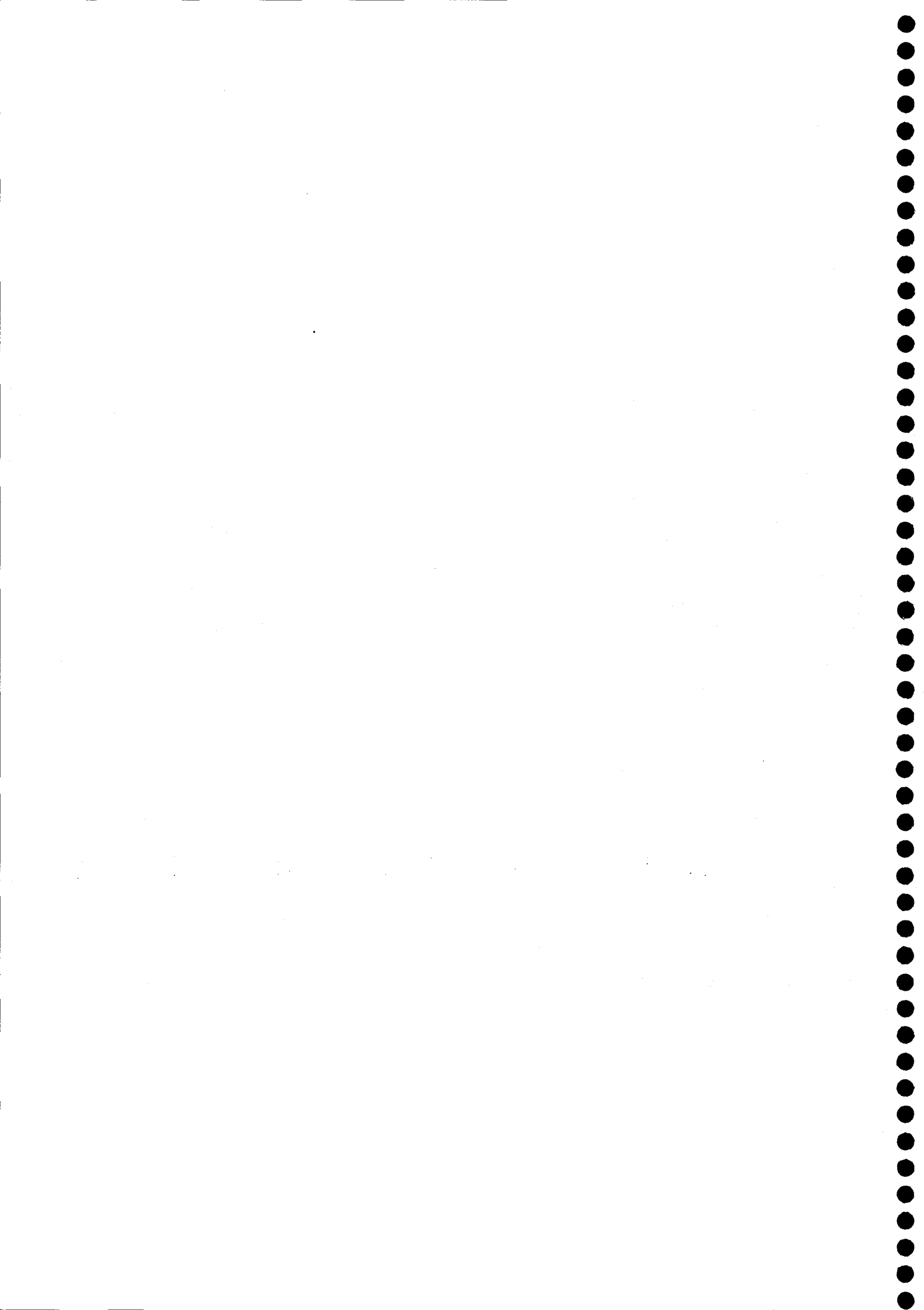
En los bacteroides procedentes de plantas crecidas con NaCl, se observan respuestas diferentes: el estímulo producido por succinato, glucosa y lactato es proporcionalmente mayor que el observado en los bacteroides de las plantas control. En cambio, malato, fumarato y glutamato no causaron respuesta significativa. Por último, otros compuestos que no provocaron efecto en los bacteroides control, como prolina, betaina, etanol y piruvato, incrementaron el consumo de oxígeno en los crecidos en salinidad. De estos, merece destacarse el incremento provocado por la prolina, del 45 % respecto a los bacteroides incubados en ausencia de sustratos exógenos.

Resultados

En resumen, se puede decir que la salinidad en el medio de crecimiento de la planta hace disminuir la intensidad de la respiración bacteroidal y, además, modifica su capacidad para metabolizar y/o incorporar diferentes compuestos, incrementándola en ciertos casos (prolina, betaina, etanol y piruvato) e inhibiéndola en otros (malato, fumarato y glutamato).



DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

1. Germinación de diferentes cultivares de *Cicer arietinum*: efecto de la sal.

El metabolismo del nitrógeno está directamente relacionado al potencial de producción de los cultivos. El estudio de la asimilación del nitrógeno durante la germinación de semillas en condiciones de estrés salino es crucial.

En el cultivar ILC1919 se observó una estimulación importante de la actividad GS con el tratamiento de cloruro sódico. Rakova *et al.* (1978) observaron que la GS es una de las enzimas del metabolismo nitrogenado más tolerante a la sal en ensayos *in vitro* junto a la GDH y NR. La salinidad también incrementó el patrón de actividad enzimática de la GDH. Este paralelismo en el desarrollo de los perfiles de la GS y GDH bajo estrés salino sugiere la interdependencia de estas dos enzimas. Los datos sugieren también que en semillas tolerantes, la asimilación del amonio en la germinación del garbanzo sometido a condiciones salinas se realice preferentemente por la vía GS/GDH que por la NADH-GOGAT, hecho evidenciado por la estimulación de la GS como de la GDH y simultáneamente una inhibición de la GOGAT por la sal. Este resultado es contrario a lo observado en semillas germinadas de *Phaseolus aureus* por Neelam *et al.* (1990). Loyola Vargas (1988) también observó una estimulación de la GOGAT con la sal.

La exposición de las plantas a la sal incrementa la acumulación de ciertos compuestos nitrogenados, sobre todo, de la prolina. Esta acumulación ha sido correlacionada con la tolerancia a la sal en numerosas plantas. Sin embargo, hay gran controversia a lo que se refiere a este acúmulo. En nuestro estudio, en el periodo de germinación del garbanzo, el cloruro sódico estimula la acumulación de prolina en las radículas del cultivar más sensible (Pedrosillano) lo que induce a pensar que la prolina en semillas germinadas de garbanzo, no puede ser considerada como un soluto compatible. En el cultivar ILC1919 (cultivar tolerante) la aplicación de la sal estimula el ciclo GS/GDH como la fuerte acumulación de aminoácidos totales y simultáneamente la inhibición de la síntesis

de prolina. Estos hechos, consolidan la hipótesis formulada según la cual la prolina no actúa como soluto compatible durante la germinación de *Cicer arietinum*.

En la célula el carbohidrato tiene una función doble: Por una parte interviene como agente osmótico y por otra parte provee energía (ATP), poder reductor (NADPH) y esqueletos carbonados para la biosíntesis. Las dos vías de oxidación de azúcares en tejidos de plantas superiores son, la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) y la vía la de las pentosas fosfato (PP) (Ap-Rees, 1977).

En nuestro estudio, la salinidad afecta diferentemente el perfil de actividad enzimática del ciclo EMP y PP en función del cultivar en estudio: mientras en el cultivar ILC1919 la actividad ADH se incrementa suavemente con la salinidad, la 6PGDH se inhibe con el estrés. En cambio, en Pedrosillano, la estimulación por la sal de la actividad enzimática de la ADH es acentuada. Los valores de la 6PGDH, sin embargo, con 100 y 150 mM de NaCl se mantienen en comparación al valor control.

El aumento de la actividad del ciclo de las pentosas fosfato en comparación con el EMP ha sido descrita durante la germinación de semillas (Rawal et al. 1985). Estudios del efecto de la salinidad sobre la actividad enzimática de la vía de las PP y su relación con la tolerancia/sensibilidad de los cultivares al NaCl ha sido muy escrutado por la literatura (Poljakoff-Mayber et al., 1981). Un aumento de la actividad de las enzimas de la vía de las pentosas fosfato (G6PDH y 6PGDH) en comparación con las de la vía EMP (fosfofructokinasa y fosfoglucoisomerasa) con la salinidad ha sido correlacionada con la sensibilidad a la sal en cultivares de Pea (Poljakoff-Mayber et al., 1981). Las observaciones de Neelam Misra y Upendra N. Dwivedi (1990) en semillas de *Phaseolus aureus* son justamente contrarias: el estrés salino en el cultivar tolerante se caracteriza por un aumento del patrón de actividad enzimática de la vía de las pentosas fosfato, en cambio, la actividad enzimática de la vía EMP se inhibe.

2. Crecimiento y fijación de nitrógeno en diferentes cultivares de *C. arietinum* en condiciones de salinidad.

En este experimento se puso de manifiesto influencia del genotipo de la planta sobre la respuesta a la salinidad. Aunque la sal afecta, en general, inhibiendo el crecimiento, un mayor o menor índice en determinados casos como 50 mM en el cultivar Gulavi se observa un incremento de la parte aérea (PS). En plantas de *Phaseolus vulgaris* Wignarajah (1990) encontró que la sal inhibía más el crecimiento de la parte aérea que de la raíz, mientras que Rao y Sharma (1995) informan de una mayor sensibilidad de la raíz en garbanzo. Nuestros resultados indican que el efecto depende en gran medida del genotipo de la planta, pues de los cinco cultivares empleados en este experimento, lechosos es más sensible la raíz, al contrario que Pedrosillano o ILC1919, no exhibiendo los dos restantes (Sirio y Gulavi) una respuesta definida, ya que esta depende de las dosis de sal aplicada. Puesto que Rao y Sharma (1995) utilizan un cultivar sensible a la salinidad, los resultados parecen sugerir que el incremento de la relación RPA puede ser un índice de mayor tolerancia al estrés salino.

La nodulación se inhibe por la sal, salvo en el cultivar ILC1919 en que aumenta ligeramente el PSN a pesar de la disminución en el número de nódulos, lo que coincide con las observaciones de Lauter *et al* (1981) y de Youseff y Sprent (1983) en *Vicia faba* que encontraron un incremento en el tamaño de los nódulos con la sal.

3. Efecto del estrés salino en la simbiosis ILC1919-Ch191: aplicación en el periodo de crecimiento vegetativo.

En este experimento se estudia el efecto del NaCl en plantas de garbanzo inoculadas con *Mesorhizobium ciceri*, aplicado en el periodo vegetativo. La disminución del crecimiento fue significativa solamente con la dosis más alta de sal. Aunque la relación RPA aumentó con los tratamientos salinos, en el primer muestreo, una tendencia que puede ser considerada como una respuesta a corto plazo a la sal, los incrementos en los siguientes muestreos fueron escasamente

significativos. El efecto depresivo del NaCl sobre el crecimiento ha sido observado en leguminosas como garbanzo (Dua, 1992), soja (Singleton y Bohlool, 1984) y habas (Zahran y Sprent, 1986; Cordovilla *et al.*, 1996). La salinidad redujo significativamente el peso seco de los nódulos por planta; sin embargo, en la segunda recogida se observó un incremento en PSN, que condicionó una ARAP igual o superior al control. Estos resultados difieren de los descritos por Elsheikh y Wood (1990) y Sheokand *et al.* (1995) para otros cultivares, lo que sugiere que ILC1919 es más tolerante a la salinidad. Otros autores han descrito una considerable inhibición de la nodulación y de la fijación de nitrógeno bajo condiciones de salinidad (Bekki *et al.*, 1987). De acuerdo con los resultados de Elsheikh y Wood (1990), la nodulación y la fijación de nitrógeno son más sensibles a la salinidad que el crecimiento, dado que los valores de los dos primeros se redujeron incluso con las concentraciones más bajas de sal, mientras que el peso seco de la planta sólo se afectó con la dosis más alta (100mM). La significativa acumulación de carbohidratos en los nódulos sugiere que el descenso de la actividad nitrogenasa (Tab.) no es causado directamente por una disminución en el aporte de fotosintato. (Seeman y Critchley, 1985; Hunt y Layzell, 1993). Como en el caso de estrés salino, esta acumulación podría deberse al hecho de que el contenido de sacarosa aumenta por el descenso de las actividades enzimáticas que catalizan su hidrólisis (González *et al.*, 1995).

Cordovilla *et al.* (1994) han descrito la inhibición de las actividades GS y NADH-GOGAT por el estrés salino en nódulos de *Vicia faba*, pero en este experimento dichas actividades se estimularon con 50mM NaCl, antes en hojas que en nódulos (Fig.). Stewart y Rhodes (1978) informaron que un incremento de la salinidad estimula los niveles de las actividades GS y GOGAT en tejidos de la parte aérea. Estos cambios parecen reflejar una tendencia hacia un papel primordial de la parte aérea en la asimilación de amonio bajo condiciones de salinidad. En este experimento el incremento de dichas actividades aparece en las dos primeras recogidas, quizás debido a una acumulación de amonio y amidas inducida por el estrés (Hatata, 1982). Por otra parte ni la GS ni la GOGAT se

correlacionaron con la actividad reductora de acetileno, resultado que coincide con lo descrito por Gordon *et al.* (1997b) trabajando con estrés hídrico.

El proceso de asimilación fotosintética del carbono en el cultivar ILC1919 de garbanzo resultó fuertemente inhibido por los niveles más altos de salinidad. Sin embargo, se observó un estímulo de la actividad rubisco por la sal (Fig.) a los cuatro días del tratamiento. Los datos demuestran que la fotosíntesis fue menos sensible que la fijación de nitrógeno; de hecho, mientras que la inhibición de la actividad rubisco a los cuatro días de tratamiento con 100 mM NaCl fue del 18%, la actividad nitrogenasa (ARA) disminuyó en más del 50% (Tab.). En el último muestreo la sal inhibió la actividad ARA más del 90%, mientras que la rubisco se redujo en un 20% respecto al control. Resultados parecidos describieron Djekoun y Planchon (1991) en soja sometida a estrés hídrico. La inhibición de la actividad rubisco por la sal puede ser debido a la sensibilidad de esta enzima al ión cloruro (Seeman y Critchley, 1985). El efecto negativo de la sal sobre el contenido de clorofila ha sido anteriormente descrito por Mostan *et al.* (1988). En el presente estudio la síntesis de clorofila disminuye y el contenido de prolina aumenta. Le Dily y colaboradores (1993) sugirieron que ambos compuestos se forman a partir de un precursor común, el glutamato, una posibilidad que concuerda con la correlación negativa encontrada en este experimento entre el contenido de prolina y de clorofila.

Las actividades fosfoenolpiruvato carboxilasa y malato deshidrogenasa en las hojas se estimularon por la sal en la primera recogida (Fig.). La inducción de la PEPC en condiciones de salinidad ha sido descrita en hojas de plantas CAM (Yen *et al.*, 1995). Así mismo, Guerrier (1998) ha propuesto que el nivel de actividad PEPC podría ser utilizado como un indicador de tolerancia al estrés salino. En leguminosas, la estimulación de la vía PEPC-MDH también ha sido descrita en nódulos de alfalfa bajo estrés hídrico, quizás causada por la menor disponibilidad de oxígeno (Irigoyen *et al.*, 1992 a). En este experimento, la actividad PEPC del citosol nodular se incrementó a los cuatro y siete días de tratamiento salino, y disminuyó en los dos últimos muestreos. La correlación

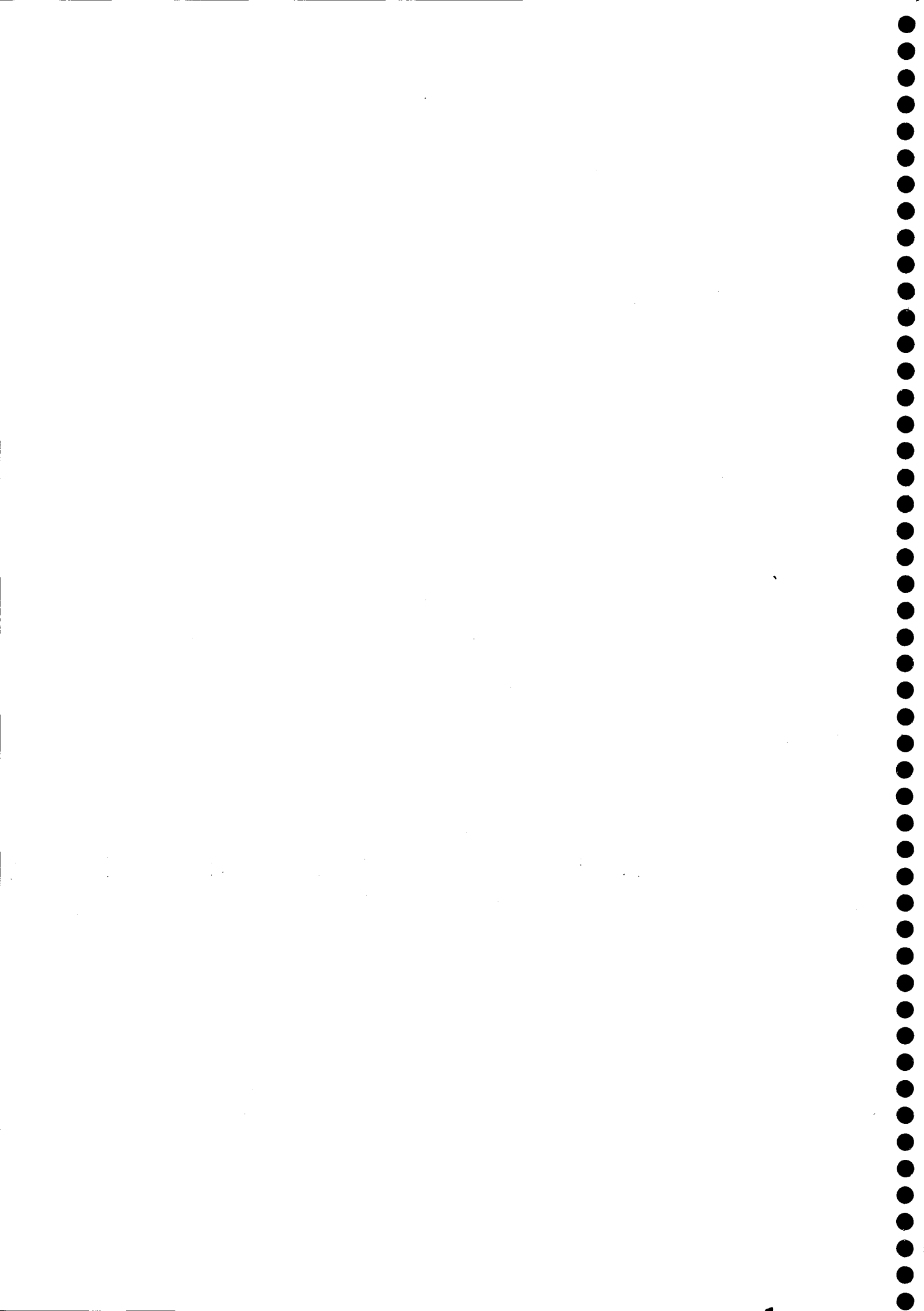
positiva y significativa entre las actividades PEPC y MDH en nódulos ($r = 0.73$, $P < 0.05$), contrariamente a lo descrito por Delgado y colaboradores (1993) en *Pisum sativum*. Estos autores también describieron una relación entre salinidad y activación de la PEPC, mientras que nuestros resultados apoyan esta relación sólo parcialmente: la actividad PEPC incrementa con la sal en la primera recogida, pero se inhibe en las dos últimas. Por tanto, la respuesta de esta actividad podría depender del momento de aplicación de la sal y de la duración de la exposición a dicho estrés.

La acumulación de solutos orgánicos bajo condiciones de salinidad ha sido ampliamente documentada. Se asume que la acumulación de solutos compatibles en respuesta al estrés salino podría constituir un mecanismo de protección en relación al mantenimiento del volumen y turgor celular, la reducción del daño celular inducido por los radicales libres, así como la protección y estabilización de enzimas y estructuras de membrana (Timasheff y Arakawa, 1989). El contenido de solutos compatibles incrementó en los últimos muestreos, mientras que la nodulación, la fijación de nitrógeno, la fotosíntesis y las actividades PEPC y MDH disminuyeron. Esto apoya la idea de que la acumulación de solutos es más una consecuencia del daño producido por el estrés salino que una estrategia de protección frente a dicho estrés.

Resultados similares han sido descritos por Pérez Alfocea *et al.* (1994) en *Lycopersicon esculentum* y Lutts *et al.* (1996) en *Oryza sativa*. En este experimento, se encontró correlación negativa entre ARA, PEPC, MDH y el contenido de prolina en hoja. Una correlación negativa entre tolerancia a la salinidad y acumulación de prolina también ha sido descrita por Waisel (1989) y Petrusa y Winicov (1997).

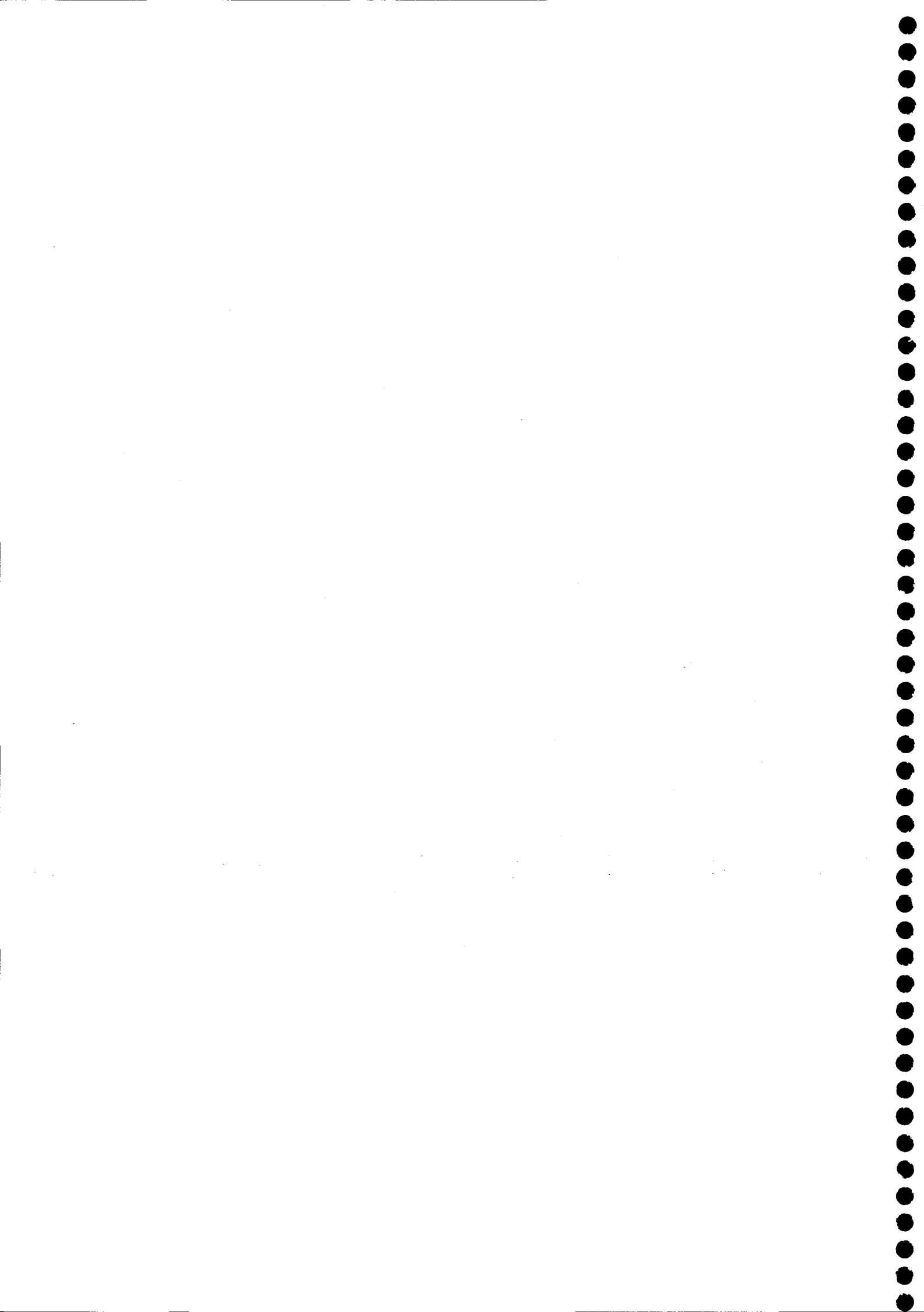
La respuesta de *Cicer arietinum* cv. ILC1919 a la sal aplicada en el periodo vegetativo, incluye la inhibición de la nodulación y la fijación de nitrógeno incluso con los niveles de salinidad más bajos, mientras que el crecimiento se inhibió sólo en el más alto. La respuesta de la fijación de nitrógeno a la sal fue más pronunciada que la de la fotosíntesis, que junto con la

cumulación de carbohidratos encontrada en el nódulo, sugiere que la falta de fotosintato no causó la inhibición de la actividad nitrogenasa bajo este tipo de estrés. La tendencia similar observada en la vía PEPC-MDH y la ARA apoya la hipótesis de Delgado *et al.* (1993) sobre la limitación del aporte de sustrato energéticos, principalmente malato, a los bacteroides. Por otra parte, la acumulación de solutos orgánicos, en este caso, refleja el daño causado por el NaCl.





CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

1. Evaluación de un grupo de cepas de *Rhizobium* que infectan a *Cicer arietinum* demostró ser diferente en la velocidad de crecimiento y la tolerancia a cloruro sódico. Así como se seleccionó cepas sensibles, cepas moderadamente tolerantes y cepas tolerantes a 400 mM.
2. Estas cepas sensibles y tolerantes al NaCl han constituido un modelo para estudiar la sensibilidad y/o tolerancia a la sal. Así, en los perfiles de proteínas con dosis altas de NaCl se observa un desplazamiento hacia la aparición de bandas polipeptídicas de alto peso molecular lo que sugiere la inhibición de proteasas que condicionan la falta de proteínas funcionales. Así mismo, la salinidad induce en los perfiles de lipopolisacáridos de *Mesorhizobium ciceri* cepa Ch191 muestra una desaparición de las bandas más lentas y una reorganización de las bandas más rápidas.
3. La germinación, etapa crítica para el establecimiento de la planta que crece en medio salino, se ha evaluado mediante diferentes índices y parámetros fisiológicos en distintos cultivares de *Cicer arietinum*. Aun considerando que estos no son suficientes para establecer una jerarquía entre variedades si que se evidencia una gran variabilidad en la tolerancia y sensibilidad a la sal entre ellas, provocando una acumulación de solutos intracelulares, aminoácidos, prolina y azúcares solubles totales en las más sensibles a la sal.
4. El estudio comparativo entre dos simbiosis con diferente sensibilidad a la sal permite proponer que las plantas tolerantes obtienen la energía y el poder reductor necesarios para la fijación de nitrógeno utilizando preferentemente la vía oxidativa de las pentosas fosfato, mientras que las sensibles lo hacen por las vías fermentativas.

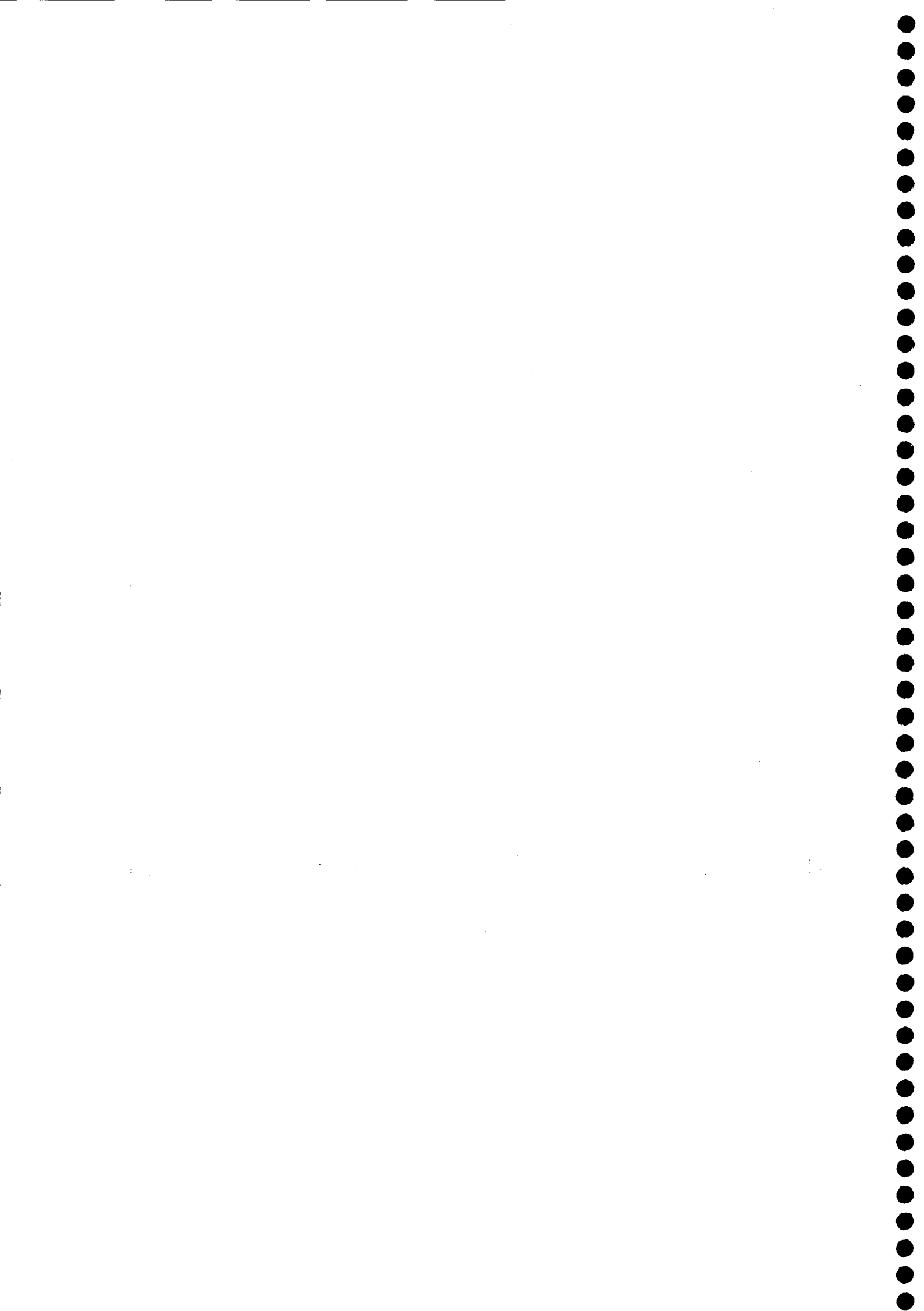
Conclusiones

5. La acumulación de carbohidratos en condiciones de estrés salino, evidencia que la fijación de nitrógeno no se ve limitada por el aporte de fotosintato. Sin embargo, la respuesta de la PEPC y MDH a la salinidad indican que puede ser la falta de sustratos respiratorios para el bacteroide, principalmente malato y succinato, el factor limitante para la actividad nitrogenasa.

6. La respiración bacteroidal se estimuló, tanto en las condiciones control como en presencia de NaCl, con el succinato y la glucosa añadidos exógenamente. La prolina estimuló el consumo de oxígeno cuando los bacteroides proceden de plantas crecidas bajo estrés salino, lo que sugiere que este compuesto puede cumplir una función de sustrato energético en condiciones de estrés salino.



BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

Alarcón JJ, Sánchez Blanco MJ, Bolarín MC, Torrecillas A. 1993. Water relations and osmotic adjustment in *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii* during short-term salt exposure and recovery. *Physiol. Plant.* **89**: 441-447.

Alarcón JJ, Sánchez Blanco MJ, Bolarín MC, Torrecillas A. 1994. Growth and osmotic adjustment of two tomato cultivars during and after saline stress. *Plant Soil.* **166**: 75-82.

Ap-Rees T. 1977. Conservation of carbohydrates by the nonphotosynthetic cells of higher plants. In *Integration of activity in higher plant.* 31, Jennings D. H., ed., Society of Experimental Biology Symposium, Cambridge University Press, Cambridge, 7-32.

Bekki K, Trinchant JC, Rigaut J. 1987. Nitrogen fixation by *Medicago sativa* nodules and bacteroids under sodium chloride stress. *Physiol.Plant.* **71**: 61-7.

Bethke PC, Drew MC. 1992. Stomatal and non stomatal componets to inhibition of photosynthesis in leaves of *Capsicum annum* during progressive exposure to NaCl salinity. *Plant Physiol.* **99**: 219-226.

Bishop PE. 1990. Genetics of alternative nitrogen fixation systems in *Azotobacter vinelandii*. 8th Int. Congress Nitrogen Fixation. Knoxville, TN. USA. p. L-51.

Bostford JL, Lewis TA. 1990. Osmoregulation in *Rhizobium meliloti*: production of glutamic acid in response to osmotic stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 488-94.

Bostford JL. 1984. Osmoregulation in *Rhizobium meliloti*: inhibition of growth by salts. *Arch. Microbiol.* **137**: 124-27.

Bouton JH, Dudeck AE, Smith RL. (1976) Germination in freshly harvested seed of centipede grass. *Agron. J.* **68**: 991-992.

Boyer JS. 1982. Plant productivity and environment. *Science.* **218**: 443-448.

Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

- Breedveld MW, Zevenhuizen LPTM, Zehnder AJB.** 1991. Osmotically regulated trehalose accumulation and cyclic beta-(1,2)-glucan excretion by *Rhizobium leguminosarum* biovar. *trifolii* TA-1. *Arch. Microbiol.* **156**: 501-6.
- Brewin NJ, Rae AL, Perotto S, Knox JP, Roberts K, LeGal MF, Sindhu SS, Wood Brugnoli E, Leuteri M.** 1991. Effects of salinity on stomatal conductance, photosynthetic capacity, and carbon isotope discrimination of salt-tolerant (*Gossypium hirsutum* L.) and salt-sensitive (*Phaseolus vulgaris* L.) C3 non halophytes. *Plant Physiol.* **95**: 628-635.
- Burris RH.** (1972) Nitrogen fixation-assay methods and techniques. Methods in Enzymology, IV. S.P. Colowick y N.O. Kaplan (eds.). Academic Press. New York. pp. 415.
- Caba JM, Lluch C, Hervás A, Ligeró F.** (1990) Nitrate metabolism in roots and nodules of *Vicia faba* in response to exogenous nitrate. *Physiol. Plant.* **79**: 531-539.
- Carlson RW, Kalembasa S, Turowski D, Pachori P, Noel KD.** 1987. Characterization of the lipopolysaccharide from a *Rhizobium phaseoli* mutant that is defective in infection thread development. *J. Bacteriol.* **169**: 4923-4928.
- Carlson RW, Krishnaiah BS.** 1992. *Carbohydr.* **231**: 205- 219.
- Chen H, Long BL, Song HY.** 1996. Exopolysaccharide-deficient mutants of *Astragali* rhizobia are symbiotically effective on *Astragalus sinicus*, an indeterminate nodulating host. *Plant Soil.* **179**: 217-221.
- Chen RD, Maréchal JV, Jacquot JP, Gadal P.** (1988) Purification and comparative properties of the cytosolic isocitrate dehydrogenases (NADP) from pea (*Pisum sativum*) roots and green leaves. *Eur. J. Biochem.* **175**: 565-572.
- Chien CT, Rupp R, Beck S, Orser CS.** 1991. Proline auxotrophic and catabolic mutants of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* strain C1204b are unaffected in nitrogen fixation. *FEMS Microbiol. Lett.* **77**: 299-302.
- Copeland L, Vella J, Hong Z.** 1989. Enzymes of carbohydrate metabolism in soybean nodules. *Phytochemistry.* **28**: 57-61.
- Cordovilla MP, Ligeró F, Lluch C.** 1994. The effect of salinity on N₂ fixation and assimilation in *Vicia faba*. *J. Exp. Bot.* **45**: 1483-1488.
- Cordovilla MP, Ligeró F, Lluch C.** 1996. Growth and nitrogen assimilation in nodules in response to nitrate levels in *Vicia faba* under salt stress. *J. Exp. Bot.* **47**: 203-10.

- Craig GF, Atkins CA, Bell DT.** 1991. Effect of salinity on growth of four strains of *Rhizobium* and their infectivity and effectiveness on two species of *Acacia*. *Plant Soil*. **133**: 253-262.
- Cramer GR, Bowman DC.** 1991. Short-term leaf elongation Kinetics of maize in response to salinity are independent of the root. *Plant. Physiol.* **95**: 965-967.
- Csonka LN, Hanson AD.** 1991. Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**: 569-606.
- Davies WJ, Zhang J.** 1991. Root signal and the regulation of growth and development of plant in drying soil. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **42**: 55-76.
- Day DA, Ou-Yang L, Udvardi M.** 1990. Nutrient exchange across the peribacteroid membrane of isolated symbiosomes. In: Gresshoff P, Roth E, Stacey G, Newton W, eds. *Nitrogen fixation: achievements and objectives*. New York: Chapman and Hall, 219-26.
- Delgado IC.** 1992. Distribución de los nutrientes minerales en plantas de girasol (*Helianthus annuus* L.) sometidos a estrés salino. *Tesis Doctoral*. pp.336. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada.
- Delgado MJ, Garrido JM, Ligeró F, Lluch C.** 1993. Nitrogen fixation and carbon metabolism by nodules and bacteroids of pea plants under sodium chloride stress. *Physiol. Plant.* **89**: 824-29.
- Djekoun A, Planchon C.** 1991. Water status effect on dinitrogen fixation and photosynthesis in soybean. *Agr. J.* **83**: 316-22.
- Dua RP.** 1992. Differential response of chickpea (*Cicer arietinum*) genotypes to salinity. *J. Agric. Sci.* **119**: 367-371.
- EA, Kannenberg EL.** 1990. Immunological detection of the plant-microbe interface in pea nodules. In: Nitrogen Fixation: Achievements and objectives. P. M. Gresshoff, G. Stacey and W. E. Newton, eds. Chapman and Hall, New York, pp. 227-234.
- Elsheikh EAE, Wood M.** 1990. Rhizobia and bradyrhizobia under salt stress: possible role of trehalose in osmoregulation. *Lett. Appl. Microbiol.* **10**: 127-29.
- Farnden KJF, Robertson JG.** (1980) Methods for studying enzymes involved in metabolism related to nitrogenase. En: Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation. F.J. Bergensen (ed.), pp. 265-314. J. Wiley and Sons, New York.

Fisher RF, Long SR. 1992. *Rhizobium*-plant signal exchange. *Nature*. **357**: 655-660.

Flowers TJ, Yeo AR. 1988. Ion relations of salt tolerance. In solute transport in plant cell and tissues. pp. 392-416 (Baker DA, Hall JL, Eds). New York: Longman.

Fougère F, Le Rudulier D, Streeter JG. 1991. Effects of salt stress on amino acid, organic acid, and carbohydrate composition of roots, bacteroids and cytosol of alfalfa (*Medicago sativa* L.) *Plant Physiol.* **96**: 1228-36.

Fowler JL. (1991) Interaction of salinity and temperature on the germination of crame. *Agron. J.* **83**: 169-172.

Fujihara S, Yoneyama T. 1993. Effects of pH and osmotic stress on cellular polyamine contents in the soybean rhizobia *Rhizobium fredii* P220 and *Bradyrhizobium japonicum* A1017. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1104-1109.

Gonzalez A, Gordon AJ, James CL, Arrese-Igor C. 1995. The role of sucrose synthase in the response of soybean nodules to drought. *J. Exp. Bot.* **46**: 1515-23.

Gonzalez-Gonzalez R, Botsford JL, Lewis T. 1990. Osmoregulation in *Rhizobium meliloti*: Characterization of enzymes involved in glutamate synthesis. *Can. J. Microbiol.* **36**: 469-74.

Gordon AJ, Minchin FR, Skot L, James CL. 1997b. Stress-induced declines in soybean N₂ fixation are related to nodule sucrose synthase activity. *Plant Physiol.* **114**: 937-46.

Graham PH. 1992. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Can. J. Microbiol.* **38**: 475-484.

Greenway H, Munns R. 1980. Mechanisms of salt-tolerance in non-halophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **31**: 149-190.

Groat RG, Vance CP. (1981) Root nodule enzymes of ammonia assimilation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* **67**: 1198-1203.

Guerrier G. 1988. Capacités PEPCase et MDH extraites des plantules germées en milieu salé: des paramètres biochimiques de l'écophysiologie de la plante? *Seed Science and Technology* **16**:571-78.

- Haardt M, Kempf B, Faatz E, Bremer E.** 1995. The osmoprotectant proline betaine is a major substrate for the binding protein dependent transport system ProU of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* **246**: 783-86.
- Hafeez FY, Aslam Z, Malik KA.** 1988. Effect of salinity and inoculation on growth, nitrogen fixation and nutrient uptake of *Vigna radiata* L. Wilczek. *Plant Soil.* **106**: 3-8.
- Hartmann A, Prabhu SR, Galinski EA.** 1991. Osmotolerance of diazotrophic rhizosphere bacteria. *Plant Soil.* **137**: 105-9.
- Hatata M.** 1982. Specific effect of certain salts on nitrogen metabolism of young corn seedlings. *Acta Botanica Polonia* **51**: 263-73.
- Herdina JA, Silsbury JH.** (1991) Estimating nitrogenase activity of Faba bean (*Vicia faba* L.) by acetylene reduction (AR) assay. *Aust. J. Plant Physiol.* **17**: 489-502.
- Herrada G, Puppo A, Rigaud J.** 1989. Uptake of metabolites by bacteroid-containing vesicles and by free bacteroids from french bean nodules. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 3165-3172.
- Hervás A.** (1988) Selección de razas de *Rhizobium leguminosarum* y su tolerancia al nitrógeno combinado en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. pp. 396.
- Hirsch AM.** 1992 Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* **122**: 211-237.
- Hitchcock PJ, Brown TM.** (1983) Morphological heterogeneity among Salmonella lipopolysaccharides chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Bacteriol.* **154**: 269-277.
- Hua S-ST, Tsai VY, Lichens GM, Noma AT.** 1982. Accumulation of amino acids in *Rhizobium* sp. strain WR1001 in response to sodium chloride salinity. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 135-40.
- Hunt S, Layzell DB.** 1993. Gas exchange of legume nodule and the regulation of nitrogenase activity. *Ann. l Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**: 483-511.
- Hurkman WJ.** 1992. Effect of salt stress on plant gene expression: a review. *Plant Soil.* **146**: 145-151.

- Irigoyen JJ, Emerich DW, Sánchez-Díaz M. (1992)** Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugar in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiol. Plant.* **84**: 55-60.
- Irigoyen JJ, Emerich DW, Sánchez-Díaz M. 1992a.** phosphoenolpyruvate carboxylase malate and alcohol dehydrogenase activities in alfalfa (*Medicago sativa*) nodules under water stress. *Physiol. Plant.* **84**: 61-66.
- Kaiser JJ, Lewis OAH. (1984)** Nitrate reductase and glutamine synthetase activity in leaves and roots of nitrate-fed *Helianthus annuus* L. *Plant Soil* **70**: 127-130.
- Kefu A, Munns R, King RW. 1991.** Abscisic acid levels in NaCl-treated barley, cotton and salbush. *Aust. J. Plant Physiol.* **18**: 17-24.
- Keys JA, Parry MAJ. (1990)** Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase and carbonic anhydrase. *Methods in Plant Biochemistry.* Academic Press. London. **3**: 1-14.
- Kobza M, Seeman JR. (1989)** Regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity in response to diurnal changes in irradiance. *Plant Physiol.* **89**: 918-924.
- Kohl DH, Kennelly EJ, Zhu Y, Schubert KR, Shearer G. 1991.** Proline accumulation, nitrogenase activity and activities of enzymes related to proline metabolism in drought stressed soybean nodules. *J. Exp. Botany.* **42**: 831-37.
- Kohl DH, Straub PF, Shearer G. 1994.** Does proline play a special role in bacteroid metabolism?. *Plant Cell Environ.* **17**: 1257-62.
- Kondorosi A. 1990.** *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide and exopolysaccharide can have the same function in the plant-bacterium interaction. *J. Bacteriol.* **172**: 5450-5458.
- Lachica M, Aguilar A, Yañez J. (1973)** Análisis foliar. Métodos utilizados en la Estación Experimental del Zaidín C.S.I.C. (II). *Anal. Edaf. Agrobiol.* **XXXII**: 1033-1047.
- Laemmli UK. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the Lowry method for protein determination. *Anal. Biochem.* **155**: 243-248.
- Lauter DJ, Munns DN. 1986.** Salt resistance of chickpea genotypes in solutions salinized with NaCl or Na₂SO₄. *Plant Soil.* **95**: 271-279.
- Le Dily F, Billard JP, Le Saos J, Huault C. 1993.** Effects of NaCl and gabaculine on chlorophyll and proline levels during growth of radish cotyledons. *Plant Physiol. Biochem.* **31**: 303-10.

Le Rudulier D, Gloux K, Riou N. 1991. Identification of an osmotically induced periplasmic glycine betaine binding protein from *Rhizobium meliloti*. *Biochim. Biophys. Acta* **1061**: 197-205.

Leigh JA, Walker GC. 1994. Exopolysaccharides of *Rhizobium*: synthesis, regulation and symbiotic function. *Trends Genet.* **10**: 63-67.

Leonard LT. (1943) A simple assembly for use in testing of culture of rhizobia. *J. Bacteriol.* **45**: 523-527.

Lichtenthaler HK. (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic membranes. *Meth. Enzym.* **148**: 350-382.

Lillo C. (1984) Diurnal variations of nitrite reductase, glutamine synthetase, glutamate synthase, alanine aminotransferase in barley leaves. *Physiol. Plant.* **61**: 214-218.

Lopez- Lara IM, Orgambide G, Dazzo F, Olivares J, Toro N. 1993. Characterization and symbiotic importance of acidic extracellular polysaccharides of *Rhizobium* sp. strain GRH2 isolated from *Acacia* nodules. *J. Bacteriol.* **175**: 2826-2832.

Lorimer GH, Badger MR, Andrews TJ. (1977) D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase. Improved methods for the activation and assay of catalytic activities. *Anal. Biochem.* **78**: 66-75.

Lowry OH, Roserbrough NJ, Farr AC, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin-Cicolteau reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.

Loyola-Vargas VM, Yanez A, Caldera J, Oropeza C, Robert ML, Quirroz J, Scorer KN. 1988. Nitrogen metabolism in *Canavalia ensiformis* L. DC II. Changing activities of nitrogen assimilating enzymes during growth. *J. Plant Physiol.* **132**: 289-293.

Lucht JM, Bremer E. 1994. Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments: osmoregulation of the high affinity glycine betaine transport system ProU. *FEMS Microbiol. Rev.* **14**: 3-20.

Lutts S, Kinet JM, Bouharmont J. 1996. Effect of various salts and mannitol on ion and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice (*Oryza sativa* L.) callus cultures. *Journal of Plant Physiology* **149**, 186-95. **Motsan Z, Lemer HR, Reinhold L.** 1988. Dependence of chlorophyll synthesis on NaCl or osmotic stress in NaCl-adapted tobacco cells. *Plant Physiol. Biochem.* **26**: 29-34.

Madkour MA, Smith LT, Smith GM. 1990. Preferential osmolyte accumulation: a mechanism of osmotic stress adaptation in diazotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2876-81.

Making SA, Beveridge TJ. 1996. The influence of A-band and B-band lipopolysaccharide on the surface characteristics and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to surfaces. *Microbiol.* **142**: 299-307.

Markhart AH, Smit B. 1990. Measurement of root hydraulic conductance. *Hort Sci.* **25**: 282-287.

Markwell MAK, Hass SM, Bieber LL, Tolberg NE. (1978) A modification of the Lowry procedure to simply protein determination. *Anal. Biochem.* **87**: 206-210.

Mass EV, Hoffman G So J. 1977. Crop salt tolerance current assessment. *J. Irrig. Dra. Div. American ciety of Civil Engineers.* **103**: 115-134.

Mellor RB, Werner D. 1987. Peribacteroid membrane biogenesis in mature legume root nodules. *Symbiosis.* **3**: 75-100.

Mendonça AF, Amoroso TL, Knabel SJ. 1994. Destruction of Gram-negative food-borne pathogens by high pH involves disruption of the cytoplasmic membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 4009-4014.

Meury J, Kohiyama M. 1991. Role of heat shock protein Dnak in osmotic adaptation of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**: 4404-4410.

Miller KJ, Kennedy EP, Reinhold VN. 1986. Osmotic adaptation by Gram negative bacteria: possible role for periplasmic oligosaccharides. *Science.* **231**: 48-51.

Miller KJ, Wood JM. 1996. Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 101-36.

Morrell M, Copeland L. (1985) Sucrose synthase of soybean nodules. *Plant Physiol.* **78**: 149-154.

Nagpal P, Khanuja SPS, Stanfield SW. 1992. Suppression of the *ndv* mutant phenotype of *Rhizobium meliloti* by cloned *exo* genes. *Mol. Microbiol.* **6**: 479-88.

Neelam M, Dwivedi UN. 1990. Nitrogen assimilation in germinating *Phaseolus aureus* seeds under saline stress. *J. Plant Physiol.* **135**: 719-724.

Newcomb W, Tandom SR. 1981. Uninfected cells of soybean root nodules: ultrastructure suggests key role in ureide production. *Science*. **212**: 1394-1396.

Noel KD, Duelli DM, Brewin NJ. 1996. Antigenic change in the lipopolysaccharide of *Rhizobium etli* CFN42 induced by exudates of *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Plant-Microbe Interac.* **9**: 180-186.

Ou-Yang LJ, Udvardi MK, Day DA. 1990. Specificity and regulation of the dicarboxylate carrier on the peribacteroid membrane of soybean nodules. *Planta*. **182**: 437-444.

Palomar J, Leranoz AM, Vinas M. 1995. *Serratia marcescens* adherence: defect of O-antigen presence. *Microbios*. **81**: 107-113.

Peach K, Tracey MV. (1956) *Modern Method of Plant Analysis*. Springer Verlag. Berlin-Gottingen-Heidelber.

Peréz-Alfocea F, Santa Cruz A, Guerrier G, Bolarin MC. 1994. NaCl stress-induced organic changes on leaves and calli of *Lycopersicum esculentum* L. *pennellii* and their interspecific hybrid. *J. Plant Physiol.* **143**: 106-111.

Pérez-Ramírez MC. (1989) *Metabolismo nitrogenado en sistemas radicales de Pisum sativum* L. en simbiosis con *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae*. Memoria de Licenciatura, Universidad de Granada. pp. 195.

Perotto S, Brewin NJ, Kannenberg EL. 1994. Cytological evidence for a host defense response that reduces cell and tissue invasion in pea nodules by lipopolysaccharide-defective mutants of *Rhizobium leguminosarum* strain 3841. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**: 99-112.

Petrusa LM, Winicov L. 1997. Proline status in salt tolerant and salt sensitive alfalfa cell lines and plants in response to NaCl. *Plant physiol. Biochem.* **35**: 303-10.

Poljakoff-Mayber A, Bar-Nun N, Hassan E, Heichal. 1981. Respiratory carbohydrate metabolism of different pea varieties under saline conditions. *Bot. Gaz.* **142**: 431-437.

Prusiner S, Miler RW, Valentin RC. (1972) Adenosine 3'5'-cyclic monophosphate control of the enzyme of glutamine metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **69**: 2922-2926.

Putnoky P, Petrovics G, Kereszt A, Grosskopf E, Cam Ha D, Bánfalvi Z,

- Rai R, Prasad V.** 1983. Salinity tolerance of *Rhizobium* mutants: growth and relative efficiency of symbiotic nitrogen fixation. *Soil Biology Biochem.* **15**: 217-19.
- Rakova MM, Klyshev LK, Kasymbekov BK.** 1978. Effect of sodium salt on the activity of N₂ metabolism enzymes isolated from plants with different salt resistance. *Fiziol. Rast.* **25**: 751-755.
- Rawal SK, Dwivedi UN, Khan BM, Mascarenhas AF.** 1985. Biochemical aspects of shoot differentiation in sugarcane callus. II. Carbohydrate metabolising enzymes. *J. Plant Physiol.* **119**: 191-199.
- Rees DC, Kin J, Georgiadis MM, Komiya H, Chirino AJ, Woo D, Schlessman J, Chan MK, Joshua-Tor L, Santillan G, Chakrabarti P, Hsu BT.** 1993. Crystal structures of the iron protein and molybdenum-iron protein of nitrogenase. p. 170-185. In E. I. Stiefel, D. Coucouvanis, and W. E. Newton (ed). Molybdenum enzymes, cofactors, and model systems. American Chemical Society, Washington D. C.
- Reibach PH, Streeter JG.** 1984. Evaluation of active versus passive uptake of metabolites by *Rhizobium japonicum* bacteroids. *J. Bact.* **159**: 47-52.
- Rigaud J, Puppo A.** (1975) Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids. *J. Gen. Microbiol.* **88**: 223-228.
- Rodriguez P, Dell'amico J, Morales D, Sánchez Blanco MJ, Alarcón JJ.** 1997. Effects of salinity on growth, shoot water relations and root hydraulic conductivity in tomato plants. *J. Agric. Sci.* **128**: 439-444.
- Roth LE, Stacey G.** 1989. Bacterium release into host cells of nitrogen-fixing soybean nodules: The symbiosome membrane comes from three sources. *Eur. J. Cell. Biol.* **49**: 13-23.
- Russa R, Urbanik-Sypniewska T, Lindström K, Mayer H.** 1995. Chemical characterization of two lipopolysaccharide species isolated from *Rhizobium loti* NZP2213. *Arch. Microbiol.* **163**: 345-351.
- San Francisco MJD, Jacobson GR.** 1985. Uptake of succinate and malate in cultured cells and bacteroids of two slow-growing species of *Rhizobium*. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 765-773.
- Santamaría M, Corzo J, Leon-Barrios M, Gutiérrez-Navarro AM.** (1997) Characterisation and differentiation of indigenous rhizobia isolated from Canarian shrub legumes of agricultural and ecological interest. *Plant Soil* **190**: 143-152.

- Santamaría M, Gutiérrez-Navarro AM, Corzo J. (1998)** Lipopolysaccharide profiles from nodules as strains markers of Bradyrhizobium nodulating wild legumes. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 902-906.
- Seeman JR, Critchley C. 1985.** Effects of salt stress on the growth, ion content, stomatal behaviour and photosynthetic capacity of salt-sensitive species, *Phaseolus vulgaris* (L). *Planta* **164**: 151-62.
- Seeman JR, Kobza J. (1988)** Genetic variation in regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity. *Plant physiol. Biochem.* **26**:461-471.
- Shannon M, Grieve CM, François LE. 1994.** Whole-plant response to salinity. In *Plant Environment Interactions*. Wilkinson RF (ed). pp 199-244. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Sharkey T, Seeman JR, Berry JA. (1986)** Regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity in response to changing partial pressure of O₂ and light in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.* **81**: 788-791.
- Sharma SK, Kumar S. 1992.** Effect of salinity on Na⁺, K⁺ and Cl⁻ content in different organs of chickpea and the basis of ion expression. *Biol. Plant.* **34**: 311-317.
- Sheokand S, Dhandi S, Swaraj K. 1995.** Studies on nodule functioning and hydrogen peroxide scavenging enzymes under salt stress in chickpea nodules. *Plant Physiol.* **33**: 561-66.
- Singh RP, Srivastava HH. (1986)** Increase in glutamate synthase (NADH) activity in maize seedlings in response to nitrate and ammonium nitrogen. *Physiol. Plant.* **66**: 413-416.
- Singleton PW, Bohlool BB. 1984.** Effect of salinity on the nodule formation by soybean. *Plant Physiol.* **74**: 72-6.
- Smith LT, Smith GM, D'Souza M, Pocard JA, Le Rudulier D, Madkour MA. 1994.** Osmoregulation in *Rhizobium meliloti*: mechanism and control by other environmental signals. *J. Exp. Zool.* **268**: 162-65.
- Somasegaran P, Hoben HJ, Gurgun V. (1988)** Effects of inoculation rate, rhizobial strain competition, and nitrogen fixation in chickpea. *Agron. J.* **80**: 68-73.
- Stacey G, So JS, Roth LE, Lakshmi B, Carlson R. 1991.** A lipopolysaccharide mutant of *Bradyrhizobium japonicum* that uncouples plant from bacterial differentiation. *Mol. Plant-Microb. Interact.* **4**: 332-40.

Stewart GR, Rhodes D. 1978. Nitrogen metabolism of halophytes. III. Enzymes of ammonia assimilation. *New Phytol.* **80**: 307-16.

Talibart R, Jebbar M, Gouesbet G, Himdikabbab S, Wroblewski H, Blanco C, Bernard T. 1994. Osmoadaptation in rhizobia: ectoine- induced salt tolerance. *J. Bacteriol.* **176**: 5210-17.

Thynn M, Werner D. (1990) A more rapid increase of alcohol dehydrogenase activity in seedling roots of *Vicia faba* by addition of ethylene compared to anaerobiosis. *Angew. Bot.* **64**: 123-131.

Timasheff SN, Arakawa T. 1989. Stabilization of protein structure by solvents. In: Creighton TE, ed. *Protein structure. A Practical Approach*. IRL Press, Oxford. 331-44.

Tsai CM, Frasch CE. (1982) A sensitive silver staining for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **119**: 115-119.

Tu JC. 1975. Structural similarity of the membrane envelopes of rhizobial bacteroids and the host plasma membrane as revealed by freeze-fracturing. *J. Bacteriol.* **122**: 691-694.

Tully R, Hanson A, Neisen C. (1979) Proline accumulation in water-stressed barley leaves in relation to traslocation and the nitrogen budget. *Plant Physiol.* **63**: 518-523.

Tyerman SD, WhiteHead LF, Day DA. 1995. A channel-like transporter for ammonium on the symbiotic interface of nitrogen-fixing plants. *Nature.* **378**: 629-632.

Udvardi MK, Lister DL, Day DA. 1991. ATPase activity and anion transport across the peribacteroid membrane of isolated soybean symbiosomes. *Arch Microbiol.* **156**: 362-366.

Udvardi MK, Ou-Yang L, Young S, Day DA. 1990. Sugar and amminoacid transport across symbiotic membranes of soybean nodules. *Mol. Plant Microbe Interact.*, in press.

Udvardi MK, Price GD, Gresshoff PM, Day DA. 1988. A dicarboxylate transporter on the peribacteroid membrane of soybean nodules. *FEBS Lett.* **231**: 36-40.

Vance CP, Stade S, Maxwell CA. (1983) Alfalfa root nodule carbon dioxide fixation. I. Association with nitrogen fixation and incorporation into amino acids. *Plant Physiol.* **72**: 469-473.

- Vance CP, Stade S. (1984) Alfalfa root nodule carbon dioxide fixation. II. Partial purification and characterization of root nodule phosphoenol pyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* 75: 261-264.
- Vasse J, de Billy F, Camut S, Truchet G. 1990. Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J. Bacteriol.* 172: 4296-4306.
- Verma DPS, Gu X, Hong Z. 1995. Biogenesis of the peribacteroid membrane in root nodules: roles of dynamin and phosphatidylinositol-3-kinase. *See Ref. 152 a*, pp. 467-470.
- Verma DPS, Kazazian V, Zogbi V, Bal AK. 1978. Isolation and characterization of the membrane envelope enclosing the bacteroids in soybean root nodules. *J. Cell. Biol.* 78: 919-936.
- Verma DPS. 1992. Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of *Rhizobium*. *Plant. Cell.* 4: 373-382.
- Vincent JM. (1970) A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria. Blackwell, Oxford.
- Vu JCV, Allen L, Allen Jr, Bowes G. (1984) Dark/light modulation of ribulose biphosphate carboxylase activity in plants from different photosynthetic categories. *Plant Physiol.* 76: 843-845.
- Waisel Y. 1989. Screening for salt resistance. In: Laudelout H, ed. *Proceedings of the 21st Colloque International Potash Institute Bern.* 143-55.
- Yap SF, Lim ST. 1983. Response of *Rhizobium* sp. UMKL 20 to sodium chloride stress. *Arch. Microbiol.* 135: 224-28.
- Yelton MM, Yang SS, Edie SA, Lim ST. 1983. Characterization of an effective salt-tolerant, fast-growing strain of *Rhizobium japonicum*. *J. Gen. Microbiol.* 129: 1537-47.
- Yemm EW, Cocking EC. (1955) The determination of amino acids with ninhydrin. *Analytic* 80: 209-13.
- Yen HE, Grimes HD, Edwards GE. 1995. The effects of high salinity, water-deficit, and abscisic acid on phosphoenolpyruvate carboxylase activity and proline accumulation in *Mesembryanthemum crystallinum* cell cultures. *J. Plant Physiol.* 145: 557-64.

Bibliografía

- Zahran HH, Mohammad EM, Emam MM, Salma SI.** 1997. The chemical composition, structure and ultrastructure of a halotolerant Rhizobia isolated from Egypt. Proceedings of the 9th conference of Microbiology, Cairo, March 25-27. pp121.
- Zahran HH, Sprent JI.** 1986. Effects of sodium chloride and polyethylene glycol on root-hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plants by *Rhizobium leguminosarum*. *Planta*. **167**: 303-309.
- Zahran HH.** 1992. Characterization of root-nodule bacteria indigenous in the salt-affected soils of Egypt by lipopolysaccharide, protein and plasmid profiles. *J. Basic Microbiol.* **32**: 279-287.
- Zaiter H, Baydoun E, Sayyed-Hallak M.** (1994) Genotypic variation in the germination of common bean in response to cold temperature stress. *Plant Soil* **163**: 95-101.
- Zhang XP, Karsisto M, Harper R, Lindström K.** 1991. Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from the root nodules of leguminous trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**: 104-113.
- Zuñiga D.** 1997. Contribución relativa de los simbioses en la fijación de nitrógeno por *Phaseolus vulgaris* en condiciones de estrés salino. Tesis doctoral. Universidad de Granada. 302 pp.



Biblioteca Universitaria de Granada



01053203