

T 4/42

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento 613380163
Nº Copia 1547530x

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 11/6/99
ENTRADA NUM. 2004

METABOLISMO DEL AMONIO Y DE UREIDOS EN
NODULOS DE *Phaseolus vulgaris*: EFECTO DEL ESTRES
SALINO

UNIVERSIDAD DE GRANADA
7 JUN. 1999
COMISION DE DOCTORADO

MARIAM KHADRI EL MOUBAREK

TESIS DOCTORAL

1999



UNIVERSIDAD DE GRANADA

COMISION DE DOCTORADO

Fecha: 08 de Junio de 1999

Su Ref^a.

Nuestra Ref^a.

Fecha de Salida:

Unidad de Origen: COMISIÓN DE DOCTORADO

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 11/6/99.....
ENTRADA NUM. 2004.....

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Registro General
- 9 JUN. 1999
SALIDA N.º 7882

Destinatario:

Ilmo. Sr. DECANO DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS

En cumplimiento del artículo 36 de las Normas Regulatoras de los estudios de Tercer Ciclo de esta Universidad, adjunto se remite un ejemplar de la Tesis Doctoral presentada por el Doctorando D^a.MARIAM KHADRI EL MOUBAREK titulada METABOLISMO DEL AMONIO Y DE UREIDOS EN NODULOS DE PHASEOLUS VULGARIS: EFECTO DEL ESTRES SALINO y dirigida por el Profesor/es Dr/es CARMEN LLUCH PLA, ANTONIO OCAÑA CABRERA con objeto de mantenerla depositada desde el día 07 de Junio de 1999 hasta el día 12 de Julio de 1999 para que pueda ser examinada por cualquier Doctor que así lo desee.

Granada, a 08 de Junio de 1999.

EL SECRETARIO DE LA COMISIÓN

DE DOCTORADO



DIEGO SEVILLA MERINO
Secretario de la Comisión

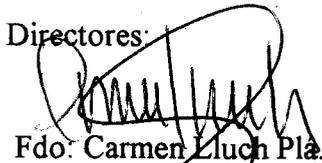
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE GRANADA

Metabolismo del amonio y de ureidos en nódulos de *Phaseolus
vulgaris*: Efecto del estrés salino

Memoria para aspirar al Grado de
Doctor por la Licenciada en Ciencias Biológicas
Doña Mariam Khadri El Moubarek.



Directores:



Fdo: Carmen Lluich Pla.

Catedrático en Fisiología Vegetal.

Facultad de Ciencias.

Universidad de Granada.



Fdo: Antonio Ocaña Cabrera.

Doctor en Ciencias Biológicas.

Facultad de Ciencias.

Universidad de Granada.

Esta Tesis Doctoral se ha realizado en el Laboratorio de Fijación de Nitrógeno del Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Granada, y ha sido financiada por los proyectos INCO-950717 (Contract Number ERBIC18CT960081) concedido por la CCE titulado "Nitrogen Fixation and Yield of Grain Legume in Saline Mediterranean Zones (FYSAME)" y PB95-1159 de la DGICYT titulado "Efecto del Estrés Salino en la Fijación Simbiótica de Nitrógeno: Mecanismos de Adaptación en el Nódulo".

*A mi Padre
A mi Madre*

A mis Hermanos, Yassin y Amal

A Saad

Agradecimientos

Deseo expresar mi más sincera gratitud a todas aquellas personas y entidades, que de alguna manera a lo largo de estos años, me han ayudado a la elaboración de este trabajo.

A la Dra. Carmen Lluch Plá, directora de la presente Tesis, le agradezco todos los conocimientos que me ha transmitido, su disposición, energía y fuerza de voluntad. Con ella he aprendido mucho.

Al Dr. Antonio Ocaña, también director de esta tesis, quiero expresarle mi gratitud por su ayuda y disponibilidad siempre que lo he necesitado.

Quisiera agradecer a la Dra. Luisa María Sandalio del laboratorio de Bioquímica Vegetal De la Estación Experimental del Zaidín de Granada (CSIC), con quien aprendí parte de la metodología realizada en esta Tesis. Al equipo del profesor La Chica, por permitir la realización de los análisis nutricionales de las plantas.

Agradezco también a la Dra. Dulce Nombre Rodríguez, que me enseñó como recolectar savia xilemática de mis plantas, y a su esposo Eduardo Leidi, a los dos por su simpática acogida en Sevilla.

Igualmente expreso mi agradecimiento a todos los miembros del Departamento de Biología Vegetal por su apoyo y simpatía: a los Dres. Jose María Ramos, Luis Romero, Luis García del Moral, a las Dras. Dolores Garrido y Isabel laoui, y a todos los becarios.

A mis compañeras y compañeros de laboratorio: Mariam, con quien compartí innumerables momentos dentro y fuera del laboratorio, uniendonos en una bonita amistad, que espero dure para siempre; Lina, con ella compartí muchos momentos gratos, a demás de un montón de "cortes"!, todo ello nos hizo buenas amigas; Alicia, que a pesar de estar en las Américas, siempre la recordare por su simpatía y espontaneidad; Noel, el cubano del laboratorio, quien sin llevar tanto tiempo con nosotros, parece que siempre hizo parte de nuestra pandilla. Con ellos pasé momentos inolvidables.

A Esther, Rosario y Hanae, que ahora empiezan en este arduo trabajo.

Quiero agradecer también a mis compañeras de piso, Marga, Belén y Pilar, por todos los buenos momentos compartidos.

A mi padre, quien con su apoyo moral y económico hizo posible la realización de todos mis estudios, y a quien debo mucho de lo que soy hoy en día.

A mi madre, por sus constantes muestras de amor, dedicación, cariño y paciencia, y por apoyar y respetar siempre mis decisiones.

A mis hermanos Yassin y Amal, que a pesar de la distancia siempre estuvimos muy unidos. No olvido a mis sobrinitos, nuevos miembros de la familia.

A mi tía y primos, por sus continuas muestras de afecto.

A Saad, quien en estos últimos dos años siempre estuvo muy cerca a pesar de la distancia, día tras día, compartiendo alegrías y preocupaciones. Durante este tiempo, nunca cesó de animarme.

A todos vosotros, gracias.

I. INDICE

I. INDICE

II. INTRODUCCION.....	1
1. Importancia de la fijación de nitrógeno.	3
2. Fijación de nitrógeno en <i>Phaseolus vulgaris</i>	3
3. Proceso de nodulación.....	7
3.1. Formación del nódulo.....	7
3.2. Tipos de nódulos.....	9
3.3. Nodulinas.....	11
3.4. Control de la nodulación.....	13
3.4.1. Efecto del nitrato en la simbiosis.....	14
3.4.2. Mecanismos de inhibición por el nitrato.....	15
4. Metabolismo del nitrógeno atmosférico.....	16
4.1. Nitrogenasa.....	16
4.1.1. Métodos de evaluación de la nitrogenasa o efectividad de la fijación de N ₂	18
4.2. Asimilación del amonio.....	19
4.2.1. Glutamina sintetasa.....	20
4.2.2. Glutamato sintasa.....	22
4.2.3. Glutamato deshidrogenasa.....	24
4.2.4. Aspartato aminotransferasa.....	25
4.3. Metabolismo de ureidos.....	26
4.3.1. Formación de alantoína y ácido alantoico.....	28
4.3.1.1. Xantina deshidrogenasa.....	28
4.3.1.2. Uricasa.....	29
4.3.1.3. Alantoinasa.....	29
4.3.2. Ventajas del transporte de ureidos.....	31
4.3.3. Regulación de la síntesis de ureidos.....	31
5. Salinidad.....	32
5.1. Efecto del estrés salino sobre la planta.....	33
5.2. Efecto del estrés salino en la simbiosis.....	33

5.3. Mecanismos de tolerancia al estrés salino.....	34
5.3.1. Adaptación mediante ajuste osmótico.....	35
5.3.2. Adaptación mediante inclusión y exclusión de iones.....	36
5.3.3. Función de las hormonas en los mecanismos de adaptación.....	38
III. OBJETO.....	41
IV. MATERIAL Y METODOS.....	47
1. Material biológico.....	49
1.1. Microorganismo.....	49
1.1.1. Medios de cultivo.....	49
1.1.2. Conservación de las cepas bacterianas.....	50
1.2. Material vegetal.....	50
1.2.1. Solución nutritiva para plantas.....	50
2. Cultivo de plantas.....	51
2.1. Esterilización y germinación de las semillas.....	51
2.2. Preparación del inóculo.....	51
2.3. Siembra e inoculación.....	51
2.4. Condiciones de la cámara de cultivo.....	52
3. Experimentos realizados.....	52
3.1. Efecto del estrés salino y de la cepa de <i>Rhizobium</i> en simbiosis con <i>Phaseolus vulgaris</i>	52
3.2. Influencia de la dosis de nitrato en la simbiosis <i>Phaseolus vulgaris-Rhizobium tropici</i>	53
3.3. Estudio del crecimiento, fijación y asimilación de nitrógeno en <i>Phaseolus vulgaris</i> a lo largo de la ontogenia del cultivo.....	53
3.4. Efecto del estrés salino en la simbiosis: aplicación en el momento de la siembra.....	54
3.4.1. Estudio de la simbiosis <i>Phaseolus vulgaris</i> var. <i>Africa-Rhizobium tropici</i> CIAT899.....	54
3.4.2. Estudio de la simbiosis <i>Phaseolus vulgaris</i> var. <i>Coco-Rhizobium tropici</i> CIAT899.....	54

3.5. Efecto del cloruro sódico aplicado a la simbiosis ya establecida.	55
3.5.1. Estudio de la simbiosis <i>Phaseolus vulgaris</i> var. <i>Africa-Rhizobium tropici</i> CIAT899.	55
3.5.2. Estudio de la simbiosis <i>Phaseolus vulgaris</i> var. <i>Coco-Rhizobium tropici</i> CIAT899.	55
3.6. Aplicación de ácido abscísico exógeno en condiciones de salinidad.....	56
3.6.1. Estudio de la simbiosis <i>Phaseolus vulgaris</i> var. <i>Africa-Rhizobium tropici</i> CIAT899 en presencia de ABA y de NaCl.	56
3.6.2. Estudio de la simbiosis <i>Phaseolus vulgaris</i> var. <i>Coco-Rhizobium tropici</i> CIAT899 en presencia de ABA y de NaCl.	56
4. Metodología empleada.....	57
4.1. Análisis del crecimiento de las plantas.....	57
4.2. Actividad nitrogenasa: actividad reductora de acetileno (ARA).....	58
4.3. Actividades enzimáticas del metabolismo del amonio.....	58
4.3.1. Preparación de los extractos.	58
4.3.2. Valoración de las actividades enzimáticas.	59
4.3.3. Actividad glutamina sintetasa.....	60
4.3.4. Actividad glutamato sintasa.....	61
4.3.5. Actividad glutamato deshidrogenasa.	61
4.3.6. Actividad aspartato aminotransferasa.	62
4.4. Actividades enzimáticas del catabolismo de purinas.....	62
4.4.1. Preparación de los extractos.	62
4.4.2. Valoración de las actividades enzimáticas.	62
4.4.3. Actividad xantina deshidrogenasa.	63
4.4.4. Actividad uricasa.....	63
4.4.5. Actividad alantoinasa.....	63
4.5. Determinaciones analíticas.....	64
4.5.1. Determinación del contenido de ureidos.....	64
4.5.1.1. Preparación de los extractos.....	64
4.5.1.2. Recolección de la savia xilemática.....	64
4.5.1.3. Valoración del contenido de ureidos.....	64
4.5.1.4. Abundancia relativa de ureidos (RU).....	65

4.5.2. Determinación de aminoácidos libres.	65
4.5.3. Determinación de proteína soluble.	66
4.5.4. Determinación de prolina.	67
4.5.5. Determinación de azúcares solubles totales.	67
4.5.6. Determinación de nitrato.	67
4.5.7. Determinación de clorofilas totales.	68
4.5.8. Determinación de nutrientes en parte aérea y raíz.	68
4.5.8.1. Determinación de nitrógeno.	68
4.5.8.2. Determinación de potasio y sodio.	69
4.5.8.3. Determinación de fósforo.	69
4.5.8.4. Determinación de calcio y magnesio.	69
4.5.8.5. Estimación de la eficiencia en el uso de nutrientes.	69
5. Presentación y estudio estadístico de los resultados.	69
V. RESULTADOS.	71
1. Efecto del estrés salino y de la cepa de <i>Rhizobium</i> en simbiosis con <i>Phaseolus vulgaris</i>.	73
1.1. Análisis del crecimiento.	73
1.2. Fijación de nitrógeno.	75
1.3. Metabolismo de ureidos.	78
2. Influencia de la dosis de nitrato en la simbiosis <i>Phaseolus vulgaris</i>-<i>Rhizobium tropici</i>.	81
2.1. Análisis del crecimiento.	81
2.2. Fijación de nitrógeno.	83
2.3. Actividades enzimáticas.	85
2.4. Contenido de ureidos en nódulos.	89
2.5. Contenido de ureidos, aminoácidos, nitrato y abundancia relativa de ureidos (RU) en savia.	90
3. Estudio del crecimiento, fijación y asimilación de nitrógeno en <i>Phaseolus vulgaris</i> a lo largo de la ontogenia del cultivo.	95

3.1. Análisis del crecimiento.....	95
3.2. Fijación de nitrógeno.....	98
3.3. Actividades enzimáticas del metabolismo nitrogenado en los nódulos radicales de <i>Phaseolus vulgaris</i>	100
3.3. Compuestos nitrogenados en nódulos, raíz y savia.....	103
4. Efecto del estrés salino en la simbiosis: aplicación en el momento de la siembra.	
4.1. Estudio de la simbiosis <i>Phaseolus vulgaris</i> var. <i>Africa-Rhizobium tropici</i> CIAT899.....	108
4.1.1. Análisis del crecimiento.....	108
4.1.2. Fijación de nitrógeno.....	110
4.1.3. Actividades enzimáticas.....	112
4.1.4. Contenido de metabolitos.....	115
4.2. Estudio de la simbiosis <i>Phaseolus vulgaris</i> var. <i>Coco-Rhizobium tropici</i> CIAT899.....	119
4.2.1. Análisis del crecimiento.....	119
4.2.2. Fijación de nitrógeno.....	120
4.2.3. Actividades enzimáticas.....	122
4.2.4. Contenido de metabolitos.....	125
4.3. Comparación de las dos simbiosis.....	128
5. Efecto del cloruro sódico aplicado a la simbiosis ya establecida.....	133
5.1. Estudio de la simbiosis <i>Phaseolus vulgaris</i> var. <i>Africa-Rhizobium tropici</i> CIAT899.....	133
5.1.1. Análisis del crecimiento.....	133
5.1.2. Fijación de nitrógeno.....	135
5.1.3. Actividades enzimáticas.....	136
5.1.4. Contenido de metabolitos.....	139
5.2. Estudio de la simbiosis <i>Phaseolus vulgaris</i> var. <i>Coco-Rhizobium tropici</i> CIAT899.....	142
5.2.1. Análisis del crecimiento.....	142
5.2.2. Fijación de nitrógeno.....	144
5.2.3. Actividades enzimáticas.....	145
5.2.4. Contenido de metabolitos.....	148

5.3. Comparación de las dos simbiosis	151
6. Aplicación de ácido abscísico exógeno en condiciones de salinidad.	156
6.1. Estudio de la simbiosis <i>Phaseolus vulgaris</i> var. <i>Africa-Rhizobium tropici</i> CIAT899 en presencia de ABA y de NaCl.....	156
6.1.1. Análisis del crecimiento.....	156
6.1.2. Fijación de nitrógeno.....	158
6.1.3. Actividades enzimáticas.....	160
6.1.4. Contenido de metabolitos.....	163
6.2. Estudio de la simbiosis <i>Phaseolus vulgaris</i> var. <i>Coco-Rhizobium tropici</i> CIAT899 en presencia de ABA y de NaCl.....	168
6.2.1. Análisis del crecimiento.....	168
6.2.2. Fijación de nitrógeno.....	169
6.2.3. Actividades enzimáticas.....	171
6.2.4. Contenido de metabolitos.....	174
6.3. Comparación de las dos simbiosis.....	178
7. Nutrición mineral.	182
7.1. Efecto del nitrato sobre el contenido de macronutrientes en plantas de <i>Phaseolus</i> <i>vulgaris</i> var. <i>Africa</i>	182
7.1.1. En Parte aérea.....	182
7.1.2. En raíces.....	186
7.1.3. Eficiencia en el uso de los elementos.....	189
7.2. Efecto del NaCl aplicado en el periodo vegetativo sobre el contenido de macronutrientes en plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> var. <i>Africa</i>	193
7.2.1. En parte aérea.....	193
7.2.2. En raíces.....	198
7.2.3. Eficiencia en el uso de los elementos.....	200
VI. DISCUSION	203
1. Efecto del estrés salino y de la cepa de <i>Rhizobium</i> en simbiosis con <i>Phaseolus</i> <i>vulgaris</i>	205

2. Influencia de la dosis de nitrato en la simbiosis <i>Phaseolus vulgaris-Rhizobium tropici</i>	205
3. Estudio del crecimiento, fijación y asimilación de nitrógeno en <i>Phaseolus vulgaris</i> a lo largo de la ontogenia del cultivo.....	207
4. Efecto del estrés salino en la simbiosis: aplicación en el momento de la siembra.....	209
5. Efecto del cloruro sódico aplicado a la simbiosis ya establecida.....	213
6. Aplicación de ácido abscísico exógeno en condiciones de salinidad.....	214
7. Nutrición mineral.....	215
VII. CONCLUSIONES	217
VIII. BIBLIOGRAFIA	223
IX. APENDICE	245

II. INTRODUCCION

“Cuando las células vivientes de la planta deben vivir con otro organismo que forma parte de su protoplasma, es necesario que exista un sutil balance entre el crecimiento de la planta y el de la bacteria”

Beijerinck, 1888

INTRODUCCION

1. IMPORTANCIA DE LA FIJACION DE NITROGENO.

El nitrógeno es el mayor nutriente limitante para la mayoría de las especies vegetales. La absorción y asimilación de nitrógeno por las plantas es considerado como el segundo proceso fisiológico en importancia, después de la fotosíntesis, para el crecimiento y el desarrollo de los cultivos (Newbould, 1989). La fijación de nitrógeno atmosférico por las leguminosas es un proceso que contribuye a aumentar el nitrógeno en los suelos agrícolas. En concreto, la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa contribuye entre 24-584 kg N ha⁻¹ año⁻¹ (Elkan, 1992). Aproximadamente 250 millones de hectáreas de la superficie de la tierra son cultivos de leguminosas, y fijan alrededor de 90 Tg de nitrógeno año⁻¹ (Kinzig y Socolow, 1994). Esta cantidad es bastante asombrosa si se tiene en cuenta que la cantidad total de la enzima responsable del proceso, la nitrogenasa, en el mundo es tan sólo unos pocos kilogramos (Delwiche, 1970). Además, para sustituir el nitrógeno fijado por las leguminosas por amonio producido por el proceso de Haber-Boch se requiere 288 Tg de gasoleo y el costo se eleva a varios millones de dolares anualmente (Vance, 1998).

El proceso de fijación biológica del nitrógeno es un fenómeno fascinante que ha sido ampliamente estudiado en los últimos años, con el único objetivo de aprovechar un potencial natural del suelo que proporciona nitrógeno a bajo coste para el incremento de la productividad de los cultivos, además de reducir la necesidad del uso de fertilizantes nitrogenados e incrementar la fertilidad de los suelos (Shantharam y Mattoo, 1997). Obviamente, desde el punto de vista agrícola existen numerosos objetivos encaminados a mejorar la utilización y la rentabilidad de las leguminosas fijadoras de nitrógeno para la humanidad, por razones económicas, ecológicas y medioambientales (Vance, 1998).

2. FIJACION DE NITROGENO EN *Phaseolus vulgaris*.

La judía (*Phaseolus vulgaris* L.) es una leguminosa grano perteneciente a la tribu *Phaseoleae*, subfamilia *Papilionaceae*, dentro de la familia *Leguminosaceae*.

Fue domesticada en regiones de Latino América desde hace más de 7000 años (Kaplan y Kaplan, 1988; Gepts y Debouck, 1991). Actualmente, se cultivan intensamente en numerosas y grandes áreas de distintos continentes. Se considera potencialmente la mayor fuente de proteínas vegetales tanto en Latino América y Este de Africa, como en la cuenca mediterránea, y contribuye significativamente a la sostenibilidad de los sistemas de cultivo tradicionales. Sin embargo, su producción en peso seco de semillas continua siendo muy bajo, alrededor de 600 kg ha⁻¹ (Woolley *et al.* 1991; Lobo, 1994).

La judía, *Phaseolus vulgaris* L., se considera una herbácea anual, que puede tener un hábito de crecimiento determinado o indeterminado. Las flores son zigomórficas y de colores diversos, independiente genéticamente del color de las semillas, aunque es común encontrar alguna sociación entre el color de las flores y el de las semillas. Las flores pueden ser de color blanco, rosa, purpura y también rojo en *Phaseolus coccineus*. Las flores contienen diez estambres y un único ovario que contiene varios óvulos, fecundados prioritariamente por autofertilización, y se desarrollan vainas y frutos ligeramente curvados. Las semillas pueden ser redondas, alargadas o de forma intermedia, de gran diversidad de colores (Graham y Ranalli, 1997). El tamaño de las semillas oscila entre 50 mg por semilla en colecciones salvajes procedentes de México, hasta 2000 mg por semilla en algunas variedades colombianas. Se pueden encontrar descripciones más detalladas en la revisión realizada por Debouck (1991).

Según Schoonhoven y Pastor-Corrales (1987), se distinguen cuatro hábitos de crecimiento en *Phaseolus vulgaris*:

- **Hábito de crecimiento I**, considerado el crecimiento determinado, pueden presentar entre 3-7, 7-15 o 15-25 hojas trifoliarias en el tallo principal antes de llegar al doble racimo terminal, dependiendo de la procedencia, variedad y otros factores (Debouck, 1991). Se propone que en estas especies, el crecimiento determinado está controlado por un gen recesivo débil (Bassett, 1989).

- **Hábito de crecimiento II**, es un hábito vertical, con tallo erecto y presencia de ramas, frecuentemente sin guía.

- **Hábito de crecimiento III**, es un hábito arbustivo, de tallo frágil y postrado, con numerosas ramas, presenta una guía corta o larga y con variable habilidad para trepar.

- **Hábito de crecimiento IV**, llega a trepar si está sujeta a un soporte adecuado, de tallo frágil, largo y entrelazado, presenta pocas ramas.

Una de las peculiaridades de la arquitectura de las leguminosas grano, y en concreto con el hábito de crecimiento indeterminado, es que puede prolongar el ciclo de crecimiento con consecuencias en la madurez y en la competencia interna de la planta entre el crecimiento reproductor y vegetativo, así como en el llenado de las vainas (Huyghe, 1998).

La germinación en *Phaseolus vulgaris* es epigea, y requiere entre 5-7 días a temperatura del suelo de 21°C. El tiempo de floración varía con el cultivar, la temperatura y el fotoperiodo. Normalmente la floración se inicia entre 28-42 días después de la siembra. La floración en cultivares con hábito de crecimiento I se concentra en un corto periodo de tiempo que oscila entre 5-6 días (Graham y Ranalli, 1997).

Phaseolus vulgaris se cultiva en ocasiones con maíz. Este tipo de cultivos contribuye a controlar el crecimiento de las malas hierbas, reduce la propagación de patógenos, y permite un mejor uso de las áreas cultivadas (Graham y Ranalli, 1997). Las plantas de maíz, de porte vigoroso, cubren a las de judía. Por lo tanto, se requiere que las plantas de judía se siembren un tiempo después que el maíz para evitar su posterior dominación (Pineda, 1992). Las plantas de maíz en asociación con *Phaseolus vulgaris* puede beneficiarse de la fijación de nitrógeno (Graham y Ranalli, 1997). Por otra parte, la judía como leguminosa, puede utilizarse en sistemas de rotación de cultivos para lo cual requiere un buen conocimiento de la fisiología y necesidades nutricionales de la judía y del cultivo en rotación (West y Mallarino, 1996).

Invariablemente, *Phaseolus vulgaris* es pobre en fijación de nitrógeno, existiendo evidencias de variabilidad genotípica en caracteres asociados con el potencial de fijación simbiótica (Park y Buttery 1988; 1989). Además, la respuesta de *Phaseolus vulgaris* a la inoculación es extremadamente variable (Graham, 1981), esto puede ser debido en parte a la gran variabilidad de las cepas de *Rhizobium* que infectan a judía (Kipe-Nolt *et al.*, 1992).

Las judías son noduladas por un grupo heterogéneo de cepas de *Rhizobium* (Martínez-Romero, 1994) que están presentes en casi todos los suelos en los cuales el cultivo ha crecido, y la nodulación por la adición de inoculantes es frecuentemente baja. No hay duda que la promiscuidad descrita a menudo en *Phaseolus vulgaris* va en detrimento de la efectividad de la nodulación (Kipe-Nolt *et al.*, 1992). Actualmente, diversas especies de *Rhizobium* son reconocidas como microsimbionte de *Phaseolus vulgaris* (Martínez-Romero *et al.*, 1991; Segovia *et al.*, 1993).

La limitada capacidad de la fijación biológica de nitrógeno en la mayoría de las variedades de *Phaseolus vulgaris* está reconocida desde hace varios años (Graham, 1981). La cantidad total de nitrógeno procedente de la atmósfera (total Ndfa) y la proporción de nitrógeno de la planta derivado de la atmósfera (% Ndfa) en cultivos de judía son normalmente insuficientes para una producción de semillas económicamente atractiva (Bliss, 1993a). En experimentos de campo se ha observado que algunas líneas de judía fijan suficiente nitrógeno para producir alrededor de 1000-2000 kg semillas ha⁻¹ en presencia de poblaciones efectivas de *Rhizobium* autóctonas o procedentes de la inoculación, y en ausencia de otros factores limitantes (Bliss, 1993a).

La limitación de la fijación de nitrógeno debido al genotipo de la planta puede ser superado por la selección y el desarrollo de nuevos cultivos. La mejora de *Phaseolus vulgaris*, inicialmente basada en la eficacia de la reducción de acetileno, análisis con ¹⁵N, y acumulación de nitrógeno, en varias generaciones de semillas, en la actualidad se debe encaminar a identificar otros aspectos de la variabilidad genética que estimulan la fijación (Bliss, 1993b).

Desafortunadamente, la inoculación con *Rhizobium* para mejorar el rendimiento es ineficaz en judías, comparada con otras leguminosas como soja o haba (Rennie y Dubetz, 1986; Szegi *et al.*, 1991). Esta falta de eficacia puede ser debida a distintas causas: a) baja eficiencia de la cepa inoculada debida a una falta de selección; b) pobre competitividad de la cepa inoculada respecto a las cepas autóctonas; c) escasos estudios de la especificidad en la interacción cepa x cultivar, en el cual se expresa el papel del genotipo/variedad del hospedador en la determinación de la eficiencia de la simbiosis (Fesenko *et al.*, 1995).

Se han realizado estudios de la interacción entre cepas de *Rhizobium* y genotipos de *Phaseolus vulgaris* en condiciones controladas con objeto de comparar la fijación

simbiótica de nitrógeno y la producción de biomasa (Epping *et al.*, 1994), y se ha observado que las respuestas de los parámetros estudiados fueron variables dependiendo de la combinación planta-*Rhizobium*, así como de la edad del cultivo (Peña-Cabriaes *et al.*, 1993; Zuñiga, 1997).

3. PROCESO DE NODULACION.

3.1. Formación del nódulo.

La simbiosis entre la leguminosa y el rizobio del suelo se lleva a cabo por un proceso complejo que finaliza con la formación de un órgano fijador de nitrógeno, el nódulo, en raíces o tallos. El proceso de nodulación envuelve sucesivos pasos que posiblemente empiezan por una respuesta adaptativa del rizobio a una quimioatracción por parte de la planta, resultando finalmente en un contacto físico entre los dos simbioses (Caetano-Anollés, 1997).

En esta fase inicial, denominada usualmente pre-infección, el rizobio debe competir con otros microorganismos, colonizar la rizosfera, adherirse a la superficie de las raíces, responder a la síntesis de compuestos que excretan las plantas, flavonoides y betainas principalmente (Long, 1996) en los exudados radicales, y posiblemente otros factores de la planta presentes en las semillas. Consecuentemente, la bacteria sintetiza y secreta los llamados factores de nodulación (genes *nod*), que actúan como señales moleculares requeridas para el comienzo del programa de desarrollo simbiótico de la planta (Dénarié y Cullimore, 1993; Carlson *et al.*, 1994).

Después de este diálogo molecular o contacto inicial entre la planta y la bacteria, la primera respuesta es la deformación y curvatura de los pelos radicales. Los estudios genéticos indican que es necesaria la presencia de genes *nod*, *nol* y *noe*, que se les denomina factores de nodulación, para la producción de estos cambios en los pelos radicales. Actualmente hay descritos 61 de estos genes (Downie, 1998), que representan una familia de morfogenes de plantas que intervienen en el proceso de diferenciación del nódulo, dirigiendo los primeros eventos de la nodulación. Estos se han implicado en la biosíntesis y secreción de los factores de nodulación, identificados como lipoquitinolisacáridos (LCO) y constan de una estructura formada por entre 3 y 5 restos de N-acetil glucosamina unidos por enlaces β 1-4, y en el carbono 2 del azúcar

del extremo no reductor lleva una cadena de ácido graso de entre 16 y 22 átomos de carbono con diferentes grados de insaturación (Lerouge *et al.*, 1990; Sanjuan *et al.*, 1992).

Además, se han identificado otra serie de genes bacterianos que determinan los componentes de superficie de la bacteria: los exopolisacáridos (genes *exo*), lipopolisacáridos (genes *lps*), glucanos cíclicos (genes *ndv*) y genes *nfe* que están implicados en la competitividad (Mergaert *et al.*, 1997; Downie, 1998; Schultze y Kondorosi, 1998).

Entre los primeros eventos de la nodulación, se produce la movilización del calcio, la alcalinización de las células y la desporalización de la membrana plasmática que da paso al encurvamiento radical y a la siguiente etapa fenológica que es la invasión o penetración del rizobio en los tejidos de la raíz, normalmente formando estructuras tubulares que se denominan cordón de infección, originados por la planta por deposición de material celular semejante al de la pared celular (Callaham y Torrey, 1981). La bacteria prolifera dentro de este cordón de infección y se rodea de una matriz mucopolisacáridica, con glicoproteínas que parecen ser secretadas tanto por la planta como por la bacteria (Kannenberg y Brewin, 1989).

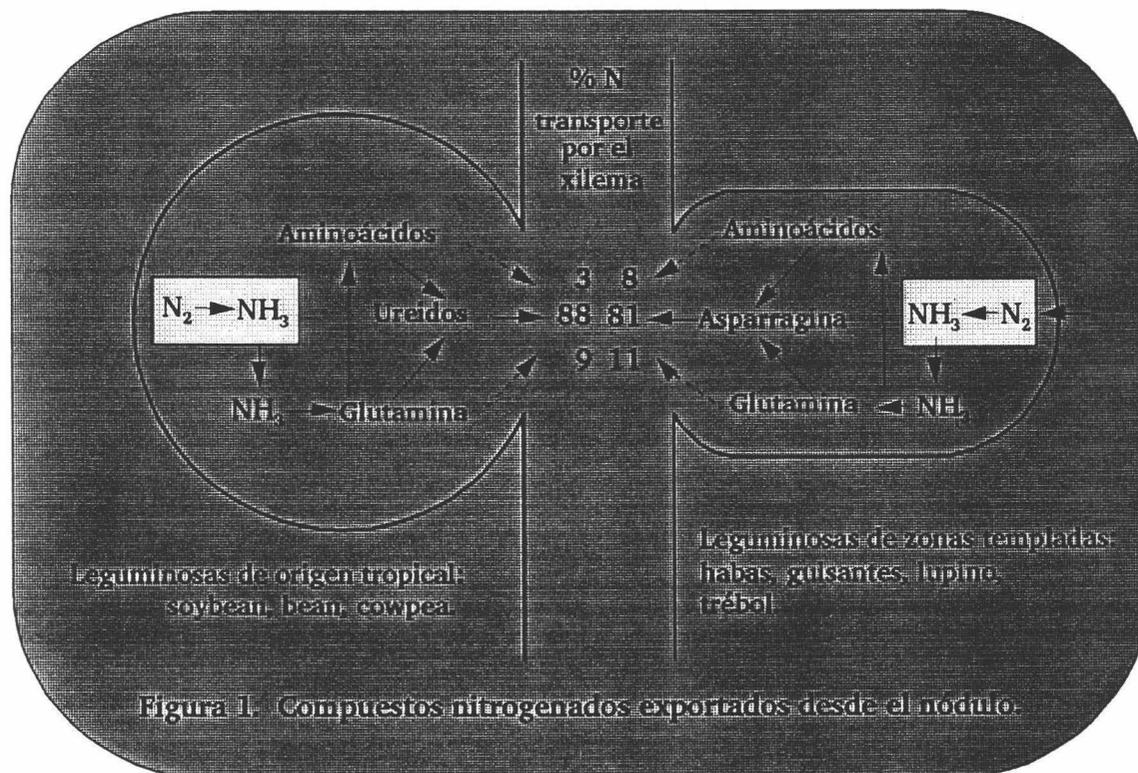
Concomitantemente con este proceso, se desencadena la división celular en la corteza externa o interna de la raíz, formando el primordio nodular, a partir del llamado meristemo nodular. Durante el desarrollo del nódulo, la bacteria interna continúa el proceso de infección en el interior del citoplasma de la planta hospedadora, quedando encapsulada por una membrana peribacteroidal (MPB) de origen vegetal (Nap y Bisseling, 1990). La división en el interior de la membrana continúa con la diferenciación de las bacterias fijadoras de nitrógeno en unas nuevas estructuras que ocupan el citoplasma de cada célula, denominadas bacteroides (Brewin, 1998). Estos comienzan a fijar activamente el nitrógeno atmosférico, gracias a la activación de los genes bacterianos *fix* y *nif*, entre otros.

Las diferentes etapas que conllevan la formación de nódulos funcionales han sido descritas en recientes revisiones concretadas en la quimiotaxis y rizosfera (Bauer y Caetano-Anollés, 1990; Brewin, 1998), intercambio de señales y factores Nod (Kondorosi *et al.*, 1993; Spaink y Lugtenberg, 1994; Fellay *et al.*, 1995) y función de la

planta en la simbiosis (Verma, 1992; Van Spronsen *et al.*, 1994) entre otras revisiones publicadas.

3.2. Tipos de nódulos.

Los nódulos radicales son estructuras altamente organizadas que pueden mostrar importantes diferencias en cuanto al desarrollo del cordón de infección (Rae *et al.*, 1992), la forma, anatomía, organización histológica, fisiología, funcionamiento, en la presencia o no de meristemo apical y en el tipo de metabolitos nitrogenados que exportan (Sprent *et al.*, 1989). En base de estas diferencias, se pueden observar dos tipos de nódulos: **indeterminados** y **determinados** (figura 1). Se ha postulado que la evolución de la nodulación va en dirección de nódulos indeterminados a determinados (Doyle y Doyle, 1997), pero es difícil correlacionar tal evolución con la filogenia de los simbiontes (Legocki *et al.*, 1998).



- **Nódulos indeterminados:** presentes en leguminosas de clima templado como es el caso de *Lupinus* y *Vicia*, de forma alargada, con un meristemo nodular persistente,

y un cordón de infección ancho. A lo largo del eje longitudinal del nódulo desde el ápice hasta su conexión a la raíz se distinguen cuatro zonas: a) zona meristemática (zona I), donde se forman los distintos tejidos del nódulo en desarrollo; b) zona de preinfección o infección (zona II), denominada también zona de invasión, donde la bacteria sigue liberándose de los cordones de infección, y la mitad de las células no están infectadas; c) zona simbiótica (zona III), está ocupada por bacteroides maduros y con fijación activa de N_2 , aunque existen también células pequeñas no infectadas, cuyo papel es el soporte metabólico en el proceso de fijación; y d) zona de senescencia e inactiva en la fijación (zona IV), la cual aparece con el envejecimiento del nódulo (Vasse *et al.*, 1990). Estos nódulos son exportadores de nitrógeno en forma de amidas, tal como se indica en la figura 2 (Atkins, 1991).

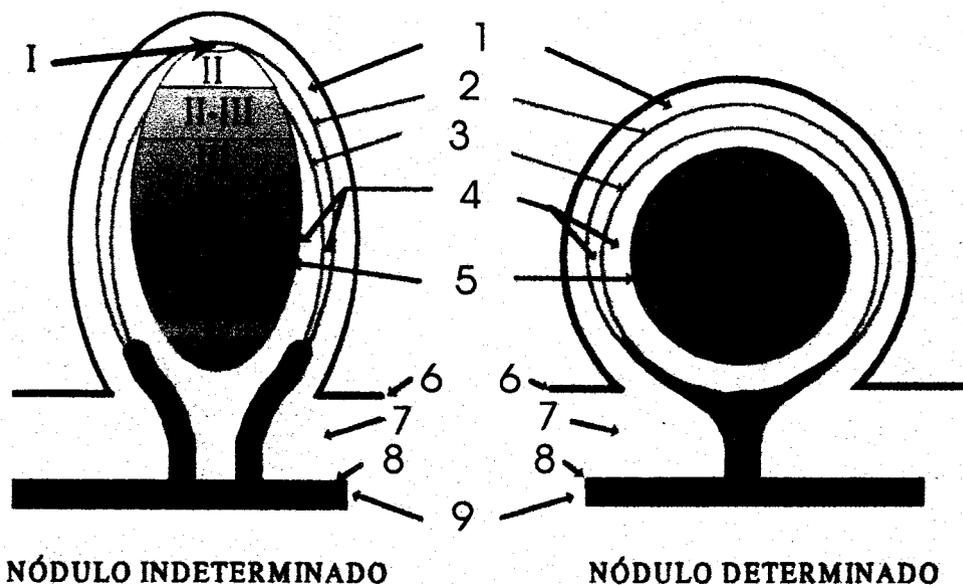


Figura 2. Diferentes zonas en los nódulos radicales de leguminosas. 1 Cortez externo. 2 Endodermis. 3 Hazes vasculares. 4 Parénquima. 5 Cortez interno. 6 Epidermis de la raíz. 7 Cortez radical. 8 Endodermis de la raíz. 9 Hazes vasculares de la raíz.

- **Nódulos determinados:** abundan en leguminosas de origen tropical como *Glycine*, *Phaseolus* y *Vigna*, son nódulos efímeros, de estructura globulosa, básicamente

esféricos, en los que la actividad mitótica cesa durante el desarrollo, siendo la expansión más que la división celular la responsable del incremento del tamaño del nódulo (figura 2). El meristemo rodea completamente al nódulo y determina su crecimiento durante un periodo de tiempo limitado. El cordón de infección es estrecho. La endodermis está cerrada al igual que el tejido vascular, xilema y floema. La senescencia se inicia en el centro del nódulo. Las células no infectadas del nódulo coexisten con las células infectadas. Sin embargo, estudios de ultraestructura y localización citoquímica demuestran que existe una compartimentación celular entre los dos tipos de células, de las secuencias metabólicas que conlleva la biosíntesis de ureidos (Hansen *et al.*, 1993; Aveline *et al.*, 1995). Este tipo de nódulos se caracteriza también por el transporte desde los nódulos del nitrógeno asimilado en forma de ureidos (Atkins, 1991). A través de estudios de inoculación, se ha visto claramente que el tipo de nódulo producido está determinado por la planta y no por el rizobio utilizado en la inoculación (Dart, 1977).

La proporción de estos dos grupos de células infectadas y no infectadas varía según el tipo de simbiosis, sin embargo, en nódulos de *Vigna* y soja, el número de células es el mismo. Se ha descrito un alto nivel de amiloplastos en células no infectadas, lo que sugiere que podrían almacenar los asimilados que liberan a las células infectadas, cuando a éstas le fuera limitante el aporte procedente del floema (Rainbird *et al.*, 1983). Estas células son pequeñas, con numerosos plasmodesmos, con peroxisomas que ocupan un volumen 60 veces superior por unidad de citoplasma que en células infectadas, con numerosos ribosomas libres y un abundante retículo endoplásmico tubular que se ramifica formando una red interconectada por el citoplasma (Lluch, 1991). En este tipo de nódulo, se observa una ausencia de células de transferencia en el periciclo, que se encuentran presentes en el nódulo exportador de amidas. Esto implicaría que las células no infectadas del nódulo determinado son un mecanismo alternativo en la transferencia de solutos (Schubert, 1986).

3.3. Nodulinas.

A lo largo del desarrollo del nódulo, tiene lugar la síntesis de proteínas vegetales específicas del nódulo, las nodulinas (Franssen *et al.*, 1992). Por extensión, este término se aplicó a los genes de la planta que se expresan exclusivamente durante el desarrollo de la simbiosis (van Kammen, 1984). Actualmente se denomina nodulina a todos

aquellos genes que se expresan específicamente durante la formación y funcionamiento del nódulo, y que inducen proteínas o alguna de sus isoformas. Las nodulinas se han clasificado en función del momento de inicio de su expresión. Así, se habla de **nodulinas tempranas** (ENOD) y **nodulinas tardías** (NOD). Las primeras se expresan antes de que el proceso de fijación de nitrógeno comience, durante la implantación y desarrollo del nódulo, y las segundas se manifiestan con el funcionamiento de la nitrogenasa.

- **Nodulinas tempranas:** Las nodulinas tempranas intervienen en el proceso de infección y en la morfogénesis del nódulo (Gloude-mans y Bisseling, 1989), y se inducen a partir de las señales sintetizadas por las bacterias, los llamados factores Nod. Se establecen tres categorías de nodulinas tempranas: a) proteína de preinfección (RH42, RH44, Mtrip1; Cook *et al.*, 1995); b) nodulinas involucradas en la organogénesis nodular (Enod2, GmEnod13, N-40, Msenod12A; Bauer *et al.*, 1994); c) nodulinas que intervienen en la infección (Enod12, PsEnod5, Enod40, GmEnod55, PsEnod14, GmEnod315; Pichon *et al.* 1992, Allison *et al.*, 1993). Recientemente, se han identificado dos nuevas nodulinas, MtN1 (*Medicago trunculata* Nodulin gene) y MtN13, que son genes homólogos a proteínas asociadas a reacciones de defensa de la planta, que se activan durante la simbiosis (Gamas *et al.*, 1998).

- **Nodulinas tardías:** Las nodulinas tardías se inducen justo antes de la fijación y asimilación del nitrógeno atmosférico (Nap y Bisseling, 1990). Entre ellas, se incluyen enzimas involucradas en: la asimilación de nitrógeno como la glutamina sintetasa (GS; Padilla *et al.*, 1991) y glutamato sintasa (GOGAT; Chen y Cullimore, 1988); el metabolismo carbonado, tales como anhidrasa carbónica (CA; de la Peña *et al.*, 1997), fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC; Deroche y Carrayol, 1989) y sacarosa sintasa (SS; Thummler y Verma, 1987); la biogénesis de amidas y ureidos, aspartato aminotransferasa (AAT; Egli *et al.*, 1989) y uricasa (uricasa II; Schubert 1986); también se consideran nodulinas tardías algunas proteínas de la membrana peribacteroidal (Fortin *et al.*, 1985) y la leghemoglobina (Appleby, 1984), considerada como la nodulina más abundante y fundamental para el mantenimiento del ambiente microaeróbico necesario para la fijación de nitrógeno (Verma, 1992; Muñoz *et al.*, 1996).

La leghemoglobina se considera la proteína soluble más abundante en nódulos y se encuentra frecuentemente en forma modificada *in vivo* (Appleby, 1984). Esta funciona como hemoproteína portadora de oxígeno, facilitando su difusión hacia los bacteroides (O'Brian, 1996). Pertenece a una familia de multigenes (Brisson y Verma, 1982; Appleby, 1992), está codificada por genes de tres intrones. El primer y tercer intrón están posicionados de forma similar al intrón de los genes *hb* de vertebrados, lo que sugiere que las leghemoglobinas vegetales y animales derivan de un ancestro común (Arredondo-Peter *et al.*, 1998). La leghemoglobina es menos estable que las mioglobinas de los vertebrados, debido a los altos rangos de autooxidación y disociación del grupo hemo (Hargrove *et al.*, 1997).

3.4. Control de la nodulación.

La planta controla la infección y posteriormente la eficiencia de la nodulación a través de mecanismos no lo suficientemente claros, pero responsables del desarrollo de la simbiosis (Caetano-Anollés, 1997).

Se ha descrito que la formación del nódulo en leguminosas y el desarrollo de la división celular está estrechamente controlada y depende de la existencia de un mecanismo interno denominado de autorregulación (Caba *et al.*, 1998), dependiente de la parte aérea, que controla la masa nodular y el número de nódulos en el sistema radical (Caetano-Anollés y Gresshoff, 1991). Las respuestas de defensa de la planta y de hormonas vegetales (etileno) parecen involucradas en el desarrollo de la infección (Ligero *et al.*, 1986). El etileno, hormona natural importante del crecimiento y desarrollo de la planta, es un fuerte inhibidor de la nodulación cuando se aplica de forma exógena (Ligero *et al.*, 1987, 1991; Hirsch y Fang, 1994). Análisis fisiológicos y genéticos de una mutante hiperinfectada de *Medicago truncatula* muestran la insensibilidad de la nodulación al etileno, lo que sugiere una función de esta hormona vegetal en el control de infección (Penmetza y Cook, 1997). Algo semejante ocurre con las mutantes hipernodulantes (Sheng y Harper, 1997) y con las supertolerantes al nitrato (mutantes *nts*) (Carroll *et al.*, 1985).

La planta también controla características asociadas con la función nodular, como el transporte del nitrógeno y carbono al interior del nódulo, la capacidad de liberación del hidrógeno, la fijación de nitrógeno, la barrera de oxígeno, e incluso la

senescencia del nódulo. (Werner, 1992; Hunt y Layzell, 1993; Parsons *et al.*, 1993; Streeter, 1995).

Además, el establecimiento y función de la simbiosis está también regulada por el nitrógeno del suelo (Carroll y Mathews, 1990; Gresshoff, 1993), y la planta invierte niveles importantes de nitrógeno y carbohidratos en la formación de los nódulos, estando por esta razón la simbiosis estrictamente regulada. La formación así como la función del nódulo son sensibles a señales externas, especialmente la disponibilidad de nitrógeno en el suelo (Parson *et al.*, 1993). La inhibición de la nodulación por el nitrato es un fenómeno común en especies de leguminosas. Se ha propuesto que este fenómeno, de efecto localizado en raíces, depende de una interacción entre el nitrato y las señales de autorregulación (Carroll y Mathews, 1990). Caba *et al.* (1998) sugieren que existe una relación entre la autorregulación y la inhibición de la nodulación por el nitrato.

3.4.1. Efecto del nitrato en la simbiosis.

La concentración de nitrógeno combinado determina si su disponibilidad es estimulante o perjudicial para la fijación de nitrógeno. En los primeros estados de la simbiosis, las plántulas de leguminosas requieren una dosis mínima de nitrógeno, ya que estas sólo disponen del nitrógeno procedente de los cotiledones (Sánchez-Guerrero Cantó, 1996) y del nitrógeno del suelo. Si la cantidad de nitrógeno es muy restrictiva, se puede apreciar un retraso del desarrollo de las plantas y reducción de la cosecha. Una vez la fijación simbiótica establecida, la simbiosis por sí sola es autosuficiente en nitrógeno. Por tanto, moderadas dosis de nitrógeno mineral al inicio del cultivo, pueden ser beneficiosas para el crecimiento de la plántula y subsecuentemente para la fijación de nitrógeno (Goi *et al.*, 1993). Hay que señalar que las leguminosas grano requieren nitrógeno durante el llenado de la vaina, debido al intenso transporte de nitrógeno desde los órganos vegetativos a los reproductores (Da Silva *et al.*, 1993).

La respuesta a una concentración de nitrato viene condicionada por el genotipo de la planta (Cherney y Duxbury, 1994; Caba *et al.*, 1993; Ocaña *et al.*, 1998), por la forma de aplicación de nitrato (Tanaka *et al.*, 1985), por la etapa de crecimiento en que se suministra el nitrato (Truchet y Dazzo, 1982), por el tiempo de exposición al nitrato (Caba *et al.*, 1995), por la especie de leguminosa (Sagan *et al.*, 1993), por la cepa de *Rhizobium* utilizada (Hervas *et al.*, 1991), por la fuente de nitrógeno utilizada (Serraj

et al., 1992), por estrés ambiental como déficit hídrico (Irigoyen *et al.*, 1992) y salinidad (Cordovilla *et al.*, 1996a) entre otros factores.

La inhibición de la nodulación por el nitrato es un proceso que ha sido ampliamente estudiado (Becana *et al.*, 1984; Streeter, 1988), y se expresa fuertemente en los primeros pasos de la infección (Malik *et al.*, 1987). La aplicación de nitrato puede inhibir la acumulación de rizobios en pelos radicales y de lectinas en la superficie de la raíz (Sherwood *et al.*, 1984), reprimir la emergencia y curvatura del pelo radical, la iniciación de la infección y la formación del nódulo (Harper, 1987), disminuir la actividad nitrogenasa (Waterer y Vessey, 1993), reducir la producción de flavonoides e isoflavonoides por la raíz (Coronado *et al.*, 1995), afectar directamente a los genes *nod* del *Rhizobium* (Verma, 1992), reducir el suministro de energía a los bacteroides (Serraj *et al.*, 1992), alterar el balance de fitohormonas nodulares (Caba *et al.*, 1998), promover la formación de radicales libres inductores de la senescencia (de Lorenzo *et al.*, 1994), afectar el metabolismo del nitrato (Caba *et al.*, 1995) y del amonio en nódulo (Cordovilla *et al.*, 1994), entre otros procesos.

3.4.2. Mecanismos de inhibición por el nitrato.

La primera hipótesis relacionada con la inhibición de la fijación de nitrógeno por el nitrato se basó en la limitación de fotoasimilados a los nódulos, como consecuencia de los requerimientos energéticos para la reducción de nitratos (Oghoghorie y Pate, 1971). Streeter (1988) demostró que la concentración de fotoasimilados disminuye con el nivel de nitrato.

Trinchant y Rigaud (1980) propusieron que la inhibición de la nitrogenasa por nitratos tiene lugar a través de los productos finales y las enzimas de la asimilación de amonio procedente de la fijación.

Otra causa de la inhibición de la fijación de nitrógeno por el nitrato, sería la acumulación de nitrito, potencial inhibidor de la nitrogenasa. El nitrito alcanzaría la región infectada de los nódulos, modificaría el potencial de la membrana peribacteroidal y afectaría la fijación de nitrógeno (Arrese-Igor *et al.*, 1998). La acumulación de nitritos en el nódulo puede inducir la inhibición enzimática y la senescencia nodular (Becana *et al.*, 1989).

Algunos autores indican un efecto indirecto del nitrato por incremento en la resistencia a la difusión de O_2 a través del cortex nodular, provocando una reducción de disponibilidad de O_2 para el bacteroide (Minchin *et al.*, 1986; Carroll *et al.*, 1987; Schuller *et al.*, 1988; Vessey *et al.*, 1988). En un intento de apoyar esta hipótesis, Minchin *et al.* (1989) propone que la inhibición de la fijación simbiótica por el nitrato ocurre en dos etapas: a) un incremento inicial en la resistencia a la difusión de O_2 , seguida de b) una entrada del nitrato en el interior del bacteroide causando inhibiciones y daños en su metabolismo.

La inhibición por *feedback* es un mecanismo a través del cual la actividad nitrogenasa puede ser regulada por el exceso de nitrógeno de la planta. Este mecanismo ha sido investigado, al igual que otros factores reguladores, responsables de la inhibición de la fijación simbiótica en respuesta al nitrógeno combinado, y se ha encontrado que es operativo en la regulación de la absorción de nitrato por la planta (Breteler y Arnoizis, 1985; Muller y Touraine, 1992). Experimentos realizados en este ámbito sugieren que un factor de la parte aérea controla la tolerancia de la fijación de nitrógeno al nitrato, demostrando que la señal del estado del nitrógeno en la planta está originada en la parte aérea (Burns 1991; Raffin y Roumet, 1994). Estos resultados sugieren que la regulación de la nitrogenasa puede tener lugar a través de cambios en la composición de los suministros del floema hacia el nódulo (Bacanamwo y Harper, 1997).

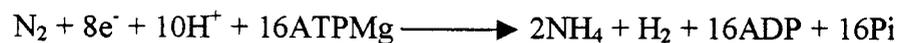
4. METABOLISMO DEL NITRÓGENO ATMOSFERICO.

La bacteria reduce el nitrógeno a amonio y lo intercambia por compuestos carbónicos procedentes de la planta. El carbono reducido se utiliza como fuente energética para el metabolismo de la bacteria, incluyendo la fijación de nitrógeno. La fijación simbiótica tiene por lo tanto un importante significado energético y agrícola (Udvardi y Day, 1997).

4.1 Nitrogenasa.

El nicho ecológico de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa es el nódulo, estructura altamente organizada en la cual se lleva a cabo la reducción del N_2 a NH_4^+

catalizada por el complejo enzimático denominado nitrogenasa, en el interior de las células rizobiales transformadas en bacteroides (Bergersen y Turner, 1967). La nitrogenasa está formada por dos componentes: la MoFe-proteína o componente I y la Fe-proteína o componente II (Merick, 1992; Dean y Jacobsen, 1992; Dean *et al.*, 1993). Ambas metaloenzimas catalizan la reducción de N₂ en una reacción dependiente del MgATP en la que se producen dos moléculas de amonio y una de hidrógeno. Esta reducción catalítica del N₂ se denomina fijación biológica de nitrógeno, y la estequiometría de la reacción está indicada como:



Por cada molécula de N₂ reducida, se requieren 10 protones, 8 para la formación de amonio y dos para generar H₂ (Newton, 1993). La formación de H₂ por la nitrogenasa se considera una reacción poco rentable que reduce la eficiencia de la enzima alrededor del 25% (Phillips, 1980). La nitrogenasa puede también reducir otros sustratos, en los que se incluye el acetileno (Hardy *et al.*, 1968).

La ecuación descrita anteriormente evidencia que la fijación biológica de N₂ es un proceso con alto consumo energético, de manera que el uso de carbono procedente de la fotosíntesis para este proceso necesitaría teóricamente entre el 10-20% de la fotosíntesis total de la planta (Phillips, 1980; Schubert, 1981). Los fotoasimilados procedentes de la parte aérea son la fuente energética principal de los esqueletos carbonados necesarios para el crecimiento y mantenimiento del nódulo, la respiración bacteroidal, y la fijación del nitrógeno (Hunt y Layzell, 1993).

En experimentos donde se incrementa la fotosíntesis (activación de la radiación, etc.) o se inhibe de la fotorrespiración (Bedmar y Olivares, 1980), se aprecia una estimulación de la masa nodular, fijación y acumulación de nitrógeno (Zanetti *et al.*, 1996). Así, se observa que la reducción de la fotosíntesis por factores externos tienen como consecuencia una rápida inhibición de la asimilación del nitrógeno atmosférico (Vance y Heichel, 1991). Sin embargo, la fotosíntesis no parece ser el principal factor limitante de la fijación biológica. Varios autores establecen que la limitación de oxígeno provocada por una serie de factores ambientales, está estrictamente asociada a la inhibición de la actividad nitrogenasa (Vessey *et al.*, 1988; Serraj y Sinclair, 1996),

siendo la limitación de oxígeno el principal factor limitante de la fijación simbiótica (Hunt y Hayzell, 1993; Hartwig y Nosberrger, 1994).

El oxígeno provoca una rápida e irreversible desnaturalización de la nitrogenasa. La gran mayoría del ATP requerido por esta enzima proviene de la fosforilación oxidativa dependiente de O₂ que tiene lugar en las células rizobiales. Por lo tanto, la enzima es funcional sólo a bajas concentraciones de O₂ ambiental (Wycoff *et al.*, 1998). De hecho, la difusión de oxígeno se considera una característica adaptativa a lo largo del desarrollo de la simbiosis (Hunt y Layzell, 1993). La corteza externa del nódulo está separada de las células internas por una capa compacta, que presenta espacios intercelulares. En esta capa de células se localiza la barrera de difusión de O₂ (de Lorenzo *et al.*, 1993), identificada por la localización de una glicoproteína (de Lorenzo *et al.*, 1998), que es la que permite mantener la concentración de oxígeno en las células infectadas y no infectadas entre 10-30 nM (cerca de la anaerobiosis). En condiciones adversas, se incrementa la resistencia de la difusión de O₂, mientras que en condiciones favorables, se aprecia una disminución de la difusión con objeto de permitir un aumento de la actividad nitrogenasa (Vance, 1998). Kuzma *et al.* (1999) han identificado la barrera de limitación del oxígeno midiendo el "pool" adenilatos y la carga energética en las células infectadas del nódulo, expuestas a distintos nivel de O₂.

Otra contribución importante para dilucidar el dilema de la difusión de oxígeno es la leghemoglobina, proteína que lo fija en el interior de las células infectadas. Esta proteína facilita la difusión del oxígeno a través del citosol vegetal hasta el bacteroide en condiciones que permiten la fosforilación oxidativa sin inactivar nitrogenasa (Appleby, 1992; Hill, 1998; Arredondo-Peter *et al.*, 1998).

4.1.1. Métodos de evaluación de la nitrogenasa o efectividad de la fijación de nitrógeno.

Se han desarrollado diferentes métodos para la estimar de la cantidad de nitrógeno procedente de la fijación simbiótica: **a)** reducción de acetileno; **b)** diferencia del contenido de nitrógeno; **c)** producción del cultivo; **d)** dilución del isótopo ¹⁵N (Nutman, 1976; Heichel, 1987; Hardarson y Danso, 1993; Herridge y Danso, 1995); **e)** contenido de ureidos en el xilema (Herridge y Danso, 1995).

a) Análisis de reducción de acetileno (ARA), está basado en el hecho de que la nitrogenasa no sólo reduce N_2 a NH_3 , sino también reduce el acetileno (C_2H_2) a etileno (C_2H_4), cuantificado por cromatografía gaseosa, utilizando un detector de ionización de llama (Hardy *et al.*, 1968; Vessey, 1994). Este método, aún cuando ha sido cuestionada su utilidad (Herridge *et al.*, 1994), puede ser considerado en estudios comparativos de programas de mejora (Minchin *et al.*, 1986), aunque no sea aconsejable en estudios de campo (Minchin *et al.*, 1994).

b) Método de diferencia de N_2 , basado en la determinación de la diferencia en el contenido de nitrógeno orgánico reducido entre cultivos fijadores y cultivos no fijadores de N_2 (Heichel, 1987; Herridge y Danso 1995). El parámetro necesario para esta medición es el nitrógeno total de la planta, determinado por el método de Kjeldahl, entre otros.

c) Método de la productividad, se basa en determinar la diferencia de peso fresco o seco total de la planta y/o cultivo en condiciones fijadoras o no fijadoras.

d) Método de la dilución isotópica del ^{15}N , consiste en marcar las reservas de N_2 en el suelo con un isótopo estable $^{15}NO_3^-$ y/o $^{15}NH_4^+$, y determinar la relación entre el N_2 de la planta en forma de ^{15}N y en forma de ^{14}N (forma mayoritariamente predominante en la naturaleza (99.65%)) (Herridge y Danso, 1995; Chalk, 1996).

e) Método de ureidos, se basa en realizar el análisis de la concentración de ureidos (alantoína y ácido alantoico) en el nódulo y en la savia del xilema.

4.2. Asimilación del amonio.

El primer producto estable de la fijación de nitrógeno en nódulos de leguminosas es el amonio (Ta *et al.*, 1986), que es transferido desde el bacteroide a través de la membrana peribacteroidal al citoplasma de la célula hospedadora (Bergersen y Turner, 1967). Puesto que el amonio es tóxico para las células vegetales, debe ser rápidamente transformado a metabolitos no tóxicos (Lea *et al.*, 1990). Por tanto, debe ser asimilado en el citoplasma vegetal, formando solutos orgánicos nitrogenados que serán transportados fuera del nódulo por el xilema (Pate y Atkins, 1983).

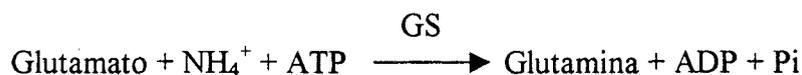
El amonio atraviesa la MPB por difusión pasiva a favor de un gradiente de concentración. El pH ácido presente en el espacio peribacteroidal favorece la reducción de NH_3 a NH_4^+ . Se ha evidenciado la existencia de un transportador específico para el

movimiento rápido de este ión (Udvardi y Day, 1997), identificándose un canal de cationes monovalentes capaz de transportar el amonio a través de la MPB (Tyerman *et al.*, 1995). Este canal se abre para permitir el paso del amonio desde el simbiosoma cuando se genera el potencial de membrana a través de la MPB.

Está ampliamente aceptado que el primer paso en la asimilación del amonio nodular es catalizado por las enzimas del ciclo de la glutamato sintasa: glutamina sintetasa y glutamato sintasa (Robinson *et al.*, 1991; Oaks, 1994). Esta vía de asimilación de amonio se induce durante el desarrollo del nódulo, y envuelve la expresión de isoformas específicas de la GS y GOGAT nodulares en algunas simbiosis (Atkins, 1991).

4.2.1. Glutamina sintetasa.

Atkins *et al.* (1988) indica que la glutamina es el producto orgánico inicial de la fijación, en una reacción catalizada por la glutamina sintetasa y que requiere ATP, incorporando el amonio en la posición amida del glutamato.



En la mayoría de los organismos eucariotas fotosintéticos, incluyendo las algas, y diversos órganos de las plantas, se localizan dos grupos de proteínas GS, una citosólica (GS₁) y otra en la matriz estromática del cloroplasto llamada GS₂ (Hirel y Gadal, 1982; Botella *et al.*, 1988). En general, la GS₁ se expresa predominantemente en raíz y tallo. La proporción relativa de las dos isoenzimas en hojas varía según, el tipo de fotosíntesis que realizan la especie vegetal (Hirel *et al.*, 1993), el estado de desarrollo (Lam *et al.*, 1996), la luz (Migge *et al.*, 1996), y la fuente de nitrato (Mäck, 1995). Sin embargo, se asume que la mayoría de las plantas tienen una proporción mayor de isoenzima GS₂ (70%) que de GS₁ (30%) (Ridley y McNally, 1985).

La GS ha sido purificada en numerosos órganos y especies vegetales (Lara *et al.*, 1984; Caba *et al.*, 1997), mostrando un peso molecular relativo de 350 KDa, compuesta de ocho subunidades comprendidas en un rango de 38-45 Kda (McNally y Hirel, 1983). Estudios posteriores en raíz permitieron aislar el mensajero que codifica la única subunidad de 38 Kda de la enzima específica de raíz, denominada GS_r, codificada por un solo gen nuclear (Tingey *et al.*, 1998). En nódulos de *Phaseolus vulgaris*, se ha

caracterizado un sistema GS que muestra dos isoenzimas definidas como GS_{n-1} y GS_{n-2}. La isoforma GS_{n-1} está formada por un polipéptido específico considerado como nodulina específica (Egli *et al.*, 1989), y la GS_{n-2} compuesta por el polipéptido β que también se expresa en raíz y hojas (Lara *et al.*, 1984).

La GS constituye el 2% de la proteína soluble en nódulos de leguminosas (McParland *et al.*, 1976) pudiendo alcanzar el 5% en el caso de *Vicia faba* (Caba *et al.*, 1997). Se localiza dentro de la corteza interna en nódulos de *Alnus* (McParland *et al.*, 1976), en bacteroides y zona infectada del nódulo (Forde *et al.*, 1989). No difunde fácilmente de la zona de infección nodular (Miao *et al.*, 1991), por lo que la expresión de esta nodulina está regulada por el amonio procedente de la fijación y del nivel de dióxido de carbono (Ortega *et al.*, 1992).

La GS nodular puede ser un factor limitante en la fijación de N₂ (Pacovsky y Fuller, 1991), pues se ha encontrado correlación entre ambos procesos (Cordovilla *et al.*, 1994), aunque esta correlación depende del genotipo de la planta (Caba *et al.*, 1994) y de la cepa de *Rhizobium* (Cordovilla *et al.*, 1996a). La actividad GS en el citosol nodular decae con los niveles de nitrato en el medio, mientras la nitrogenasa todavía contribuye a la asimilación de nitrógeno (Becana *et al.*, 1984). Sin embargo, Vézina *et al.* (1988) determinan que los nitratos inducen la actividad GS en plastidios radicales, incluso el amonio provoca el mismo efecto en nódulos no efectivos de plantas de alfalfa (Groat y Vance, 1981). También se observa que la actividad GS nodular se estimula con el amonio procedente de otros procesos alternativos de la fijación biológica en presencia de nitratos en el medio (Vance y Heichel, 1981).

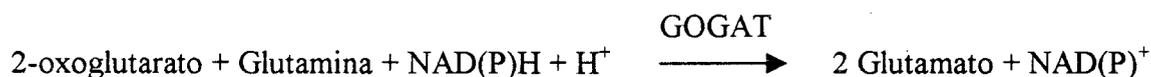
Algunos tipos de estrés pueden inducir cambios en la integridad del nódulo, de tal manera que los niveles de proteínas y enzimas sean drásticamente reducidos (Gordon *et al.*, 1990), provocando cambios en la expresión de determinados genes. En nódulos de soja, la oscuridad induce una caída de los mRNAs que codifican la GS (Gordon *et al.*, 1993), la temperatura también afecta esta actividad (Shukla *et al.*, 1997), la aclimatación al frío (Charest y Phan, 1990), y el estrés hídrico (Ramanjulu y Sudhakar, 1997). El estrés hídrico provoca una removilización del nitrógeno a la hoja, lo que provoca un incremento de la expresión de la GS₂ plastídica en hoja (Bauer *et al.*, 1997).

La inhibición de la actividad GS por la salinidad ha sido descrita en tomate (Berteli *et al.*, 1995), en *Canavalia ensiformis* (Miranda-Ham y Loyola-Vargas, 1988)

en nódulos de *Vicia faba* (Cordovilla *et al.*, 1995c), y en *Lolium multiflorum* (Sagi *et al.*, 1998), aún cuando esta inhibición puede ser atenuada por la adición de nitrato en el medio (Garg *et al.*, 1993). La asimilación de amonio vía GS en condiciones de salinidad se ve afectada por la utilización de vías alternativas (Miranda-Ham y Loyola-Vargas, 1998). Incluso el efecto de la sal sobre la actividad GS es distinta en cultivos de células o en tejidos vegetales (Bourgeais-Chaillou y Guerrier, 1992). La complejidad del efecto de la sal podría deberse a cambios en las isoformas de la GS en respuesta al estrés osmótico (Bhullar *et al.*, 1996) o bien a cambios en la biogénesis del glutamato (Berteli *et al.*, 1995) que interviene en la formación de prolina considerada metabolito clave en la respuesta a la sal, como se comentara posteriormente.

4.2.2. Glutamato sintasa.

La glutamato sintasa cataliza una reacción de aminación reductiva, que produce dos equivalentes de glutamato utilizando los piridín nucleótidos reducidos como donadores de electrones.



En plantas superiores se conocen tres formas distintas de GOGAT que difieren en peso molecular, cinética y localización dentro de la planta (Lea *et al.*, 1990): **a)** una dependiente de la ferredoxina (EC 1.4.7.1), abundante en los tejidos fotosintéticos y localizada en el estroma de los cloroplastos, en algas verdes y en cianobacterias fotosintéticas (Botella *et al.*, 1988); **b)** otra dependiente del NADH (EC 1.4.1.1.4), encontrada en nódulos radicales de leguminosas y en dos isoformas denominadas NADH-GOGAT I y NADH-GOGAT II, de localización plastidial en el tejido central del nódulo (Chen y Cullimore, 1988); **c)** otra dependiente de NADPH (EC 1.4.1.1.3), también localizada en nódulos (Chen y Cullimore, 1988).

Generalmente, la actividad NADH-GOGAT en nódulos es considerada mayor que la Fd-GOGAT. Chen y Cullimore (1988) encontraron dos isoenzimas de NADH-GOGAT en *Phaseolus vulgaris*, de las cuales una es específica del nódulo, la GOGAT II. Ambas isoformas se localizan en los plastidios de las células del nódulo, pero mientras la GOGAT I se encuentra en la corteza y región central del nódulo, con igual actividad, la GOGAT II se localiza exclusivamente en el tejido central, y la

actividad se incrementa hasta 20 veces durante el desarrollo de los nódulos, habiéndose sugerido que participa en la asimilación del amonio producido por los bacteroides (Chen *et al.*, 1990).

La GOGAT se caracterizó y purificó en nódulos de altramuz (Boland y Benny, 1977), de soja (Boland *et al.*, 1982), de *Vigna* (Shelp *et al.*, 1983), judía (Chen y Cullimore, 1989), alfalfa (Andersson *et al.*, 1989; Gregerson *et al.*, 1993) y haba (Cordovilla *et al.*, 1999d). Es una flavoproteína sulfogénica monomérica con un peso molecular aproximado de 230 KD. No es inhibida por el N-etil-maleimida, lo que indica que ni el hierro ni el grupo sulfidrilo ni los restos de histidina participan en el centro activo de la enzima (Anderson *et al.*, 1989). Los anticuerpos anti-GOGAT de nódulos de alfalfa no reconocieron ninguna proteína en raíz y hoja, lo que indicaría que podría tratarse de una nodulina. Con anticuerpos anti-GOGAT de nódulos de *Vicia faba* presenta reacción cruzada con un polipéptido del mismo peso molecular de nódulos de leguminosas transportadoras de ureidos (Cordovilla *et al.*, 1999d).

La actividad GOGAT se estimula con el desarrollo del nódulo (Groat y Vance, 1981) y decae con la inhibición de la fijación de nitrógeno, siendo poco activa en nódulos inefectivos (Chen *et al.*, 1990). Vance *et al.* (1983) informan que la relación GOGAT/GS es inferior en leguminosas transportadoras de ureidos que de amidas. Por tanto, si la actividad GOGAT es inferior en leguminosas tropicales, el N-amino de la glutamina puede ser directamente utilizado en la biosíntesis de purinas (Boland y Schubert, 1982).

La presencia de nitrato en el medio favorece la pérdida de acoplamiento en el ciclo de la glutamato sintasa (GS/GOGAT), producida por una saturación de la GS (Becana *et al.*, 1984). El aumento de nitrato reduce ambas actividades aunque depende del genotipo de la planta (Caba *et al.*, 1995), y de la dosis de nitrato (Cordovilla *et al.*, 1999b), siendo la GS más sensible que la NADH-GOGAT al nitrato (Caba *et al.*, 1994). Sin embargo, en el periodo de hambre de nitrógeno que pasan las leguminosas desde que finaliza el nitrógeno de los cotiledones hasta que se inicia la fijación de nitrógeno, no se afecta la actividad de esta enzima (Hungria *et al.*, 1991).

En condiciones de estrés osmótico, el ciclo GS/GOGAT ha demostrado ser una importante fuente de glutamato (Rhodes y Hande, 1989). En condiciones de salinidad se induce la Fd-GOGAT en hojas de tomate favoreciendo la producción de glutamato

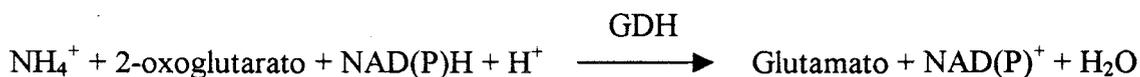
requerido para la síntesis de prolina (Lea *et al.*, 1990). Sin embargo, efectos contrarios encuentran Bougeais-Chaillou *et al.* (1992) en *Glycine max*, y Billar y Boucand (1980) en *Phaseolus vulgaris*. No obstante, Bougeais-Chaillou *et al.* (1992), utilizando diversos tejidos y células vegetales concluyen que la sensibilidad a la sal de la GOGAT es distinta. Algo semejante describen Garg *et al.* (1993), cuando observan que la inhibición de la actividad GOGAT por la salinidad depende del estado de crecimiento (floración, prefloración, etc.). En nódulos de *Vicia faba* (Cordovilla *et al.*, 1996b) se observa que esta actividad se inhibió más intensamente por la sal que la GS, por lo que podría limitar la asimilación de amonio, incluso en plantas fertilizadas con nitrato (Cordovilla *et al.*, 1999b).

4.2.3. Glutamato deshidrogenasa.

La glutamato deshidrogenasa (GDH) es una enzima que puede intervenir en la asimilación de amonio en ciertas condiciones adversas. Su función en la asimilación de amonio sigue siendo un tema de discusión (Atkins, 1991). La función de la GDH se centra en la reasimilación del amonio y en la síntesis de glutamato en la mitocondria. Otra alternativa funcional se relaciona con la oxidación del glutamato para proporcionar esqueletos carbonados al ciclo de ácidos tricarbónicos (Oaks, 1994). Este papel catabólico de la enzima implica un mecanismo de regulación para el metabolismo del carbono y del nitrógeno (Robinson *et al.*, 1991).

Se ha sugerido que en plantas superiores, la glutamato deshidrogenasa (GDH) es más bien activa en la desaminación del glutamato que en la incorporación de amonio a esqueletos carbonados (Robinson *et al.*, 1991). Se han efectuado experimentos donde se prueba que la glutamato deshidrogenasa es activa *in vivo* en la oxidación del glutamato y se cuestiona su función en la asimilación del amonio (Oaks, 1994).

Esta enzima cataliza la aminación reductiva del 2-oxoglutarato utilizando el amonio y piridín nucleótidos como donadores de electrones.



Su localización es prioritariamente mitocondrial (Stewart *et al.*, 1980). Una pequeña fracción de la actividad total se ha detectado en cloroplastos y difiere de la mitocondrial en que utiliza NADPH y en su afinidad por el amonio (Srivastara y Singh,

1987). Se han descrito siete isoenzimas que pueden aumentar con el amonio de la planta (Nagel y Hartman, 1980) y que tienen una función catabólica o anabólica variable (Cammaerts y Jacobs, 1985).

Se ha observado un aumento en la actividad GDH en la senescencia de la planta (Commaerts y Jacobs, 1984). También, en condiciones adversas y de estrés salino (Cordovilla *et al.*, 1996b), el comportamiento de esta enzima es singular, ya que se ha descrito que la actividad glutamato deshidrogenasa es adaptativa, estando implicada en el mantenimiento de los niveles de glutamato intracelular que no pueden ser mantenidos por el ciclo GS/GOGAT (Muñoz-Blanco y Cárdenas, 1989).

4.2.4. Aspartato aminotransferasa.

La aspartato aminotransferasa es una holoenzima dimérica que cataliza la siguiente reacción reversible (Ireland y Joy, 1985):



Análisis bioquímicos revelan que la AAT tiene un papel importante en la asimilación simbiótica de nitrógeno, a juzgar por los elevados niveles de actividad de sus isoenzimas en nódulos de leguminosas (Vance y Gantt, 1992). Esta enzima está ampliamente distribuida en plantas y caracterizada como una forma dimérica, detectada en nódulos de varias especies de leguminosas (Griffith y Vance, 1989; Gantt *et al.*, 1992). Se ha sugerido la existencia de múltiples isoformas habiéndose purificado y caracterizado en nódulos de alfalfa y altramuz. De hecho, se han podido separar dos formas: AAT-P1 y AAT-P2 en nódulos de altramuz (Shelp y Atkins, 1984), y otras dos AAT-1 y AAT-2 en nódulos de alfalfa (Farnham *et al.*, 1990). La forma 1 es abundante en raíz, de localización citosólica y se expresa la forma constitutiva, mientras que la forma 2 de la AAT aparece fundamentalmente en nódulo, con localización citosólica en alfalfa y asociada a plastidios en *Lupinus* (Shelp y Atkins, 1984), y representa más del 90% de la actividad total. Se ha sugerido que la expresión y regulación de la AAT-2 en nódulos puede ser diferente en leguminosas productoras de amidas y en productoras de ureidos.

La AAT estaría implicada en: a) la incorporación del nitrógeno fijado en aspártico y asparagina; b) la regulación del flujo de carbono y nitrógeno entre el citosol

del hospedador y el microsimbionte; c) la transferencia de equivalentes de reducción entre diferentes compartimentos subcelulares en las células infectadas. Se describen otras funciones de esta enzima, como su implicación en la transformación malato-aspartato en plantas C-3 (Ireland y Joy, 1985) y su función en el transporte del carbono entre células del mesófilo y de la vaina en plantas C-4 (Hatch y Mau, 1973).

4.3. Metabolismo de ureidos.

Los ureidos son compuestos nitrogenados orgánicos, cíclicos o acíclicos, derivados o estructuralmente relacionados con la urea, con una relación C:N de 1:1. Representan los primeros productos de la fijación de nitrógeno (Schubert y Boland, 1990). Aunque son muchos los tipos de compuestos que se han descrito en plantas, la alantoína, ácido alantoico (leguminosas) y la citrulina (*Alnus*) son los ureidos con papel clave en la asimilación, transporte y almacenamiento de nitrógeno en estas plantas. Su síntesis tiene lugar en nódulos y son los compuestos nitrogenados mayoritarios exportados a las hojas en leguminosas de origen tropical (Herridge *et al.*, 1978; Streeter, 1979; Pate *et al.*, 1980), donde serán utilizados como donadores de nitrógeno reducido para la síntesis de aminoácidos y proteínas.

Estudios con ^{15}N confirman que el nitrógeno de los ureidos representa una fuente de nitrógeno para la síntesis de proteínas en semillas (Atkins, 1982). Las leguminosas exportadoras de ureidos pertenecen a la tribu *Phaseoleae*. Es interesante mencionar que, en este tipo de leguminosas, los ureidos representan el 80-99% del nitrógeno orgánico en la savia xilemática durante el crecimiento vegetativo y reproductor (Atkins, 1982; Pate y Atkins, 1983; Schubert, 1986).

Actualmente no hay lugar a dudas de que la alantoína y el ácido alantoico en nódulos provienen de la oxidación de purinas sintetizadas *de novo* en el nódulo (Boland y Schubert, 1982), lo que requiere precursores de la biosíntesis de purinas (Schubert, 1981; Reynolds *et al.*, 1982). Por consiguiente, en la biogénesis de alantoína y ácido alantoico, se consideran varios procesos: a) suministro de precursores para la biosíntesis de purinas; b) biosíntesis de purinas; c) oxidación de las purinas a alantoína y ácido alantoico.

Los principales precursores de la biosíntesis de purinas son la ribosa-5-fosfato, glicina, glutamina y aspártico; seis moléculas de ATP; dos fragmentos de C_1 -activado:

meteniltetrahidrofolato (metenil-FH₄) y formil-FH₄, y como producto de partida el fosforibosilpirofosfato (PRPP) procedente de la ribosa activada con dos moléculas de ATP por la ribokinasa y la PRPP sintetasa (Lluch, 1991).

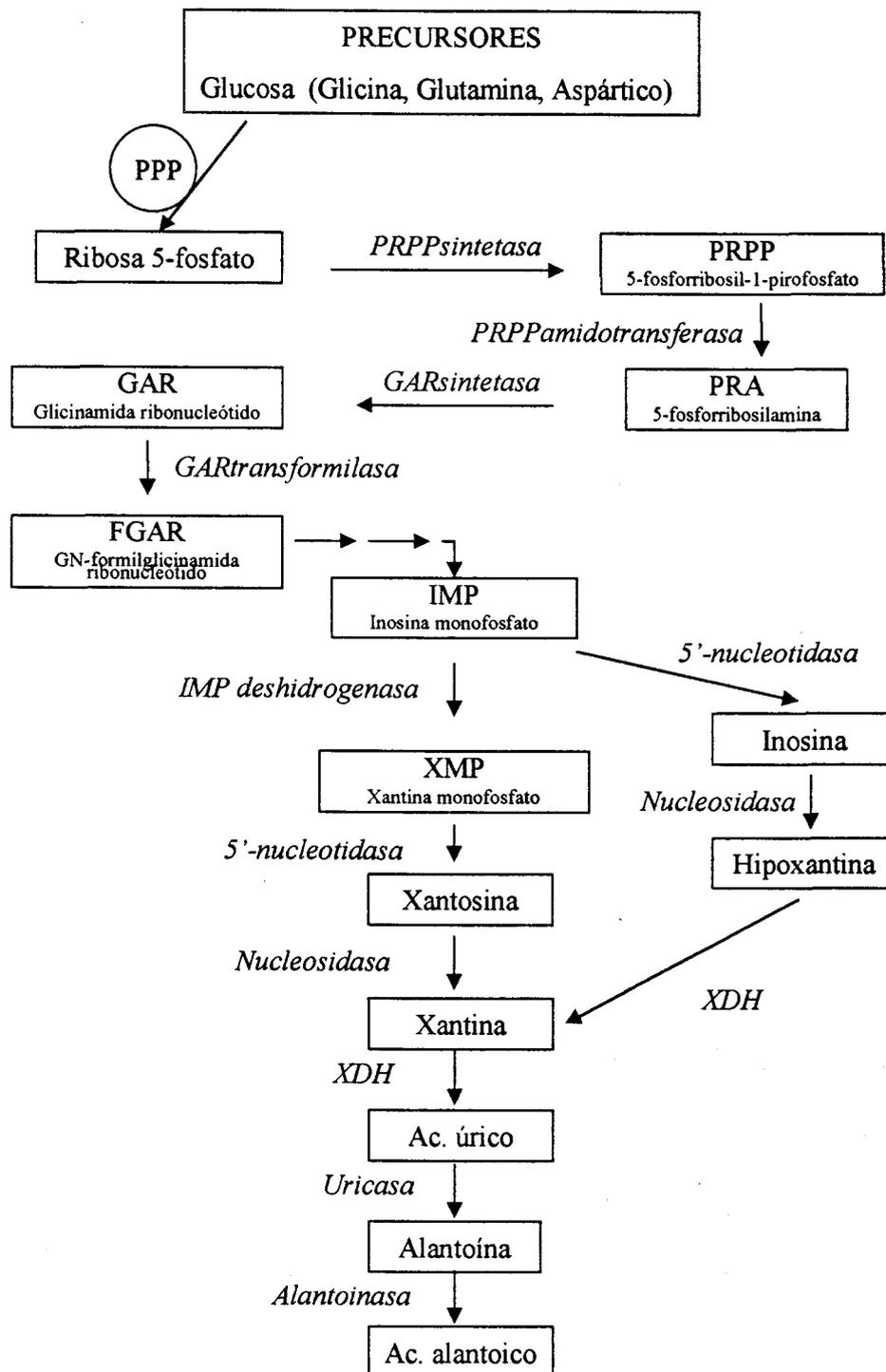


Figura 3. Ruta metabólica para la biogénesis de alantoína y ácido alantoico en los nódulos radicales de las leguminosas.

La biosíntesis de purinas representa una vía compleja, que se puede recopilar en una serie de pasos: **a)** formación de 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP) a partir de ribosa-5-fosfato, punto inicial de la ruta; **b)** seguidamente tiene lugar la primera reacción específica catalizada por la PRPP aminotransferasa (PRAT); **c)** incorporación de glicina en purinas con la participación de una fosforribosil glicinamida sintetasa; **d)** incorporación del carbono 3 de la serina; **e)** incorporación de un carbono procedente de CO₂ en el inosin monofosfato (IMP). Se llega así al IMP, primer producto de la biosíntesis de purinas en nódulos de leguminosas tropicales, a partir del cual se inicia una vía oxidativa para la síntesis de ureidos (Ligero y Lluch, 1992).

4.3.1. Formación de alantoína y ácido alantoico.

El IMP es oxidado a xantina monofosfato (XMP) por una IMP deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ (figura 4). En los siguientes pasos intervienen enzimas importantes del catabolismo de purinas: xantina deshidrogenasa (XDH), uricasa, y la enzima responsable de la formación de ácido alantoico: alantoinasa. Estas están principalmente localizadas en las células no infectadas del nódulo (Schubert y Boland, 1990).

4.3.1.1. Xantina deshidrogenasa.

Es una molibdoflavoproteína, de localización citosólica en la célula infectada. Está constituida por FAD y Mo-pterina (dos aceptores de electrones), y dos centros Fe₂S₂ como grupo prostético (Palmer y Olson, 1980; Mendel, 1997). Cataliza la oxidación de la xantina o la hipoxantina, intermediario del catabolismo de purinas en una vía alternativa, a ácido úrico en una reacción dependiente del NAD⁺, siendo el alopurinol un fuerte inhibidor de la reacción (Coughlan, 1980).

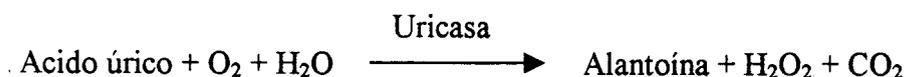


La XDH ha sido identificada en plantas superiores, tanto en hojas (Nguyen y Feierabend, 1978; Nguyen, 1983; Montalbini, 1998), como en nódulos de *Phaseolus vulgaris* (Boland, 1981) y *Glycine max* (Boland *et al.*, 1983). En todos los casos, esta enzima presenta una considerable actividad en presencia de NAD⁺ y otros oxidantes

artificiales, pero no reacciona a concentraciones significativas de oxígeno (Montalbini, 1998).

4.3.1.2. Uricasa.

El ácido úrico sufre una descarboxilación oxidativa en alantoína y dióxido de carbono, liberando H₂O₂. La uricasa actúa como urato: oxígeno oxidorreductasa que utiliza el oxígeno como oxidante.

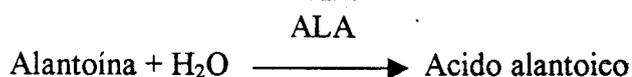


Se ha observado que la uricasa está asociada a glioxisomas de diversos tejidos de semillas (endodermo, perispermo, cotiledones) de distintas especies (Theimer y Beever, 1971; Damsz *et al.*, 1994), también en peroxisomas de raíces de maíz (Parish, 1972), en cotiledones e hipocotilos de soja durante el desarrollo de semillas y la germinación temprana (Tajima *et al.*, 1991), y en peroxisomas intactos de células no infectadas de nódulos de soja (Kouchi *et al.*, 1989).

Se ha caracterizado la enzima en raíz (uricasa I) y en nódulos (uricasa II), siendo esta última una forma específica de la nodulina denominada N-35. Se expresa específicamente en peroxisomas de las células no infectadas del nódulo. Se ha purificado en nódulos de soja (Bergmann *et al.*, 1983) y de judía (Sánchez *et al.*, 1987), y en hipocotilos de judía (Capote-Mainez y Sánchez, 1997). La enzima constituye aproximadamente el 2% del total de proteína soluble nodular (Sánchez *et al.*, 1987). Se ha observado que los eventos que tienen lugar durante el desarrollo de nódulo son importantes en la regulación de la expresión de genes de la uricasa II (Padilla *et al.*, 1991).

4.3.1.3. Alantoinasa.

La formación de ácido alantoico a partir de alantoína consiste en una rotura hidrolítica de un enlace amido interno de ésta, catalizada por la alantoinasa (alantoína amidohidrolasa).



Se propone que se trata de una proteína glucosilada, asociada a la fracción microsomal del retículo endoplásmico. En leguminosas, esta enzima ha sido detectada en hojas, tallo, nódulos y frutos durante el crecimiento vegetativo y reproductor (Herridge *et al.*, 1978; Hanks *et al.*, 1981). Se propone que el Mn^{2+} tiene la función de mantener la estabilidad de la enzima (Wells y Lees, 1992). Esta actividad suele ser estable a temperaturas altas (Webb y Lindell, 1993), llegando a permanecer activa más de una hora a $70^{\circ}C$, una vez purificada de nódulos y cotiledones de soja (Bell y Webb, 1995). Ha sido también purificada y caracterizada en hojas, semillas y nódulos de *Glycine max* (Webb y Lindell, 1993; Bell y Webb, 1995), en nódulos de *Cajanus cajan* (Amarjit y Singh, 1985), de *Vigna radiata* (Mary *et al.*, 1981), y de *Phaseolus vulgaris* (Wells y Lees, 1992). La alantoinasa no es una nodulina, sin embargo la secuencia de datos y diferencia en la inmunoreactividad sugiere que en soja existe una forma específica del nódulo (Bell y Webb, 1995).

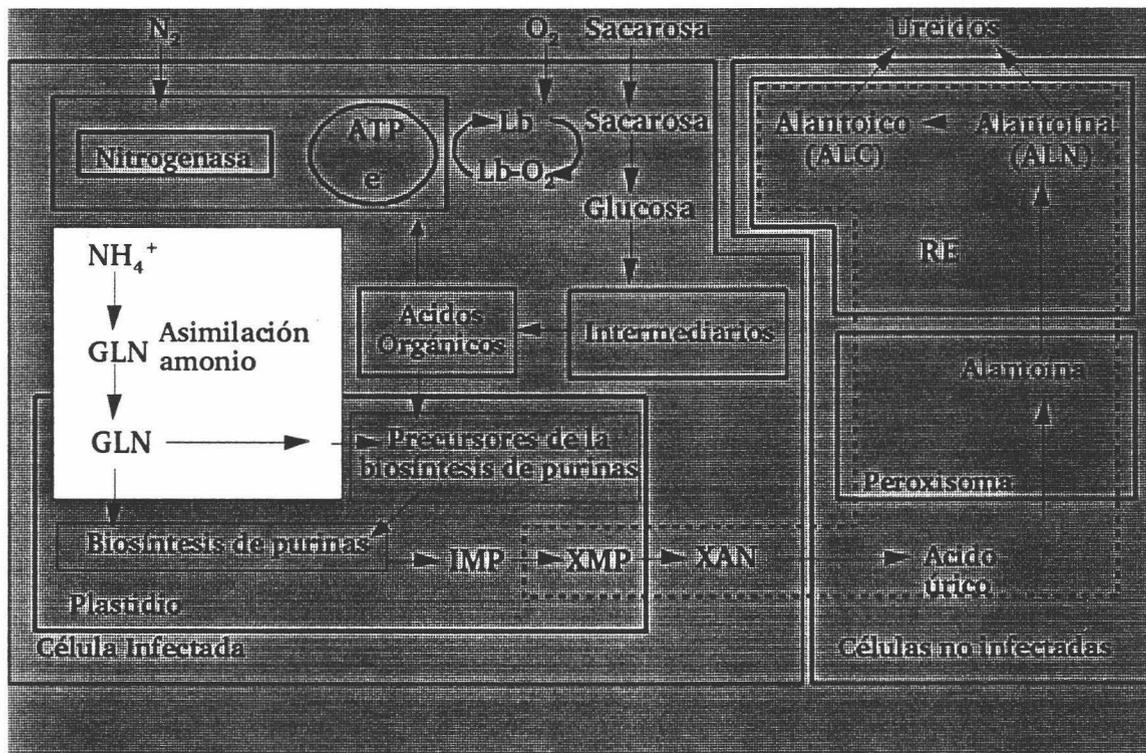


Figura 4. Compartimentación celular de la asimilación de amonio, síntesis de purinas *de novo* y biosíntesis de ureidos, en nódulos de leguminosas exportadoras de ureidos.

Existe una cierta compartimentación de estos procesos, con una determinada localización subcelular para la mayor parte de las enzimas implicadas. Las células infectadas llevan a cabo la asimilación inicial del amonio producido por el bacteroide y la biosíntesis de purinas, así como los precursores necesarios; mientras que en las células no infectadas tiene lugar la oxidación de la xantina a ácido úrico y la formación de alantoína y ácido alantoico (Schubert y Boland, 1990), tal como se visualiza en la figura 4.

4.3.2. Ventajas del transporte de ureidos.

El transporte de ureidos presenta varios aspectos positivos: a) la correlación existente entre fijación de nitrógeno y ureidos del xilema sugiere que se pueden utilizar para la estimación del grado de actividad fijadora de nitrógeno; esto se determina mediante métodos experimentales sensibles y rápidos (Argillier *et al.*, 1989); b) el coste metabólico en ATP de la síntesis de ureidos se estima en menos de 50% de lo que necesita la asparagina por átomo de nitrógeno (Schubert, 1986), lo que permite a la planta invertir menos energía en la síntesis de asimilados nitrogenados del nódulo; c) las plantas exportadoras de ureidos utilizan más eficientemente el carbono de los nódulos debido a la baja relación C/N que presentan los ureidos; d) mientras que las aminas están implicadas en muchos aspectos del metabolismo, los ureidos transportan y almacenan nitrógeno; esta especialización de los ureidos confiere a la planta mayor control de su metabolismo nitrogenado (Atkins, 1982); e) las leguminosas transportadoras de ureidos toleran mejor la presencia de nitrato o amonio en el medio radical que las transportadoras de amidas, llegando incluso a cambiar la síntesis de ureidos por amidas (Lluch, 1991).

4.3.3. Regulación de la síntesis de ureidos.

La regulación de la biogénesis de ureidos en nódulos (o en otros tejidos) está en continua investigación. Los puntos potenciales en la regulación metabólica incluyen la regulación de las enzimas de biosíntesis de purinas y la regulación de las enzimas de oxidación de purinas (Atkins *et al.*, 1988). Otras formas de regulación serían a nivel molecular, inducción o represión de isoenzimas y compartimentación de las mismas. La biosíntesis de ureidos en nódulos fijadores de N_2 , en plantas transportadoras de ureidos,

es la principal fuente de nutrición nitrogenada para la planta. Por esta razón, el proceso de biosíntesis debe ser muy activo y sólo estaría limitado por la disponibilidad de precursores (Schubert y Boland, 1990).

5. SALINIDAD.

El concepto de estrés ha sido ampliamente desarrollado en los últimos 60 años. Cualquier condición desfavorable o sustancia que afecte o bloquee el metabolismo de la planta, crecimiento o desarrollo, puede considerarse como estrés. Varios factores naturales o antropogénicos pueden inducir un estrés a las plantas y a la vegetación en general. Se puede diferenciar entre el efecto del estrés a corto plazo (*short term*) y a largo plazo (*long term*), considerando el primero como un nivel de estrés bajo que puede ser parcialmente compensado por aclimatación y adaptación; y el segundo como un nivel de estrés intenso o crónico, que causaría daños considerables, afectando a las células y eventualmente conllevaría a la muerte de la planta (Lichtenthaler, 1996).

La salinidad afecta más del 40% de los suelos irrigados que son especialmente las áreas más productivas del mundo, como áreas mediterráneas, en sur Asia y América del sur, entre otras regiones. Esto es debido a efectos acumulativos de riego con aguas que contienen sales disueltas (Flowers y Yeo, 1988). Los diferentes suelos afectados por sales se distribuyen en desiertos, semidesiertos, suelos de sedimento fértiles, valles, zonas costeras, y en sistemas irrigados (Szabolcs, 1994).

La alta concentración de sales provoca: **a)** una reducción del potencial osmótico de la solución del suelo que reduce la disponibilidad de agua para la planta; **b)** un deterioro en la estructura física del suelo que disminuye la permeabilidad del agua y limita la fase gaseosa; y **c)** una toxicidad de iones específicos (Amzallag y Lerner, 1994). La salinidad también puede afectar indirectamente al crecimiento de la planta a través de la inhibición de los procesos biológicos del suelo, tales como mineralización de nitrógeno, nitrificación, entre otros procesos (Alvarez-Rogel *et al.*, 1997). Los cationes frecuentemente asociados a la salinidad son el calcio, magnesio y sodio, y los aniones, cloruro, sulfato y bicarbonato. En ocasiones, el potasio y el nitrato pueden favorecer el estrés salino, y cuando el pH es superior a 9, el bicarbonato se convierte en un anión importante (Dudley, 1994).

5.1. Efecto del estrés salino sobre la planta.

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 (Munns, 1993). 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 (Yeo, 1998).

El grado en que el estrés salino afecta al crecimiento de las plantas viene determinado por el genotipo (Cordovilla *et al.*, 1995d), las condiciones climáticas, las propiedades del suelo, el riego y las prácticas de cultivo (Rhoades, 1972). El efecto de la salinidad sobre los tejidos y el desarrollo de los distintos órganos de la planta se puede reflejar en las alteraciones del crecimiento y desarrollo de la planta. Según Volkmar *et al.* (1998), el efecto directo de la sal se refleja en: a) el grado de división celular; b) la disminución de duración de la elongación celular; y c) la ontogenia de la planta. Incluso, Bernstein *et al.* (1993) observaron que la mayor sensibilidad al estrés salino ocurre en el periodo de máxima elongación, mientras que Romero y Maranon (1994) describen una aceleración del desarrollo fenológico en algunas especies de vegetales.

5.2. Efecto del estrés salino en la simbiosis.

La leguminosas inoculadas con *Rhizobium* son generalmente más sensibles al estrés salino que el microsimbionte. Se ha descrito que el nivel de sal que inhibe la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa difiere de la concentración que inhibe el crecimiento de los simbiontes individualmente (Bordeleau y Prévost, 1994). Además, se tienen evidencias de que la tolerancia a la sal de las leguminosas puede variar dependiendo del modo de adquisición del nitrógeno; por ejemplo, en leguminosas de origen tropical parece que la planta en simbiosis tolera mejor la salinidad que la fertilizada con nitratos, mientras que en alfalfa, la inhibición del crecimiento fue similar en ambas situaciones (Lauchli, 1984). Se ha descrito también que las leguminosas que producen nódulos indeterminados son más tolerantes a la sal y al estrés hídrico que los que forman nódulos determinados (Sprent y Zahran, 1988). Los nódulos indeterminados tienen un

potencial de regenerar la actividad de las estructuras afectadas por el estrés del que carecen los nódulos determinados (Bordeleau y Prévost, 1994).

La salinidad puede afectar directamente al proceso de infección del *Rhizobium* asociado con los primeros pasos de la iniciación del nódulo y, probablemente, debido a la sensibilidad a la sal de los lugares de infección (Singleton y Bohlool, 1984), limitar el desarrollo del nódulo (Craig *et al.*, 1991), reducir el número y peso de nódulos por planta (Hafeez *et al.*, 1988), inhibir el funcionamiento normal del nódulo (Hoppmans *et al.*, 1984) reduciendo la actividad nitrogenasa (Wilson, 1985), afectar negativamente el contenido de nitrógeno en raíz y parte aérea (Elsheikh y Wood, 1995). Estos últimos autores indicaron que la fijación de nitrógeno fue más sensible a la sal que el crecimiento y que el uso de cepas tolerantes puede producir un incremento de la fijación biológica de nitrógeno respecto a las cepas sensibles. Zou *et al.* (1995) describieron que las respuestas en la nodulación y fijación de nitrógeno de plantas de *Acacia ampliceps* inoculadas con una cepa tolerante de *Rhizobium* fue mucho menos afectada a 200 mM NaCl que la inoculada con una cepa sensible. La sal afecta más la nodulación que el proceso de infección (Zahran y Sprent, 1986), mientras que la actividad nitrogenasa fue más afectada por el estrés salino que la nodulación (Zou *et al.*, 1995).

El estrés salino puede actuar en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa indirectamente reduciendo el crecimiento del hospedador y afectando a determinados procesos fisiológicos de la planta como la germinación, la fotosíntesis (Soussi *et al.*, 1998), el transporte de solutos inorgánicos, asimilados y hormonas a los tejidos en crecimiento, y a determinadas actividades enzimáticas (Cordovilla *et al.*, 1994), entre otros procesos.

5.3. Mecanismos de tolerancia al estrés salino.

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).

Según Subbarao y Johansen (1994), existen diferentes formas para definir la tolerancia a la salinidad de los cultivos, dependiendo del contexto en que se use.

Algunas de estas se exponen a continuación: **a)** la capacidad de persistir en presencia del incremento del grado de salinidad (Hayward y Wadleigh, 1949); **b)** el grado en que el ajuste osmótico puede tener lugar, sin afectar al crecimiento (Bernstein, 1961); **c)** la ausencia de efectos negativos en el crecimiento de plantas que acumulan sales en sus tejidos (Levitt, 1980); **d)** la diferencia de producción de cultivo con niveles de sales solubles en el medio radical, en comparación con la producción en condiciones no salinas (Maas y Hoffman, 1977); **e)** el mantenimiento del crecimiento de las plantas en un entorno de exceso de sal en el medio de crecimiento (Shannon, 1984).

En el contexto de productividad de los cultivos en condiciones de salinidad, las dos últimas definiciones son las más relevantes.

5.3.1. Adaptación mediante ajuste osmótico

La acumulación de sales procedentes del citoplasma en el interior de la vacuola produce un fuerte gradiente osmótico a través de la membrana vacuolar. Este gradiente está controlado por el incremento de la síntesis de solutos moleculares en el citoplasma, proceso conocido como ajuste osmótico (McCue y Hanson, 1990). Este proceso está considerado como una adaptación a la salinidad pues ayuda a mantener la turgencia y el volumen de la célula. Los solutos compatibles contribuyen en los procesos anteriormente mencionados, y además estabilizan la configuración activa de las enzimas citoplasmáticas. En leguminosas, se ha encontrado que, en condiciones de salinidad, se acumulan estos compuestos en los cultivares tolerantes a la sal más que en los sensibles (Wyn Jones y Storey, 1981). Sin embargo, en dos cultivos de *Cicer arietinum*, uno tolerante y otro sensible, se observó un efecto distinto (Soussi *et al.*, 1999a).

Según Samaras *et al.* (1994), los solutos compatibles u osmoreguladores de las células incluyen: **a)** aminoácidos como prolina, alanina y β -alanina; **b)** compuestos cuaternarios de amonio como glicina-betaína, prolina-betaína, β -alanina-betaína, glicerofosforilcolina y colina-O-sulfato; **c)** ciertos carbohidratos como trehalosa, glicerol, manitol, sorbitol y pinitol.

Estos compuestos no tienen carga a pH neutro y son altamente solubles en agua. De hecho, Jacoby (1994) describe a la prolina, glicina-betaína, algunos azúcares, polioles y malato, como osmolitos compatibles de bajo peso molecular. El acúmulo de prolina y azúcares en el citosol celular ha sido relacionado con el ajuste osmótico,

condicionado por el acúmulo de iones en la vacuola (Hu y Schmidhaller, 1998), confiriéndole un mecanismo de tolerancia al estrés hiperosmótico (Kishor *et al.*, 1995), y actuando como osmoprotectores (Nolte y Hanson, 1997). La acumulación de prolina es una respuesta metabólica de plantas superiores a determinados tipos de estrés (Delauney y Verma, 1993).

Se han descrito otro tipo de solutos compatibles en respuesta el estrés salino. Así, en hojas y callos de *Lycopersicon esculentum* L., los azúcares totales solubles, ácidos orgánicos y prolina aumentan con la salinidad (Perez-Alcocea *et al.*, 1994), aunque estos cambios vienen condicionados con el grado de desarrollo del cultivo (Cayuela *et al.*, 1996). Resultados semejantes han sido encontrados en raíces de *Medicago sativa* (Cunningham y Volenec, 1997). También se ha descrito la acumulación de aminoácidos en hojas de *Coleus blumei* (Gilbert *et al.*, 1998), y de ácidos orgánicos, azúcares, y solutos orgánicos en raíces de *Zea mays* (Gonzalez-Rodriguez *et al.*, 1997) en respuestas a la salinidad.

Esta acumulación de la prolina y glicina-betaina ha sido descrita en otros diferentes tipos de estrés, como el estrés hídrico (Irigoyen *et al.*, 1992; Somal y Yapa, 1998), las altas temperaturas (Kuznetsov y Shevyakova, 1997), y la desecación (Pukacka y Pukacki, 1997).

En general, el contenido de prolina es directamente proporcional al nivel de salinidad. Sin embargo, no siempre se encuentra una correlación positiva entre contenido en prolina y tolerancia relativa o susceptibilidad de la planta al estrés salino. Incluso existe la propuesta de que la toxicidad iónica inducida por el estrés salino provoca la biosíntesis de prolina, por lo que se considera una consecuencia del daño producido por el estrés salino (Lutts *et al.*, 1996). Una relación negativa entre tolerancia a la sal y acumulación de prolina ha sido descrita por Petrusa y Winicov (1997) en cultivos celulares de alfalfa sensibles y tolerantes a la sal, y en nódulos de *Cicer arietinum* por Soussi *et al.* (1998).

5.3.2. Adaptación mediante inclusión y exclusión de iones.

En general, las plantas tolerantes al estrés salino han desarrollado dos tipos de estrategias: a) la estrategia glicofítica, basada predominantemente en la exclusión de iones de la raíz y/o parte aérea, en combinación con la síntesis de solutos orgánicos para

su ajuste osmótico; b) la estrategia halofítica, basada en la alta velocidad y transporte de iones, cuya acumulación en determinados tejidos y su compartimentación subcelular evita la toxicidad iónica, al tiempo que contribuye significativamente al ajuste osmótico. La mayoría de las especies cultivadas suelen presentar una estrategia glicofítica aunque algunas de ellas pueden exhibir rasgos halofíticos (Shannon, 1984).

La captación de grandes cantidades de iones Na^+ y Cl^- por la raíz provoca la alteración de la absorción y por lo tanto del contenido de otros iones, tales como K^+ y Ca^{2+} (Cramer *et al.*, 1987). La especificidad del sistema de absorción del potasio varía de forma importante en plantas halófitas y glicófitas que difieren a su vez en el grado de tolerancia (Serrano y Gaxiola, 1994). La selectividad K^+/Na^+ debe estar controlada a nivel de tres membranas: el plasmalema de las células epidérmicas y corticales de la raíz, el tonoplasto de la raíz, y el plasmalema de las células parenquimáticas del xilema. La primera de ellas debe ser altamente selectiva para el K^+ , bien por un influjo selectivo de K^+ y/o por una extrusión activa de Na^+ (Nakamura *et al.*, 1996).

La regulación de selectividad iónica, especialmente la relación Na^+/K^+ , está relacionada con la exclusión de iones y con la tolerancia a la salinidad (Gorham, 1993). En el proceso de absorción, el Na^+ puede ser sustituido por el K^+ , y se piensa que los mecanismos de absorción son similares para los dos iones (Schroeder *et al.*, 1994). Los altos niveles de K^+ en tejidos jóvenes en expansión están asociados con la tolerancia a la salinidad en varias especies de plantas (Storey *et al.*, 1993; Khatun y Flowers 1995). Por lo tanto, es posible que la relación Na^+/K^+ esté asociada con la tolerancia a la salinidad.

Se ha descrito un aumento en el contenido de potasio con la sal en parte aérea y una disminución en raíces de *Cicer arietinum* (Soussi *et al.*, 1999b), *Phaseolus vulgaris*, *Vicia faba*, *Glycine max*, y *Pisum sativum* (Cordovilla *et al.*, 1995b), en *Heliantus annuus* (Ashraf y O'Leary, 1994; 1995) y en *Zea mays* (Zidan *et al.*, 1992). Por tanto, la reducción de la contribución osmótica que ejercen los iones potasio, probablemente es compensada por la acumulación de sodio (Cordovilla *et al.*, 1995b). Greenway y Munns (1980) describen, en condiciones de estrés salino, una disminución en el contenido de potasio en los tejidos de la planta debido a limitación de la absorción de este elemento. Cuando se alcanzan niveles de deficiencia en el contenido de potasio, tiene lugar lo que se denomina antagonismo Na/K (Benlloch *et al.*, 1994).

En leguminosas, la variación intraespecífica en la concentración de iones en parte aérea ha sido asociada con la tolerancia a la salinidad. De hecho, se ha observado en plantas de *Cicer arietinum* una correlación entre la sensibilidad a la sal y la acumulación de sodio, lo que sugiere que la tolerancia de la planta depende de la capacidad de esta para excluir el sodio (Soussi, 1998). La limitación en la absorción de este ion es una característica relacionada con la tolerancia al estrés salino en cultivo de arroz (Gregorio y Senadhira, 1993) y de trigo (Fortmeier y Schubert, 1995). La diferencia en la concentración de Na^+ y Cl^- en parte aérea en distintas especies ha estado relacionada con la absorción de iones, la retención en raíces y el transporte iónico a la parte aérea (Lauchli y Wieneke, 1979; Noble *et al.*, 1984). La gran mayoría de plantas halofitas utilizan la sal como un osmolito para equilibrar la concentración del medio externo (Ungar, 1991). Además, no se discierne relación alguna entre la exclusión de sales y la tolerancia a la salinidad en especies glicofitas.

5.3.3. Función de las hormonas en los mecanismos de adaptación.

La respuesta de las plantas al estrés salino depende de múltiples factores, sin embargo, las fitohormonas son sustancias endógenas involucradas en los mecanismos de tolerancia y susceptibilidad de varias especies de plantas (Fedina *et al.*, 1994). En respuesta al descenso de la disponibilidad hídrica, las plantas desarrollan mecanismos adaptativos en los cuales el ácido abscísico tienen una función importante (Pruvot *et al.*, 1996), ya que se ha observado en variedades tolerantes a la salinidad, una mayor producción de ácido abscísico en respuesta a estrés osmótico y una mayor biosíntesis de proteínas inducidas por el ABA, que en variedades sensibles a la salinidad (Moons *et al.*, 1995).

El ácido abscísico está reconocido por su participación en varios procesos fisiológicos, como la maduración de semillas, la adaptación a condiciones ambientales adversas (Zeevaart y Creelman, 1988; Hetherington y Quatrano, 1991) entre numerosos procesos fisiológicos. En condiciones de salinidad (Bostock y Quatrano, 1992), de déficit hídrico (Cohen y Bray, 1990), y de bajas temperaturas (Lang *et al.*, 1994), el ácido abscísico se incrementa, estando probablemente relacionado el control hormonal con la respuesta adaptativa de las plantas (Fedina *et al.*, 1994). Esta misma respuesta se observa cuando se aplica el ABA exógeno (Popova *et al.*, 1996). Las respuestas a la

presencia de ácido abscísico incluyen modificaciones en el flujo de iones, causando el cierre de estomas para evitar la pérdida de agua, así como en la alteración en la expresión génica (Hetherington y Quatrano, 1991). La Rosa *et al.* (1987) establecen que el ABA exógeno facilita la adaptación de células aisladas a altas concentraciones de NaCl.

En la medida que aumenta la evidencia de la existencia de un sistema general de respuesta al estrés, se ha propuesto que respuestas adicionales a diferentes estreses ambientales puedan estar mediados por una señal celular comun de vías de transducción (Hare *et al.*, 1997).

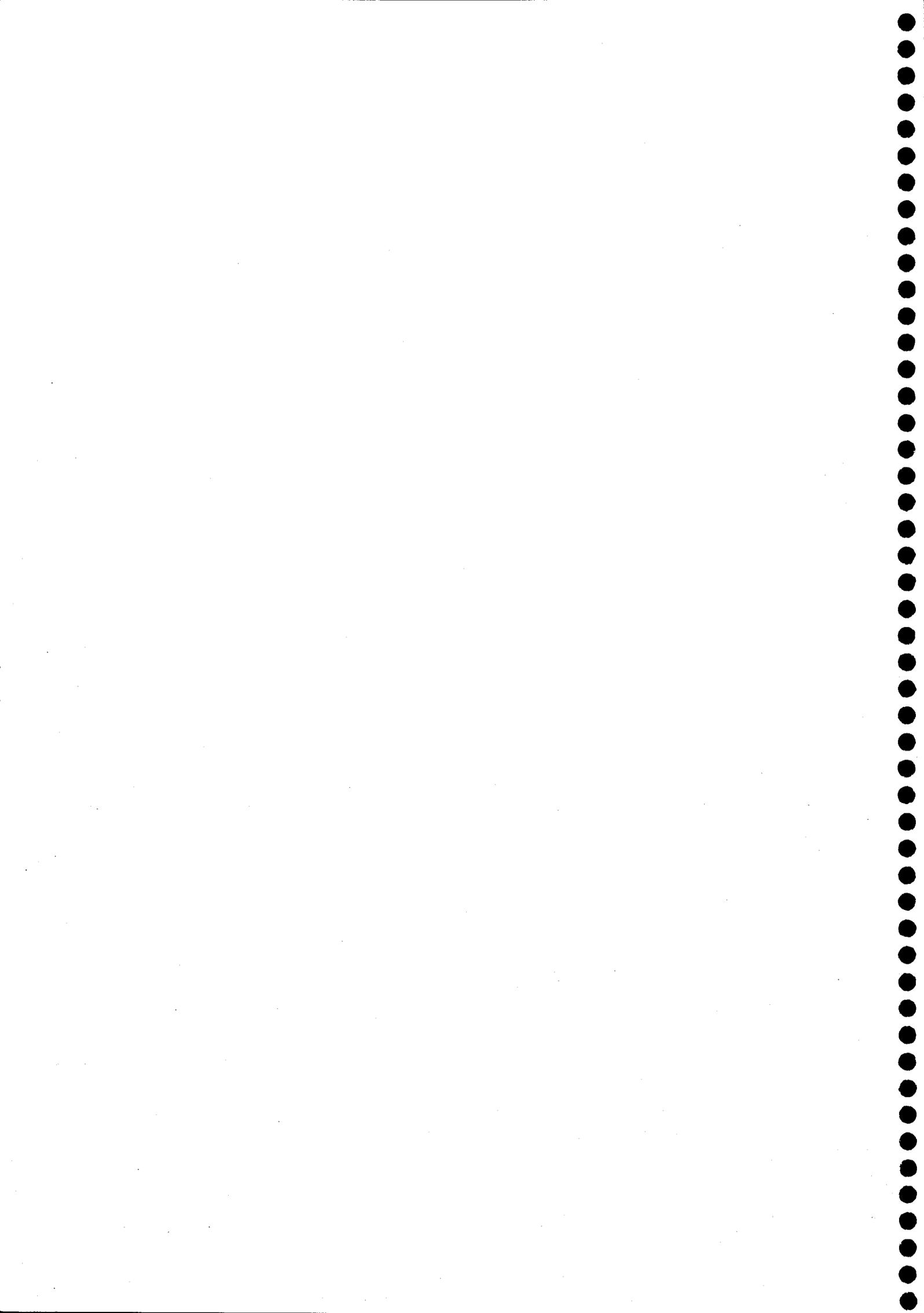
Munns y Termaat (1986) sugieren que el desarrollo foliar en condiciones de salinidad está controlado por el estado hídrico de la raíz, por medio de señales derivadas de la misma raíz. En algunas plantas, como la judía, considerada sensible a la salinidad, estas señales pueden estar mediadas por el ácido abscísico (Montero *et al.*, 1997; 1998). El estrés salino provoca mayor inhibición del crecimiento que el estrés osmótico, y se ha observado que la reducción del crecimiento en plantas tratadas con NaCl está mediada por el ABA en respuesta al sodio radical (Sibole *et al.*, 1998).

Se sugiere que el ABA está fuertemente implicado en varios tipos de estrés, capaces de inducir la acumulación de prolina (Hare y Cress, 1997). Se ha propuesto que algunas especies presentan una relación causal entre el ABA y acumulación de prolina (Savouré *et al.*, 1997). La acumulación de prolina en algunas especies en respuesta un estrés hiperosmótico lleva siendo tema de discusión desde hace varias décadas (Hare *et al.*, 1999) como ya se ha comentado.

La presencia de ABA en el medio que contiene nitrato provoca una estimulación del metabolismo del nitrato en raíces de plantas de achicoria, con altos niveles de actividad nitrato reductasa. Esta estimulación enzimática es concomitante a un alto consumo de azúcares y una disminución del nivel de azúcares reducidos (Goupil *et al.*, 1998). Se ha observado que la aplicación exógena de ABA a hojas de soja produce una inhibición de la fructosa-1,6-bifosfatasa, que es una de las enzimas clave en la regulación de la síntesis de sacarosa (Cheikh y Brenner, 1992). Por otra parte, semillas de mostaza tratadas con ABA muestran una inhibición de la actividad glutamina sintetasa, no siendo esta inhibición específica de ninguna de las dos isoformas,

citoplasmática y cloroplástica (Chanda *et al.*, 1998). Estos mismos autores describen también una inhibición en la formación de clorofilas en plantas expuestas a ABA.

III. OBJETO



OBJETO

El efecto de los suelos salinos en el crecimiento y desarrollo de las plantas ha constituido un foco de investigación importante en este siglo puesto que el estrés salino es, dentro del estrés abiótico y/o ambiental, el mayor factor limitante en la productividad de cultivos. La salinidad del suelo constituye un problema en amplias áreas productivas y, en concreto, en la cuenca del Mediterráneo. Ello conduce a una débil colonización de ecosistemas naturales de determinadas especies vegetales.

Las leguminosas son consideradas cultivos importantes en la **agricultura sostenible**, tanto en los sistemas de rotación de cultivos y de intercultivos, como por su menor dependencia en el uso de la fertilización nitrogenada, debido a su capacidad de formar simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Rhizobium*. Esta independencia de abonos nitrogenados contribuye a mejorar la fertilidad del suelo y permite el asentamiento de otras especies vegetales, ya que el nitrógeno atmosférico fijado quedará fuertemente incorporado a la materia orgánica, aspectos que potencialmente son importantes y útiles en la lucha contra la desertificación. No hay que olvidar, además, que el abuso de fertilizantes nitrogenados produce la contaminación de las aguas de riego y subterráneas, debido al acúmulo de sustancias tóxicas como las nitrosaminas, lo que provoca la eutrofización de las aguas y el impacto en el medio ambiente.

Los efectos identificados en las plantas como consecuencia del estrés salino, vienen determinados por el **efecto osmótico**, que altera el potencial hídrico de la planta y por lo tanto el ajuste osmótico, y el **efecto iónico**, que condiciona deficiencias nutricionales, la toxicidad iónica y el desequilibrio iónico en las plantas. Además, la salinidad induce cambios morfológicos en el desarrollo y en el metabolismo de la planta, afectando a procesos como germinación, fotosíntesis, senescencia, dependiendo del estado de desarrollo de la planta. Es evidente que la adición de la sal en distintas etapas del crecimiento puede dar lugar a respuestas más o menos acentuadas.

Las leguminosas se consideran tradicionalmente cultivos moderadamente sensibles a la salinidad, pero como glicofitas han condicionado su sostenibilidad en el medio adverso a través de determinadas estrategias o mecanismos que vienen

condicionados por modificaciones metabólicas, alteraciones fisiológicas o variaciones bioquímicas, entre otras posibilidades.

El desarrollo de simbiosis efectivas en leguminosas depende de una serie de interacciones complejas entre la planta hospedadora y el rizobio invasor. Ambos simbiosistas responden sintetizando una serie de moléculas y/o proteínas que conducen a la formación de una estructura morfológica singular, altamente especializada, el nódulo radical. Este órgano, en medio salino, responde con un acúmulo de aminoácidos, nitrito y amonio, produciéndose de esta forma una alteración del metabolismo nitrogenado. Además, la capacidad del nódulo radical para mantener un significativo nivel de fijación de nitrógeno (actividad nitrogenasa) en condiciones limitantes, viene determinada por procesos energéticos y por la exportación e importación de asimilados. Todo ello contribuye a que la información a nivel fisiológico, bioquímico y molecular sea necesaria para entender las consecuencias del estrés salino en el funcionamiento de los nódulos de las leguminosas.

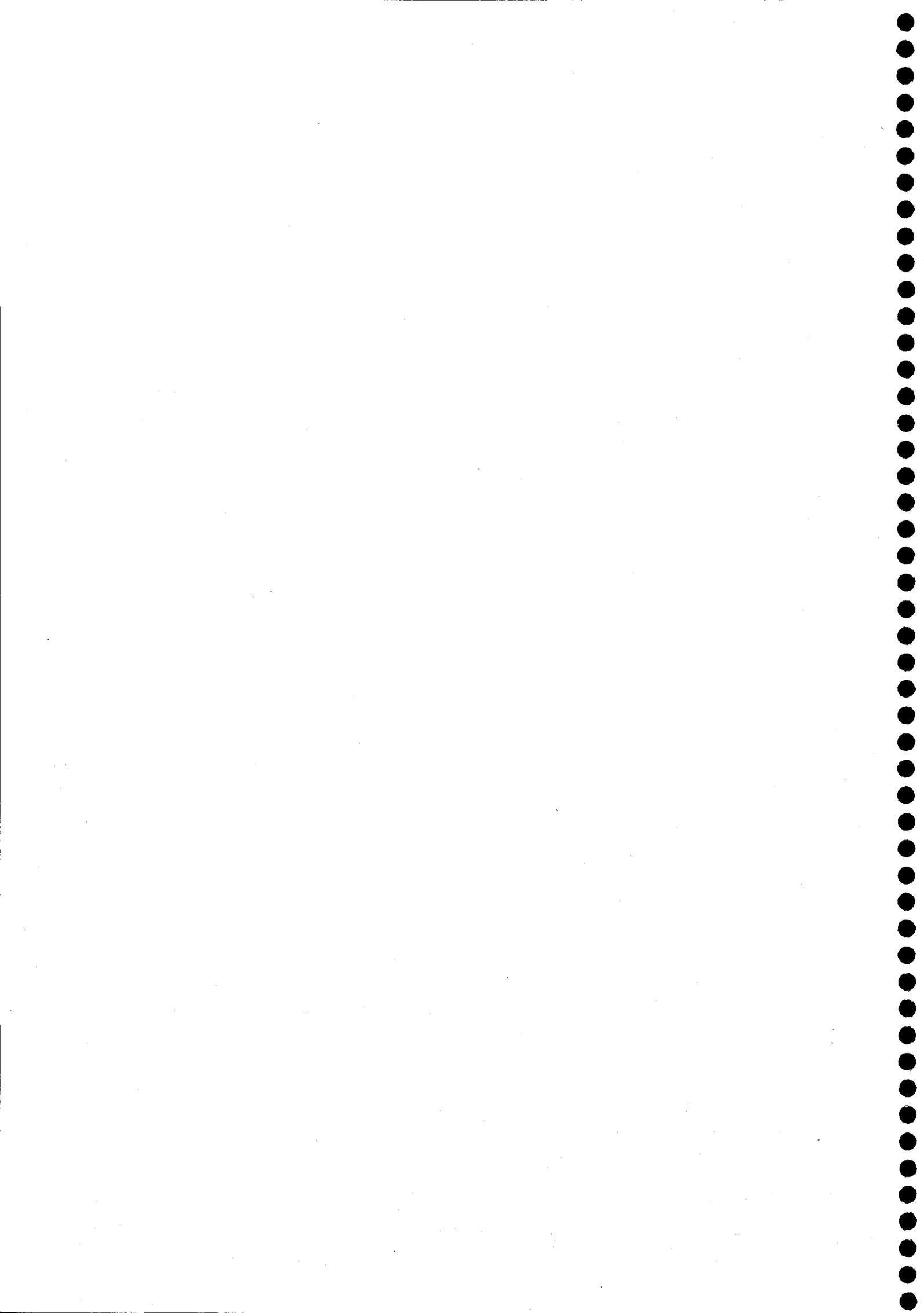
Por todo ello, se plantea estudiar el efecto del estrés salino sobre la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, utilizando como leguminosa grano *Phaseolus vulgaris*. Esta selección está basada en los diferentes proyectos de investigación en curso. Además, la judía es considerada una leguminosa grano de interés en la alimentación humana, de alto contenido proteico y amplia implantación como cultivo.

El objeto general se centra en conocer los mecanismos y adaptaciones al estrés salino que se producen en *Phaseolus vulgaris*, en condiciones simbióticas, y especialmente estudiar el metabolismo nodular, concretándonos en este trabajo en el metabolismo del amonio procedente de la fijación biológica, y en el de ureidos, al ser la judía una leguminosa tropical que exporta al xilema el nitrógeno asimilado en alantoína y ácido alantoico. Así mismo, se completa el trabajo con un estudio realizado con el ácido abscísico, por ser la hormona vegetal relacionada con los procesos de estrés en plantas, y algunos estudios nutricionales de la planta, que justifican uno de los mecanismos de adaptación y/o tolerancia al estrés salino.

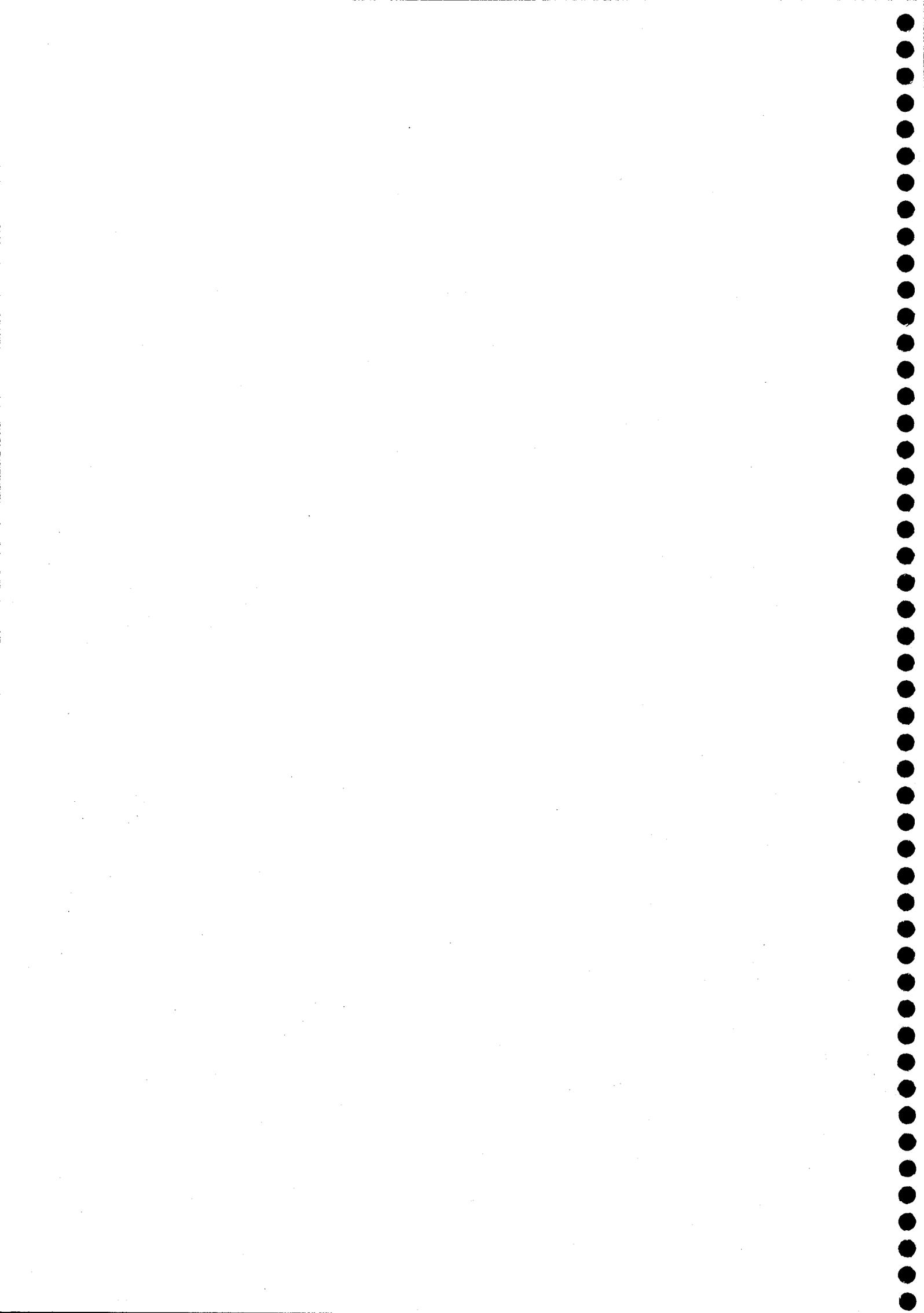
Para cumplir los objetivos enunciados, se propone un plan de trabajo que se inicia con experimentos previos que van a contribuir a conocer la simbiosis con la que trabajamos. En este contexto se han planificado los tres primeros experimentos del

trabajo. Posteriormente, se propusieron los experimentos que nos ayudan a dilucidar los objetivos propuestos.

1. **Estudio del efecto de la cepa de *Rhizobium* utilizada en simbiosis con *Phaseolus vulgaris* en condiciones de salinidad**, evaluando la respuesta con el análisis de crecimiento, el proceso de fijación de nitrógeno y el metabolismo de ureidos.
2. **Influencia del nitrato y su interacción con la fijación de nitrógeno**. Este estudio se llevó a cabo con distintas dosis de nitrógeno en el medio, con objeto de detectar la dosis de nitrógeno que en la simbiosis *Phaseolus vulgaris-Rhizobium tropici* no afecta el proceso de la simbiosis, comprobándolo en diferentes tiempos del cultivo y estudiando la respuesta de determinados procesos metabólicos.
3. **Caracterización de la fijación de nitrógeno y metabolismo de ureidos en nódulos de *Phaseolus vulgaris* a lo largo de la ontogenia del cultivo**, llevando a cabo distintos muestreos durante el crecimiento para determinar la duración de los distintos estados fenológicos de la planta, crecimiento vegetativo, inicio de floración, floración, maduración de nódulos, senescencia, etc.
4. **Influencia del estrés salino en la simbiosis *Phaseolus vulgaris-Rhizobium tropici* CIAT899**, estudiando el efecto de la adición de NaCl al inicio del cultivo (*long-term*) y con la simbiosis establecida (*short-term*). Se realizó un estudio comparativo entre dos variedades de *Phaseolus vulgaris* y se evaluaron diferentes procesos fisiológicos, bioquímicos y nutricionales.
5. **Control de los efectos inducidos por el cloruro sódico por el ácido abscísico exógeno**, llevándose a cabo este estudio con las dos mismas variedades de *Phaseolus vulgaris*, centrando el estudio en el proceso de fijación de nitrógeno, metabolismo de ureidos, y el ajuste osmótico.



IV. MATERIAL Y METODOS



MATERIAL Y METODOS

1. Material biológico.

1.1. Microorganismo.

Las cepas de *Rhizobium* utilizadas en este trabajo proceden de diferentes colecciones.

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

Cepa	Género	Procedencia
CIAT899	<i>Rhizobium tropici</i>	Colombia
Rp10	<i>Rhizobium</i> sp.	E.E.Z.
980	<i>Rhizobium</i> sp.	México

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 la judía (*Phaseolus vulgaris* L.), leguminosa grano de interés agrícola y económico. Se han utilizado dos variedades de *Phaseolus vulgaris*.

Tabla 2. Denominación y algunas características de las dos variedades de *Phaseolus vulgaris* utilizadas en el presente trabajo.

Identificación	Tipo varietal	Hábito de crecimiento	Procedencia
AFRICA	Palmeña	Determinado arbustivo	España
COCO	Blanca Larga	Determinado arbustivo	Tunez

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.

Macronutrientes		Micronutrientes	
KH ₂ PO ₄	0.200 g	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.004 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.200 g	MnSO ₄ ·2H ₂ O	0.002 g
KCl	0.200 g	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.002 g
CaSO ₄ ·2H ₂ O	0.120 g	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.003 g
Na ₂ FeEDTA	0.025 g	H ₃ BO ₃	0.018 g
		CoCl ₂ ·4H ₂ O	0.12 mg
Agua		1000 ml	

2. Cultivo de plantas.

El cultivo de las plantas se llevó a cabo 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 hipoclorito sódico al 5% (v/v) durante 3 minutos, lavándose después con abundante agua destilada estéril con objeto de eliminar los restos de hipoclorito. Tras la esterilización se dejaron en imbibición durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, se colocaron en semilleros de vermiculita estéril y convenientemente humedecida. La esterilización de las 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: 26°C día/ 18°C noche \pm 1°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. Efecto del estrés salino y de la cepa de *Rhizobium* en simbiosis con *Phaseolus vulgaris*.

Se utilizó la variedad Africa de *Phaseolus vulgaris*, y tres cepas distintas de *Rhizobium*: CIAT899, Rp10 y 980. Se estudió la respuesta de estas tres simbiosis a la salinidad. Las plantas crecieron en jarras Leonard con solución nutritiva adicionada de 1 mM de KNO_3 . Se ensayaron dos niveles de NaCl (0 y 50 mM), adicionados en el estado vegetativo a la solución nutritiva (18 días de cultivo). Las plantas se recogieron al final del periodo vegetativo, cuando se abren los primeros botones florales (28 días). En cada tratamiento se utilizaron 6 jarras (12 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 total por planta.

- c) Contenido de alantoína, ácido alantoico y actividad alantoinasa en nódulos.

3. 2. Influencia de la dosis de nitrato en la simbiosis *Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium tropici*.

Se utilizó la variedad Africa de *Phaseolus vulgaris* inoculada con la cepa CIAT899 de *Rhizobium tropici*. Se aplicaron cinco concentraciones de nitrato potásico de 0, 1, 2, 5 y 10 mM a la solución nutritiva desde la siembra. Se realizaron cuatro recogidas, a los 18, 28, 34 y 40 días de cultivo. El experimento se realizó dos veces, determinándose los siguientes parámetros:

- a) Análisis de crecimiento: Peso seco de parte aérea, raíz y total por planta, relación raíz/parte aérea y superficie foliar.
- b) Nodulación y fijación de nitrógeno: Peso seco de nódulos, peso normalizado de nódulos, actividad reductora de acetileno específica y total por planta.
- c) Actividades enzimáticas del metabolismo nitrogenado: glutamina sintetasa y glutamato sintasa en nódulos.
- d) Actividades enzimáticas del catabolismo de purinas: xantina deshidrogenasa y uricasa en nódulos.
- e) Determinaciones analíticas: Contenido de ureidos (alantoína y ácido alantoico) en nódulos y savia, proteínas solubles en nódulos, aminoácidos y nitrato en savia. También se evaluó la abundancia relativa de ureidos (RU) en savia.
- f) Análisis nutricional: Contenido de N, K, Ca y Mg en raíz y parte aérea, así como la eficiencia en el uso de nutrientes.

3.3. Estudio del crecimiento, fijación y asimilación de nitrógeno en *Phaseolus vulgaris* a lo largo de la ontogenia del cultivo.

Se utilizaron plantas de la variedad Africa inoculadas con la cepa CIAT899. Las plantas crecieron en jarras Leonard con solución nutritiva adicionada de 1 mM KNO₃. Se realizaron un total de 11 muestreos durante el periodo de cultivo, recogiendo 6 plantas cada 3-4 días a partir de los 15 días. Las determinaciones realizadas fueron las siguientes:

- a) Análisis de crecimiento, nodulación y fijación de nitrógeno, tal como se indica en el apartado (3.2).

- b) Actividades enzimáticas del metabolismo nitrogenado: glutamina sintetasa, glutamato sintasa, glutamato deshidrogenasa y aspartato aminotransferasa.
- c) Actividades enzimáticas del metabolismo de ureidos: xantina deshidrogenasa, uricasa y alantoinasa.
- d) Determinaciones analíticas: Contenido de ureidos (alantoína y ácido alantoico) en nódulos, raíces y savia, contenido de aminoácidos en nódulos y savia, contenido de proteínas solubles en nódulos.

3.4. Efecto del estrés salino en la simbiosis: aplicación en el momento de la siembra.

3.4.1. Estudio de la simbiosis *Phaseolus vulgaris* var. *Africa-Rhizobium tropici* CIAT899.

Se aplicaron cuatro dosis de NaCl de 0, 25, 50 y 100 mM a la solución nutritiva. Los muestreos se llevaron a cabo a los 18, 21, 24, 27 y 30 días después de la siembra, coincidiendo con distintos estados fenológicos de la planta. En los dos primeros muestreos, las plantas estaban en crecimiento vegetativo, en el tercero final del estado vegetativo, en el cuarto se inició la floración y en el último las plantas se encontraban en floración. Se realizaron las siguientes determinaciones:

- a) Análisis de crecimiento, nodulación y fijación de nitrógeno, tal como se indica en el apartado (3.1).
- b) Actividades enzimáticas del metabolismo nitrogenado: glutamina sintetasa, glutamato sintasa, glutamato deshidrogenasa y aspartato aminotransferasa en nódulos.
- c) Actividades enzimáticas del metabolismo de ureidos: xantina deshidrogenasa, uricasa en nódulos.
- d) Determinaciones analíticas: Contenido de ureidos (alantoína y ácido alantoico) y aminoácidos en nódulos.

3.4.2. Estudio de la simbiosis *Phaseolus vulgaris* var. *Coco-Rhizobium tropici* CIAT899.

Se aplicaron cuatro dosis de NaCl de 0, 10, 25 y 50 mM a la solución nutritiva. Los muestreos se realizaron a los 18, 21, 24, 27 y 30 días después de la siembra,

coincidiendo con distintos estados fenológicos. Las determinaciones fueron las mismas que el experimento anterior (apartado 3.4.1).

3.5. Efecto del cloruro sódico aplicado a la simbiosis ya establecida.

3.5.1. Estudio de la simbiosis *Phaseolus vulgaris* var. *Africa-Rhizobium tropici* CIAT899.

Se aplicaron cuatro dosis de NaCl de 0, 25, 50 y 100 mM a la solución nutritiva, en el periodo de crecimiento vegetativo, cuando la simbiosis está establecida. Los muestreos se hicieron a los 3, 6, 9 y 12 días después de la aplicación de la sal (DdT), coincidiendo con distintos estados fenológicos de la planta; los dos primeros coincidían con el estado vegetativo, el tercero con el inicio de floración y en el cuarto las plantas estaban en floración. Se determinaron los siguientes parámetros:

- a) Análisis de crecimiento, nodulación y fijación de nitrógeno, tal como se muestra en el apartado (3.1).
- b) Actividades enzimáticas del metabolismo nitrogenado: glutamina sintetasa, glutamato sintasa, glutamato deshidrogenasa y aspartato aminotransferasa en nódulos.
- c) Actividades enzimáticas del metabolismo de ureidos: xantina deshidrogenasa, uricasa en nódulos.
- d) Determinaciones analíticas: Contenido de ureidos (alantoína y ácido alantoico), aminoácidos y proteína soluble en nódulos.
- e) Análisis nutricional: Contenido de N, K, P, Ca, Mg y Na en raíz y parte aérea, así como la eficiencia en el uso de los nutrientes.

3.5.2. Estudio de la simbiosis *Phaseolus vulgaris* var. *Coco-Rhizobium tropici* CIAT899.

Se aplicaron cuatro dosis de NaCl de 0, 10, 25 y 50 mM a la solución nutritiva, en el periodo de crecimiento vegetativo, cuando la simbiosis está establecida. Los muestreos fueron a los 3, 6, 9 y 12 días después de la aplicación de la sal coincidiendo con distintos estados fenológicos de la planta, como se ha descrito en el apartado (3.5.1). Las determinaciones fueron las mismas que el experimento anterior (apartado 3.5.1), excepto el análisis nutricional (e).

3.6. Aplicación de ácido abscísico exógeno en condiciones de salinidad.

3.6.1. Estudio de la simbiosis *Phaseolus vulgaris* var. Africa-*Rhizobium tropici* CIAT899 en presencia de ABA y de NaCl.

Las plantas se cultivaron en condiciones control (en ausencia de ácido abscísico y sal) hasta los 16 días de cultivo en que empezó el tratamiento con ácido abscísico. Se utilizaron 3 tratamientos de ABA (0, 1 y 10 μM) adicionados a la solución nutritiva dieciseis días después de la siembra. 48 horas después del tratamiento con ABA (18 días de cultivo) se aplicó el estrés salino (0 y 100 mM NaCl). Paralelamente se dispusieron plantas sin ABA y sin NaCl. La solución nutritiva se cambió cada 24 horas. Se efectuaron dos recogidas, a los 3 y 6 días después de la aplicación de la sal. Se determinaron los siguientes parámetros:

- a) Análisis de crecimiento, nodulación y fijación de nitrógeno, tal como se indica en el apartado (3.1).
- b) Actividades enzimáticas del metabolismo nitrogenado: glutamina sintetasa, glutamato sintasa, glutamato deshidrogenasa, aspartato aminotransferasa, xantina deshidrogenasa y uricasa en nódulos.
- c) Determinaciones analíticas en nódulos: Contenido de ureidos, aminoácidos, prolina y proteína soluble.
- d) Determinaciones analíticas en hojas: Contenido de aminoácidos, prolina, azúcares totales solubles y clorofila.
- e) Análisis nutricional: Contenido de N, K, P, Ca, Mg y Na en raíz y parte aérea, así como la eficiencia en el uso de los nutrientes.

3.6.2. Estudio de la simbiosis *Phaseolus vulgaris* var. Coco-*Rhizobium tropici* CIAT899 en presencia de ABA y de NaCl.

En este experimento, se utilizó la variedad Coco y se siguió el mismo procedimiento que el experimento anterior (3.6.1). Se realizaron las mismas determinaciones.

4. Metodología empleada.

4.1. 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 nitrogenosa, se aislaron los nódulos de cada planta, registrándose inmediatamente su peso fresco. A continuación, se mezclan de forma uniforme por tratamiento y se guardan a -80°C hasta su posterior utilización.

Se separaron las hojas del tallo y se midió la superficie foliar con la ayuda de un planímetro fotoeléctrico (LI300, Lambda Instruments Corporation) que registra la superficie foliar en cm^2 .

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.

Se consideró interesante calcular a efectos comparativos, la **tasa de crecimiento absoluto (TCA)**, que fue obtenida según la siguiente fórmula (Hunt, 1978):

$$\text{TCA} = \frac{\text{PSP}}{t}$$

donde,

PSP = peso seco total por planta en mg

t = tiempo de cultivo en días

Los resultados se expresaron en $\text{mg PS planta}^{-1} \text{ día}^{-1}$, indicando así los miligramos que crece una planta en un día.

También se calculó la **tasa de crecimiento relativo (TCR)** de acuerdo con la siguiente ecuación (West *et al.*, 1920):

$$\text{TCR} = \int_1^2 \frac{dw}{w dt} = \frac{\ln w_2 - \ln w_1}{t_2 - t_1}$$

donde w_1 y w_2 son los pesos secos al principio y al final del intervalo de tiempo t . Expresamos el resultado en mg g día^{-1} y nos indica los miligramos que crece cada gramo de planta en un día.

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

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

Este parámetro es el resultado de dividir el PS de nódulos (en mg) por el de parte aérea (en g), expresándose en mg PS nódulos por g PSPA.

4.2. Actividad nitrogenasa: actividad reductora de acetileno (ARA).

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 *et al.* (1991). Tras la adición de acetileno (10% v/v) se tomaron muestras a los 10 y 20 minutos 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. Actividades enzimáticas del metabolismo del amonio.

4.3.1. Preparación de los extractos.

Para la preparación de extractos citosólicos se utilizó el tampón maleico-KOH 100 mM pH 6.8, adicionado de sacarosa 100 mM, β -mercaptoetanol 2% (v/v) y etilenglicol 20% (v/v).

El tejido fresco se homogeneizó en mortero con medio de extracción en una proporción de peso/volumen igual a 1/12, y polivinilpirrolidona (PVPP) insoluble

en una cantidad equivalente al 33% del peso fresco de la muestra fresca. El homogeneizado se filtró a través de 3 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.

4.3.2. Valoración de las actividades enzimáticas.

Parte de las actividades enzimáticas estudiadas en este trabajo (glutamato sintasa, glutamato deshidrogenasa y aspartato aminotransferasa) 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 la reacción utilizada varió para cada enzima. La reacción se inicia con la adición del extracto o sustrato, según la enzima estudiada. Tras una fase lag de 10 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 oxidoreducción NAD(P)H/NAD(P)⁺, como es el caso de las actividades NADH-GOGAT y GDH, se realiza según la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad } (\mu\text{mol min}^{-1}) = \frac{(\Delta\text{DO} \cdot \text{min}^{-1})V V_T}{10^{-6} \epsilon d v}$$

Donde:

Δ 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

ϵ = 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 $\text{nmol (mg proteína)}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

4.3.3. 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 γ -GH, puede valorarse mediante una reacción colorimétrica. 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 $\mu\text{mol } \gamma\text{-GH (g PF)}^{-1} \text{ h}^{-1}$. 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 contiene 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
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	45 mM
Hidroxilamina.....	30 mM
ATP.....	10 mM

Se adiciona de 0.05 a 0.2 ml de extracto, que inicia la reacción. Esta se desarrolla a 30°C durante 30 min. Pasado este tiempo, se detiene por la adición de 1 ml de reactivo de cloruro férrico [mezcla de volúmenes iguales de: 10 % (p/v) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en HCl 2; 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 el control a tiempo cero (deteniendo la reacción inmediatamente antes de la incubación).

4.3.4. Actividad glutamato sintasa.

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

Tampón fosfato potásico pH 7.5.....	50 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.

4.3.5. Actividad glutamato deshidrogenasa.

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

Tampón fosfato potásico pH 7.5.....	50.0 mM
α-cetoglutarato.....	2.5 mM
NADH.....	0.15 mM
Extracto.....	0.1 ml

La reacción se inicia con la adición del α-cetoglutarato.

4.3.6. Actividad aspartato aminotransferasa.

La actividad aspartato aminotransferasa (EC 2.6.1.1) se determinó siguiendo el método descrito por González *et al.* (1995). La mezcla de reacción contiene, en 1 ml de volumen total:

Tampón Tris-HCl pH 8	50 mM
MgCl ₂	4 mM
Acido aspártico	10 mM
NADH	0.2 mM
α-cetoglutarato.....	1 mM
Extracto	0.05 ml

La reacción se inicia con la adición del α-cetoglutarato.

4.4. Actividades enzimáticas del catabolismo de purinas.

4.4.1. Preparación de los extractos.

Se utilizó como medio de extracción tampón TES-KOH 25 mM pH 7.5, adicionado de 0.15 M de sorbitol. El material vegetal utilizado fueron nódulos. El tejido fresco se homogeneizó en mortero a 4°C en una proporción de peso/volumen 1/20, y 10% (p/p) de polivinilpirrolidona (PVPP). El homogeneizado se filtró a través de 4 capas de gasa, y a continuación se centrifugó a 1100 g durante 15 minutos. El sobrenadante obtenido se utilizó como extracto crudo para la determinación de las enzimas.

4.4.2. Valoración de las actividades enzimáticas.

La valoración de la xantina deshidrogenasa se hizo por medio de la reducción de NAD(P)⁺. En el caso de la actividad uricasa, se determina midiendo la disminución de la absorbancia a 293 nm, debida a la oxidación del ácido úrico. La actividad enzimática se determinó a partir de la velocidad inicial de reacción utilizando un coeficiente de extinción molar para el ácido úrico: $\epsilon = 1.22 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

4.4.3. Actividad xantina deshidrogenasa.

La actividad xantina deshidrogenasa (EC 1.2.1.37) se determinó según el procedimiento de Schubert (1981). La mezcla de reacción contiene en 1 ml de volumen total:

Tampón TES-KOH pH 8.4.....	50 mM
NAD ⁺	3.5 mM
Hipoxantina	0.5 mM
Extracto	0.1 ml

La reacción se inicia con la adición de la hipoxantina.

4.4.4. Actividad uricasa.

La actividad uricasa (EC 1.7.3.3) se determinó según el procedimiento de Schubert (1981) y Christensen y Jochimsen (1983). La mezcla de reacción contiene en 1 ml de volumen total:

Tampón glicina-KOH pH 9.....	85 mM
Acido úrico	50 µM
Extracto	0.02 ml

La muestra se utilizó diluida a la mitad. Primeramente, se incubó la muestra durante 5 min a 30°C en el tampón de reacción previamente saturado de aire, y pasado este tiempo se inició la reacción con la adición del ácido úrico.

4.4.5. Actividad alantoinasa.

La actividad alantoinasa (EC 3.5.2.5.) se determinó midiendo la formación de ácido alantoico, siguiendo el método descrito por Ory *et al.* (1969) con algunas modificaciones. La mezcla de reacción contiene 2 ml de una solución de alantoína 12.5 mM disuelta en tampón TES-KOH pH 8.1. Se añadió 0.5 ml de HCl 0.2 N a los tubos control a tiempo cero. Seguidamente, se adicionó 0.01-0.05 ml de extracto y se incubaron las repeticiones junto con los controles durante 20 min a 37°C. Pasado este tiempo, se paró la reacción con 0.5 ml HCl 0.2 N y se hirvió a 100°C durante 4 min Se

introdujeron los tubos en hielo durante 45 segundos, se dejaron a continuación 5 min a temperatura ambiente y se añadió 0.5 ml de una solución de fenilhidracina (3 mg/ml H₂O). Se incubaron de nuevo a 37°C durante 10 min y se introdujeron en hielo 30 segundos. Se adicionó a los tubos 1.2 ml de HCl concentrado previamente enfriado a 4°C. Tras agitar se adicionó 0.5 ml de una solución de potasio ferricianuro (16 mg/g H₂O), Se agitaron los tubos vigorosamente antes de incubar a 37°C durante 20-30 min. La absorbancia se midió a 520 nm.

Para el cálculo de la concentración de ácido alantoico formado, se preparó una curva patrón siguiendo el mismo procedimiento descrito, con concentraciones conocidas de ácido alantoico. La actividad se expresó en $\mu\text{mol de ácido alantoico g}^{-1} \text{ PF h}^{-1}$.

4.5. Determinaciones analíticas.

4.5.1. Determinación del contenido de ureidos.

4.5.1.1. Preparación de los extractos.

El material vegetal utilizado fueron nódulos. La extracción se realizó sobre hielo en mortero con ácido perclórico 0.25 N como medio de extracción, con una relación peso fresco/volumen de medio de 1/4. En el caso de la utilización de raíces como material fresco, la relación peso fresco/volumen fue de 1/2. Tras la maceración se centrifugó a 10.000 g durante 15 minutos. Se neutralizó el sobrenadante con KOH 2 N (15 μl de KOH por ml de extracto) y se volvió a centrifugar a 10.000 g durante 15 min. El sobrenadante obtenido se utilizó como extracto crudo para la determinación de ureidos.

4.5.1.2. Recolección de la savia xilemática.

A mitad de fotoperiodo, se cortaron los tallos de 8 plantas por tratamiento, a la altura de los cotiledones, y se recogió la savia del xilema que emergía con la ayuda de una micropipeta durante 20-30 minutos, consiguiendo unos 0.1-0.2 ml por planta, que se procedió a guardar a -20°C hasta su posterior análisis.

4.5.1.3. Valoración del contenido de ureidos.

Acido alantoico: Se utilizó el método descrito por Vogels y Van Der Drift (1970). Se utilizaron alícuotas de 0.05-0.1 ml de extracto crudo o de 0.02-0.05 ml de savia

diluida 10 veces, que se llevaron a 0.8 ml con agua destilada. Se añadió 0.2 ml de 0.15 N HCl y se incubó durante 4 minutos en baño de agua a 100°C. Tras enfriar a temperatura ambiente, se añadieron 0.2 ml de tampón sodio fosfato 0.4 M pH 7 y 0.2 ml de una solución de fenilhidracina (100 mg/ 30 ml H₂O), a continuación, se introdujeron los tubos en hielo durante 1 minuto. La reacción se paró con 1 ml de 12 N HCl enfriado a 4°C, y se añadió 0.2 ml de una solución de potasio ferricianuro (500 mg/30 ml H₂O). Se realizaron 4 repeticiones de cada extracto y se preparó un blanco sin extracto. Tras incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 525 nm.

Alantoína: Se utilizaron también alícuotas de 0.05-0.1 ml que se llevaron a 0.6 ml con agua destilada. Se efectuó una hidrólisis básica con 0.2 ml de 0.5 N NaOH, incubando después en baño de agua a 100°C durante 8 minutos. Después se añadió 0.2 ml de 0.65 N HCl y se incubó de nuevo a 100 °C durante 4 minutos. En los demás pasos, se siguió el mismo procedimiento descrito para el ácido alantoico.

Para la valoración de la concentración de ureidos se preparó siguiendo el mismo procedimiento una curva patrón de alantoína y de ácido alantoico en concentraciones conocidas de 10 a 80 µM, partiendo de una solución madre de 0.2 mM de alantoína y ácido alantoico.

4.5.1.4. Abundancia relativa de ureidos (RU).

El porcentaje de la abundancia relativa de nitrógeno en forma de ureidos en la savia xilemática (RU) se calculó según Herridge (1984) de la siguiente manera:

$$RU = \frac{400a}{(4a + b + c)}$$

donde: a, b y c son respectivamente la concentración molar de ureidos, NO₃⁻ y aminoácidos.

4.5.2. Determinación de aminoácidos libres.

La extracción del material hidrosoluble procedente de raíces y nódulos se llevó a cabo por el método de Irigoyen *et al.* (1992), utilizando como medio de extracción el etanol al 96%, con la relación peso fresco de muestra/volumen de medio de 1/12 para los dos órganos mencionados. Tras la maceración se centrifugó a 3500 g durante 10

min. El sobrenadante se utilizó para la determinación de aminoácidos siguiendo el método de Yemm y Cocking (1955), que se describe más adelante.

Para la determinación de estos compuestos en savia xilemática, ésta se diluyó 10 veces, y se tomaron alícuotas entre 20-50 µl, siguiendo posteriormente el mismo procedimiento que se describe para las demás muestras (Yemm y Cocking, 1955).

En hojas, el disolvente 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. Al sobrenadante obtenido se 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 (24 h), una transparente y una verde. La fase transparente se utiliza para la determinación de aminoácidos 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 5.0, y etilenglicol monometiléter. Se agitan los tubos y se hierven en baño maría durante 15 min. A continuación se detiene la reacción con hielo y se añaden 5 ml de isopropanol al 50%. Se toman los valores de absorbancia a 570 nm.

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

4.5.3. Determinación de proteína soluble.

El contenido de proteínas se determinó según el método Bradford (1976), 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. Se utilizaron alícuotas de 0.1 ml convenientemente diluidas para que contengan entre 10 y 50 mg de proteína, a las que se añadió 1 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 se realizó por comparación con una curva patrón de seroalbumina bovina (Merck, fracción V).

4.5.4. Determinación de prolina.

El contenido de prolina se determinó en los extractos obtenidos en el apartado 4.5.2. Se utilizaron alícuotas de 0.5 a 2 ml de extracto crudo, a las que se les adicionó 1.5 ml de ninhidrina, [preparada al 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 hierve 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.

4.5.5. Determinación de azúcares solubles totales.

Para la determinación del contenido de azúcares se utilizaron los mismos extractos que los obtenidos para la determinación de aminoácidos. Para la valoración colorimétrica se ha seguido el método propuesto por Irigoyen *et al.* (1992), utilizando el reactivo de antrona. A 0.05 ml 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 muestra.

4.5.6. Determinación de nitrato.

El contenido de nitrato se determinó por el método de Cataldo *et al.* (1975). Se utilizaron alícuotas de 0.04 ml de savia del xilema, a las que se añade 0.96 ml de una solución de ácido salicílico al 5% (p/v) en H₂SO₄ concentrado, y tras una agitación vigorosa y un periodo de reposo de 20 min a temperatura ambiente, se procede a la adición de 19 ml de NaOH 2N muy lentamente y en agitación continua. Cuando la solución adquiere un pH>12 se aprecia un cambio de coloración hacia el amarillo cuya

absorbancia se puede medir a 410 nm. Para la cuantificación del nitrato presente se prepara, de igual forma, una curva patrón con concentraciones conocidas de KNO_3 .

4.5.7. Determinación de clorofilas totales.

El contenido de clorofilas totales se determinó según el método de Wolfenden *et al.* (1988). Para la extracción, se utilizaron cantidades de 0.1 g de hojas a las que se les añadió 1 ml de metanol al 50% y 3 ml de triclorometano. El material fresco se maceró en un mortero a 4°C para evitar la degradación de los pigmentos. Tras la filtración por tres capas de gasa, se centrifugó a 5500 rpm durante 10 min. Todas las clorofilas pasan a la capa de cloroformo. Se elimina la capa superior con la ayuda de una micropipeta, y se filtra la capa baja en papel filtro. A continuación, el volumen obtenido se diluye en un factor de 5 con cloroformo. A partir de aquí, se procede a tomar alícuotas para la determinación del contenido en clorofilas que se efectuó mediante espectrofotometría, calculando la absorbancia (A) a tres longitudes de onda distintas: 470, 648 y 666 nm. El blanco se ajusta con triclorometano. El resultado se obtiene en $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Las ecuaciones utilizadas para la cuantificación de la concentración total de clorofilas fueron:

$$C_a = 10.9 A_{666} - 1.2 A_{648}$$

$$C_b = 16.38 A_{648} - 4.57 A_{666}$$

$$C_{x+c} = (1000 A_{470} - 2.84 C_a - 142.11 C_b)/174$$

$$\text{Clorofilas totales} = C_a + C_b + C_{x+c}$$

4.5.8. 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) y descrita por Lachica *et al.* (1973).

4.5.8.1. Determinación de nitrógeno.

El nitrógeno se valoró por método de Kjeldahl, utilizando el sistema de Bouat (Bouat y Grouzet, 1965). Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro de absorción molecular Beckman-25. Los valores se expresaron finalmente en mg N planta^{-1} y en porcentaje.

4.5.8.2. Determinación de potasio y sodio.

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. La intensidad de radiación emitida es proporcional a la concentración del elemento en el material.

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

4.5.8.3. Determinación de fósforo.

El fósforo se determinó en un autoanalizador de acuerdo con Capitán y Martínez (1954) siguiendo la reacción con amidol. Los valores de P se expresaron finalmente en porcentaje y en mg planta⁻¹.

4.5.8.4. 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.

La determinación de magnesio se realiza directamente sobre el mineralizado, pero para el calcio debe adicionarse lantano, debido a que se 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.

4.5.8.5. Estimación de la eficiencia en el uso de nutrientes.

La eficiencia en el uso de nutrientes se estimó como los gramos de parte aérea producidos por gramo de nutrientes absorbidos por la planta, según Rao *et al.* (1995).

5. Presentación y estudio estadístico de los resultados.

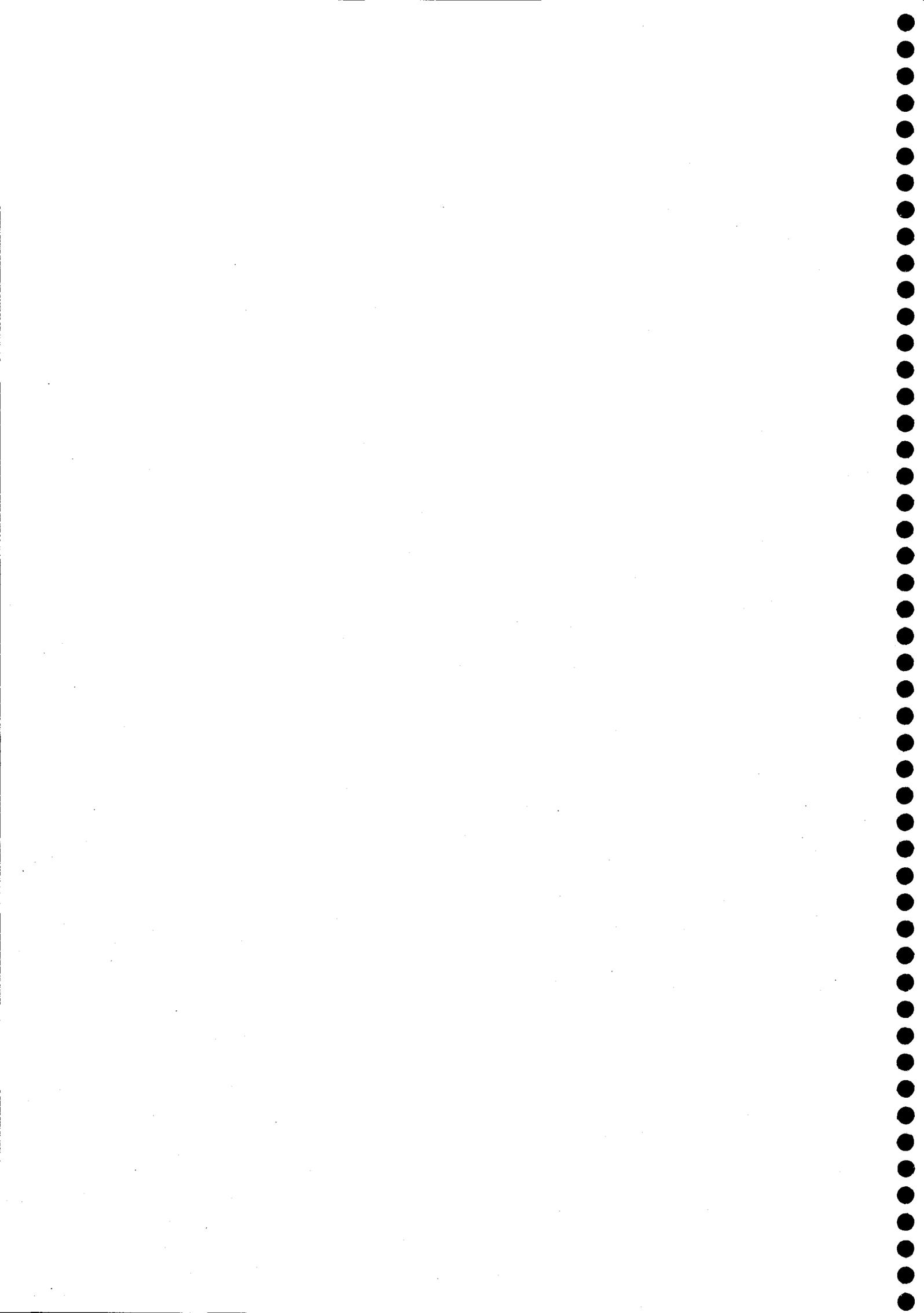
En todos los experimentos con plantas se utilizó un diseño completamente al azar, distribuyendo las macetas de cada tratamiento siempre de forma totalmente aleatoria por la superficie de la mesa de cultivo. Los experimentos fueron repetidos al

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 plus (STSC Inc., Rockville, Maryland, U.S.A.) consistente en:

- Análisis de la varianza uni o multifactorial.
- Test de mínimas diferencias significativas (MDS) entre medias.
- Coeficientes de correlación simple entre variables.

Los resultados se presentaron en gráficas o diagramas de barras, incluidas en el apartado de resultados. Las tablas de medias así como el análisis de varianzas se recopilan en el apéndice de esta memoria.

V. RESULTADOS



RESULTADOS

1. Efecto del estrés salino y de la cepa de *Rhizobium* en simbiosis con *Phaseolus vulgaris*.

En este experimento se utilizaron tres cepas diferentes de *Rhizobium* sp. que infectan a *Phaseolus vulgaris*. Estas cepas proceden de una colección que dispone nuestro grupo de investigación, cuya procedencia se expone en Material y Métodos (apartado 1.1). Las cepas fueron seleccionadas en un experimento previo (datos no mostrados) en el que se ensayó la interacción entre plantas de judía variedad Africa y 20 cepas de *Rhizobium*, seleccionándose las tres que presentaron mejores características simbióticas: especificidad, infectividad y efectividad.

Los cultivos se llevaron hasta el inicio del periodo reproductor, o sea, a inicio floración, empezando a abrirse los botones florales, considerado como aquel en el cual la simbiosis alcanza su máxima expresión. Todos los datos obtenidos proceden de plantas con igual desarrollo fisiológico, al realizar el muestreo en el inicio de la floración. El sistema de cultivo utilizado permitió el desarrollo adecuado de la planta, por lo que en el momento de la recolección no han aparecido las limitaciones propias del sistema de cultivo.

1.1. Análisis del crecimiento.

En el momento de la cosecha, las plantas control presentaban un color verde intenso, mientras que las plantas tratadas con el NaCl mostraron un color verde claro, llegando a amarillear en la simbiosis más sensible. Las plantas control tuvieron entre 15 y 25 botones florales, y entre 2 y 4 flores abiertas, mientras que las plantas estresadas, no pasaron de 15 botones florales y apenas se abrió un botón floral. En la figura 1.1 se recogen cuatro diagramas de barra donde se representa la acumulación de materia seca de la parte aérea, de raíz, de planta entera (expresado en g planta⁻¹) y la relación raíz/parte aérea, de las plantas de judía inoculadas con las tres cepas de *Rhizobium* y tratadas con dos niveles de NaCl (0 y 50 mM). Asimismo, en el apéndice de esta memoria se recogen los datos numéricos y los análisis de varianza correspondientes, reflejándose los que se comentan en las tablas A 1.1 y A 1.2.

Al estudiar los datos de crecimiento obtenidos, en las plantas control se observa que la simbiosis con la cepa 980, provoca un mayor crecimiento de las plantas, que representa un incremento del 25-35% de lo obtenido con las otras cepas de *Rhizobium* sp. estudiadas. Al observar el incremento de crecimiento de los órganos vegetativos de las plantas inoculadas con la cepa 980 se comprueba que es la raíz el órgano que muestra un 40% más de crecimiento respecto a las plantas inoculadas con Rp10 y un 80% más que con CIAT899. Este mayor desarrollo radical provoca que la relación R/PA sea de 0.31 (tabla A 1.1) superior a las detectadas con las otras simbiosis (0.27 con Rp10 y 0.22 con CIAT899).

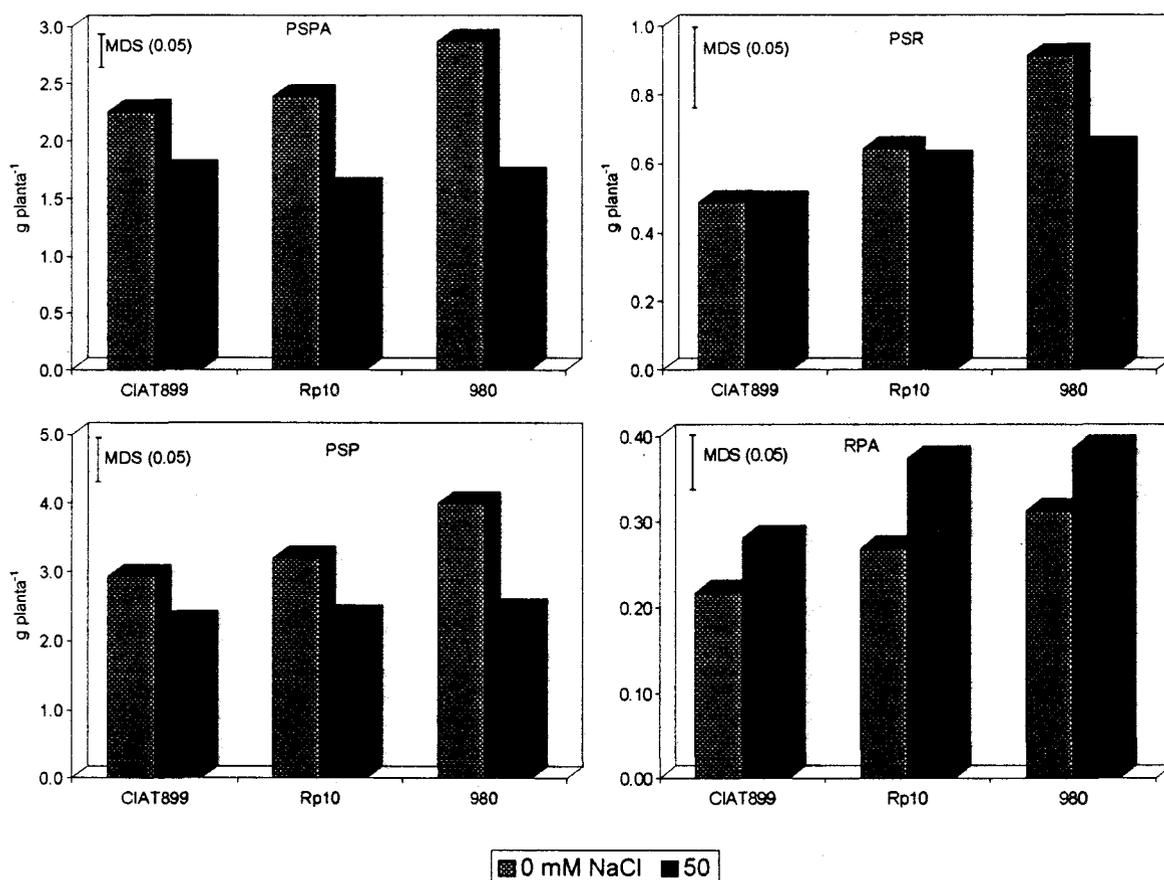


Figura 1.1. Peso seco de parte aérea (PSPA), raíz (PSR) y planta completa (PSP), expresado en g planta⁻¹, relación raíz/parte aérea (RPA), en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa en simbiosis con tres cepas distintas de *Rhizobium* sp. con dos dosis de NaCl aplicadas en el estado vegetativo.

Al comparar los porcentajes de reducción del crecimiento de las plantas, se observa que las plantas en simbiosis con la cepa 980 son las más afectadas por la sal, sufriendo disminuciones del 40% (PSP), 30% (PSR) y 42% (PSPA), mientras que las plantas inoculadas con la cepa Rp10 mostraron una inhibición del crecimiento más moderada del 22% (PSP), 6% (PSR) y 35% (PSPA), considerando que la simbiosis formada por *Phaseolus vulgaris* var. Africa y *Rhizobium tropici* CIAT899 fue la menos afectada por la sal; la única disminución significativa de peso seco (25%) se detectó en la parte aérea, que condicionó una reducción en el PSP.

El efecto del estrés salino en el crecimiento de los distintos órganos vegetativos conduce a postular la hipótesis de que la raíz es menos sensible a la sal que la parte aérea, puesto que, en general, el porcentaje de reducción de PSR con 50 mM NaCl es menor que el PSPA en cualquiera de las tres simbiosis estudiadas.

La relación raíz/parte aérea pone de manifiesto una variación que oscila entre 0.22 y 0.31, indicando que la cepa 980 provoca un mayor desarrollo radical que la CIAT899. Sin embargo, la sal provoca en todas las simbiosis estudiadas un aumento de la relación R/PA, siendo este incremento del 22, 27 y 37% con las cepas 980, CIAT899 y Rp10 respectivamente. Curiosamente las simbiosis más sensibles a la sal alcanzan los máximos valores en la relación R/PA, cercanos a 0.4, lo que implicaría que el peso seco de la planta se distribuye así: el 70% de parte aérea y el 30% de raíz.

El análisis de la varianza expuesto en la tabla A 1.2 del apéndice, indica que el tratamiento salino fue la fuente de variación que tuvo un efecto más intenso sobre el peso seco aéreo de la planta, siendo responsable del 70% de la variabilidad observada.

En la tabla de correlaciones (tabla 1.1) se evidencia que la relación R/PA presenta correlación negativa con distintos parámetros determinados en este estudio y es de destacar la correlación positiva entre el PSP y el PSPA.

1.2. Fijación de nitrógeno.

Las tres cepas de *Rhizobium* utilizadas en este estudio nodularon, observándose numerosos nódulos situados en la mitad del tercio superior del sistema radical. Los nódulos eran de tamaño grande y mediano, se encontraron tanto en la raíz principal como en las laterales. Presentaban un tono rojizo, apreciándose en algunos el tono rosado, sin llegar a detectarse los nódulos típicos de la senescencia. Las condiciones de

salinidad influyeron en el aspecto morfológico de los nódulos, se observaron nódulos más pequeños con estrías blancas intensas en la superficie y el color varía entre rosa claro y blanco.

Los datos de los parámetros relacionados con la fijación de nitrógeno, como el peso seco de nódulos (PSN) y la actividad reductora de acetileno (ARA) se exponen en la tabla A 1.3 del apéndice, y se visualizan en el diagrama de barras de la figura 1.2. Este diagrama de barras facilita el estudio comparativo de las tres simbiosis.

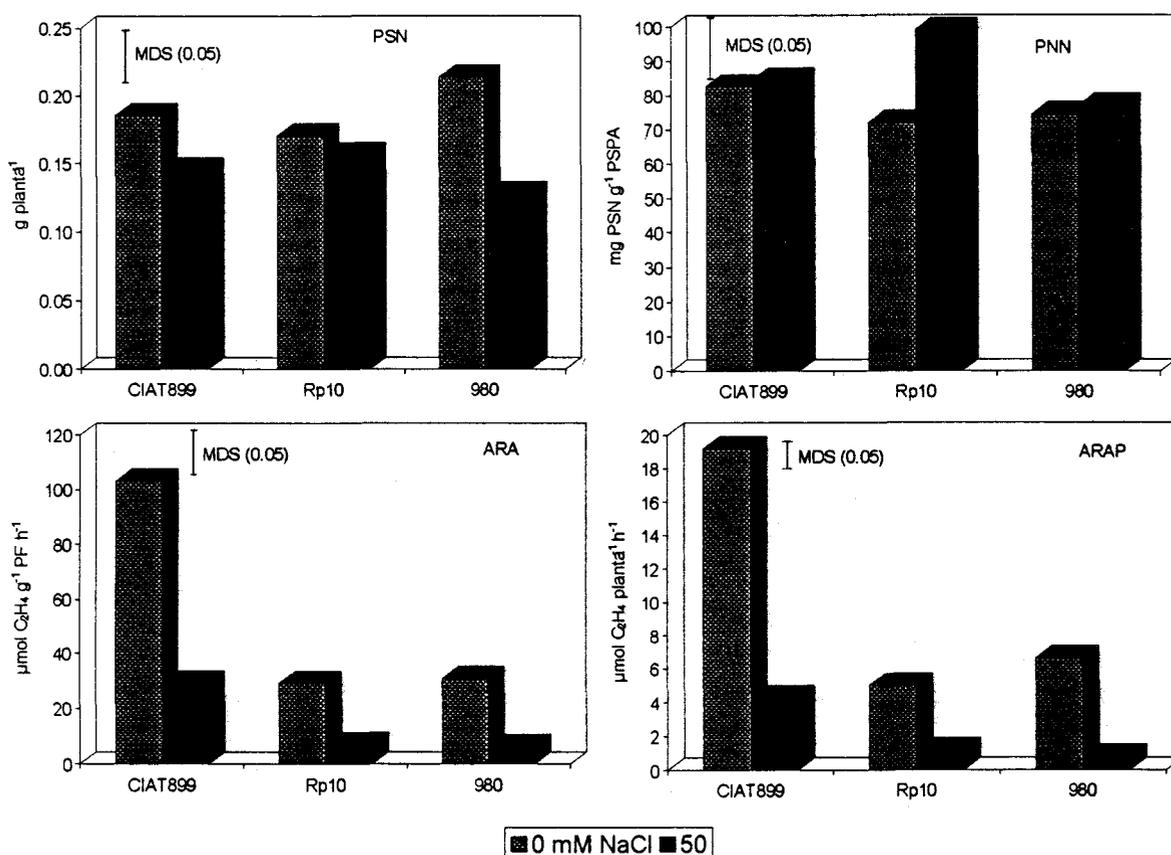


Figura 1.2. Peso seco de nódulos (PSN) en g planta⁻¹, peso normalizado de nódulos (PNN) en mg PSN g⁻¹ PSPA, actividad reductora de acetileno (ARA) en μmol C₂H₄ g⁻¹ PF h⁻¹, y ARA por planta en μmol C₂H₄ planta⁻¹ h⁻¹, en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa en simbiosis con tres cepas distintas de *Rhizobium* sp. con dos dosis de NaCl aplicadas en el estado vegetativo.

Las plantas inoculadas con la cepa 980 fueron las que alcanzaron mayor masa nodular, representando un 10-15% más que las obtenidas con las otras dos cepas ensayadas.

También se evidencia que la sal afecta a la masa nodular, y la simbiosis más afectada fue la que forma la cepa 980, ya que la disminución del peso de nódulos fue del 40% con 50 mM de NaCl. Sin embargo, con la cepa CIAT899 la reducción de la masa nodular fue del 20% y algo menos (8%) con otra cepa objeto de estudio. Este parámetro está muy bien correlacionado con parámetros de crecimiento tales como PSR y PSP (tabla 1.1).

El peso normalizado de nódulos (PNN) es un parámetro de la fijación de nitrógeno que relaciona el peso de los nódulos con el crecimiento de la parte aérea. Este parámetro varió con la cepa utilizada y con la sal en el medio de cultivo. Las variaciones inducidas por la cepa bacteriana no fueron estadísticamente significativas, mientras que la dosis de 50 mM de NaCl provocó un ligero aumento de este parámetro en todas las simbiosis estudiadas que llegó a ser significativo ($P \leq 0.05$) en la simbiosis que se establece con la cepa Rp10 (tabla A 1.3).

Otros datos bioquímicos relacionados con el proceso de fijación de nitrógeno que se exponen en la figura 1.2, proceden de los datos numéricos expuestos en la tabla A 1.3. La actividad reductora del acetileno específica destaca con el valor más alto detectado en nódulos formados por la cepa CIAT899 de *Rhizobium tropici*, mientras que las otras cepas obtienen un tercio de esa actividad nitrogenasa. Posteriormente, se evidencia que 50 mM de NaCl provoca una inhibición de la actividad nitrogenasa similar en todas las simbiosis ensayadas, la reducción es muy drástica y alcanza valores que oscilan entre el 70-80% de la actividad nitrogenasa detectada en el tratamiento control (0 mM NaCl).

Un comportamiento bastante semejante se puede describir de la actividad reductora de acetileno por planta (ARAP), los nódulos formados por la cepa CIAT899 presentan un ARAP que representa 3 y 4 veces la detectada para los nódulos de la cepa 980 y Rp10, respectivamente. De nuevo se observa que la reducción de esta actividad por la salinidad es intensa, de hecho se reduce a la cuarta parte con las cepas CIAT899 y RP10 y 1/8 con la 980. Es correcto pensar que el proceso de fijación de nitrógeno realizado por la cepa 980 es sensible a la sal, ya que presenta la mayor reducción de la actividad nitrogenasa (ARA) y de la ARAP. Se destaca un elevado coeficiente de correlación entre ARA y ARAP en la tabla 1.1 ($r = 0.99$, $P \leq 0.001$).

El análisis de la varianza de los parámetros seleccionados con la fijación de nitrógeno (tabla A 1.4) indica que la cepa de *Rhizobium* fue la fuente de variación que tuvo más efecto en la actividad nitrogenasa (específica y por planta) siendo responsable de algo más del 60% de variabilidad observada.

1.3. Metabolismo de ureidos.

La valoración del contenido de ureidos totales, alantoína y ácido alantoico, y de la actividad alantoinasa detectados en los nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculada con tres cepas de *Rhizobium*, se exhiben en la tabla A 1.5 del apéndice. Se han representado en la figura 1.3 los datos relativos a estos parámetros, en diagrama de barras.

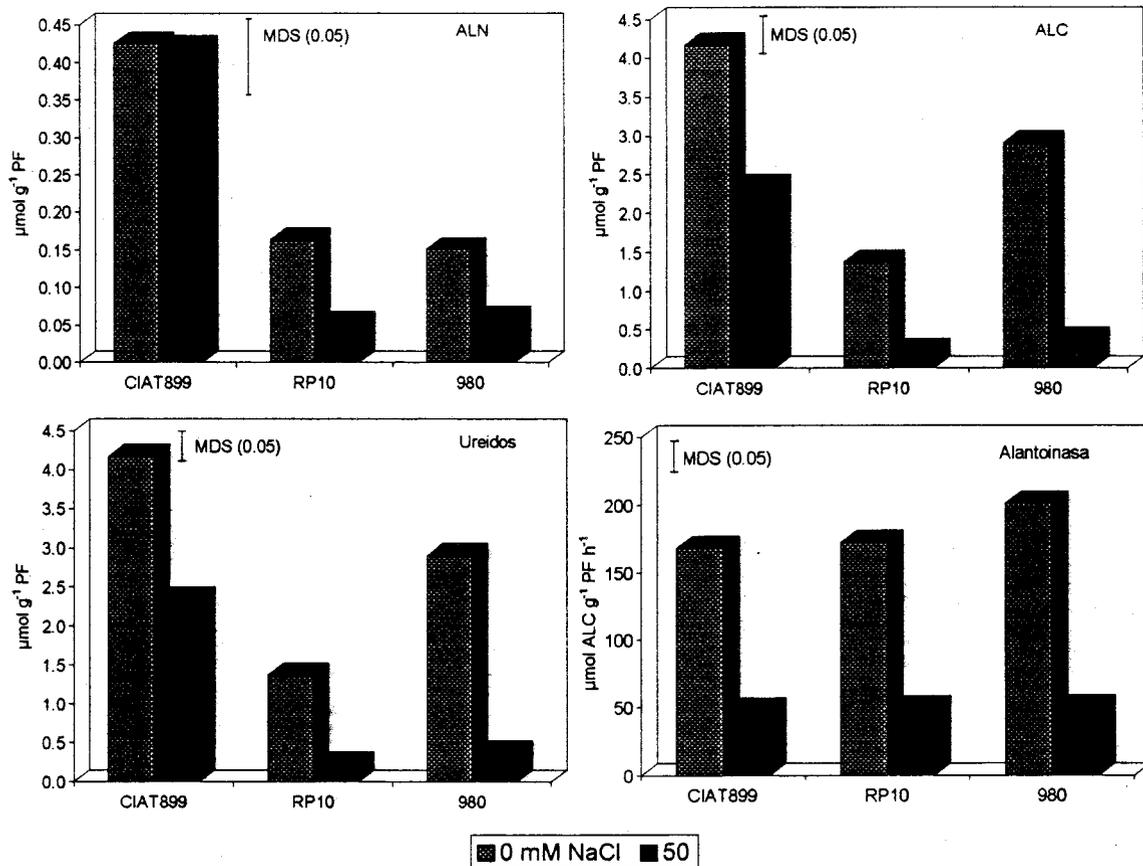


Figura 1.3. Contenido de alantoína (ALN), ácido alantoico (ALC) y ureidos (ALN+ALC) en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF y actividad alantoinasa en $\mu\text{mol ALC g}^{-1}$ PF h^{-1} , en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Africa en simbiosis con tres cepas distintas de *Rhizobium* sp. con dos dosis de NaCl aplicadas en el estado vegetativo.

Al contemplar los datos representados en la tabla A 1.5 se comprueba que: **a)** la alantoína es el componente minoritario en el contenido de ureidos, representa entre el 5 y 12% dependiendo de la cepa utilizada; **b)** la sal incrementa esta contribución, representando el contenido de alantoína entre el 15 y 23% del contenido de ureidos totales según la cepa estudiada; **c)** de los dos metabolitos que constituyen el contenido de ureidos, el ácido alantoico es más sensible a la salinidad que la alantoína, ya que las reducciones provocadas por 50 mM de NaCl son mayores en el ácido alantoico independientemente de la simbiosis estudiada; **d)** la producción de ureidos viene condicionada por la cepa bacteriana, siendo los nódulos presentes en las plantas inoculadas con la CIAT899 los que presentan mayor contenido de ureidos incluso en condiciones de salinidad; **e)** así mismo, la CIAT899 confirió a la simbiosis *Rhizobium-Phaseolus* una mayor adaptación y/o tolerancia a la salinidad; **f)** los análisis de la varianza indican que la variabilidad observada en el contenido de ácido alantoico y de ureidos totales se debió fundamentalmente a la cepa de *Rhizobium* (60%) y al tratamiento (30%), mientras que en la actividad alantoinasa el tratamiento salino fue el responsable del 95% de la variabilidad observada (tabla A 1.6); **g)** por último, mencionar el alto coeficiente de correlación encontrado (tabla 1.1) entre ácido alantoico y contenido de ureidos (0.99, $P \leq 0.001$).

Respecto a la actividad alantoinasa, interesa señalar que es mayor en los nódulos procedentes de la CIAT899, presentando en las otras simbiosis valores menores, estas diferencias son estadísticamente significativas. Sin embargo, el efecto de la sal es semejante en las tres simbiosis ensayadas, prácticamente en todas ellas la actividad alantoinasa se reduce a la cuarta parte por efecto de 50 mM de NaCl.

Tabla 1.1. Matriz de coeficientes de correlación simple entre variables relacionadas con el crecimiento, fijación de nitrógeno y metabolismo de ureidos en nódulos de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa en simbiosis con las cepas CIAT899, Rp10 y 980 de *Rhizobium* sp. Variables: PSPA, peso seco parte aérea; PSR, peso seco raíz; PSP, peso seco planta; RPA, relación raíz/parte aérea; ARA, actividad nitrogenasa específica; ARAP, actividad nitrogenasa por planta; PSN, peso seco de nódulos; PNN, peso normalizado de nódulos; ALN, alantoina; ALC, ácido alantoico; ALA, actividad alantoinasa.

	PSPA	PSR	PSP	RPA	ARA	ARAP	PSN	PNN	ALN	ALC	Ureidos	ALA
PSPA	1.00											
PSR	0.66	1.00										
PSP	0.98	0.79	1.00									
RPA	-0.48	0.33	-0.30	1.00								
ARA	0.38	-0.35	0.24	-0.86	1.00							
ARAP	0.45	-0.26	0.31	-0.84	0.99	1.00						
PSN	0.90	0.57	0.89	-0.49	0.48	0.55	1.00					
PNN	-0.65	-0.42	-0.62	0.30	-0.13	-0.14	-0.27	1.00				
ALN	0.10	-0.57	-0.09	-0.83	0.75	0.70	0.16	-0.04	1.00			
ALC	0.64	-0.01	0.52	-0.83	0.88	0.89	0.70	-0.30	0.75	1.00		
Ureidos	0.60	-0.07	0.46	-0.85	0.89	0.89	0.66	-0.28	0.80	0.99	1.00	
ALA	0.96	0.49	0.92	-0.61	0.54	0.60	0.89	-0.60	0.16	0.68	0.64	1.00

Valor crítico			
P	0.05	0.01	0.001
	0.81	0.92	0.97

2. Influencia de la dosis de nitrato en la simbiosis *Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium tropici*.

En este estudio se aborda el efecto de la dosis de nitrato en el establecimiento y desarrollo de la simbiosis. Para ello se aplicaron cinco concentraciones de nitrato, en el rango 0-10 mM, con objeto de conocer la dosis óptima que no afecta la fijación de nitrógeno. Esta dosis de nitrato puede contribuir en las primeras fases del crecimiento, durante el estado de plántula, cuando el proceso de fotosíntesis no suministra fotosintato para el desarrollo de la nodulación, y la fijación de nitrógeno no es totalmente eficiente. Este experimento se llevó hasta fructificación, realizando cuatro recogidas; la primera de ellas se correspondió con el estado vegetativo del cultivo. En la segunda, que se llevó a cabo a los 28 días de cultivo, las plantas se encontraban al inicio de floración. Durante los seis días siguientes, las plantas florecidas alcanzaron lo que se considera plena floración (tercer muestreo) y el último se realizó a los 40 días, cuando en las plantas se aprecia la presencia de vainas, fructificación. Este experimento se realizó dos veces y de cada tratamiento se evaluaron seis repeticiones.

2.1. Análisis del crecimiento.

Los parámetros determinados, relacionados con el crecimiento de las plantas, se encuentran detallados en la tabla A 2.1 del apéndice, en la que se expone el peso seco de parte aérea y raíz, el peso seco total de planta, la superficie foliar y la relación raíz/parte aérea. También se indica la mínima diferencia significativa ($P \leq 0.05$). De forma gráfica en el diagrama de barras de la figura 2.1 se exhiben algunos de los parámetros de crecimiento a lo largo del cultivo, con distintas dosis de nitrato.

El crecimiento de la planta se incrementó con la dosis de nitrato en el medio, observándose desde la primera recogida que con la máxima dosis de nitrato (10 mM) las plantas incrementan un 50% el peso seco en general tanto de raíz como de parte aérea. Sin embargo, el incremento que se obtiene con 10 mM es poco significativo respecto a 5 mM, ya que con esta dosis de nitrato se obtienen en las primeras recogidas aumentos del 35-40% que se intensifican en las siguientes, lográndose porcentajes que oscilan entre el 42-48% más de materia seca que el control.

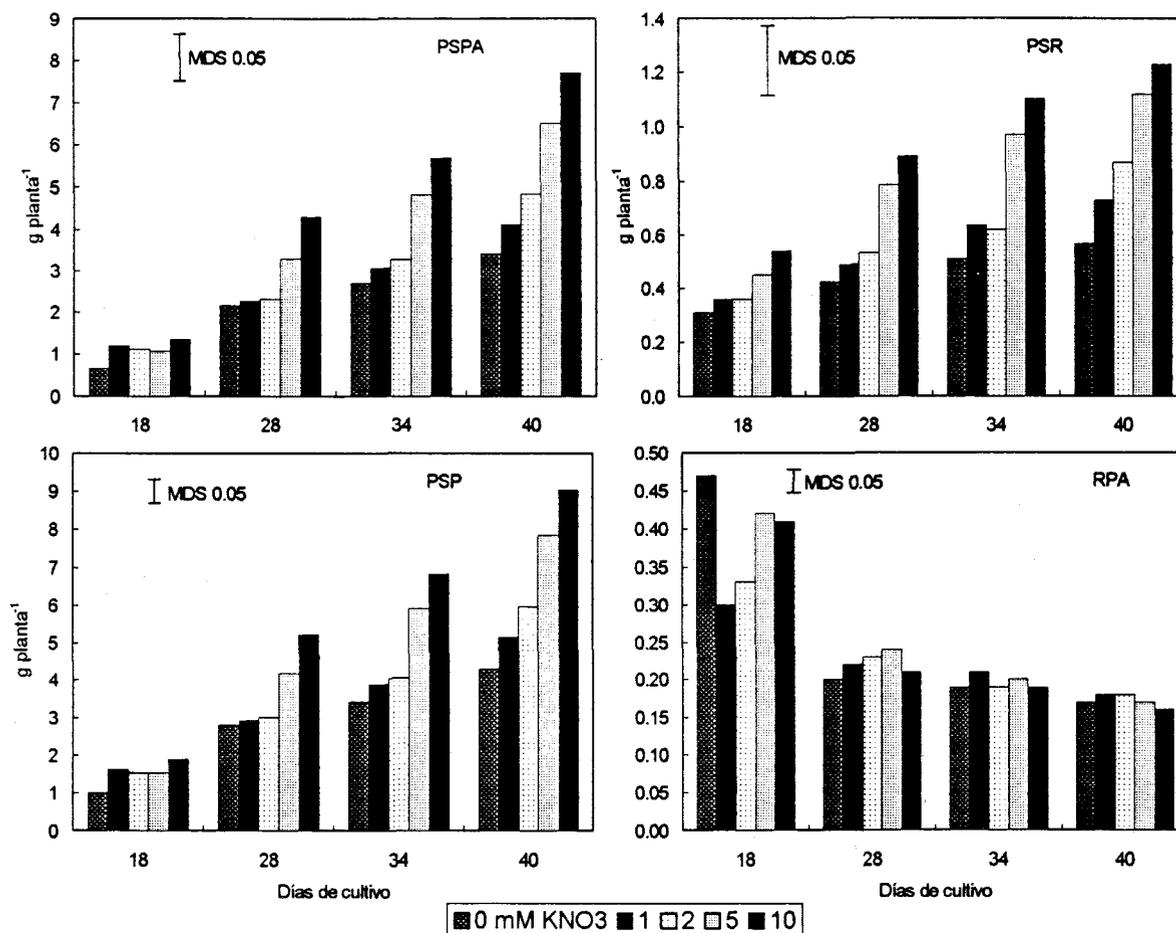


Figura 2.1. Peso seco parte aérea (PSPA), raíz (PSR) y planta completa (PSP) en g⁻¹ planta, relación raíz/parte aérea, de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con la cepa CIAT899 de *R. tropici*, tratadas con cuatro dosis de KNO₃ desde el inicio del cultivo.

Evidentemente el nitrógeno favorece el desarrollo foliar reflejándose tanto en el aumento del peso seco de parte aérea como de la superficie foliar. En los dos últimos muestreos se alcanzan incrementos del 60% de la superficie foliar de las plantas con 10 mM de nitrato respecto al control. Este efecto se confirma en los datos obtenidos de relación raíz/parte aérea (tabla A 2.1 y figura 2.1). En la primera recogida los valores oscilan entre 0.30 y 0.47, indicando que del total de la planta, la raíz representa el 30%, mientras que en la última recogida, ya en fructificación la relación raíz/parte aérea disminuye obteniéndose valores entre 0.16-0.18. Estos valores indican que la raíz representa el 15% del peso total de la planta. Es de destacar que las dosis de nitrato utilizadas no tuvieron un efecto significativo en esta relación salvo en el primer muestreo.

El análisis de la varianza realizado a los parámetros de crecimiento y representados en la tabla A 2.2 del apéndice, muestran niveles altos de significación estadística, y en todos ellos se aprecia que la variabilidad observada puede asignarse en un 70% al día de cultivo y en un 25% al efecto del nitrato.

2.2. Fijación de nitrógeno.

Se han evaluado diversos parámetros relacionados con el proceso de fijación de nitrógeno, que se recopilan en la tabla A 2.3. En ella se contemplan el peso seco de nódulos, el peso normalizado de los mismos, la nitrogenasa representada por la actividad reductora de acetileno específica (ARA) y total por planta (ARAP). La representación gráfica de estos parámetros se puede observar en la figura 2.2.

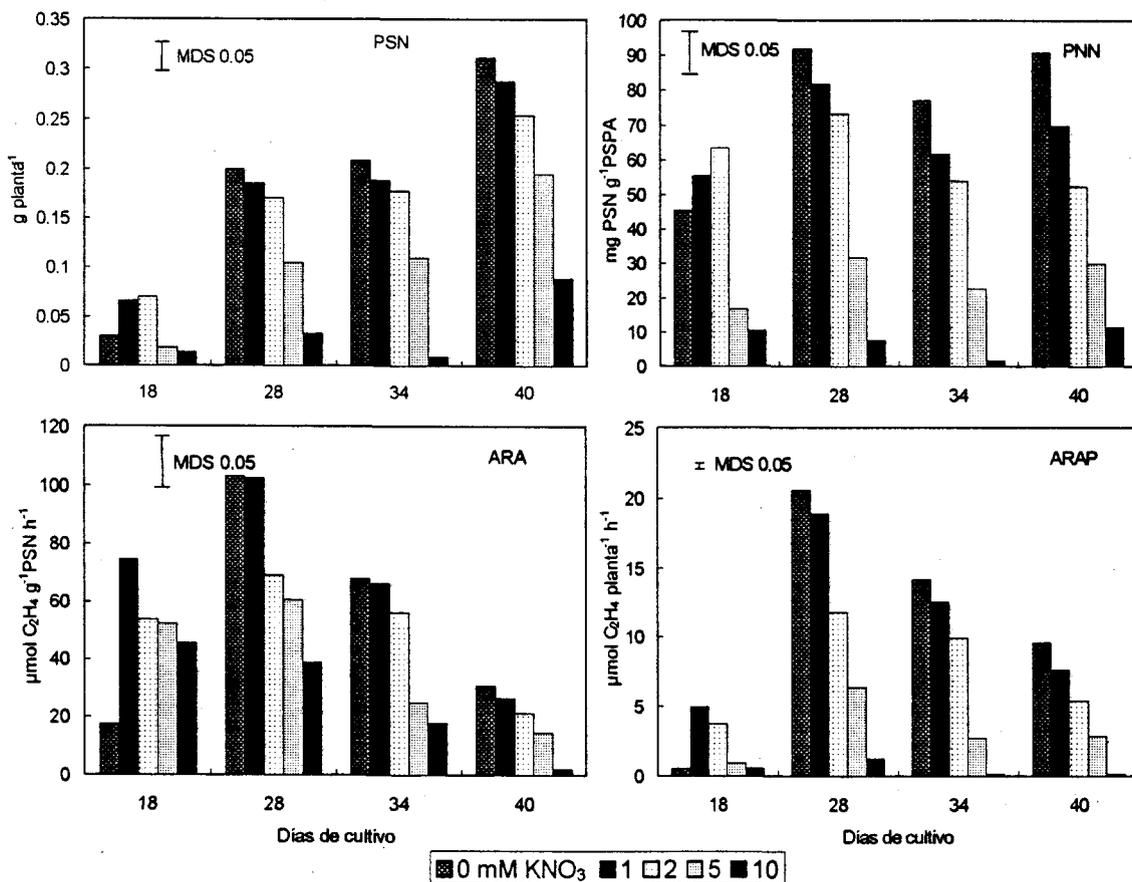


Figura 2.2. Peso seco de nódulos (PSN) en g⁻¹ planta, peso normalizado de nódulos (PNN) en mg PSN g⁻¹ PSPA, actividad reductora de acetileno (ARA) en μmol C₂H₄ g⁻¹ PF h⁻¹ y ARA por planta (ARAP) en μmol C₂H₄ planta⁻¹ h⁻¹ en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con la cepa CIAT899 de *R. tropici*, tratadas con cuatro dosis de KNO₃ desde el inicio del cultivo.

Al estudiar la evolución del peso seco de nódulos en el tiempo de cultivo se comprueba que la dosis de 1 mM, que duplica el PSN respecto al control, triplica el valor en la segunda y tercera recogida, y en la última se detecta un incremento del 65%. La dosis de 2 mM, al igual que lo descrito con 1 mM para el primer muestreo, duplica su valor en la segunda y tercera recogida, y en la última se observa un incremento semejante al ya señalado (69%). La dosis 5 mM provoca en el PSN una disminución que representa la mitad de lo obtenido en el control en las tres primeras recogidas.

El efecto descrito para el PSN no es tan drástico en el peso normalizado de nódulos, al relacionar el peso de nódulos con el de la parte aérea. La varianza indica que el tratamiento con nitrato fue la fuente de variación que tuvo más efecto sobre el peso normalizado de nódulos siendo responsable del 86% de la variabilidad observada (tabla A 2.4).

La inhibición de la fijación de nitrógeno por el nitrato se aprecia en la actividad nitrogenasa. A lo largo del desarrollo del cultivo, el máximo de actividad se detecta a los 28 días coincidiendo con el inicio de floración, aún cuando a partir de ese momento la actividad nitrogenasa decae en cualquiera de las dosis de nitrato ensayadas. La inhibición brusca se hace patente en la última recogida coincidiendo con el inicio de la fructificación. Con 1 mM de nitrato se obtienen valores semejantes al control en todas las etapas del cultivo analizadas, no encontrándose diferencias significativas entre los tratamientos excepto a los 18 días de cultivo, que con esta dosis de nitrato se detectó una actividad nitrogenasa cuatro veces mayor. Esto demuestra la necesidad de la adición de una dosis mínima de nitrato en las tres primeras semanas de cultivo, que puede eliminarse una vez bien establecida la simbiosis fijadora de nitrógeno, y ser esta última la fuente de nitrógeno suficiente para el desarrollo del cultivo.

Los valores de actividad nitrogenasa que se obtienen con 2 y 5 mM de KNO_3 durante el crecimiento del cultivo son semejantes en las dos últimas recogidas, pero el efecto inhibitor del nitrato es más intenso con 5 mM. La actividad nitrogenasa detectada en las plantas que han recibido la dosis mayor de nitrato (10 mM) presenta un curioso perfil, así en la primera recogida casi triplica el tratamiento control mientras que en la segunda y tercera recogida (inicio de floración y floración) se produce el descenso siendo del 14 y 60% respectivamente.

Al estudiar los datos obtenidos con ARAP se detecta que los máximos valores se obtienen en la segunda recogida, con 0 y 1 mM de nitrato en el medio, no exhibiendo diferencias significativas excepto en el primer muestreo. La similitud descrita con 2 y 5 mM de nitrato de la actividad nitrogenasa no se refleja en ARAP, ya que en este parámetro se evidencia una reducción de la actividad con la dosis de nitrato y en el tiempo de cultivo a partir del inicio de floración, debido a la reducción del peso seco de nódulos.

Las correlaciones entre estos parámetros de fijación de nitrógeno que se presentan en la tabla 2.3 indican que son positivas y altamente significativas ($P \leq 0.001$). Así mismo, los análisis de la varianza indican que la variabilidad observada es debida el 60% al tiempo de cultivo y el 35% a la dosis de nitrato (tabla A 2.4).

2.3. Actividades enzimáticas.

Han sido determinadas las actividades de dos enzimas claves del metabolismo nitrogenado en el citosol nodular, glutamina sintetasa y glutamato sintasa, que utilizan el amonio bien procedente del nitrato del medio de cultivo, asimilado por la nitrato reductasa y nitrito reductasa, o de la nitrogenasa. Además, se determinan la xantina deshidrogenasa y la uricasa como enzimas claves del catabolismo de las purinas, responsables de la formación de ureidos, compuestos nitrogenados transportadores del nitrógeno asimilado al xilema en esta especie vegetal. Todo ello se recoge en la tabla A 2.5 del apéndice y gráficamente en la figura 2.3. El análisis de la varianza se encuentra representado en la tabla A 2.6 del apéndice.

Cuando se observa la actividad GS expresada en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Africa (figura 2.3) se aprecia que el máximo de actividad se alcanza en el inicio de floración (día 28 de cultivo, segunda recogida) independientemente de la dosis de nitrato utilizada. A partir de ese momento, esta actividad enzimática experimenta una disminución del 50% en todas las dosis de nitrato ensayadas. Al evaluar como influye el incremento del KNO_3 en el medio de cultivo, se establece que los tratamientos control (inoculado, 0 mM KNO_3) y con 1 mM de nitrato, obtienen la máxima actividad con valores muy semejantes al menos en los dos primeros muestreos. En los demás se aprecia una ligera disminución significativa ($P \leq 0.05$) del 10%. Sin embargo, con 2 y 5 mM de KNO_3 en el medio esta actividad es menos intensa

representando 85-90% de lo obtenido en el tratamiento control. Por último, señalar que esta disminución se acentúa con 10 mM ya que la reducción que se establece respecto al control se sitúa entre el 30-50% dependiendo del muestreo.

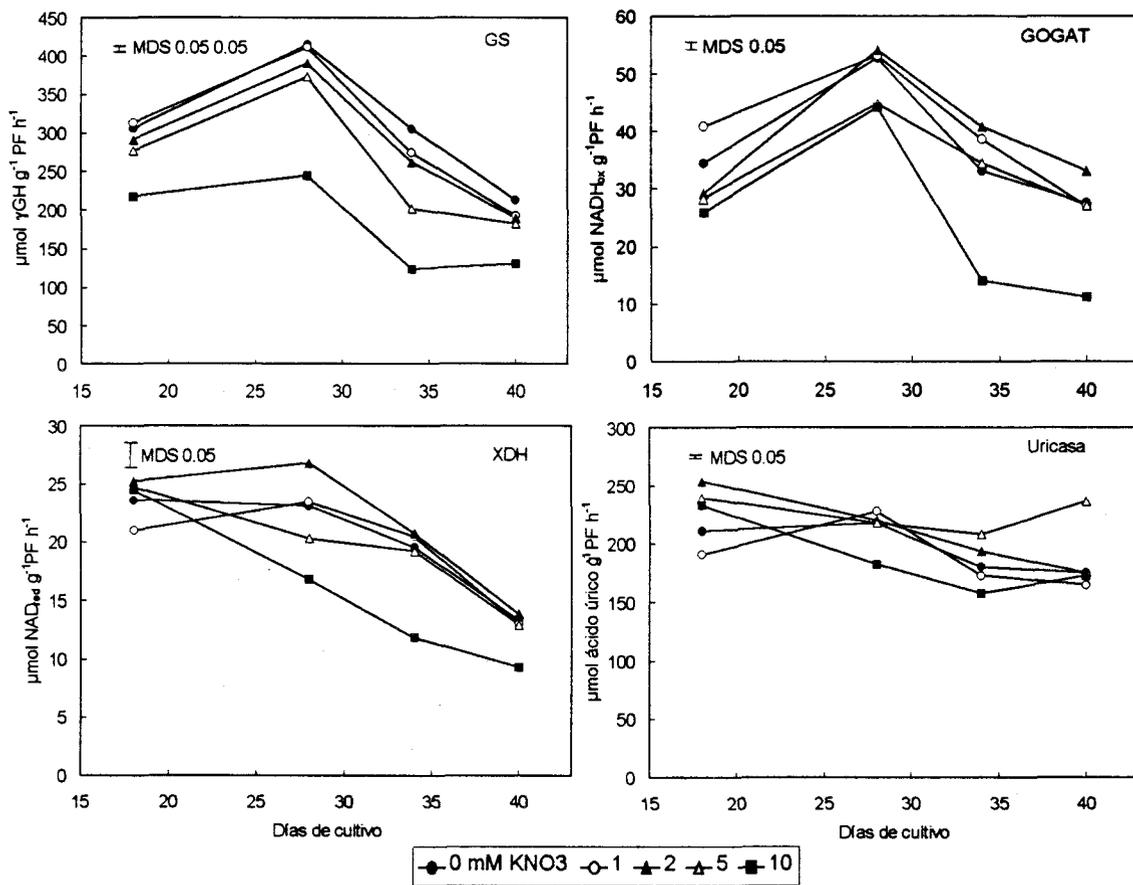


Figura 2.3. Actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT), xantina deshidrogenasa (XDH) y uricasa, en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculados con la cepa CIAT899 de *R. tropici*, tratadas con cuatro dosis de KNO_3 desde el inicio del cultivo.

Los datos obtenidos para la actividad NADH-GOGAT, que se correlaciona positivamente con la GS (0.85; $P \leq 0.001$), presentan cierta semejanza a los datos observados con la actividad GS. El máximo de actividad se alcanza al inicio de floración, y los nódulos correspondientes a las plantas tratadas con 10 mM de KNO_3 exhiben una caída de la actividad GOGAT del orden del 60%, al menos en las dos últimas recogidas realizadas. Aunque se observan algunas diferencias: a) el máximo de actividad se obtiene con 2 mM de nitrato en todos los muestreos excepto en el primero; b) la caída de actividad en el último muestreo es algo más drástica, ya que se detectan

disminuciones del 75% respecto al máximo (con 10 mM) mientras que en la GS todas ellas se situaron entorno al 50%; c) el análisis de la varianza (tabla A 2.6) indica que el tiempo de cultivo contribuyó en un 65% a la variabilidad apreciada en ambas enzimas, la dosis de nitrato en un 30% (GS) y 26% (GOGAT).

Los niveles de actividad observados de xantina deshidrogenasa disminuyen en el tiempo de cultivo, obteniéndose los máximos valores en las dos primeras recogidas. La dosis de 2 mM se puede considerar óptima, sin embargo el incremento de actividad alcanzado con esta dosis respecto a los tratamientos 0, 1 y 5 mM oscila entre 5-15%, no siendo significativo en algunos casos. Se puede intuir que no es la dosis de nitrato sino el estado fenológico de la planta lo que influye en la actividad XDH, sin olvidar que 10 mM de KNO_3 en el medio de cultivo provoca una disminución de la actividad XDH entre el 30-40% al menos a partir de la segunda recogida.

La actividad uricasa representa entre 9-10 veces la actividad XDH, de forma generalizada. Esta actividad enzimática se mantiene durante el periodo de crecimiento estudiado sin modificaciones drásticas, ni en el tiempo de cultivo, ni con la dosis de nitrato en el medio, aunque los valores mínimos se obtuvieron con 10 mM de nitrato en el medio. Se comprueba en la tabla 2.3 los coeficientes de correlación de esta enzima donde se evidencian correlaciones significativas y negativas con los parámetros de crecimiento (PSPA, PSR, PSP, SF) y positivas con la actividad GS y XDH. Incluso las fuentes de variación (tabla A 2.6) indican que la variabilidad se atribuye en un 40% al estado fenológico, en un 30% al efecto del nitrato y el resto (30%) a la interacción entre ambos factores (nitrato x tiempo).

En la tabla A 2.5 se incluyen los datos de proteína soluble nodular que han servido para elaborar los datos de las actividades enzimáticas expresados en nmol mg^{-1} proteína min^{-1} , expuestos en la tabla 2.1. En el citosol nodular, la actividad GS se mostró entre ocho y diez veces más activa que la NADH-GOGAT de forma generalizada independientemente de la dosis de nitrato y del estado fenológico del cultivo. La máxima actividad se detectó al inicio de floración, el día 28 de cultivo y en todos los tratamientos con KNO_3 , excepto el control cuyo máximo de $760.2 \mu\text{mol NADH}_{\text{ox}} \text{g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ obtenido en el tercer muestreo no es significativo con el detectado el día 28. Las dosis bajas de nitrato estimulan esta actividad enzimática (1 y 2 mM) observándose incrementos del 10-20% en las primeras recogidas, sin embargo en las

siguientes (tercera y cuarta) y con dosis de nitrato superiores de 5 y 10 mM, los niveles de actividad GS fueron inferiores al control, si bien este efecto fue estadísticamente significativo con 10 mM.

Tabla 2.1. Actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT), xantina deshidrogenasa (XDH) y uricasa en nmol mg^{-1} proteína min^{-1} en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899 tratadas con cinco dosis de nitrato potásico a largo de cuatro recogidas.

Días	KNO ₃ (mM)	GS	GOGAT	XDH	Uricasa
18	0	418	47.0	32.1	288
	1	587	76.6	39.3	357
	2	562	56.5	48.7	490
	5	439	44.9	39.2	379
	10	374	44.6	42.0	399
28	0	735	93.5	40.9	386
	1	796	102.7	45.3	439
	2	787	109.0	53.9	442
	5	730	87.7	39.7	426
	10	505	91.4	34.8	376
34	0	760	82.2	48.8	449
	1	615	86.6	46.0	387
	2	708	110.4	56.2	523
	5	566	96.6	54.0	584
	10	478	54.0	45.8	606
40	0	556	71.7	34.9	458
	1	509	71.2	34.3	435
	2	439	76.5	32.1	405
	5	452	67.2	32.1	586
	10	328	28.2	23.4	432
MDS (0.05)		11	1.4	4.74	4

El efecto del nitrato observado en la actividad glutamato sintasa cuando se expresa en nmol mg^{-1} proteína min^{-1} , fue bastante similar al descrito anteriormente. El máximo de actividad se detecta al inicio de la floración, y la disminución de la actividad NADH-GOGAT respecto al control se evidencia con 10 mM de nitrato y en los dos últimos muestreos.

Las enzimas de la degradación de las purinas, cuando se expresan por mg de proteína (tabla 2.1), presentan el máximo de actividad en floración (34 días de cultivo) y

aún cuando el máximo de actividad se detecta con 2 mM de KNO_3 , se puede apreciar que 1 mM de nitrato incrementa la actividad XDH en un 10% en las tres primeras recogidas y con 2 mM el incremento en ese mismo tiempo de cultivo es algo mayor (15-30%), incluso con 5 mM se observaron ligeros incrementos del 10% en el primer y tercer muestreo, pero 10 mM de nitrato indujo una actividad XDH inferior al control a lo largo de todo el tiempo de experimentación.

La tendencia descrita en los datos que se obtuvieron de actividad uricasa es algo diferente. El máximo de actividad se observa en diferente estado fenológico de las plantas dependiendo del tratamiento. Mientras el control alcanza el máximo al final del tiempo de experimentación, con 1 mM se obtiene en el segundo muestreo y con el resto de las dosis de nitrato ensayadas (2, 5 y 10 mM) en el tercer muestreo (plena floración). Estas variaciones indican que es la enzima más activa en etapas tardías de la planta de las ensayadas. Además, los niveles detectados en los dos últimos muestreos se incrementan hasta el 35% respecto a los que se obtienen al inicio de las determinaciones (18 días de cultivo).

2.4. Contenido de ureidos en nódulos.

La evolución de ureidos totales en el citosol nodular se observa en la figura 2.4, y los datos numéricos de alantoína y ácido alantoico se han plasmado en la tabla 2.2, en la que se incluyen las MDS ($P \leq 0.05$). En general, se detecta que la contribución del ácido alantoico al contenido total de ureidos es mayoritaria, del 90% respecto al 10% que representa la alantoína. Esto se comprobará en todos los experimentos realizados en esta memoria.

El contenido de alantoína y ácido alantoico se vió modificado tanto por los niveles de nitrato como a lo largo del tiempo del cultivo. En el tratamiento control, el contenido de alantoína se redujo a la mitad en el tiempo de experimentación mientras que el ácido alantoico, aún cuando incrementó al inicio de la floración (25%), al final del cultivo (último muestreo) se redujo en un 70%. Es de destacar que el nitrato en las épocas iniciales del cultivo, concretamente en el primer muestreo duplica la alantoína con 10 mM respecto al control. Los datos observados con las distintas dosis de nitrato son semejantes, incluso se intensifican con los niveles crecientes de nitrato en el medio.

Ello condiciona que los ureidos disminuyan a partir del inicio de la floración en todos los tratamientos ensayados (figura 2.4) y con descensos estadísticamente significativos.

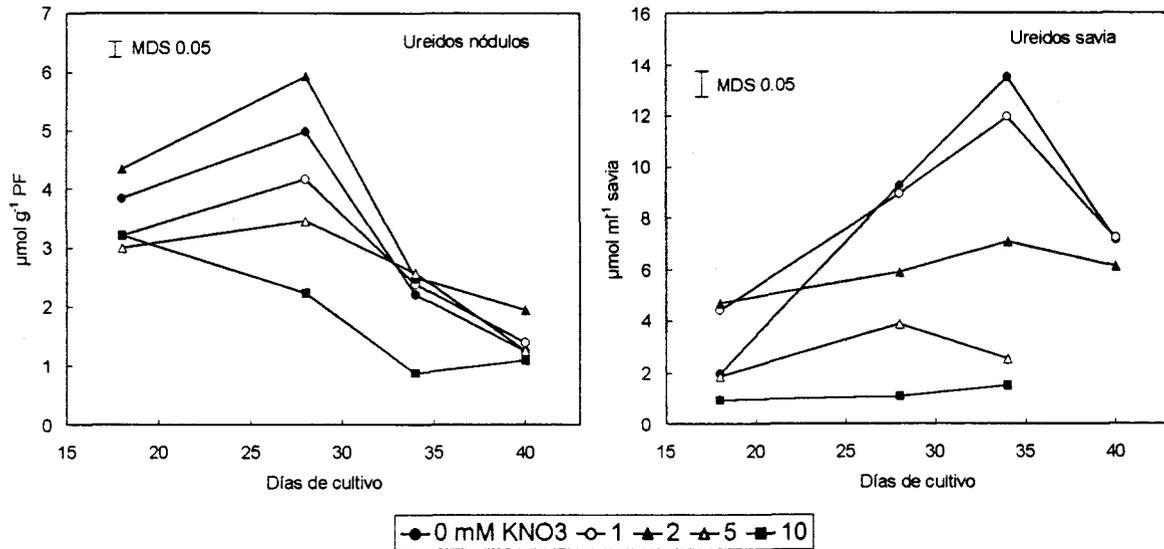


Figura 2.4. Contenido de ureidos en nódulos, expresado en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF, y en savia expresado en $\mu\text{mol ml}^{-1}$ savia, de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con la cepa CIAT899 de *R. tropici*, tratadas con cuatro dosis de KNO_3 desde el inicio del cultivo.

Por último, hay que indicar que el tiempo de cultivo provoca una reducción en el contenido de ureidos que fue del orden del 65% en el tratamiento control y con 10 mM de nitrato. Con las otras dosis de nitrato, las reducciones fueron algo más suaves (35-55%). Sin embargo, el tratamiento control y 10 mM de KNO_3 fueron los que obtuvieron durante el tiempo de cultivo valores más estables del contenido de ureidos ya que a lo largo del cultivo los valores sufrieron una oscilación del 10%.

En la tabla 2.3 se comprueba que el contenido de ureidos en nódulos se correlaciona positivamente con parámetros de fijación de nitrógeno (ARA), actividades enzimáticas del citosol nodular (GS/GOGAT, XDH, uricasa), y negativamente con parámetros de crecimiento (PSP, RPA etc.), entre otros.

2.5. Contenido de ureidos, aminoácidos, nitrato y abundancia relativa de ureidos (RU) en savia.

Se ha elaborado la tabla 2.2 en la que se recogen diversos datos relacionados con el contenido de alantoína y ácido alantoico en nódulos y en savia del xilema, el

contenido de aminoácidos y nitrato también en el flujo xilemático, y el porcentaje de abundancia de nitrógeno en forma de ureidos en la savia representado como RU.

El estudio del contenido de ureidos en savia (figura 2.4) indica que: **a)** el máximo se obtiene a los 34 días de cultivo, coincidiendo con el máximo de floración e inicio de fructificación; **b)** el nivel de ureidos transportados por la savia es 6 veces el detectado en nódulos en el tratamiento control y con 1 mM de nitrato; **c)** los tratamientos 1 y 2 mM de nitrato favorecen la exportación de ureidos en savia en todos los muestreos realizados, como se aprecia en el control; **d)** en la fructificación no se detectan ureidos en savia, al menos con 5 y 10 mM de KNO_3 y disminuciones significativas con las otras dosis ensayadas; **e)** el ácido alantoico representa el 75-80% del contenido total de ureidos en la savia de *Phaseolus vulgaris* var. Africa; **f)** existe una alta correlación (0.97; $P \leq 0.001$) entre alantoína y ácido alantoico en savia, así como con otros metabolitos en la savia (tabla 2.3); **g)** la variabilidad observada en los datos que se comentan se debe al estado fenológico de la planta.

El nitrato en el medio de cultivo (5 y 10 mM) favorece la acumulación de aminoácidos en la savia (tabla 2.2) obteniendo los máximos valores en el primer muestreo (día 18). Sin embargo tanto con el tratamiento control como con 1 y 2 mM KNO_3 el máximo se obtiene en plena floración (día 34, tercer muestreo). Al igual como se describió anteriormente, no se detectaron en fructificación en aquellos tratamientos que se habían aplicado altas dosis de nitrato (5 y 10 mM).

Por último, se determinó el contenido de nitrato en savia (tabla 2.2). Al estudiar los valores obtenidos se puede observar que responden al patrón descrito del contenido de aminoácidos en el flujo xilemático, ya que se obtienen los máximos valores en plena floración (34 días) en el tratamiento control, 1 y 2 mM, y en el crecimiento vegetativo (18 días de cultivo) con 5 y 10 mM de KNO_3 . El contenido de nitrato en los tratamientos control, 1 y 2 mM se reduce a la mitad desde el tercer muestreo al cuarto (fructificación) mientras que en el contenido de aminoácidos este efecto no fue tan drástico ya que había una disminución no significativa, incluso con 2 mM se incrementa un 48% el contenido de aminoácidos en la fructificación (cuarto muestreo). Otro aspecto distinto que se aprecia en los tratamientos con 5 y 10 mM es que la disminución del contenido de aminoácidos desde el primer muestreo fue gradual y llegó al 50% en la tercera recogida, en cambio el contenido de nitrato no sufrió una reducción tan intensa.

Tabla 2.2. Contenido de alantoína (ALN), ácido alantoico (ALC) en nódulos en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PFN, y en savia en $\mu\text{mol ml}^{-1}$ savia, así como el contenido de aminoácidos (AA) y nitratos en savia en $\mu\text{mol ml}^{-1}$, y abundancia relativa de ureidos (RU) en porcentaje, en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899 tratadas con cinco dosis de nitrato potásico a largo de cuatro recogidas. (ND = no determinado)

Parámetro	Días	KNO_3 (mM)				
		0	1	2	5	10
ALN nódulo	18	0.41	0.43	0.31	0.70	0.83
	28	0.49	0.42	0.30	0.13	0.26
	34	0.18	0.21	0.26	0.19	0.18
	40	0.25	0.28	0.20	0.10	0.08
MDS (0.05) 0.19						
ALC nódulo	18	3.43	2.78	4.03	2.29	2.38
	28	4.49	3.75	5.63	3.33	1.97
	34	2.03	2.17	2.23	2.38	0.70
	40	1.00	1.11	1.75	1.16	1.02
MDS (0.05) 0.24						
ALN savia	18	0.24	0.99	0.89	0.11	0.07
	28	2.64	2.39	1.58	0.82	0.20
	34	4.03	3.48	1.89	0.55	0.35
	40	1.53	1.73	1.16	ND	ND
MDS (0.05) 0.028						
ALC savia	18	1.71	3.41	3.79	1.76	0.87
	28	6.62	6.53	4.31	3.04	0.89
	34	9.49	8.47	5.19	1.99	1.15
	40	5.63	5.49	4.96	ND	ND
MDS (0.05) 0.020						
AA savia	18	3.34	4.46	4.24	5.69	8.17
	28	4.74	4.41	3.90	4.60	4.87
	34	6.53	6.32	4.04	2.97	4.02
	40	5.99	5.10	6.01	ND	ND
MDS (0.05) 0.98						
NO_3^- savia	18	0.25	1.54	2.05	13.82	17.53
	28	0.19	0.35	2.06	4.90	10.76
	34	0.62	1.61	2.89	10.83	14.71
	40	0.30	0.69	1.63	ND	ND
MDS (0.05) 0.80						
RU% savia	18	68.5	74.6	74.8	27.7	12.8
	28	88.3	88.2	79.8	61.9	21.8
	34	88.9	85.8	80.3	42.4	24.3
	40	82.0	83.3	76.2	ND	ND
MDS (0.05) 3.53						

Estos parámetros condicionaron los resultados del porcentaje de abundancia del nitrógeno en forma de ureidos transportado por el xilema (RU, tabla 2.2). Los resultados indican que los tratamientos con 1 y 2 mM de KNO_3 se asemejan bastante al control dependiente exclusivamente de la fijación de nitrógeno. Además, el porcentaje aumenta

con el crecimiento del cultivo en cualquier dosis de nitrato empleada. Por último, se aprecia que existen algunas diferencias estadísticamente significativas en los datos observados con 1 y 2 mM de nitrato interesantes de señalar, que no se aprecian si se comparan los datos obtenidos del tratamiento control y 1 mM. Estas diferencias abogan por considerar 1 mM como la dosis idónea en posteriores estudios a realizar con *Phaseolus vulgaris* var. Africa. Los coeficientes de correlación obtenidos entre RU y los parámetros de fijación de nitrógeno contemplados en la tabla 2.3 son interesantes de mencionar, así como los obtenidos con las actividades enzimáticas del ciclo de la glutamato sintasa.

Tabla 2.3. Matriz de coeficientes de correlación simple entre variables relacionadas con crecimiento, la fijación de nitrógeno, las enzimas del metabolismo del amonio y del catabolismo de purinas, contenido en ureidos, aminoácidos y nitratos en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa, inoculadas con Ciat 899 de *R. tropici*, tratadas con cinco dosis de KNO₃ desde el inicio del cultivo. Variables: PSPA, peso seco parte aérea; PSR, peso seco de raíz; PSP, peso seco de planta; RPA, relación raíz/parte aérea; SF, superficie foliar; PNN, peso normalizado de nódulos; ARA, actividad reductora de acetileno; ARAP, ARA por planta; GG, glutamato sintasa; GS, glutamina sintetasa; XDH, xantina deshidrogenasa; URIC, uricasa; PRT, proteína soluble en el citosol nodular; ALNn, alantoina en nódulos; ALCn, ácido alantoico en nódulos; Ureid.n, ureidos en nódulos; ALNs, alantoina en savia; ALCs, ácido alantoico en savia; Ureid.s, ureidos en savia; AAs, aminoácidos en savia; NITs, nitratos en savia; RU, abundancia relativa de ureidos en savia.

	PSPA	PSR	PSP	RPA	SF	PSN	PNN	ARA	ARAP	GG	GS	XDH	URIC	PRT	ALNn	ALCn	Ureid.n	ALCs	ALNs	Ureid.s	AAs	NITs	RU	
PSPA	1.00																							
PSR	0.94	1.00																						
PSP	1.00	0.94	1.00																					
RPA	-0.77	-0.56	-0.77	1.00																				
SF	0.98	0.93	0.98	-0.70	1.00																			
PSN	0.30	0.01	0.31	-0.69	0.23	1.00																		
PNN	-0.23	-0.52	-0.22	-0.36	-0.27	0.79	1.00																	
ARA	-0.45	-0.51	-0.44	-0.10	-0.51	0.14	0.51	1.00																
ARAP	-0.07	-0.30	-0.06	-0.51	-0.13	0.67	0.82	0.77	1.00															
GG	-0.24	-0.30	-0.23	-0.18	-0.38	0.20	0.43	0.73	0.64	1.00														
GS	-0.58	-0.62	-0.58	0.12	-0.65	0.06	0.51	0.84	0.64	0.85	1.00													
XDH	-0.82	-0.70	-0.82	0.60	-0.83	-0.37	0.11	0.57	0.17	0.50	0.71	1.00												
URIC	-0.71	-0.56	-0.70	0.61	-0.72	-0.40	-0.02	0.40	-0.01	0.31	0.56	0.86	1.00											
PRT	-0.83	-0.76	-0.83	0.80	-0.82	-0.36	0.06	0.22	-0.07	0.24	0.42	0.68	0.59	1.00										
ALCn	-0.57	-0.54	-0.57	0.26	-0.62	-0.12	0.34	0.61	0.38	0.74	0.85	0.83	0.71	0.49	1.00									
ALNn	-0.67	-0.53	-0.67	0.71	-0.64	-0.41	-0.17	0.23	-0.14	-0.04	0.16	0.55	0.57	0.73	0.21	1.00								
Ureid.n	-0.64	-0.60	-0.64	0.35	-0.69	-0.17	0.30	0.62	0.35	0.71	0.84	0.87	0.76	0.57	0.99	0.34	1.00							
ALCs	0.00	-0.26	0.01	-0.52	-0.02	0.77	0.82	0.51	0.84	0.31	0.34	-0.04	-0.25	-0.19	0.07	-0.33	0.02	1.00						
ALNs	0.02	-0.21	0.02	-0.53	0.00	0.67	0.74	0.56	0.85	0.35	0.37	0.01	-0.27	-0.20	0.10	-0.32	0.05	0.97	1.00					
Ureid.s	0.00	-0.25	0.01	-0.53	-0.02	0.75	0.80	0.53	0.85	0.32	0.35	-0.02	-0.26	-0.19	0.08	-0.33	0.03	1.00	0.99	1.00				
AAs	-0.12	-0.10	-0.11	0.07	-0.09	0.17	0.01	0.06	0.05	-0.27	-0.19	-0.08	-0.09	0.07	-0.34	0.39	-0.27	0.25	0.22	0.24	1.00			
NITs	0.17	0.45	0.17	0.31	0.23	-0.69	-0.89	-0.35	-0.65	-0.46	-0.48	-0.02	0.14	-0.06	-0.31	0.40	-0.24	-0.73	-0.64	-0.70	0.20	1.00		
RU	-0.14	-0.42	-0.13	-0.39	-0.19	0.76	0.93	0.44	0.76	0.44	0.48	0.05	-0.12	-0.04	0.31	-0.38	0.24	0.84	0.76	0.82	-0.13	-0.97	1.00	

P≤	Valor crítico		
	0.05	0.01	0.001
	0.44	0.56	0.68

3. Estudio del crecimiento, fijación y asimilación de nitrógeno en *Phaseolus vulgaris* a lo largo de la ontogenia del cultivo.

El crecimiento de las plantas, así como la nodulación, fijación de nitrógeno y asimilación del nitrógeno fijado, fue estudiado a lo largo de la ontogenia, llevando a cabo recogidas de plantas cada 3-4 días. La primera de ellas se realizó a los 15 días después de la siembra, las plantas se encuentran en crecimiento vegetativo y ya se pueden separar los nódulos de las raíces. El último muestreo se realizó a los 49 días de cultivo, momento en que las plantas están en plena madurez y coincidiendo con el inicio de la senescencia, que se manifestó con la pérdida de hojas y pérdida del color rosado de los nódulos.

El crecimiento vegetativo duró hasta el día 27 de cultivo. Durante este periodo y a intervalos de tres días se llevaron a cabo cinco muestreos. El día 27 coincide con la apertura de los primeros botones florales, considerándose que las tomas de muestras realizadas los días 30 y 34 coinciden con la floración. La fructificación, que se solapó con el final de la floración, se inició a los 34 días de cultivo, encontrándose vainas plenamente formadas el día 40. En el final del crecimiento reproductor se llevaron a cabo tres muestreos más, asumiéndose que se completaba el estudio ontogénico del cultivo. Este experimento se realizó dos veces y los datos que se muestran son medias de ambos. En cada uno de los muestreos realizados se tomaban seis plantas (repeticiones).

3.1. Análisis del crecimiento.

Los parámetros de crecimiento determinados, peso seco de raíz (PSR), parte aérea (PSPA) y planta completa (PSP), expresados en g planta⁻¹, superficie foliar (SF) en cm² planta⁻¹ y relación raíz/parte aérea, se representan en la tabla A 3.1 del apéndice. Una mejor visualización de la evolución de estos parámetros a lo largo del periodo de cultivo se plasma en la figura 3.1.

El peso seco de los órganos vegetativos se incrementó con la edad del cultivo, siguiendo una tendencia en función del tiempo que se ajusta a las siguientes ecuaciones de regresión.

Ecuación	Coef. Correlación	Nivel probabilidad	Determinación (%)
$PSR = 0.024 t - 0.111$	0.967	$P < 0.001$	93.54
$PSPA = 0.129 t - 1.182$	0.994	$P < 0.001$	98.89
$PSP = 0.160 t - 1.363$	0.998	$P < 0.001$	99.58

El peso seco de parte aérea y el peso seco total por planta se ajustan a un modelo lineal, con un coeficiente de correlación superior 0.99, mientras que en el peso seco de raíz fue algo inferior (0.967).

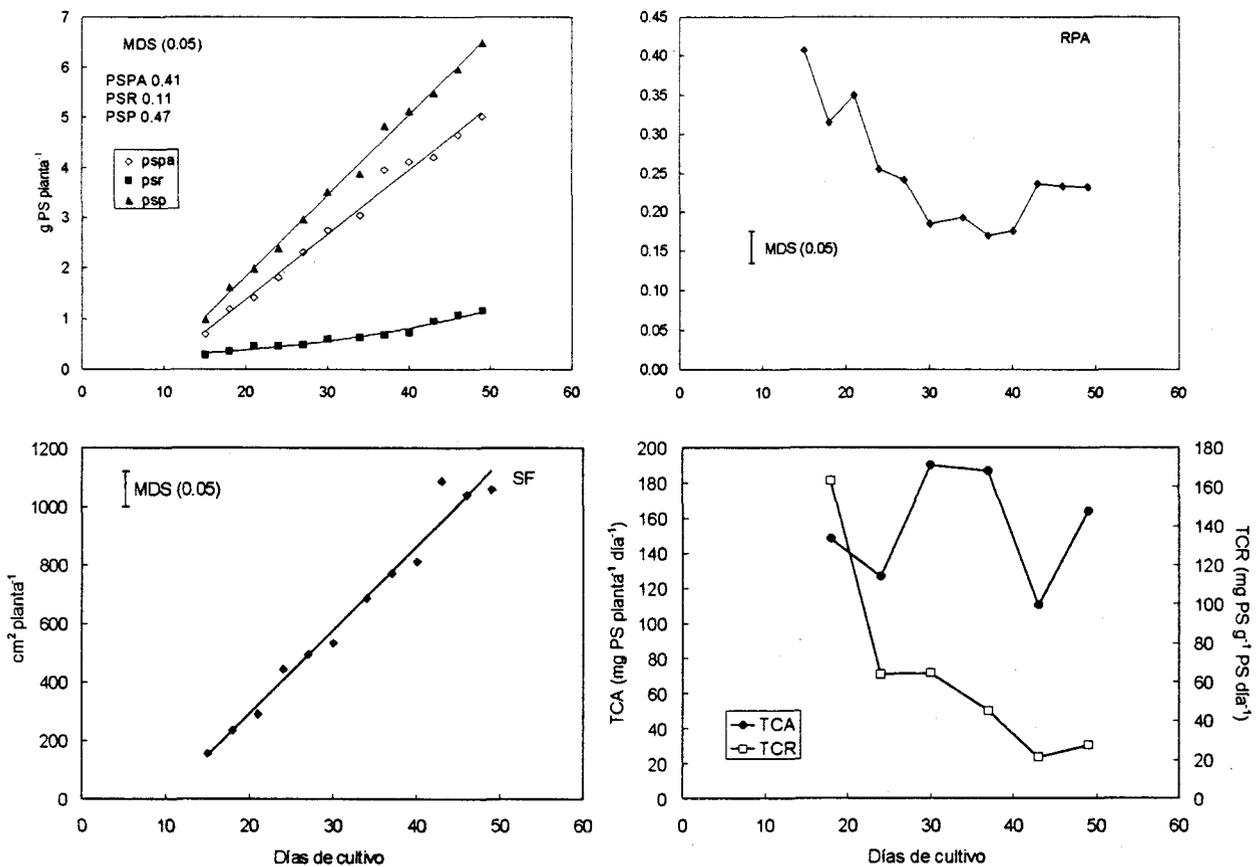


Figura 3.1. Acumulación de materia seca, en g planta⁻¹, en raíz (PSR), parte aérea (PSPA) y planta completa (PSP), relación raíz/parte aérea (RPA), superficie foliar (SF) en cm² planta⁻¹, evolución de la tasa de crecimiento absoluto (TCA) en mg PS planta⁻¹ día⁻¹, tasa de crecimiento relativo (TCR) en mg PS g⁻¹ PS día⁻¹ en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium. tropici* CIAT899 a lo largo de la ontogenia.

La relación de peso seco de raíz/parte aérea (RPA) se ha representado en función del tiempo en la figura 3.1. Se aprecia claramente la tendencia descendente de este parámetro a lo largo de la ontogenia, lo que implica un mayor crecimiento de la parte aérea respecto a la raíz. Pero esta tendencia se invierte al final del periodo reproductor, con un incremento de RPA en el día 43, ya en plena fructificación, que se mantiene hasta el final del cultivo.

La evolución de la superficie foliar (tabla A 3.1. y figura 3.1) en función del tiempo sigue un comportamiento lineal, similar a los parámetros de peso seco de la planta. La ecuación de regresión es la siguiente:

Ecuación	Coef. Correlación	Nivel probabilidad	Determinación (%)
SF = 28.64 t - 281.2	0.987	P < 0.001	97.48

A partir de valores de 156 cm² por planta en el primer muestreo, este parámetro incrementó progresivamente a lo largo de la ontogenia hasta alcanzar un valor máximo de 1087 cm² por planta el día 43, y permaneció estable en los últimos muestreos. Aparentemente las hojas se mantuvieron verdes durante todo el crecimiento vegetativo y empezó a aparecer amarilleamiento y marchitez en hojas viejas durante el crecimiento reproductor y concretamente al inicio de la fructificación.

La tasa de crecimiento absoluto (TCA), que refleja el incremento de peso seco de la planta por día, se representa gráficamente en la figura 3.1. El cálculo se realiza tal como se describe en Material y Métodos (apartado 4.1). Los valores más altos de crecimiento, de unos 190 mg por planta y por día, se detectaron entre los días 24 al 37, coincidiendo con la última semana del periodo vegetativo y primera semana del periodo reproductor. A continuación se observó un descenso importante de la tasa de crecimiento absoluto coincidiendo con el inicio de fructificación, que se recuperó en parte en la última semana.

La tasa de crecimiento relativo (TCR, figura 3.1) que se define como el incremento de peso seco del vegetal por unidad de peso seco presente y por unidad de tiempo (West *et al.*, 1920), fue máxima en los primeros días del cultivo, en los que se detectó un incremento de 160 mg por cada gramo y por día. Este parámetro descendió

bruscamente en los primeros muestreos (periodo vegetativo) y más lentamente hasta el final del cultivo.

3.2. Fijación de nitrógeno.

En relación a la fijación de nitrógeno se han estudiado parámetros de nodulación como peso seco de nódulos (PSN) expresado en g planta⁻¹, y peso normalizado de nódulos (PNN) expresado en mg PSN g⁻¹ PSPA. También se ha estudiado la actividad nitrogenasa, valorada como actividad reductora de acetileno específica (ARA, figura 3.2) expresada en μmol C₂H₄ g⁻¹ PSN h⁻¹, y total por planta (ARAP, figura 3.2) en μmol C₂H₄ planta⁻¹ h⁻¹. Los valores numéricos de todos estos parámetros han sido reunidos en la tabla A 3.3 del apéndice, y en la siguiente se recogen los análisis de varianza de estos parámetros.

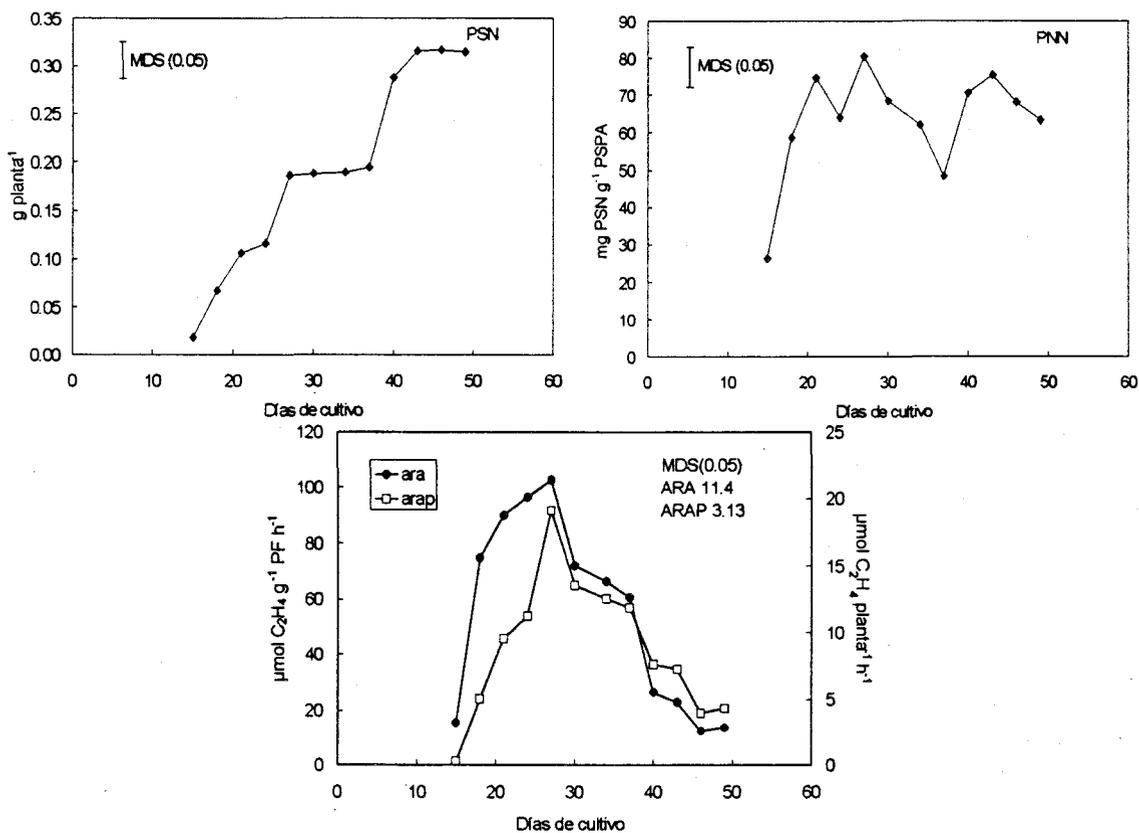


Figura 3.2. Peso seco de nódulos (PSN) en g planta⁻¹, peso normalizado de nódulos (PNN) en mg PSN g⁻¹ PSPA, actividad reductora de acetileno específica (ARA) en μmol C₂H₄ g⁻¹ PS h⁻¹, y ARA por planta (ARAP) en μmol C₂H₄ planta⁻¹ h⁻¹, en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium. tropici* CIAT899 a lo largo de la ontogenia.

El PSN evolucionó a lo largo de la ontogenia siguiendo unas fases bien definidas. Así, durante el crecimiento vegetativo hasta el día 27 la masa nodular aumentó fuertemente, siguiendo una tendencia lineal con una pendiente muy pronunciada, comenzando con valores de 18 mg por planta en el primer muestreo y alcanzando 186 en el día 27 (quinto muestreo), lo que supone multiplicarse por 10 en los doce días que van entre la primera y quinta recogida (periodo vegetativo). Entre los días 27 al 37, coincidiendo con el periodo de floración, el PSN se estabilizó sin aumento significativo a lo largo de las cuatro recogidas siguientes. En el inicio de fructificación hubo un incremento importante (días 40 y 43), y se estabilizó de nuevo hasta el final del cultivo en valores de 315 mg por planta. En las dos últimas tomas de muestras aparecieron gran cantidad de nódulos senescentes que habían perdido su característico color rosado. También se apreció que los nódulos, en general, se disponían en el tercio superior de la raíz, y alrededor del 40% de ellos se localizaban en la raíz principal. Así mismo, se pudo comprobar que las raíces secundarias tenían abundante nodulación aun cuando los nódulos eran de menor tamaño.

El peso normalizado de nódulos sufrió un incremento muy importante en las primeras recogidas, alcanzando valores máximos, del orden de 80 mg de peso seco de nódulos por gramo de parte aérea, en el crecimiento vegetativo. Al comienzo del periodo reproductor el valor de este parámetro descendió, mostrando el mínimo en floración avanzada, y se incrementó de nuevo en los cuatro últimos muestreos, pero alcanzando valores algo inferiores a los del periodo vegetativo.

La actividad nitrogenasa específica, cuyos datos numéricos se expresan en la tabla A 3.3 y gráficamente en la figura 3.2, aumentó drásticamente en las primeras cosechas, alcanzando los valores máximos, superiores a $100 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ PSN h}^{-1}$, en el periodo vegetativo avanzado. Con el inicio del crecimiento reproductor se observó un descenso pronunciado de esta actividad, que siguió disminuyendo hasta el final del cultivo, con valores similares a los del primer muestreo, inferiores a $20 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ PSN h}^{-1}$. Los valores de la actividad nitrogenasa total por planta (tabla A 3.3 y figura 3.2) mostraron una tendencia similar a la actividad específica ya comentada, con el máximo, del orden de $20 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ planta}^{-1} \text{ h}^{-1}$, al final del periodo vegetativo, seguido de un descenso paulatino hasta el final de la ontogenia, debido al descenso de la actividad específica.

3.3. Actividades enzimáticas del metabolismo nitrogenado en los nódulos radicales de *Phaseolus vulgaris*.

Se han estudiado las variaciones de las actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo del amonio y de los ureidos. En la tabla A 3.5 se recogen los niveles detectados de actividad glutamina sintetasa, glutamato sintasa, glutamato deshidrogenasa, aspartato aminotransferasa, xantina deshidrogenasa, uricasa y alantoinasa, expresadas en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, en plantas de *Phaseolus vulgaris* durante el proceso ontogénico del cultivo. Además, en las figuras 3.3 y 3.4 se visualiza gráficamente la evolución de estas actividades enzimáticas expresadas en las mismas unidades.

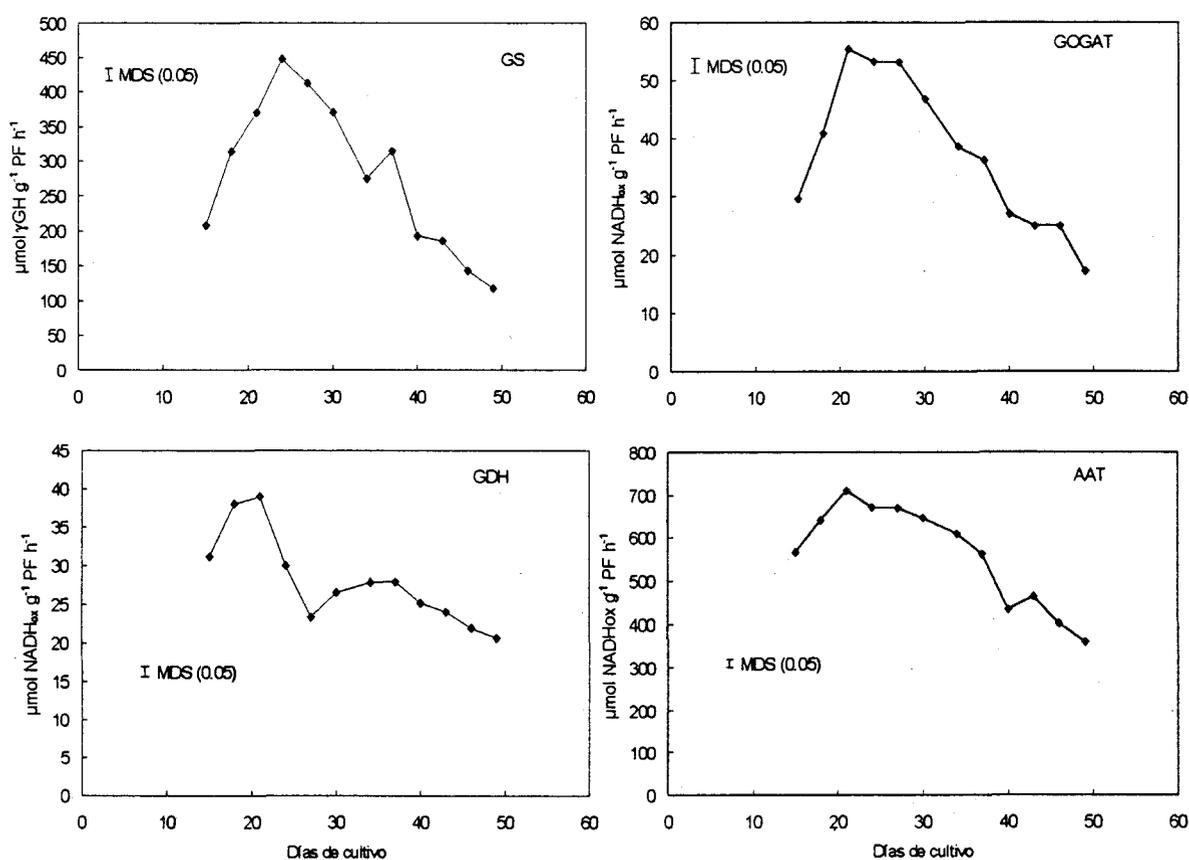


Figura 3.3. Actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT), glutamato deshidrogenasa (GDH) y aspartato aminotransferasa (AAT), en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899 a lo largo de la ontogenia.

Las actividades glutamina sintetasa y glutamato sintasa en los nódulos mostraron un comportamiento semejante al de la nitrogenasa, obteniéndose los máximos valores en el periodo vegetativo, seguidos de una caída que comienza al inicio del crecimiento reproductor y que continua hasta el final del cultivo. La glutamina sintetasa a los 15 días de cultivo mostró una actividad de $208 \mu\text{mol } \gamma\text{GH g}^{-1} \text{ PF h}^{-1}$, alcanzando un máximo de 448 en el día 24 mientras que la actividad NADH-GOGAT exhibió valores unas diez veces inferiores a la GS, con un máximo en torno a los $55 \mu\text{mol NADH}_{\text{ox}} \text{ g}^{-1} \text{ PF h}^{-1}$. Ambas enzimas mostraron coeficientes de correlación altamente significativos tanto entre sí como con los parámetros de crecimiento (PSR, PSPA y PSP) y de fijación de nitrógeno (ARA y ARAP), según se especifica en la tabla 3.1.

La actividad glutamato deshidrogenasa también siguió una tendencia parecida, con los valores máximos en el periodo vegetativo (figura 3.3), si bien el descenso mostrado al inicio del reproductor fue más pronunciado, siguiendole una cierta recuperación durante la quinta, sexta y séptima recogidas correspondiendo a la floración, para continuar disminuyendo hasta el final del cultivo. Los valores medidos de esta actividad fueron similares a los de la GOGAT.

La actividad aspartato aminotransferasa en cambio obtuvo valores superiores a los de la glutamina sintetasa, con un máximo de $710 \mu\text{mol NADH}_{\text{ox}} \text{ g}^{-1} \text{ PF h}^{-1}$ (figura 3.3). Si bien la tendencia de esta actividad enzimática fue similar, presentando el máximo en el periodo vegetativo (tercer muestreo), seguido de un descenso hasta el final del cultivo, en este caso la caída fue menos pronunciada, con un valor mínimo en la última cosecha de $359 \mu\text{mol NADH}_{\text{ox}} \text{ g}^{-1} \text{ PF h}^{-1}$. El coeficiente de correlación de AAT con GS y GOGAT es de 0.92 y 0.95 respectivamente, altamente significativo ($P < 0.001$, tabla 3.1) y también significativo pero negativo con los parámetros de crecimiento de la planta (PSPA, PSR, SF y PSP).

Cuando se observa la evolución que siguen las enzimas relacionadas con el metabolismo de los ureidos determinadas en este trabajo, xantina deshidrogenasa y uricasa (figura 3.4), se puede comprobar que muestran un comportamiento que se asemeja al establecido en las enzimas de asimilación del amonio simbiótico, no en vano los coeficientes de correlación que se indican en la tabla 3.1 de estas actividades (XDH y uricasa) con GS y GOGAT son significativos ($P < 0.01$), incluso esto mismo se puede describir con la actividad nitrogenasa (ARA y ARAP).

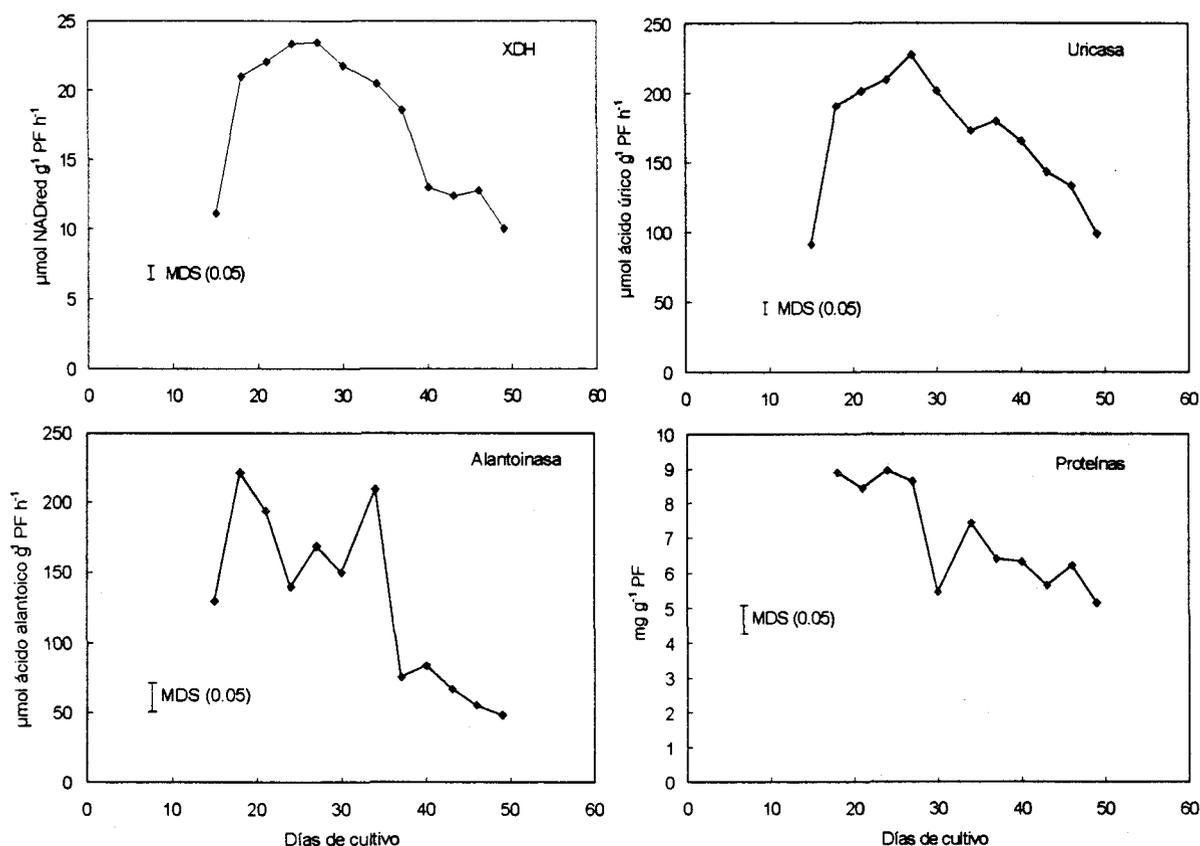


Figura 3.4. Actividad xantina deshidrogenasa (XDH), uricasa (UR) y alantoinasa expresadas en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, contenido de proteína soluble en $\text{mg g}^{-1} \text{PF}$, en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium.tropici* CIAT899 a lo largo de la ontogenia.

Los valores máximos de XDH fueron de $23.4 \mu\text{mol NADH}_{\text{red}} \text{g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, mientras que la uricasa alcanzó $227.3 \mu\text{mol ac. úrico g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ (figura 3.4). Se observa una zona de máximos, con pocas diferencias entre sí, entre la segunda y séptima recogida correspondiendo al desarrollo vegetativo y floración. La actividad alantoinasa (figura 3.4) tuvo un máximo de $221.5 \mu\text{mol ac. alantóico g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ en el día 18 (segundo muestreo), seguido de una caída muy brusca. A diferencia de las actividades del metabolismo de los ureidos anteriormente descritas, en este caso se observó un segundo máximo durante el periodo reproductor de $209.3 \mu\text{mol ac. alantóico g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, que coincide con la séptima toma de muestra en plena floración, al que siguió otra fuerte caída con valores por debajo de $85 \mu\text{mol ac. alantóico g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ en las cinco últimas recogidas realizadas.

El contenido de proteína soluble en citosol nodular (figura 3.4) presentó valores muy estables, del orden de $9 \text{ mg g}^{-1} \text{ PF}$ durante el periodo vegetativo. El inicio del reproductor estuvo marcado por un fuerte descenso de la proteína nodular hasta los $5 \text{ mg g}^{-1} \text{ PF}$ que se recuperó en parte, para continuar descendiendo hasta el final.

3.3. Compuestos nitrogenados en nódulos, raíz y savia.

El contenido de ureidos, representado por la suma de alantoína y ácido alantoico, en nódulos y raíz se indica en la figura 3.5, en savia del xilema en la figura 3.6. Ambas figuras se han elaborado a expensas de los datos numéricos de la tabla A 3.9 en donde se exponen el contenido de alantoína y ácido alantoico determinado en cada uno de los tejidos mencionados durante el proceso de crecimiento y desarrollo de la planta. Así mismo, se indican las mínimas diferencias significativas para $P \leq 0.05$, y el análisis de varianza (tabla A 3.10).

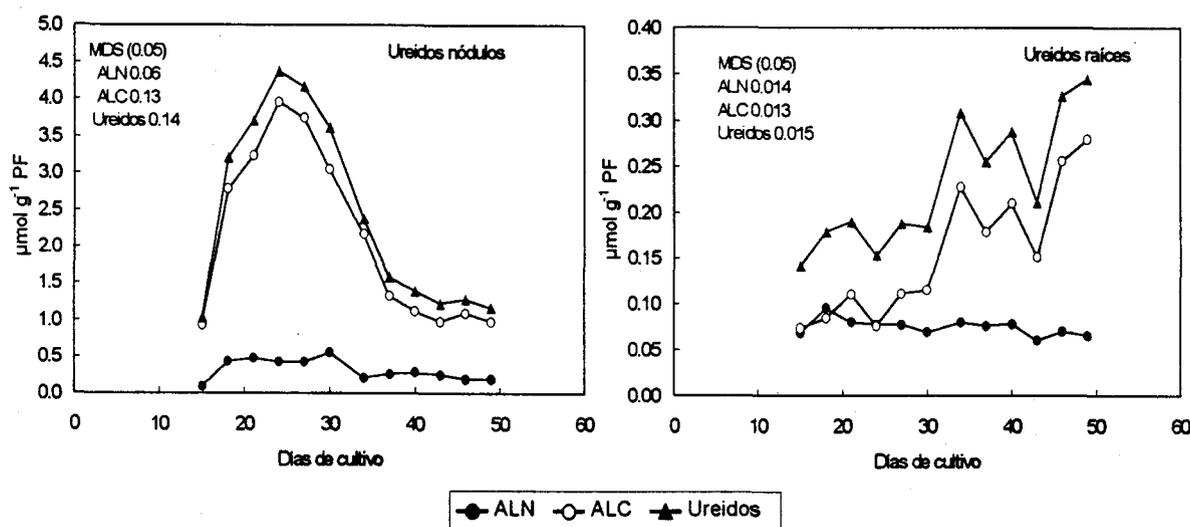


Figura 3.5. Contenido de alantoína (ALN), ácido alantoico (ALC) y Ureidos (ALN + ALC) en nódulos y raíces expresado en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ PF}$, en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899 a lo largo de la ontogenia.

La concentración de ureidos en nódulos viene condicionada prioritariamente por el ácido alantoico, ya que la alantoína representa el 10% del contenido total de ureidos. El máximo se alcanza en el vegetativo (cuarta toma de muestras, día 24) y es de algo más de $4 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ PF}$, experimentando una caída intensa durante la ontogenia del cultivo que se estabiliza en la fructificación a partir del día 40 de cultivo se mantiene la

concentración de ureidos en torno a $1.2 \mu\text{mol g}^{-1}$ PF. Estos parámetros presentan una correlación significativa ($P \leq 0.05$) negativa con los parámetros de crecimiento (SF, PSPA, PSR y PSP), y muy significativa ($P \leq 0.001$) con ARA y ARAP (fijación de nitrógeno) y las enzimas del metabolismo del amonio (GS, NADH-GOGAT y AAT) y de los ureidos (XDH y uricasa) tal como se observa en la tabla 3.1.

Los valores del contenido de ureidos en raíz fueron los más bajos, en ningún caso superiores a $0.35 \mu\text{mol g}^{-1}$ PF. Curiosamente durante los cinco primeros muestreos se detectan valores de alantoína y ácido alantoico parecidos, por lo que la contribución al contenido de ureidos es la misma, a partir del día 30 de cultivo (sexto muestreo, floración) el nivel de ácido alantóico duplica o triplica el contenido de alantoína (tabla A 3.9). Al observar la gráfica que representa el contenido de ureidos en raíz se detecta una tendencia a aumentar durante la ontogenia del cultivo con distintos puntos de inflexión no significativos. Los ureidos (ALA y ALC) presentan correlación positiva y significativa ($P \leq 0.001$) con los parámetros de crecimiento y negativa con ARA y con las enzimas del metabolismo del amonio, incluyendo la GDH y con el contenido de ureidos en nódulos (tabla 3.1).

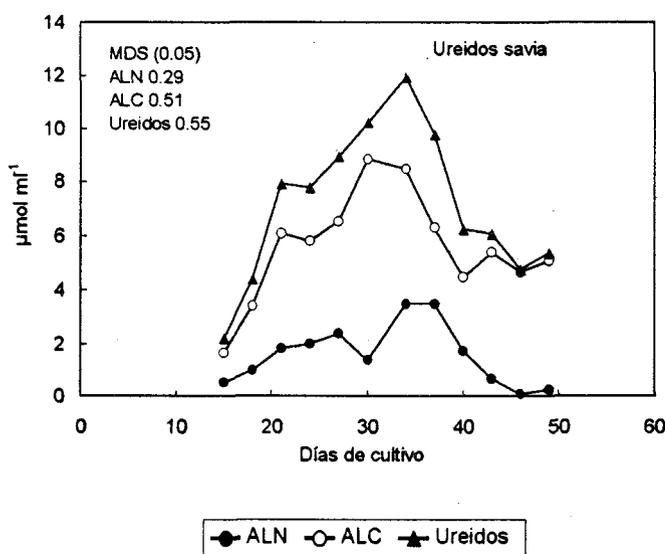


Figura 3.6. Contenido de alantoína (ALN), ácido alantoico (ALC) y Ureidos (ALN + ALC) en savia del xilema expresado en $\mu\text{mol ml}^{-1}$ savia en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899 a lo largo de la ontogenia.

El contenido de ureidos en el xilema fue superior, con un máximo próximo a los $12 \mu\text{mol g}^{-1}$ PF. Además, la evolución durante la ontogenia del cultivo fue diferente, presentando un máximo el día 34 de cultivo (floración e inicio de la fructificación). En general se puede asumir que el ácido alantoico es tres veces superior a la alantoína, por tanto la contribución de esta última a la concentración de ureidos representa alrededor del 25 %, excepto en las dos últimas recogidas que representa el 0.02-0.05 %. Sin embargo, en la sexta recogida (día 30) y en la décima (día 43) el nivel de ALC es 6 y 8 veces el de ALN respectivamente. Sólo presentan correlaciones significativas ($P \leq 0.05$) con la XDH, la uricasa nodular y el ARAP (tabla 3.1).

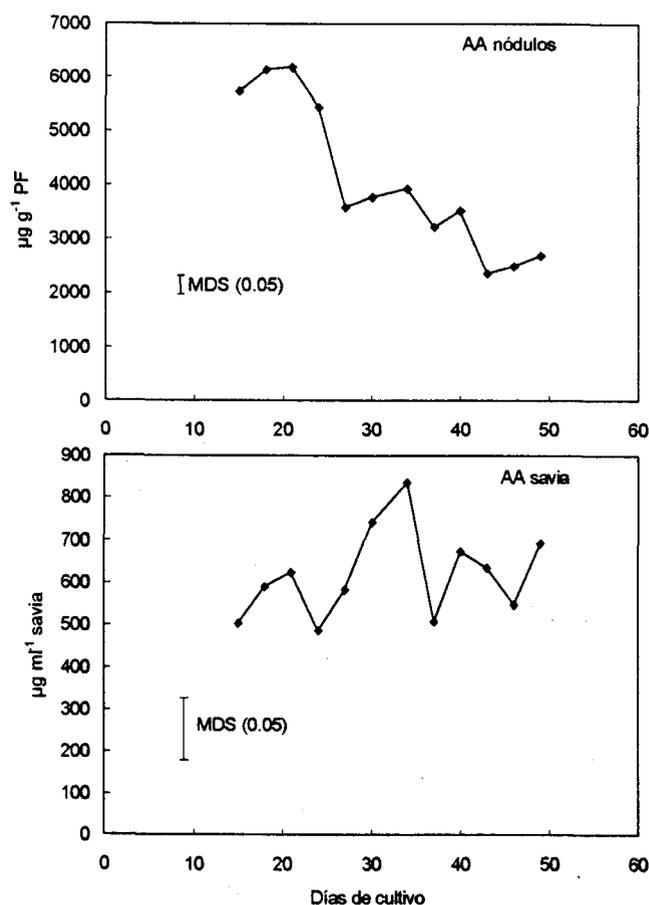


Figura 3.7. Contenido de aminoácidos en nódulos y savia expresado en $\mu\text{g g}^{-1}$ PF y $\mu\text{g ml}^{-1}$ en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899 a lo largo de la ontogenia.

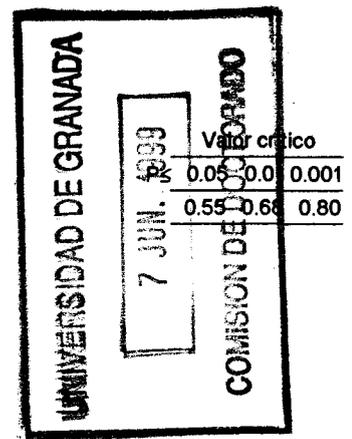
El contenido de aminoácidos en nódulos (tabla A 3.11), y representado gráficamente en la figura 3.7, mostró el máximo ($46.79 \mu\text{mol g}^{-1}$ PF) en el periodo

vegetativo, con la tendencia descendente ya descrita para las enzimas del metabolismo nitrogenado. En la tabla A 3.11 se expone el contenido de aminoácidos en nódulos y en savia expresados en $\mu\text{g g}^{-1}$ PF y en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF. Este parámetro también se correlacionó positivamente con el metabolismo nitrogenado (tabla 3.1). En cambio, el contenido de estos compuestos en savia siguió una evolución muy irregular a lo largo de la ontogenia, observándose oscilaciones que varían de 487 (cuarta recogida) a 835 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF (séptima recogida) mostrando variaciones algunas de ellas no significativas ($P \leq 0.05$).

Es interesante destacar que los niveles de aminoácidos en nódulos son 10 veces los detectados en savia. Además, el contenido de aminoácidos en nódulos presenta correlaciones negativas y altamente significativas con numerosos parámetros determinados en este estudio (tabla 3.1).

Tabla 3.1. Matriz de coeficientes de correlación simple entre variables relacionadas con crecimiento, la fijación de nitrógeno, las enzimas del metabolismo del amonio y del catabolismo de purinas, contenido en ureidos, aminoácidos y proteína en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa, inoculadas con Ciat 899 de *R. tropici*. Variables: PSPA, peso seco parte aérea; PSR, peso seco de raíz; PSP, peso seco de planta; RPA, relación raíz/parte aérea; SF, superficie foliar; PNN, peso normalizado de nódulos; ARA, actividad reductora de acetileno; ARAP, ARA por planta; GG, glutamato sintasa; GS, glutamina sintetasa; XDH, xantina deshidrogenasa; URIC, uricasa; ALA, alantoinasa; PRT, proteína soluble en el citosol nodular; ALNn, alantoina en nódulos; ALCn, ácido alantoico en nódulos; Urei.n, ureidos en nódulos; ALNs, alantoina en savia; ALCs, ácido alantoico en savia; UREIDs, ureidos en savia; ALNr, alantoina en raíz; ALCr, ácido alantoico en raíz; Urei.r, ureidos en raíz; AAn, aminoácidos en nódulos; AAs, aminoácidos en savia; PRT, proteína soluble.

	PSPA	PSR	PSP	RPA	SF	PSN	PNN	ARA	ARAP	GS	GG	GDH	AAT	XDH	URIC	ALA	ALNn	ALCn	Urei.n	ALNr	ALCr	Urei.r	ALNs	ALCs	Urei.s	AAn	AAs	PRT	
PSPA	1.00																												
PSR	0.94	1.00																											
PSP	1.00	0.96	1.00																										
RPA	-0.74	-0.53	-0.71	1.00																									
SF	0.98	0.96	0.98	-0.67	1.00																								
PSN	0.93	0.87	0.93	-0.73	0.93	1.0																							
PNN	0.18	0.15	0.19	-0.38	0.20	0.47	1.00																						
ARA	-0.55	-0.62	-0.57	0.01	-0.57	-0.43	0.47	1.00																					
ARAP	-0.05	-0.22	-0.07	-0.50	-0.08	0.10	0.63	0.78	1.00																				
GS	-0.62	-0.70	-0.63	0.05	-0.63	-0.50	0.35	0.96	0.74	1.00																			
GG	-0.67	-0.70	-0.68	0.16	-0.67	-0.55	0.37	0.96	0.69	0.97	1.00																		
GDH	-0.79	-0.75	-0.79	0.62	-0.80	-0.77	-0.10	0.48	-0.05	0.48	0.55	1.00																	
AAT	-0.81	-0.84	-0.82	0.31	-0.81	-0.70	0.20	0.90	0.57	0.92	0.95	0.69	1.00																
XDH	-0.53	-0.60	-0.54	-0.06	-0.55	-0.43	0.42	0.98	0.78	0.95	0.95	0.48	0.90	1.00															
URIC	-0.34	-0.46	-0.35	-0.25	-0.36	-0.20	0.61	0.92	0.83	0.89	0.87	0.34	0.76	0.93	1.00														
ALA	-0.78	-0.77	-0.78	0.35	-0.78	-0.67	0.18	0.73	0.38	0.65	0.74	0.72	0.85	0.75	0.59	1.00													
ALNn	-0.37	-0.39	-0.37	-0.09	-0.40	-0.20	0.62	0.79	0.59	0.78	0.79	0.40	0.69	0.80	0.85	0.52	1.00												
ALCn	-0.58	-0.58	-0.58	0.10	-0.58	-0.44	0.48	0.94	0.67	0.92	0.94	0.42	0.85	0.93	0.86	0.71	0.83	1.00											
Urei.n	-0.57	-0.57	-0.57	0.08	-0.57	-0.42	0.51	0.94	0.67	0.92	0.94	0.43	0.85	0.93	0.87	0.70	0.86	1.00	1.00										
ALNr	-0.50	-0.58	-0.52	0.13	-0.57	-0.51	0.08	0.59	0.22	0.47	0.50	0.67	0.54	0.61	0.56	0.73	0.41	0.50	0.50	1.00									
ALCr	0.88	0.86	0.88	-0.57	0.83	0.74	0.01	-0.57	-0.16	-0.70	-0.68	-0.65	-0.78	-0.53	-0.45	-0.57	-0.52	-0.60	-0.60	-0.30	1.00								
Urei.r	0.84	0.81	0.84	-0.57	0.78	0.70	0.02	-0.51	-0.14	-0.66	-0.63	-0.58	-0.74	-0.47	-0.39	-0.49	-0.48	-0.55	-0.56	-0.19	0.99	1.00							
ALNs	-0.11	-0.35	-0.15	-0.41	-0.17	-0.09	0.21	0.61	0.79	0.57	0.51	0.17	0.51	0.62	0.61	0.40	0.22	0.37	0.36	0.41	-0.07	-0.02	1.00						
ALCs	0.23	0.13	0.22	-0.65	0.20	0.31	0.56	0.50	0.80	0.44	0.43	-0.19	0.32	0.57	0.57	0.22	0.49	0.43	0.45	-0.03	0.18	0.18	0.59	1.00					
Urei.s	0.12	-0.05	0.09	-0.63	0.07	0.19	0.48	0.60	0.89	0.54	0.51	-0.07	0.44	0.65	0.65	0.32	0.43	0.46	0.46	0.14	0.10	0.12	0.82	0.94	1.00				
AAn	-0.92	-0.86	-0.92	0.73	-0.93	-0.89	-0.19	0.49	-0.08	0.53	0.59	0.91	0.71	0.46	0.28	0.74	0.35	0.52	0.51	0.62	-0.74	-0.68	0.08	-0.30	-0.17	1.00			
AAs	0.28	0.27	0.29	-0.42	0.26	0.42	0.43	-0.03	0.25	-0.17	-0.11	-0.18	-0.09	0.03	0.03	0.23	0.09	-0.04	-0.02	-0.03	0.44	0.45	0.18	0.60	0.49	-0.26	1.00		
PRT	-0.86	-0.82	-0.86	0.62	-0.81	-0.83	0.18	0.80	0.36	0.71	0.76	0.67	0.75	0.76	0.72	0.75	0.46	0.77	0.75	0.77	-0.67	-0.60	0.36	-0.13	0.08	0.81	-0.36	1.00	



4. Efecto del estrés salino en la simbiosis: aplicación en el momento de la siembra.

En este experimento se ha estudiado tanto la respuesta del crecimiento y fijación de nitrógeno como las alteraciones del metabolismo nitrogenado (asimilación del amonio y síntesis de ureidos) en nódulos de *Phaseolus vulgaris*, en condiciones de estrés salino. Este estudio se ha llevado a cabo con dos variedades de *Phaseolus vulgaris*, con diferente sensibilidad a la sal. Se estableció el diseño experimental descrito el apartado 3.4 de Material y Métodos, con cinco recogidas, la primera a los 18 días de cultivo, seguida de dos más, la segunda el día 21 y la tercera el día 24, ambas en estado vegetativo. La cuarta se efectuó al inicio de floración (día 27 de cultivo) y la última en plena floración. La aplicación de la sal, en forma de NaCl, se realizó al inicio del cultivo, cuando las semillas pregerminadas son transplantadas a las jarras Leonard. El diseño estableció seis repeticiones por tratamiento y cada experimento se realizó al menos dos veces.

4.1. Estudio de la simbiosis *Phaseolus vulgaris* var. Africa-*Rhizobium tropici* CIAT899.

4.1.1. Análisis del crecimiento.

El crecimiento expresado como peso seco de parte aérea, raíz, planta completa y relación raíz/parte aérea, se exponen en la figura 4.1. Los datos numéricos de dicha figura se reúnen en la tabla A 4.1 del apéndice en la cual se detalla la MDS ($P \leq 0.05$) y el análisis de la varianza (tabla A 4.2).

Desde la primera recogida, el peso seco de parte aérea se vio significativamente disminuido por el estrés salino. Los porcentajes de reducción aumentaron con las dosis de NaCl y con la edad del cultivo, observándose la máxima inhibición a los 30 días de cultivo donde la disminución del crecimiento aéreo fue de un 75% con 100 mM NaCl. Es de destacar que la acumulación de masa aérea en plantas control fue importante a lo largo de los 12 días que duraron los muestreos ya que aumentó más del doble (2.3) desde el día 18 de cultivo al 30, mientras que en las plantas tratadas con 100 mM NaCl, el PSPA incrementó un 23% que está próximo al límite de significación estadística. No obstante con las dosis intermedias de 25 y 50 mM presentaron incrementos del 80 y 50%, respectivamente, a lo largo del cultivo.

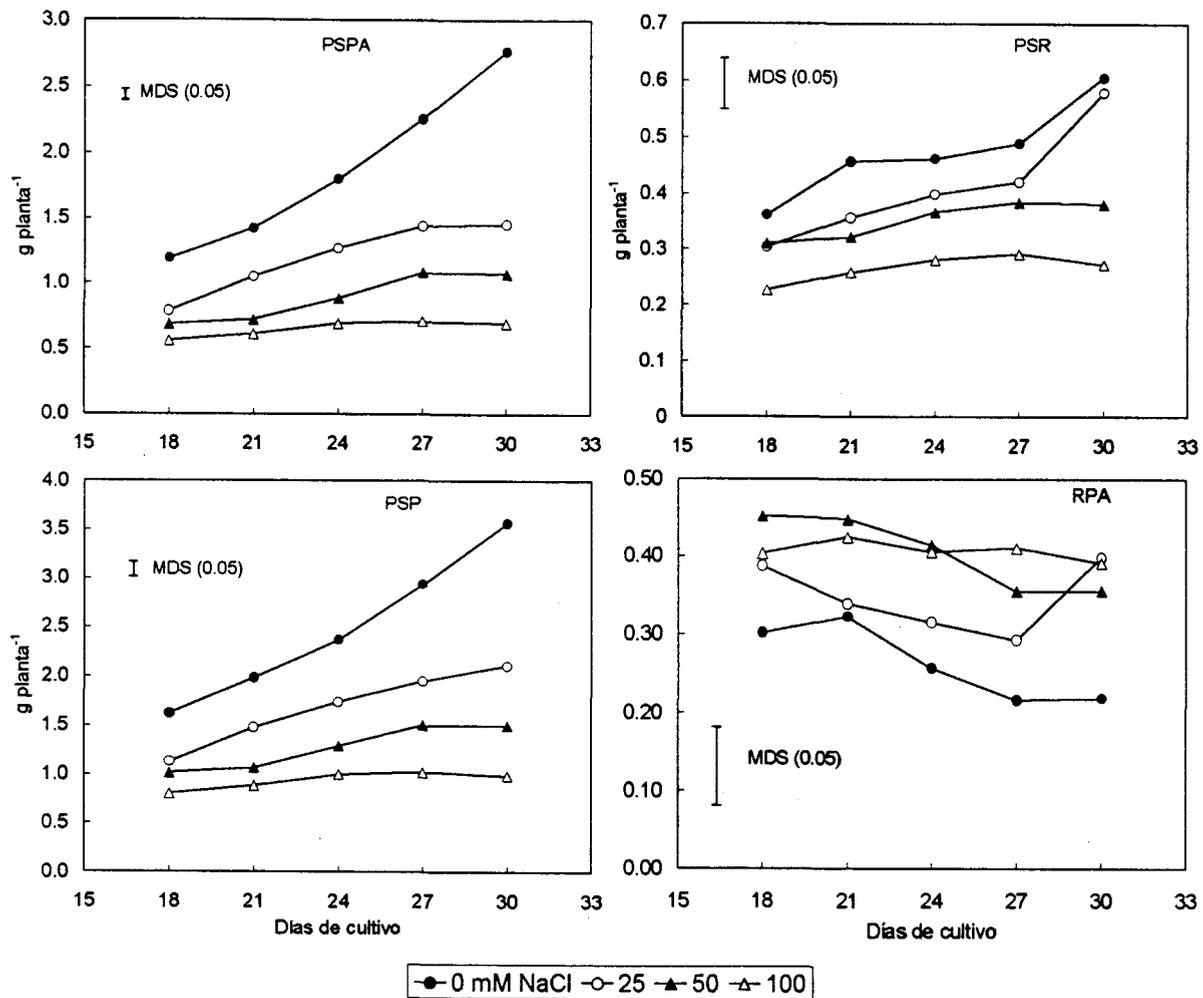


Figura 4.1. Peso seco de parte aérea (PSPA), raíz (PSR) y planta completa (PSP), expresado en g planta^{-1} , relación raíz/parte aérea (RPA), en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con la cepa CIAT899 de *Rhizobium tropici*, con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

El peso seco de raíz se vio menos afectado por el estrés salino que la parte aérea; 25 mM no inhibió significativamente este parámetro, salvo en la segunda recogida, y la reducción más significativa fue a los 30 días de cultivo y con la dosis más alta de cloruro sódico (100 mM), donde el crecimiento radical se vio reducido en un 55% respecto al control.

Dado que el PSPA es entre 2 y 4 veces superior al PSR, el peso seco de la planta completa mostró las mismas tendencias que el peso seco de parte aérea. El análisis de la varianza indica que la variabilidad observada tanto en el PSPA como en el PSP, viene condicionada principalmente por la dosis de sal en un 70%. Además, existen unas altas

y significativas correlaciones entre los distintos parámetros de crecimiento determinados (tabla 4.1).

La relación raíz/parte aérea, se incrementó de forma significativa con 50 y 100 mM en las cuatro primeras recogidas, y con todas las dosis de sal a los 30 días de cultivo (figura 4.1). Estos incrementos fueron de hasta un 80%. Este resultado apoya lo observado anteriormente sobre la mayor sensibilidad de la parte aérea al estrés salino en comparación con la raíz.

4.1.2. Fijación de nitrógeno.

Los parámetros de fijación de N₂ determinados fueron el peso seco de nódulos, peso normalizado de nódulos, actividad reductora de acetileno específica y total por planta, y se encuentran representados en la figura 4.2. En el apéndice se encuentra la tabla A 4.3 con los datos numéricos relacionados con el proceso de fijación de nitrógeno, y la A 4.4 con el análisis de varianza.

El peso seco de nódulos aumentó a lo largo del crecimiento en las plantas control, mostrando cierta estabilidad al inicio de floración. Este aumento en el tiempo se atenúa de tal forma con el estrés salino que con 100 mM NaCl en las tres últimas recogidas se observa una tendencia descendente. Los valores de PSN en la última recogida son 2 a 3 veces superiores a los de la primera con todos los tratamientos. Aún así, la masa nodular disminuyó con la sal entre 57 y 90% respecto al control en el último muestreo. Este parámetro disminuyó de forma significativa ($P \leq 0.05$) con todos los tratamientos salinos desde la primera recogida, de forma que con 100 mM la inhibición fue de más del 80%, en todos los días de cosecha respecto al control.

El peso normalizado de nódulos presentó dos picos en las plantas control, uno a los 21 días de cultivo y el otro a los 27 días coincidiendo con el inicio de la floración. El estrés salino provocó un descenso en este parámetro, en especial con 50 y 100 mM NaCl, donde las reducciones fueron significativas en todos los muestreos, registrándose descensos de hasta 70%. El PNN se correlacionó positivamente con el crecimiento de la planta ($P \leq 0.001$) tal como se observa en la tabla 4.1.

La actividad reductora de acetileno en las plantas control mostró un máximo al inicio de la floración (27 días de cultivo) que coincide con el detectado en el experimento 3 de la ontogenia. En cuanto al efecto del cloruro sódico, 25 mM no alteró

significativamente el ARA en las cuatro primeras recogidas, mientras que en floración, la inhibición de este parámetro con 25 mM fue de un 71% respecto al control. Sin embargo, 50 y 100 mM NaCl inhibieron significativamente el ARA desde el primer muestreo, registrándose descensos entre 50-70% con 50 mM y entre 70-90% con 100 mM. Es interesante señalar que en las plantas crecidas con 100 mM NaCl disminuyó la actividad nitrogenasa en el tiempo de crecimiento del cultivo. Se encontraron correlaciones positivas con el crecimiento y con el PNN (tabla 4.1).

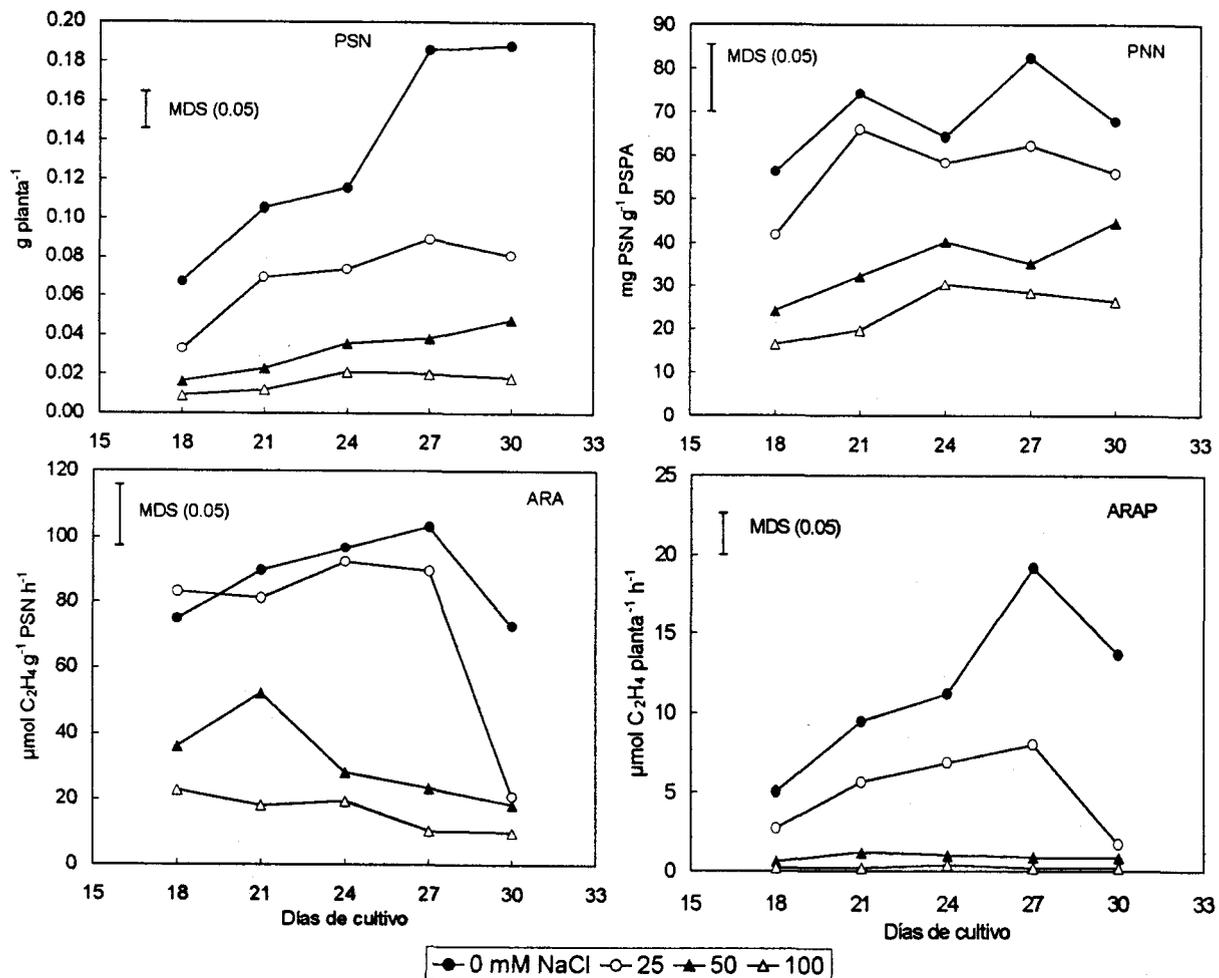


Figura 4.2. Peso seco de nódulos (PSN) en g planta⁻¹, peso normalizado de nódulos (PNN) en mg PSN g⁻¹ PSPA, actividad reductora de acetileno (ARA) en μmol C₂H₄ g⁻¹ PS h⁻¹ y actividad reductora de acetileno por planta (ARAP) en μmol C₂H₄ g⁻¹ PS h⁻¹ en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con la cepa CIAT899 de *Rhizobium tropici*, con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

El ARA total por planta presentó un perfil bastante similar al de la actividad específica (figura 4.2). El máximo observado en floración (día 27) se aprecia en el tratamiento control y con 25 mM NaCl. Ahora bien, mientras en los tratamientos 0 y 25 mM el valor máximo obtenido es cuatro y tres veces respectivamente el detectado en el primer muestreo, en los otros (50 y 100 mM) sólo se duplica. De hecho, con 50 y 100 mM NaCl, la actividad presentó un perfil en el tiempo prácticamente constante, ya que los valores oscilaron entre 0.6-1.2 para 50 mM y entre 0.20-0.40 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ para 100 mM NaCl, a lo largo del crecimiento del cultivo. A partir del segundo muestreo, todas las dosis de sal disminuyeron significativamente esta actividad, con porcentajes de inhibición entre 87-99%. El ARAP se correlacionó positivamente con el crecimiento de la planta ($P \leq 0.001$), PNN y ARA.

4.1.3. Actividades enzimáticas.

Se determinaron diversas actividades enzimáticas del metabolismo nitrogenado en citosol nodular relacionadas con el metabolismo del amonio, glutamina sintetasa, glutamato sintasa, glutamato deshidrogenasa y aspartato aminotransferasa, y con el catabolismo de purinas, xantina deshidrogenasa y uricasa. Estas actividades se ven representadas la figura 4.3. Al igual que en parámetros anteriores, se puede recurrir a las tablas A 4.5 del apéndice para encontrar los valores numéricos que han servido para elaborar la figura 4.3. El estudio estadístico se puede observar en la tabla A 4.6.

La actividad glutamina sintetasa representa ocho veces la actividad glutamato sintasa en el tratamiento control. Las distintas dosis de sal provocan que la GS represente entre 10-15 veces la actividad NADH-GOGAT. Este efecto se vio incrementado al final del cultivo, ya que en el último muestreo realizado la actividad GS llegó a 20-25 veces la actividad GOGAT. La glutamina sintetasa presentó un máximo en las plantas control a los 24 días de cultivo, tres días antes de iniciarse la floración. Esta tendencia desaparece con los tratamientos salinos. A los 18 días de cultivo, 25 mM no afectó esta actividad mientras que 50 y 100 mM redujeron la glutamina sintetasa entre 30-40%. A partir de este primer muestreo, todas las dosis de sal aplicadas inhibieron esta actividad de forma significativa, registrándose porcentajes de reducción de hasta el 69%.

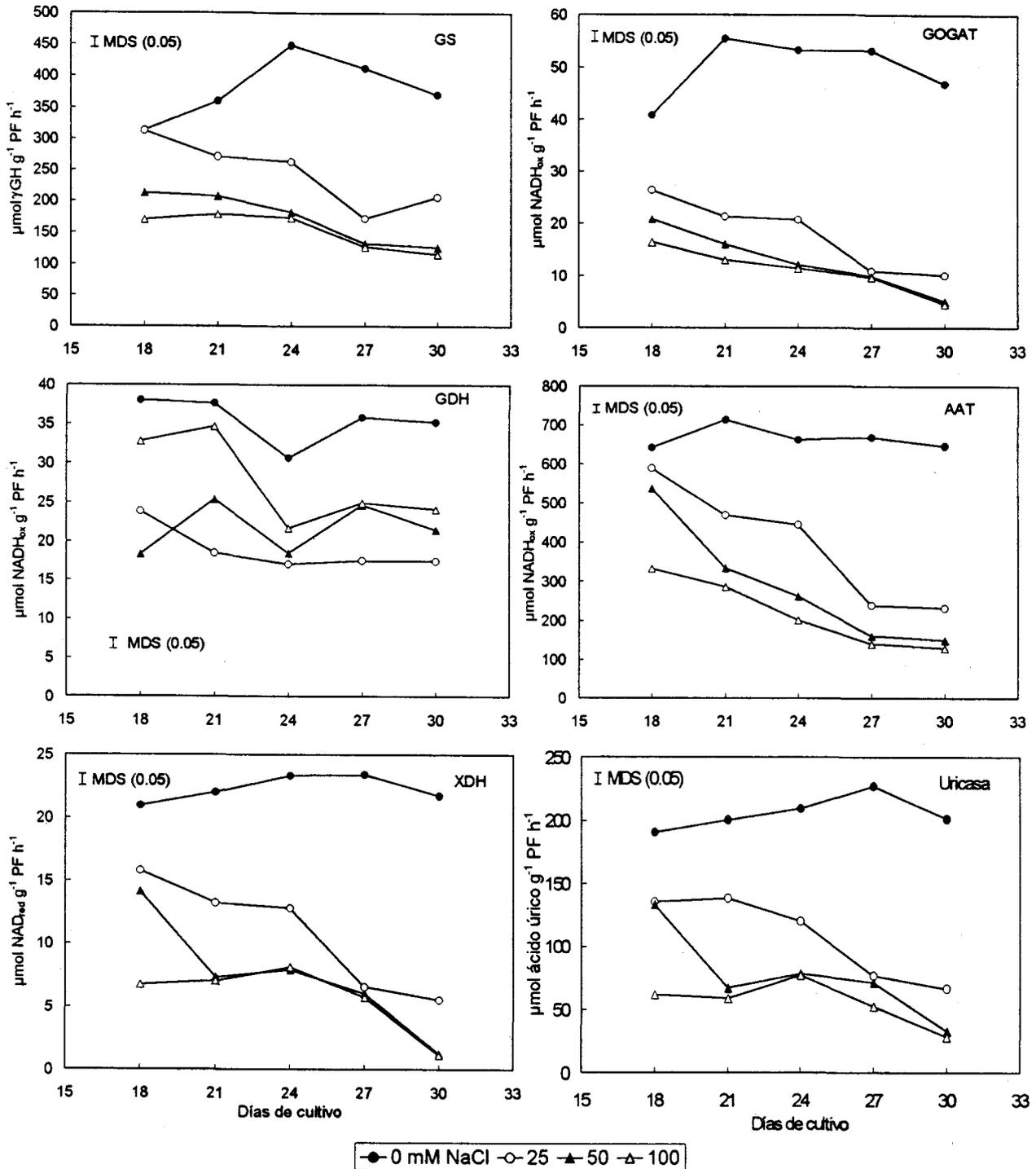


Figura 4.3. Actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT), glutamato deshidrogenasa (GDH), aspartato aminotransferasa (AAT), xantina deshidrogenasa (XDH) y uricasa (UR), expresadas en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ y contenido de proteína soluble (PRT) expresado en $\text{mg g}^{-1} \text{PF}$ en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con la cepa CIAT899 de *Rhizobium tropici*, con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

La sal inhibió significativamente la glutamato sintasa desde el primer muestreo, incrementándose los porcentajes de reducción conforme aumenta la dosis de NaCl. Sin embargo, mostró una actividad estable en plantas control entre los 21 y 27 días de cultivo, mientras que con el estrés salino, la tendencia fue disminuir de la actividad en el tiempo (figura 4.3). Esta actividad se vio afectada en mayor proporción que la GS desde el primer muestreo y con todas las dosis de sal, y disminuyó hasta un 90% con la dosis más alta.

A pesar de las grandes diferencias observadas en ambas actividades, el tratamiento fue la fuente de variación que tuvo más efecto sobre la expresión de la GS y NADH-GOGAT en nódulo, siendo responsable del 90% de la variabilidad observada. También se debe indicar las significativas correlaciones observadas con los parámetros de crecimiento y de fijación de nitrógeno (tabla 4.1).

La glutamato deshidrogenasa, al contrario que la glutamina sintetasa, presentó un mínimo a los 24 días de cultivo en las plantas control, que se apreció también en las plantas tratadas con 50 y 100 mM NaCl. La sal provocó un descenso de la actividad respecto al control, pero comparando los tratamientos salinos entre sí, es de destacar que cuanto más baja fue la dosis de sal, más importante fue la inhibición. Es decir que las dosis más altas de NaCl estimularon esta actividad, sin llegar a superar la de las plantas control. La glutamato deshidrogenasa, contrariamente a las otras enzimas, no se correlacionó con el crecimiento mientras que sí lo hizo positivamente con ARAP ($P \leq 0.05$), GS, GOGAT y AAT ($P \leq 0.01$).

No se observaron oscilaciones importantes en la aspartato aminotransferasa, que mantuvo una actividad estable con el desarrollo del cultivo, no registrándose oscilaciones importantes (figura 4.3). Sin embargo, el estrés salino provocó una disminución importante de la actividad con el crecimiento del cultivo. La sal inhibió la aspartato aminotransferasa desde el primer muestreo de forma significativa, provocando descensos con porcentajes de inhibición del orden del 60-70% en las dos últimas recogidas. Esta enzima sí se comportó como la GS y la GOGAT, ya que se correlacionó positivamente con el crecimiento y la fijación de nitrógeno (tabla 4.1).

Se observó que la actividad xantina deshidrogenasa presentó un perfil de actividad estable a lo largo del crecimiento de las plantas control, ya que la actividad osciló entre 21-23 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ desde la primera a la última recogida. Esto no se

mantuvo en los tratamientos salinos, donde que la actividad tendió a disminuir en el tiempo. El estrés salino inhibió la xantina deshidrogenasa desde el primer muestreo con todas las dosis de sal. Las plantas tratadas con 50 y 100 mM NaCl presentaron los mismos porcentajes de inhibición (70-90%) a excepción del día 18 de cultivo.

En cuanto a la uricasa, mostró un comportamiento muy similar a la XDH en las plantas control y en las sometidas a estrés salino (figura 4.3). La actividad uricasa fue 10 veces superior a la actividad xantina deshidrogenasa, independientemente del día de cultivo y del tratamiento. Los porcentajes de inhibición fueron semejantes a los obtenidos en la actividad XDH. Estas dos enzimas del catabolismo de purinas se correlacionaron positivamente con el crecimiento de la planta, fijación de nitrógeno y todas las enzimas estudiadas (tabla 4.1), incluso en ambas actividades enzimáticas se detecta que la variabilidad observada se debía fundamentalmente al tratamiento de sal (80%) y a la interacción entre las dos fuentes de variación, dosis x edad del cultivo (15%).

4.1.4. Contenido de metabolitos.

Se determinó el contenido de alantoína y ácido alantoico en nódulos, así como el de ureidos totales (suma de ALN y ALC), contenido de aminoácidos libres en nódulos, raíces y hojas, y por último el contenido de proteína soluble en nódulos. Estos datos se exhiben en la figura 4.4. Las tablas del apéndice A 4.7 y A 4.9 recogen los valores numéricos de ambas figuras.

El contenido de alantoína se mantuvo estable en el tiempo de cultivo en plantas control, aumentando en la floración, mientras que con los tratamientos salinos, se observó con 25 mM un máximo al inicio de floración, y con 50 y 100 mM NaCl a los 24 días de cultivo. En cuanto la respuesta al estrés salino fue distinta según la dosis de sal y el día de cultivo, así en los primeros muestreos la alantoína disminuyó con la sal respecto al control, mientras que en los dos siguientes se incrementó con el NaCl (con 50 y 100 mM), para disminuir de nuevo en floración.

Sin embargo, el ácido alantoico mostró una respuesta más evidente frente el estrés salino, disminuyendo significativamente desde el primer muestreo con todas las dosis de sal, con porcentajes de inhibición del orden del 80% (figura 4.4). En cuanto al comportamiento a lo largo del desarrollo del cultivo, las plantas control presentaron un

máximo tres días antes de iniciarse la floración. Este pico se acentuó con 25 mM NaCl y desapareció con 50 y 100 mM. Estas dos últimas dosis inhibieron de forma similar el contenido de ácido alantoico.

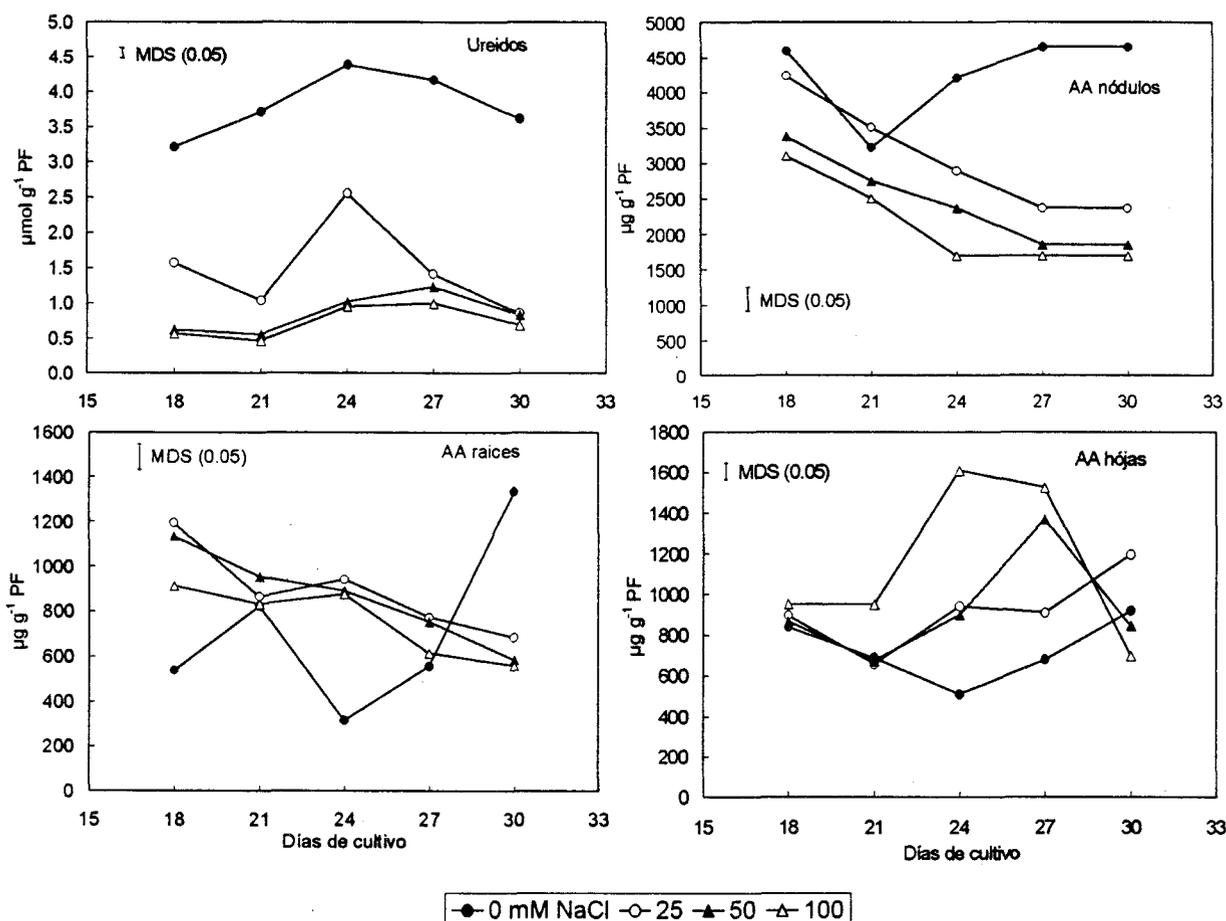


Figura 4.4. Contenido de ureidos en nódulos en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF y de aminoácidos en nódulos, raíces y hojas expresado $\mu\text{g g}^{-1}$ PF en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con la cepa CIAT899 de *Rhizobium tropici*, con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

El hecho de que el contenido de ácido alantoico en nódulos sea 8 veces superior al de alantoína, condiciona que el contenido de ureidos totales presente el mismo perfil que el ácido alantoico. El contenido de alantoína sólo se correlacionó con el PSP ($P < 0.05$) mientras que el alantoico (y ureidos totales) lo hizo con el crecimiento, fijación de nitrógeno y todas las enzimas estudiadas. El análisis de la varianza (tabla A 4.8) del contenido de ácido alantoico y de ureidos indica que prácticamente toda la variabilidad apreciada puede asignarse al efecto de la dosis de sal (90%).

Al estudiar la figura 4.4 se aprecia que el contenido de aminoácidos en nódulos presenta un punto de inflexión a los 21 días de cultivo en plantas control, aumentando luego hasta la última recogida. Sin embargo, en plantas en condiciones de estrés salino, este contenido disminuyó desde el primer muestreo. De hecho, cuando el contenido de aminoácidos se expresa en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF (tabla A 4.8) se aprecia en la segunda recogida una disminución del 20% en las plantas en condiciones de estrés salino. En la tercera, la reducción es del 35-40%, en la cuarta del 45% llegando al 55-60% en la última, respecto a los valores obtenidos al inicio del tiempo de experimentación. El contenido de aminoácidos en nódulos se correlacionó con el PSN, la fijación de nitrógeno, todas las enzimas evaluadas y el contenido de ureidos (tabla 4.1).

El NaCl provocó una acumulación del contenido de aminoácidos en raíces en las cuatro primeras recogidas, siendo la respuesta a las tres dosis aplicadas (25, 50 y 100 mM NaCl) similar. Así, durante el crecimiento vegetativo, el contenido de aminoácidos en raíces tratadas con NaCl, expresado en $\mu\text{g g}^{-1}$ PF, independientemente de la dosis, se mantienen con variaciones del 15%. En floración, la acumulación disminuye algo más del 30% y al final del tiempo de experimentación en el 45%.

En cuanto al contenido de aminoácidos en hojas, la acumulación de estos compuestos en respuesta al estrés salino fue más evidente conforme aumentaba la dosis de NaCl aplicada, llegando a ser el contenido de aminoácidos foliar a los 24 días de cultivo tres veces más con 100 mM respecto al control (figura 4.4). Se apreció un punto de inflexión a los 24 días de cultivo de las plantas control, mientras que con los tratamientos salinos estos compuestos tendieron a aumentar en el tiempo, contrariamente a lo sucedido en nódulos y raíces. Este contenido se correlacionó negativamente con la fijación de nitrógeno, con algunas de las enzimas (GS, GOGAT, AAT y uricasa) y con el contenido de ácido alantoico y de aminoácidos en nódulos (tabla 4.1).

Tabla 4.1. Matriz de coeficientes de correlación simple entre variables relacionadas con crecimiento, la fijación de nitrógeno, las enzimas del metabolismo del amonio y del catabolismo de purinas, contenido en ureidos y aminoácidos en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. *Africa*, inoculadas con Ciat 899 de *R. tropici*, tratadas con NaCl desde el inicio del cultivo. Variables: PSPA, peso seco parte aérea; PSR, peso seco de raíz; PSP, peso seco de planta; RPA, relación raíz/parte aérea; PNN, peso normalizado de nódulos; ARA, actividad reductora de acetileno; ARAP, ARA por planta; GG, glutamato sintasa; GS, glutamina sintetasa; GDH, glutamato deshidrogenasa; AAT, aspartato aminotransferasa; XDH, xantina deshidrogenasa; URIC, uricasa; ALN, alantoina en nódulos; ALC, ácido alantoico en nódulos; UREID, ureidos en nódulos; AAn, aminoácidos en nódulos; AAr, aminoácidos en raíces; AAh, aminoácidos en hojas.

	PSPA	PSR	PSN	PSP	RPA	PNN	ARA	ARAP	GS	GG	GDH	AAT	XDH	URIC	ALC	ALN	UREID	AAn	AAr	AAh	
PSPA	1.00																				
PSR	0.90	1.00																			
PSN	0.98	0.86	1.00																		
PSP	1.00	0.92	0.98	1.00																	
RPA	-0.89	-0.69	-0.91	-0.88	1.00																
PNN	0.82	0.80	0.89	0.84	-0.85	1.00															
ARA	0.61	0.46	0.69	0.60	-0.73	0.81	1.00														
ARAP	0.89	0.69	0.95	0.88	-0.91	0.87	0.82	1.00													
GS	0.71	0.56	0.77	0.70	-0.71	0.75	0.83	0.83	1.00												
GG	0.69	0.52	0.75	0.68	-0.71	0.70	0.76	0.83	0.95	1.00											
GDH	0.35	0.11	0.38	0.33	-0.42	0.20	0.24	0.44	0.52	0.69	1.00										
AAT	0.55	0.40	0.62	0.54	-0.57	0.62	0.80	0.72	0.93	0.93	0.54	1.00									
XDH	0.65	0.47	0.71	0.64	-0.67	0.68	0.80	0.79	0.96	0.97	0.57	0.96	1.00								
URIC	0.70	0.53	0.76	0.69	-0.73	0.74	0.81	0.83	0.95	0.96	0.53	0.95	0.99	1.00							
ALC	0.78	0.60	0.82	0.77	-0.85	0.80	0.80	0.88	0.92	0.94	0.59	0.82	0.90	0.91	1.00						
ALN	0.45	0.44	0.39	0.45	-0.40	0.29	0.01	0.30	0.06	0.19	0.12	-0.04	0.15	0.18	0.29	1.00					
UREID	0.80	0.63	0.84	0.79	-0.87	0.80	0.77	0.88	0.89	0.93	0.58	0.79	0.88	0.90	1.00	0.38	1.00				
AAn	0.40	0.19	0.48	0.38	-0.51	0.49	0.78	0.63	0.84	0.81	0.50	0.91	0.87	0.85	0.71	-0.18	0.67	1.00			
AAr	-0.02	-0.02	-0.05	-0.02	0.20	-0.16	0.04	-0.09	-0.01	-0.05	-0.14	0.18	0.07	0.03	-0.20	-0.16	-0.21	0.07	1.00		
AAh	-0.28	-0.18	-0.35	-0.27	0.35	-0.42	-0.57	-0.45	-0.54	-0.50	-0.26	-0.57	-0.43	-0.46	-0.45	0.37	-0.40	-0.58	0.11	1.00	

P _≤	Valor crítico		
	0.05	0.01	0.001
	0.44	0.56	0.68

4.2. Estudio de la simbiosis *Phaseolus vulgaris* var. *Coco-Rhizobium tropici* CIAT899.

El efecto de la sal desde el inicio del cultivo, en la simbiosis *Phaseolus vulgaris* variedad *Coco-Rhizobium tropici* CIAT899 fue estudiado siguiendo el diseño experimental utilizado en el experimento anterior. Del mismo modo, se abordan los procesos estudiados utilizando los mismos parámetros.

4.2.1. Análisis del crecimiento.

El crecimiento expresado como peso seco de parte aérea, raíz, planta completa y relación raíz/parte aérea, se exponen en la figura 4.5, a partir de datos que se encuentran en la tabla A 4.9 del apéndice, figurando en la siguiente el análisis de la varianza.

El peso seco de la parte aérea no se afectó significativamente con 10 mM en ningún muestreo. Con 25 mM NaCl se redujo el crecimiento de parte aérea sólo en las tres últimas recogidas, provocando descensos de alrededor del 20%, mientras 50 mM disminuyó significativamente el crecimiento de la parte aérea desde el día 18 de cultivo, llegando a disminuir hasta un 62% en la última recogida. Es de destacar que 50 mM fue la dosis de sal que más limitó el crecimiento aéreo a lo largo del tiempo ya que la masa seca aumentó de 0.56 a 0.66 g planta⁻¹ a lo largo del tiempo de experimentación.

Como se puede apreciar, la parte aérea se mostró una vez más, menos tolerante al estrés salino que la raíz ya que el peso seco de raíz no se vio afectado por ninguno de los tratamientos salinos, salvo en la última recogida donde 10 mM NaCl provocó un incremento del 26% del peso seco de raíz y 50 mM una disminución del 27%.

Evidentemente, el peso seco de planta completa presentó un comportamiento similar al de la parte aérea, ya que ésta representa casi el 70% del peso de la planta completa.

La relación raíz/parte aérea (figura 4.5), refleja que el crecimiento vegetativo condiciona un RPA cercano al 0.40, y a medida que se llegue a floración esta relación disminuye para situarse en torno al 0.30 (cuarta recogida). Este comportamiento lo exhiben tanto las plantas control como las tratadas con 10 y 25 mM de NaCl. Sin embargo, la dosis más alta de NaCl incrementó esta relación dos veces respecto al control.

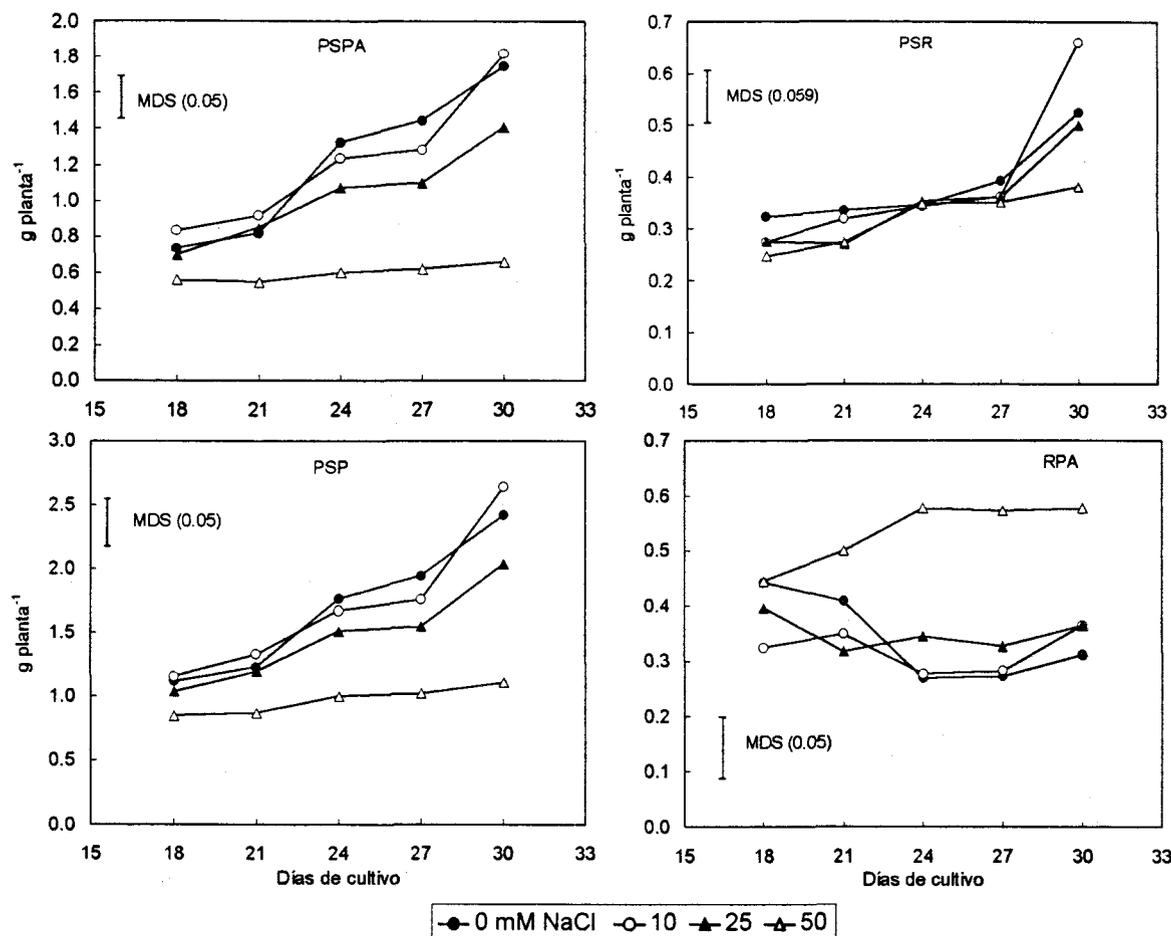


Figura 4.5. Peso seco de parte aérea (PSPA), raíz (PSR) y planta completa (PSP), expresado en g planta⁻¹, relación raíz/parte aérea (RPA), en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con la cepa CIAT899 de *Rhizobium tropici*, con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

4.2.2. Fijación de nitrógeno.

En la figura 4.6 se representan los parámetros de fijación de N₂, peso seco de nódulos, peso normalizado de los mismos y actividad reductora de acetileno específica y total por planta. Los datos numéricos se pueden observar en la tabla A 4.11, seguida del análisis estadístico (tabla A 4.12).

En la primera y segunda recogida, el peso seco de nódulos no se afectó significativamente con ninguna dosis de cloruro sódico. En el resto de los muestreos, este parámetro disminuyó significativamente sólo con 50 mM NaCl respecto al control, descendiendo algo más del 50%. Incluso se apreció una leve estimulación de este peso de nódulos con 10 mM NaCl. El incremento del peso seco de nódulos en el tiempo fue bastante similar para 0, 10 y 25 mM NaCl, aumentando 2 veces desde la primera a la

última recogida, mientras que con 50 mM el peso de nódulos osciló entre 0.44-0.74 g planta⁻¹ durante el tiempo del experimento. Este parámetro muestra una correlación positiva y significativa ($P \leq 0.001$) con el crecimiento de la planta y la actividad nitrogenasa (tabla 4.2).

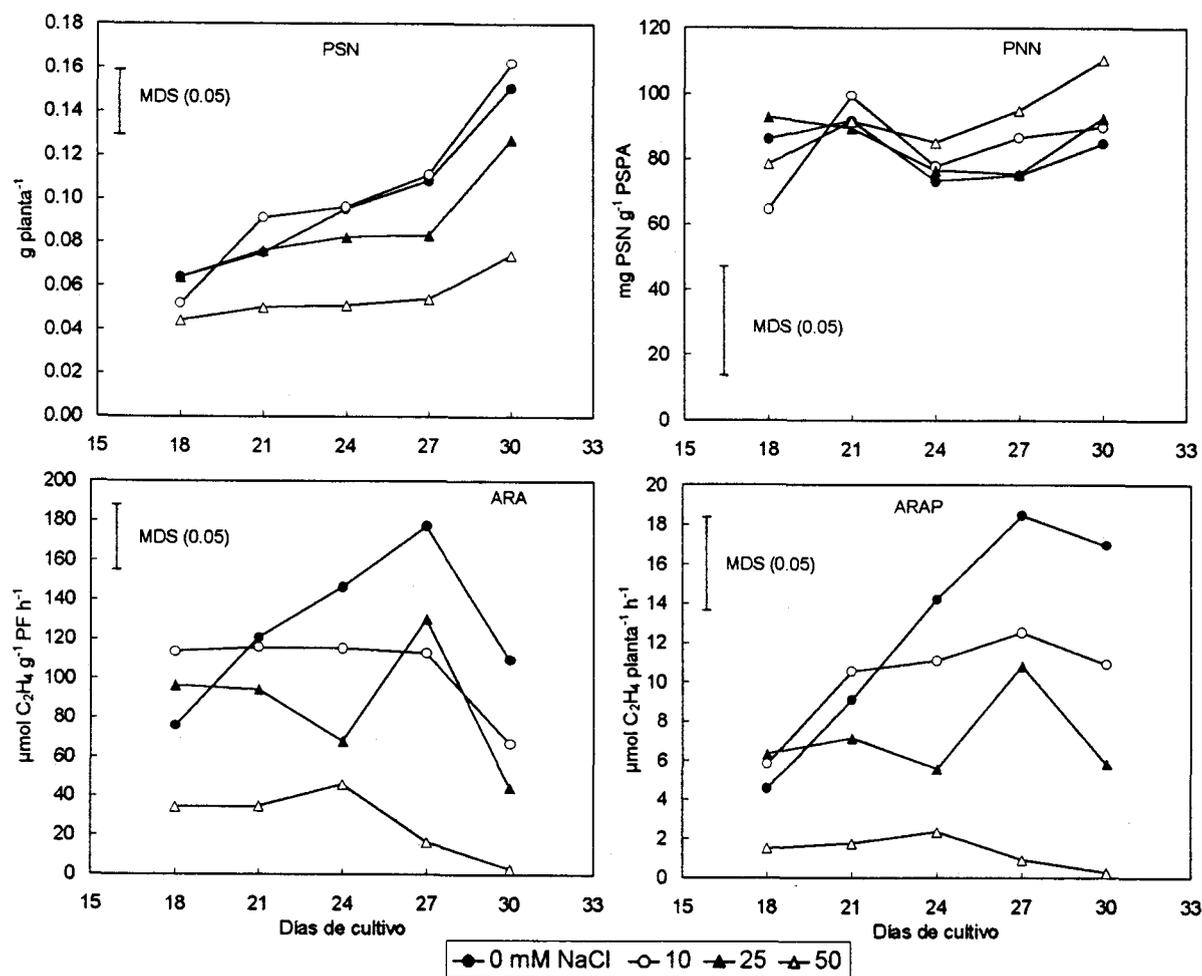


Figura 4.6. Peso seco de nódulos (PSN) en g planta⁻¹, peso normalizado de nódulos (PNN) en mg PSN g⁻¹ PSPA, actividad reductora de acetileno (ARA) en μmol C₂H₄ g⁻¹ PS h⁻¹ y actividad reductora de acetileno por planta (ARAP) en μmol C₂H₄ g⁻¹ PS h⁻¹ en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con la cepa CIAT899 de *Rhizobium tropici*, con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

Como se puede observar en la figura 4.6, este parámetro no se vio afectado significativamente con el estrés, incluso llegó a aumentar con las distintas dosis de NaCl aplicadas sin llegar a ser estos incrementos significativos. Es de destacar que el peso normalizado de nódulos se correlacionó positivamente con la relación R/PA (tabla 4.2).

La actividad reductora de acetileno presentó un máximo al inicio de floración en las plantas control, mientras que en las tratadas con NaCl sólo se pudo apreciar el máximo con la dosis de 25 mM. A los 18 días de cultivo, 10 mM NaCl provocó un aumento significativo de esta actividad (50%), mientras que 50 mM fue la única dosis que inhibió (55%) la actividad nitrogenasa. A los 21 días de cultivo (segundo muestreo), la disminución sólo fue significativa con 50 mM con un porcentaje de reducción del 71%. En el tercer muestreo, 25 y 50 mM NaCl inhibieron esta actividad de forma importante y en los dos últimos todas las dosis de NaCl aplicadas provocaron una inhibición significativa del ARA, llegando a disminuir más del 90% con 50 mM.

El ARA por planta siguió un perfil en el tiempo y de respuesta al estrés salino muy similar al observado para ARA específica (figura 4.6). Este parámetro se correlacionó positiva y significativamente ($P \leq 0.001$) con el crecimiento de la planta, PSN y con el ARA (tabla 4.2).

4.2.3. Actividades enzimáticas.

Las actividades del metabolismo del amonio: glutamina sintetasa, glutamato sintasa, glutamato deshidrogenasa y aspartato aminotransferasa, así como las enzimas del catabolismo de purinas: xantina deshidrogenasa y uricasa se exponen en la figura 4.7. Estas actividades se ven reflejadas en la tabla A 4.12 (en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$) y A 4.14 (en $\text{nmol mg}^{-1} \text{proteína min}^{-1}$). El análisis estadístico de dichas actividades está representado en las tablas A 4.13 y A 4.15.

La glutamina sintetasa tendió a disminuir a lo largo del crecimiento del cultivo en todos los tratamientos, con la pequeña excepción que en plantas control esta actividad se incrementó en floración. En cuanto al efecto del estrés salino, la actividad se inhibió significativamente con todas las dosis de NaCl aplicadas, desde el primer muestreo. Los porcentajes de reducción aumentaron en el tiempo, aunque se mantuvieron con 10 y 25 mM de NaCl en torno al 60%, sin embargo disminuyó drásticamente (92%) con 50 mM NaCl a los 30 días de cultivo.

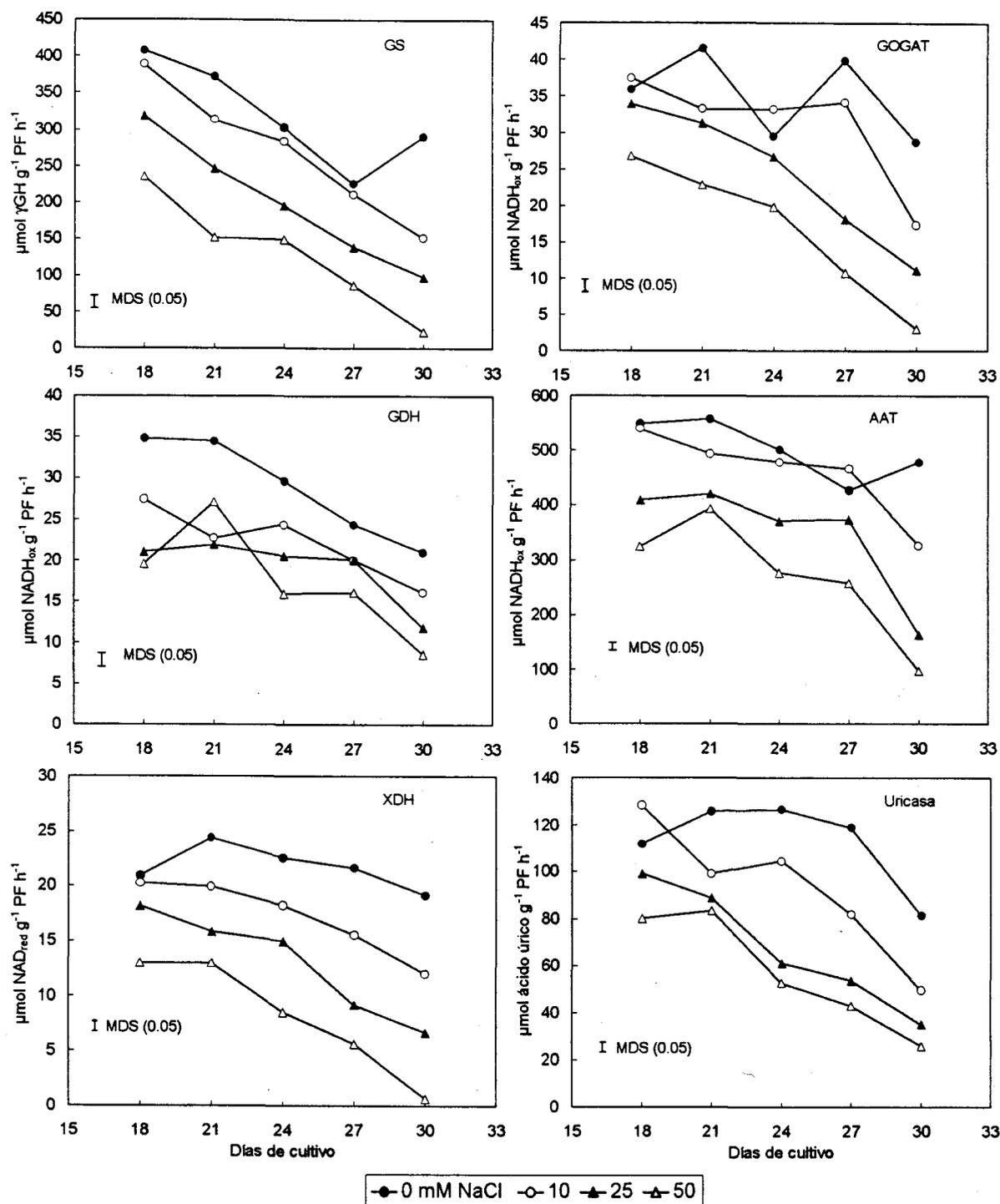


Figura 4.7. Actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT), glutamato deshidrogenasa (GDH), aspartato aminotransferasa (AAT), xantina deshidrogenasa (XDH) y uricasa (UR), expresadas en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ y contenido de proteína soluble (PRT) expresado en $\text{mg g}^{-1} \text{PF}$ en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con la cepa CIAT899 de *Rhizobium tropici*, con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

La actividad glutamato sintasa (figura 4.7) mostró dos picos en plantas control; uno en el estado vegetativo (21 días de cultivo) y otro al inicio de floración, mientras que las tratadas con NaCl presentaron una actividad descendiente en el tiempo. En el primer muestreo, 10 mM no afectó significativamente esta actividad, pero en el resto de las recogidas todas las dosis de sal aplicadas provocaron una disminución significativa de la glutamato sintasa. Sin embargo, los porcentajes de reducción fueron más bajos en la primera recogida de todos los tratamientos, y durante todo el cultivo en plantas tratadas con 10 mM NaCl, que los obtenidos en la GS. La actividad NADH-GOGAT es entre 6-10 veces inferior a la actividad GS, observándose: a) las dosis de sal tienden a favorecer que la relación de ambas actividades sea menor, lo que indica que la actividad NADH-GOGAT es menos sensible a la sal que la GS. b) el inicio de la floración condiciona un cambio de sensibilidad de ambas enzimas a la sal. Estas dos enzimas se correlacionaron positivamente con la actividad nitrogenasa (tabla 4.2). El análisis de la varianza (tabla A 4.13) indica que la variabilidad en ambas enzimas se debe por igual (50%) a las dos fuentes de variación estudiadas: día de cultivo y dosis de sal.

También en la figura 4.7 se aprecia la evolución de la actividad glutamato deshidrogenasa. En plantas control tuvo una tendencia a decaer en el tiempo. Esta tendencia se atenuó en el resto de tratamientos, apareciendo incluso un máximo a los 21 días de tratamiento con 50 mM NaCl, superando la actividad registrada con 10 y 25 mM. En cuanto al efecto del estrés salino, inhibió esta actividad desde los 18 días de cultivo, pero con porcentajes de reducción menores que los encontrados en las dos enzimas anteriores, sin superar el 59%. De hecho la disminución observada con 10 y 50 mM a lo largo del tiempo de experimentación es la misma que la que exhibe el tratamiento control, propia de la evolución ontogénica del cultivo. La glutamato deshidrogenasa se correlacionó positivamente con el ARA, GS y GOGAT (tabla 4.2).

La observación de la gráfica que engloba los datos relativos a la actividad aspartato aminotransferasa conduce a realizar los siguientes comentarios: a) la actividad se mantiene estable durante el crecimiento vegetativo; b) en floración la sal favorece la inhibición de la actividad más drástica con la dosis de sal, mientras que el control experimenta un ligero aumento de actividad; c) los porcentajes de inhibición durante todo el crecimiento vegetativo, incluso hasta el inicio de floración, inducidos por las dosis de sal son inferiores a los observados para GS y NADH-GOGAT, y semejantes a

los encontrados en la GDH; d) esta enzima también se correlacionó con el ARA y con todas las actividades enzimáticas evaluadas (tabla 4.2).

La xantina deshidrogenasa de las plantas control no sufrió grandes variaciones en el tiempo de experimentación (figura 4.7). Sin embargo, la evolución de la actividad en plantas en condiciones de estrés indica que decae con la ontogenia del cultivo. La expresión de esta actividad se vio fuertemente inhibida conforme aumentaba la dosis de sal y pasaba el tiempo, alcanzando el porcentaje de reducción más alto registrado entre todas las actividades enzimáticas estudiadas (97%) con 50 mM a los 30 días de cultivo.

Al igual que la XDH, la uricasa exhibió un comportamiento estable en el tiempo, con un ligero descenso de la actividad en floración. En los tratamientos salinos, la tendencia a disminuir con el crecimiento del cultivo fue más evidente. Excepto en la primera recogida donde 10 mM estimuló la actividad un 15%, el estrés salino provocó un descenso significativo de la uricasa, sin embargo, en menor proporción que la xantina deshidrogenasa. Como lo descrito para las demás enzimas, estas también se registraron coeficientes de correlación positivos y altamente significativos ($P \leq 0.001$) con la actividad nitrogenasa y con todas las otras actividades enzimáticas estudiadas.

4.2.4. Contenido de metabolitos.

Se determinó el contenido de alantoína y ácido alantoico en nódulos, así como el de ureidos totales, contenido de aminoácidos libres en nódulos, raíces y hojas, y por último el contenido de proteína soluble en nódulos. Esto se representa en la tabla A 4.15. y A 4.17 del apéndice y en la figura 4.8.

La contribución de la alantoína al conjunto de ureidos resulta minoritaria, representando de forma generalizada el 8-10%. Sin embargo, la sal y el tiempo de cultivo favorecen esta contribución, que llega a ser del 30-40% con dosis de 25 y 50 mM de NaCl. En los tres últimos muestreos realizados también se observa que el contenido de alantoína sufrió variaciones importantes a lo largo del desarrollo del cultivo y con el estrés salino. En las plantas control, se aprecia un máximo en el periodo vegetativo (21 días de cultivo) mientras que en los tratamientos de 25 y 50 mM NaCl, este se retrasa tres días y aparece a los 24 días de cultivo. En cuanto a 10 mM, no provocó fluctuaciones en el contenido de alantoína en el tiempo. De hecho, la aparición

y desaparición de estos picos provocó que en algunos muestreos la sal inhibiera el contenido de alantoína, y en otro lo incrementase.

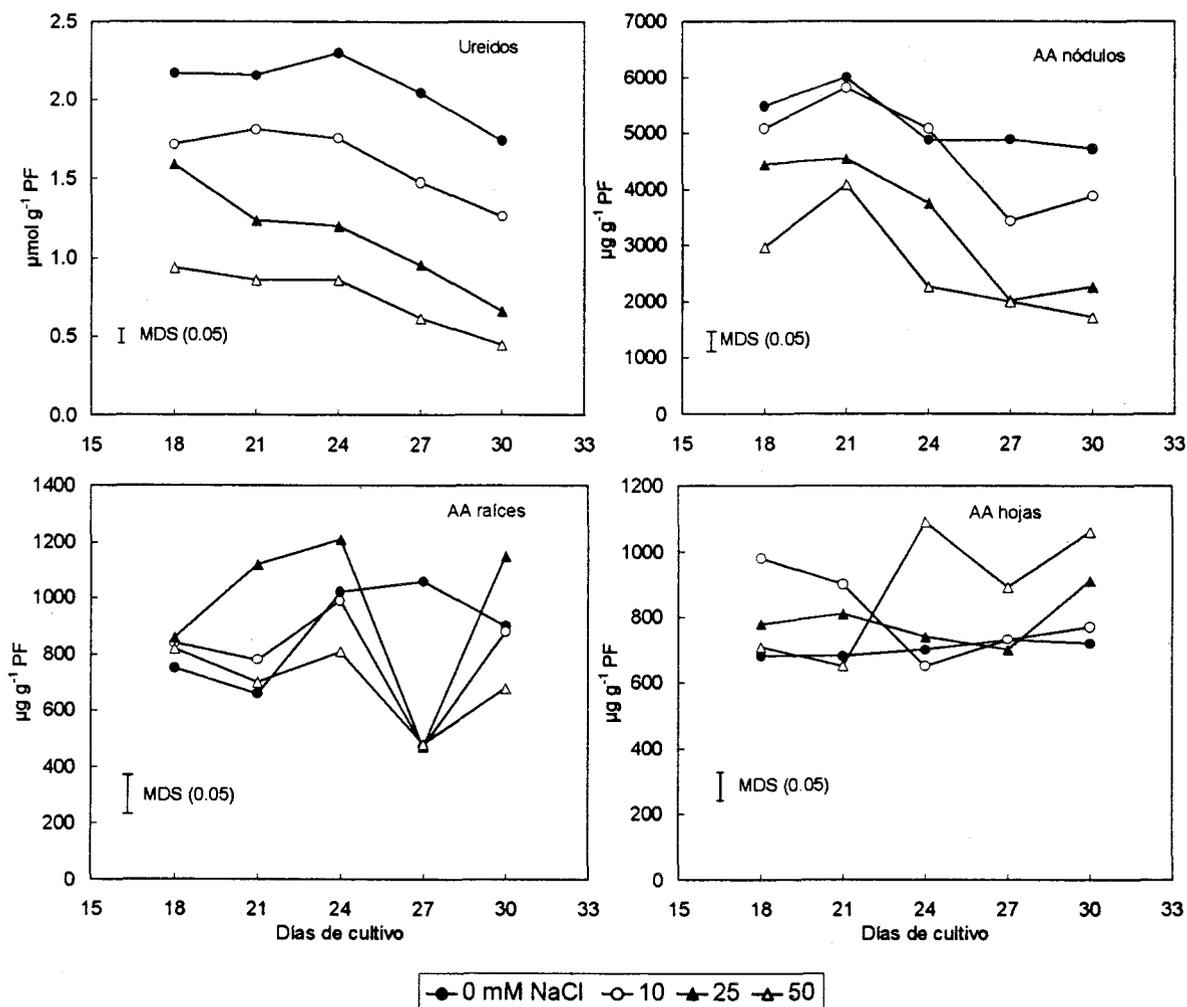


Figura 4.8. Contenido de ureidos en nódulos totales en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF y de aminoácidos en nódulos, raíces y hojas expresado $\mu\text{g g}^{-1}$ PF en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con la cepa CIAT899 de *Rhizobium tropici*, con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

El ácido alantoico mantuvo una cierta estabilidad en el tiempo de experimentación en todos los tratamientos. La presencia de NaCl en el medio causó un descenso importante de estos compuestos en nódulos, incrementándose los porcentajes de reducción conforme aumenta la dosis de sal.

El contenido de ureidos, presentó un perfil muy similar al de ácido alantoico, con unos porcentajes de inhibición que se intensifican con el tiempo y la dosis de sal (figura 4.8). Así, con 10 mM la disminución es del 15-20% en las primeras recogidas y

del 30% en los dos últimos muestreos, con 25 mM la inhibición es del 40% (primera y segunda recogida), 50% (tercera y cuarta) y del 60% en la última. Con 50 mM de NaCl, la inhibición se inicia con el 60% en el primer muestreo y llega al 75% en los últimos. Es de destacar las correlaciones positivas y altamente significativas ($P \leq 0.001$) que se encontraron entre el ácido alantoico (y ureidos), fijación de nitrógeno y todas las enzimas evaluadas. El tratamiento salino fue la fuente de variación que tuvo más efecto sobre el contenido de ureidos en nódulos, siendo responsable del 80% de la variabilidad observada.

En nódulos de las plantas control el contenido de aminoácidos mostró un ligero aumento a los 21 días de cultivo para luego permanecer bastante estable (figura 4.8). El estrés salino provocó una disminución en el contenido de aminoácidos en nódulos, llegando a registrarse descensos del orden del 60% a partir del inicio de floración, salvo con 10 mM en los tres primeros muestreos donde no hubo diferencia significativa con el control. Se obtuvieron correlaciones positivas con la fijación de nitrógeno, actividades enzimáticas y contenido de ureidos.

El contenido de aminoácidos en raíces sufrió variaciones importantes en el tiempo y con el estrés salino. Salvo el control, los demás tratamientos presentaron un mínimo al inicio de floración, provocando que en este muestreo (27 días) el contenido de aminoácidos se vea disminuido por la sal. En el resto de las recogidas, la presencia de NaCl en el medio provocó una acumulación de aminoácidos en raíz, que se hizo más evidente con 25 mM NaCl.

En hojas el contenido de aminoácidos presentó un perfil estable, a excepción del tratamiento de 50 mM que tendió a aumentar el contenido de estos compuestos en el tiempo (figura 4.8). La respuesta al estrés salino varió dependiendo del día de cultivo. En las dos primeras recogidas, 10 y 25 mM incrementaron el contenido de aminoácidos foliares respecto al control, mientras que en las tres últimas fueron las plantas tratadas con 50 mM las que acumularon estos compuestos en hojas. Este parámetro se correlacionó positivamente con la relación raíz/parte aérea, mientras que lo hizo negativamente con ARAP, actividades enzimáticas, contenido de ureidos y de aminoácidos en nódulos.

4.3. Comparación de las dos simbiosis.

Tras los resultados expuestos se puede realizar un estudio comparativo entre las dos simbiosis en condiciones de estrés salino aplicado al medio desde el momento de la siembra. A pesar de que las dosis de NaCl fueron distintas en los dos experimentos, existen dos de ellas en común, 25 y 50 mM que nos permiten establecer un punto de referencia, además del control utilizado en los dos casos.

Tabla 4.3. Tasa de crecimiento relativo (TCR) en mg PS g⁻¹ PS día⁻¹, de las dos variedades de *Phaseolus vulgaris* estudiadas, Africa y Coco, inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, en condiciones de estrés salino desde el inicio del cultivo.

Intervalo de días	NaCl (mM)	Africa	Coco
18-24	0	63.3	75.4
	25	73.0	62.0
	50	39.3	26.7
24-30	0	67.6	53.1
	25	32.2	50.1
	50	25.8	17.5

El análisis de crecimiento de las dos simbiosis nos indica que en condiciones control, las plantas de la variedad Africa presentaron un peso alrededor 1.5 veces superior a la variedad Coco (figura 4.1 y 4.5). La tasa de crecimiento relativo (TCR, tabla 4.3) permite comparar el crecimiento de diferentes variedades, independientemente de su tamaño. La salinidad disminuye la TCR, salvo en Africa con 25 mM en la primera recogida que aumentó. Las plantas control de Coco en el periodo vegetativo (18-24 días) presentaron una TCR mayor que Africa, pero la disminución de TCR por la sal fue mayor en Coco, tanto con 25 mM como con 50 mM NaCl. En el periodo reproductor (24-30 días), tanto las plantas control como las tratadas con 50 mM de sal en Africa mostraron mayor TCR que las de Coco. El crecimiento de la parte aérea sufrió una disminución importante en Africa desde la primera recogida con 25 y 50 mM, mientras que en Coco esto ocurrió solo en los últimos muestreos. Es interesante destacar la respuesta del crecimiento radical en presencia de NaCl, en Africa la disminución del peso seco de raíz se hizo evidente en todas las recogidas, mientras que en Coco apenas se alteró. No obstante la reducción de PSR en Africa fue proporcionalmente menor que la reducción de PSPA, lo que implica un incremento de la relación RPA. En Coco

también se observa un incremento de RPA determinado principalmente por el descenso de PSPA. El análisis de la varianza (tabla A 4.21) muestra que el efecto sobre la relación RPA de la variedad, el tratamiento salino y la interacción de ambos factores, es significativa.

En cuanto a los parámetros de fijación de nitrógeno, la disminución del peso seco de nódulos fue espectacular en el caso de Africa (figura 4.2) ya que con 50 mM los porcentajes de inhibición rondaron el 70% desde los 18 días de cultivo, mientras que con la variedad Coco (figura 4.6) estas disminuciones fueron del 50% con la misma dosis de NaCl. Además en la primera recogida, 25 mM inhibió significativamente este parámetro en Africa mientras no lo hizo en Coco. En general, las plantas control de Africa mostraron mayor PSN que las de Coco, pero en esta última variedad la nodulación (como PSN) fue menos sensible a la sal que en Africa. También en este parámetro es significativo el efecto de la interacción variedad x sal (tabla A 4.21).

Al comparar la actividad reductora de acetileno, se apreció que las dos simbiosis presentaron un máximo al inicio de floración. Salvo la primera recogida, donde en los dos casos se apreció un ligero aumento de la nitrogenasa con 25 mM, esta dosis no afectó significativamente la actividad en Africa, mientras sí inhibió la de Coco. Con 50 mM también disminuyó la nitrogenasa de forma más pronunciada en Coco. El análisis de los datos de ARAP muestra que el efecto de la interacción variedad x sal no es significativo. Africa fue más sensible en cuanto a nodulación y menos en cuanto a ARA específica, que Coco. Esto resulta en un efecto de la sal sobre ARAP semejante en ambas simbiosis, si bien en cada caso el estrés incidió preferentemente sobre cada uno de los componentes de ARAP (ARA o PSN).

Es interesante comentar que el crecimiento de la planta puede comportarse en estas condiciones de forma distinta al proceso de fijación de nitrógeno, ya que a pesar de que la variedad Africa sufrió fuertes alteraciones en el crecimiento de la planta respecto a la var. Coco, la nitrogenasa de la primera toleró dosis de NaCl que Coco no pudo tolerar.

Las actividades enzimáticas nodulares evaluadas tuvieron valores de actividad próximos en las dos simbiosis (figuras 4.3 y 4.7). En el caso de las plantas control, el perfil de actividad registrado en el tiempo en Africa y Coco fue bastante similar, salvo algunas excepciones como la glutamina sintetasa que presentó un máximo tres días

antes de iniciarse la floración en Africa, mientras que en Coco ésta tendió a disminuir en el tiempo. En cuanto al efecto del estrés salino, todas coincidieron en un descenso de la actividad en presencia del cloruro sódico. La relación actividad GS/NADH-GOGAT fue mayor en los nódulos de la var. Africa que en Coco, lo que induce a asumir que la var. Coco expresa mejor la NADH-GOGAT. Incluso la sal provoca un efecto distinto en esta actividad según la variedad de *Phaseolus vulgaris*. La var. Coco induce una mayor actividad NADH-GOGAT y AAT en condiciones de estrés salino. Los porcentajes de inhibición fueron parecidos en los dos estudios salvo excepciones donde Coco mostró inhibiciones más acentuadas, como el 92% menos de actividad registrada a los 30 días de cultivo con 50 mM NaCl frente al 66% encontrado en Africa. Además, la glutamato deshidrogenasa, en Africa se vio incrementada con las dosis de NaCl sin superar los valores del control, mientras que en Coco esta sufrió un descenso al igual que las demás enzimas. Del análisis de la varianza se deduce que la variedad tuvo un efecto significativo sobre las enzimas del metabolismo del nitrógeno, así como sobre el contenido de ureidos, siendo también significativo el efecto de la interacción variedad x sal.

En el caso de las enzimas del catabolismo de purinas, parecen ligeramente más inhibidas por la sal en Africa que en Coco (figura 4.3 y 4.7). Un punto importante a comentar es las correlaciones positivas y altamente significativas encontradas entre la gran mayoría de las enzimas estudiadas, el crecimiento de la planta, peso seco de nódulos y fijación de nitrógeno en Africa, mientras que en Coco estas mismas enzimas solo se correlacionaron con la nitrogenasa.

Se determinaron los mismos metabolitos en las dos simbiosis (figura 4.4 y 4.8). El contenido de ureidos en nódulos fue aproximadamente dos veces superior en Africa que en Coco, sin embargo sufrió descensos más importantes en Africa que en Coco con las dosis de 25 y 50 mM NaCl. Al igual que las enzimas, el contenido de ureidos en Africa se correlacionó con el crecimiento de la planta mientras no lo hizo en Coco.

En Africa, el contenido de aminoácidos en nódulos aumentó en el tiempo entre los 21 y 30 días de cultivo en las plantas control mientras que disminuyó con el crecimiento de la planta en los tratamientos salinos. En Coco, la disminución de los aminoácidos en el tiempo tuvo lugar en todos los tratamientos, incluso en las plantas

control. La sal provocó descensos en el contenido de estos compuestos en las dos simbiosis, con porcentajes de reducción ligeramente más altos en Coco.

En la mayoría de los muestreos, el contenido de aminoácidos en raíces aumentó en presencia del cloruro sódico en la variedad Africa con porcentajes mucho más altos que los encontrados en Coco.

El contenido de aminoácidos en hojas tendió a aumentar con el estrés salino en las dos simbiosis, destacando que en algunos muestreos los porcentajes de incremento en Africa fueron muy superiores a los registrados en Coco utilizando las mismas dosis de NaCl. En las dos variedades el contenido de aminoácidos foliares se correlacionaron negativamente con la nitrogenasa por planta y con algunas de las enzimas. Sin embargo, en Coco se encontró un coeficiente de correlación positivo y significativo entre los aminoácidos de hojas y la relación raíz parte aérea, que no se registró en Africa.

Tabla 4.2. Matriz de coeficientes de correlación simple entre variables relacionadas con crecimiento, la fijación de nitrógeno, las enzimas del metabolismo del amonio y del catabolismo de purinas, contenido en ureidos y aminoácidos en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. *Coco*, inoculadas con Ciat 899 de *R. tropici*, tratadas con NaCl desde el inicio del cultivo. Variables: PSPA, peso seco parte aérea; PSR, peso seco de raíz; PSP, peso seco de planta; RPA, relación raíz/parte aérea; PNN, peso normalizado de nódulos; ARA, actividad reductora de acetileno; ARAP, ARA por planta; GG, glutamato sintasa; GS, glutamina sintetasa; GDH, glutamato deshidrogenasa; AAT, aspartato aminotransferasa; XDH, xantina deshidrogenasa; URIC, uricasa; ALN, alantoina en nódulos; ALC, ácido alantoico en nódulos; UREID, ureidos en nódulos; AAn, aminoácidos en nódulos; AAr, aminoácidos en raíces; AAh, aminoácidos en hojas; PRT, contenido de proteína soluble en nódulos.

	PSPA	PSR	PSP	RPA	PSN	ARA	ARAP	PNN	GS	GG	GDH	AAT	XDH	URIC	AAn	AAr	AAh	ALN	ALC	UREID	PRT	
PSPA	1.00																					
PSR	0.80	1.00																				
PSP	0.99	0.87	1.00																			
RPA	-0.70	-0.16	-0.61	1.00																		
PSN	0.96	0.88	0.97	-0.55	1.00																	
ARA	0.48	-0.02	0.39	-0.81	0.32	1.00																
ARAP	0.80	0.38	0.73	-0.82	0.69	0.88	1.00															
PNN	-0.22	0.15	-0.13	0.52	0.07	-0.51	-0.33	1.00														
GS	0.00	-0.33	-0.07	-0.45	-0.09	0.59	0.35	-0.37	1.00													
GG	0.07	-0.37	-0.02	-0.57	-0.05	0.74	0.51	-0.42	0.89	1.00												
GDH	-0.10	-0.39	-0.17	-0.32	-0.22	0.55	0.29	-0.38	0.84	0.80	1.00											
AAT	0.13	-0.28	0.04	-0.57	0.00	0.73	0.52	-0.44	0.90	0.91	0.89	1.00										
XDH	0.21	-0.21	0.13	-0.62	0.09	0.78	0.60	-0.41	0.91	0.94	0.85	0.93	1.00									
URIC	0.00	-0.42	-0.09	-0.50	-0.14	0.72	0.46	-0.45	0.89	0.92	0.88	0.89	0.94	1.00								
AAn	0.16	-0.16	0.10	-0.51	0.11	0.63	0.49	-0.19	0.88	0.86	0.82	0.88	0.94	0.88	1.00							
AAr	0.35	0.15	0.32	-0.43	0.28	0.17	0.22	-0.24	0.15	0.17	0.00	0.00	0.25	0.16	0.28	1.00						
AAh	-0.28	0.03	-0.23	0.51	-0.20	-0.43	-0.44	0.30	-0.38	-0.48	-0.59	-0.56	-0.54	-0.45	-0.45	-0.03	1.00					
ALN	-0.20	-0.02	-0.17	0.25	-0.18	-0.12	-0.22	0.00	0.05	0.03	0.06	-0.04	0.01	-0.10	-0.07	0.02	0.15	1.00				
ALC	0.33	-0.07	0.26	-0.63	0.22	0.81	0.69	-0.34	0.85	0.84	0.79	0.87	0.93	0.89	0.89	0.19	-0.49	-0.18	1.00			
UREID	0.31	-0.08	0.24	-0.61	0.20	0.80	0.67	-0.35	0.87	0.86	0.81	0.88	0.95	0.89	0.89	0.20	-0.48	-0.04	0.99	1.00		
PRT	-0.06	-0.38	-0.12	-0.41	-0.13	0.55	0.29	-0.26	0.89	0.84	0.80	0.84	0.88	0.86	0.90	0.31	-0.32	0.13	0.78	0.81	1.00	

Valor crítico		
P ≤ 0.05	0.01	0.001
0.44	0.56	0.68

5. Efecto del cloruro sódico aplicado a la simbiosis ya establecida.

En este experimento se estudia el efecto de la adición de la sal cuando la simbiosis está establecida, con objeto de observar los efectos de la salinidad sobre el metabolismo nitrogenado en nódulos fijadores de nitrógeno. Para ello, el NaCl se aplicó a los 18 días de cultivo, cuando los nódulos formados son funcionales. Se estableció el diseño experimental descrito en el apartado 3.5 de Material y Métodos, con cuatro recogidas: la primera y segunda a los 3 y 6 días de adicionar la sal, coincidiendo con el estado vegetativo; la tercera a los 9 días del tratamiento salino tuvo lugar al inicio de floración; y la última recogida se realizó a los 12 días de tratamiento, en plena floración. Los muestreos realizados permiten seguir la evolución del crecimiento, del proceso de fijación de nitrógeno, del metabolismo del amonio y de la síntesis de los asimilados durante un periodo del desarrollo de la simbiosis importante. Este estudio se realizó con dos variedades de *Phaseolus vulgaris*: **Africa**, considerada como más tolerante al estrés salino, y **Coco**, considerada como sensible a la sal. Se aplicaron tres concentraciones salinas en el medio de cultivo: 25, 50 y 100 mM NaCl para Africa, y 10, 25 y 50 mM para Coco. Como control se utilizaron plantas que crecieron sin sal en la solución nutritiva.

5.1. Estudio de la simbiosis *Phaseolus vulgaris* var. *Africa-Rhizobium tropici* CIAT899.

5.1.1. Análisis del crecimiento.

El crecimiento expresado como peso seco de parte aérea, raíz, planta completa y relación raíz/parte aérea de esta variedad, en función del tiempo de cultivo y los tratamientos salinos, se exponen en la figura 5.1. Los datos numéricos se encuentran en la tabla A 5.1 del apéndice de esta memoria, en la que se exponen datos procedentes de dos experimentos realizados, y en cada uno de los tratamientos ensayados se realizaron seis repeticiones. Todos estos datos se han sometido a análisis de la varianza (apéndice) y se ha calculado la mínima diferencia significativa (MDS) así como los coeficientes de correlación simple (tabla 5.1).

En la primera y segunda recogida, el peso seco parte aérea no se vio afectado con la sal, mientras que en las dos últimas se observa una disminución significativa con todas

las dosis de cloruro sódico aplicadas, descendiendo el PSPA hasta un 33% con 100 mM NaCl. El peso seco de raíz no presentó cambios significativos con los tratamientos salinos.

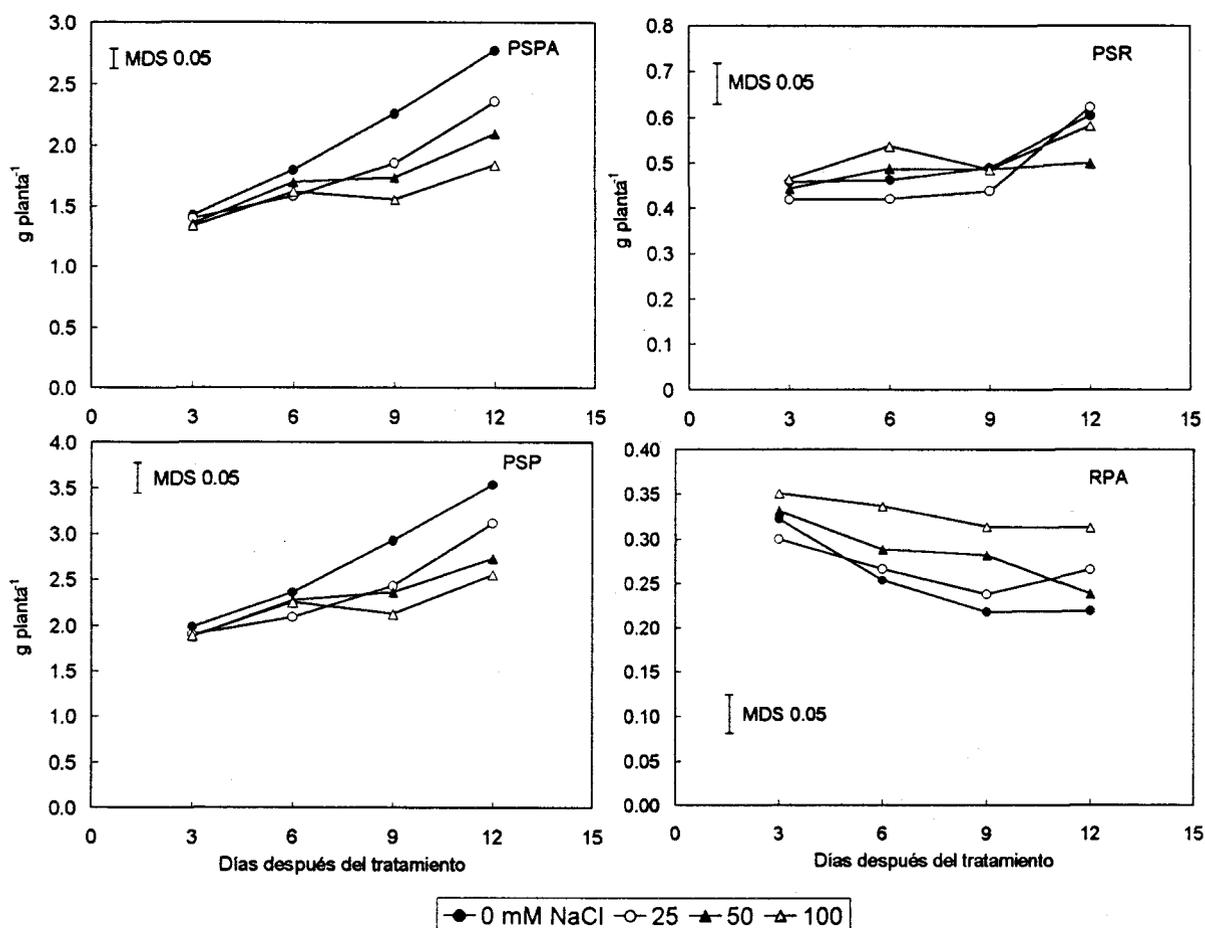


Figura 5.1. Peso seco de parte aérea (PSPA), raíz (PSR) y planta completa (PSP), expresado en g planta⁻¹, relación raíz/parte aérea (RPA), en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con la cepa CIAT899 de *Rhizobium tropici*, con cuatro dosis de NaCl aplicadas en el periodo vegetativo.

Dado que el peso seco de planta (PSP) está constituido principalmente (70%) por la parte aérea, este parámetro mostró la misma respuesta al estrés salino que la parte aérea, no inhibiéndose en las dos primeras recogidas y disminuyendo con la sal en las dos últimas. La relación raíz/parte aérea aumentó con la sal desde los tres días de tratamiento, incrementándose a los 9 y 12 días hasta un 40% con 100 mM NaCl (figura

5.1). Los coeficientes de correlación (tabla 5.1) indican que, en general, existe una buena correlación entre los parámetros de crecimiento.

5.1.2. Fijación de nitrógeno.

Los parámetros de fijación de nitrógeno fueron representados por el peso seco de nódulos, peso normalizado de nódulos, actividad reductora de acetileno específica y total por planta, expuestos en la figura 5.2. Así mismo, los datos numéricos de estos parámetros se han recopilado en la tabla A 5.2 del apéndice, en la que se indica la MDS ($P \leq 0.05$).

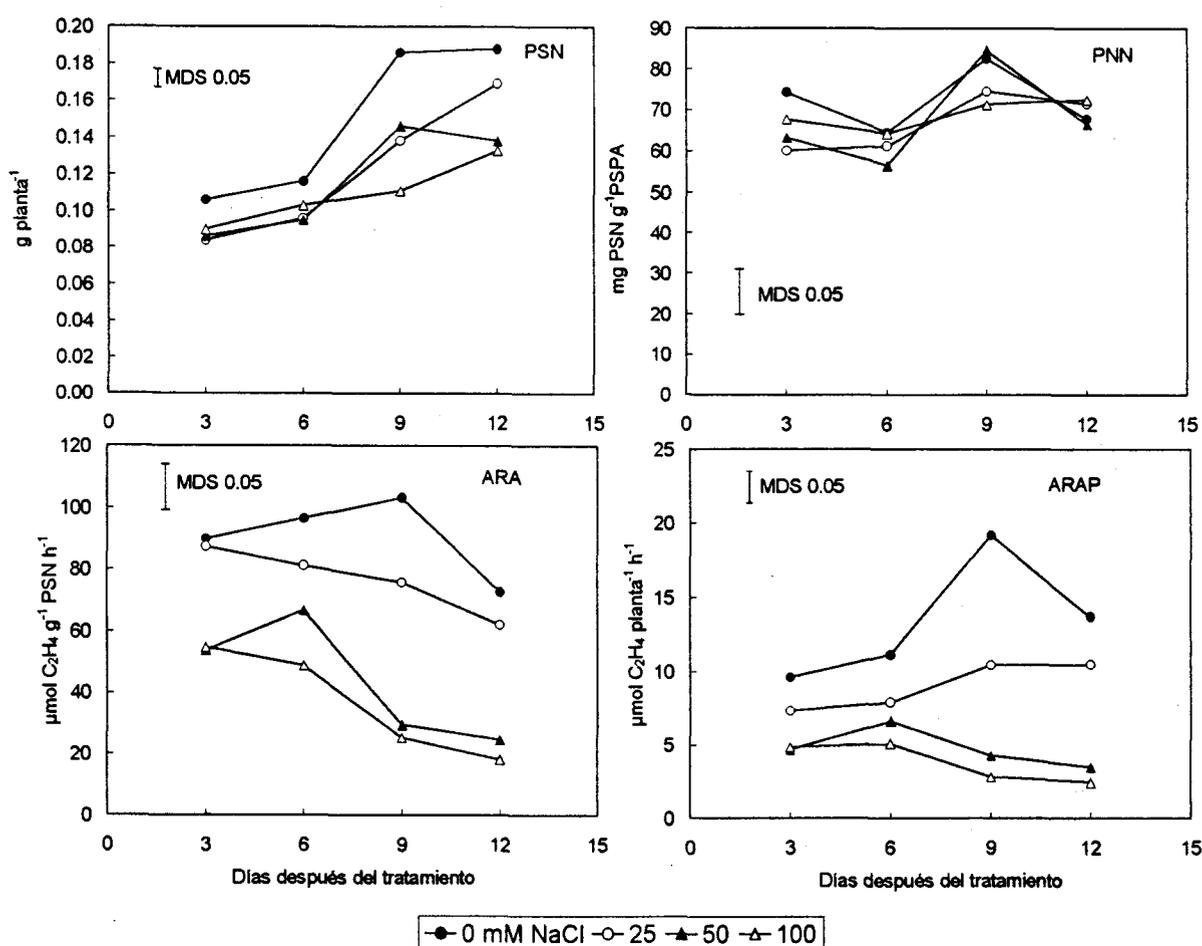


Figura 5.2. Peso seco de nódulos (PSN) en g planta^{-1} , peso normalizado de nódulos (PNN) en mg PSN g^{-1} PSPA, actividad reductora de acetileno (ARA) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{g}^{-1} \text{PS h}^{-1}$ y actividad reductora de acetileno por planta (ARAP) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{g}^{-1} \text{PS h}^{-1}$ en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con la cepa CIAT899 de *Rhizobium tropici*, con cuatro dosis de NaCl aplicadas en el periodo vegetativo.

El peso seco de nódulos descendió con el estrés salino desde el tercer día de adicionar la sal al medio de cultivo, llegando a disminuir hasta un 40% a los 9 días de tratamiento con 100 mM, mientras que con 50 mM esta disminución fue de un 20%. El peso normalizado de nódulos no se vio alterado por la sal, pues las diferencias entre tratamientos no son significativas. Con el tiempo se observó una tendencia ascendente hasta el día 9 de tratamiento, para descender en la última recogida, si bien las diferencias entre recogidas también fueron escasas.

La actividad reductora de acetileno mostró un máximo a los 27 días de cultivo en las plantas control, coincidiendo con el inicio de floración (figura 5.2). Este pico desaparece con los tratamientos salinos e incluso con 50 y 100 mM se observa una disminución en los dos últimos muestreos respecto a los anteriores. En cuanto al efecto del estrés salino, fue significativo desde la adición de la sal, con 50 y 100 mM en la primera recogida, y en los demás muestreos con las tres dosis aplicadas, inhibiéndose entre un 65-75% con 50 y 100 mM NaCl. El ARA fue más sensible a la sal que el PSN.

La actividad reductora de acetileno total por planta se afectó por la sal de forma similar al ARA, correlacionándose positivamente con el crecimiento de la planta y con PSN, tal como se observa en la tabla 5.1.

5.1.3. Actividades enzimáticas.

Se determinaron diversas actividades enzimáticas del metabolismo nitrogenado en nódulos, relacionadas con el metabolismo del amonio (GS, NADH-GOGAT, GDH y AAT) y de los ureidos (XDH y uricasa). Los valores de todas estas actividades enzimáticas se reúnen en las tablas A 5.5 y A 5.6 del apéndice, expresadas en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ y en $\text{nmol mg}^{-1} \text{proteína min}^{-1}$, respectivamente. Se representan gráficamente las seis actividades enzimáticas expresadas en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ en la figura 5.3.

La glutamina sintetasa presentó la máxima actividad en las plantas control durante el crecimiento vegetativo de la planta (24 días de cultivo). Con los tratamientos salinos esta actividad no presentó un máximo el día 24. En la primera recogida, el estrés salino no afectó esta actividad, mientras que en el resto de los muestreos la disminución se hizo evidente con todas las dosis aplicadas, inhibiéndose alrededor del 20% con 25 mM y entre el 40-50% con 100 mM.

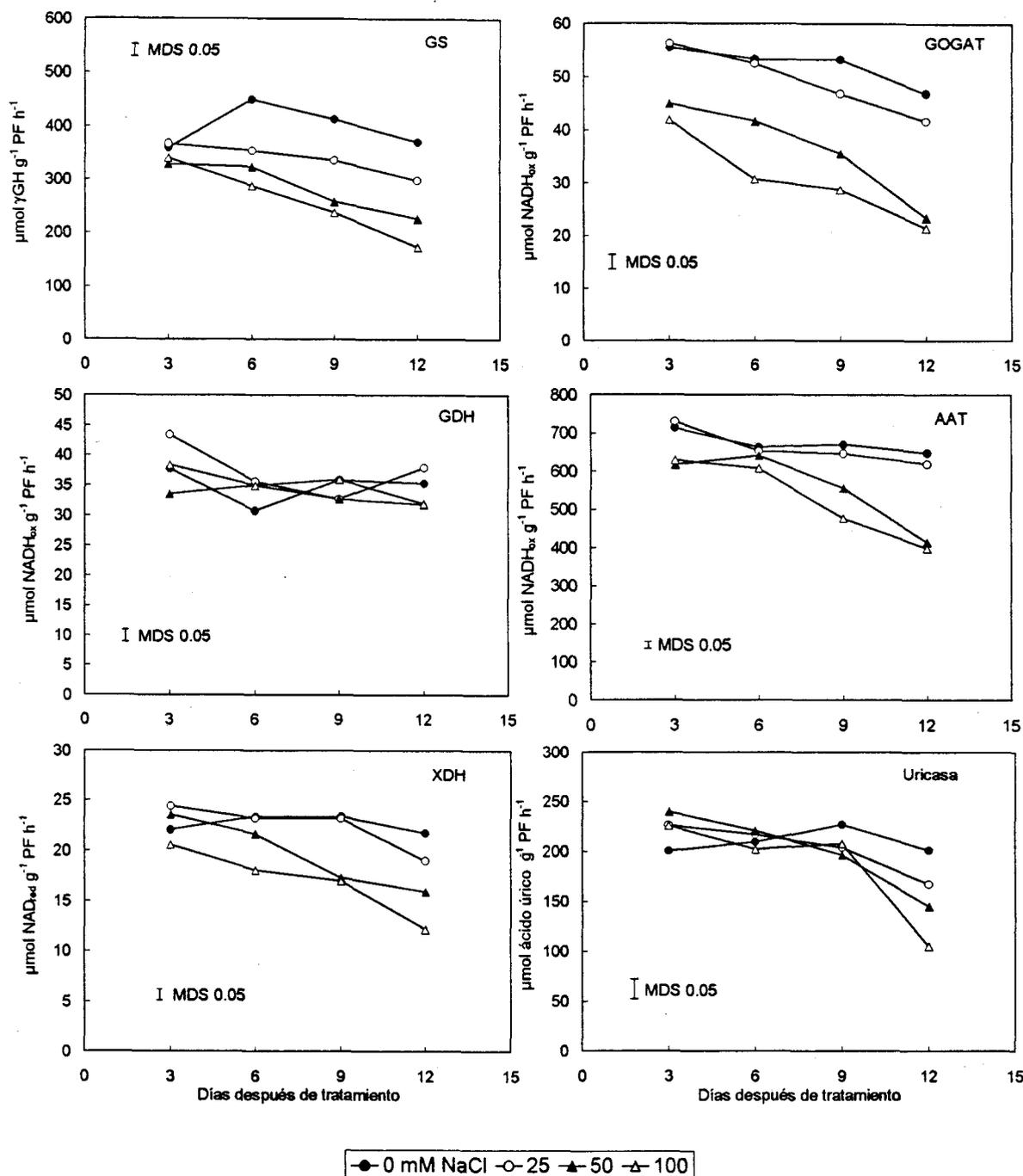


Figura 5.3. Actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT), glutamato deshidrogenasa (GDH), aspartato aminotransferasa (AAT), xantina deshidrogenasa (XDH) y uricasa (UR), expresadas en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ y contenido de proteína soluble (PRT) expresado en $\text{mg g}^{-1} \text{PF}$ en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con la cepa CIAT899 de *Rhizobium tropici*, con cuatro dosis de NaCl aplicadas en el periodo vegetativo.

La evolución en el tiempo de la glutamato sintasa en las plantas control fue bastante estable tendiendo a disminuir levemente en la floración, mientras que las plantas tratadas con cloruro de sodio presentaron una actividad descendiente a lo largo del desarrollo del cultivo (figura 5.3). A los 3 y 6 días de tratamiento, la actividad se inhibió sólo con 50 y 100 mM NaCl, y a los 9 y 12 días, con todas las dosis aplicadas. Los porcentajes de inhibición se incrementan con el tiempo de cultivo, siendo la inhibición en la primera recogida del 20-25%, en la segunda del 25-45%, en la tercera del 35-50% y en la cuarta del 50% con 50 y 100 mM NaCl. La respuesta de estas dos enzimas al estrés salino fue muy similar, y presentaron un coeficiente de correlación positivo y altamente significativo con ARA (0.94; $P \leq 0.001$) y con ARAP (0.74; $P \leq 0.001$).

La respuesta al estrés salino que mostró la glutamato deshidrogenasa fue distinta que la expresada por GS y GOGAT. A los 3 y 6 días de tratamiento salino, 25 mM causó un incremento de esta actividad estadísticamente significativo, mientras que en el resto de las recogidas, la sal no pareció afectar a esta actividad, observándose variaciones que no fueron significativas ($P \leq 0.05$).

La aspartato aminotransferasa (figura 5.3) presentó un perfil de actividad estable en el tiempo para 0 y 25 mM NaCl, y tendió a disminuir con 50 y 100 mM NaCl. La concentración de 25 mM de cloruro sódico no tuvo ningún efecto sobre esta actividad, mientras que 50 y 100 mM la inhibieron a los 9 y 12 días de adicionar la sal.

Es de resaltar que el efecto del estrés salino sobre estas dos últimas actividades enzimáticas, AAT y GDH, fue más atenuado que para la GS y la GOGAT. Mientras que la GDH sólo se correlacionó con la AAT ($P \leq 0.05$), ésta registró correlaciones positivas y altamente significativas con ARA, ARAP, GS y GOGAT ($P \leq 0.001$) tal como se indica en la tabla 5.1.

Se apreció una estimulación significativa de la actividad xantina deshidrogenasa a los 3 días de tratamiento con 25 y 50 mM NaCl. En el resto de las recogidas, la actividad con 25 mM fue similar a las de las plantas control, mientras que con dosis de sal mayores (50 y 100 mM) se inhibió entre 25-40%. La uricasa presentó también un aumento de la actividad en el primer muestreo con todas las dosis de sal aplicadas, y en la segunda con 25 y 50 mM NaCl (figura 5.3). En las dos últimas recogidas la actividad tendió a disminuir con la sal. Estas dos enzimas del catabolismo de purinas se

correlacionaron positivamente con ARA y con las demás enzimas estudiadas, a excepción de la GDH (tabla 5.1).

Cuando las actividades enzimáticas se expresan en nmol mg^{-1} proteína min^{-1} (tabla A5.6), la respuesta al estrés salino fue distinta en algunos casos. Se observó un incremento significativo de algunas actividades con la sal, como fue el caso de la glutamina sintetasa en la primera recogida o la glutamato deshidrogenasa y la uricasa en todos los muestreos y con todas las dosis de NaCl.

En general, tanto el tiempo de exposición al cloruro sódico como la dosis de sal aplicada fueron factores determinantes en la respuesta de estas enzimas al estrés salino.

5.1.4. Contenido de metabolitos.

Se determinó el contenido de alantoína y ácido alantoico en nódulos, así como el de ureidos totales (suma de ALN y ALC), contenido de aminoácidos libres en nódulos, raíces y hojas, y por último, el contenido de proteína soluble en nódulos. Los valores de estos metabolitos se reúnen en las tablas A 5.9 y A 5.11 del apéndice. En este apartado se representan gráficamente en la figura 5.4.

El contenido de alantoína (tabla A 5.9) no se vio alterado por el estrés salino a excepción de 100 mM NaCl en las tres últimas recogidas donde este contenido disminuyó entre 20-40%. El contenido de ácido alantoico se inhibió de forma significativa con todas las dosis de cloruro sódico aplicadas, salvo 25 mM en el primer muestreo, llegando a descender hasta un 60% en los últimos muestreos con las dosis más altas de NaCl. El contenido de ácido alantoico presentó valores siete veces superiores a los de alantoína, por lo tanto, el contenido de ureidos totales (figura 5.4) mostró el mismo perfil y respuesta a la sal que el ácido alantoico. El ácido alantoico, y por lo tanto el contenido de ureidos, presentaron correlaciones positivas y altamente significativas con ARA (0.93; $P \leq 0.001$) y con todas las enzimas estudiadas, a excepción de la GDH (tabla 5.1).

El contenido de aminoácidos en nódulos presentó un máximo en el momento que se inicia la floración para todos los tratamientos (figura 5.4). El estrés salino incrementó el contenido de estos compuestos en nódulos de forma significativa desde la dosis de NaCl más baja a la más alta. Este parámetro sólo se correlacionó positiva y significativamente con el contenido de alantoína en nódulos ($P \leq 0.05$).

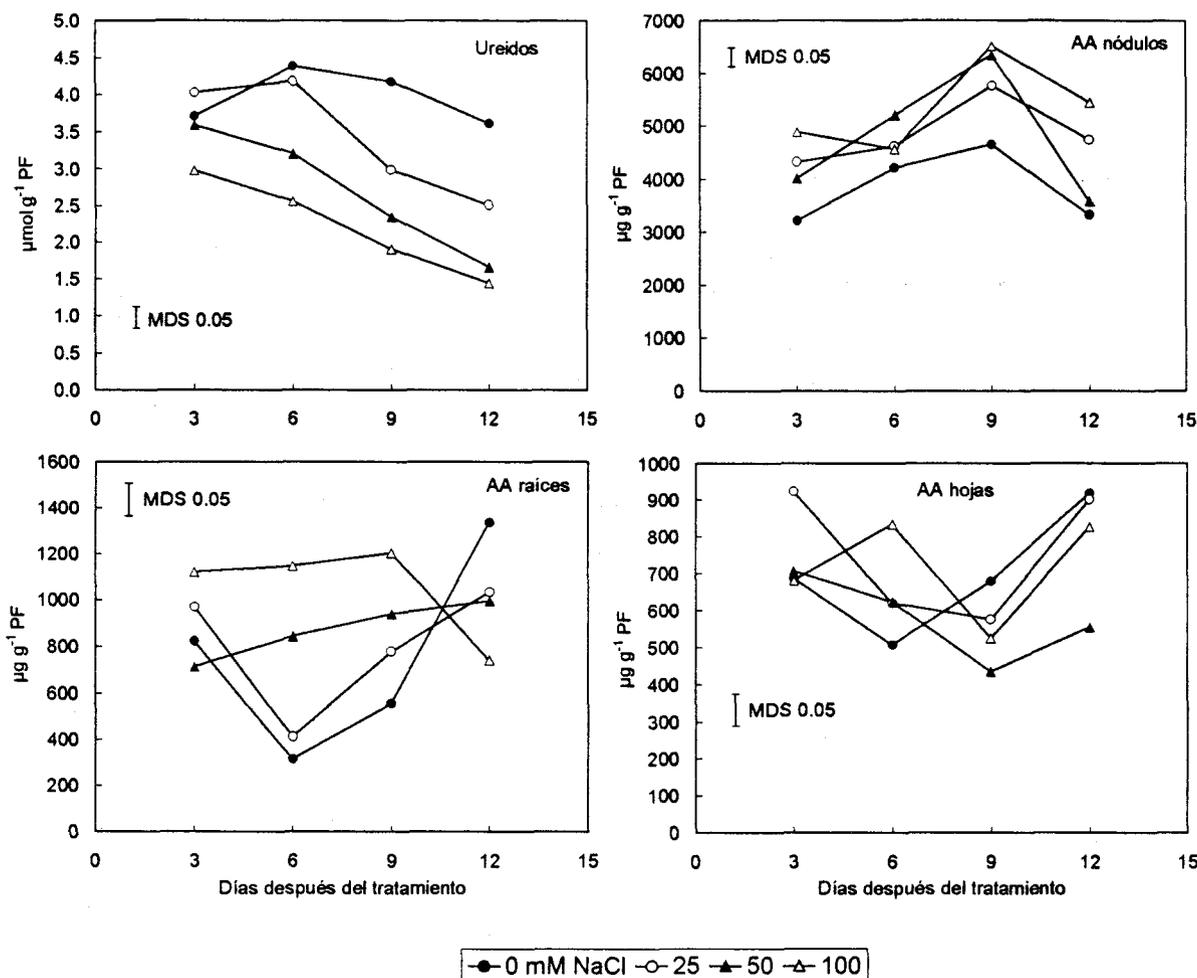


Figura 5.4. Contenido de ureidos en nódulos en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF y de aminoácidos en nódulos, raíces y hojas expresado $\mu\text{g g}^{-1}$ PF en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con la cepa CIAT899 de *Rhizobium tropici*, con cuatro dosis de NaCl aplicadas en el periodo vegetativo.

El contenido de aminoácidos en raíces también aumentó respecto al control con los tratamientos salinos, incrementándose hasta cuatro veces con 100 mM NaCl en la segunda recogida. Las plantas control y las tratadas con 25 mM mostraron un punto de inflexión a los 24 días de cultivo para luego aumentar hasta la última recogida. En el caso de 50 mM la tendencia fue de aumento en el tiempo, y para 100 mM, este contenido se mostró constante a lo largo del tiempo hasta los 27 días de cultivo, para descender en la última recogida (figura 5.4). Los aminoácidos en raíces se correlacionaron positivamente con PSR y negativamente con el contenido, esta vez, de ácido alantoico en nódulos (tabla 5.1).

Tabla 5.1. Matriz de coeficientes de correlación simple entre variables relacionadas con crecimiento, la fijación de nitrógeno, las enzimas del metabolismo del amonio y del catabolismo de purinas, contenido en ureidos, aminoácidos en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa, inoculadas con Ciat 899 de *R. tropici*, con cuatro dosis de NaC aplicadas en el periodo vegetativo. Variables: PSPA, peso seco parte aérea; PSR, peso seco de raíz; PSP, peso seco de planta; RPA, relación raíz/parte aérea; PNN, peso normalizado de nódulos; ARA, actividad reductora de acetileno; ARAP, ARA por planta; GG, glutamato sintasa; GS, glutamina sintetasa; XDH, xantina deshidrogenasa; URIC, uricasa; PRT, proteína soluble en el citosol nodular; ALN, alantoina en nódulos; ALC, ácido alantoico en nódulos; UREID, ureidos en nódulos; AAn, aminoácidos en nódulos; AAr, aminoácidos en raíz; AAh, aminoácidos en hojas.

	PSPA	PSR	PSP	RPA	PSN	PNN	ARA	ARAP	AAn	AAr	AAh	ALN	ALC	UREID	GG	GS	XDH	URIC	GDH	AAT	PRT	
PSPA	1.00																					
PSR	0.70	1.00																				
PSP	1.00	0.76	1.00																			
RPA	-0.76	-0.11	-0.71	1.00																		
PSN	0.92	0.64	0.93	-0.71	1.00																	
PNN	0.28	0.21	0.31	-0.20	0.63	1.00																
ARA	0.08	-0.35	0.02	-0.37	0.05	-0.10	1.00															
ARAP	0.56	0.08	0.53	-0.66	0.60	0.29	0.81	1.00														
AAn	-0.21	-0.05	-0.19	0.15	-0.03	0.34	-0.44	-0.34	1.00													
AAr	0.20	0.49	0.24	0.26	0.15	0.03	-0.47	-0.28	0.05	1.00												
AAh	0.12	0.34	0.14	0.20	-0.02	-0.32	0.22	0.15	-0.48	0.27	1.00											
ALN	0.36	0.14	0.34	-0.28	0.28	-0.04	0.39	0.42	-0.53	0.12	0.32	1.00										
ALC	-0.10	-0.51	-0.16	-0.25	-0.15	-0.22	0.92	0.65	-0.42	-0.53	0.17	0.31	1.00									
UREID	-0.07	-0.49	-0.13	-0.26	-0.12	-0.22	0.93	0.67	-0.45	-0.50	0.19	0.38	1.00	1.00								
GG	-0.08	-0.47	-0.13	-0.25	-0.07	-0.09	0.94	0.69	-0.39	-0.41	0.22	0.48	0.93	0.95	1.00							
GS	0.05	-0.37	-0.01	-0.32	0.01	-0.14	0.94	0.76	-0.43	-0.41	0.12	0.44	0.94	0.95	0.91	1.00						
XDH	-0.12	-0.56	-0.19	-0.24	-0.17	-0.25	0.88	0.61	-0.36	-0.36	0.14	0.44	0.91	0.92	0.93	0.91	1.00					
URIC	-0.35	-0.60	-0.40	0.08	-0.35	-0.21	0.58	0.32	-0.06	-0.11	-0.05	0.20	0.73	0.72	0.69	0.71	0.83	1.00				
GDH	-0.23	-0.13	-0.23	0.28	-0.24	-0.18	0.34	0.13	-0.15	0.35	0.61	0.23	0.29	0.30	0.44	0.25	0.35	0.38	1.00			
AAT	-0.12	-0.38	-0.17	-0.08	-0.14	-0.16	0.89	0.62	-0.35	-0.22	0.31	0.46	0.87	0.88	0.93	0.87	0.90	0.75	0.53	1.00		
PRT	0.46	-0.09	0.41	-0.70	0.54	0.36	0.68	0.84	-0.03	-0.20	-0.19	0.25	0.58	0.59	0.63	0.66	0.60	0.46	0.05	0.58	1.00	

P≤	Valor crítico		
	0.05	0.01	0.001
	0.50	0.62	0.74

En hojas, la respuesta a la sal del contenido de aminoácidos fue diferente que en nódulos y raíz. Mientras que a los 6 días de tratamiento salino se acumularon los aminoácidos con todas las dosis aplicadas, disminuyeron a los 9 y 12 días con el NaCl. La única correlación que se encontró fue con la actividad GDH en nódulos, actividad que no se había correlacionado con ningún parámetro hasta ahora.

El contenido de proteínas solubles en nódulos (tabla A 5.5) presentó el máximo al inicio de floración para todos los tratamientos, al igual que los aminoácidos de nódulos. El estrés salino disminuyó claramente el contenido de proteínas en proporción con el aumento de la concentración de NaCl. Las correlaciones positivas obtenidas fueron con ARA, ARAP, ureidos en nódulos y las enzimas estudiadas, a excepción de la GDH y la uricasa (tabla 5.1).

5.2. Estudio de la simbiosis *Phaseolus vulgaris* var. Coco-*Rhizobium tropici* CIAT899.

El mismo tipo de experimento realizado con *Phaseolus vulgaris* var. Africa, fue llevado a cabo con la variedad Coco, considerada como sensible a la sal. Este tipo de experimento se planificó con objeto de realizar estudios comparativos entre variedades sensibles y tolerantes a la sal estudiando el efecto que ejerce el NaCl en los procesos metabólicos relacionados con la fijación de nitrógeno y la asimilación de amonio en *Phaseolus vulgaris*.

5.2.1. Análisis del crecimiento.

El crecimiento expresado como peso seco de parte aérea, raíz, planta completa y relación raíz/parte aérea de esta variedad en función de las recogidas realizadas y los tratamientos salinos, se exponen en la tabla A 5.13 del apéndice y en la figura 5.5.

En la primera recogida, la sal no modificó el crecimiento de la parte aérea. A partir de la segunda recogida, en crecimiento vegetativo, el peso seco de parte aérea se vio más afectado que la raíz por los tratamientos salinos, sobre todo con 50 mM puesto que descendió un 34% respecto a las plantas control. Por el contrario, el crecimiento de la raíz no disminuyó significativamente con la sal, incluso se incrementó con 10 mM en el último muestreo. El desarrollo radical se mantiene en niveles semejantes al obtenido por el control presentando variaciones poco significativas ($P \leq 0.05$). Al estudiar el peso

seco de planta completa se observa que las dosis de 10 y 25 mM no alteran significativamente el crecimiento de la planta, al igual que el PSPA, ya que la parte aérea constituye cerca del 70% del peso total de la planta.

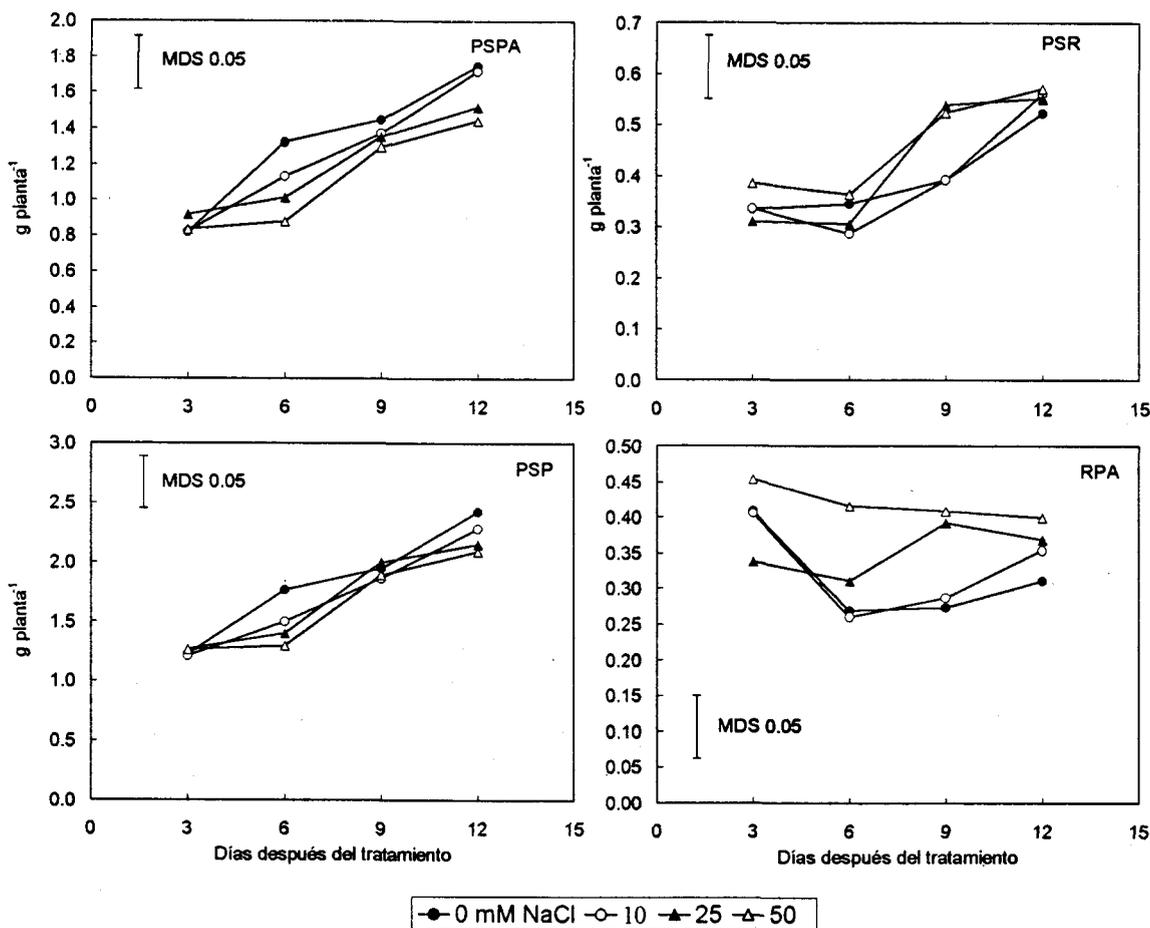


Figura 5.5. Peso seco de parte aérea (PSPA), raíz (PSR) y planta completa (PSP), expresado en g planta⁻¹, relación raíz/parte aérea (RPA), en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con la cepa CIAT899 de *Rhizobium tropici*, con cuatro dosis de NaCl aplicadas en el periodo vegetativo.

La relación raíz/parte aérea (figura 5.5) presentó incrementos importantes con el estrés salino, en especial con 50 mM de NaCl, donde aumentó 50-55% respecto al control. A lo largo del desarrollo del cultivo, se observa que las plantas crecidas con 50 mM de sal presentaron un RPA estable en el tiempo, mientras que en las plantas control, disminuyó con el desarrollo del cultivo. La relación raíz/parte aérea se correlacionó negativamente con el PSPA y PSN, tal como se observa en la tabla 5.2.

5.2.2. Fijación de nitrógeno

El proceso de fijación de nitrógeno está representado por diferentes parámetros: peso seco de nódulos, peso normalizado de nódulos, actividad reductora de acetileno específica y total por planta, que se exponen en la figura 5.6, elaborada con los datos numéricos de la tabla A 5.14 del apéndice.

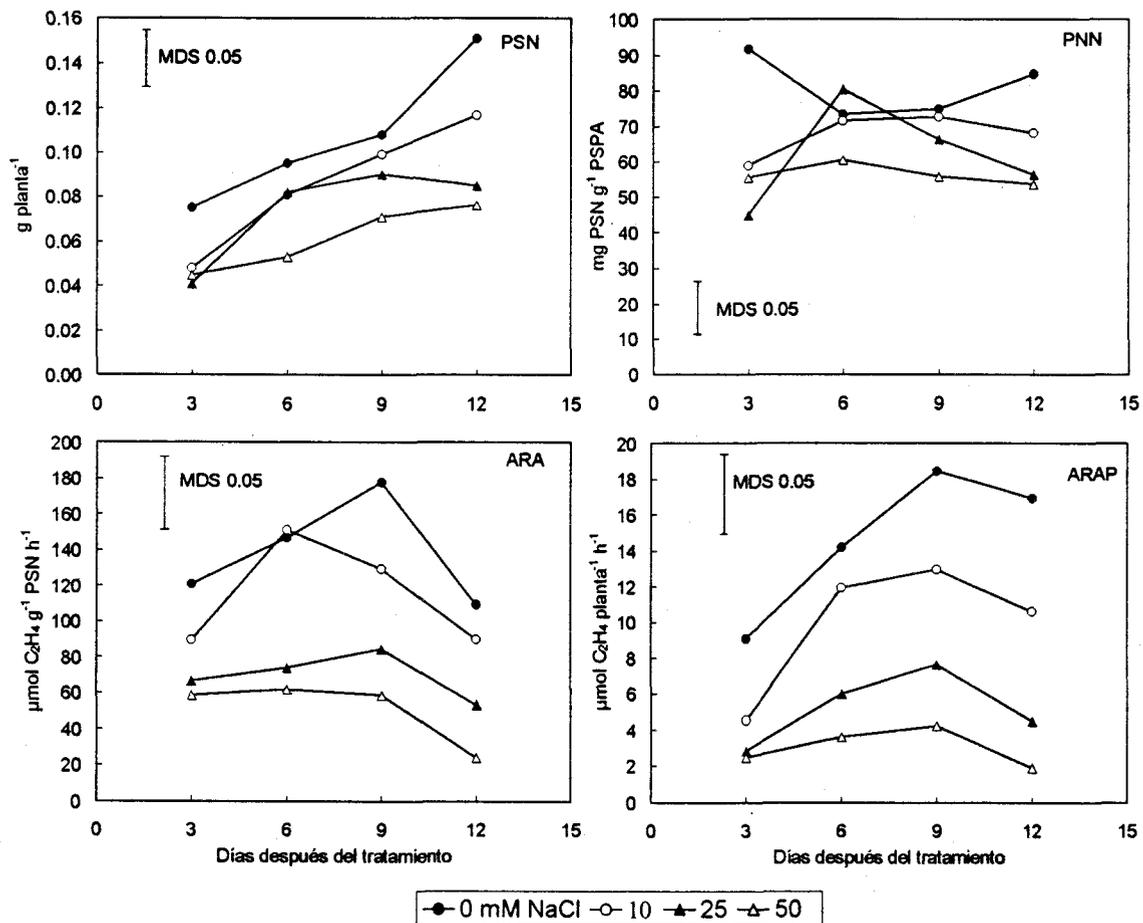


Figura 5.6. Peso seco de nódulos (PSN) en g planta^{-1} , peso normalizado de nódulos (PNN) en mg PSN g^{-1} PSPA, actividad reductora de acetileno (ARA) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{g}^{-1} \text{PS h}^{-1}$ y actividad reductora de acetileno por planta (ARAP) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{g}^{-1} \text{PS h}^{-1}$ en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con la cepa CIAT899 de *Rhizobium tropici*, con cuatro dosis de NaCl aplicadas en el periodo vegetativo.

El peso seco de nódulos disminuyó desde la primera recogida con todas las dosis de cloruro sódico, llegando a inhibirse hasta un 60% con 50 mM a los 12 días de adicionar la sal. Este parámetro aumentó a lo largo del desarrollo del cultivo un 100%

en las plantas control y un 68% en las tratadas con 50 mM de NaCl. Las variaciones obtenidas no son significativas estadísticamente al menos en las recogidas realizadas durante el crecimiento vegetativo (primera y segunda recogida) y al inicio de floración (tercera). Sin embargo, en la última se indican caídas que representan el 55% en las tres dosis de sal ensayadas (10, 25 y 50 mM). Este parámetro se correlaciona positiva y significativamente ($P \leq 0.001$) con todos los parámetros de crecimiento excepto con RPA que presentó correlación negativa. El peso normalizado de nódulos disminuyó con la sal, a excepción de la segunda recogida, en la que se obtuvo el valor más alto con 25 mM NaCl.

La actividad reductora de acetileno (ARA), registró un máximo a los 27 días de cultivo en las plantas control, coincidiendo con el inicio de floración (figura 5.6). Con 10 mM, este pico se atenúa y se adelanta tres días, mientras que con 25 y 50 mM, esta actividad permanece prácticamente estable hasta decaer en floración. La sal inhibió el ARA desde los tres días de tratamiento salino con todas las dosis aplicadas, descendiendo entre 50-80% con 25 y 50 mM NaCl respectivamente. El ARA total por planta (ARAP) mostró un perfil muy parecido al de ARA específica, disminuyendo hasta 90% a los 12 días de tratamiento con 50 mM de cloruro de sodio. Se encontraron correlaciones positivas y significativas entre el crecimiento de la planta, ARAP y PSN (tabla 5.2).

5.2.3. Actividades enzimáticas.

Se determinaron diversas actividades enzimáticas del metabolismo nitrogenado en el citosol nodular. Glutamina sintetasa, glutamato sintasa, glutamato deshidrogenasa y aspartato aminotransferasa, así como las enzimas del catabolismo de purinas: xantina deshidrogenasa y uricasa. Todas ellas se representan gráficamente en la figura 5.7. En el apéndice se dispone de las tablas que reflejan los valores de las actividades enzimáticas expresadas en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ (tabla A 5.17) y en $\text{nmol mg}^{-1} \text{proteína min}^{-1}$ (tabla A 5.18), así como el estudio estadístico habitual.

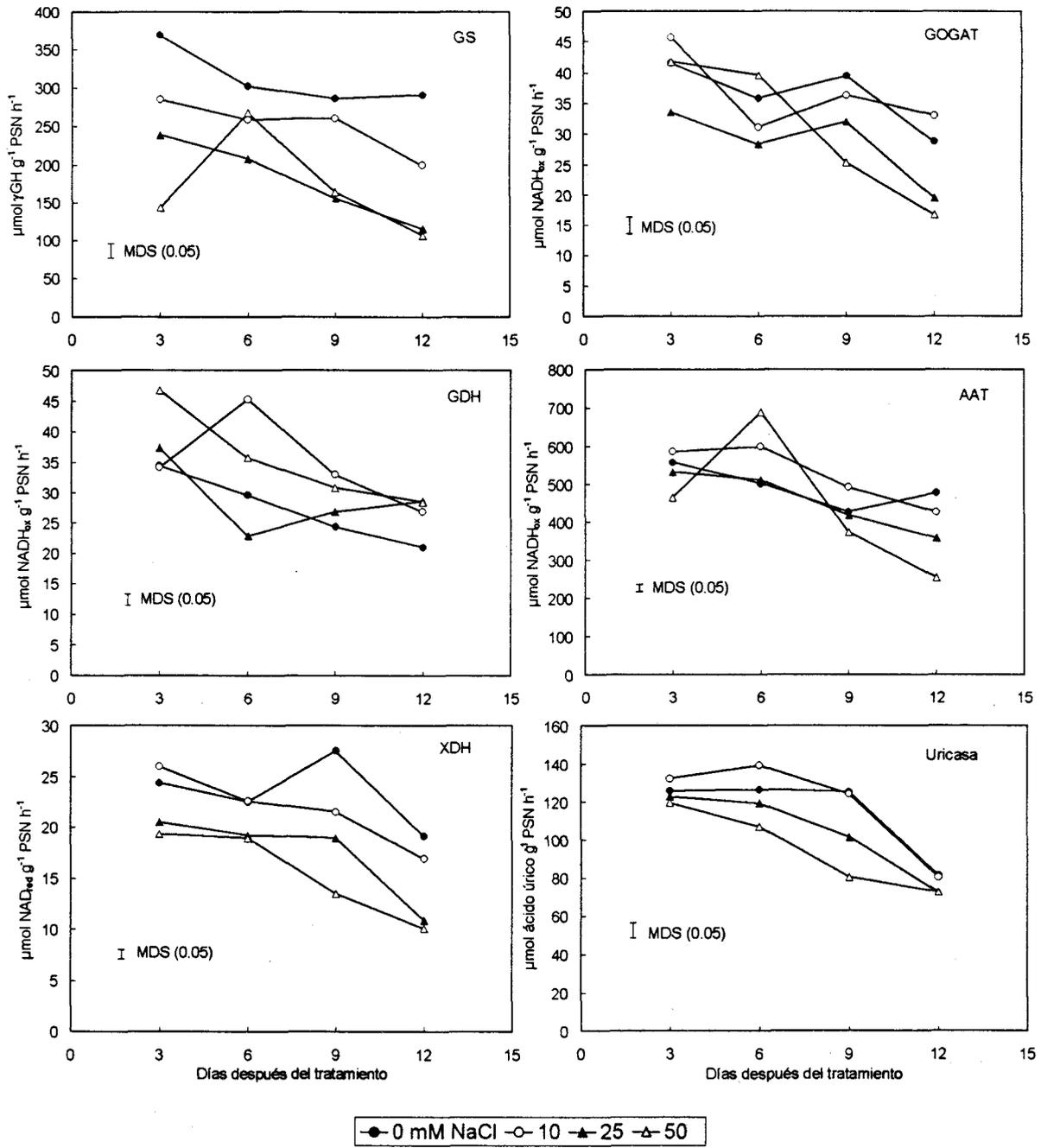


Figura 5.7. Actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT), glutamato deshidrogenasa (GDH), aspartato aminotransferasa (AAT), xantina deshidrogenasa (XDH) y uricasa (UR); expresadas en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ y contenido de proteína soluble (PRT) expresado en $\text{mg g}^{-1} \text{PF}$ nódulos de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con la cepa CIAT899 de *Rhizobium tropici*, con cuatro dosis de NaCl aplicadas en el periodo vegetativo.

La actividad glutamina sintetasa presentó una tendencia a disminuir con el desarrollo del cultivo en las plantas control y en las tratadas con 10 y 25 mM NaCl. Con 50 mM NaCl se observa un pico a los 24 días de cultivo (6 DdT), que hace que esta actividad sea superior en esta recogida, a la registrada con 10 y 25 mM NaCl. El cloruro sódico causó una disminución importante de la actividad sintetasa desde el inicio del tratamiento salino, inhibiéndose entre 40-60% con 25 y 50 mM NaCl en la tercera y cuarta recogida. La fuente de variación que influyó en mayor medida en la variabilidad observada fue el tiempo de cultivo (65%).

La glutamato sintasa presentó valores de actividad 8 veces menor que la GS (figura 5.7). Se vio afectada por la sal en menor proporción que la GS, disminuyendo entre 35-40% con 50 mM en los últimos muestreos. Al igual que la GS, 50 mM de NaCl estimuló esta actividad a los 24 días de cultivo, superando el valor registrado en las plantas control. Estas dos enzimas se correlacionaron positivamente entre sí y negativamente con el crecimiento de la planta (tabla 5.2).

El estudio de la glutamato deshidrogenasa también exhibió una evolución a lo largo del tiempo semejante a las ya comentadas (figura 5.7), con la excepción de la dosis 10 mM NaCl, donde la actividad mostró un máximo a los 24 días de cultivo, (6 DdT). Sin embargo, la concentración de NaCl incrementó la actividad glutamato deshidrogenasa de forma significativa, contrariamente a las dos enzimas precedentes. Con 50 mM NaCl, el incremento fue entre 25-35% respecto al control en todas la recogidas. Con 10 y 25 mM NaCl el aumento se estableció entre 10%-25% dependiendo del día de cultivo, llegando a alcanzar esta actividad el sexto día de tratamiento con 10 mM NaCl un 33% más respecto a las plantas control. Esta enzima se correlacionó negativamente con el crecimiento y además con el PSN ($P \leq 0.01$; tabla 5.2).

Al igual que la GDH, la actividad aspartato aminotransferasa disminuyó en el tiempo, a excepción de las plantas tratadas con 50 mM de NaCl, mostrando un máximo de actividad a los 6 días de tratamiento salino. A los 3, 6 y 9 días después del tratamiento salino, 10 mM de NaCl estimuló la AAT entre 5-20% mientras que 25 mM mantuvo casi la misma actividad que las plantas control. Se puede decir que la sal no afectó significativamente la AAT, a excepción de la última recogida, donde todas las dosis de cloruro sódico inhibieron esta actividad. Los análisis de varianza indican que la fuente de variación que más influyó en la variabilidad observada fue el tiempo del

cultivo (65%). La AAT se correlacionó positiva y significativamente con la GS y la GOGAT ($P \leq 0.01$), y negativamente con el crecimiento (tabla 5.2).

En cuanto a las enzimas del catabolismo de purinas, la xantina deshidrogenasa intensificó su actividad en las plantas control al inicio de floración, no observándose este pico en las tratadas con sal (figura 5.4). A los 3 días de tratamiento salino se aprecia una leve estimulación de esta actividad con 10 mM de cloruro sódico, mientras que en el resto de los muestreos la disminución fue significativa con todas las dosis aplicadas. A su vez, la uricasa mostró una estimulación en las dos primeras recogidas con la dosis más baja de cloruro de sodio, manteniéndose como las plantas control en las dos últimas. 25 y 50 mM disminuyeron esta actividad a los 6, 9 y 12 días de tratamiento pero en menor proporción que la XDH. De nuevo se pone de manifiesto que, a pesar del tratamiento, el tiempo de cultivo continua siendo la fuente de variación que más contribuye a la variabilidad observada (75%).

Cuando expresamos las actividades enzimáticas en $\text{nmol mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$ (tabla A 5.18) se observaron algunas diferencias en las tendencias registradas frente al estrés salino. Se apreció una importante estimulación por la sal de algunas actividades como fue el caso de la GDH y la AAT en las 3 últimas recogidas. En el caso de la reducción de la actividad por la sal, los porcentajes de inhibición fueron inferiores a los observados en la expresión de $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ PF h}^{-1}$ (tabla A 5.17).

Estas dos enzimas se correlacionaron positivamente con las enzimas de la asimilación de amonio, tal como se muestra en la tabla 5.2. También se apreció una correlación altamente positiva y significativa con la actividad nitrogenasa ($P \leq 0.01$), dato que no se observó con las demás actividades enzimáticas estudiadas.

5.2.4. Contenido de metabolitos.

Se determinó el contenido de alantoína y ácido alantoico en nódulos así como el de ureidos totales (suma de ALN y ALC), contenido de aminoácidos libres en nódulos, raíces y hojas, y por último, el contenido de proteína soluble en nódulos. Estos datos se muestran en la figura 5.8. Así mismo, se muestran en las tablas A 5.20 y A 5.22. del apéndice los datos numéricos de las figuras citadas.

El contenido de alantoína (tabla A 5.20) presentó un máximo a los 24 días de cultivo en las plantas control, mientras que en las tratadas con sal, el contenido de

alantoína disminuyó con el tiempo. El estrés salino no tuvo efecto significativo sobre la alantoína, a excepción de la segunda recogida donde todas las dosis de cloruro sódico inhibieron este valor hasta 60% menos que las plantas control. Cuantitativamente la alantoína representa un 25% del contenido de ureidos en la primera recogida (3 DdT) con todos los tratamientos. Esta proporción, que se mantiene constante en el control, en la segunda recogida (6 DdT) disminuye con el NaCl, representando entre 10-20% del contenido de ureidos, y disminuye mucho más en las siguientes recogidas.

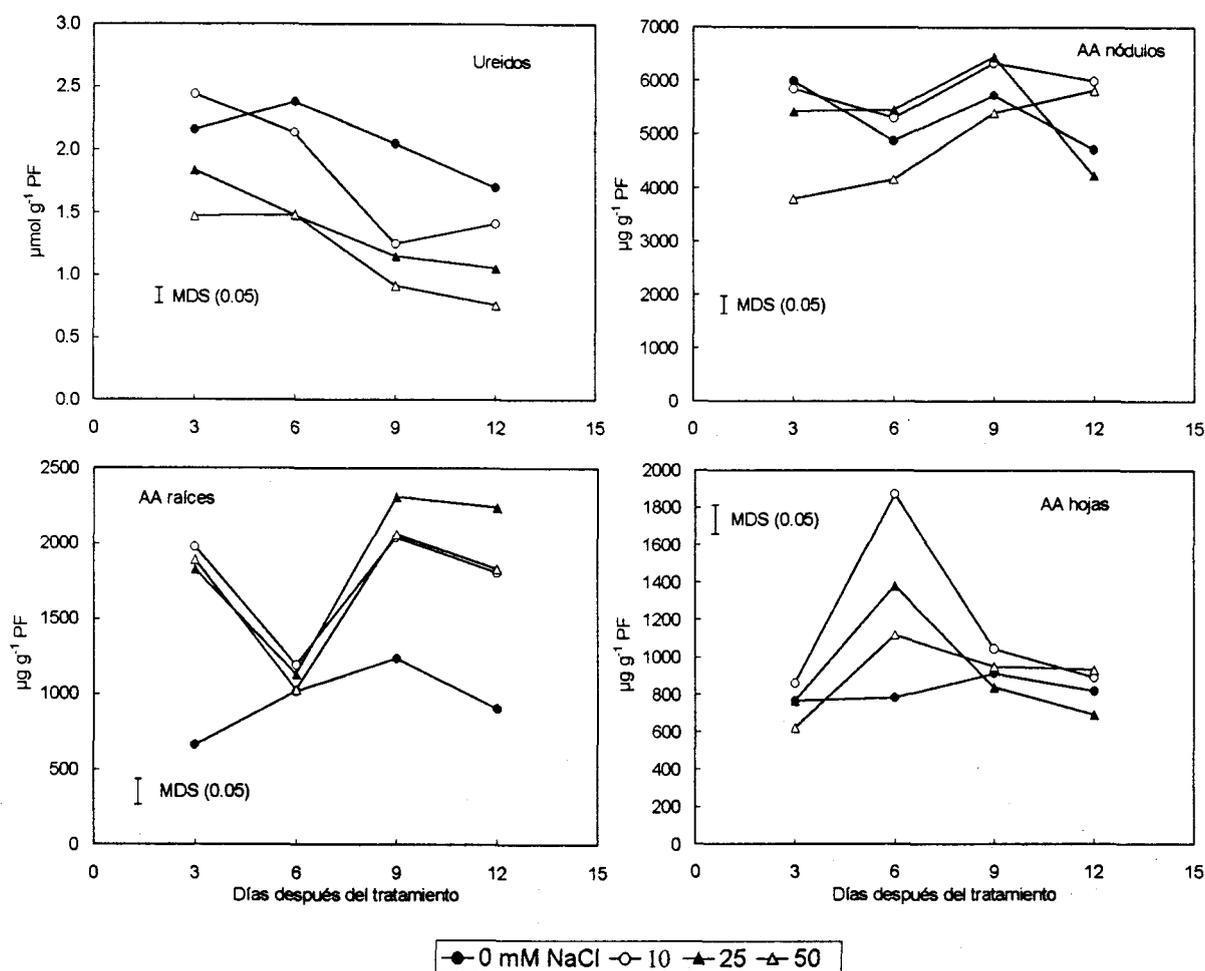


Figura 5.8. Contenido de ureidos en nódulos en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF y de aminoácidos en nódulos, raíces y hojas expresado $\mu\text{g g}^{-1}$ PF en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con la cepa CIAT899 de *Rhizobium tropici*, con cuatro dosis de NaCl aplicadas en el periodo vegetativo.

El contenido de ácido alantoico, que presentó valores 4 veces superiores a los de la alantoína en la primera recogida, mostró un máximo a los 24 días de cultivo en las plantas control pero menos acentuado que el registrado para la alantoína. El estrés salino

afectó significativamente el contenido de ácido alantoico, provocando caídas de hasta el 60% con 50 mM NaCl. Por lo tanto la evolución y respuesta a la sal de los ureidos totales (figura 5.8) siguió el mismo perfil que el ácido alantoico, ya que este último fue el componente mayoritario del contenido de ureidos. Mientras que el contenido de alantoína sólo se correlacionó positiva y significativamente con la actividad uricasa, el de alantoico lo hizo con el PNN, ARA y todas las enzimas estudiadas a excepción de la GDH (tabla 5.2). Se encontró una correlación negativa y significativa entre el contenido de estos compuestos y el PSR, tal como se detalla en la tabla 5.2.

En la figura 5.8 también se expone el contenido de aminoácidos en nódulos aumentó ligeramente con 10 y 25 mM de NaCl a los 6 y 9 días de adicionar la sal, mientras que en la última recogida se incrementó con 10 y 50 mM NaCl. En raíces, el contenido de aminoácidos fue entre tres y cinco veces menor que en nódulos, y el efecto del estrés salino se hizo evidente ya desde el tercer día de tratamiento salino, aumentando hasta 200% respecto a las plantas control. En la segunda recogida a los 6 días de tratamiento, el incremento fue moderado ya que no superó el 20% con la sal, pero se recuperó en las dos últimas recogidas, registrándose incrementos con la sal de hasta 150% respecto al control. En hojas, los niveles de aminoácidos fueron algo inferiores a los de raíces, a excepción de los valores obtenidos con los tratamientos salinos en la segunda recogida (figura 5.8), si bien la diferencia no fue tan grande como con nódulos. Mientras que en la primera recogida no hubo diferencia significativa entre los distintos tratamientos, a los 6 días de tratamiento salino el contenido de aminoácidos se incrementó en 140, 76 y 43% con 10, 25 y 50 mM de NaCl respectivamente. A los 9 y 12 días de adicionar la sal, la tendencia volvió a ser como en la de la primera recogida.

En general, el estrés salino provocó una acumulación de éstos compuestos más o menos importante dependiendo del órgano analizado. El contenido de aminoácidos en raíces se correlacionó positivamente con el PSR y negativamente con el PNN, GS, AAT y el contenido de ureidos en nódulos (tabla 5.2).

Por último, el contenido de proteína soluble en nódulos (tabla A 5.17) disminuyó en el tiempo y con todos los tratamientos. A los 3 días de adicionar la sal, 50 mM NaCl fue la única dosis que inhibió este contenido, mientras que en el resto de las recogidas, todos los tratamientos salinos disminuyeron de forma significativa el contenido de proteína soluble nodular. Se encontraron correlaciones negativas con el crecimiento,

positivas con el contenido de ureidos en nódulos y las enzimas estudiadas a excepción de la GDH (tabla 5.2).

5.3. Comparación de las dos simbiosis.

Las dosis de cloruro sódico aplicadas a la variedad Africa de *Phaseolus vulgaris* fueron 0, 25, 50 y 100 mM NaCl, mientras que para la variedad Coco, se utilizaron las concentraciones 0, 10, 25 y 50 mM NaCl. No obstante, tuvimos tres concentraciones en común que fueron 0, 25 y 50 mM de cloruro de sodio, con las cuales se pudo establecer una comparación bastante amplia.

Tabla 5.3. Tasa de crecimiento relativo (TCR) en mg PS g⁻¹ PS día⁻¹, de las dos variedades de *Phaseolus vulgaris* estudiadas, Africa y Coco, inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, con la sal aplicada en el periodo vegetativo.

Intervalo de días	NaCl (mM)	Africa	Coco
18-24	0	62.7	75.2
	25	40.0	36.8
	50	56.4	24.0
24-30	0	67.4	53.2
	25	68.7	71.9
	50	30.5	79.6

El peso seco de la variedad Coco en condiciones control fue un 30% inferior a la variedad Africa, siendo significativa la diferencia de crecimiento entre ambas variedades. Sin embargo, en el análisis de varianza del PSP (tabla A 5.24) podemos ver que no es significativo el efecto de la interacción variedad x estrés salino, es decir, el efecto inhibitor del crecimiento producido por el estrés salino fue de proporciones similares en las dos variedades, si bien el efecto es distinto según el periodo de crecimiento que se considere. Igual que en el experimento anterior, en el periodo vegetativo (18-24 días) las plantas de Coco tuvieron una tasa de crecimiento relativo más alta que en Africa en ausencia de sal, pero en condiciones de salinidad la disminución de TCR fue mayor en Coco (tabla 5.3). En cambio, en el periodo reproductor (24-30 días) la TCR en condiciones control fue menor en Coco que en Africa, pero la sal hizo aumentar el valor de TCR en Coco, y en Africa se mantuvo con

25 mM y sólo disminuyó con 50 mM NaCl. Además, en el periodo reproductor, el efecto de la sal sobre la TCR fue mucho menor en las dos variedades que cuando se aplicó la sal desde el inicio del cultivo (experimento 4). Se observa que la relación raíz/parte aérea aumentó en respuesta a la sal en las dos variedades, pero con intensidad distinta ya que 25 mM en Africa no afectó este parámetro mientras que en Coco esta misma dosis aumentó el RPA de forma significativa. También destaca el efecto de 100 mM para Africa, siendo los porcentajes de incremento de RPA muy similares a los observados con 50 mM NaCl en Coco.

El peso seco de nódulos aumentó en las plantas control de Africa casi tres veces en 12 días mientras que se incrementó dos veces en Coco en el mismo periodo de tiempo. Esta diferencia de nodulación, de aproximadamente un 30% inferior en Coco respecto a Africa, coincide con la diferencia de crecimiento entre ambas variedades ya comentadas. El efecto de la sal sobre la nodulación también fue distinta en las dos variedades. En ambas se produce un descenso del PSN con la sal, que en Coco con 50 mM NaCl fue del 34 al 50% respecto al control, mientras que en Africa fue del 18 al 27% con la misma dosis de sal. El peso normalizado de nódulos, que relaciona el peso seco de nódulos y parte aérea, fue superior en Coco en la primera, segunda y cuarta recogida pero disminuyó con el NaCl en mayor proporción que en Africa, que apenas mostró efectos significativos de la sal sobre este parámetro.

La actividad reductora de acetileno, en las plantas control de la variedad Coco mostró valores entre el 35 y 70% superiores que en Africa, pero 25 mM en Coco inhibió esta actividad en todos los muestreos alrededor del 50% respecto al control. Sin embargo, en Africa, estas disminuciones con 25 mM no superaron el 26% y sólo en las dos últimas recogidas. Los efectos de 50 mM de NaCl sobre el ARA de Coco fueron semejantes a los de 100 mM en la variedad Africa.

Analógamente, la actividad reductora de acetileno por planta (ARAP) se inhibió menos con 25 mM NaCl en Africa que en Coco, siendo semejantes los efectos de las dosis más altas en ambas variedades. El análisis de la varianza (tabla A 5.24) indica que el efecto de la interacción variedad x sal es significativo tanto en ARA como en ARAP.

En general, los valores de actividad glutamina sintetasa fueron superiores en Africa que en Coco tanto en condiciones control (excepto el día 3 de tratamiento) como con sal. El efecto inhibitor del estrés salino sobre esta actividad enzimática se manifestó

desde la primera recogida en Coco, mientras que en Africa no fue significativa hasta la segunda. Además, los porcentajes de inhibición de la actividad respecto al control, fueron mayores en Coco que en Africa. Así, con 25 mM NaCl, la inhibición de la GS en Coco osciló entre el 35 y 60% mientras que en Africa osciló entre el 18 y 21%.

La actividad glutamato sintasa también fue superior en Africa que en Coco en todas las condiciones ensayadas, y el efecto inhibitor de la sal, al igual que se ha comentado para la GS, fue más intenso en Coco. En Africa, las enzimas del ciclo GS/GOGAT se correlacionaron positivamente con el ARA (0.94; $P \leq 0.001$), mientras que no se encontró correlación alguna entre estos parámetros en la variedad Coco.

Los valores de actividad glutamato deshidrogenasa se encuentran en rangos muy parecidos en ambas variedades, entre los 23 y 45 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$. Esta actividad en Africa no presentó grandes variaciones con el estrés salino mientras que en Coco se incrementó de forma significativa en presencia de NaCl. La aspartato aminotransferasa mostró valores aproximadamente entre 250 y 700 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$. Esta actividad fue algo superior en Africa que en Coco, y en ambas se observa un efecto inhibitor de la sal, si bien en Coco, 10 mM NaCl produjo incrementos en las tres primeras recogidas.

El estudio comparativo también se ha llevado a cabo con la actividad xantina deshidrogenasa, que mostró valores muy parecidos en las dos variedades. El efecto inhibitor de la sal sobre dicha actividad se manifestó con más intensidad en la variedad Coco. La actividad uricasa en Africa fue entre 47 y 81% superior a Coco en condiciones control. Con los tratamientos salinos también se obtuvieron actividades más altas en Africa e incluso se observaron incrementos del 10 al 20% con 25 y 50 mM NaCl en las dos primeras recogidas, e inhibiciones en la tercera y cuarta. En cambio en Coco, con las mismas dosis de sal, esta actividad se vio inhibida en todos los muestreos.

El contenido de ureidos en las plantas control de las dos variedades fue máximo en la segunda recogida. Los datos obtenidos en Africa fueron aproximadamente el doble que los de Coco, tanto en condiciones control como con los tratamientos salinos. La disminución de la acumulación de ureidos fue mayor en Coco. En las dos variedades se observa que el porcentaje de disminución del contenido de ureidos con cada tratamiento salino aumenta con el tiempo.

La acumulación de aminoácidos en nódulos en respuesta al estrés salino se acentuó evidente en Africa que en Coco. De hecho, en Africa todas las dosis de NaCl

aplicadas indujeron un incremento de este contenido desde los 3 días de tratamiento, mientras que en Coco, se acumularon los aminoácidos sólo en algunos muestreos y no con todas las dosis de sal. En cuanto al contenido de aminoácidos en raíces en condiciones de salinidad, fue parecido en las dos variedades, con la diferencia que a los 12 días de tratamiento disminuyó este parámetro con la sal en Africa mientras siguió superior al control en Coco. El contenido de aminoácidos en hojas aumentó con la sal a los 6 días de tratamiento para las dos variedades. A los 9 y 12 días de tratamiento, este contenido en Africa descendió con la sal de forma significativa mientras que en Coco no se afectó por el estrés salino.

El contenido de proteínas solubles en nódulos mostró un comportamiento distinto con el desarrollo del cultivo. En Africa se detectó un pico a los 27 días de cultivo (inicio floración) con todos los tratamientos, mientras que en Coco las proteínas disminuyeron en el tiempo. La disminución del contenido de proteínas por la sal fue más acentuada en Coco en alguna de las recogidas.

Tabla 5.2. Matriz de coeficientes de correlación simple entre variables relacionadas con crecimiento, la fijación de nitrógeno, las enzimas del metabolismo del amonio y del catabolismo de purinas, contenido en ureidos, aminoácidos en plantas de *Phaseolus vulgaris* var.Coco, inoculadas con Ciat 899 de *R. tropici*, con cuatro dosis de NaCl aplicadas en el periodo vegetativo. Variables: PSPA, peso seco parte aérea; PSR, peso seco de raíz; PSP, peso seco de planta; RPA, relación raíz/parte aérea; PNN, peso normalizado de nódulos; ARA, actividad reductora de acetileno; ARAP, ARA por planta; GG, glutamato sintasa; GS, glutamina sintetasa; XDH, xantina deshidrogenasa; URIC, uricasa; PRT, proteína soluble en el citosol nodular; ALN, alantoina en nódulos; ALC, ácido alantoico en nódulos; UREID, ureidos en nódulos; AAn, aminoácidos en en nódulos; AAr, aminoácidos en raíz; AAh, aminoácidos en hojas.

	PSPA	PSR	PSP	RPA	PSN	PNN	ARA	ARAP	AAT	GS	GG	GDH	XDH	URIC	AAn	AAr	AAh	ALN	ALC	UREID	PRT	
PSPA	1,00																					
PSR	0,79	1,00																				
PSP	0,99	0,86	1,00																			
RPA	-0,53	0,07	-0,42	1,00																		
PSN	0,85	0,53	0,82	-0,55	1,00																	
PNN	-0,16	-0,33	-0,18	-0,03	0,36	1,00																
ARA	0,22	-0,33	0,12	-0,76	0,45	0,36	1,00															
ARAP	0,60	0,08	0,52	-0,78	0,81	0,38	0,87	1,00														
AAT	-0,65	-0,79	-0,71	0,03	-0,37	0,33	0,26	-0,02	1,00													
GS	-0,57	-0,69	-0,61	0,12	-0,13	0,74	0,33	0,12	0,66	1,00												
GG	-0,55	-0,65	-0,60	0,08	-0,33	0,20	0,41	0,11	0,71	0,56	1,00											
GDH	-0,63	-0,52	-0,65	0,30	-0,70	-0,22	-0,08	-0,42	0,46	0,16	0,40	1,00										
XDH	-0,38	-0,72	-0,46	-0,31	-0,08	0,38	0,73	0,44	0,65	0,63	0,85	0,19	1,00									
URIC	-0,57	-0,87	-0,65	-0,29	-0,37	0,19	0,57	0,17	0,68	0,47	0,74	0,50	0,86	1,00								
AAn	0,08	0,01	0,06	-0,18	0,14	0,18	0,24	0,17	-0,14	0,17	0,04	-0,29	0,24	0,13	1,00							
AAr	0,45	0,62	0,48	-0,00	0,01	-0,74	-0,27	-0,15	-0,57	-0,83	-0,32	-0,05	-0,44	-0,32	0,10	1,00						
AAh	0,10	-0,20	0,04	-0,50	0,13	0,04	0,32	0,24	0,24	-0,15	-0,16	0,12	0,09	0,29	0,10	-0,04	1,00					
ALN	-0,28	-0,42	-0,33	-0,19	-0,43	-0,44	0,14	-0,11	0,27	-0,06	0,45	0,35	0,37	0,53	-0,16	0,13	-0,07	1,00				
ALC	-0,45	-0,70	-0,51	-0,10	-0,06	0,63	0,55	0,30	0,64	0,87	0,60	0,18	0,77	0,62	0,07	-0,74	-0,02	0,15	1,00			
UREID	-0,52	-0,78	-0,59	-0,11	-0,19	0,48	0,53	0,23	0,69	0,81	0,69	0,28	0,83	0,72	0,04	-0,66	-0,03	0,37	0,97	1,00		
PRT	-0,74	-0,89	-0,79	0,05	-0,52	0,21	0,21	-0,13	0,79	0,70	0,68	0,43	0,69	0,72	-0,10	-0,59	-0,07	0,57	0,77	0,87	1,00	

P≤	Valor crítico		
		0.05	0.01
	0.50	0.62	0.74

6. Aplicación de ácido abscísico exógeno en condiciones de salinidad.

En este experimento se aborda el efecto que la adición de ácido abscísico exógeno provoca en el crecimiento, fijación de nitrógeno y en el metabolismo del nitrógeno en nódulos de *Phaseolus vulgaris* en condiciones de salinidad. Para ello se ha llevado a cabo un pretratamiento con ácido abscísico (1, 10 μM) dos días antes de adicionar el cloruro de sodio, siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.6 de Material y Métodos. El experimento se ha realizado con las dos mismas variedades utilizadas en los experimentos anteriores. La recolección de las plantas tuvo lugar a los 21 y 24 días de cultivo (3 y 6 días de adicionar la sal), las dos recogidas en crecimiento vegetativo. Así mismo, los datos obtenidos proceden de la repetición del experimento al menos dos veces. Los datos numéricos de este experimento, la MDS ($P \leq 0.05$) y el análisis de la varianza se encuentran en el apéndice de esta memoria, agrupadas en un conjunto de tablas enumeradas de la A 6.1 a la A 6.24.

6.1. Estudio de la simbiosis *Phaseolus vulgaris* var. *Africa-Rhizobium tropici* CIAT899 en presencia de ABA y de NaCl.

Durante el experimento, se mantuvieron las plantas verdes y con buen aspecto puesto que el tratamiento salino no se aplicó hasta los 18 días de cultivo, y las dos recogidas tuvieron lugar en el estado vegetativo (21 y 24 días de cultivo). Sin embargo, al final del experimento las plantas tratadas con ácido abscísico fueron más pequeñas y de un verde más intenso que las que no se les aplicó la hormona.

6.1.1. Análisis del crecimiento.

Los parámetros de crecimiento evaluados, como el peso seco de planta o la relación raíz/parte aérea se exponen en la figura 6.1. Los datos numéricos se encuentran en la tabla A 6.1 del apéndice.

Independientemente del tratamiento salino, se aprecia que la presencia de ácido abscísico en el medio reduce el crecimiento de la parte aérea el 18% en la primera recogida, y se intensificó en la segunda llegando al 30%. En ausencia de la hormona, el NaCl disminuyó el PSPA entre un 8 y 10% en el primer y segundo muestreo respectivamente, disminución que no llega a ser significativa estadísticamente. Con 1 μM de ABA, el NaCl incluso parece estimular un poco el PSPA al menos en la primera

recogida, aunque el efecto tampoco es significativo, mientras que con 10 μM de ABA el efecto del cloruro sódico fue muy similar al observado sin ABA.

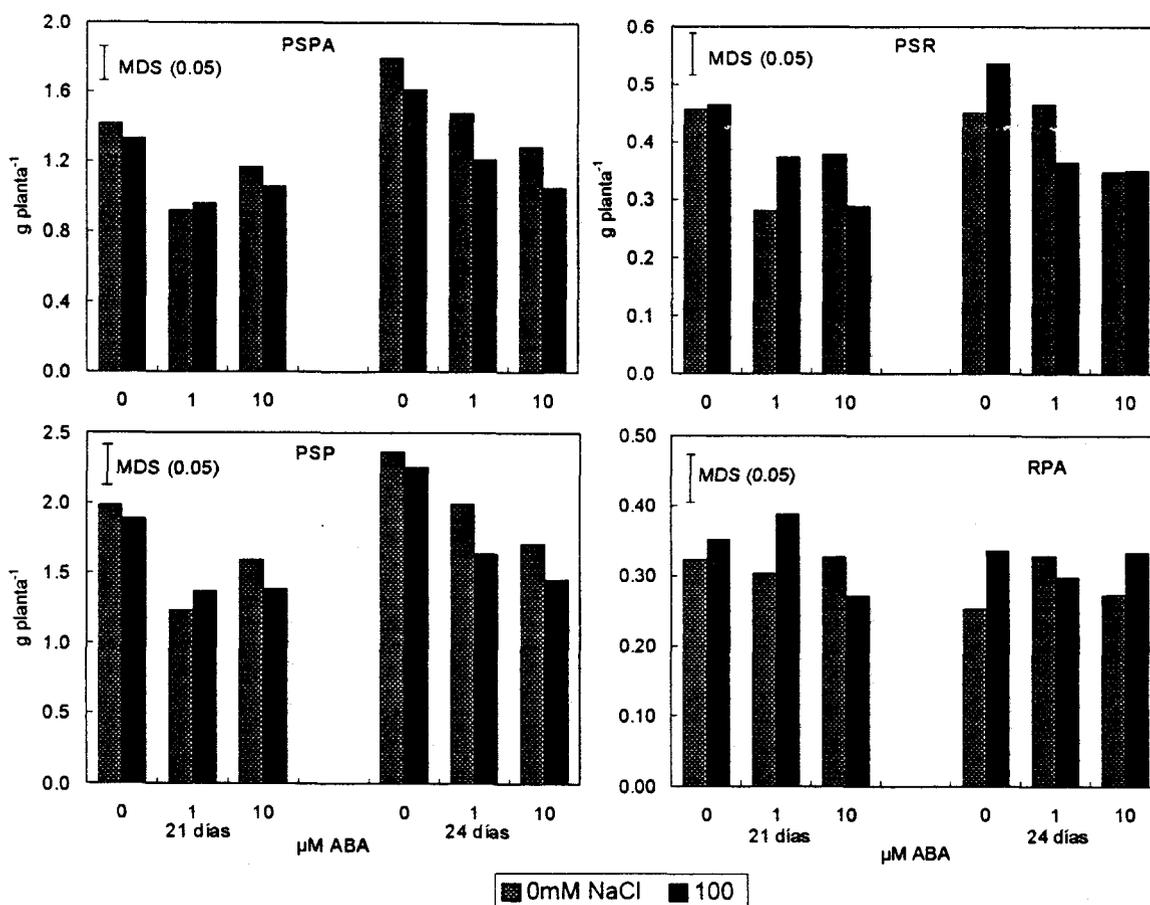


Figura 6.1. Peso seco parte aérea (PSPA), raíz (PSR), planta completa (PSP) en g planta^{-1} , relación raíz/parte aérea (RPA), en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con la cepa CIAT899 de *Rhizobium tropici*, tratadas con ABA y NaCl.

En cuanto al peso seco de raíz, en las plantas no tratadas con ácido abscísico, la sal no afectó significativamente su crecimiento, llegando incluso a incrementarse a los 24 días de cultivo con la sal. El ácido abscísico, independientemente de la dosis, provoca variaciones en el peso seco radical no significativas, y el efecto de 100 mM de sal en plantas tratadas con ABA no es drástico. De hecho, en la segunda recogida la inhibición del desarrollo radical es la misma en ambas dosis de ABA.

El peso seco de planta se comportó de forma similar al peso seco de parte aérea. En general, en todos los parámetros de crecimiento estudiados se detecta que el tratamiento de ABA fue la fuente de variación que tuvo mayor efecto sobre el

crecimiento, siendo responsable del 45% de la variabilidad observada, correspondiendo el 20% de la variabilidad al tiempo de cultivo y su interacción con el ABA (tabla A 6.3).

La relación raíz/parte aérea no se afectó significativamente por la sal a los 21 días en ausencia de ABA (figura 6.1). El tratamiento con 1 μM ABA favorece que RPA aumente significativamente en las plantas crecidas con 100 mM NaCl, mientras que 10 μM ABA la hace disminuir. A los 24 días de cultivo (6 días después del tratamiento salino) es la sal la que incrementa esta relación, mientras que el ABA la incrementa en las plantas control y apenas tiene efecto sobre RPA de las plantas con sal. Este efecto desapareció con 1 y 10 μM de ABA, ya que la sal no alteró significativamente esta relación en respuesta a la sal. Es curioso observar que el clásico aumento del RPA asumido por efecto de la sal, no se evidencia en plantas tratadas con 10 μM ABA en el primer muestreo y con 1 μM en el segundo.

Se puede decir que la adición de ácido abscísico al medio redujo el crecimiento. En cuanto al efecto del estrés salino en presencia de ABA no experimentó grandes variaciones en comparación con la no aplicación de esta hormona, debido a que en esta variedad, la sal no afectó significativamente el crecimiento, incluso en ausencia de la hormona.

6.1.2. Fijación de nitrógeno.

En la figura 6.2 y en la tabla A 6.2 se representan los parámetros de fijación de nitrógeno evaluados en este experimento.

El peso seco de nódulos experimentó una importante reducción de hasta 3 veces menos por el tratamiento con ácido abscísico, independientemente de la concentración salina aplicada. La disminución del peso seco de nódulos con 100 mM NaCl en ausencia de ABA no fue significativa. Con 1 μM de ABA en el medio, se aprecia una leve estimulación de este parámetro con la sal, mientras que con 10 mM este efecto desaparece. Este parámetro se correlacionó positiva y significativamente con los parámetros de crecimiento ($P \leq 0.001$) tal como se puede comprobar en la tabla 6.1.

También se vio reducido por la adición de ABA el peso normalizado de nódulos, independientemente del tratamiento con NaCl y del día de cultivo. El NaCl no afectó este parámetro significativamente en ninguno de los tratamientos con ácido abscísico.

La actividad nitrogenasa específica, evaluada mediante la actividad reductora de acetileno, sufrió una importante inhibición con 100 mM NaCl en ausencia de ABA, del orden del 40% a los 21 días y del 50% a los 24 días de cultivo. Sin embargo, en la primera recogida, 1 y 10 μM ABA eliminaron este efecto inhibitorio de la sal, y en la segunda sólo 1 μM ABA. Hay que destacar que la hormona no inhibió el ARA a los 21 días de tratamiento, pero a los 24 días de cultivo 1 μM de ABA redujo esta actividad en un 62%.

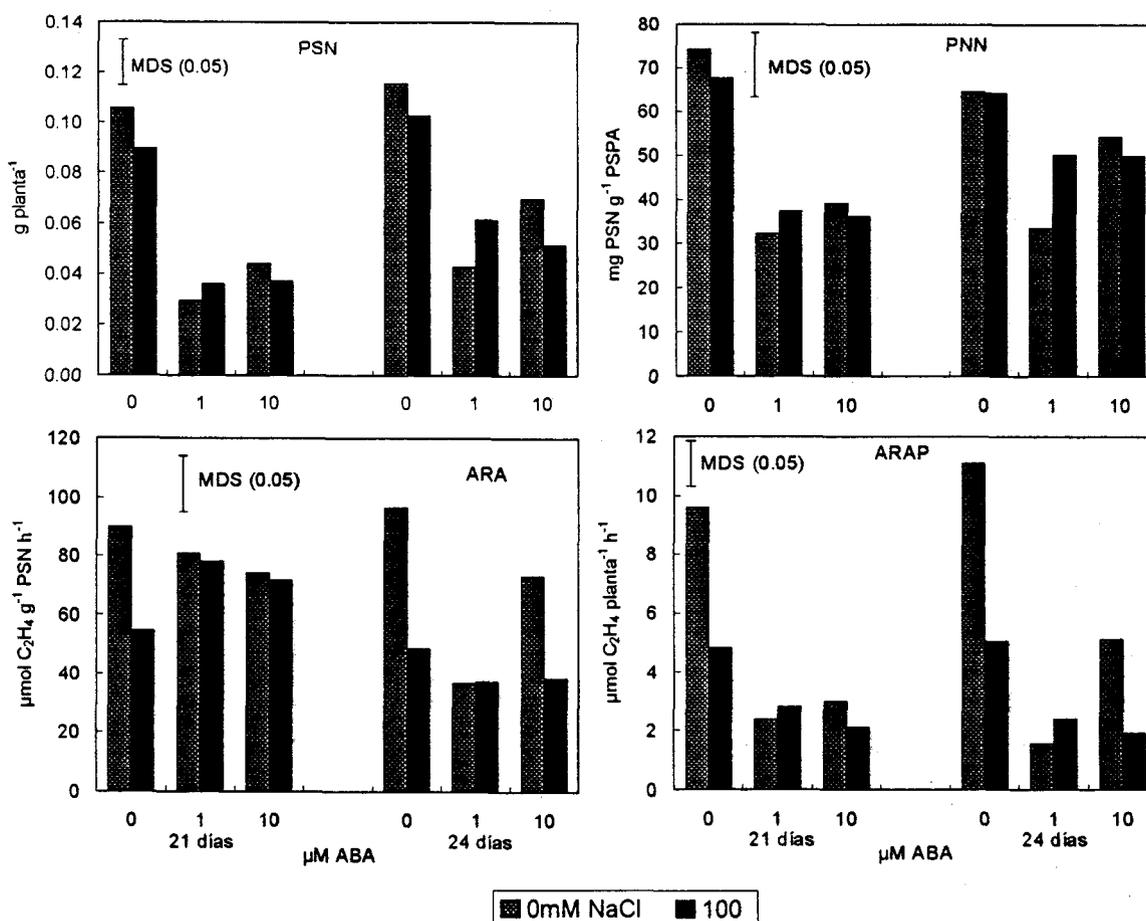


Figura 6.2. Peso seco de nódulos (PSN) en g planta^{-1} , peso normalizado de nódulos (PNN) en mg PSN g^{-1} PSPA, actividad reductora de acetileno (ARA) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ PSN h}^{-1}$ y ARA por planta (ARAP) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ planta}^{-1} \text{ h}^{-1}$, en plantas de *Phaseolus vulgaris* variedad Africa inoculadas con la cepa CIAT899 de *Rhizobium tropici*, tratadas con ABA y NaCl.

Se comprobó que la actividad ARA por planta en las plantas no tratadas con ABA, se inhibió por la sal en torno al 50%. Los tratamientos con ABA inhibieron el

ARAP en ambas recogidas a consecuencia tanto de la inhibición del PSN (primera recogida) como de la inhibición del ARA específica (segunda recogida).

En resumen, el efecto de la sal a corto plazo no es significativo sobre el crecimiento de esta variedad, siendo en cambio importante las inhibiciones del crecimiento provocadas por el ABA. La fijación de nitrógeno se inhibió por la sal y el ABA, pero el ABA tuvo un cierto efecto benéfico sobre ARA en presencia de NaCl.

6.1.3. Actividades enzimáticas.

Se determinaron las actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo del nitrógeno procedente de la fijación biológica, desde la asimilación del amonio hasta la síntesis de ureidos. Al igual que para los parámetros de crecimiento y fijación expuestos anteriormente, la adición al medio de ABA provoca una disminución de determinadas actividades enzimáticas, independientemente del tratamiento salino (figura 6.3). Los datos numéricos de estas actividades están representados en las tablas A 6.5 y A 6.6 expresados en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ y en $\text{nmol mg}^{-1} \text{proteína min}^{-1}$ respectivamente. El estudio estadístico de ambas también se recoge en el apéndice de esta memoria.

La glutamina sintetasa aún cuando incrementó con el tiempo de cultivo, disminuyó significativamente con la sal en los dos muestreos, y a pesar de la presencia de ABA, excepto el día 21 en el que 10 μM de ABA provocó una estimulación de la actividad GS con el cloruro sódico. Según el análisis de la varianza (tabla A 6.7) la práctica totalidad de la variabilidad observada se debe en un 85% al tratamiento de ABA.

La respuesta de la glutamato sintasa, que se mantuvo constante en el tiempo de experimentación, fue parecida a la de la GS ya que se inhibió significativamente con la sal en ausencia del ácido abscísico en las dos recogidas el 25 y 45% respectivamente. Con 1 μM ABA la inhibición fue del 13-18% según la recogida, y con 10 μM ABA no se observó el efecto inhibitorio. La actividad GS es 6-8 veces superior a la actividad NADH-GOGAT dependiendo del tiempo de cultivo. Con 100 mM NaCl es 8-9 veces, y con el ABA baja a niveles de 4-6 veces. Es interesante señalar que en plantas tratadas con ABA esta relación disminuye con 100 mM NaCl en la segunda recogida. Prácticamente la variabilidad apreciada puede asignarse en un 40% al ABA, otro 40% al NaCl y la interacción ABA x NaCl (tabla A 6.7).

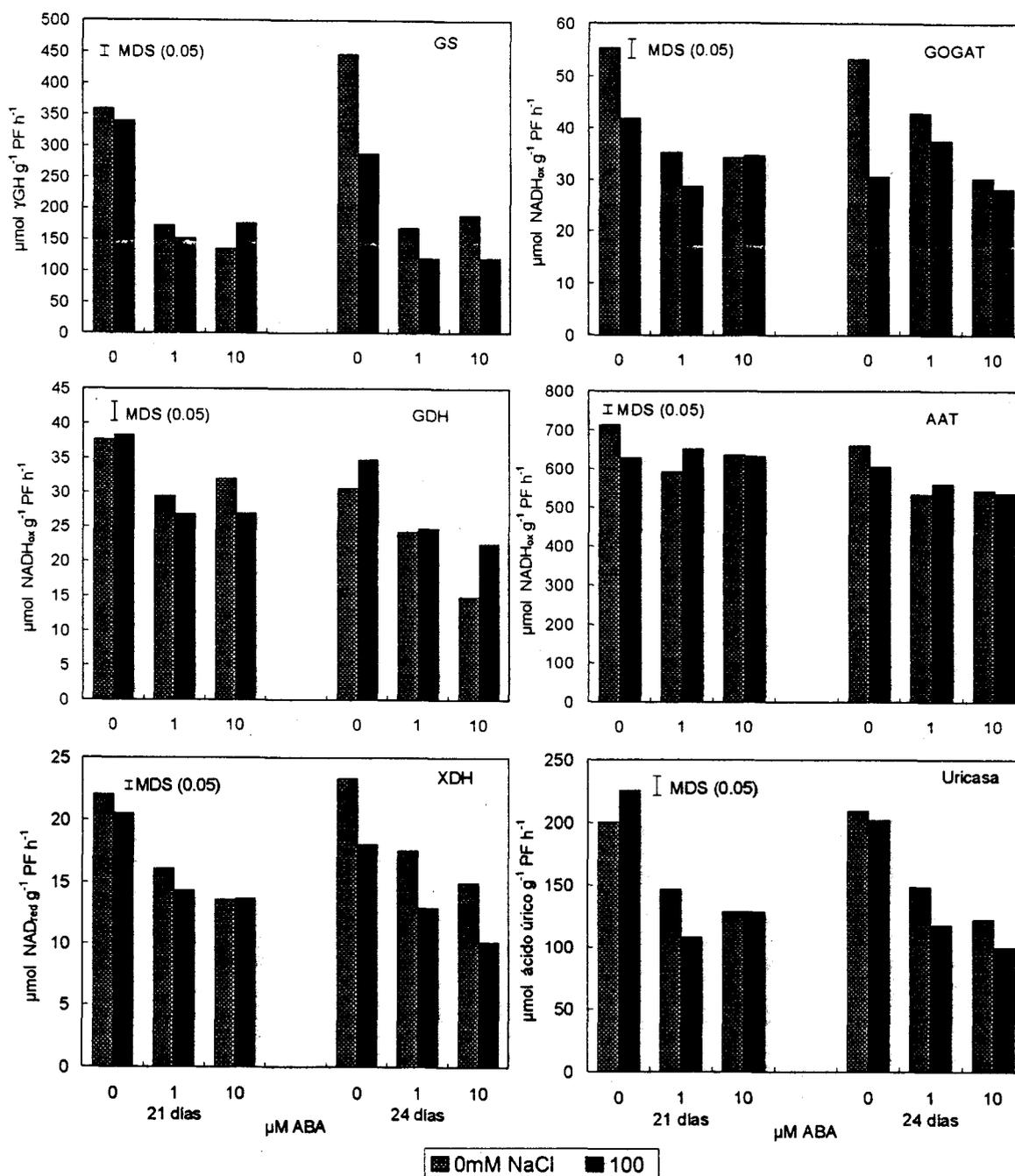


Figura 6.3. Actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GG), glutamato deshidrogenasa (GDH), xantina deshidrogenasa (XDH) y uricasa en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con CIAT899 de *Rhizobium tropici*, tratadas con ABA y NaCl.

La glutamato deshidrogenasa se estimuló ligeramente con el estrés salino (figura 6.3). La presencia de la hormona en el medio provocó un descenso de esta actividad que llegó a ser del 40% en la segunda recogida. La interacción ABA x NaCl indujo

variaciones que, aunque fueron significativas ($P \leq 0.05$) en algunos tratamientos no son de consideración.

La enzima que menos varió su actividad con el ABA independientemente del tratamiento salino fue sin duda la aspartato aminotransferasa. En cuanto al efecto del estrés salino, redujo significativamente esta actividad en ausencia de ABA en los dos muestreos. Sin embargo, con $1 \mu\text{M}$ ABA en el medio, se estimuló significativamente con la sal. En cambio $10 \mu\text{M}$ mantuvo la actividad similar con o sin cloruro sódico. La AAT presentó correlaciones positivas con las demás enzimas estudiadas y con los parámetros de fijación de N_2 , ARA y ARAP (tabla 6.1).

Las enzimas del catabolismo de purinas estudiadas (figura 6.3) muestran efectos diversos por la sal. La xantina deshidrogenasa se inhibe entre 10-20% dependiendo del tiempo de cultivo, y la uricasa se incrementa un 13% (21 días de cultivo) o se mantiene (24 días). Cuando las plantas han sido tratadas con $1 \mu\text{M}$ ABA, la sal provoca una reducción en la XDH del 13%, que se intensifica en la segunda recogida (25%). Sin embargo, con $10 \mu\text{M}$ ABA, sólo se muestra el efecto negativo de la sal en la segunda recogida. Es interesante mencionar otros dos aspectos estadísticos más: a) ambas actividades enzimáticas presentan una muy buena correlación con los parámetros de crecimiento, fijación de nitrógeno y con las actividades enzimáticas ya comentadas (tabla 6.1); b) prácticamente toda la variabilidad detectada puede asignarse al efecto del ABA (85%) en ambas enzimas (tabla A 6.7).

En la tabla A 6.6 se pueden observar las actividades enzimáticas comentadas expresadas en $\text{nmol mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$. El comportamiento observado es semejante al descrito en cada una de ellas, destacando que: a) en general la sal no afecta las actividades enzimáticas; b) El ABA inhibe las actividades enzimáticas; c) las variaciones observadas por la sal con plantas tratadas con $1 \mu\text{M}$ ABA no son excesivas pero significativas, y con $10 \mu\text{M}$ ABA no son significativas, al menos en la primera recogida (21 días) excepto en GS y GDH.

En resumen, en las actividades enzimáticas, el efecto atenuante del ácido abscísico en condiciones de estrés salino se hizo patente en algunas de las actividades y especialmente con la dosis de $10 \mu\text{M}$ de ABA. Es de interés comentar que todas las enzimas evaluadas, excepto la GDH, se correlacionaron positiva y significativamente con ARAP (tabla 6.1).

6.1.4. Contenido de metabolitos.

Se han evaluado diversos metabolitos en nódulos y parte aérea. Así, en nódulos se determinaron el contenido de alantoína y ácido alantoico (ureidos), el contenido de prolina, aminoácidos totales y proteína soluble (figura 6.4). En parte aérea se ha valorado el contenido de prolina, aminoácidos totales, azúcares totales solubles y el contenido en clorofila que se recopilan en el diagrama de barras de la figura 6.5.

- En nódulos:

El contenido de ureidos en nódulos disminuyó con 100 mM y sin ABA un 20% el día 21 y un 40% el día 24 de cultivo. 10 μM de ABA parece ser la única dosis que atenuó este descenso provocado por la sal, ya que en el primer muestreo se aprecia un aumento de estos compuestos del 21% con 100 mM NaCl, y en el segundo muestreo un descenso de sólo el 23% con la sal.

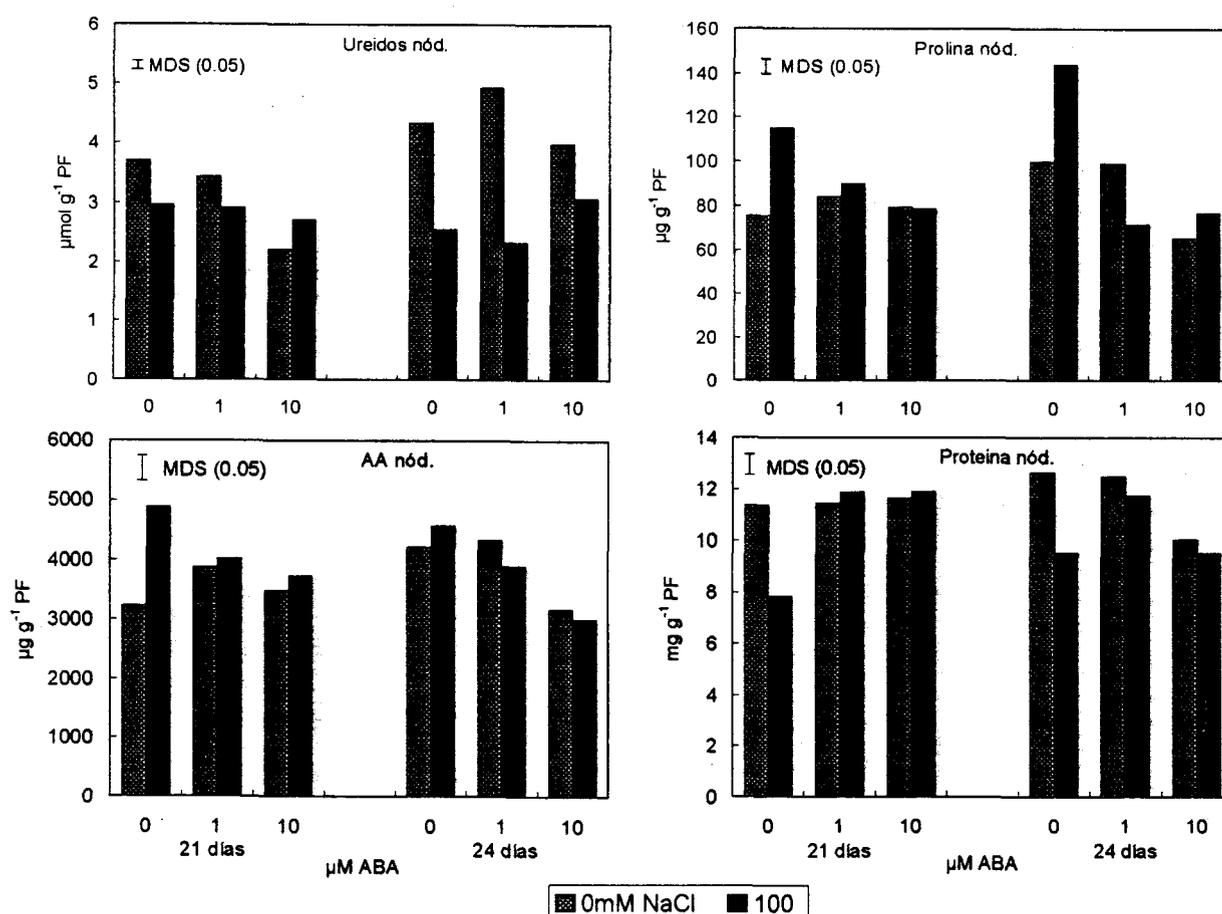


Figura 6.4. Contenido de ureidos en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF, prolina (PRL) y aminoácidos (AA) en $\mu\text{g g}^{-1}$ PF, y proteína en mg g^{-1} PF, en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculada con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con ABA y NaCl.

Se considera interesante mencionar que el contenido de ureidos en nódulos se correlacionó negativa y significativamente ($P \leq 0.001$) con la prolina y azúcares en hojas (tabla 6.1).

El contenido de prolina en nódulos aumentó significativamente con 100 mM NaCl, con incrementos del orden del 50% respecto al control sin sal en los dos muestreos. En presencia de 1 y 10 μM de ABA, esta tendencia observada con la sal desaparece, no afectando 100 mM el contenido de prolina nodular. Se encontró una correlación positiva y significativa entre el contenido de prolina en nódulos, el crecimiento de la planta y las actividades GDH y uricasa tal como se puede ver en la tabla 6.1.

A los 21 días de cultivo y en ausencia de ABA, el contenido de aminoácidos totales en nódulos se incrementó con la sal de forma similar al de prolina en nódulos, aumentando un 50% respecto al control (figura 6.4). El día 24 con el mismo tratamiento, el incremento sólo fue de un 8%. El pretratamiento con 1 y 10 μM de ABA provocó que el día 21 la acumulación de aminoácidos con la sal no fuese significativa, con porcentajes de incremento alrededor del 5%, mientras que en el segundo muestreo la tendencia se invirtió y los aminoácidos descendieron levemente con la sal en presencia de ABA. El contenido de aminoácidos en nódulos se correlacionó positiva y significativamente con el PSR, prolina en nódulos y la actividad uricasa (tabla 6.1).

También disminuyó con la sal el contenido de proteína soluble en nódulos, alrededor del 30% en los dos muestreos en las plantas no tratadas con ABA, mientras que el ABA en el medio provocó una anulación del efecto del NaCl sobre el contenido de proteína soluble en nódulos.

- En hojas:

El contenido de prolina en hojas (figura 6.5) fue cuatro veces inferior al de nódulos independientemente de los tratamientos. También se observó un aumento de este compuesto con la dosis de sal e incluso con la de ácido abscísico en las plantas control. Sin embargo, en las plantas tratadas con 100 mM NaCl, el contenido de prolina disminuyó conforme aumentaba la dosis de ABA. La acumulación de estos metabolitos en respuesta a la sal fue más importante que la apreciada en nódulos ya que, en ausencia de ABA, el porcentaje de incremento se situó entre el 70-150% respecto al control frente al 45-50% detectado en nódulos. En presencia de ABA, se aprecia en general una

acumulación de prolina en hojas con la sal. De hecho 100 mM NaCl provoca incrementos del 35-50% en 1 y 10 μM ABA según el día de recogida, y en nódulos las variaciones no son tan intensas ya que con 1 μM ABA incluso se detecta una caída del 30% (día 21 de cultivo). El contenido de prolina en hojas se correlacionó positivamente con la relación raíz/parte aérea y negativamente con ARAP, GS, GOGAT y XDH (tabla 6.1).

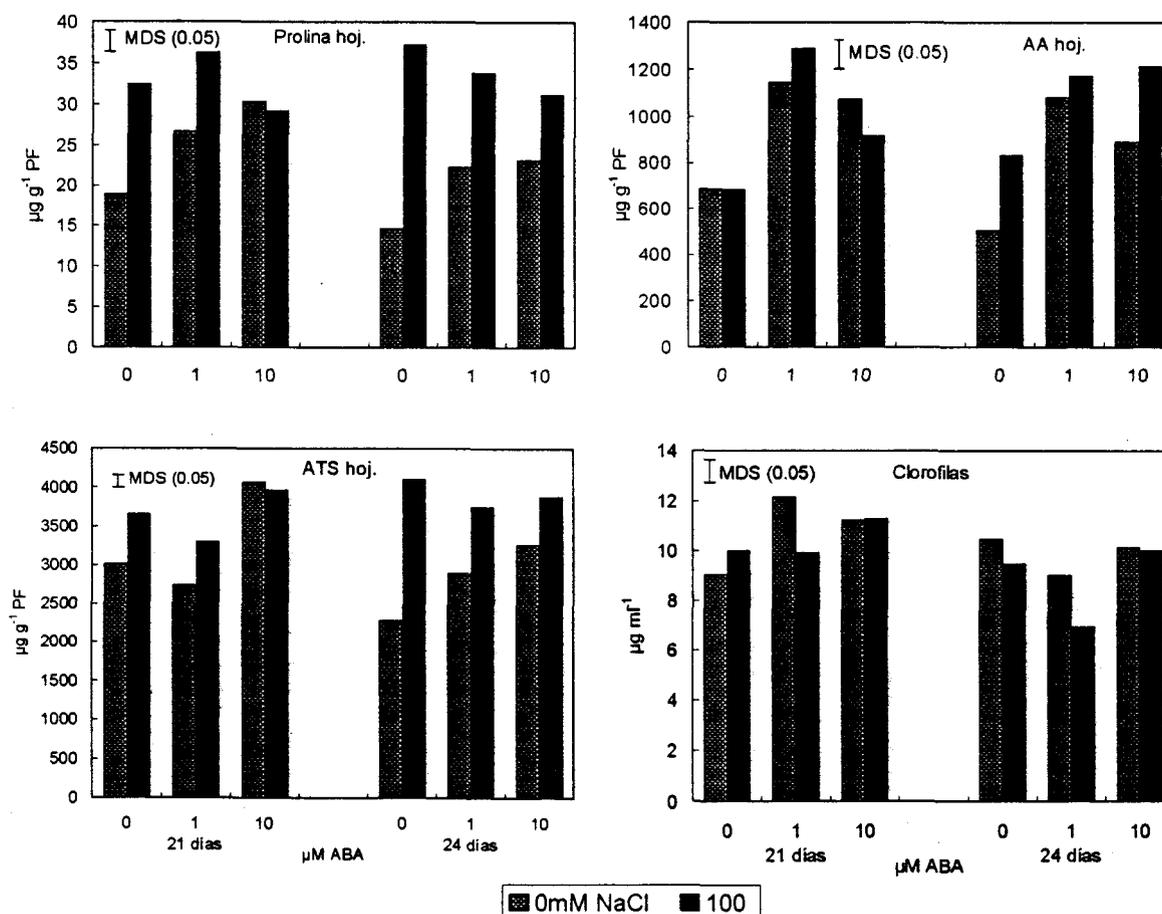


Figura 6.5. Contenido de prolina (PRL), aminoácidos (AA), azúcares totales solubles (ATS) en $\mu\text{g g}^{-1}$ PF, clorofilas en $\mu\text{g ml}^{-1}$, en hojas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculada con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con ABA y NaCl.

El ABA en el medio de cultivo provoca un incremento en el contenido de aminoácidos en hojas independientemente del tratamiento salino. En ausencia de ABA, la sal provocó un incremento (64%) de estos metabolitos a los 24 días de cultivo. En este muestreo, la presencia de ABA en el medio atenuó este porcentaje de incremento con la sal.

El estudio comparativo entre el contenido de aminoácidos en nódulos y hojas llevaría a indicar: **a)** el contenido de aminoácidos en nódulos es 3-4 veces más alto que en hojas; **b)** la sal no influye significativamente ($P \leq 0.05$) sobre la acumulación de aminoácidos en ambos órganos, aunque en general la favorece; **c)** la dosis de ABA que más beneficia la acumulación es 1 μM ; **d)** la interacción de la sal con el ABA provoca un efecto variable según el tiempo de cultivo y la dosis de ABA.

El estudio del análisis de la varianza que se recoge en la tabla A 6.12 del apéndice muestra que la fuente de variación que tuvo más efecto sobre el contenido de aminoácidos en hojas fue el ABA, siendo responsable del 71% de la variabilidad observada. Los aminoácidos foliares se correlacionaron positivamente sólo con la prolina en hojas, y negativamente con el crecimiento de la planta, PSN, ARAP y todas las enzimas estudiadas salvo la GDH (tabla 6.1).

El contenido de azúcares totales solubles en hojas tuvo un perfil similar al contenido de prolina en hojas, incrementándose con el estrés salino. En la primera recogida y sin ABA en el medio, los azúcares aumentaron con 100 mM un 20%, manteniéndose este aumento con 1 μM de ABA y desapareciendo con la dosis de 10 μM . En el segundo muestreo, la acumulación de azúcares con la sal en ausencia de ABA fue del 80% respecto al control, mientras que la presencia de ABA atenuó este incremento llegando a porcentajes del 20-30%. Los azúcares totales en hojas se correlacionaron positiva y significativamente ($P \leq 0.001$) con la prolina en hojas, mientras que lo hicieron negativamente con la actividad nitrogenasa, GOGAT y XDH.

Por último, se analizó el contenido de clorofila en hojas (figura 6.5) donde la presencia de ambas dosis de ABA en condiciones de estrés salino se tradujo en un aumento del 30-35% de clorofila, manteniendo el mismo contenido de clorofila con 0 que con 100 mM de NaCl. Es de destacar que el contenido de clorofila fue el único parámetro que se correlacionó positiva y significativamente con la actividad nitrogenasa en estas condiciones.

Tabla 6.1. Matriz de coeficientes de correlación simple entre variables relacionadas con crecimiento, la fijación de nitrógeno, las enzimas del metabolismo del amonio y del catabolismo de purinas, contenido de prolina, aminoácidos, azúcares, clorofilas, ureidos y proteína en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa, inoculadas con Ciat 899 de *R. tropici*, tratadas con ABA y NaCl. Variables: PSPA, peso seco parte aérea; PSR, peso seco de raíz; PSP, peso seco de planta; RPA, relación raíz/parte aérea; PNN, peso normalizado de nódulos; ARA, actividad reductora de acetileno; ARAP, ARA por planta; GG, glutamato sintasa; GS, glutamina sintetasa; GDH, glutamato deshidrogenasa; AAT, aspartato aminotransferasa; XDH, xantina deshidrogenasa; Uric, uricasa; Ureid, ureidos en nódulos; PRLn, prolina en nódulos; PRLh, prolina en hojas; AAn, aminoácidos en nódulos; AAh, aminoácidos en hojas; CLF, clorofilas; ATSh, azúcares en hojas; PRT, proteína soluble en nódulos.

	PSPA	PSR	PSN	PSP	RPA	ARA	ARAP	PNN	GS	GG	GDH	AAT	XDH	Uric	PRLn	PRLh	AAn	AAh	CLF	ATSh	Ureid	PRT	
PSPA	1.00																						
PSR	0.82	1.00																					
PSN	0.83	0.73	1.00																				
PSP	0.99	0.89	0.86	1.00																			
RPA	-0.30	0.29	-0.20	-0.17	1.00																		
ARA	-0.37	-0.38	-0.22	-0.37	0.08	1.00																	
ARAP	0.58	0.39	0.77	0.58	-0.26	0.39	1.00																
PNN	0.64	0.64	0.95	0.70	-0.07	-0.26	0.68	1.00															
GS	0.76	0.62	0.88	0.77	-0.23	0.09	0.87	0.78	1.00														
GG	0.61	0.42	0.60	0.59	-0.30	0.02	0.69	0.51	0.75	1.00													
GDH	0.29	0.52	0.47	0.37	0.31	0.11	0.42	0.47	0.60	0.50	1.00												
AAT	0.18	0.22	0.41	0.22	0.08	0.47	0.68	0.40	0.61	0.54	0.73	1.00											
XDH	0.74	0.65	0.76	0.76	-0.14	0.16	0.81	0.64	0.93	0.83	0.61	0.58	1.00										
Uric	0.72	0.72	0.80	0.76	-0.05	-0.04	0.66	0.72	0.91	0.67	0.76	0.51	0.91	1.00									
PRLn	0.53	0.74	0.44	0.59	0.33	-0.16	0.14	0.32	0.46	0.02	0.55	0.12	0.45	0.65	1.00								
PRLh	-0.47	-0.07	-0.35	-0.40	0.61	-0.14	-0.61	-0.23	-0.52	-0.75	0.06	-0.20	-0.58	-0.31	0.29	1.00							
AAn	0.40	0.54	0.24	0.43	0.24	-0.06	0.05	0.11	0.38	0.16	0.47	0.09	0.47	0.59	0.81	0.24	1.00						
AAh	-0.76	-0.53	-0.85	-0.75	0.43	0.09	-0.75	-0.76	-0.93	-0.70	-0.49	-0.51	-0.85	-0.86	-0.35	0.56	-0.28	1.00					
CLF	-0.32	-0.43	-0.31	-0.35	-0.15	0.56	0.05	-0.35	0.02	-0.19	0.08	0.19	-0.03	-0.01	-0.02	-0.13	-0.10	-0.06	1.00				
ATSh	-0.31	-0.05	-0.20	-0.26	0.30	-0.50	-0.61	-0.05	-0.46	-0.61	0.04	-0.17	-0.59	-0.28	0.11	0.78	-0.07	0.31	-0.11	1.00			
Ureid	0.44	0.21	0.18	0.39	-0.28	0.06	0.35	0.05	0.35	0.49	-0.25	-0.15	0.49	0.23	-0.04	-0.80	0.02	-0.31	0.01	-0.81	1.00		
PRT	0.03	-0.24	-0.28	-0.06	-0.33	0.33	0.11	-0.47	-0.12	0.31	-0.19	0.18	0.02	-0.28	-0.36	-0.43	-0.16	0.17	0.00	-0.46	0.29	1.00	

P _≤	Valor crítico		
	0.05	0.01	0.001
	0.50	0.58	0.71

6.2. Estudio de la simbiosis *Phaseolus vulgaris* var. *Coco*-*Rhizobium tropici* CIAT899 en presencia de ABA y de NaCl.

6.2.1. Análisis del crecimiento.

Los valores medios obtenidos para el PSPA, PSR, PSP y RPA de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. *Coco* en este experimento se reflejan en el diagrama de barras de la figura 6.6 y en la tabla A 6.13 del apéndice.

En las plantas control se aprecia una disminución del peso seco de la parte aérea con la dosis de ABA aplicada. En ausencia de la hormona, la sal redujo este parámetro significativamente, alrededor del 35%, en los dos muestreos ensayados. Se puede observar claramente que 1 μM ABA en el medio mantuvo el mismo peso de la parte aérea en el control y en el tratamiento con 100 mM NaCl, estimulando el PSPA respecto a las plantas con sal y sin ABA, lo que implica que 1 μM de ABA atenuó el efecto

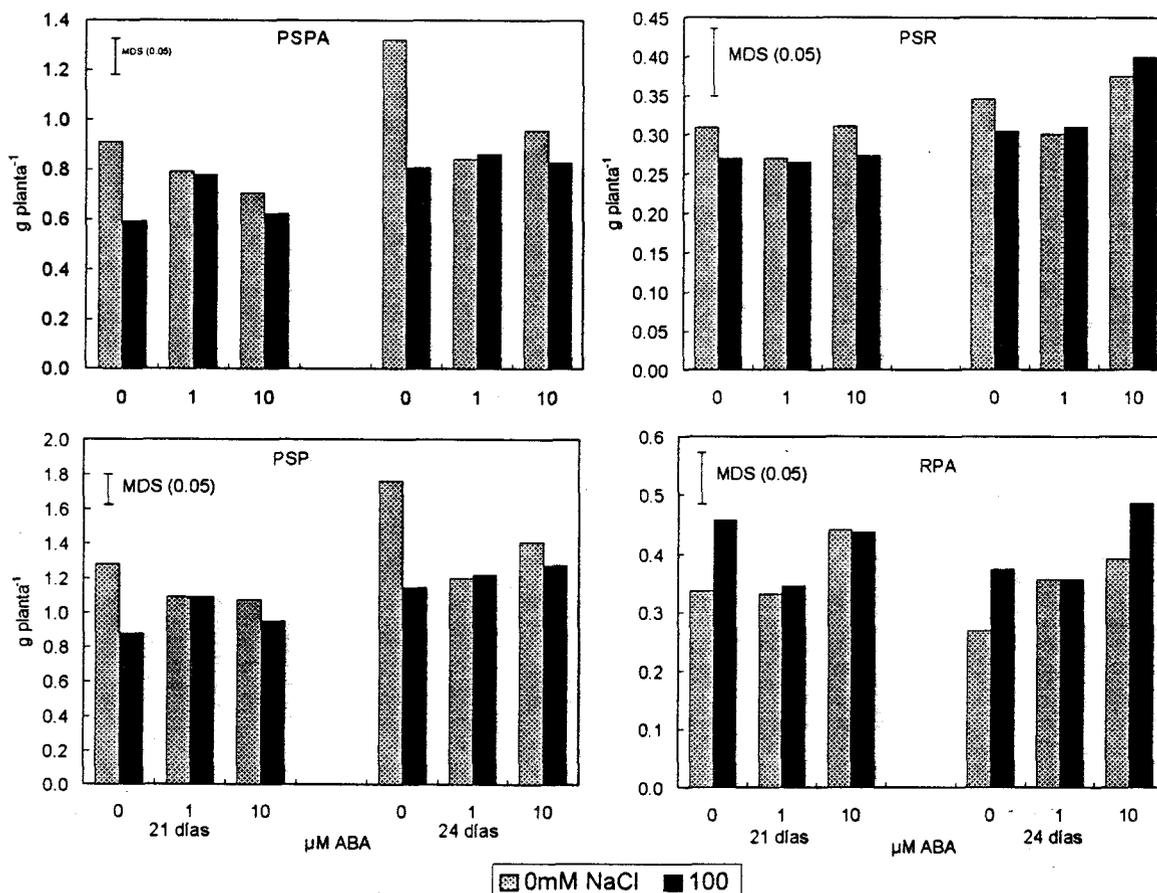


Figura 6.6. Peso seco parte aérea (PSPA), peso seco raíz (PSR), peso seco planta (PSP) en g planta⁻¹, y relación raíz/parte aérea (RPA), en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. *Coco* inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con ABA y NaCl.

inhibidor de la sal. Con 10 μM ABA, el porcentaje de reducción provocado por la sal fue del 13%, estadísticamente no significativo. A los 24 días de cultivo se observó una disminución de PSPA tanto con el tratamiento salino como con el ABA, siendo el efecto de ambos tratamientos parecido.

El peso seco de raíz no se afectó significativamente con el estrés salino independientemente del tratamiento con ABA, especialmente con 1 μM ABA donde las plantas crecidas con 0 y 100 mM NaCl obtuvieron el mismo peso seco de raíz en ambos muestreos.

En el peso seco de planta, se observó la misma tendencia que la descrita para el peso seco de la parte aérea, ya que la planta está esencialmente constituida por parte aérea. Se aprecia una vez más que la dosis de 1 μM ABA favoreció el crecimiento de la planta en presencia de 100 mM NaCl.

En cuanto a la relación raíz/parte aérea, se incrementó de forma significativa (40%) con 100 mM de sal y ausencia de ABA a los 24 días de cultivo. Se observó que en presencia de 1 μM ABA el estrés salino no modificó esta relación en las dos recogidas, mientras que con 10 μM ABA, se incrementó en las plantas con o sin sal en los dos muestreos, y se incrementó más en las plantas con sal en el segundo muestreo. Esto demuestra que en ausencia de ABA la parte aérea fue más sensible al estrés salino que la raíz, mientras que en presencia de ABA en el medio, en particular la dosis de 1 μM , el NaCl tuvo un efecto similar en parte aérea y en raíz. Sin embargo, 10 μM de ABA tuvo un efecto positivo sobre la RPA.

6.2.2. Fijación de nitrógeno.

En la figura 6.7 se exhiben los resultados obtenidos relativos a la fijación de nitrógeno, representados por el PSN, PNN, ARA y ARAP. Los datos numéricos y el estudio estadístico se encuentran en las tablas A 6.14 y 6.16.

En plantas control, la presencia de ABA en el medio de cultivo redujo el peso seco de nódulos, especialmente 1 μM (45%), puesto que con 10 μM la disminución no fue significativa (10%). El tratamiento salino (100 mM NaCl) provocó una reducción importante de este parámetro del 60-70% en ausencia de ABA. Sin embargo, la hormona en plantas tratadas con sal estimuló el peso seco de nódulos en los dos muestreos, si bien el efecto fue mayor con 10 μM . Con esta dosis de ABA en el medio,

la sal no afectó el peso seco de nódulos a los 21 días de cultivo pero sí lo hizo significativamente a los 24. Sin embargo, el porcentaje de reducción en este caso fue del 33%, mucho menor al registrado sin ABA en el medio.

En ausencia de ABA en el medio, el peso normalizado de nódulos disminuye entre un 30-50% con la sal en ambos muestreos, mientras que en presencia de ABA, este parámetro no se afectó significativamente por el NaCl, incluso llegando a estimularse levemente. Esto podría ser debido al incremento del peso seco de nódulos inducido por el ABA en el medio en condiciones de estrés salino, y a la estabilidad del peso seco de parte aérea en estas mismas condiciones.

La actividad nitrogenasa específica (figura 6.7) se vio disminuida por el ABA en un 40% en plantas control, mientras que en el tratamiento salino se aprecia un aumento de esta actividad con la hormona. El efecto inhibitor del estrés salino, solo fue

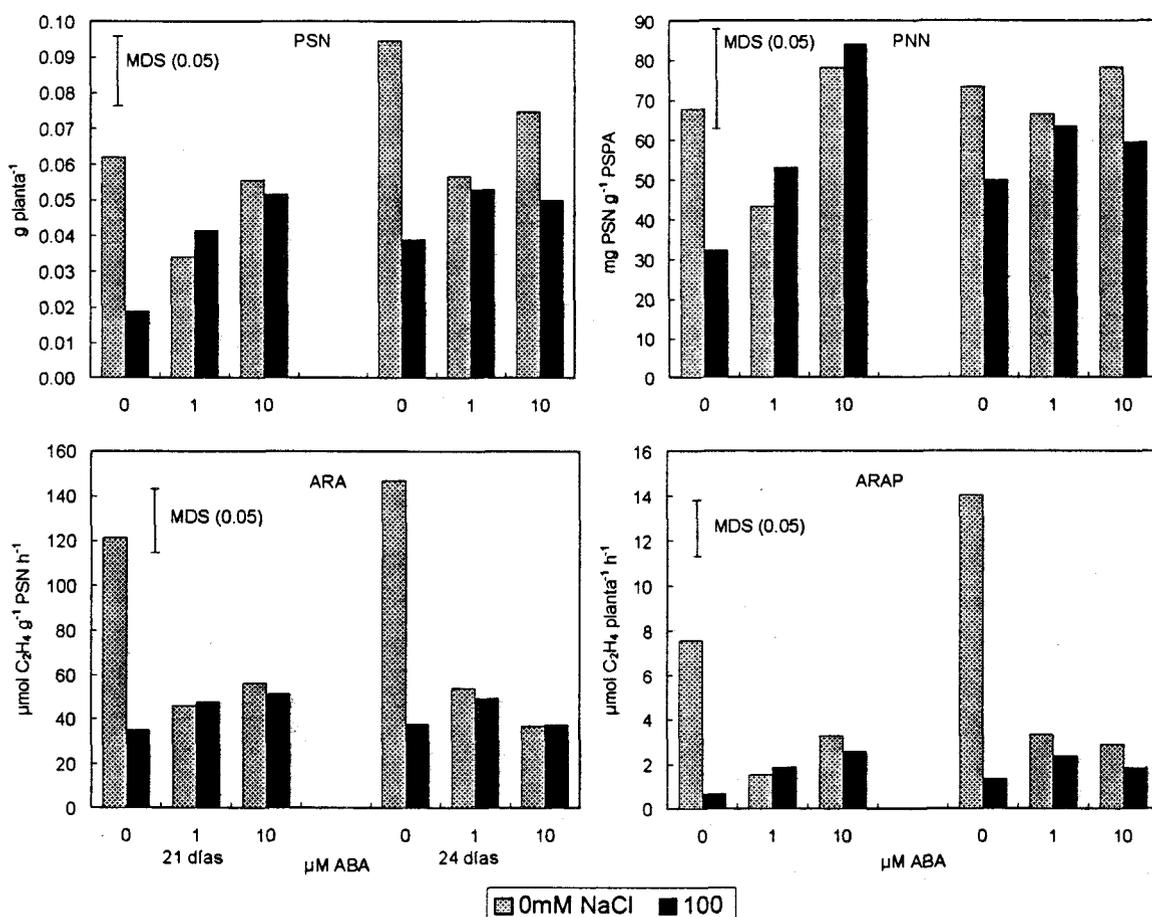


Figura 6.7. Peso seco de nódulos (PSN) en g planta^{-1} , peso normalizado de nódulos (PNN) en mg PSN g^{-1} PSPA, actividad reductora de acetileno (ARA) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1}$ PSN h^{-1} , y ARA por planta (ARAP) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ planta}^{-1} \text{ h}^{-1}$, en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con ABA y NaCl.

significativo en ausencia de ABA, registrándose porcentajes de reducción del 70% en las dos recogidas.

Las variaciones observadas en la actividad nitrogenasa por planta fueron más espectaculares. Así, el ácido abscísico incrementó esta actividad en las plantas tratadas con NaCl hasta tres veces, esencialmente debido al importante aumento de la nodulación por la hormona. No obstante, el NaCl inhibió el ARAP un 90% en ausencia de ABA, y en presencia de la hormona en el medio la sal no afectó significativamente este parámetro. Además, el ABA inhibe drásticamente el ARAP en las plantas sin sal debido a la fuerte inhibición que provoca sobre ARA específica.

El estudio estadístico señala que tanto en ARA como en ARAP, la variabilidad observada se debe prioritariamente a la interacción ABA x sal, siendo significativos ambos tratamientos (tabla A 6.16 del apéndice). Además, ambos parámetros se correlacionaron positivamente con el crecimiento de la planta y con el peso seco de nódulos (tabla 6.2).

En resumen, el ABA tiene un efecto negativo tanto sobre el crecimiento como sobre la fijación de nitrógeno, comparable en muchos casos al efecto de una dosis alta de sal. Sin embargo, en condiciones de estrés salino, el ABA estimula algunos parámetros como el PSPA y, sobre todo, el PSN.

6.2.3. Actividades enzimáticas.

En la figura 6.8 se observa que la actividad glutamina sintetasa se inhibió significativamente con 100 mM NaCl en ausencia de ABA, especialmente en el primer muestreo donde el porcentaje de reducción fue del 69%. La hormona en el medio contribuyó a que el efecto del estrés salino fuese el inverso, ya que esta actividad se estimuló con la sal en el primer muestreo un 20 y 10% con 1 y 10 μ M ABA respectivamente. En la segunda recogida, a pesar de la presencia de ABA, la actividad se vio reducida por el NaCl. Es de destacar que en las plantas control (sin NaCl), el ABA provocó una disminución de la actividad, 2 veces menos con 1 μ M ABA. Sin embargo, en las plantas sometidas al estrés salino, el ABA estimuló esta actividad hasta un 40%. Esto se reflejó claramente a los 21 días de cultivo.

Los datos relativos glutamato sintasa reflejaron un perfil similar al de la GS en el primer muestreo puesto que, sin la adición de ABA al medio, el NaCl inhibió esta actividad un 52% en el primer muestreo, mientras que se estimuló con la sal un 15% y 4% con 1 μ M y 10 μ M ABA, respectivamente. Al igual que la GS, el ABA incrementó la glutamato sintasa en las plantas sometidas a estrés salino. Estas dos actividades enzimáticas se correlacionaron positiva y significativamente entre sí (0.74; $P \leq 0.001$), pero sólo la GS se correlacionó con PSN, PNN, ARA y ARAP. El análisis de la varianza indica que la variabilidad apreciada se debe prioritariamente a la interacción de las tres fuentes de variación, tiempo de cultivo, dosis de ABA y de NaCl (tabla A 6.19).

La glutamato deshidrogenasa (figura 6.8) disminuyó con el estrés salino en ausencia de ABA pero con porcentajes menores a los registrados en las enzimas anteriores, ya que lo hizo en un 9% y 28% a los 21 y 24 días respectivamente. En cuanto al efecto del ABA en el medio, la actividad GDH de las plantas control no varió con 1 μ M y descendió con 10 μ M. En las plantas tratadas con NaCl, la actividad más alta se registró con 1 μ M ABA. Con esta dosis de ABA se provocó un estímulo de la actividad con el NaCl de alrededor el 10% en ambos muestreos, mientras que con 10 μ M se mantuvo tanto en el control como con el tratamiento salino con la misma actividad.

En la figura 6.8 también se muestra la actividad aspartato aminotransferasa que, junto con la GDH, fueron las actividades enzimáticas que mostraron mayor tolerancia a la sal, puesto que tampoco sufrió grandes variaciones con la sal en ausencia de ABA, incluso se estimuló (15%) con 100 mM NaCl en el segundo muestreo. La presencia de ABA en el medio no provocó diferencias ya que no alteró de forma importante esta actividad. La aspartato aminotransferasa se correlacionó positivamente con la GOGAT (tabla 6.1).

La xantina deshidrogenasa (figura 6.8) disminuyó significativamente (20%) con 100 mM NaCl sin ABA en el medio. También en el tratamiento con ABA disminuyó esta actividad en ambos muestreos. Sin embargo, el día 21 de cultivo, esta actividad se incrementó con la sal un 6% y 28% en presencia de 1 y 10 μ M ABA respectivamente, mientras que el día 24 la actividad disminuyó con la sal independientemente del tratamiento con ABA, pero con porcentajes menores en presencia que en ausencia de ABA. En las plantas control, el ABA provocó una disminución de la actividad. En las

tratadas con 100 mM NaCl, la actividad aumentó con el ABA en el primer muestreo, y se mantuvo en el segundo.

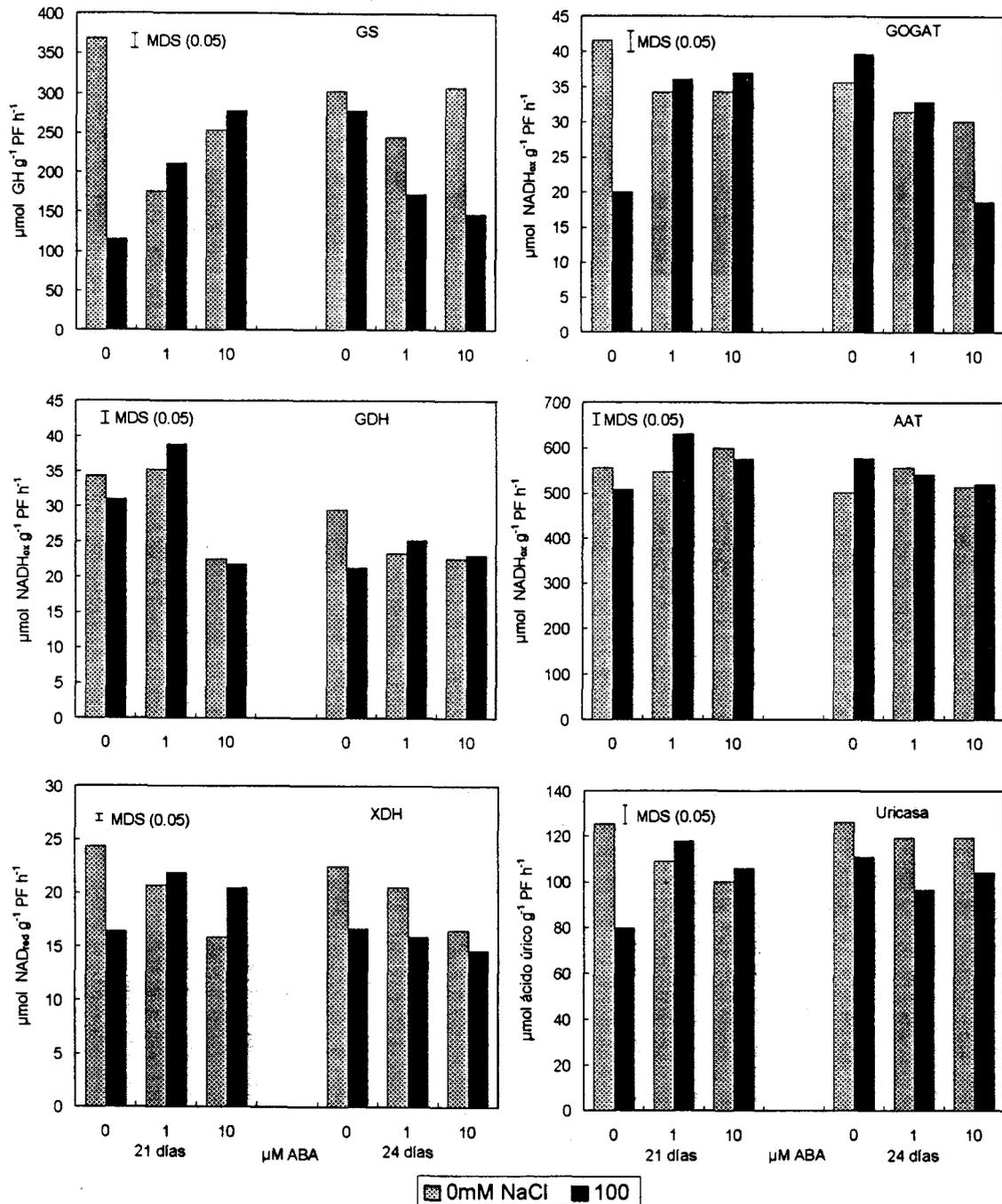


Figura 6.8. Actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GG), glutamato deshidrogenasa (GDH), aspartato aminotransferasa (AAT), xantina deshidrogenasa (XDH) y uricasa, en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con ABA y NaCl.

Al estudiar el comportamiento de la actividad uricasa se observó una respuesta a los distintos tratamientos similar a la XDH, ya que se inhibió con el NaCl en ausencia de ABA un 36 y 12% a los 21 y 24 días de cultivo respectivamente (figura 6.8). En el primer muestreo, la presencia de la hormona indujo un aumento de la actividad con el NaCl del 8%, mientras que el segundo no se observó diferencia en la respuesta al NaCl entre los tratamientos con ABA. Ambas enzimas se correlacionaron positivamente entre sí (0.68; $P \leq 0.01$) así como con ARA, ARAP, GS y GOGAT, además de que la XDH se correlacionó positivamente con la GDH.

En la tabla A 6.18 se recogen los valores medios de las actividades enzimáticas previamente comentados, expresados en $\text{nmol mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$. Se evidencia que, con algunas variaciones, las respuestas son similares a las observadas anteriormente: a) en presencia de ABA en el medio, la sal incrementa de forma generalizada todas las actividades enzimáticas en ambos muestreos; b) Las actividades enzimáticas menos sensibles a la sal fueron la GDH y la AAT, seguidas de la XDH y la uricasa, siendo las más sensibles la GS y la GOGAT; c) la relación de actividades GS/GOGAT se mantiene entre 5-6/1 y la de uricasa/XDH entre 5-7/1.

6.2.4. Contenido de metabolitos.

A continuación se exponen los resultados obtenidos sobre los distintos metabolitos evaluados en nódulos y hojas de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Coco, tal como se ha descrito para la variedad Africa en el experimento anterior.

- En nódulos:

Los metabolitos evaluados en nódulos se representan en la figura 6.9 y en la tabla A 6.21 del apéndice, con el estudio estadístico habitual.

El contenido de prolina en nódulos disminuye en presencia de ABA en ambas recogidas (30-40%). Independientemente de la concentración de la hormona y del muestreo realizado, el contenido de prolina aumenta con el NaCl siempre que haya ABA en el medio de cultivo.

Respecto al contenido de aminoácidos en nódulos, se aprecia que disminuye en presencia de ABA del orden del 25-30% en la primera recogida y del 20% en la segunda, mientras que aumenta con la sal en presencia de la hormona. Sin embargo, aún cuando este comportamiento es similar al descrito para el contenido de prolina, al

observar los niveles de aminoácidos en plantas control, se detecta que sólo se incrementa con la sal en el segundo muestreo. El contenido de aminoácidos en nódulos se correlacionó positivamente con la prolina en nódulos y con la actividad GDH (tabla 6.2).

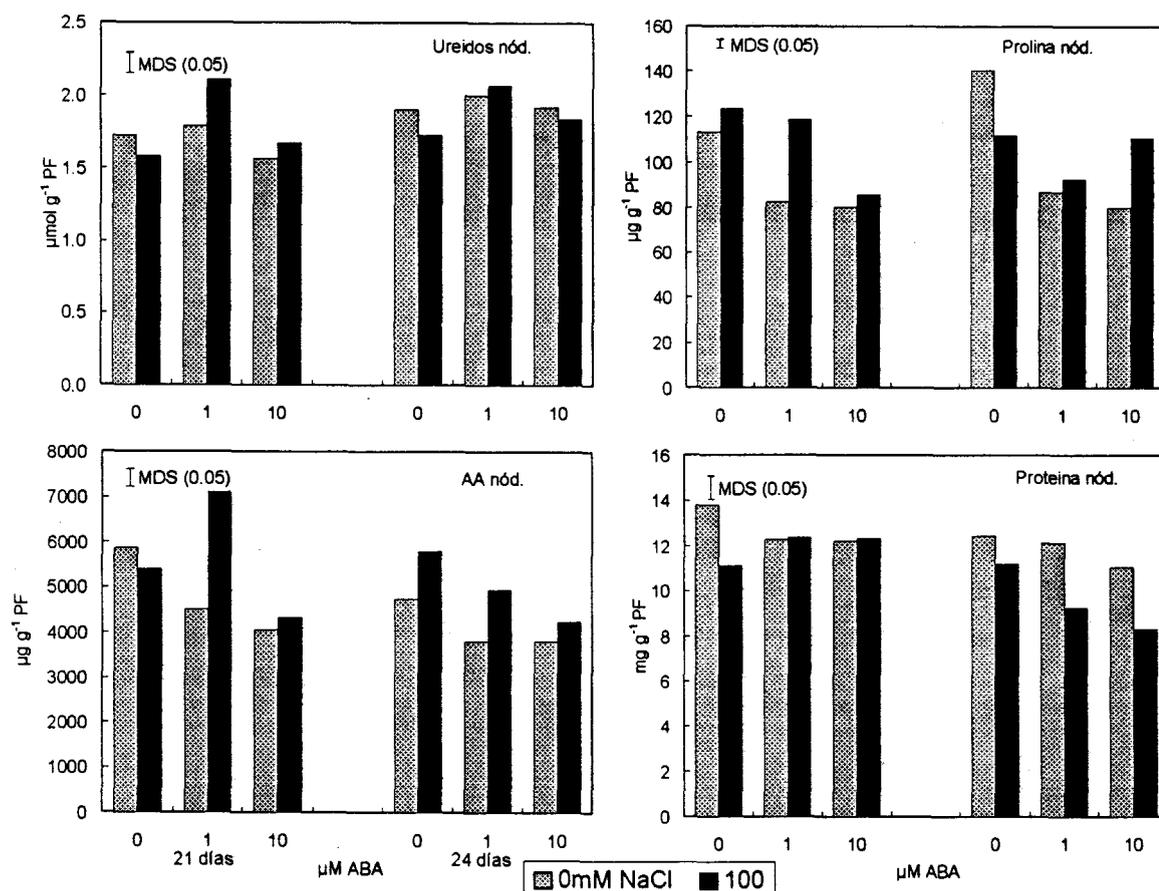


Figura 6.9. Contenido de ureidos en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF, prolina (PRL) y aminoácidos (AA) en $\mu\text{g g}^{-1}$ PF, y proteína en mg g^{-1} PF, en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con ABA y NaCl.

En la figura 6.9 también se aprecia el contenido de ureidos en nódulos, que disminuyó con la sal alrededor del 9% en las plantas no tratadas con ABA, mientras que se estimuló con la sal en el primer muestreo un 17 y 7% con 1 y 10 μM ABA, respectivamente. En la segunda recogida, el nivel de ureidos no sufrió variaciones con la sal en presencia de ABA. En las plantas control el contenido de ureidos no se alteró con la adición de ABA al medio, mientras que en las plantas tratadas con NaCl, este contenido tendió a aumentar con el ABA, en especial con 1 μM .

La proteína soluble en nódulos también descendió con la sal en las plantas no tratadas con ABA entre un 10-20% en los dos muestreos ensayados. La adición de ABA, acentuó esta tendencia levemente sólo en la segunda recogida, ya que en la primera la sal no modificó este parámetro en presencia de ABA. La proteína soluble en nódulos se correlacionó positivamente con ARA y las enzimas GS, GOGAT y XDH (tabla 6.2).

- En hojas:

El contenido de metabolitos determinados en hojas está representado en el diagrama de barras de la figura 6.10. Los datos numéricos y el estudio estadístico correspondiente, se pueden encontrar en la tabla A 6.23 y A 6.24 del apéndice.

La prolina en hojas en las plantas no tratadas con ABA se incrementó alrededor de 135% en los dos muestreos. Este incremento por el efecto de la sal fue espectacular en plantas control, obteniéndose con 100 mM NaCl 2.4 veces más que con 0 mM de sal. Sin embargo, no hay que olvidar que los niveles de prolina en hojas representan solo el 20-50% del detectado en nódulos. El ácido abscísico provocó que se duplicase el contenido de prolina en hoja, independientemente de la dosis de ABA y de la fecha de recogida. La interacción de la sal con el ABA en el medio de cultivo ofreció un efecto similar al descrito en nódulos. Este parámetro se correlacionó positivamente con el crecimiento de la planta, ARA, ARAP y algunas de las actividades enzimáticas como GS, XDH y uricasa, como se muestra en la tabla 6.2.

De nuevo se detecta que la acumulación de aminoácidos en hojas es menor que en nódulos, siendo los valores obtenidos en nódulos 4-5 veces los alcanzados en hojas. El contenido de aminoácidos en hojas se incrementó de forma significativa con el estrés salino en las plantas no tratadas con ABA, con porcentajes de aumento del 112 y 63% a los 21 y 24 días respectivamente. Este efecto del NaCl desapareció en presencia de ABA en el medio, no registrándose diferencias significativas entre el contenido de aminoácidos en el control y en el tratamiento salino, al menos en el primer muestreo. En la segunda recogida, estos compuestos disminuyeron entre el 10-30% con la sal en presencia de ABA. Los aminoácidos foliares aumentaron con el ABA en las plantas control y disminuyeron en las tratadas con NaCl. Es de destacar que estos solutos se correlacionaron negativamente con el crecimiento de la planta, la nitrogenasa, la actividad GS y uricasa, y positivamente con el contenido de prolina en hojas.

El contenido de azúcares totales solubles en hojas de las plantas control en presencia de ABA, aumentó ligeramente (10-20%) en el primer muestreo y disminuyó en el segundo (20-30%), y se mantuvo estable en las plantas tratadas con NaCl (figura 6.10). En cuanto al efecto del estrés salino, estos solutos orgánicos aumentaron un 17% con la sal y sin ABA en el primer muestreo. La adición de ABA al medio no varió mucho la respuesta a la sal en esta recogida. Sin embargo, el día 24 de cultivo, la sal disminuyó el contenido de azúcares en ausencia de ABA, mientras que la presencia de ABA estimuló la acumulación de azúcares con la sal. En la tabla 6.2 se aprecia que los azúcares totales solubles en hojas se correlacionaron con el PSP, PSN y ARAP.

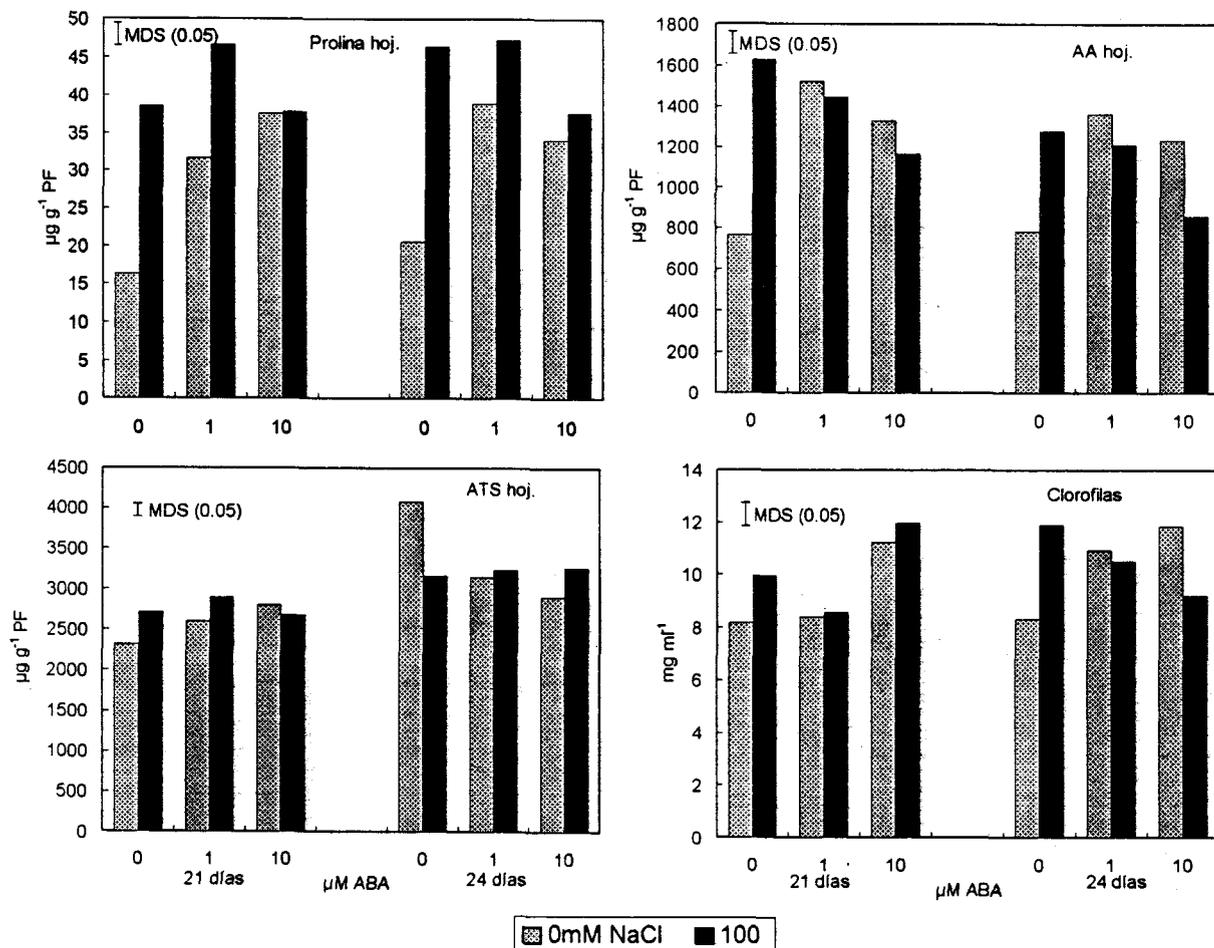


Figura 6.10. Contenido de prolina (PRL), aminoácidos (AA), azúcares totales solubles (ATS) en $\mu\text{g g}^{-1}$ PF, clorofilas (CLF) en $\mu\text{g ml}^{-1}$, en hojas de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con ABA y NaCl.

Cuando se observan los valores de clorofila (figura 6.10) se aprecian tres hechos: a) la sal provoca un aumento del contenido de clorofila que oscila entre 25-45% según el muestreo realizado; b) el ABA también favorece el incremento en porcentajes que se sitúan en torno al 46-36% dependiendo de la dosis; c) en presencia de ABA en el medio, la sal no modifica el contenido de clorofila. Además, en la tabla 6.2 se evidencia que este parámetro se correlaciona positivamente sólo con la prolina en hojas y negativamente con el ARA, GDH, XDH y contenido de prolina en nódulos.

Por último, se puede decir que existe una acumulación de solutos orgánicos en condiciones de estrés salino, pero como en el contenido de la prolina, se atenuó en presencia del ABA sólo en parte aérea ya que en nódulos la tendencia fue controvertida. Lo mismo sucedió con el contenido de clorofila. La disminución de algunos compuestos como los ureidos y la proteína soluble se ralentizó con la adición de ABA al medio.

6.3. Comparación de las dos simbiosis.

Después de estudiar en las dos simbiosis por separado el efecto de la aplicación de ácido abscísico exógeno antes de aplicar el estrés salino, a continuación se aborda el estudio comparativo de los resultados obtenidos con las dos variedades.

Cuando se evalúa el crecimiento de la planta, se observa que la adición de ABA disminuyó este parámetro en las plantas control en ambas simbiosis. En el caso de las plantas tratadas con NaCl, este efecto del ABA sólo se observó en Africa, ya que en Coco parece que el ABA incluso estimuló ligeramente el crecimiento de las plantas en condiciones de estrés salino, si bien las diferencias son poco significativas. En cuanto al efecto del NaCl sobre el crecimiento de la planta en ausencia de ABA sólo fue significativo en Coco, ya que en Africa la sal no afectó este parámetro en ninguno de los dos muestreos. Por esta razón sólo se pudo apreciar el efecto atenuante del ABA en condiciones de salinidad en la segunda simbiosis estudiada en cuanto a parámetros de crecimiento, esencialmente con la dosis menor de ABA.

Mientras la reducción por la sal del peso seco de nódulos en la variedad Africa en ausencia de ABA no superó el 15%, en Coco este porcentaje de inhibición fue casi del 70%. El ABA en el medio de cultivo, especialmente 1 μ M, eliminó este efecto inhibitor de la sal, llegando incluso a apreciarse una estimulación del peso seco de nódulos. Lo que sí se pudo observar claramente es el importante incremento de la

nodulación por el ABA en las plantas de la variedad Coco tratadas con NaCl, especialmente en el primer muestreo, efecto que no se observó en Africa donde este parámetro se redujo por los tratamientos con ABA, tanto en las plantas control como en las tratadas con NaCl. Estadísticamente, el efecto de la interacción variedad x ABA fue significativo (tabla A 6.27), lo que confirma la diferente respuesta de ambas variedades al pretratamiento con esta hormona.

La actividad nitrogenasa específica sufrió una inhibición significativa con el estrés salino en ausencia de ABA en el medio. En la variedad Africa el porcentaje de reducción se situó entre 39-49% mientras que en Coco, el ARA se redujo en más del 70% con la sal. La disminución de la nitrogenasa con las dosis de ABA utilizadas se hizo más evidente en las plantas control de Coco, donde la actividad se redujo hasta 4 veces con 10 μ M el día 24. En cuanto al efecto del ABA en las plantas tratadas con sal, el ARA tendió a aumentar levemente en las dos simbiosis. Esta estimulación por el ABA se reflejó claramente en la nitrogenasa por planta (ARAP) de las plantas tratadas con NaCl en Coco, debido esencialmente a la estimulación del peso seco de nódulos de estas plantas por el ABA observada en esta variedad.

Cuando se compara la respuesta a los tratamientos aplicados de las enzimas evaluadas en las dos simbiosis, se observa: a) en ausencia de ABA, el efecto negativo del NaCl en algunas actividades, como GS, GOGAT, XDH y uricasa, se hizo más evidente en Coco; b) en presencia de ABA, el efecto negativo de la sal se atenua en las dos simbiosis, llegando en ocasiones a igualar la actividad enzimática del control con la del tratamiento salino; c) incluso, se aprecia que la presencia de ABA en el medio aumenta la actividad de determinadas actividades enzimáticas en las plantas de la variedad Coco tratadas con NaCl en el primer muestreo.

La acumulación de solutos orgánicos como la prolina en condiciones de estrés salino se hizo evidente, en ausencia de ABA, en ambas simbiosis, con la diferencia que en Africa esto tuvo lugar en nódulos y en hojas, mientras que en Coco sólo en hojas. La presencia de ABA mitigó esta respuesta a la sal en las dos simbiosis. El contenido de azúcares totales solubles en hojas se incrementó significativamente con la sal en la variedad Africa, mientras no se modificó en Coco. Lo contrario se observó con el contenido de clorofila, ya que aumentó en Coco con la sal y sin ABA, mientras no se alteró significativamente en Africa.

El contenido de ureidos y de proteína soluble en nódulos disminuyó con la sal más intensamente en Africa que en Coco. La adición de ABA al medio palió claramente este efecto.

Se encontraron algunas correlaciones totalmente distintas en una simbiosis y otra. Por ejemplo, el contenido de ATS en hojas se correlacionó negativamente con ARAP en Africa mientras lo hizo positivamente en Coco, o la clorofila que presentó un coeficiente de correlación positivo con ARA en Africa mientras que negativo en Coco. Esto nos induce a pensar que la acumulación de solutos como respuesta al estrés salino es diferente según el grado de sensibilidad / tolerancia de la variedad.

Tabla 6.2. Matriz de coeficientes de correlación simple entre variables relacionadas con crecimiento, la fijación de nitrógeno, las enzimas de metabolismo del amonio y del catabolismo de purinas, contenido de prolina, aminoácidos, azúcares, clorofilas, ureidos y proteína en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Coco, inoculadas con Ciat 899 de *R. tropici*, tratadas con ABA y NaCl. Variables: PSPA, peso seco parte aérea; PSR, peso seco de raíz; PSP, peso seco de planta; RPA, relación raíz/parte aérea; PNN, peso normalizado de nódulos; ARA, actividad reductora de acetileno; ARAP, ARA por planta; GG, glutamato sintasa; GS, glutamina sintetasa; GDH, glutamato deshidrogenasa; AAT, aspartato aminotransferasa; XDH, xantina deshidrogenasa; Uric, uricasa; Ureid, ureidos en nódulos; PRLn, prolina en nódulos; PRLh, prolina en hojas; AAn, aminoácidos en nódulos; AAh, aminoácidos en hojas; CLF, clorofilas; ATSh, azúcares en hojas; PRT, proteína soluble en nódulos.

	PSPA	PSR	PSN	PSP	RPA	PNN	ARA	ARAP	GS	GG	GDH	AAT	XDH	Uric	PRT	Ureid	PRLn	PRLh	AAn	AAh	CLF	ATSh	
PSPA	1.00																						
PSR	0.53	1.00																					
PSN	0.84	0.58	1.00																				
PSP	0.98	0.66	0.88	1.00																			
RPA	-0.71	0.17	-0.47	-0.59	1.00																		
PNN	0.32	0.38	0.77	0.40	-0.05	1.00																	
ARA	0.74	0.13	0.69	0.68	-0.65	0.35	1.00																
ARAP	0.85	0.28	0.82	0.81	-0.63	0.43	0.96	1.00															
GS	0.46	0.16	0.67	0.46	-0.44	0.66	0.60	0.58	1.00														
GG	0.24	-0.37	0.30	0.15	-0.64	0.36	0.45	0.35	0.74	1.00													
GDH	0.08	-0.46	-0.21	-0.03	-0.47	-0.49	0.30	0.16	-0.11	0.16	1.00												
AAT	-0.42	-0.52	-0.28	-0.46	-0.01	0.09	-0.21	-0.32	0.14	0.53	0.16	1.00											
XDH	0.35	-0.38	0.30	0.24	-0.71	0.13	0.69	0.57	0.53	0.62	0.62	0.20	1.00										
Uric	0.69	0.25	0.69	0.67	-0.68	0.45	0.58	0.60	0.77	0.59	0.17	0.12	0.68	1.00									
PRT	0.10	-0.53	0.17	0.00	-0.50	0.18	0.52	0.41	0.63	0.69	0.44	0.36	0.82	0.49	1.00								
Ureid	0.44	0.15	0.30	0.41	-0.50	0.07	0.03	0.10	-0.05	0.07	0.20	0.07	0.18	0.43	-0.22	1.00							
PRLn	0.42	0.05	0.10	0.36	-0.27	-0.35	0.51	0.51	-0.02	-0.08	0.42	-0.24	0.28	0.11	0.04	0.06	1.00						
PRLh	-0.55	-0.24	-0.55	-0.54	0.39	-0.27	-0.81	-0.76	-0.55	-0.21	-0.29	0.43	-0.59	-0.50	-0.52	0.25	-0.26	1.00					
AAn	-0.08	-0.46	-0.34	-0.17	-0.28	-0.48	0.11	-0.03	-0.01	0.32	0.66	0.45	0.35	0.07	0.24	0.16	0.60	0.15	1.00				
AAh	-0.64	-0.64	-0.71	-0.70	0.20	-0.53	-0.70	-0.70	-0.54	-0.18	0.14	0.29	-0.26	-0.53	0.02	-0.07	-0.35	0.61	0.09	1.00			
CLF	-0.38	0.04	-0.05	-0.31	0.45	0.36	-0.53	-0.43	0.12	0.01	-0.83	0.12	-0.55	-0.26	-0.21	-0.21	-0.56	0.52	-0.42	0.28	1.00		
ATSh	0.71	0.46	0.55	0.71	-0.34	0.16	0.33	0.53	-0.03	-0.12	-0.26	-0.37	-0.11	0.22	-0.34	0.42	0.46	0.02	-0.15	-0.35	-0.06	1.00	

P ≤	Valor crítico		
	0.05	0.01	0.001
	0.50	0.58	0.71

7. Nutrición mineral.

En este apartado se recopila el análisis del estado nutricional de la planta que se ha llevado a cabo en algunos de los experimentos realizados en esta memoria. Se ha determinado el contenido de macronutrientes en parte aérea y raíz, en porcentaje de peso seco, que ha servido para calcular la acumulación de estos nutrientes en los dos órganos vegetales (mg planta^{-1}) y la eficiencia en el uso de estos.

7.1. Efecto del nitrato sobre el contenido de macronutrientes en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa.

La concentración de distintos nutrientes, como porcentaje de peso seco, y el contenido en mg planta^{-1} , en parte aérea y raíz de la simbiosis *Phaseolus vulgaris* var. Africa-*Rhizobium tropici* CIAT899, con distintos niveles de KNO_3 en el medio de cultivo (experimento 2) se exponen en los diagramas de barras de la figura 7.1 a la figura 7.4. También se pueden ver los datos en porcentaje en la tabla A 7.1 del apéndice, seguida del análisis de la varianza (tabla A 7.2, A 7.3). El contenido en mg de elemento por planta se encuentran en la tabla A 7.4, seguida del análisis de la varianza correspondiente. En ambas formas de exponer estos datos se detecta que existe una variabilidad generalizada de las respuestas obtenidas. Se ha considerado interesante además incluir la eficiencia en el uso de estos nutrientes.

7.1.1. En Parte aérea.

La concentración de nitrógeno en parte aérea (figura 7.1), expresada en porcentaje de peso seco presentó un máximo al inicio de floración con los tratamientos 0, 1 y 2 mM KNO_3 el día 28 de cultivo (segunda recogida), mientras que con 5 y 10 mM la concentración de este elemento disminuyó con el crecimiento del cultivo (tabla A 7.1). En cuanto a la respuesta a los tratamientos con nitrato en el medio, no se apreciaron grandes variaciones entre los distintos tratamientos, excepto en el primer muestreo, donde el nitrógeno se incrementó un 15 y 20% con 5 y 10 mM KNO_3 respectivamente. Cuando se expresa el resultado en mg planta^{-1} (figura 7.2), este elemento aumentó en el tiempo entre 4-5 veces entre el primer y el último muestreo con todos los tratamientos. El tratamiento con nitrato determinó un aumento del contenido de nitrógeno por planta con la dosis utilizada, siendo con 10 mM algo más del doble que

el obtenido en las plantas dependientes exclusivamente de la fijación. De hecho, se observaron porcentajes de incremento de más del 100% con 5 y 10 mM.

Al estudiar las tablas de correlaciones que se adjuntan se puede comprobar que el porcentaje de nitrógeno en parte aérea se correlacionó con ARA y ARAP (tabla 7.2), así como con las enzimas de la asimilación del amonio en nódulos (GS y NADH-GOGAT), incluso con la XDH y con el contenido de ureidos en nódulos (ALN y ALC; tabla 7.3).

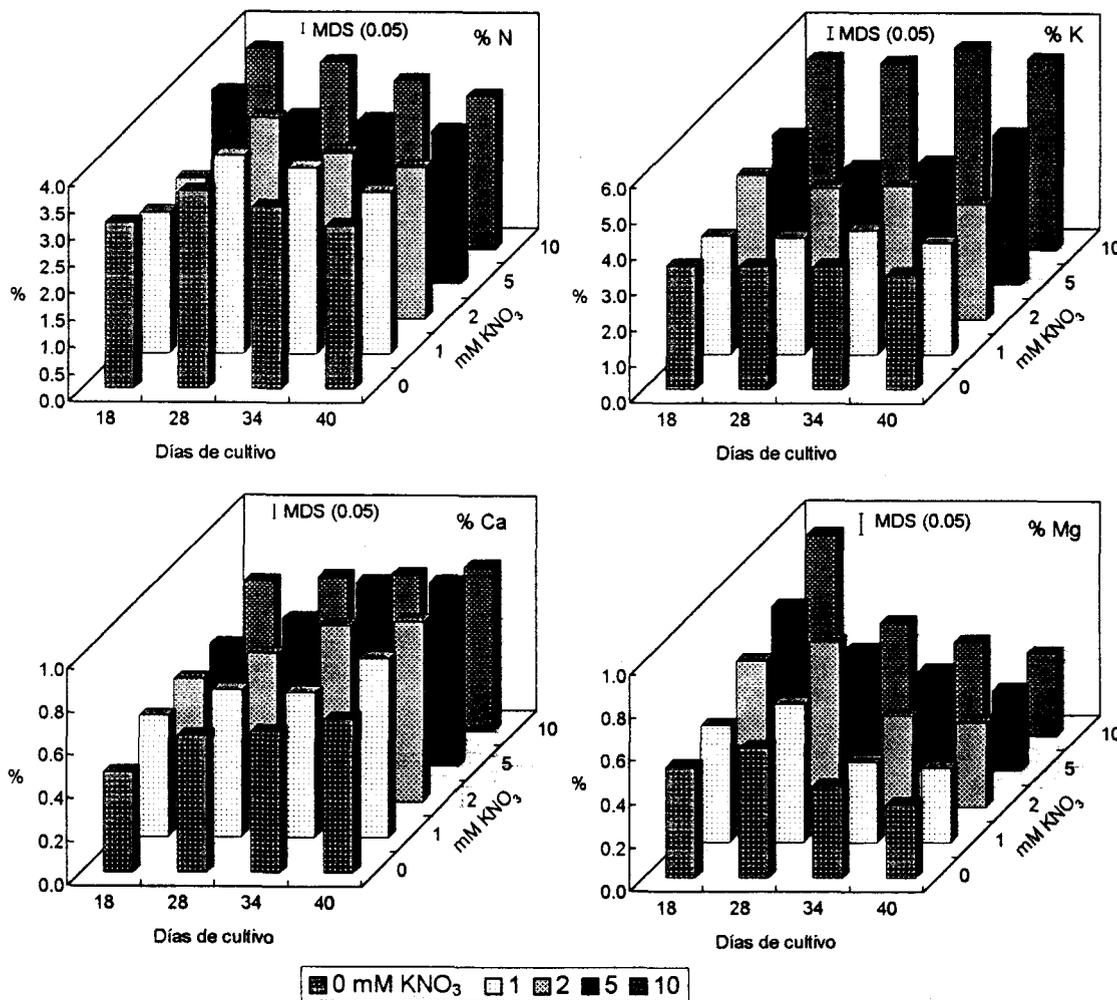


Figura 7.1. Concentración de N, K, Ca y Mg en porcentaje de peso seco, en parte aérea de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa en simbiosis con *Rhizobium tropici* CIAT899, durante el desarrollo del cultivo con cinco dosis de KNO_3 .

La concentración de calcio en parte aérea fue 7 veces inferior a la de nitrógeno (figura 7.1). Este elemento aumentó en el tiempo con el crecimiento de la planta independientemente del tratamiento con nitrato, obteniéndose los valores más altos en el

último muestreo (día 40 de cultivo) en fructificación. En este muestreo, el incremento fue en torno al 50% con 1, 2 y 5 mM de nitrato, semejante al tratamiento testigo (0 mM KNO_3) y sólo del 10% con 10 mM de KNO_3 . De hecho, se apreció también un aumento del calcio con las dosis de KNO_3 , registrándose el porcentaje de incremento más alto en el primer muestreo con 10 mM KNO_3 (52%).

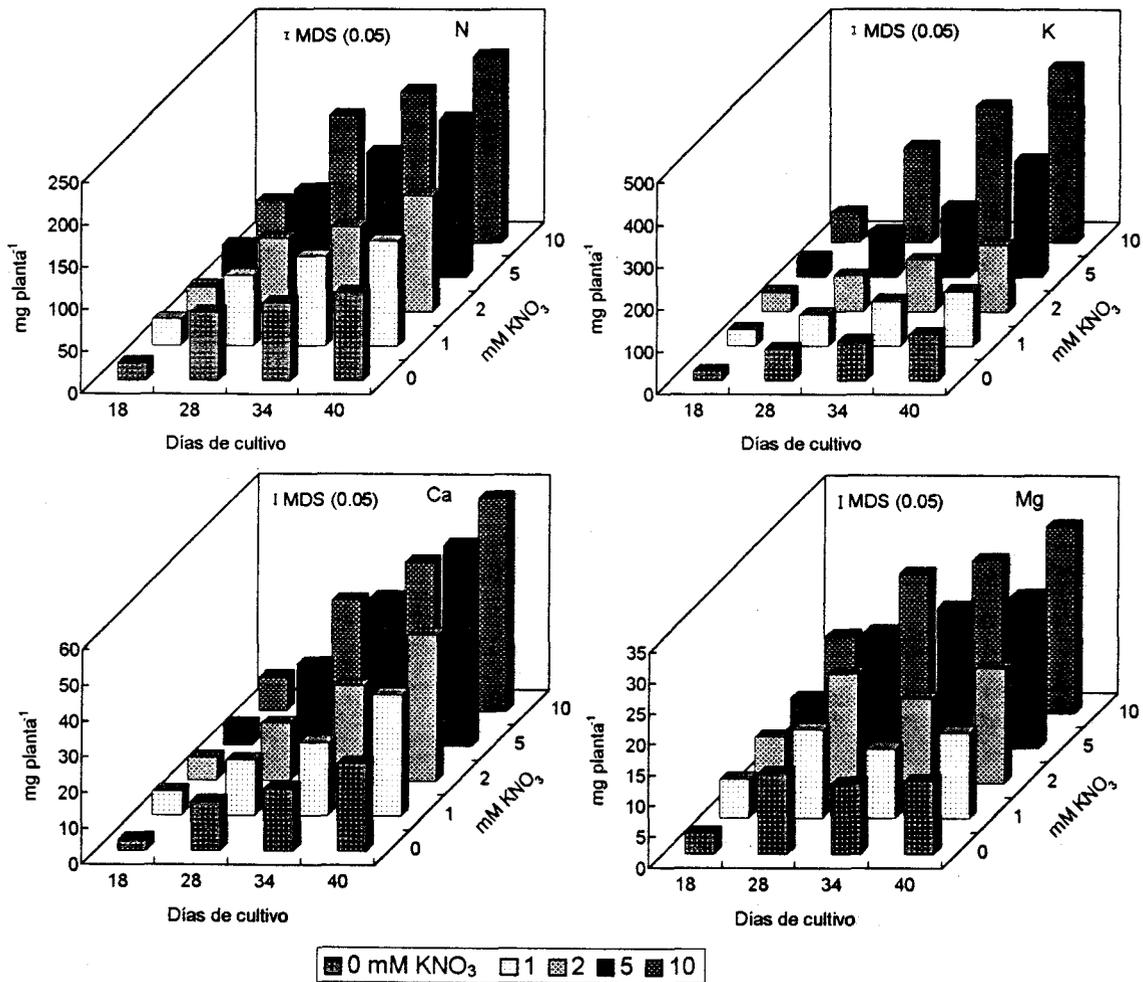


Figura 7.2. Contenido de N, K, Ca y Mg en mg planta⁻¹ en parte aérea, en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa en simbiosis con *Rhizobium tropici* CIAT899, durante el desarrollo del cultivo con cinco dosis de KNO_3 .

El estudio de la varianza (tabla A 7.2) indica que la variabilidad detectada viene condicionada en un 50% por el tiempo de cultivo, participando el tratamiento y la interacción tiempo x tratamiento en igual proporción. Además, el calcio en parte aérea (%) se correlacionó positivamente con el contenido de ureidos en nódulos y con algunas enzimas del metabolismo nodular estudiadas (tabla 7.3).

En presencia de nitrato en el medio, la tendencia fue la misma en el contenido total, expresado en mg planta^{-1} (figura 7.2), pero con porcentajes de incremento muy superiores, siendo muy evidente con 5 mM de KNO_3 ya que se multiplica por 9 el Ca al final del cultivo (40 días).

La evolución de la concentración de magnesio en el tiempo en parte aérea fue similar a la descrita para el nitrógeno (figura 7.1), con un máximo al inicio de floración (28 días de cultivo), para descender en fructificación, y con el máximo en el primer muestreo en las plantas tratadas con 5 y 10 mM de nitrato. No hubo diferencias significativas entre el control y 1 mM KNO_3 . En algunos muestreos, este elemento se acumuló con las dosis más altas de nitrato, en el primero con 10 mM casi se duplica el porcentaje de Mg respecto al testigo. En mg planta^{-1} (figura 7.2), el contenido de magnesio aumentó con el desarrollo del cultivo en todos los tratamientos, y se acumuló de forma significativa en todas las recogidas con 2, 5 y 10 mM KNO_3 . El estudio de los coeficientes de correlación (tablas 7.2 y 7.3) indican que el magnesio presenta correlación con los mismos parámetros que los descritos para el calcio pero con distinto signo. Así, se correlacionó negativamente con los parámetros de crecimiento (excepto RPA), y positivamente con el contenido de ureidos en nódulos y enzimas de la asimilación del amonio. Además, el tiempo de cultivo fue la fuente de variación que tuvo más efecto sobre este parámetro en parte aérea, siendo responsable del 65% de la variabilidad observada (tabla A 7.2)

El potasio, expresado en porcentaje de peso seco, fue el elemento más abundante en parte aérea, seguido del nitrógeno (figura 7.1). Este elemento se mantuvo estable a lo largo del desarrollo del cultivo. Se observó una acumulación significativa del potasio en parte aérea con 2, 5 y 10 mM KNO_3 en el primer muestreo. En el último el incremento llegó al 64% con 10 mM. La tendencia obtenida cuando se expresó en mg planta^{-1} fue similar a la comentada para los demás elementos (figura 7.2), aumentando en el tiempo e incrementándose con el nitrato en el medio. Este elemento, al igual que el Ca, exhibió una correlación negativa con las enzimas del amonio (GS y GOGAT) y con el contenido de ureidos en nódulos (tabla 7.3). El análisis de la varianza (tabla A 7.2) indica que la mayor parte de la variabilidad apreciada puede asignarse al efecto del tratamiento (88%).

Hay que comentar que, expresados en porcentaje, el magnesio fue el único elemento que se correlacionó positiva y significativamente con el nitrógeno, mientras que con el calcio lo hizo negativamente. También se apreciaron correlaciones negativas entre el potasio y el magnesio de parte aérea y algunos parámetros de fijación de nitrógeno (tabla 7.2).

7.1.2. En raíces.

La concentración de nitrógeno detectada en raíz fue 20-40% inferior a la detectada en parte aérea, según la dosis de nitrato en el medio y el muestreo realizado (figura 7.3). Este elemento mantuvo las concentraciones estables en el tiempo de cultivo, sin grandes oscilaciones, independientemente del tratamiento con KNO_3 . Sin embargo, con las dosis altas de nitrato, el nitrógeno en raíz tendió a incrementarse, especialmente en la última recogida que se incrementó un 30% con 2 mM KNO_3 respecto al control. Este aumento del nitrógeno al final del tiempo de experimentación no se evidenció en parte aérea. Cuando el resultado fue expresado en mg planta^{-1} (figura 7.4), el comentario puede ser similar al descrito en parte aérea, aumentando con el crecimiento del cultivo, y alcanzando aumentos que oscilan entre el 180-270% según las distintas dosis de nitrato.

La concentración de calcio en raíz (%) es menor que en parte aérea (figura 7.3), aún cuando la diferencia, que se puede establecer entre 15-25%, en la segunda recogida podría llegar a ser de algo más del 40%. En cuanto al efecto del nitrato, se observó que con las dosis más altas se incrementó la concentración de calcio, especialmente a los 40 días de cultivo, con 5 y 10 mM KNO_3 los porcentajes de aumento fueron del 40 y 73% respectivamente. En general, este elemento aumentó en el tiempo, especialmente con 5 y 10 mM KNO_3 , detectándose que la concentración de Ca aumentó casi 2 veces entre el primer y el último muestreo. Expresado en mg planta^{-1} (figura 7.4), se visualiza un comportamiento similar al descrito para el nitrógeno, aunque el incremento del contenido de Ca en raíz con el tiempo de cultivo se intensificó. De hecho, las plantas con 1 y 2 mM KNO_3 multiplicaron por 2.5 el calcio en raíz, similar al tratamiento testigo, mientras que con 5 y 10 mM la acumulación del Ca en raíz fue 4 veces mayor en la última recogida (40 días de cultivo) respecto a la primera (18 días de cultivo). El porcentaje de calcio en raíz se correlacionó negativa y significativamente ($P \leq 0.001$) al

igual que el nitrógeno con las enzimas estudiadas (GS, GOGAT, XDH y uricasa) y con los parámetros de crecimiento (tabla 7.2 y 7.3).

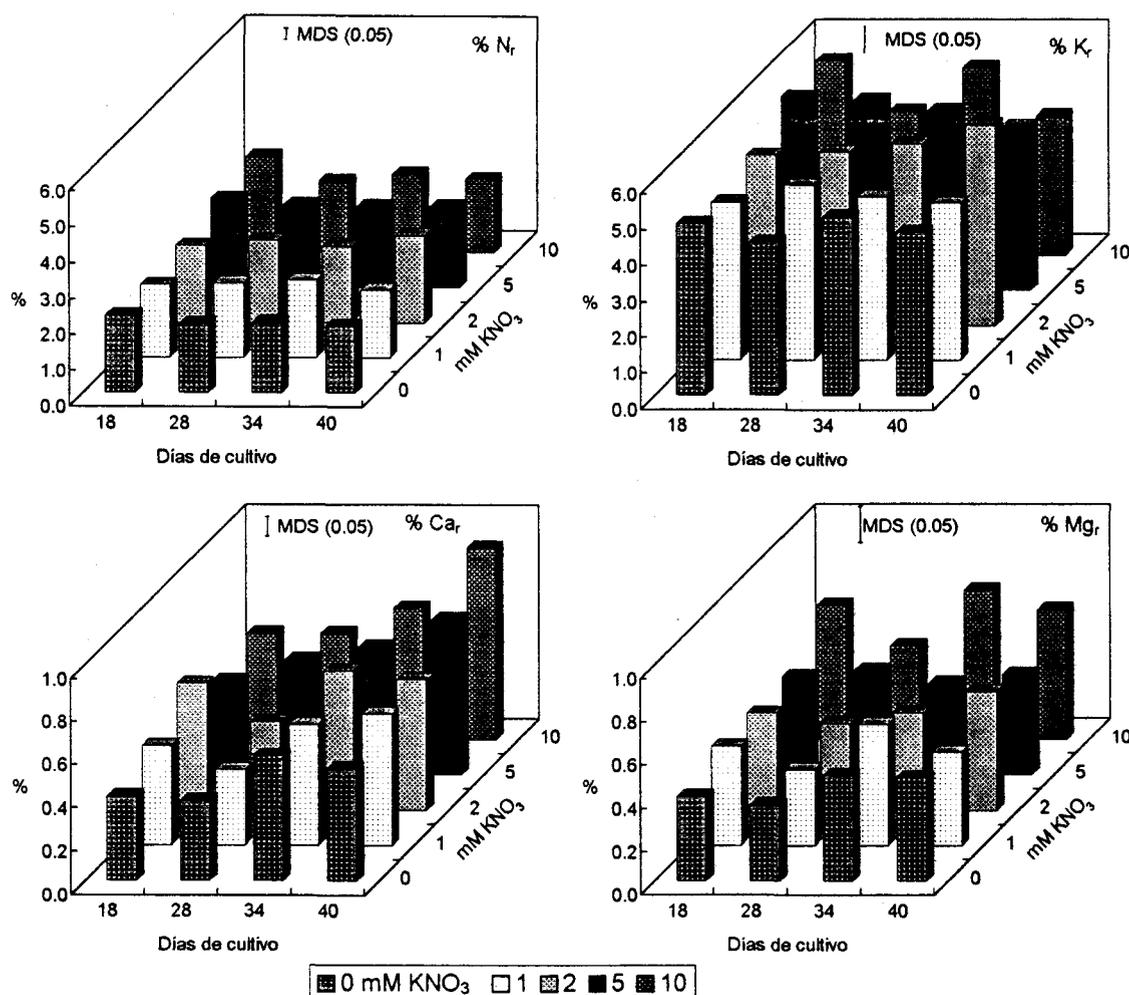


Figura 7.3. Concentración de N, K, Ca y Mg en porcentaje de peso seco, en raíces de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa en simbiosis con *Rhizobium tropici* CIAT899, durante el desarrollo del cultivo con cinco dosis de KNO₃.

El efecto curioso que se observa al estudiar el porcentaje de magnesio en raíz, es que durante el crecimiento vegetativo (primera y segunda recogida) es mayor en parte aérea que en raíz, mientras que en el reproductor (tercera y cuarta recogida) es mayor en raíz, en porcentajes variables dependiendo de la dosis de nitrato y del muestreo realizado (figura 7.3). La concentración de magnesio en raíz disminuyó al inicio de floración en la mayoría de los tratamientos con KNO₃, contrariamente a lo que ocurría en parte aérea, donde en esta misma recogida se registró la concentración más alta de magnesio en los tres primeros tratamientos con nitrato. La presencia de KNO₃ en el

medio favorece el aumento de la concentración de magnesio, en concreto con 10 mM provoca un incremento del 30-60%. En mg planta^{-1} (figura 7.4), la acumulación de magnesio fue similar a la de calcio, tanto en datos numéricos como en respuesta. Sin embargo, mientras los valores de calcio al final del cultivo (40 días) representaban entre 2.5 y 4 veces los obtenidos al inicio (día 18 de cultivo) dependiendo de la dosis de nitrato, las de magnesio en raíz no presentan incrementos tan espectaculares, aún cuando el contenido de Mg al final del cultivo es 2-3 veces lo obtenido en el primer muestreo.

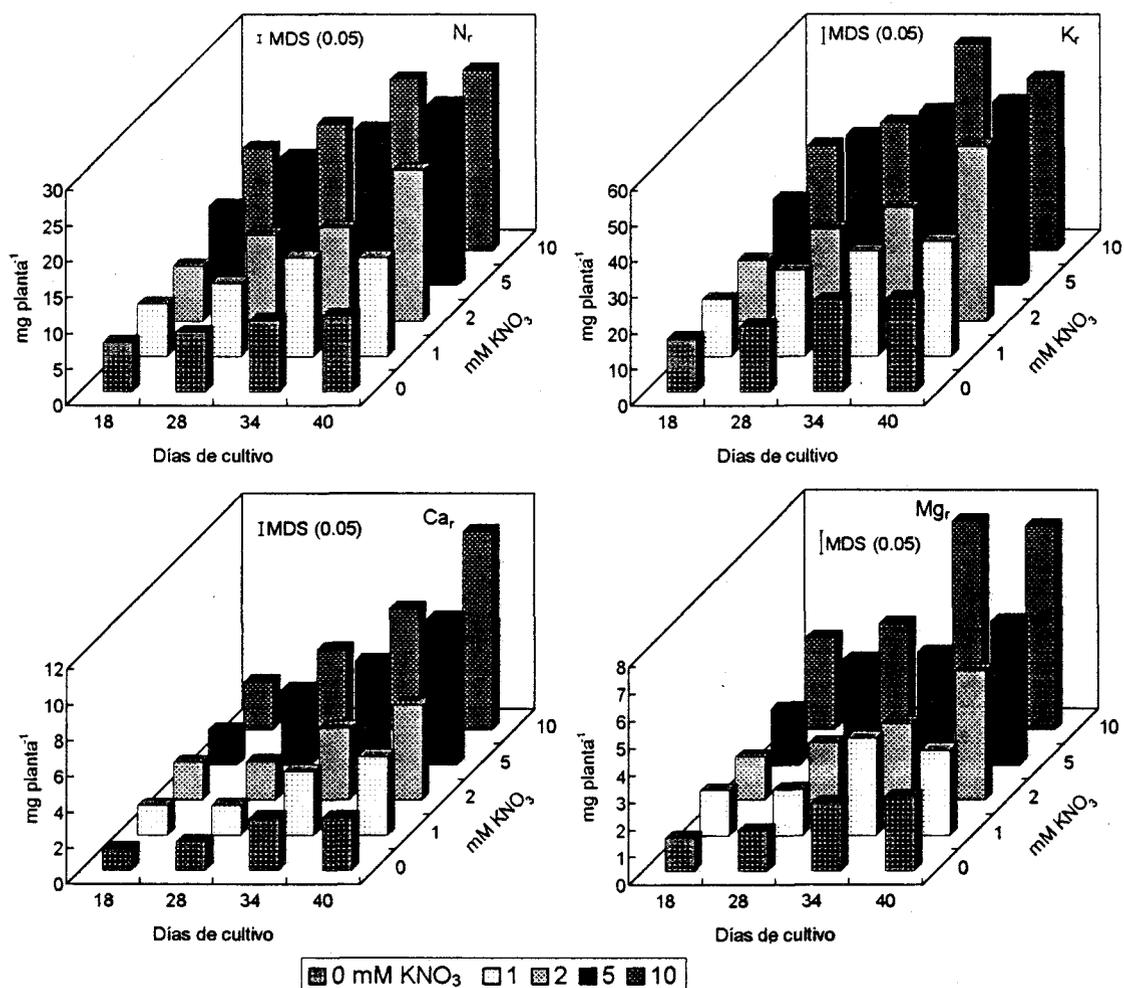


Figura 7.4. Contenido de N, K, Ca y Mg en mg planta^{-1} , en raíces de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa en simbiosis con *Rhizobium tropici* CIAT899, durante el desarrollo del cultivo con cinco dosis de KNO_3 .

La concentración de potasio en raíces (figura 7.3) fue, en general, superior a la de parte aérea, siendo el elemento mayoritario en este órgano representando, excepto

dosis y muestreos particulares, entre el 40-60% más que en parte aérea. Se observó una estabilidad en el tiempo, sin grandes variaciones, al igual que en parte aérea. En presencia de KNO_3 en el medio, el potasio no se afectó significativamente ya que no se apreciaron variaciones con las distintas dosis de KNO_3 . En mg planta^{-1} (figura 7.4), el potasio fue el elemento mayoritario en raíces, con porcentajes de incremento en presencia de 5 y 10 mM KNO_3 alrededor del 200% respecto al control. Sin embargo, al comparar el incremento del potasio en parte aérea y en raíz en el tiempo de experimentación respecto al obtenido en el primer muestreo, se aprecia que en parte aérea se obtienen incrementos entre 3-6 veces dependiendo de la dosis de nitrato, y en raíz los incrementos son de 1.5-3 veces.

Al observar los coeficientes de correlación, se aprecia que el porcentaje de calcio radical se correlacionó positiva y significativamente con el calcio foliar y el magnesio radical, mientras que lo hizo negativamente con el nitrógeno y el magnesio foliares. Además, el Mg radical se correlacionó con el K de la parte aérea y por último el N de raíz se correlacionó positivamente con el Mg foliar y negativamente con el K radical (tabla 7.2).

7.1.3. Eficiencia en el uso de los elementos.

Este parámetro, que relaciona la parte aérea producida y la absorción de nutrientes por la planta completa, refleja la eficiencia en el uso de los elementos estudiados anteriormente en estas plantas y en estas condiciones de fertilización nitrogenada. Los datos se pueden ver en la tabla 7.1, incluida en este apartado.

Se pudo apreciar que la eficiencia en el uso del calcio tendió a disminuir con la edad del cultivo en todos los tratamientos con nitrato. La presencia de nitrato en el medio disminuyó también este parámetro respecto al control entre 11-30% con 10 mM KNO_3 . Sin embargo, no se registraron diferencias significativas entre las distintas dosis de nitrato en los tres últimos muestreos. En cuanto a los demás elementos, nitrógeno, magnesio y potasio, la eficiencia en el uso de estos elementos fue en aumento con el crecimiento de la planta, con todos los tratamientos durante el periodo de fructificación, donde se registró la mayor eficiencia. El nitrato no pareció afectar significativamente este parámetro, salvo la dosis de 10 mM KNO_3 , que en el caso del magnesio, disminuyó en el periodo vegetativo, y en el caso del potasio, descendió en todos los muestreos.

Tabla 7.1. Eficiencia en el uso del N, Ca, Mg y K expresado en g PSPA g⁻¹ nutrientes, en plantas de *Phaseolus vulgaris* var Africa en simbiosis con *Rhizobium tropici* CIAT899, durante el desarrollo del cultivo y con cinco dosis de KNO₃.

Días	KNO ₃ (mM)	Efc. N	Efc. Ca	Efc. Mg	Efc. K
18	0	24.2	156	143	17.5
	1	30.7	142	149	21.5
	2	30.1	131	121	17.8
	5	21.7	132	104	15.5
	10	20.9	111	84	13.3
28	0	24.5	143	151	23.2
	1	24.2	132	140	23.2
	2	23.5	127	136	20.9
	5	27.2	122	176	21.9
	10	25.8	121	228	16.6
34	0	26.4	132	155	22.7
	1	25.5	127	165	22.6
	2	28.7	106	184	21.3
	5	28.6	102	253	22.6
	10	28.3	118	253	15.1
40	0	29.8	125	194	25.2
	1	29.9	107	229	25.5
	2	30.7	105	247	23.5
	5	30.9	102	322	20.2
	10	31.6	109	344	16.9
MDS (0.05)		1.3	10	16	1.3

Tabla 7.2. Matriz de correlación simple entre variables relacionadas con el crecimiento, fijación de nitrógeno y contenido de macronutrientes, determinadas en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa en simbiosis con *Rhizobium tropici* CIAT899 durante el desarrollo del cultivo con cinco dosis de KNO₃. El símbolo del elemento indica el contenido en parte aérea; con "r" indica el contenido en raíz.

	PSPA	PSR	PSP	RPA	SF	PSN	PNN	ARA	ARAP	Ca%	Mg%	N%	K%	Ca% _r	Mg% _r	N% _r	K% _r	
PSPA	1.00																	
PSR	0.96	1.00																
PSPA	1.00	0.96	1.00															
RPA	-0.73	-0.60	-0.74	1.00														
SF	0.97	0.94	0.97	-0.68	1.00													
PSN	0.21	0.01	0.23	-0.65	0.14	1.00												
PNN	-0.38	-0.59	-0.37	-0.23	-0.41	0.74	1.00											
ARA	-0.61	-0.65	-0.61	0.05	-0.64	0.12	0.58	1.00										
ARAP	-0.25	-0.40	-0.24	-0.39	-0.29	0.63	0.84	0.79	1.00									
Ca%	0.78	0.76	0.79	-0.73	0.69	0.45	-0.18	-0.40	-0.05	1.00								
Mg%	-0.62	-0.47	-0.62	0.66	-0.60	-0.54	-0.15	0.42	-0.05	-0.44	1.00							
N%	-0.34	-0.29	-0.33	0.14	-0.34	-0.04	0.12	0.54	0.46	-0.18	0.52	1.00						
K%	0.36	0.48	0.34	0.10	0.42	-0.64	-0.77	-0.40	-0.58	0.09	0.24	0.08	1.00					
Ca% _r	0.80	0.76	0.80	-0.47	0.81	0.09	-0.40	-0.67	-0.42	0.61	-0.54	-0.59	0.37	1.00				
Mg% _r	0.44	0.52	0.43	-0.08	0.54	-0.28	-0.58	-0.50	-0.50	0.24	-0.12	-0.20	0.64	0.57	1.00			
N% _r	-0.13	0.07	-0.12	0.51	-0.13	-0.44	-0.53	-0.16	-0.44	0.04	0.58	0.17	0.28	-0.03	0.36	1.00		
K% _r	-0.25	-0.11	-0.23	0.31	-0.22	-0.13	-0.17	0.01	-0.12	0.05	0.33	0.12	-0.09	-0.17	0.26	0.73	1.00	

Valor crítico
P ≤ 0.05 0.01 0.001
0.44 0.56 0.68

Tabla 7.3. Matriz de correlación simple entre variables relacionadas con el metabolismo nitrogenado, síntesis de ureidos y contenido de macronutrientes, determinadas en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa en simbiosis con *Rhizobium tropici* CIAT899 durante el desarrollo del cultivo con cinco dosis de KNO₃. El símbolo del elemento indica el contenido en parte aérea; con "r" indica el contenido en raíz. GG, glutamato sintasa; GS, glutamina sintetasa; XDH, xantina deshidrogenasa; URIC, uricasa; PRT, proteína soluble en el citosol nodular; ALNn, alantoina en nódulos; ALCn, ácido alantoico en nódulos; Ureid.n, ureidos en nódulos; ALNs, alantoina en savia; ALCs, ácido alantoico en savia; Ureid.s, ureidos en savia; AAs, aminoácidos en savia; NITs, nitratos en savia; RU, abundancia relativa de ureidos en savia.

	GS	GG	XDH	URIC	PRT	ALCn	ALNn	Ureid.n	ALCs	ALNs	Ureid.s	AAs	NITs	RU	Ca%	Mg%	N%	K%	Ca%r	Mg%r	N%r	K%r	
GS	1.00																						
GG	0.87	1.00																					
XDH	0.77	0.63	1.00																				
URIC	0.48	0.31	0.69	1.00																			
PRT	0.45	0.29	0.66	0.53	1.00																		
ALCn	0.87	0.76	0.84	0.61	0.51	1.00																	
ALNn	0.30	0.15	0.63	0.48	0.73	0.32	1.00																
Ureid.n	0.86	0.75	0.88	0.64	0.59	0.99	0.44	1.00															
ALCs	0.34	0.31	-0.04	-0.25	-0.19	0.07	-0.33	0.02	1.00														
ALNs	0.37	0.35	0.01	-0.27	-0.20	0.10	-0.32	0.05	0.97	1.00													
Ureid.s	0.35	0.32	-0.02	-0.26	-0.19	0.08	-0.33	0.03	1.00	0.99	1.00												
AAs	-0.19	-0.27	-0.08	-0.09	0.07	-0.34	0.39	-0.27	0.25	0.22	0.24	1.00											
NITs	-0.48	-0.46	-0.02	0.14	-0.06	-0.31	0.40	-0.24	-0.73	-0.64	-0.70	0.20	1.00										
RU	0.48	0.44	0.05	-0.12	-0.04	0.31	-0.38	0.24	0.84	0.76	0.82	-0.13	-0.97	1.00									
Ca%	-0.54	-0.21	-0.62	-0.33	-0.73	-0.50	-0.49	-0.54	0.08	0.07	0.08	0.04	0.15	-0.05	1.00								
Mg%	0.46	0.29	0.77	0.72	0.58	0.62	0.78	0.70	-0.43	-0.39	-0.42	0.17	0.46	-0.43	-0.44	1.00							
N%	0.49	0.48	0.50	0.20	0.31	0.40	0.50	0.45	0.13	0.25	0.17	0.31	0.23	-0.16	-0.18	0.52	1.00						
K%	-0.52	-0.54	-0.26	-0.06	-0.08	-0.34	0.10	-0.30	-0.62	-0.50	-0.58	0.18	0.82	-0.83	0.09	0.24	0.08	1.00					
Ca%r	-0.76	-0.70	-0.73	-0.36	-0.62	-0.66	-0.62	-0.71	0.05	0.02	0.04	0.09	0.15	-0.09	0.61	-0.54	-0.59	0.37	1.00				
Mg%r	-0.70	-0.73	-0.48	-0.42	-0.42	-0.61	-0.13	-0.59	-0.23	-0.20	-0.22	0.48	0.57	-0.50	0.24	-0.12	-0.20	0.64	0.57	1.00			
N%r	-0.11	-0.13	0.31	0.46	0.23	0.10	0.42	0.15	-0.50	-0.50	-0.50	0.28	0.62	-0.57	0.04	0.58	0.17	0.28	-0.03	0.36	1.00		
K%r	0.02	-0.03	0.29	0.24	-0.04	0.06	0.26	0.09	-0.21	-0.25	-0.23	0.21	0.40	-0.30	0.05	0.33	0.12	-0.09	-0.17	0.26	0.73	1.00	

Valor crítico			
P ≤	0.05	0.01	0.001
	0.44	0.56	0.68

7.2. Efecto del NaCl aplicado en el periodo vegetativo sobre el contenido de macronutrientes en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa.

Se ha seguido la evolución de la concentración de diferentes nutrientes en parte aérea y raíz de la simbiosis *Phaseolus vulgaris* var. Africa-*Rhizobium tropici* CIAT899 por efecto de distintos niveles de NaCl en el periodo vegetativo, adicionado cuando ya el proceso de nodulación de la simbiosis está establecido, según el sistema de cultivo del experimento 5. Los porcentajes de nutrientes se recogen en la figura 7.5 y se exponen en la tabla A 7.7 del apéndice. El contenido en mg de elemento por planta se recopila en la figura 7.6 y en la tabla A 7.10 del apéndice. El análisis de la varianza también se encuentra en el apéndice.

7.2.1. En parte aérea.

La concentración de nitrógeno, en porcentaje de peso seco, en parte aérea mostró un máximo al inicio de floración, tanto en el control como con 25 mM NaCl y desapareció con las otras dosis de sal (figura 7.5). El efecto del estrés salino sobre el porcentaje de este elemento no tuvo una respuesta clara ni registró grandes variaciones. Con 25 mM NaCl en las 3 últimas recogidas, incrementó entre 4-12% respecto al control.

Cuando el resultado fue expresado en mg de elemento por planta (figura 7.6), se observó que en los dos primeros muestreos, 100 mM NaCl fue la única dosis que disminuyó significativamente el contenido de N, alrededor del 15%, mientras que a los 9 y 12 DdT, todas las concentraciones de sal redujeron este parámetro significativamente, detectándose reducciones del 40 y 28% respecto al testigo. Sin embargo, a lo largo del tiempo de cultivo se observó que el contenido de N aumentó, llegando a ser en la última recogida casi el doble respecto a la primera, tanto en las plantas control como en las tratadas con 25 mM, mientras que en las tratadas con las dosis más altas (50 y 100 mM), el incremento a lo largo del tiempo fue algo menor (30-60 %). La interacción tiempo de cultivo x tratamiento fue la fuente de variación que tuvo más efecto sobre el contenido de nitrógeno en porcentaje en parte aérea, siendo responsable del 60% de la variabilidad detectada (tabla A 7.8).

Al estudiar el diagrama de barras correspondiente a la concentración de fósforo (figura 7.5), se observa que no se alteró significativamente con 25 mM en los tres

primeros muestreos, mientras que en el último disminuyó un 17%. La respuesta de este elemento a la sal tampoco fue muy clara, tal como se ha comentado para el N, ya que con 50 mM NaCl, se incrementó en las 3 primeras recogidas (6-22%), y descendió un 10% a los 12 DdT con esta misma dosis de sal.

En mg planta^{-1} (figura 7.6), este elemento se comportó de forma similar al N expresado en esta misma unidad. El tiempo de cultivo favoreció la acumulación de fósforo en la parte aérea, en el tratamiento testigo se duplica el valor y con las diferentes dosis crecientes de sal se obtienen incrementos del 62, 35 y 70% respectivamente. Además, el efecto negativo de la sal sólo se evidenció en las plantas con 100 mM NaCl desde la primera recogida, en crecimiento vegetativo, y con dosis inferiores a partir de la tercera recogida, ya en la primera etapa reproductora.

Otro de los macronutrientes que se muestra en la figura 7.5 es el potasio, que en parte aérea fue el elemento mayoritario en porcentaje respecto a los demás nutrientes estudiados, seguido del nitrógeno. Ya desde el primer muestreo se observó que 50 mM NaCl provocó un aumento significativo de la concentración de potasio, que se mantuvo en los demás muestreos realizados. Este aumento de potasio por la sal también se evidenció en las plantas tratadas con 25 y 100 mM, aunque no fueron significativos respecto al control en la primera recogida. En las siguientes, sí fue significativo, llegando incluso a incrementos del 15% con 25 mM, y algo menos con 50 y 100 mM NaCl en el medio de cultivo. El contenido de potasio expresado en mg planta^{-1} (figura 7.6) presentó un comportamiento diferente al descrito. La evolución en el tiempo de experimentación indica que se acumula en la parte aérea, lográndose aumentos del 55-60% en las plantas con tratamientos salinos frente al 80% alcanzado en las control. Además, la dosis de 50 mM obtuvo los máximos valores, al menos en las dos primeras recogidas, mientras que el resto de los tratamientos obtuvieron valores semejantes al control. Sin embargo, en las recogidas correspondientes al crecimiento reproductor (tercera y cuarta) todos los tratamientos salinos redujeron significativamente el contenido de potasio en parte aérea respecto a las plantas control, reducciones que se intensificaron con la dosis de sal en el medio. En el análisis de la varianza (tabla A 7.8) se detecta que la mayor parte de la variabilidad apreciada en el porcentaje de potasio puede asignarse al efecto del tratamiento salino (75%). Es importante destacar que el

porcentaje de potasio en parte aérea se correlacionó negativamente ($P \leq 0.001$) con la actividad nitrogenasa mientras que en raíces lo hizo positivamente ($P \leq 0.001$; tabla 7.5).

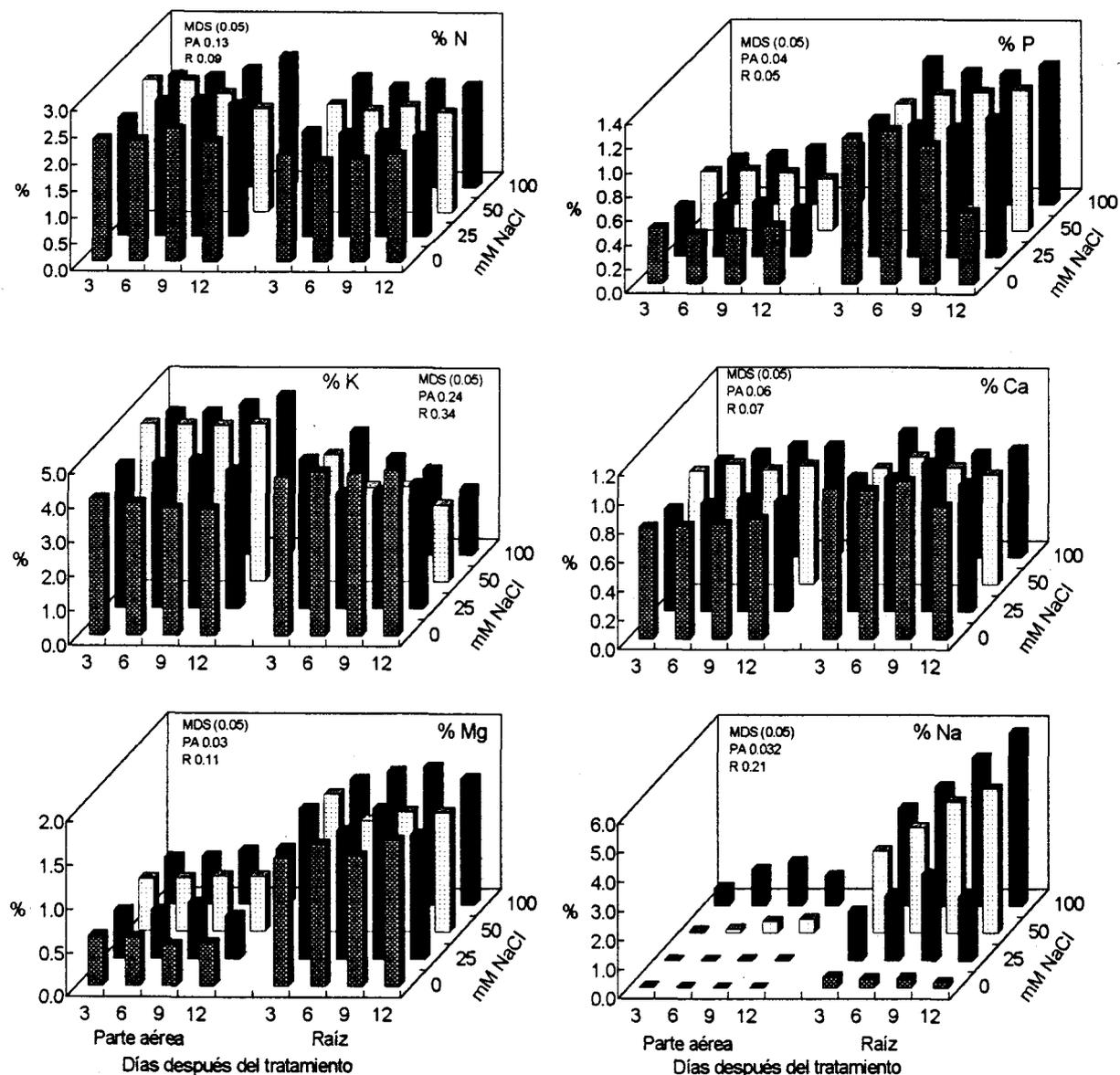


Figura 7.5. Concentración de N, P, K, Ca, Mg y Na como porcentaje de peso seco en parte aérea y raíz de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa en simbiosis con *Rhizobium tropici* CIAT899 tratadas con cuatro dosis de NaCl el periodo vegetativo.

La concentración de calcio en parte aérea no se modificó significativamente por el estrés salino, excepto con 100 mM NaCl a los 3 DdT, que disminuyó el porcentaje de este elemento un 13% respecto al control. A lo largo del tiempo de experimentación, en

ese tratamiento se produjo un aumento del 15% (figura 7.5). Cuando el calcio se expresa en mg planta^{-1} (figura 7.6), se hace más evidente la reducción de este elemento con la sal, ya que en los dos últimos muestreos, todas las dosis de sal disminuyeron significativamente este parámetro, siendo más evidente con 100 mM NaCl, que provocó una disminución del 20% (primera y segunda recogida), del 35% (tercera) y del 40% (última). Sin embargo, de nuevo se aprecia que en el tiempo de cultivo aumentó el contenido de calcio, que se duplica en el control y con 25 mM NaCl, y se incrementa entre un 60-70% con las otras dosis de sal. Se aprecia que el porcentaje de este elemento en parte aérea fue el único que se correlaciona positiva y significativamente con el crecimiento de la planta (tabla 7.5).

Otro macronutriente catiónico que se determinó en parte aérea fue el magnesio. Los valores que se obtuvieron, aun cuando no presentan variaciones importantes, no exhibe una respuesta fácil de comentar. Así, en las dos primeras recogidas no hubo cambios significativos. Sin embargo, a los 9 DdT se apreció una acumulación del 25% de este elemento con todos los tratamientos salinos, y a los 12 DdT con 50 y 100 mM NaCl incluso llegan al 35% respecto al control (figura 7.5). El contenido de magnesio en mg por planta (figura 7.6) disminuyó significativamente con 100 mM NaCl en todas las recogidas, mientras que 50 mM parece no afectar al contenido de este elemento. Incluso la acumulación inducida por el tiempo de experimentación fue semejante en todos los tratamientos ensayados, incluido el control. El porcentaje de magnesio en parte aérea se correlacionó negativamente ($P \leq 0.01$) con la actividad nitrogenasa (tabla 7.5).

Por último, se determinó la concentración de sodio, que fue minoritario en plantas control (figura 7.5). La dosis de 25 mM NaCl provocó variaciones poco significativas en los niveles de sodio en parte aérea en el tratamiento control, tanto cuando se expresa en porcentaje de peso seco (figura 7.5) como en mg planta^{-1} (figura 7.6). Sólo en la acumulación a lo largo del tiempo de experimentación se detectan diferencias. La dosis de 50 mM NaCl produjo acumulaciones severas desde la primera recogida que se duplica, hasta la última que se multiplica por 10, en ambas formas de expresar el contenido de Na, siendo semejante la acumulación del Na en el tiempo de cultivo en ambas figuras (7.5 y 7.6). Con 100 mM, se incrementó de forma espectacular, pasando de 0.003% en plantas control a 1.49% con 100 mM a los 9 DdT. Esta misma

respuesta a la sal se observó cuando el sodio se expresa en mg planta^{-1} (figura 7.6). El sodio de los dos órganos de la planta se correlacionó negativamente con la actividad nitrogenasa, según se comprueba en la tabla 7.5.

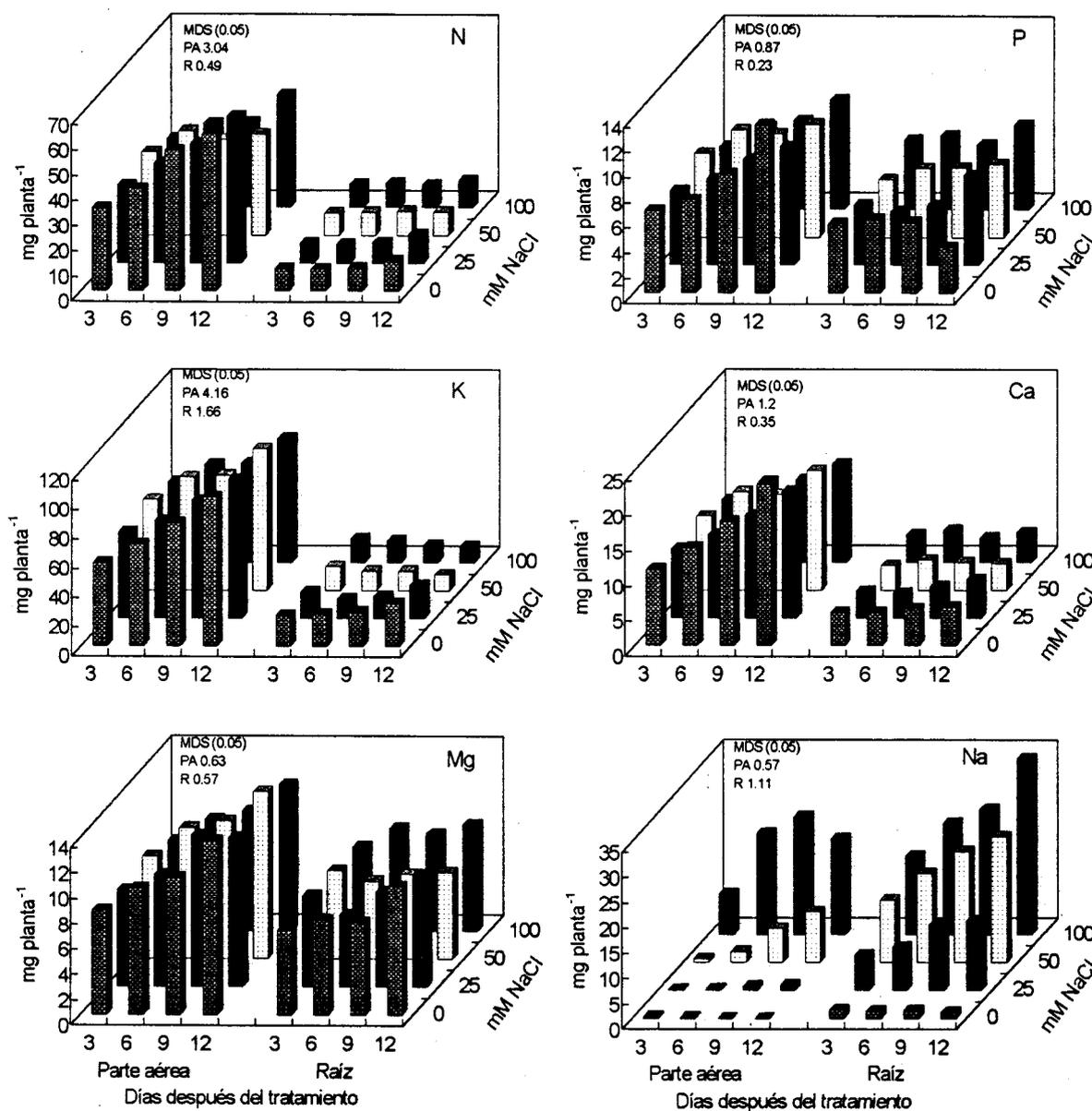


Figura 7.6. Contenido de N, P, K, Ca, Mg y Na en mg planta^{-1} en parte aérea y raíz de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa en simbiosis con *Rhizobium tropici* CIAT899 tratadas con cuatro dosis de NaCl en el periodo vegetativo.

7.2.2. En raíces.

En raíces, el porcentaje de nitrógeno no experimentó variaciones significativas con los tratamientos salinos, excepto el último muestreo (12 DdT), en el que la sal disminuyó significativamente el contenido en este elemento, con porcentajes bajos (6-8%). El nitrógeno se acumuló más en parte aérea, siendo el nitrógeno detectado en raíz el 75-90% del detectado en parte aérea. En mg planta^{-1} (figura 7.6), este elemento disminuyó significativamente con 25 mM en los tres primeros muestreos, mientras que en el último, este descenso fue significativo con 50 y 100 mM NaCl.

A diferencia del nitrógeno, la concentración de fósforo en porcentaje de peso seco, es mayor en raíz que en parte aérea, encontrándose valores 2-3 veces superiores, dependiendo del tiempo de cultivo y la dosis de sal ensayada. Contrariamente a lo observado en parte aérea, en raíces la tendencia del porcentaje de fósforo fue a disminuir un 6-13% con los tratamientos salinos a los 3, 6 y 9 DdT, con porcentajes entre, mientras que en el último muestreo, se observa un incremento de este elemento con el estrés salino. Este mismo comportamiento se obtuvo cuando el resultado fue expresado en mg de elemento por planta, tal como se muestra en la figura 7.6. El tiempo de cultivo provocó que el aumento del fósforo en raíz en el último muestreo (12 DdT) fuese del 50% con 25 mM NaCl y del 20-25% con las otras dosis de sal, mientras que en el tratamiento control se observó una caída de este elemento estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$). El análisis de la varianza (tabla A 7.9) indica que toda la variabilidad observada en el porcentaje de fósforo puede atribuirse a la interacción tiempo de cultivo x tratamiento. Además, este parámetro presenta correlación negativa con los de crecimiento (tabla 7.5).

La respuesta del potasio en porcentaje de peso seco al estrés salino fue totalmente opuesta a la observada en parte aérea (figura 7.5), ya que los tratamientos salinos redujeron la concentración de este elemento significativamente en todos los muestreos, excepto a los 3 DdT con 25 mM NaCl, llegando a disminuir hasta un 60% a los 12 DdT con 100 mM NaCl. El potasio radical en plantas control es superior (20-30%) al detectado en parte aérea, en todo el tiempo de experimentación. Lo contrario ocurre con plantas en condiciones de estrés salino: la parte aérea acumula un 20% con 25 mM, un 40% con 50 mM y hasta un 60% con 100 mM NaCl más que en raíz. El tratamiento fue la fuente de variación que tuvo más efecto sobre el porcentaje de potasio

radical, siendo responsable del 75% de la variabilidad detectada (tabla 7.9). Cuando se estudia el contenido de potasio en mg planta^{-1} (tabla 7.6), también se detecta el efecto negativo de la sal, que se intensifica con la dosis de sal y el tiempo de cultivo, con porcentajes de reducción del orden del 60% en el último muestreo con 50 y 100 mM. Los datos que se obtienen en las tablas 7.5 y 7.6 indican que el porcentaje de este elemento en raíz se correlaciona con los parámetros de fijación de nitrógeno (ARA y ARAP), y con las enzimas del metabolismo del amonio (GS y GOGAT) y de los ureidos.

La sal tendió a disminuir la concentración de calcio en raíces (figura 7.5) en todas las recogidas, y con porcentajes más altos con 50 y 100 mM NaCl (16-34%). Mientras que en plantas con 50 y 100 mM NaCl el porcentaje de calcio es semejante en parte aérea y raíz, en plantas control y con 25 mM NaCl, en raíz se acumula un 30% más que en parte aérea. El porcentaje de calcio se correlaciona positivamente con la nitrogenasa ($P \leq 0.001$) y con el contenido de potasio radical, y negativamente con el K, Mg y Na foliar (tabla 7.5). La reducción de este elemento, expresado en mg planta^{-1} , se pudo apreciar en todos los muestreos y con casi todas las dosis de sal, con porcentajes de disminución parecidos a los observados en el porcentaje de calcio (figura 7.6).

En raíces, la concentración de magnesio en porcentaje de peso seco descendió significativamente con la sal, especialmente a los 12 DdT con reducciones entre 14-18% (figura 7.5). Se aprecia que la concentración de este elemento en raíz es, en general, 2.5-3 veces mayor que la detectada en parte aérea, independientemente del tratamiento y época del cultivo. Cuando se evalúa el magnesio en mg planta^{-1} (figura 7.6), se aprecian porcentajes de reducción con la sal en el último muestreo entre 12-33%.

El porcentaje de sodio radical se incrementó con la sal al igual que en parte aérea, con la diferencia de que este incremento fue significativa desde la dosis más baja de sal. Este efecto también se evidenció con el tiempo de cultivo, pudiéndose comprobar que el aumento fue proporcional a la dosis de sal y a la edad del cultivo. Este parámetro se correlaciona negativamente con la nitrogenasa (tabla 7.5), con las enzimas de asimilación de amonio y con el contenido de ureidos en nódulos (tabla 7.6), y positivamente con el K, Mg y Na foliar. La fuente de variación que tuvo más efecto en el porcentaje de sodio radical fue el tratamiento, responsable del 85% de la variabilidad

obtenida. En mg sodio por planta (figura 7.6) los datos se comportaron de forma similar, llegando a valores entre 9 y 15 veces superiores con 100 mM (figura 7.6).

7.2.3. Eficiencia en el uso de los elementos.

En general, la eficiencia en el uso de los nutrientes, excepto el sodio, no se vio afectada por la presencia de NaCl en el medio. Se registraron algunas disminuciones con la sal significativas estadísticamente, como fue el caso del potasio en el último muestreo con todas las dosis, así como el potasio y el magnesio, a los 9 y 12 DdT. Sin embargo estos porcentajes de reducción por la sal no superaron el 27%. El caso del sodio fue distinto, ya que disminuyó este parámetro entre 3-19 veces con 25 mM NaCl, 6-20 veces con 50 mM y hasta 40 veces con la dosis más alta de sal.

Tabla 7.4. Eficiencia en el uso del N, P, Ca, Mg, K y Na expresado en g PSPA g⁻¹ nutrientes, en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa en simbiosis con *Rhizobium tropici* CIAT899 tratadas con cuatro dosis de NaCl en el estado vegetativo (DdT: días después del tratamiento).

DdT	NaCl (mM)	Efc. N	Efc. P	Efc. K	Efc. Ca	Efc. Mg	Efc. Na
3	0	33.8	117	18.2	90.9	94.8	659
	25	35.5	130	18.2	101.3	93.5	188
	50	32.1	119	17.3	95.7	89.7	102
	100	35.8	126	18.5	102.9	96.8	56
6	0	36.3	136	19.6	95.8	102.0	1059
	25	33.1	141	19.7	101.8	108.1	175
	50	33.2	120	18.6	92.0	102.5	85
	100	37.1	129	19.7	99.7	96.0	39
9	0	34.4	149	21.1	97.5	124.2	1288
	25	32.9	140	19.3	96.4	94.6	133
	50	36.1	125	18.8	98.2	98.2	60
	100	35.6	126	19.3	101.0	90.5	32
12	0	37.1	163	21.0	96.8	115.7	1275
	25	33.5	141	20.0	99.5	113.9	157
	50	42.0	141	19.4	100.6	104.7	60
	100	32.8	119	19.1	99.6	91.8	34
MDS (0.05)		1.7	9	0.9	6.9	4.3	121

Tabla 7.5. Matriz de coeficientes de correlación simple entre variables relacionadas con el crecimiento, fijación de nitrógeno y contenido en macronutrientes en parte aérea y raíz en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899 tratadas con cuatro dosis de NaCl en el periodo vegetativo. El símbolo del elemento seguido de "r" indica en raíz.

	PSPA	PSR	PSP	RPA	PSN	PNN	ARA	ARAP	N%	P%	K%	Ca%	Mg%	Na%	N% _r	P% _r	K% _r	Ca% _r	Mg% _r	Na% _r	
PSPA	1.00																				
PSR	0.70	1.00																			
PSP	1.00	0.76	1.00																		
RPA	-0.76	-0.11	-0.71	1.00																	
PSN	0.92	0.64	0.93	-0.71	1.00																
PNN	0.28	0.21	0.31	-0.20	0.63	1.00															
ARA	0.08	-0.35	0.02	-0.37	0.05	-0.10	1.00														
ARAP	0.56	0.08	0.53	-0.66	0.60	0.29	0.81	1.00													
N%	0.12	-0.08	0.10	-0.30	0.16	0.10	0.41	0.42	1.00												
P%	0.02	-0.01	0.02	-0.05	0.01	0.03	-0.23	-0.19	0.33	1.00											
K%	-0.43	-0.17	-0.41	0.36	-0.42	-0.16	-0.73	-0.83	-0.05	0.46	1.00										
Ca%	0.60	0.28	0.58	-0.63	0.53	0.14	-0.04	0.25	0.25	0.66	0.11	1.00									
Mg%	-0.39	-0.29	-0.38	0.18	-0.34	0.01	-0.54	-0.66	-0.02	0.55	0.84	0.27	1.00								
Na%	-0.17	0.28	-0.12	0.44	-0.14	0.02	-0.56	-0.46	-0.23	0.03	0.23	-0.20	0.18	1.00							
N% _r	-0.24	-0.26	-0.24	0.25	-0.14	0.14	0.20	0.09	-0.01	0.13	-0.22	-0.28	-0.17	-0.33	1.00						
P% _r	-0.55	-0.38	-0.54	0.32	-0.41	0.07	0.00	-0.24	-0.04	-0.40	0.27	-0.36	0.25	0.00	-0.35	1.00					
K% _r	0.20	-0.15	0.16	-0.30	0.20	0.06	0.87	0.80	0.19	-0.23	-0.85	-0.04	-0.65	-0.55	0.46	-0.21	1.00				
Ca% _r	0.16	-0.27	0.12	-0.44	0.22	0.16	0.93	0.85	0.40	-0.24	-0.72	0.02	-0.44	-0.52	0.12	0.07	0.80	1.00			
Mg% _r	0.05	-0.18	0.02	-0.17	0.03	-0.03	0.38	0.32	0.11	-0.07	-0.40	-0.15	-0.14	0.04	0.28	-0.38	0.51	0.34	1.00		
Na% _r	-0.26	0.13	-0.22	0.40	-0.23	-0.01	-0.92	-0.84	-0.27	0.19	0.85	-0.06	0.65	0.58	-0.35	0.21	-0.98	-0.84	-0.41	1.00	

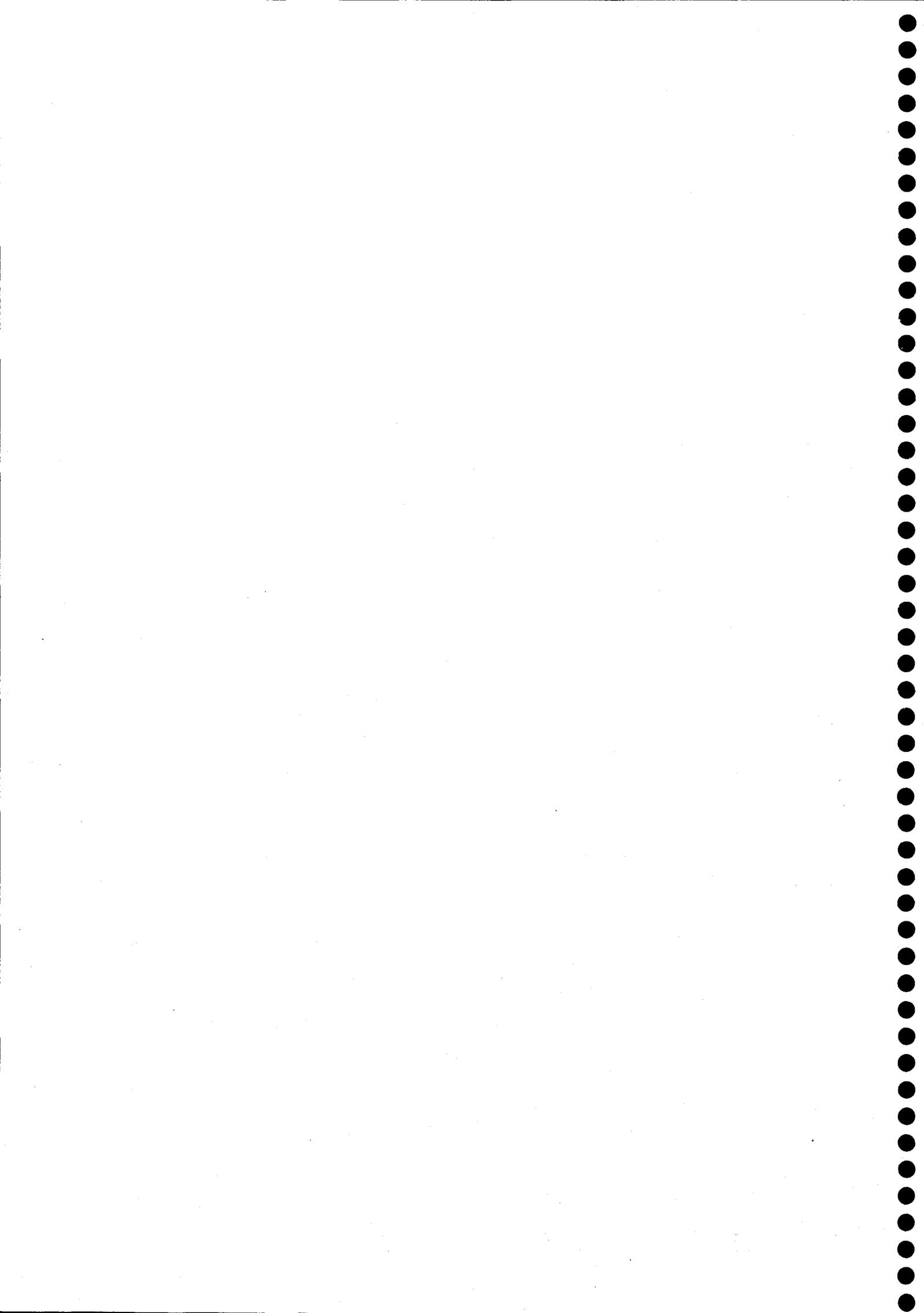
Valor crítico		
P ≤	0.05	0.01
	0.50	0.62
	0.74	

Tabla 7.6. Matriz de coeficientes de correlación simple entre variables relacionadas con la asimilación de amonio, síntesis de ureidos y contenido en macronutrientes en parte aérea y raíz en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899 tratadas con cuatro dosis de NaCl en el periodo vegetativo. El símbolo del elemento seguido de "r" indica en raíz.

	GS	GG	GDH	AAT	XDH	UR	PRT	ALNn	ALCn	Ureid.n	AAAn	AAr	AAh	N%	P%	K%	Ca%	Mg%	Na%	N% _r	P% _r	K% _r	Ca% _r	Mg% _r	Na% _r	
GS	1.00																									
GG	0.91	1.00																								
GDH	0.25	0.44	1.00																							
AAT	0.87	0.93	0.53	1.00																						
XDH	0.91	0.93	0.35	0.90	1.00																					
UR	0.71	0.69	0.38	0.75	0.83	1.00																				
PRT	0.66	0.63	0.05	0.58	0.60	0.46	1.00																			
ALNn	0.44	0.48	0.23	0.46	0.44	0.20	0.25	1.00																		
ALCn	0.94	0.93	0.29	0.87	0.91	0.73	0.58	0.31	1.00																	
Ureid.n	0.95	0.95	0.30	0.88	0.92	0.72	0.59	0.38	1.00	1.00																
AAAn	-0.43	-0.39	-0.15	-0.35	-0.36	-0.06	-0.03	-0.53	-0.42	-0.45	1.00															
AAr	-0.41	-0.41	0.35	-0.22	-0.36	-0.11	-0.20	0.12	-0.53	-0.50	0.05	1.00														
AAh	0.12	0.22	0.61	0.31	0.14	-0.05	-0.19	0.32	0.17	0.19	-0.48	0.27	1.00													
N%	0.24	0.41	-0.05	0.31	0.36	0.12	0.38	0.14	0.34	0.34	0.19	-0.52	0.08	1.00												
P%	-0.26	-0.13	-0.35	-0.17	-0.07	-0.03	0.06	-0.13	-0.11	-0.12	0.16	0.02	-0.22	0.33	1.00											
K%	-0.74	-0.62	-0.32	-0.62	-0.49	-0.32	-0.62	-0.39	-0.61	-0.63	0.45	0.04	-0.34	-0.05	0.46	1.00										
Ca%	-0.07	-0.11	-0.56	-0.23	-0.06	-0.23	0.39	0.08	-0.09	-0.08	-0.09	-0.08	-0.36	0.25	0.66	0.11	1.00									
Mg%	-0.57	-0.46	-0.50	-0.52	-0.38	-0.32	-0.38	-0.45	-0.48	-0.50	0.42	-0.09	-0.54	-0.02	0.55	0.84	0.27	1.00								
Na%	-0.58	-0.64	-0.11	-0.54	-0.62	-0.31	-0.40	-0.79	-0.52	-0.57	0.44	0.30	0.00	-0.23	0.03	0.23	-0.20	0.18	1.00							
N% _r	0.31	0.44	0.41	0.41	0.40	0.48	0.08	0.50	0.31	0.34	-0.16	0.26	0.20	-0.01	0.13	-0.22	-0.28	-0.17	-0.33	1.00						
P% _r	-0.06	-0.03	-0.02	-0.07	-0.11	-0.10	-0.27	-0.33	-0.05	-0.08	0.23	-0.50	-0.33	-0.04	-0.40	0.27	-0.36	0.25	0.00	-0.35	1.00					
K% _r	0.91	0.88	0.36	0.82	0.79	0.55	0.65	0.55	0.83	0.85	-0.56	-0.21	0.33	0.19	-0.23	-0.85	-0.04	-0.65	-0.55	0.46	-0.21	1.00				
Ca% _r	0.84	0.83	0.17	0.79	0.73	0.42	0.73	0.33	0.77	0.78	-0.34	-0.47	0.08	0.40	-0.24	-0.72	0.02	-0.44	-0.52	0.12	0.07	0.80	1.00			
Mg% _r	0.41	0.41	0.18	0.36	0.46	0.29	0.33	0.02	0.39	0.38	-0.13	0.01	0.32	0.11	-0.07	-0.40	-0.15	-0.14	0.04	0.28	-0.38	0.51	0.34	1.00		
Na% _r	-0.91	-0.89	-0.31	-0.82	-0.80	-0.51	-0.69	-0.56	-0.86	-0.88	0.60	0.29	-0.29	-0.27	0.19	0.85	-0.06	0.65	0.58	-0.35	0.21	-0.98	-0.84	-0.41	1.00	

Valor crítico
P≤ 0.05 0.01 0.001
0.50 0.62 0.74

VI. DISCUSSION



DISCUSION

1. Efecto del estrés salino y de la cepa de *Rhizobium* en simbiosis con *Phaseolus vulgaris*.

Los datos de contenido de ureidos, alantoína y ácido alantoico, y la actividad alantoinasa, indican que en las plantas inoculadas con la cepa CIAT899, la disminución del contenido de ác. alantoico es debida a la reducción de la actividad alantoinasa, mientras que el hecho de que el contenido de alantoína no disminuya, indica poca sensibilidad al estrés salino de la actividad xantina deshidrogenasa y uricasa. En las plantas inoculadas con las demás cepas, la disminución del contenido de ureidos se observa tanto en alantoína como en alantoico, lo que indica que, además, del efecto sobre la actividad alantoinasa, debe de haber un efecto de la sal sobre la XDH y uricasa, o bien que el efecto puede ser debido a la enorme sensibilidad de la nitrogenasa a la sal en las cepas RP10 y 980, y el factor limitante de la producción de ureidos sería la nitrogenasa y no las enzimas de la síntesis de ureidos. En CIAT899, el factor limitante para la producción de ureidos parece ser la actividad alantoinasa. Sin embargo, no se observa una mayor acumulación de alantoina, lo que sugiere que se incrementa su exportación al xilema, pudiendo compensarse por este mecanismo la menor producción de ácido alantoico.

2. Influencia de la dosis de nitrato en la simbiosis *Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium tropici*.

Las leguminosas requieren la utilización conjunta de nitrógeno atmosférico y combinado del suelo para conseguir el máximo crecimiento (Streeter 1988). El crecimiento del peso seco observado en todas las muestras, inducido por la adición de nitrato, ha sido descrito para otras leguminosas (Buttery y Gibson 1990). Sin embargo, al aplicar el nitrato al inicio del cultivo (estado de plántula), la disponibilidad disminuye gradualmente y esto se refleja con un crecimiento más intenso al principio y menor en la última recogida (Muller *et al.*, 1993). En judías se ha demostrado, en condiciones de campo, que la fertilización nitrogenada puede incrementar sustancialmente el rendimiento del cultivo (Buttery *et al.*, 1987).

El estudio de la capacidad fijadora de nitrógeno, medido por la ARA, mostró que 1 mM de nitrato no afecta esta actividad, y 2 mM sólo en el último muestreo, coincidiendo con el inicio de fructificación. La sensibilidad de la fijación de nitrógeno al nitrógeno combinado depende de la especie de leguminosa (Lang *et al.*, 1993) e incluso del genotipo (Caba *et al.*, 1995) y de la variedad. Detectar variedades de *Phaseolus vulgaris* que mantengan un sistema simbiótico con tolerancia al nitrato es deseable en cualquier programa de mejora.

Se puede establecer una estrecha correlación en la actividad GS y GOGAT, pero aparentemente la GOGAT es una enzima más lábil e "in vitro" el funcionamiento de la GOGAT es del 10-20% de la GS (Pacovsky y Fuller 1991). Este porcentaje se mantiene en todos los muestreos y en todas las dosis de nitrato, aun cuando en *Vicia faba* se detecta que la GS era 6.5 veces mayor que la GOGAT (Caba *et al.*, 1993). Esta relación de actividad ha sido informada para *Medicago sativa* (Cresswell *et al.*, 1992) para *Glycine max* (Schuller *et al.*, 1988) y *Pisum sativum* (Rosendahl *et al.*, 1989).

El nitrato inhibe la actividad GS y GOGAT en nódulos (Schuller *et al.*, 1986), aun cuando en los primeros muestreos se mantiene la actividad y disminuye a partir del día 34 de cultivo. El comportamiento de la actividad GS es semejante al de la fijación de nitrógeno y la inhibición de la fijación va precedida por una caída de actividad GS (Becana *et al.*, 1984; Cordovilla *et al.*, 1996). Sin embargo, la GOGAT es más sensible al tratamiento con nitrato. Los cambios en la fijación de nitrógeno pueden promover cambios en la actividad GS y en la GOGAT nodular (Chen *et al.*, 1990) relacionados con los distintos isoenzimas que las constituyen.

La actividad *in vitro* de la xantina deshidrogenasa y de la uricasa no se inhibió con dosis de hasta 5 mM de nitrato (Schuller *et al.*, 1986). La XDH expresa una disminución con 10 mM semejante a la GS, mientras que la uricasa casi no se afecta. El máximo de ambas actividades se corresponde con el de la fijación de nitrógeno, sin embargo, se mantiene la actividad cuando la nitrogenasa disminuye (crecimiento reproductor). Similares resultados se encontraron con los ureidos acumulados en nódulos, solo 10 mM de nitratos inhibe seriamente la acumulación de ureidos.

3. Efecto del estrés salino en la simbiosis: aplicación en el momento de la siembra.

Los resultados de crecimiento obtenidos apoyan lo observado anteriormente por otros autores sobre la mayor sensibilidad de la parte aérea al estrés salino en comparación con la raíz.

Este contenido se correlacionó negativamente con la fijación de nitrógeno, con algunas de las enzimas (GS, GOGAT, AAT y uricasa) y con el contenido de ácido alantoico y de aminoácidos en nódulos (tabla 4.1). Esta última correlación explicaría que la disminución de unos en nódulos estaría relacionada con la acumulación de otros en hojas.

El estrés salino no influyó negativamente en el crecimiento de la raíz excepto en la última recogida. La parte aérea fue más dañada que las raíces, con síntomas de clorosis y hojas pequeñas. La parte aérea se vió, por tanto, más afectada por la sal que la raíz. Resultados semejantes han sido obtenidos en plantas de haba, explicándose por una posible acumulación de sodio en la parte aérea (Cordovilla *et al.*, 1995). Este efecto también ha sido descrito por Wignarajah (1990) en judía.

La nodulación es sensible a altos niveles de NaCl (25 y 50 mM) mientras que se pudo detectar un pequeño incremento en el peso seco de nódulos con 10 mM. Se observó que la actividad nitrogenasa fue más sensible a la sal que la nodulación, coincidiendo con lo descrito por Burns *et al.* (1985), atribuyendo este fenómeno a un efecto directo del NaCl sobre la actividad nitrogenasa. Serraj *et al.* (1994) asocian la inhibición de esta actividad con una limitación del aporte de oxígeno al bacteroide, causada por el estrés salino. La nodulación y la fijación de nitrógeno fueron más sensibles a la sal que el crecimiento de la planta. Elsheikh y Wood (1990), y Soussi *et al.* (1998) obtuvieron resultados semejantes en cultivos de *Cicer arietinum*. Se puede concluir que la actividad nitrogenasa es más sensible a la sal que la nodulación y también que la fijación de nitrógeno y la nodulación son más sensibles a la sal que el crecimiento. Streeter (1982) indicó que esto podría ser atribuido a una limitación en el transporte de nitrógeno al xilema.

Las actividades glutamina sintetasa y la glutamato sintasa mostraron un descenso significativo con la salinidad tanto en el periodo vegetativo como en el periodo reproductor con todos los tratamientos. La sensibilidad de estas enzimas a la sal

ha sido descrita por Cordovilla *et al.* (1996), y en *Cicer arietinum* por Soussi *et al.* (1998).

El contenido de ureidos es asociado con frecuencia a la nodulación efectiva y la fijación de nitrógeno en leguminosas de origen tropical (Herridge and Peoples, 1990; Atkins, 1991). El contenido de ureidos exhibió un descenso de un 10% y 80% con 25 y 50 mM de NaCl respectivamente. Una reducción del contenido de aminoácidos se observó con el estrés salino. Este efecto es diferente al observado por Soussi *et al.* (1998) en garbanzo, y por Gordon *et al.* (1997) en soja, donde una acumulación de aminoácidos se manifestó como efecto directo del estrés salino. Estas diferencias podrían ser explicadas por la diferencia entre especies y el tiempo de aplicación de la sal.

La acumulación de prolina no está correlacionada con los niveles y con el tiempo de exposición a la sal. Sin embargo, los niveles de prolina son tres veces superiores en nódulos tratados con sal, respecto a los de las plantas control. Este efecto se observó solo con 10 mM NaCl. Existe una gran controversia a cerca de la acumulación de prolina, que parece ser más un síntoma de susceptibilidad al estrés (Hanson and Hitz, 1982) que una respuesta adaptativa.

Se puede concluir que: 1) el crecimiento de la parte aérea es más sensible a la salinidad que el de la raíz, y la relación raíz/parte aérea podría ser una referencia de tolerancia de la planta a este estrés; 2) La salinidad inhibe la actividad nitrogenasa específica en mayor medida durante el periodo reproductor que durante el periodo vegetativo, observándose una compensación entre ARA y peso seco de nódulos; 3) las enzimas de la asimilación del amonio y del catabolismo de las purinas son inhibidas por el estrés salino, con una estrecha correlación con la actividad nitrogenasa. Estas actividades fueron más sensibles a la sal que el crecimiento de la planta y la nodulación. Por lo tanto, en esta variedad de *Phaseolus vulgaris*, la limitación de la eficiencia simbiótica es debida a la vez a una limitación de la actividad nitrogenasa y de los procesos de asimilación de amonio. Esta alteración del metabolismo del nitrógeno se refleja en una reducción del contenido de ureidos y aminoácidos en nódulos

Es difícil decidir cual de las dos variedades utilizadas fue más tolerante al estrés salino ya que, en algunos aspectos, una respondió mejor que la otra, mientras que

ocurrió lo contrario con otros parámetros. Si tomamos en cuenta el crecimiento de la planta y la nodulación, la variedad Coco fue más tolerante al NaCl que Africa. La reducción de PSR en Africa fue proporcionalmente menor que la reducción de PSPA, lo que implica un incremento de la relación RPA. En Coco también se observa un incremento de RPA determinado principalmente por el descenso de PSPA. La actividad nitrogenasa medida por el test de reducción de acetileno mostró una mejor respuesta en Africa que en Coco en estas condiciones de salinidad en el medio desde el inicio del cultivo. La actividades enzimáticas se inhibieron con la sal en los dos casos de forma importante, salvo la glutamato deshidrogenasa que presentó una respuesta distinta con los tratamientos salinos en las dos simbiosis, lo que nos haría pensar en su posible función en la mejor o peor respuesta de la simbiosis al estrés salino ya que en Africa esta actividad se incrementó con las dosis de sal, sin superar los valores del control.

4. Efecto del cloruro sódico aplicado a la simbiosis ya establecida.

En algunas leguminosas, el crecimiento de la planta y acumulación de materia seca se reducen por las bajas concentraciones de sal (Lauchli 1984; Wignarajah 1990). Nuestros resultados confirman que *Phaseolus vulgaris* var. Africa es menos sensible a las bajas concentraciones de sal que otras leguminosas, por lo menos pocos días después de adicionar la sal. El estrés salino afecta al crecimiento de la parte aérea más que al de raíz, lo que conlleva a un incremento de la relación raíz/parte aérea. Este mismo resultado ha sido confirmado en *Vicia faba* (Cordovilla *et al.*, 1995) y *Pisum sativum* (Delgado *et al.*, 1994).

En este experimento, las plantas crecieron sin sal durante tres semanas y por lo tanto el efecto de la salinidad en la iniciación y formación del nódulo no fue estudiada. En relación con esto, algunos autores confirman que el proceso de iniciación nodular es un evento en la simbiosis Rhizobium-leguminosa altamente sensible al estrés salino y osmótico (Velagaleti *et al.*, 1990; Cordovilla *et al.*, 1994). El estrés salino inhibe más intensamente que el peso seco de nódulos, debido parcialmente a una reducción de la actividad nodular por el estrés salino (Hafeez *et al.*, 1988; Cordovilla *et al.*, 1995), y en parte a la reducción de diferenciación de nuevos nódulos.

De acuerdo con nuestros datos, la fijación de nitrógeno es menos tolerante a la sal que la asimilación de amonio en nódulos. La actividad nitrogenasa se correlacionó

significativamente con las enzimas del ciclo de la glutamato sintasa ($P \leq 0.01$). Resultado similares fueron descritos por Bourgeais-Chaillou *et al.* (1992) en *Glycine max* y por Cordovilla *et al.* (1994) en *Vicia faba*. Sin embargo, la actividad xantina deshidrogenasa y uricasa se vieron menos inhibidas en condiciones de salinidad que las enzimas de asimilación de amonio. El contenido de ureidos en nódulos disminuye con la edad del cultivo: en este estudio, este contenido fue superior en el periodo vegetativo y desciende en el periodo de floración (Osofu-Budu *et al.*, 1990) tal como lo hizo la actividad nitrogenasa. La concentración de ureidos varió con el desarrollo fisiológico, como lo observado por Peoples *et al.* (1991), incluso en condiciones de sequedad (Purcell *et al.*, 1998). También, se obtuvo una correlación negativa entre la concentración de ureidos en nódulos y el peso seco de raíz, lo que podría explicarse por la alta demanda de los nódulos (Sicarda di Mallorca e Izaguirre-Mayoral, 1993). La disminución del contenido de proteína soluble en nódulos es una respuesta típica al estrés salino y se ha observado también en otras leguminosas (Bourgeais-Chaillou *et al.*, 1992). La respuesta puede deberse a la degradación de proteínas o a la alteración en la incorporación de aminoácidos a las proteínas (Stewart y Lee, 1979). Por lo tanto, la acumulación de aminoácidos en el citosol nodular es una pronunciada respuesta de varios organismos al estrés osmótico (Yancey *et al.*, 1982).

Phaseolus vulgaris var. Africa, importante leguminosa grano en diversas áreas, se puede considerar moderadamente tolerante a la salinidad, de acuerdo con la clasificación de Lauchli (1984). En este experimento, el nitrógeno total en las plantas fijadoras de nitrógeno sometidas a condiciones salinas, revelan una reducción significativa. Sin embargo, el proceso de asimilación de amonio se mostró menos tolerante a la salinidad que el catabolismo de purinas, causando un descenso en el contenido de ureidos y aumento del contenido de aminoácidos en nódulos. En general, tanto el tiempo de exposición al cloruro sódico como la dosis de sal aplicada fueron factores determinantes en la respuesta de estas enzimas al estrés salino.

El PSP no se vio afectado por la sal, y apenas disminuyó en el resto de los muestreos. Con 50 mM y a los 12 días de adicionar la sal, la diferencia sí fue significativa con respecto al control. La relación R/PA se incrementó significativamente con la sal en las 3 últimas recogidas. Este aumento de RPA con la sal refleja que se

inhibió el crecimiento aéreo más que el radical, y esto ya ha sido descrito en *Phaseolus vulgaris* por Wignarajah (1990), quien explica este fenómeno por un desplazamiento de nutrientes a la raíz en condiciones de salinidad.

El PSN se disminuyó significativamente con todos los niveles de NaCl desde la primera recogida, inhibiéndose hasta un 60% en el último muestreo con 50 mM NaCl. El PSN también se vio afectado por la sal a lo largo del desarrollo del cultivo, aumentando su peso un 100% en las plantas control y 68% en las plantas tratadas con 50 mM sal. La actividad reductora de acetileno se vio más afectada con la sal que el PSN. El hecho de que la nitrogenasa sea más sensible a la sal que la nodulación ya ha sido descrito por varios autores, explicándose por un efecto directo de la sal sobre la nitrogenasa. La inhibición de esta actividad está estrechamente asociada con la limitación de O₂ causada por el estrés salino. A su vez, la nodulación y fijación de nitrógeno son más sensibles al estrés salino que el crecimiento. Según Streeter (1981), esta inhibición durante el estrés puede explicarse por una limitación de la exportación de N₂ reducido.

La GS descendió con todos los niveles de NaCl y en todos los muestreos de forma significativa, mientras que la GOGAT se vio afectada en menor proporción. Estas actividades enzimáticas se correlacionaron positivamente y significativamente, mientras no se correlacionaron con la actividad nitrogenasa, resultado que coincide con lo descrito por Gordon *et al.* (1997) trabajando con estrés hídrico.

La XDH presentó un pico a los 27 días de cultivo en las plantas control, que desaparece en las plantas tratadas con sal. A los 3 y 6 días de tratamiento salino, se aprecia una estimulación de estas 2 actividades con la dosis más baja de NaCl, 10 mM, mientras que a los 9 y 12 días de tratamiento, la XDH disminuye con todas las dosis, y la uricasa solo disminuye con 25 y 50 mM NaCl. Estas 2 enzimas se correlacionan positiva y significativamente con el ARA.

Vemos que el tiempo de exposición al NaCl y la dosis aplicada son determinantes en la respuesta de estas enzimas al estrés salino. Sagi *et al.* (1998) describen una estimulación de las enzimas del catabolismo de purinas en condiciones de salinidad en raíces de remolacha, con el fin de transportar a la parte aérea compuestos nitrogenados con baja relación C/N en respuesta al estrés.

El contenido de ureidos en nódulo descendió hasta un 55% con 50 mM sal. Esto puede ser resultado de la disminución de la XDH y uricasa con las dosis más altas de NaCl, a la vez del transporte de estos compuestos a la PA. Serraj y Sinclair (1996) han observado en plantas de soja un incremento del contenido de ureidos en peciolos en condiciones de estrés. El contenido de ureidos se correlacionó positiva y significativamente con el ARA y con todas las enzimas estudiadas. Sinclair y Serraj (1995) sugieren que los ureidos están estrechamente involucrados en la respuesta de la fijación N_2 al estrés hídrico.

El contenido en aminoácidos libres no se afectó en el primer muestreo. Se observa una estimulación de estos valores con la sal, en particular a los 12 días de tratamiento salino y con las dosis más altas de sal. La acumulación de aminoácidos en respuesta a la sal ha sido descrita por Gordon *et al.* (1997) en soja, y por Soussi *et al.* (1998) en garbanzo, como consecuencia del daño producido por el estrés salino.

En resumen, la fijación biológica de N_2 es más sensible al estrés salino que el crecimiento; la GS, primera enzima implicada en la asimilación de amonio, es la que más se afectó por el estrés salino; el contenido de AA aumenta en nódulos mientras el de ureidos desciende en respuesta a la sal.

Estos resultados muestran claramente que la actividad nitrogenasa fue más sensible a la sal que la nodulación, y que los parámetros de fijación de N_2 se afectaron más por el estrés salino que el crecimiento de la planta.

El efecto de la sal sobre el crecimiento es semejante en las dos variedades. En cambio, nodulación y actividad nitrogenasa se inhibieron más con la sal en Coco que en Africa. Las actividades enzimáticas de la asimilación del amonio y de la degradación de purinas se inhibieron más en Coco. Así mismo, es la variedad Coco la que muestra un mayor descenso del contenido de ureidos en nódulos. En conjunto, se puede decir que los parámetros del metabolismo nodular indican una mayor sensibilidad a la sal de la variedad Coco, aunque esto no se refleje significativamente en el crecimiento de las plantas.

Todo lo descrito anteriormente ha proporcionado una idea general sobre las diferencias existentes entre las dos variedades. Se puede decir que la respuesta a la sal a corto plazo de tiempo fue mejor en Africa que en Coco. Los parámetros que

disminuyeron con la sal lo hicieron más en Coco que en Africa. La estimulación de la GDH con la sal en Coco, puede estar relacionada con la sensibilidad de esta última. En general, Coco presentó inhibiciones con dosis que no afectaron (o afectaron levemente) parámetros de Africa.

5. Aplicación de ácido abscísico exógeno en condiciones de salinidad.

Los resultados del estudio efectuado, donde se propuso ver el efecto de un pretratamiento con ácido abscísico antes de aplicar el estrés salino, sobre la respuesta de las plantas al NaCl, nos permiten deducir que:

- En esta variedad, la adición de ABA exógeno al medio en *Phaseolus vulgaris* var. Africa reduce el crecimiento de las plantas independientemente del tratamiento salino, pero no se registran diferencias significativas entre la presencia y la ausencia del ABA respecto al estrés salino.
- El efecto inhibitor del cloruro sódico sobre la actividad nitrogenasa específica y total se atenua de forma importante por la adición de ABA al medio, en especial con la concentración de 1 μM , si bien el ABA muestra un efecto inhibitor sobre la nodulación.
- El comportamiento de algunas actividades enzimáticas frente al estrés salino es distinto en presencia de ABA, coincidiendo que en casi todas las actividades estudiadas la dosis que atenuó el efecto del NaCl fue 10 μM . Es de interés comentar que todas las enzimas evaluadas, excepto la GDH, se correlacionaron positiva y significativamente con ARAP (tabla 6.1).
- La sal provoca la disminución del contenido de determinados metabolitos en nódulos como ureidos y proteína, así como la acumulación de otros compuestos como la prolina o azúcares totales solubles. Este último efecto también se observa en hoja. Este efecto del cloruro de sodio se ve contrarrestado de forma significativa en las plantas tratadas con ABA.

En ausencia de ABA la parte aérea fue más sensible al estrés salino que la raíz, mientras que en presencia de ABA en el medio, en particular la dosis de 1 μM , el NaCl tuvo un efecto similar en parte aérea y en raíz. Sin embargo, 10 μM de ABA tuvo un efecto positivo sobre la RPA.

En resumen, el ABA tiene un efecto negativo tanto sobre el crecimiento como sobre la fijación de nitrógeno, comparable en muchos casos al efecto de una dosis alta de sal. Sin embargo, en condiciones de estrés salino, el ABA estimula algunos parámetros como PSPA y, sobre todo, PSN.

Se puede apreciar que, independientemente del tratamiento salino, el ácido abscísico tendió a disminuir las actividades enzimáticas en las plantas control, mientras que las estimuló en presencia de NaCl. Esto se hizo especialmente evidente el día 21 de cultivo. El NaCl inhibió de forma importante la GS y la GOGAT, y de hecho es donde mejor se aprecia el efecto atenuante del ABA en el medio en estas condiciones de estrés. Esto mismo se refleja en las enzimas del catabolismo de purinas.

Tras este estudio, para observar el efecto del pretratamiento con ácido abscísico antes de aplicar el estrés salino, podemos deducir que:

- En *Phaseolus vulgaris* var. Coco la presencia en el medio de ABA reduce el crecimiento de las plantas independientemente del tratamiento salino. Sin embargo, el cloruro sódico no afecta al crecimiento en presencia de ABA en el medio.
- El efecto inhibitor del cloruro sódico sobre la actividad nitrogenasa específica y total por planta se atenúa de forma importante por la presencia de ABA en el medio.
- La mayoría de las actividades enzimáticas estudiadas disminuyeron significativamente con la sal en ausencia de ABA, pero la adición de esta hormona al medio provoca que este efecto inhibitor del NaCl no sea tan drástico.
- La sal favorece la disminución de algunos metabolitos en nódulos, como el contenido de ureidos y de proteína, y la acumulación de azúcares solubles, mientras que en hojas se acumulan los azúcares totales solubles y la prolina. Este efecto del cloruro de sodio se reduce de forma significativa en las plantas tratadas con ABA.

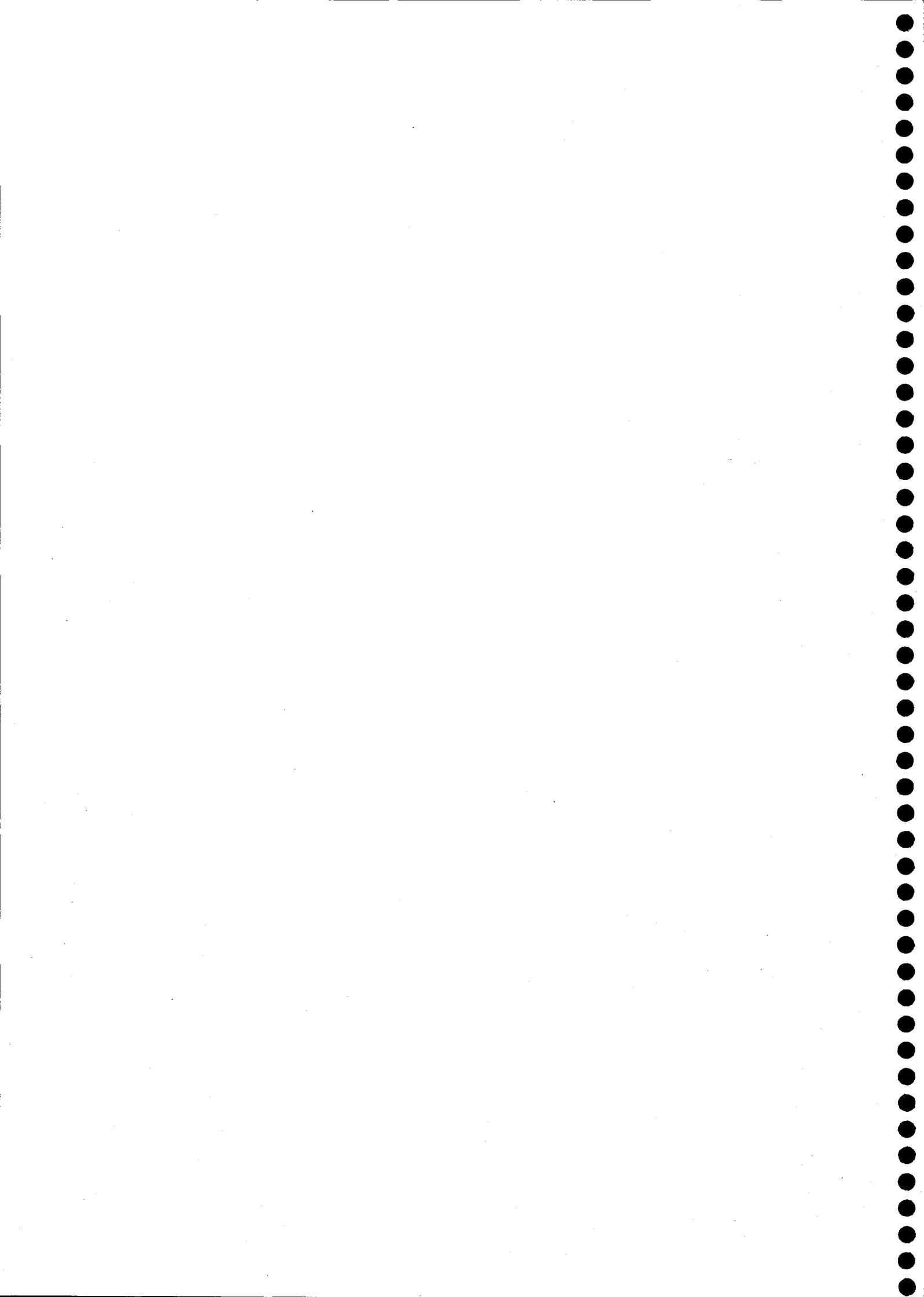
6. Nutrición mineral.

El peso seco de parte aérea y raíz se incrementaron con los niveles de nitrato aplicado. Resultados semejantes han sido descritos por Muller *et al.*, (1993) en plantas de judía. El nitrato en el medio retrasa el desarrollo del nódulo, y esto puede ser debido a una inhibición del proceso de infección (Streeter, 1988). La aplicación de dosis altas de nitrato inhibe la fijación simbiótica de N₂. Esto se ha atribuido a una competencia por carbohidratos entre la asimilación de nitratos por la nitrato reductasa y la fijación de

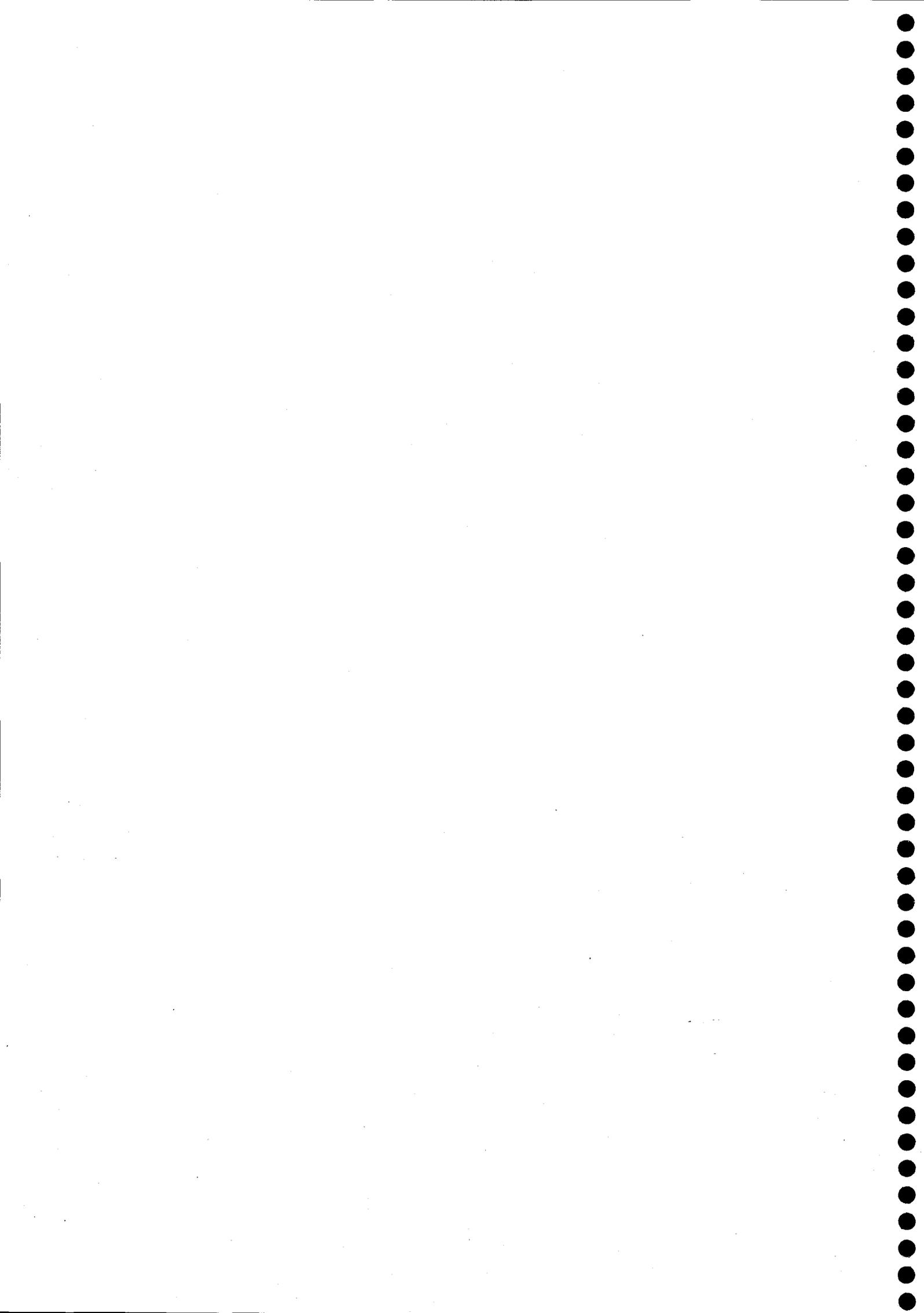
N₂ mediada por la nitrogenasa (Leidi *et al.*, 1980). A los 18 días de cultivo y a partir de 1 mM de KNO₃, se aprecia una estimulación de hasta cuatro veces del ARA. Una aplicación base de nitrógeno antes de iniciarse la fijación simbiótica de N₂ estimula la fijación y el crecimiento de la planta (Park y Buttery, 1989).

La acumulación de nutrientes fue, en general, más importante en parte aérea que en raíz (Gijsman, 1990). El N y sobre todo el Ca y Mg se incrementaron en parte aérea y raíz con el nitrato. Resultados semejantes ha descrito Gijsman (1990) en respuesta a la fertilización nitrogenada. El contenido en K aumentó con el nitrógeno combinado. Gomez *et al.*, (1992) explican en hojas de tomate, que el nitrato promueve una mayor asimilación de K, especialmente en periodo de máximo crecimiento vegetativo. Cox y Reisenwer (1973) describen que el nitrato estimula la asimilación de cationes acompañada de la inhibición de la asimilación de aniones.

En conclusión, el nitrato estimuló el crecimiento de las plantas de *P. vulgaris*, e inhibió la fijación de N₂ una vez establecida la simbiosis. La aplicación base que no afecta la fijación de nitrógeno en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa es de 1 mM de nitrato al inicio del cultivo. La acumulación de la mayoría de nutrientes se incrementó con el nitrato especialmente en parte aérea.



VII. CONCLUSIONES



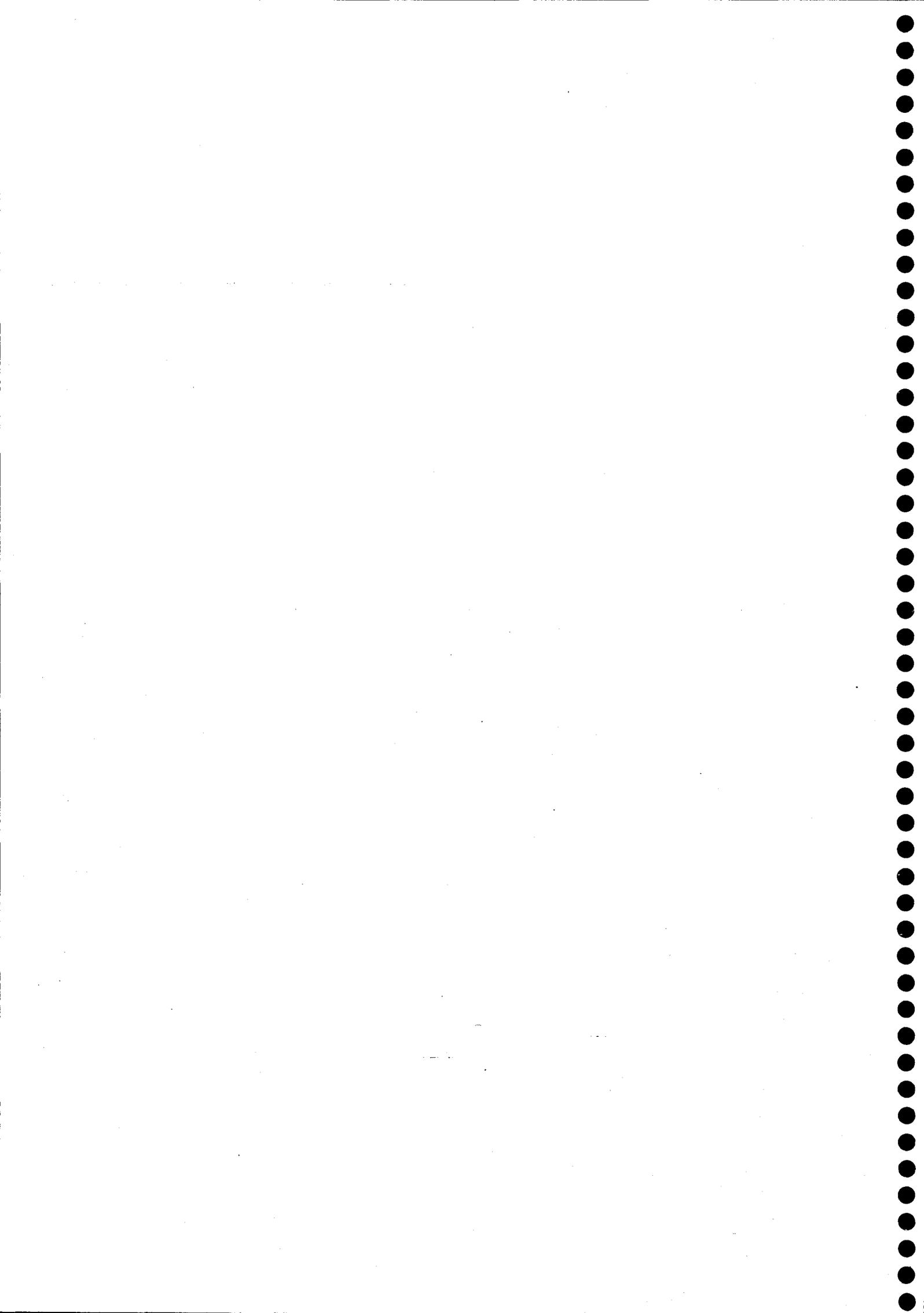
CONCLUSIONES

1. La sensibilidad de la fijación de nitrógeno al nitrógeno combinado depende tanto de la especie como de la variedad de la leguminosa. La capacidad fijadora de nitrógeno de *Phaseolus vulgaris* variedad Africa esta condicionada por el nitrato en el medio, asumiendo que 1 mM de nitrato se considera la dosis adecuada que no interfiere en el proceso de asimilación de nitrógeno. La abundancia relativa de ureidos en el xilema durante el tiempo de experimentación en plantas con 1 mM de nitrato lo avalan.
2. Los parámetros de crecimiento de las plantas de *Phaseolus vulgaris* siguen una tendencia lineal durante el periodo estudiado, mostrando unas tasas de crecimiento descendientes a lo largo de la ontogenia. Las mayores tasas de crecimiento aparecen en el periodo vegetativo, coincidiendo con los máximos de actividad nitrogenasa y de actividades enzimáticas de la asimilación de amonio y síntesis de ureidos.
3. Las enzimas de asimilación del amonio son más sensibles a la sal que las del metabolismo de purinas, por lo que pueden ser limitantes en la síntesis de ureidos. La glutamato deshidrogenasa se presenta como alternativa al suministro de glutamato para el metabolismo de las purinas en condiciones de estrés salino.
4. El contenido de ureidos y su transporte se modifican con la edad del cultivo y con la presencia de nitrógeno combinado en el medio. Así, el contenido de ureidos durante el periodo reproductor desciende en nódulos y aumenta en la savia del xilema, mientras que el nitrato hace disminuir el contenido de ureidos en savia, favoreciendo el transporte de aminoácidos.
5. El estrés salino provoca una alteración de la contribución de la alantoína y del ácido alantoico al contenido de ureidos en nódulos y/o savia del xilema. Se pone de manifiesto que la sal inhibe la actividad alantoinasa, favoreciendo la disminución de la relación ácido alantoico/alantoína.

6. El ácido abscísico exógeno actúa como hormona que reduce el crecimiento de las plantas. Así mismo, inhibe el proceso de fijación de nitrógeno, afectando el peso de nódulos y la actividad nitrogenasa. Sin embargo, la presencia de ABA logra atenuar los efectos drásticos de la sal en el metabolismo enzimático, el nivel de algunos cationes como el Na y K, y osmorreguladores de peso molecular bajo como la prolina. Este efecto del ABA se intensifica en la variedad de *Phaseolus vulgaris* que muestra una mayor sensibilidad a la sal.

7. De las dos variedades estudiadas en este trabajo, proponemos que *Phaseolus vulgaris* var. Africa se puede considerar moderadamente tolerante a la salinidad mientras que *Phaseolus vulgaris* var. Coco sería moderadamente sensible a la sal. Esta propuesta viene avalada por el efecto que el estrés salino ejerce en el proceso de fijación de nitrógeno en ambas variedades, y en el metabolismo del amonio y de ureidos.

VIII. BIBLIOGRAFIA



BIBLIOGRAFIA

- Allison LA, Kiss GB, Bauer P, Poiret M, Pierre M, Savouré A, Kondorosi E, Kondorosi A. 1993. Identification of two alfalfa genes with homology to members of the pea *Enod12* gene family. *Plant Mol. Biol.* 21: 375-380.
- Alvarez-Rogel J. 1997. Patterns of spacial and temporal variations in soil salinity: example of salt marsh in a semiarid climate. *Arid Soil Res. Reh.* 11: 315-329.
- Amarjit, Singh R. 1985. *Phytochemistry* 24: 415-418.
- Amzallag GN, Lerner HR. 1994. Physiological adaptation of plants to environmental stresses. En: Handbook for Crop Physiology. M Pessaraki (ed.). M. Dekker, New York. 557-576.
- Anderson MP, Vance CP, Heichel GH, Miller SS. 1989. Purification and characterization of NADH-glutamate synthase from alfalfa root nodules. *Plant Physiol.* 90: 351-358.
- Appleby CA. 1984. Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35: 443-478.
- Appleby CA. 1992. The origin and functions of hemoglobin in plants. *Sci. Prog.* 76: 365-398.
- Argillier C, Drevon JJ, Zengra M, Salsac L. 1989. Relation between nitrogenase activity and stem or xylem sap ureide content of soybeans plants (*Glycine max* L Merr.). *Plant Sci.* 61: 37-42.
- Arredondo-Peter R, Hargrove MS, Moran JF, Sarath G, Klucas RV. 1998. Plant hemoglobins. *Plant Physiol.* 118: 1121-1125.
- Arrese-Igor C, Gordon AJ, Minchin FR, Denison RF. 1998. Nitrate entry and nitrite formation in the infected region of soybean nodules. *J. Exp. Bot.* 49: 41-48.
- Ashraf M, O'Leary JW. 1994. Ion distribution in leaves of varying age in salt-tolerant lines of alfalfa under salt stress. *J. Plant Nutr.* 17: 1463-1476.
- Ashraf M, O'Leary JW. 1995. Distribution of cations in leaves of salt-tolerant and salt-sensitive lines of sunflower under saline conditions. *J. Plant Nutr.* 18: 2379-2388.
- Atkins CA, Storer PJ, Pate JS. 1988. Pathways of nitrogen assimilation in cowpea nodules studied using $^{15}\text{N}_2$ and allopurinol. *Plant Physiol.* 86: 204-207.
- Atkins CA. 1982. Ureide metabolism and the significance of ureides in legumes. En: Advances in Agricultural Microbiology. NSS Rao (ed.). Oxford and IBH, New Delhi. 53-88.
- Atkins CA. 1991. Ammonia assimilation and export of nitrogen from the legume nodule. En: Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation. M Dilworth y A Glenn (eds.). Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam. 293- 319.
- Aveline A, Crozat Y, Pinochet X, Domenach AM. 1995. Early remobilization - A possible source of error in the ureide assay method for N_2 fixation measurement by early maturing soybean. *Soil Sci. Plant Nut.* 41: 737-751.
- Bacanamwo M, Harper JE. 1997. The feedback mechanism of nitrate inhibition of nitrogenase activity in soybean may involve asparagine and/or products of its metabolism. *Physiol. Plant.* 100: 371-377.
- Bassett MJ. 1989. List of genes. *Annu. Rep. Bean Impro. Coop.* 32: 1-15.
- Bauer D, Biehler K, Fock H, Carrayol E, Hirel B, Migge A, Becker TW. 1997. A role for cytosolic glutamine synthetase in the remobilization of leaf nitrogen during water stress in tomato. *Physiol. Plant.* 99: 241-248.

- Bauer P, Crespi MD, Szécsi J, Allison LA, Schultze I, Ratet P, Kondorosi E, Kondorosi K. 1994. Alfalfa *Enod12* genes are differentially regulated during nodule development by Nod factors and *Rhizobium* invasion. *Plant Physiol.* **105**: 585-594.
- Bauer WD, Caetano-Anollés G. 1990. Chemotaxis, induced gene expression and competitiveness in the rhizosphere. *Plant Soil* **129**: 45-52.
- Becana M, Aparicio-Tejo PM, Sánchez-Díaz M. 1984. Root nodule enzymes of ammonia metabolism from *Medicago sativa* L. as influenced by nitrate levels. *J. Plant Physiol.* **116**: 285-292.
- Becana M, Minchin FR, Sprent JI. 1989. Short-term inhibition of legume N₂ fixation by nitrate. I. Nitrate effects of nitrate-reductase activities of bacteroids and nodule cytosol. *Planta* **180**: 40-45.
- Bedmar EJ, Olivares J. 1980. Effect of chemical inhibitors of photorespiration on nitrogenase activity in nodulated alfalfa plants. *Planta* **150**: 299-302.
- Beijerinck MW. 1888. *Botanische Zeitung* **46**: 725-804.
- Bell JA, Webb MA. 1995. Immunoaffinity purification and comparison of allantoinases from soybean root nodules and cotyledons. *Plant Physiol.* **107**: 435-441.
- Benlloch M, Ojeda MA, Ramos J, Rodríguez-Navarro A. 1994. Salt sensitivity and low discrimination between potassium and sodium in bean plants. *Plant Soil* **166**: 117-123.
- Bergersen FJ, Turner GL. 1967. Nitrogen fixation by the bacteroid fraction of breis of soybean root nodules. *Biochem. Biophys. Acta* **141**: 507-515.
- Bergmann H, Preddie E, Verma DPS. 1983. Nodulin-35: a subunit of specific uricase (uricase II) induced and localised in the uninfected cells of soybean nodules. *EMBO. J.* **2**: 2333-2339.
- Bernstein L. 1961. Osmotic adjustment of plants to saline media. I. Steady state. *Am. J. Bot.* **48**: 909-918.
- Bernstein N, Silk WK, Lauchli A. 1993. Growth and development of sorghum leaves under conditions of NaCl stress. *Planta* **191**: 433-439.
- Berteli F, Corrales E, Guerrero C, Ariza MJ, Pliego F, Valpuesta V. 1995. Salt stress increases ferredoxin-dependent glutamate synthase activity and protein level in leaves of tomato. *Physiol. Plant.* **93**: 259-264.
- Bhullar SS, Desamsetty NK, Behura SK, Singh P. 1996. Differential changes in glutamine synthetase isoforms in the cotyledons of germinating chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds in response to osmotic stress. *J. Plant Physiol.* **149**: 201-204.
- Billard JP, Boucaud J. 1980. Effect of NaCl on the activities of glutamate synthase from a halophyte *Suaeda maritima* and from a glycophyte *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry* **19**: 1939-1942.
- Bliss FA. 1993a. Breeding common bean for improved biological nitrogen fixation. *Plant Soil* **152**: 71-79.
- Bliss FA. 1993b. Utilizing the potencial for increased nitrogen fixation in common bean. *Plant Soil* **152**: 157-160.
- Boland MJ, Benny AG. 1977. Enzymes of nitrogen metabolism in legume nodules: purification and properties of NADH-dependent glutamate synthase from lupin nodules. *Eur. J. Biochem.* **79**: 355-362.
- Boland MJ, Blevins DG, Randall DD. 1983. Soybean nodule xanthine dehydrogenase: a kinetic study. *Arch. Biochem. Biophys.* **222**: 435-441.

- Boland MJ, Hanks JF, Reynolds PHS, Blevins DG, Tolbert NE, Schubert KR. 1982. Subcellular organization of ureide biogenesis from glycolytic intermediates and ammonium in nitrogen fixing soybean nodules. *Planta* 155: 45-51.
- Boland MJ, Schubert KR. 1983. Biosynthesis of purines by a proplastid fraction from soybean nodules. *Arch. Biochem. Biophys.* 220: 179-187.
- Boland MJ. 1981. NAD⁺ xanthine dehydrogenase from nodule of navy beans: partial purification and properties. *Biochem. Int.* 2: 567-574.
- Bordeleau LM, Prévost D. 1994. Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant Soil* 161: 115-125.
- Bostock RM, Quatrano RS. 1992. Regulation of *Em* gene expression in rice. Interaction between osmotic stress and abscisic acid. *Plant Physiol.* 98: 1356-1363.
- Botella JR, Verbelen JP, Valpuesta V. 1988. Immunolocalization of glutamine synthetase in green leaves and cotyledons of *Lycopersicon esculentum*. *Plant Physiol.* 88: 943-946.
- Bourgeois-Chaillou P, Guerrier G. 1992. Salt-responses in *Lycopersicon esculentum* calli and whole plants. *J. Plant Physiol.* 140: 494-501.
- Bourgeois-Chaillou P, Oérez-Alfocea F, Guerrier G. 1992. Comparative effects of N-sources on growth and physiological responses of soybean exposed to NaCl-stress. *J. Exp. Bot.* 254: 1125-1233.
- 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.
- Breteler H, Arnoizis PA. 1985. Effect of amino compounds on nitrate utilization by roots of dwarf bean. *Phytochemistry* 24: 653-657.
- Brewin NJ. 1998. Tissue and cell invasion by *Rhizobium*: The structure and development of infection threads and symbiosomes. En: *The Rhizobiaceae*. HP Spaink, A Kondorosi, PJJ Hooykaas (eds.). Kluwer Academic Publishers. 417-429.
- Brisson N, Verma DPS. 1982. Soybean leghemoglobin gene groups: normal, pseudo and truncated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 4055-4059.
- Brouat A, Croucet C. 1965. Notes techniques sur un appareil semiautomatique de clorage l'azote et de certains composés volatiles. *Ann. Agric.* 16: 107-118.
- Burns IG. 1991. Short- and long-term effects of a change in the spacial distribution of nitrate in the root zone on N uptake, growth and root development of young lettuce plants. *Plant Cell Environ.* 14: 21-33.
- Burriss RH. 1972. Nitrogen fixation-assay methods and techniques. *Methods in Enzymology*, IV. Colowick S.P. y Kaplan N.O. (eds.). Academic Press. N.Y. 415.
- Caba JM, Guzmán J, Ortega JL, Lluch C, Lara M, Ligerio F. 1997. Purification and partial characterization of glutamine synthetase from root nodules of faba bean. *Ars. Pharm.* 38: 345-365.
- Caba JM, Lluch C, Hervás A, Ligerio F. 1990. Nitrate metabolism in roots and nodules of *Vicia faba* in response to exogenous nitrate. *Physiol. Plant.* 79: 531-539.
- Caba JM, Lluch C, Ligerio F. 1993. Genotypic differences in nitrogen assimilation in *Vicia faba*: Effect of nitrate. *Plant soil.* 151: 167-174.
- Caba JM, Lluch C, Ligerio F. 1994. Genotypic variability in nitrogen metabolism enzymes in nodulated roots of *Vicia faba*. *Soil Biol. Biochem.* 26: 785-789.
- Caba JM, Lluch C, Ligerio F. 1995. Distribution of nitrate reductase activity in *Vicia faba*: effect of nitrate and plant genotype. *Physiol. Plant.* 93: 667-672.

- Caba JM, Recalde L, Ligeró F. 1998. Nitrate-induced ethylene biosynthesis and the control of nodulation in alfalfa. *Plant Cell Environ.* **21**: 87-93.
- Caetano-Anollés G, Gresshoff PM. 1991. Plant genetic control of nodulation. *Ann. Rev. Microbiol.* **45**: 345-382.
- Caetano-Anollés G. 1997. Molecular dissection and improvement of the nodule symbiosis in legumes. *Field Crops Res.* **53**: 47-68.
- Callaham DA, Torrey JG. 1981. The structural basis of infection of root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*. *Can. J. Bot.* **59**: 1647-1664.
- Cammaerts DM, Jacobs M. 1984. A study of the polymorphism and the genetic control of the glutamate dehydrogenase isozymes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci. Lett.* **31**: 65-73.
- Cammaerts DM, Jacobs M. 1985. A study of the role of glutamate dehydrogenase in the nitrogen metabolism of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **163**: 517-526.
- Capitan F, Martínez F. 1954. Sobre la determinación espectrofotométrica de fósforo con amidol. *Anal. Edaf. Agrobiol.* **XIII**: 767-790.
- Capote-Mainez N, Sánchez F. 1997. Characterization of the common bean uricase II and its expression in organs other than nodules. *Plant Physiol.* **115**: 1307-1317.
- Carlson RW, Price NPJ, Stacey G. 1994. The biosynthesis of rhizobial lipo-oligosaccharide nodulation signal molecules. *Mol. Plant-Microbe Interact* **7**: 684-695.
- Carroll BJ, Mathews A. 1990. Nitrate inhibition of nodulation in legumes. En: Molecular Biology of Symbiotic Nitrogen Fixation. PM Gresshoff (ed.). CRC Press Inc, Boca Raton. 159-180.
- Carroll BJ, McNeil DL, Gresshoff PM. 1985. Isolation and properties of soybean (*Glycine max*) mutants that nodulate in the presence of high nitrate concentrations. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **82**: 4164-4166.
- Carroll BJ, Hansen AP, McNeil DL, Gresshoff PM. 1987. Effect of oxygen supply on nitrogenase activity of nitrate- and dark-stressed soybean (*Glycine max* L. Merr.) plants. *Austr. J. Plant Physiol.* **146**: 79-87.
- Cataldo DA, Haroon M, Schrader LE, Youngs VL. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissues by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Sci. Plant Anal.* **6**: 71-80.
- Cayuela E, Pérez-Alfocea F, Caro M, Bolarín MC. 1996. Priming of seeds with NaCl induces physiological changes in tomato plants grown under salt stress. *Physiol. Plant.* **96**: 231-236.
- Chalk PM. 1996. Estimation of N₂ fixation by ¹⁵N isotope dilution. The a value approach. *Soil Biol. Biochem.* **28**: 1123-1130.
- Chanda SV, Sood CR, Reddy VS, Singh YD. 1998. Influence of plant growth regulators on some enzymes of nitrogen assimilation in mustard seedling. *J. Plant Nutr.* **21**: 1765-1777.
- Charest C, Phan CT. 1990. Cold acclimation of wheat (*Triticum aestivum*): properties of enzymes involved in proline metabolism. *Physiol. Plant.* **80**: 159-168.
- Cheikh N, Brenner ML. 1992. Regulation of key enzymes of sucrose biosynthesis in soybean leaves. *Plant Physiol.* **100**: 1230-1237.
- Chen FL, Bennett MJ, Cullimore JV. 1990. Effect of the nitrogen supply on the activities of isoenzymes of NADH-dependent glutamate synthase and glutamine synthetase in root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. *J. Exp. Bot.* **231**: 1215-1221.

- Chen FL, Cullimore JV. 1988. Two isozymes of NADH-dependent glutamate synthase in root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* **88**: 1411-1417.
- Chen FL, Cullimore JV. 1989. Location of two isoenzymes of NADH-dependent glutamate synthase in root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* **179**: 441-447.
- Cherney JH, Duxbury JM. 1994. Inorganic nitrogen supply and symbiotic dinitrogen in alfalfa. *J. Plant Nut.* **17**(12): 2053-2067.
- Christensen TMIE, Jochimsen BU. 1983. Enzymes of ureide synthesis in pea and soybean. *Plant Physiol.* **72**: 56-59.
- Cohen A, Bray EA. 1990. Characterization of three mRNAs that accumulate in wilted tomato leaves in response to elevated levels of endogenous abscisic acid. *Planta* **182**: 27-33.
- Cook D, Dreyer D, Bonnet D, Howell M, Nony E, VandenBosch K. 1995. Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti*. *Plant Cell* **7**: 43-55.
- Cordovilla MP, Berridos SI, Ligeró F, Lluch C. 1999c. *Rhizobium* strain effects on the growth and nitrogen assimilation in *Pisum sativum* and *Vicia faba* plant growth under salt stress. *J. Plant Physiol.* **154**: 127-131.
- 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. 1995d. Influence of host genotypes on growth, symbiotic performance and nitrogen assimilation in faba bean (*Vicia faba* L.) under salt stress. *Plant Soil.* **172**: 289-297.
- Cordovilla MP, Ligeró F, Lluch C. 1996b. Growth and nitrogen assimilation in nodules in response to nitrate levels in *Vicia faba* under salt stress. *J. Exp. Bot.* **47**: 203-210.
- Cordovilla MP, Ligeró F, Lluch C. 1999a. Effects of NaCl on growth and nitrogen fixation and assimilation of inoculated and KNO₃ fertilized *Vicia faba* L. and *Pisum sativum* L. plants. *Plant Sci.* **140**: 127-136.
- Cordovilla MP, Ligeró F, Lluch C. 1999b. Effects of salinity on growth, nodulation and nitrogen assimilation in nodules of faba bean (*Vicia faba* L.). *App. Soil Eco.* **11**: 1-7.
- Cordovilla MP, Ocaña A, Ligeró F, Lluch C. 1995a. Salinity effects on growth analysis and nutrient composition in four grain legumes *Rhizobium* symbiosis. *J. Plant Nutr.* **18**: 1595-1609.
- Cordovilla MP, Ocaña A, Ligeró F, Lluch C. 1995b. Growth and macronutrient contents of faba bean plants: effects of salinity and nitrate nutrition. *J. Plant Nutr.* **18**: 1611-1628.
- Cordovilla MP, Ocaña A, Ligeró F, Lluch C. 1995c. Growth stage response to salinity in symbiosis *Vicia faba-Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Plant Physiol.* **14**: 105-111.
- Cordovilla MP, Ocaña A, Ligeró F, Lluch C. 1996a. Growth and symbiotic performance of faba bean inoculated with *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* strains tolerant to salt. *Soil Sci. Plant Nutr.* **42**: 133-140.
- Cordovilla MP, Perez J, Ocaña A, Ligeró F, Lluch C, Valpuesta V. 1999d. Partial purification and characterization of NADH-glutamate synthase from faba bean (*Vicia faba*) root nodules. *Physiol. Plant.* (en prensa).
- Coronado C, Zuanazzi JAS, Sallaud C, Quirion JC, Esnault R, Husson HP, Kondorosi A, Ratet P. 1995. Alfalfa root flavonoid production is nitrogen regulated. *Plant Physiol.* **108**: 533-542.

- Coughlan MP. 1980. Aldehyde oxidase, xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase; hydroxylases containing molybdenum, iron-sulphur and flavin. En: Molybdenum and Molybdenum-containing Enzymes. MP Coughlan (ed.). Pergamon Press, Oxford. 121-185.
- Craig GF, Atkins CA, Bell BT. 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, Lynch J, Laüchli A, Epstein E. 1987. Influx of Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ into roots of salt-stressed cotton seedlings. *Plant Physiol*. 83: 510-516.
- Cunningham SM, Volenec JJ. 1997. Seasonal carbohydrate and nitrogen metabolism in roots of contrasting alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars. *J. Plant Physiol*. 153: 220-225.
- Da Silva PM, Tsai SM, Bonetti R. 1993. Response to inoculation and N fertilization for increased yield and biological nitrogen fixation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Soil*. 152: 123-130.
- Damsz B, Dannenhoffer JM, Bell JA, Webb MA. 1994. Immunocytochemical localization of uricase in soybean cotyledons. *Plant Cell Physiol*. 35: 979-982.
- Dart PJ. 1977. Infection and development of leguminous nodules. En: A Treatise on Dinitrogen Fixation. RWF Hardy Wiley (ed.). New York. 367-472.
- De la Peña TC, Frugier F, McKhann HI, Bauer P, Brown S, Kondorosi A, Crespi M. 1997. A carbonic anhydrase gene is induced in the nodule primordium and its cell-specific expression is controlled by the presence of *Rhizobium* during development. *Plant J*. 11: 407-420.
- De Lorenzo C, Fernández-Pascual MM, de Felipe MR. 1994. Protective enzymes against active oxygen species during nitrate-induced senescence of *Lupinus albus* nodules. *J. Plant Physiol*. 144: 633-640.
- De Lorenzo C, Iannetta PPM, Fernández-Pascual M, James EK, Lucas MM, Sprent JI, Witty JF, Minchin FR, de Felipe MR. 1993. Oxygen diffusion in lupin nodules II: mechanisms of diffusion barrier operation. *J. Exp. Bot*. 44: 1469-1474.
- De Lorenzo CA, Fernández-Pascual MM, de Felipe MR. 1998. Subcellular localization of glycoprotein epitopes during the development of lupin root nodules. *Protopl*. 201: 71-84.
- Dean DR, Bolin JT, Zheng L. 1993. Nitrogenase metalloclusters: structures, organization, and synthesis. *J. Bacteriol*. 175: 6737-6744.
- Dean DR, Jacobsen MR. 1992. Biochemical genetics of nitrogenase. En: Biological Nitrogen Fixation. G Stacey, RH Burris, HJ Evans. (eds.). Chapman-Hall, New York. 763-831.
- Debouck D. 1991. Systematics and morphology. En: Common Beans: Research for Crop Improvement. A van Schoonhoven, O Voysest (eds.). CIAT, Cali, Colombia. 55-118.
- Delauney AJ, Verma DPS. 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J*. 4: 215-223.
- Delwiche CC. 1970. *Sci. Amer*. 223: 136-146.
- Dénarie J, Cullimore J. 1993. Lipo-oligosaccharide nodulation factors: a new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Cell* 74: 951-954.
- Deroche ME, Carrayol E. 1989. Some properties of legume nodule phosphoenol-pyruvate carboxylase. *Plant Physiol. Biochem*. 27: 379-386.
- Downie JA. 1998. Functions of rhizobial nodulation genes. En: The *Rhizobiaceae*. HP Spink, A Kondorosi, PJJ Hooykaas (eds.). Kluwer Academic Publishers. 417-429.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1997. Phylogenetic perspectives on the origins and evolution of nodulation in the legumes and allies. En: Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable

- Agriculture. Legocki AB., Bothe H. y Puhler A. (eds.). NATO ASI Series Springer, Berlin Heidelberg. 307-312
- Dudley LM. 1994. Salinity in the soil environmental. En: Handbook for Crop Physiology. M Pessaraki (ed.). M. Dekker, New York. 13-30.
- Egli MA, Griffith SM, Miller SS, Anderson MP, Vance CP. 1989. Nitrogen assimilating enzyme activities and enzyme protein during development and senescence at effective and plant gene controlled ineffective alfalfa nodule. *Plant Physiol.* 91: 898-904.
- Elkan GH. 1992. Biological nitrogen fixation systems in tropical ecosystems: an overview. En: Biological Nitrogen Fixation and Sustainability of Tropical Agriculture. K Mulongoy, M Gueye, DSC Spencer (eds.). John Wiley and Sons, Chichester, UK. 27-40
- Elsheikh EAE, Wood M. 1995. Nodulation and N₂ fixation by soybean inoculate with salt-tolerant rhizobia or salt-sensitive bradyrhizobia in saline soil. *Soil Biol. Biochem.* 27: 657-661.
- Epping B, Hansen AP, Djalali B, Martin P. 1994. Symbiotic effectivity of four *Phaseolus vulgaris* genotypes after inoculation with different strains of *Rhizobium* under controlled conditions. *Z. Naturf.* 49c: 343-351.
- Farnden KJF, Robertson JG. 1980. Methods for studying enzymes involved in metabolism related to nitrogenase. En: Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation. FJ. Bergensen, (ed.) J. Wiley and Sons, N.Y. 265-314.
- Farnham MW, Miller SS, Griffith SM, Vance CP. 1990. Aspartate aminotransferase in alfalfa root nodules. II. Immunological distinction between two forms of the enzyme. *Plant Physiol.* 93: 603-610.
- Fedina IS, Tsonev TD, Guleva EI. 1994. ABA as a modulator of the response of *Pisum sativum* to salt stress. *J. Plant Physiol.* 143: 245-249.
- Fellay R, Rochepeau P, Broughton WJ. 1995. Signals to and emanating from *Rhizobium* largely control symbiotic specificity. En: Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases. Histopathological, Biochemical, Genetic and Molecular Bases, Vol. I: Prokaryotes. US Singh, RP Singh, K Hohmoto (eds.). Pergamon/Elsevier Science Ltd., Oxford. 199-220.
- Fesenko AN, Provorov NA, Orlova, IF, Orlov VP, Simarov BV. 1995. Selection of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* strains for inoculation of *Pisum sativum* L. cultivars: analysis of symbiotic efficiency and nodulation competitiveness. *Plant Soil* 172: 189-198.
- Flowers TJ, Yeo AR. 1988. Ion relations of salt tolerance. En: Solute Transport in Plant Cell and Tissues. DA Baker, JL Hall (eds.). Longman, New York. 392-416.
- Forde BJ, Day HM, Turton JF, Shen WJ, Cullimore JV, Oliver JE. 1989. Two glutamine synthetase genes from *Phaseolus vulgaris* L. display contrasting developmental and spatial pattern of expression in transgenic *Lotus corniculatus* plant. *Plant Cell* 1: 391-401.
- Fortin MG, Zelechowska M, Verma DPS. 1985. Specific targeting of the membrane nodulins to the bacteroid enclosing compartment in soybean nodules. *EMBO J.* 4: 3041-3046.
- Fortmeier R, Schubert S. 1995. Salt tolerance of maize (*Zea mays* L.): the role of sodium exclusion. *Plant Cell Environ.* 18: 1041-1047.
- Franssen HJ, Vijn I, Yang WC, Bisseling T. 1992. Developmental aspects of *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Mol. Biol.* 19: 89-107.
- Gamas P, de Billy F, Truchet G. 1998. Symbiosis-specific expression of two *Medicago truncatula* nodulin genes, *MtN1* and *MtN13*, encoding products homologous to plant defense proteins. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11: 393-403.

- Gantt JS, Larson RJ, Fasella MW, Pathirana SM, Miller SS, Vance SS. 1992. Aspartate aminotransferase in effective and ineffective alfalfa nodules. Cloning of cDNA and determination of enzyme activity, protein, and mRNA levels. *Plant Physiol.* 98: 868-878.
- Garg BK, Vyas SP, Kathja S, Lahiri AN, Mali PC, Sharma PC. 1993. Salinity-fertility interaction on growth, mineral composition and nitrogen metabolism of indian mustard. *J. Plant Nutr.* 16: 1637-1650.
- Gepts P, Debouck D. 1991. Origin, domestication, and evolution of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). En: Common Bean: Research for Crop Improvement. A van Schoonhoven, O Voysest (eds.). CIAT, Cali, Colombia. 7-53.
- Ghanda SV, Sood CR, Reddy VS, Singh YD. 1998. Influence of plant growth regulators on some enzymes of nitrogen assimilation in mustard seedling. *J. Plant. Nutr.* 21: 1765-1777.
- Gilbert GA, Gadush MV, Wilson C, Madore MA. 1998. Amino acid accumulation in sink and source tissues of *Coleus blumei* Benth. during salinity stress. *J. Exp. Bot.* 49: 107-114.
- Gludemans T, Bisseling T. 1989. Plant gene expression in early stages *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Sci.* 65: 1-14.
- Goi SR, Sprent JI, James EK, Jacob-Neto J. 1993. Influence of nitrogen form and concentration on the nitrogen fixation of *Acacia auriculiformis*. *Symbiosis* 14: 115-122.
- González 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: 1515-1523.
- González Rodríguez H, Roberts JKM, Jordan WR, Drew MC. 1997. Growth, water relations, and accumulation of organic and inorganic solutes in roots of maize seedling during salt stress. *Plant Physiol.* 113: 881-893.
- Gordon AJ, Kessler W, Minchin FR. 1990. Defoliation-induced stress in white clover. I. Changes in physiological parameters and protein synthesis. *J. Exp. Bot.* 41: 1245-1253.
- Gordon AJ, Ougham HJ, James CL. 1993. Changes in levels of gene transcripts and their corresponding proteins in nodule of soybean plants subjected to dark-induced stress. *J. Exp. Bot.* 44: 1453-1460.
- Gorham J. 1993. Genetics and physiology of enhanced K/Na discrimination. En: Genetic Aspects of Plant Mineral Nutrition. P Randall (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 151-159.
- Goupil P, Loncle D, Druart N, Bellettre A, Rambour S. 1998. Influence of ABA on nitrate reductase activity and carbohydrate metabolism in chicory roots (*Cichorium intybus* L.). *J. Exp. Bot.* 49: 1855-1862.
- Graham PH, Ranalli P. 1997. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Field Crops Res.* 53: 131-146.
- Graham PH. 1981. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L.: A review. *Field Crop Res.* 4: 93-112.
- Greenway H, Munns R. 1980. Mechanisms of salt-tolerance in non-halophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31: 149-190.
- Gregerson RG, Miller SS, Twary SN, Grantt JS, Vance CP. 1993. Molecular characterization of NADH-dependent glutamate synthase from alfalfa nodules. *Plant Cell.* 5: 215-226.
- Gregorio GB, Senadhira D. 1993. Genetic analysis of salinity tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) *Theor. Appl. Genet.* 86: 333-338.

- Gresshoff PM. 1993. Molecular genetic analysis of nodulation genes in soybean. *Plant Ber. Rev.* 11: 275-318.
- Griffith SM, Vance CP. 1989. Aspartate aminotransferase in alfalfa root nodules. I. Purification and partial characterization. *Plant Physiol.* 90: 1622-1629.
- Groat RG, Vance CP. 1981. Root nodule enzymes of ammonia assimilation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* 67: 1198-1203.
- Groat RG, Vance CP. 1981. Root nodule enzymes of ammonia assimilation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* 67: 1198-1203.
- 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.
- Hanks JF, Tolbert NE, Schubert KR. 1981. Localization of enzymes of ureide biosynthesis in peroxisomes and microsomes of nodules. *Plant Physiol.* 68: 65-69.
- Hansen AP, Rerkasem B, Lordkaew S, Martin P. 1993. Xylem-solute technique to measure N₂ fixation in *Phaseolus vulgaris* L.: calibration and sources of error. *Plant Soil* 150: 223-231.
- Hardarson G, Danso SKA. 1993. Methods for measuring biological nitrogen fixation in grain legumes. *Plant Soil* 152: 19-23.
- Hardy RWF, Holsten RO, Jackson EK, Burns RC. 1968. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43: 1185-1207.
- Hare PD, Cress WA, van Staden J. 1997. The involvement of cytokinins in plant responses to environmental stress. *Plant Growth Reg.* 23: 79-103.
- Hare PD, Cress WA, van Staden J. 1999. Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. *J. Exp. Bot.* 50: 413-434.
- Hare PD, Cress WA. 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regul.* 21: 79-102.
- Hargrove MS, Barry JK, Brucker EA, Berry MB, Phillips GN, Olson JS, Arredondo-Peter R, Dean JM, Klucas RV, Sarath G. 1997. Characterization of recombinant soybean leghemoglobin a and apolar distal histidine mutants. *J. Mol. Biol.* 267: 1032-1042.
- Harper JE. 1987. Soybeans: improvement, production, and uses. En: Nitrogen Metabolism, 2^a Ed. JR Wilcox (ed.). ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI. 497-533.
- Hartwig U, Nosberger J. 1994. What triggers the regulation of nitrogenase activity in forage legume nodules after defoliation. *Plant Physiol.* 161: 109-114.
- Hatch MD, Mau SL. 1973. Activity, location, and role of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase isoenzymes in leaves with C-4 pathway photosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 156: 195-206.
- Hayward HE, Wadleigh CH. 1949. Plant growth on saline and alkaline soils. *Adv. Agron.* 1: 1-35.
- Heichel GH. 1987. Legume nitrogen: symbiotic fixation and recovery by subsequent crops. En: Energy in Plant Nutrition and Pest Control. ZR Hinsel (ed.). Elsevier Science, Amsterdam. 63-80.
- 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.
- Herridge DF, Atkins CA, Pate JS, Rainbird R. 1978. Allantoin and allantoic acid in the nitrogen economy of the cowpea (*Vigna unguiculata*). *Plant Physiol.* 62: 495-498.

- Herridge DF, Danso SKA. 1995. Enhancing crop legume N₂ fixation through selection and breeding. *Plant Soil* 174: 51-82.
- Herridge DF. 1984. Effects of nitrate and plant development on the abundance of nitrogenous solutes in root-bleeding and vacuum-extracted exudates of soybean. *Crop Sci.* 24: 173-179.
- Hervás A, Ligeró F, Lluch C. 1991. Nitrate reduction in pea plants: effects of nitrate application and *Rhizobium* strains. *Soil Biol. Biochem.* 23: 695-699.
- Hervás A, Caba JM, Ligeró F, Lluch C. 1991. Effect of combined nitrogen on dinitrogen fixation and productivity in *Pisum sativum* L. Inoculated with different strains of *Rhizobium*. *Chem.* 22: 1153-1160.
- Hetherington AM, Quatrano RS. 1991. Mechanisms of action of abscisic acid at the cellular level. *New Phytol.* 119: 9-32.
- Hill RD. 1998. What are hemoglobins doing in plants?. *Can. J. Bot.* 76: 707-712.
- Hirel B, Gadal P. 1982. Glutamine synthetase isoforms in leaves of a C-4 plant: *Sorghum vulgare*. *Physiol. Plant.* 54: 69-79.
- Hirel B, Miao GH, Verma DPS. 1993. Metabolic and developmental control of glutamine synthetase genes in legume and non-legume plants. En: Control of Plant Gene Expression. DPS Verma (ed.). CRC Press Inc, Boca Raton. 443-458.
- Hirsch AM, Fang Y. 1994. Plant hormones and nodulation: What's the connection? *Plant Mol. Biol.* 26: 5-9.
- Hoppmans P, Douglas LA, Chalk PM. 1984. Effect of soil salinity and mineral nitrogen on the acetylene reduction activity of *Trifolium subterraneum* L. *Austr. J. Agric. Res.* 35: 9-15.
- Hu Y, Schmidhalter U. 1998. Spatial distributions of inorganic ions and sugars contributing to osmotic adjustment in the elongating wheat leaf under saline soil conditions. *Austr. J. Plant Physiol.* 25: 591-597.
- Hungria M, Barradas CAA, Wallsgrove RM. 1991. Nitrogen fixation, assimilation and transport during the initial growth stage of *Phaseolus vulgaris* L. *J. Exp. Bot.* 42: 839-844.
- Hunt R. 1978. Plant growth analysis, Studies in Biology n° 96. Edward Arnold, London.
- Hunt S, Layzell DB. 1993. Gas exchange of legume nodule and the regulation of nitrogenase activity. *Ann. 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.
- Huyghe C. 1998. Genetics and genetic modifications of plant architecture in grain legumes: a review. *Agronomie* 18: 383-411.
- Ireland RJ, Joy KW. 1985. Plant transaminases. En: Transaminases. P Christen, DE Metzler (eds). John Wiley and Sons, New York. 376-384.
- 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. 1992. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugar in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiol. Plant.* 84: 55-60.
- Jacoby B. 1994. Mechanisms involved in salt tolerance by plants. En: Handbook of Plant and Crop Stress. M Pessarakli (ed.). M. Dekker, Inc. New York. 97-124.

- 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.
- Kannenbergh EL, Brewin NJ. 1989. Expression of cell surface antigen from *Rhizobium leguminosarum* 3841 is regulated by O₂ and pH. *J. Bacteriol.* 171: 4543-4548.
- Kaplan L, Kaplan LN. 1988. *Phaseolus* in archeology. En: Genetic Resources of *Phaseolus* Beans: Their Maintenance, Domestication, Evolution and Utilization. P Gepts Kluwer (ed.). Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. 125-142.
- Khatun S, Flowers TJ. 1995. Effect of salinity on seed set in rice. *Plant Cell Environ.* 18: 61-87.
- Kinzing AP, Socolow RH. 1994. Human impacts on the nitrogen-cycle. *Physics Today* 47: 24-35.
- Kipe-Nolt JA, Montealegre CM, Tohme J. 1992. Restriction of nodulation by the broad host range *Rhizobium tropici* strain CIAT899 in wild accessions of *Phaseolus vulgaris* L. *New Phytol.* 129: 489-494.
- Kishor BPK, Hong Z, Miao G, Hu CA, Verma DPS. 1995. Overexpression of D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol.* 108: 1387-1394.
- Kondorosi E, Schultze M, Savoure A, Hoffman B, Dudits D, Pierre M, Allison L, Bauer P, Kiss, GB, Kondorosi A. 1993. Control of nodule induction and plant cell growth by Nod factors. En: Advances in Molecular-Genetics of Plant-Microbe Interactions. EW Nester, DPS Verma (eds.). Kluwer Academic publishers, Dordrecht. 143-150.
- Kouchi H, Tsukamoto M, Tajima S. 1989. Differential expression of nodule-specific (nodulin) genes in the infected, uninfected and cortical cells of soybean (*Glycine max*) root nodules. *J. Plant Physiol.* 135: 608-517.
- Kuzma MM, Winter H, Storer P, Oresnik I, Atkins CA, Layzell BD. 1999. The site of oxygen limitation in soybean nodules. *Plant Physiol.* 119: 399-407.
- Kuznetsov VV, Shevyakova NI. 1997. Stress responses of tobacco cells to high temperature and salinity. Proline accumulation and phosphorylation of polypeptides. *Physiol. Plant.* 100: 320-326.
- La Rosa DC, Hasegawa D, Rhodes D, Clithero MJ, Watad AEA, Bressan RA. 1987. Abscisic acid stimulated osmotic adjustment and involvement in adaptation of tobacco cells to NaCl. *Plant Physiol.* 85: 174-181.
- 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.
- Lam HM, Coschigano KT, Oliverira JC, Melooliveira R, Coruzzi GM. 1996. The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 569-593.
- Lang V, Mantyla E, Welin B, Sundberg B, Palva ET. 1994. Alterations in water status, endogenous abscisic acid content, and expression of *rab18* gene during the development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 104: 1341-1349.
- Lara M, Porta H, Padilla J, Folch J, Sanchez F. 1984. Heterogeneity of glutamine synthetase polypeptides in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* 76: 1019-1023.
- Lauchli A, Wieneke J. 1979. Studies on growth and distribution of Na⁺, K⁺ and Cl⁻ in soybean varieties differing in salt tolerance. *Z. Pflanzenernaehr. Bodenkd.* 142: 3-13.

- Lauchli A. 1984. Salt exclusion: an adaptation of legumes for crops and pastures under saline conditions. En: Salinity Tolerance in Plants – Strategies for Crop Improvement. Staples RC. y Toenniessen GH. (eds). *J. Wiley and Sons*. NY. 171-188.
- Lea PJ, Robinson SA, Stewart GR. 1990. The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate and asparagine. En: The Biochemistry of Plants, Intermediary Nitrogen Metabolism. BJ Miflin, PJ Lea (eds.). San Diego, 16: 121-159.
- Legocki AB, Biesiadka J, Golinowski W, Kopcinska J, Lotocka B, Rudzinska A, Sikorski M, Stepkowski T, Strozycki P. 1998. Molecular genetics of model plant: *Lupinus luteus*. En: Biological Nitrogen Fixation for the 21 st Century. Elmerich C., Kondorosi A. y Newton WE. (eds.) Kluwer Academic, Dordrecht. 309-311.
- Leonard LT. 1943. A simple assembly for use in testing of culture of rhizobia. *J. Bacteriol.* 45: 523-527.
- Lerouge P, Roche P, Faucher C, Maillet F, Truchet G, Prome JC, Dénarié J. 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature.* 344: 781-784.
- Levitt J. 1980. Responses of Plants to Environmental Stresses. Vol. II, Water, Salt and Other Stresses, Academic Press, New York.
- Lichtenthaler HK. 1996. Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *J. Plant Physiol.* 148: 4-14.
- Ligero F, Caba JM, Lluch C, Olivares J. 1991. Nitrate inhibition of nodulation can be overcome in the presence of the ethylene inhibitor aminoethoxyvinyl glycine. *Plant Physiol.* 97: 1221-1225.
- Ligero F, Lluch C, Olivares J. 1986. Evolution of ethylene from roots of *Medicago sativa* plants inoculated with *Rhizobium meliloti*. *J. Plant Physiol.* 125: 361-365.
- Ligero F, Lluch C, Olivares J. 1987. Evolution of ethylene from roots and nodulation rate of alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants inoculated with *Rhizobium meliloti* as affected by the presence of nitrate. *J. Plant Physiol.* 129: 461-467.
- Ligero F, Lluch C. 1992. Metabolismo nitrogenado en nódulos radicales: asimilación del amonio. En: Biología del Nitrógeno. J González López, C Lluch Pla (eds.). Editorial Rueda, SL, Madrid. 197-219.
- Lillo C. 1984. Diurnal variations of nitrite reductase, glutamine synthetase, glutamate synthase, alanine aminotransferase in barley leaves. *Physiol. Plant.* 61: 214-218.
- Lluch C. 1991. Metabolismo de los ureidos en nódulos de leguminosas. *Bol. S.E.F.V.* 14:15-21.
- Lobo M. 1994. *Phaseolus* production in Colombia. *Grain Legumes (AEP)* 5: 26-27.
- Long SR. 1996. *Rhizobium* symbiosis-Nod factors in perspective. *Plant Cell* 8: 1885-1898.
- 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. *J. Plant Physiol.* 149: 186-195.
- Maas EV, Hoffman GJ. 1977. Crop salt tolerance-current assessment. *Am. Soc. Civ. Eng. J. Irrig. Drain. Div.* 103: 115-134.
- Mäck G. 1995. Organ-specific changes in the activity and subunit composition of glutamine synthetase isoforms of barley (*Hordeum vulgare* L.) after growth on different levels of NH_4^+ . *Planta* 196: 231-238.

- MacParland RH, Guevara JG, Becker RR, Evans HJ. 1976. The purification of the glutamine synthetase from the cytosol of soybean root nodules. *Biochem. J.* **153**: 597-606.
- Malik NSA, Calvert HE, Bauer WD. 1987. Nitrate induced regulation of nodule formation in soybean. *Plant Physiol.* **84**: 266-271.
- Martinez-Romero E, Segovia L, Mercante FM, Franco AA, Graham P, Pardo MA. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**: 417-426.
- Martínez-Romero E. 1994. Recent developments in *Rhizobium* taxonomy. *Plant Soil* **161**: 11-20.
- Mary A, Nirmala J, Sastry KS. 1981. Specific effect of manganese on the allantoinase of *Vigna radiata*. *Phytochemistry* **20**: 2647-2650.
- McCue KF, Hanson AD. 1990. Drought and salt tolerance: towards an understanding and application. *Trends Biotechnol.* **8**: 358-362.
- McNally SF, Hirel B. 1983. Glutamine synthetase isoforms in higher plants. *Physiol. Veg.* **21**: 761-779.
- Mendel RR. 1997. Molybdenum cofactor of higher plants: biosynthesis and molecular biology. *Planta* **203**: 399-405.
- Mergaert P, Van Montagu M, holsters M. 1997. Molecular mechanisms of Nod factor diversity. *Mol. Microbiol.* **25**: 811-817.
- Merrick MJ. 1992. Regulation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic bacteria. En: Biological Nitrogen Fixation. G Stacey, RH Burris, HJ Evans. (eds.). Chapman-Hall, New York. 835-876.
- Miao GH, Hirel B, Marsolier MC, Ridge RW, Verma DPS. 1991. Ammonia regulated expression of a soybean gene encoding cytosolic glutamine synthetase in transgenic *Lotus-corniculatus*. *Plant Cell.* **3**: 11-22.
- Migge A, Meya G, Carrayol E, Hirel B, Becker TW. 1996. Regulation of the subunit composition of tomato plastidic glutamine synthetase by light and the nitrogen source. *Planta* **200**: 213-220.
- Minchin FR, Becana M, Sprent JI. 1989. Short-term inhibition of legume N₂ fixation by nitrate. II. Nitrate effects on nodule oxygen diffusion. *Planta* **180**: 46-52.
- Minchin FR, Mínguez MI, Sheehy JE, Witty JF, Skot L. 1986. Relationships between nitrate and oxygen supply in symbiotic nitrogen fixation by white clover. *J. Exp. Bot.* **37**: 1103-1113.
- Minchin FR, Witty JF, Mytton LR. 1994. Reply to "Measurement of nitrogenase activity in legume root nodules: in defense of the acetylene reduction assay" by JK Vessey. *Plant Soil* **158**: 163-167.
- Miranda-Ham ML, Loyola-Vargas VM. 1988. Ammonia assimilation in *Canavalia ensiformis* plants under water and salt stress. *Plant Cell Physiol.* **29**: 747-753.
- Montalbini P. 1998. Purification and some properties of xantine dehydrogenase from wheat leaves. *Plant Sci.* **134**: 89-102.
- Montero E, Cabot C, Poschenrieder C, Barceló J. 1997. Endogenous abscisic acid levels are linked to decreases growth of bush bean plants treated with NaCl. *Physiol. Plant.* **101**: 17-22.
- Montero E, Cabot C, Poschenrieder C, Barceló J. 1998. Relative importance of osmotic-stress and ion-specific effects on ABA-mediated inhibition of leaf expansion growth in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Cell Environ.* **21**: 54-62.

- Moons A, Bauw G, Prinsen E, Van Montagu M, Van der Straeten D. 1995. Molecular and physiological responses to abscisic acid and salts in roots of salt-tolerant indica rice varieties. *Plant Physiol.* 107: 177-186.
- Muller B, Touraine B. 1992. Inhibition of NO₃⁻ uptake by various phloem-translocated amino acids in soybean seedlings. *J. Exp. Bot.* 43: 617-623.
- Munns R, Termaat A. 1986. Whole-plant responses to salinity. *Aust. J. Plant Physiol.* 13: 143-160.
- Munns R. 1993. Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant Cell Envir.* 16: 15-24.
- Muñoz JA, Palomares AJ, Ratet P. 1996. Plant genes induced in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *World J. Microbiol. Biotech.* 12: 189-202.
- Muñoz-Blanco J, Cardenas J. 1989. Changes in glutamate dehydrogenase activity of *Chlamydomonas reinhardtii* under different trophic and stress conditions. *Plant Cell Environ.* 12: 173-182.
- Nagel M, Hartmann T. 1980. Glutamate dehydrogenase from *Medicago sativa* L.: purification and comparative kinetic studies of organ-specific multiple forms. *Zeitschrift für Naturforschung.* 35C: 406-415.
- Nakamura T, Osaki M, Ando M, Tadano T. 1996. Differences in mechanisms of salt tolerance between rice and barley plant. *Soil Sci. Plant Nutr.* 42: 303-314.
- Nap JP, Bisseling T. 1990. Nodulin function and nodulin gene regulation in root nodule development. En: *The Molecular Biology of Symbiotic Nitrogen Fixation*. PM Gresshoff (ed.). Boca Raton, Florida: CRC Press. 181-229.
- Newbould P. 1989. *Plant Soil* 115: 297-311.
- Newton WE. 1993. Nitrogenases: distribution, composition, structure and function. En: *New Horizons in Nitrogen Fixation*. R Palacios, J Mora, W Newton (eds.). Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands Publishers. 5-17.
- Nguyen J, Feierabend J. 1978. Some properties and subcellular localization of xanthine dehydrogenase in pea leaves. *Plant Sci. (Lett.)* 13: 125-132.
- Nguyen J. 1983. In vitro study of the xanthine dehydrogenase from illuminated or darkened leaves. *Physiol. Plant.* 59: 73-78.
- Noble CL, Halloran GM, West DW. 1984. Identification and selection for salt tolerance in lucerne (*Medicago sativa* L.). *Aust. J. Agric. Res.* 35: 239-252.
- Nolte KD, Hanson AD. 1997. Proline accumulation and methylation to proline betaine in citrus: implications for genetic engineering of stress resistance. *Amer. Soc. Hort. Sci.* 122: 8-13.
- Nutman PS. 1976. IBP field experiments on nitrogen fixation by nodulated legumes. En: *Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants*. PS Nutman (ed.). Cambridge University Press, Cambridge. 211-237.
- O'Brian M. 1996. Heme synthesis in the *Rhizobium*-legume symbiosis: a palette for bacterial and eukariotic pigments. *J. Bacteriol.* 2471-2478.
- Oaks A. 1994. primary nitrogen assimilation in higher plants and its regulation. *Can. J. Bot.* 72: 739-750.
- Ocaña A, Caba JM, Ligeró F, Lluch C. 1998. Effect of plant genotype on nitrogen fixation and carbon metabolism in *Vicia faba* root nodules. *Agr. Med.* 128: 241-249.

- Oghoghorie CGO, Pate JS. 1971. The nitrate stress syndrome of the nodulated field pea (*Pisum arvense* L.). En: Biological Nitrogen Fixation in Natural and Agricultural Habitats. Plant Soil (special volume). TA Lie, EG Mulder (eds.). Martinus Nijhoff. The Hague. 185-202.
- Ortega JL, Sánchez F, Soberón M, Lara M. 1992. Regulation of nodule glutamine synthetase by CO₂ levels in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiol.* 98: 584-587.
- Ory RL, Gordon CV, Singh R. 1969. Ureide metabolism in castor beans. Evidence for a particle-bound allantoinase. *Phytochem.* 8: 401-404.
- Packovsky RS, Fuller G. 1991. Nitrogen assimilation and partitioning in two nitrogen-fixing cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Soil.* 132: 139-148.
- Padilla JE, Miranda J, Sánchez F. 1991. Nodulin regulation in common bean nodules induced by bacterial mutants. *Mol Plant Microbe Interact.* 4: 433-439.
- Palmer G, Olson JS. 1980. Concepts and approaches to the understanding of electron transfer processes in enzymes containing multiple redox centers. En: Molybdenum and Molybdenum-Containing Enzymes. MP Coughlan (ed.). Pergamon Press, Oxford. 189-220.
- Parish RW. 1972. Urate oxidase in peroxisomes from maize root tips. *Planta* 104: 247-251.
- Park SJ, Buttery BR. 1988. Nodulation mutants of white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) induced by ethyl-methane sulphonate. *Can. J. Plant Sci.* 68: 199-202.
- Park SJ, Buttery BR. 1989. Identification and characterization of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) lines well-nodulated in the presence of high nitrate. *Plant Soil* 119: 237-244.
- Parsons R, Stanforth A, Raven JA, Sprent JI. 1993. Nodule growth and activity may be regulated by feedback mechanism involving phloem nitrogen. *Plant Cell Environ.* 16: 125-136.
- Pate JS, Atkins CA, White ST, Rainbird RM, Woo KC. 1980. Nitrogen nutrition and xylem transport of nitrogen in a ureide-producing grain legume. *Plant Physiol.* 65: 961-965.
- Pate JS, Atkins CA. 1983. Nitrogen uptake, transport and utilization in nitrogen fixation. En: Ecology of Nitrogen Fixation. WJ Broughton (ed.). Clarendon Press, Oxford. 245-298.
- Peach K, Tracey MV. 1956. Modern Method of Plant Analysis. Springer Verlag. Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- Penmetsa RV, Cook DR. 1997. A legume ethylene-insensitive mutant hyperinfected by its rhizobial symbiont. *Science* 275: 527-530.
- Peña-Cabriales JJ, Grageda-Cabrera OA, Kola V, Hardarson G. 1993. Time course of N₂ fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Soil.* 152: 115-121.
- Peréz-Alfocea F, Santa Cruz A, Guerrier G, Bolarin MC. 1994. NaCl stress-induced organic changes on leaves and calli of *Lycopersicon esculentum* L. *pennellii* and their interspecific hybrid. *J. Plant Physiol.* 143: 106-111.
- 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: 303-310.
- Phillips DA. 1980. Efficiency of symbiotic nitrogen fixation in legume. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31: 29-49.
- Pichon M, Journet EP, Dedieu A, de Billy F, Truchet G, Barker DG. 1992. *Rhizobium meliloti* elicits transient expression of the early nodulin gene *ENOD12* in the differentiating root epidermis of transgenic alfalfa. *Plant Cell* 4: 1199-1211.
- Pineda P. 1992. Mejoramiento de la fijación biológica de nitrógeno en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en el Perú. CIAT Documento de trabajo 118: 63.

- Popova LP, Tsonev TD, Lazova GN, Stoinova ZG. 1996. Drought- and ABA-induced changes in photosynthesis of barley plants. *Physiol. Plant.* 96: 623-629.
- Pruvot G, Massimino J, Peltier G, Rey P. 1996. Effects of low temperature, high salinity and exogenous ABA on the synthesis of two chloroplastic drought-induced proteins in *Solanum tuberosum*. *Physiol Plant.* 97: 123-131.
- Pukacka S, Pukacki PM. 1997. Changes in soluble sugars in relation to desiccation tolerance and effects of dehydration on freezing characteristics of *Acer platanoides* and *Acer pseudoplatanus* seeds. *Acta Physiol. Plant.* 19: 147-154.
- Rae AL, Bonfante-Fasolo P, Brewin NJ. 1992. Structure and growth of infection threads in the legume symbiosis with *Rhizobium leguminosarum*. *Plant J.* 2: 385-395.
- Raffin A, Roumet P. 1994. Shoor-root control of nitrate tolerance of N₂ fixation in spontaneously tolerant soybean lines: reciprocal grafting experiments. *Agronomie* 14: 473-480.
- Rainbird RM, Atkins CA, Pate JS, Sanford P. 1983. Significance of hydrogen evolution in the carbon and nitrogen economy of nodulated cowpea. *Plant Physiol.* 71: 122-127.
- Ramanjulu S, Sudhakar C. 1997. Drought tolerance is partly related to amino acid accumulation and ammonia assimilation: a comparative study in two mulberry genotypes differing in drought sensitivity. *J. Plant Physiol.* 150: 345-350.
- Rao IM, Ayarza MA, Garcia R. 1995. Adaptive Attributes of tropical forage species to acid soils I. Differences in plant growth, nutrient acquisition and nutrient utilization among C₄ grasses and C₃ legumes. *J. Plant Nut.* 18: 2135-2155.
- Rennie RJ, Dubetz S. 1986. Determined nitrogen fixation in field grown chickpea, lentil, faba bean and field bean. *Agron. J.* 78: 654-660.
- Reynolds PHS, Boland MJ, Blevins DG, Randall DD, Schubert KR. 1982. Ureide biogenesis in leguminous plants. *Trends Biochem. Sci.* 7: 366-368.
- Rhoades JD. 1972. Quality of water for irrigation. *Soil Sci.* 113: 177-184.
- Rhodes D, Handa S. 1989. Amino acid metabolism in relation to osmotic adjustment in plant cells. En: Biochemical and Physiological Mechanisms Associated with Environmental Stress Tolerance. JH Cherry (ed.). Springer-Verlag, Berlin. 41-62.
- Ridley SM, McNally SF. 1985. Effect of the phosphinothricin on the isoenzymes of glutamine synthetase isolated from plant species which exhibit varying degrees of susceptibility to the herbicide. *Plant Sci.* 39: 31-36.
- Rigaud J. y Puppo A. (1975) Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids. *J. Gen. Microbiol.* 88: 223-228.
- Robinson SA, Slade AP, Fox GG, Phillips R, Ratcliffe RG, Stewart GR. 1991. The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism. *Plant Physiol.* 95: 509-516.
- Romero JM, Maranon T. 1994. Long-term responses of *Meliloti segitalis* to salinity. I. Growth and partitioning. *Plant Cell Environ.* 17: 1243-1248.
- Sagan M, Messenger A, Duc G. 1993. Specificity of the *Rhizobium*-legume symbiosis obtained after mutagenesis in pea (*Pisum sativum* L.). *New Phytol.* 125: 757-761.
- Sagi M, Dovrat A, Kipnis T, Lips H. 1998a. Nitrate reductase, phosphoenolpyruvate carboxylase, and glutamine synthetase in annual ryegrass as affected by salinity and nitrogen. *J. Plant Nutr.* 21: 707-723.
- Samaras Y, Bressan RA, Csonka LN, Garcia-Rios MGD, Urzo P, Rhodes D. 1994. Proline accumulation during drought and salinity. En: Environment and Plant Metabolism. Flexibility

- and Acclimation. N Smirnov, WJ Davies (eds.). Bios Scientific Publis. Lancaster, UK. 161-187.
- Sánchez F, Campos F, Padilla J, Bonneville JM, Enriquez C, Caput D. 1987. Purification, cDNA cloning and developmental expression of the nodule-specific uricase from *Phaseolus vulgaris* L. Negro Jamapa. *Plant Physiol.* **84**: 1143-1147.
- Sánchez-Guerrero Cantó I. 1996. Estudios fisiológicos y bioquímicos de la reducción de nitrato en *Vicia faba*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. pp. 188.
- Sanjuan J, Carlson RW, Spaink HP, Bhat RU, Barbour MW, Glushka J, Stacey G. 1992. A 2-O-Methylfucose moiety is present in the lipo-oligosaccharide nodulation signal of *Bradyrhizobium japonicum*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 8789-8793.
- Savouré A, Hua XJ, Bertauche N, van Montagu M, Verbruggen N. 1997. Abscisic acid-independent and abscisic acid-dependent regulation of proline biosynthesis following cold and osmotic stresses. *Mol. Gen. Genet.* **254**: 104-109.
- Schoonhoven A van, Pastor-Corrales MA. 1987. Standard system for the evaluation of bean germplasm. CIAT, Cali, Colombia. 53.
- Schroeder JI, Ward JM, Gassmann W. 1994. Perspectives on the physiology and structure of inward-rectifying K⁺ channels in higher plants: biophysical implications for K⁺ uptake. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**: 441-471.
- Schubert KR, Boland MJ. 1990. The ureides. *Biochem. Plant* **16**: 197-282.
- Schubert KR. 1981. Enzymes of purine biosynthesis and catabolism in *Glycine max*. *Plant Physiol.* **68**: 1115-1122.
- Schubert KR. 1981. Enzymes of purine biosynthesis and catabolism in *Glycine max*: Comparison of activities with N₂ fixation and composition of xylem exudate during nodule development. *Plant Physiol.* **68**: 1115-1122.
- Schubert KR. 1986. Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport and metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **37**: 539-574.
- Schuller KA, Minchin FR, Gresshoff PM. 1988. Nitrogenase activity and oxygen diffusion in nodules of soybean cv. Bragg and a supernodulating mutant: effects of nitrate. *J. Exp. Bot.* **39**: 865-877.
- Schultze M, Kondorosi A. 1998. Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu. Rev. Genet.* **32**: 33-57.
- Segovia L, Young JPW, Martinez-Romero E. 1993. Reclassification of american *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**: 374-377.
- Serraj R, Drevon JJ, Obaton M, Vidal A. 1992. Variation in nitrate tolerance of nitrogen fixation in soybean (*Glycine max*) - *Bradyrhizobium* symbiosis. *J. Plant Physiol.* **140**: 366-371.
- Serraj R, Sinclair TR. 1996. Processes contributing to N₂-fixation insensitivity to drought in the soybean cultivar Jackson. *Crop Sci.* **36**: 961-968.
- Serrano R, Gaxiola R. 1994. Microbial model and salt stress tolerance in plant. *Crit. Rev. Plant Sci.* **13**: 121-138.
- Shannon MC. 1984. Breeding, selection, and the genetics of salt tolerance. En: Salinity Tolerance in Plants: Strategies for Crop Improvement. RC Staples, GH Toenniessen (eds.). John Wiley and Sons, New York. 231-254.

- Shantharam S, Mattoo AK. 1997. Enhancing biological nitrogen fixation: an appraisal of current and alternative technologies for N input into plants. *Plant Soil* 194: 205-216.
- Shelp BJ, Atkins CA, Storer PJ, Canvin DJ. 1983. Cellular and subcellular organization of pathway of ammonia assimilation and ureide synthesis in nodules of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Arch. Biochem. Biophys.* 224: 429-441.
- Shelp BJ, Atkins CA. 1984. Subcellular location of enzymes of ammonia assimilation and asparagine synthesis in root nodules of *Lupinus albus* L. *Plant Sci. Lett.* 36: 225-230.
- Sheng C, Harper JE. 1997. Shoot versus root signal involvement in nodulation and vegetative growth in wild-type and hypernodulating soybean genotypes. *Plant Physiol.* 113: 825-831.
- Sherwood JE, Vasse JM, Dazzo FB, Truchet GL. 1984. Development and trifoliin A-binding ability of the capsule of *Rhizobium trifolii*. *J. Bacteriol.* 159: 145-152.
- Shukla SP, Pandey KD, Kashyap AK. 1997. Nitrogen fixation, ammonium transport and glutamine synthetase activity in an antarctic cyanobacterium anabaena sp: influence of temperature. *J. Plant Physiol.* 150: 351-354.
- Sibole JV, Montero E, Cabot C, Pochenrieder C, Barceló J. 1998. Role of sodium in the ABA-mediated long-term growth response of bean to salt stress. *Physiol. Plant.* 104: 299-305.
- 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 nodule formation by soybean. *Plant Physiol.* 74: 72-76.
- Somal TLC, Yapa PAJ. 1998. Accumulation of proline in cowpea under nutrient, drought, and saline stresses. *J. Plant Nutr.* 21: 2465-2473.
- Soussi M, Lluch C, Ocaña A. 1999a. Comparative study of nitrogen fixation and carbon metabolism in two chick-pea (*Cicer arietinum* L.) cultivars under salt stress. *J. Exp. Bot.* (en prensa).
- Soussi M, Lluch C, Ocaña A. 1999b. Growth, nitrogen fixation, and ion accumulation in two chick-pea cultivar. *J. Plant Nutr.* (en prensa).
- Soussi M, Ocaña A, Lluch C. 1998. Effects of salt stress on growth, photosynthesis and nitrogen fixation in chick-pea (*Cicer arietinum* L.). *J. Exp. Bot.* 49: 1329-1337.
- Soussi M. 1998. Estudio de la simbiosis *Mesorhizobium ciceri*-*Cicer arietinum*: Efectos metabólicos, fisiológicos y bioquímicos inducidos por el estrés salino. Tesis doctoral. Universidad de Granada.
- Spaink HP, Lugtenberg BJJ. 1994. Role of rhizobial lipo-chitin oligosaccharide signal molecules in root nodule organogenesis. *Plant Mol. Biol.* 26: 1413-1422.
- Sprent JI, Sutherland JM, Faria SM. 1989. Structure and function of root nodules from woody legumes. En: *Advances in Legume Biology*. C.H. Stirton y J.L. Zarucchi (eds.), Monog. Syst. Bot., Missouri Bot. Gard., Missouri. 29: 559-578.
- Sprent JL, Zahran HH. 1988. Infection development and functioning of nodules under drought and salinity. En: *Nitrogen Fixation by Legumes in Mediterranean Agriculture*. DP Beck y LA Materon (eds.). Martinus-Nijhoff. Dordrecht. 145-151.
- Srivastava HS, Singh RP. 1987. Role and regulation of L-glutamate deshydrogenase activity in higher plants. *Phytochemistry* 26: 597-610.

- Stewart CR, Mann AF, Fentem PA. 1980. Enzymes of glutamate formation: glutamate deshydrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase. En: The Biochemistry of Plants. BJ Miflin (ed.). Academic Press, New York. 271-327.
- Storey R, Gorham J, Pitman MC, Hanson MG, Gage D. 1993. Response of *Melanthera biflora* to salinity and water stress. *J. Exp. Bot.* **44**: 1551-1561.
- Streeter J. 1988. Inhibition of legume nodule formation and nitrogen fixation by nitrate. *Crit. Rev. Plant Sci.* **7**: 1-23.
- Streeter JG. 1979. Allantoin and allantoic acid in tissues and stem exudate from field-grown soybean plants. *Plant Physiol.* **63**: 478-480.
- Streeter JG. 1988. Inhibition of legume nodule formation and N₂ fixation by nitrate. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* **7**: 1-23.
- Streeter JG. 1995. Recent developments in carbon transport and metabolism in symbiotic systems. *Symbiosis.* **19**: 175-196.
- Subbarao GV, Johansen C. 1994. Strategies and scope for improving salinity tolerance in crop plants. En: Handbook of Plant and Crop Stress. M Pessaraki (ed.). 559-579.
- Szabolcs I. 1994. Soil and salinization. En: Handbook of Plant and Crop Stress. M Pessaraki (ed.). M. Dekker, Inc. New York. 3-12.
- Szegi J, Gulyas F, Köves-Pechy K, Soos T. 1991. Experiments with rhizobial inoculants in hungarian soil. *Zentralbl. Microbiol.* **146**: 539-543.
- Ta TC, Faris MA, Macdowall FDH. 1986. Pathways of nitrogen metabolism in nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* **80**: 1002-1005.
- Tajima S, Ito H, Tanaka K, Nanakodo T, Sugimoto A, Kouchi H, Okazaki K. 1991. Soybean cotyledons contain a uricase that cross-reacts with antibodies raised against the nodule uricase (Nod-35). *Plant Cell Physiol.* **32**: 1307-1311.
- Tanaka A, Fujita K, Terasawa I. 1985. Growth and dinitrogen fixation of soybean root system affected by partial exposure to nitrate. *Soil Sci. Plant Nutr.* **31**: 637-645.
- Theimer RR, Beevers H. 1971. Uricase and allantoinase in glyoxysomes. *Plant Physiol.* **47**: 246-251.
- Thummler F, Verma DPA. 1987. Nodulin-100 of soybean is the subunit of sucrose synthase regulated by the availability of free heme in nodules. *J. Biol. Chem.* **262**: 14730-14736.
- Tingey SV, Tsai FY, Edwards JW, Walker EL, Coruzzi GM. 1988. Chloroplast and cytosolic glutamine synthetase are encoded by homologous nuclear genes which are differentially expressed *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **263**: 9651-9657.
- Trinchant JC, Rigaud J. 1980. Nitrite inhibition of nitrogenase from soybean bacteroids. *Arch. Microbiol.* **124**: 49.
- Truchet GL, Dazzo FB. 1982. Morphogenesis of lucerne root nodules incited by *Rhizobium meliloti* in the presence of combined nitrogen. *Planta* **154**: 352-360.
- Tully R, Hanson A, Nelsen 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 y Day DA. 1995. A channel like transporter for NH₄⁺ on the symbiotic interface of N₂-fixing plants. *Nature.* **378**: 629-632.
- Udvardi MK, Day DA. 1997. Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 493-523.

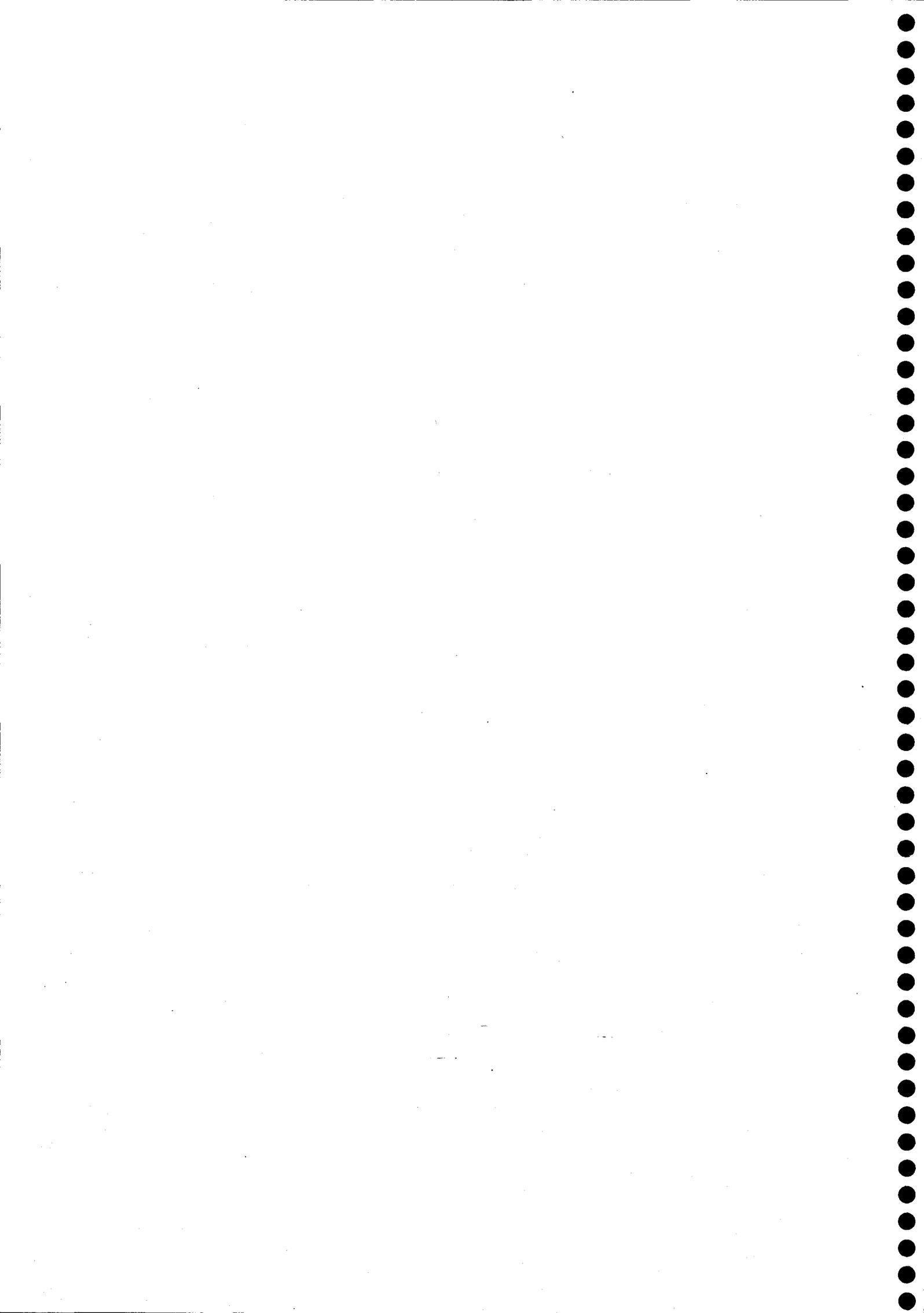
- Ungar IA. 1991. Ecophysiology of vascular halophytes. CRC Press, Boca Raton, Florida. 209.
- Van Kammen A. 1984. Suggested nomenclature for plant genes involved in nodulation and symbiosis. *Plant Mol. Biol. Rep.* 2: 43-45.
- Van Sponen PC, Bakhuizen R, van Brussel AAN, Kijne JW. 1994. Cell wall degradation during infection thread formation by root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* is a two step process. *Eur. J. Cell Biol.* 64: 88-94.
- Vance CP, Gantt JS. 1992. Control of nitrogen and carbon metabolism in root nodules. *Physiol. Plant.* 85: 266-274.
- Vance CP, Gregerson RG, Robinson DL, Miller SS, Gantt JS. 1994. *Plant Sci.* 7: 1-7
- Vance CP, Heichel GH. 1981. Nitrate assimilation during vegetative regrowth of alfalfa. *Plant Physiol.* 68: 1052-1056.
- Vance CP, Heichel GH. 1991. Carbon in nitrogen fixation: limitation or exquisite adaptation? *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol.* 42: 373-392.
- 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. 1998. Legume symbiotic nitrogen fixation: Agronomic aspects. En: The *Rhizobiaceae*. HP Spaink, A Kondorosi, PJJ Hooykaas (eds.). Kluwer Academic Publishers. 509-530.
- 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.
- 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. 1992. Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of *Rhizobium*. *Plant Cell* 4: 378-382.
- Verma DPS. 1992. Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of *Rhizobium*. *Plant. Cell.* 4: 373-382.
- Vessey JK, Walsh KB, Layzell DB. 1988. Can a limitation in phloem supply to nodules account for the inhibitory effect of nitrate on nitrogenase activity in soybean? *Physiol. Plant.* 74: 137-146.
- Vessey JK. 1994. Measurement of nitrogenase activity in legume root nodules: in defense of the acetylene reduction assay. *Plant Soil* 158: 151-162.
- Vézina LP, Joy KW, Hope HJ. 1988. The effects of nitrate on the enzymes involved in nitrogen assimilation in nodulated pea roots. *Physiol. Plant.* 72: 762-768.
- Vincent JM. 1970. A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria. Blackwell, Oxford. pp.164.
- Vogels GD, van der Drift C. 1970. Differential analyses of glyoxylate derivatives. *Anal. Biochem.* 33: 143-157.
- Volkmar KM, Hu Y, Steppuhn H. 1998. Physiological responses of plants to salinity: A review. *Can. J. Plant Sci.* 78: 19-27.
- Waterer JG, Vessey JK. 1993. Effect of low static nitrate concentration on mineral nitrogen uptake, nodulation, and nitrogen fixation on field pea. *J. Plant Nut.* 16(9): 1775-1789.

- Webb MA, Lindell JS. 1993. Purification of allantoinase from soybean seeds and characterization of antibodies. *Plant Physiol.* 103: 1235-1241.
- Wells E, Lees EM. 1992. Properties of allantoinase from whole developing fruits of french bean, *Phaseolus vulgaris* L. *Aust. J. Plant Physiol.* 19: 201-211.
- Werner D. 1992. Physiology of nitrogen-fixing legume nodules: compartments and functions. En: Biological Nitrogen Fixation. G Stacey, RH Burris, HJ Evans (eds.). Chapman and Hall, New York. 399-431.
- West C, Briggs GE, Kidd F. 1920. Methods and significant relations in a quantitative analysis of plant growth. *New Phytol.* 19: 200-207.
- West CP, Mallarino AP. 1996. Nitrogen transfer from legumes to grasses. En: Nutrient Cycling in Forage Systems, Potash and Phosphate. RE Joost, CA Roberts (eds). Institute and Foundation for Agronomic Research, Manhattan, Kansas. 167-175.
- Wilson JR. 1985. Comparative response to salinity of the growth and nodulation of *Macroptilium atropurpureum* cultivar siratro and *Neonotonia wightii* cultivar cooper seedling. *Austr. J. Agric. Res.* 36: 589-600.
- Wolfenden J, Robinson DC, Cape JN, Paterson IS. 1988. Use of caretenoid ratios ethylene emissions and buffer capacities for the early diagnosis of forest decline. *New Phytol.* 109: 85-95.
- Woolley JN, Lepiz-I, Portes e Castro T de A, Voss J. 1991. Bean cropping systems in the tropics and subtropics and their determinants. En: Common Bean: Research for Crop Improvement. A van Schoonhoven and O Voysest (eds.). CAB International/CIAT, Wallingford, UK. 679-706.
- Wycoff KL, Hunt, S, Gonzales MB, VandenBosch KA, Layzell DB, Hirsch AM. 1998. Effects of oxygen on nodule physiology and expression of nodulins in alfalfa. *Plant Physiol.* 117: 385-395.
- Wyn Jones RG, Storey R. 1981. Betaines. En: The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants. LG Paleg, D Aspinall (eds.). Academic Press, New York. 171-204.
- Yemm EW, Cocking EC. 1955. The determination of amino acids with ninhydrin. *Analytic.* 80: 209-213.
- Yeo A. 1998. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *J. Exp. Bot.* 49: 915-929.
- 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, 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.
- Zanetti S, Hartwig UA, Luscher A, Hebeisen T, Hendrey GR, Blum H, Nosberger J. 1996. Stimulation of symbiotic N₂ fixation in trifolium repens L under elevated atmospheric Pco(2) in a grassland ecosystem. *Plant Physiol.* 112: 575-583.
- Zeevaart JAD, Creelman RA. 1988. Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 439-473.
- Zidan L, Shaviv A, Ravina L, Neumann PM. 1992. Does salinity inhibit maize leaf growth by reducing tissue concentrations of essential mineral nutrients. *J. Plant Nutr.* 15: 1407-1419.

Zou N, Dart PJ, Marcar NE. 1995. Interaction of salinity and rhizobial strain on growth and N₂-fixation by *Acacia ampliceps*. *Soil Biol. Biochem.* 27: 409-413.

Zúñiga 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. pp 302.

IX. APENDICE



1. Efecto del estrés salino y de la cepa de *Rhizobium* en simbiosis con *Phaseolus vulgaris*.

Tabla A 1.1. Peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de raíz (PSR), peso seco de planta (PSP) en g planta⁻¹, relación raíz/parte aérea (RPA), en *Phaseolus vulgaris* var. Africa en simbiosis con las cepas CIAT899, Rp10 y 980 de *Rhizobium* sp.

Cepa	NaCl (mM)	PSPA	PSR	PSP	RPA
CIAT899	0	2.26	0.49	2.93	0.22
	50	1.73	0.48	2.26	0.28
Rp10	0	2.38	0.64	3.20	0.27
	50	1.58	0.60	2.34	0.37
980	0	2.87	0.92	4.00	0.31
	50	1.67	0.64	2.44	0.39
MDS (0.05)		0.38	0.23	0.61	0.07

Tabla A 1.2. Análisis de la varianza correspondientes al peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de raíz (PSR), peso seco de planta (PSP) en g planta⁻¹, relación raíz/parte aérea (RPA), en *Phaseolus vulgaris* var. Africa en simbiosis con las cepas CIAT899, Rp10 y 980 de *Rhizobium* sp.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Peso seco parte aérea (PSPA)					
cepa (C)	0.600	2	0.300	4.222	0.025
trat. (T)	5.989	1	5.989	84.242	0.000
C x T	0.654	2	0.327	4.600	0.019
Error	1.990	28	0.071		
Total	8.841	33			
b) Peso seco raíz (PSR)					
cepa (C)	0.488	2	0.244	7.382	0.003
trat. (T)	0.093	1	0.093	2.827	0.104
C x T	0.118	2	0.059	1.784	0.187
Error	0.925	28	0.033		
Total	1.580	33			
c) Peso seco planta (PSP)					
cepa (C)	2.065	2	1.033	5.388	0.011
trat. (T)	8.341	1	8.341	43.524	0.000
C x T	1.459	2	0.729	3.805	0.035
Error	5.366	28	0.192		
Total	16.465	33			
d) Relación raíz/parte aérea (RPA)					
cepa (C)	0.063	2	0.032	11.347	0.000
trat. (T)	0.056	1	0.056	20.130	0.000
C x T	0.003	2	0.001	0.473	0.628
Error	0.078	28	0.003		
Total	0.201	33			

Tabla A 1.3. Peso seco de nódulos (PSN) en g planta⁻¹, peso normalizado de nódulos (PNN) en mg PSN g⁻¹ PSPA, actividad reductora de acetileno (ARA) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ PSN h}^{-1}$ y ARA por planta (ARAP) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ planta}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en *Phaseolus vulgaris* var. Africa en simbiosis con las cepas CIAT899, Rp10 y 980 de *Rhizobium* sp.

Cepa	NaCl (mM)	PSN	PNN	ARA	ARAP
CIAT899	0	0.186	82.6	103.2	19.18
	50	0.146	84.7	29.4	4.27
Rp10	0	0.171	72.1	29.2	4.99
	50	0.157	99.3	7.0	1.17
980	0	0.214	74.5	31.0	6.63
	50	0.128	76.9	6.2	0.79
MDS (0.05)		0.041	18.9	8.1	1.74

Tabla A 1.4. Análisis de la varianza correspondientes con el peso seco de nódulos (PSN) en g planta⁻¹, peso normalizado de nódulos (PNN) en mg PSN g⁻¹ PSPA, actividad reductora de acetileno (ARA) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ PSN h}^{-1}$ y ARA por planta (ARAP) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ planta}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en *Phaseolus vulgaris* var. Africa en simbiosis con las cepas CIAT899, Rp10 y 980 de *Rhizobium* sp.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Peso seco de nódulos (PSN)					
cepa (C)	0.0003	2	0.0001	0.106	0.899
trat. (T)	0.0183	1	0.0183	15.181	0.001
C x T	0.0072	2	0.0036	2.993	0.066
Error	0.0338	28	0.0012		
Total	0.0593	33			
b) Peso normalizado de nódulos (PNN)					
cepa (C)	604.2	2	302.1	1.222	0.310
trat. (T)	944.3	1	944.3	3.819	0.061
C x T	1152.0	2	576.0	2.330	0.116
Error	6922.8	28	247.2		
Total	9471.4	33			
c) Actividad reductora de acetileno específica (ARA)					
cepa (C)	23517.0	2	11758.5	198.4	0.000
trat. (T)	8007.5	1	8007.5	135.1	0.000
C x T	8098.7	2	4049.3	68.3	0.000
Error	1659.2	28	59.3		
Total	42028.9	33			
d) ARA por planta (ARAP)					
cepa (C)	727.5	2	363.7	156.6	0.000
trat. (T)	343.4	1	343.4	147.8	0.000
C x T	316.3	2	158.1	68.1	0.000
Error	65.0	28	2.3		
Total	1485.6	33			

Tabla A 1.5. Contenido de alantoina (ALN), ácido alantoico (ALC), ureidos (ALN+ALC) en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF, y actividad alantoinasa en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF h^{-1} , en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Africa en simbiosis con las cepas CIAT899, Rp10 y 980 de *Rhizobium* sp.

Cepa	NaCl (mM)	ALN	ALC	Ureidos	Alantoinasa
CIAT899	0	0.42	3.75	4.17	232.4
	50	0.42	1.93	2.35	48.4
Rp10	0	0.16	1.20	1.37	172.4
	50	0.05	0.17	0.23	49.7
980	0	0.15	2.76	2.91	201.0
	50	0.06	0.32	0.38	49.9
MDS (0.05)		0.10	0.05	0.09	19.5

Tabla A 1.6. Análisis de la varianza correspondientes al contenido de alantoina (ALN), ácido alantoico (ALC), ureidos (ALN+ALC) en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF, y actividad alantoinasa en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF h^{-1} , en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Africa en simbiosis con las cepas CIAT899, Rp10 y 980 de *Rhizobium* sp.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Alantoina (ALN)					
cepa (C)	0.831	2	0.416	64.970	0.000
trat. (T)	0.002	1	0.002	0.377	0.550
C x T	0.046	2	0.023	3.615	0.040
Error	0.186	29	0.006		
Total	1.057	34			
b) Acido alantoico (ALC)					
cepa (C)	35.156	2	17.578	1302.701	0.000
trat. (T)	19.033	1	19.033	1410.523	0.000
C x T	9.104	2	4.552	337.363	0.000
Error	0.405	30	0.013		
Total	63.698	35			
c) Ureidos					
cepa (C)	45.769	2	22.885	1302.229	0.000
trat. (T)	19.598	1	19.598	1115.190	0.000
C x T	8.570	2	4.285	243.825	0.000
Error	0.527	30	0.018		
Total	74.464	35			
d) Alantoinasa					
cepa (C)	5357.5	2	2678.7	9.837	0.001
trat. (T)	208760.7	1	208760.7	766.613	0.000
C x T	5476.2	2	2738.1	10.055	0.001
Error	8169.5	30	272.3		
Total	227763.8	35			

2. Influencia de la dosis de nitrato en la simbiosis *Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium tropici*.

Tabla A 2.1. Peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de raíz (PSR), peso seco de planta (PSP) en g planta⁻¹, relación raíz/parte aérea (RPA), superficie foliar (SF) en cm² planta⁻¹ en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899 tratadas con cinco dosis de nitrato potásico a largo de 4 recogidas.

Días	KNO ₃ (mM)	PSPA	PSR	PSP	RPA	SF
18	0	0.66	0.31	1.00	0.47	147
	1	1.19	0.36	1.62	0.30	208
	2	1.10	0.36	1.53	0.33	245
	5	1.07	0.45	1.54	0.42	266
	10	1.33	0.54	1.89	0.41	317
28	0	2.17	0.43	2.80	0.20	515
	1	2.26	0.49	2.93	0.22	440
	2	2.32	0.53	3.02	0.23	534
	5	3.30	0.79	4.19	0.24	804
	10	4.29	0.89	5.22	0.21	1038
34	0	2.70	0.51	3.43	0.19	835
	1	3.05	0.64	3.88	0.21	796
	2	3.27	0.62	4.07	0.19	742
	5	4.83	0.97	5.91	0.20	1351
	10	5.70	1.10	6.82	0.19	1857
40	0	3.43	0.57	4.31	0.17	961
	1	4.12	0.73	5.14	0.18	1076
	2	4.85	0.87	5.97	0.18	1317
	5	6.52	1.12	7.84	0.17	1483
	10	7.71	1.23	9.03	0.16	2420
MDS (0.05)		1.08	0.23	1.18	0.05	232

Tabla A 2.2. Análisis de la varianza correspondientes al peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de raíz (PSR), peso seco de planta (PSP) en g planta⁻¹, relación raíz/parte aérea (RPA), superficie foliar (SF) en cm² planta⁻¹ en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899 tratadas con cinco dosis de nitrato potásico a largo de 4 recogidas.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Peso seco parte aérea (PSPA)					
tiempo (t)	193.330	3	64.443	784537	0.000
trat. (T)	67.761	4	16.940	206232	0.000
t x T	23.024	12	1.919	23358	0.000
Error	0.005	60	8.21E-05		
Total	284.120	79			
b) Peso seco raíz (PSR)					
tiempo (t)	2.753	3	0.918	11088	0.000
trat. (T)	2.623	4	0.656	7924	0.000
t x T	0.363	12	0.030	366	0.000
Error	0.005	60	8.28E-05		
Total	5.744	79			
c) Peso seco parte aérea (PSP)					
tiempo (t)	259.552	3	86.517	1000000	0.000
trat. (T)	87.268	4	21.817	276939	0.000
t x T	26.557	12	2.213	28093	0.000
Error	0.005	60	7.88E-05		
Total	373.382	79			
d) Relación raíz/parte aérea (RPA)					
tiempo (t)	0.573	3	0.1911	4815	0.000
trat. (T)	0.014	4	0.0035	89	0.000
t x T	0.074	12	0.0062	156	0.000
Error	0.002	60	3.97E-05		
Total	0.664	79			
e) Superficie foliar (SF)					
tiempo (t)	16830570	3	5610190	1000000	0.000
trat. (T)	7183403	4	1795851	1000000	0.000
t x T	2930652	12	244221	1000000	0.000
Error	2.395	60	0.040		
Total	26944628	79			

Tabla A 2.3. Peso seco de nódulos (PSN) en g planta⁻¹, peso normalizado de nódulos (PNN) en mg PSN g⁻¹ PSPA, actividad reductora de acetileno (ARA) en μmol C₂H₄ g⁻¹ PSN h⁻¹ y ARA por planta (ARAP) en μmol C₂H₄ planta⁻¹ h⁻¹, en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899 tratadas con cinco dosis de nitrato potásico a largo de 4 recogidas.

Días	KNO ₃ (mM)	PSN	PNN	ARA	ARAP
18	0	0.030	45.4	17.5	0.53
	1	0.066	55.5	74.8	4.94
	2	0.070	63.6	53.6	3.75
	5	0.018	46.8	52.1	0.94
	10	0.014	10.5	45.5	0.64
28	0	0.200	92.2	103.1	20.62
	1	0.185	81.9	102.7	18.99
	2	0.170	73.3	69.2	11.77
	5	0.105	31.8	60.5	6.35
	10	0.033	7.7	38.8	1.28
34	0	0.209	77.3	68.0	14.22
	1	0.189	62.0	66.4	12.54
	2	0.177	54.1	56.1	9.93
	5	0.110	22.8	24.8	2.73
	10	0.009	1.6	18.0	0.16
40	0	0.312	91.0	30.7	9.59
	1	0.288	69.9	26.4	7.61
	2	0.254	52.4	21.3	5.41
	5	0.195	29.9	14.6	2.84
	10	0.089	11.5	2.1	0.19
MDS (0.05)		0.055	12.6	40.2	0.18

Tabla A 2.4. Análisis de la varianza correspondientes al peso seco de nódulos (PSN) en g planta⁻¹, peso normalizado de nódulos (PNN) en mg PSN g⁻¹ PSPA, actividad reductora de acetileno (ARA) en μmol C₂H₄ g⁻¹ PSN h⁻¹ y ARA por planta (ARAP) en μmol C₂H₄ planta⁻¹ h⁻¹, en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899 tratadas con cinco dosis de nitrato potásico a largo de 4 recogidas.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Peso seco de nódulos (PSN)					
tiempo (t)	0.354	3	0.1181	52995	0.000
trat. (T)	0.265	4	0.0662	29692	0.000
t x T	0.056	12	0.0046	2076	0.000
Error	0.000	60	2.23E-06		
Total	0.675	79			
b) Peso normalizado de nódulos (PNN)					
tiempo (t)	4187	3	1395.679	2161	0.000
trat. (T)	55549	4	13887.177	21501	0.000
t x T	4875	12	406.228	629	0.000
Error	39	60	0.646		
Total	64649	79			
c) Actividad reductora de acetileno específica (ARA)					
tiempo (t)	31243.71	3	10414.57	40170	0.000
trat. (T)	16398.40	4	4099.60	15812	0.000
t x T	13823.05	12	1151.92	4443	0.000
Error	15.56	60	0.26		
Total	61480.71	79			
d) ARA por planta (ARAP)					
tiempo (t)	1012.23	3	337.41	20560	0.000
trat. (T)	1442.85	4	360.71	21980	0.000
t x T	541.15	12	45.10	2748	0.000
Error	0.98	60	0.02		
Total	2997.22	79			

Tabla A 2.5. Actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT), xantina deshidrogenasa (XDH) y uricasa en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, contenido de proteína soluble en $\text{mg g}^{-1} \text{PF}$, en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899 tratadas con cinco dosis de nitrato potásico a largo de cuatro recogidas.

Días	KNO ₃ (mM)	GS	GOGAT	XDH	URICASA	Proteína
18	0	306	34.4	23.5	211	12.21
	1	313	40.9	21.0	190	8.89
	2	291	29.2	25.2	253	8.62
	5	276	28.3	24.7	239	10.50
	10	217	25.9	24.4	232	9.69
28	0	415	52.8	23.1	218	9.41
	1	412	53.8	23.4	227	8.62
	2	391	54.2	26.8	220	8.28
	5	373	44.8	20.3	217	8.51
	10	244	44.1	16.8	182	8.04
34	0	305	33.0	19.6	180	6.69
	1	274	38.5	20.5	172	7.42
	2	261	40.7	20.7	193	6.15
	5	201	34.4	19.2	208	5.93
	10	124	14.0	11.9	157	4.32
40	0	213	27.4	13.3	175	6.38
	1	193	26.9	13.0	165	6.31
	2	189	33.0	13.9	175	7.19
	5	182	27.1	12.9	236	6.72
	10	130	11.2	9.3	172	6.64
MDS (0.05)		5	0.6	2.2	2	0.63

Tabla A 2.6. Análisis de la varianza correspondientes a la actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT), xantina deshidrogenasa (XDH) y uricasa en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, contenido de proteína soluble en $\text{mg g}^{-1} \text{PF}$, en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899 tratadas con cinco dosis de nitrato potásico a largo de cuatro recogidas.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Glutamina sintetasa (GS)					
tiempo (t)	377061	3	125687	9717	0.000
trat. (T)	170625	4	42656	3298	0.000
t x T	25615	12	2135	165	0.000
Error	776	60	13		
Total	574078	79			
b) Glutamato sintasa (GOGAT)					
tiempo (t)	6692	3	2230.79	10916	0.000
trat. (T)	2719	4	679.70	3326	0.000
t x T	1058	12	88.19	432	0.000
Error	12	60	0.20		
Total	10482	79			
c) Xantina deshidrogenasa (XDH)					
tiempo (t)	1519	3	506.30	210.69	0.000
trat. (T)	285	4	71.32	29.68	0.000
t x T	196	12	16.33	6.79	0.000
Error	144	60	2.40		
Total	2144	79			
d) Uricasa					
tiempo (t)	27200	3	9066.56	3830	0.000
trat. (T)	16435	4	4108.75	1736	0.000
t x T	17525	12	1460.38	617	0.000
Error	142	60	2.37		
Total	61301	79			
e) Proteína soluble					
tiempo (t)	190.960	3	63.653	317.197	0.000
trat. (T)	19.593	4	4.898	24.409	0.000
t x T	41.442	12	3.454	17.210	0.000
Error	12.040	60	0.201		
Total	264.035	79			

Tabla A 2.7. Análisis de la varianza correspondientes a la actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT), xantina deshidrogenasa (XDH) y uricasa en nmol mg⁻¹ proteína min⁻¹ en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899 tratadas con cinco dosis de nitrato potásico a largo de cuatro recogidas.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Glutamina sintetasa (GS)					
tiempo (t)	897203	3	299068	4534	0.000
trat. (T)	482113	4	120528	1827	0.000
t x T	181693	12	15141	230	0.000
Error	3957	60	66		
Total	1564965	79			
b) Glutamato sintasa (GOGAT)					
tiempo (t)	23799	3	7933	8059	0.000
trat. (T)	10634	4	2658	2701	0.000
t x T	6402	12	533	542	0.000
Error	59	60	0.98		
Total	40893	79			
c) Xantina deshidrogenasa (XDH)					
tiempo (t)	3594	3	1198	106.7	0.000
trat. (T)	927	4	232	20.6	0.000
t x T	911	12	76	6.8	0.000
Error	673	60	11		
Total	6104	79			
d) Uricasa					
tiempo (t)	187048	3	62349	6427	0.000
trat. (T)	107600	4	26900	2773	0.000
t x T	208201	12	17350	1788	0.000
Error	582	60	10		
Total	503431	79			

Tabla A 2.8. Análisis de la varianza correspondientes al contenido de alantoína (ALN), ácido alantoico (ALC) en nódulos en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PFN, y en savia en $\mu\text{mol ml}^{-1}$ savia, así como el contenido de aminoácidos (AA) y nitratos en savia en $\mu\text{mol ml}^{-1}$, y abundancia relativa de ureidos (RU) en porcentaje, en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899 tratadas con cinco dosis de nitrato potásico a largo de cuatro recogidas.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Alantoína nódulos					
tiempo (t)	1.590	3	0.530	1546.9	0.000
trat. (T)	0.064	4	0.016	46.8	0.000
t x T	1.140	12	0.095	277.3	0.000
Error	0.021	60	3.43E-04		
Total	2.814	79			
b) Acido alantoico nódulos					
tiempo (t)	80.43	3	26.810	775	0.000
trat. (T)	30.67	4	7.668	222	0.000
t x T	16.87	12	1.406	41	0.000
Error	2.08	60	0.035		
Total	130.05	79			
c) Alantoína savia					
tiempo (t)	38.750	3	12.917	35161	0.000
trat. (T)	6.004	2	3.002	8171	0.000
t x T	8.377	6	1.396	3800	0.000
Error	0.013	36	0.00007		
Total	53.144	47			
d) Acido alantoico savia					
tiempo (t)	136.973	3	45.658	32661	0.000
trat. (T)	19.970	2	9.985	7143	0.000
t x T	44.687	6	7.448	5328	0.000
Error	0.050	36	0.001		
Total	201.681	47			
e) Aminoácidos savia					
tiempo (t)	26.957	3	8.986	23398	0.000
trat. (T)	3.273	2	1.637	4262	0.000
t x T	18.288	6	3.048	7937	0.000
Error	0.014	36	0.0001		
Total	48.532	47			
f) Nitrato savia					
tiempo (t)	5.883	3	1.961	5024	0.000
trat. (T)	26.965	2	13.482	34545	0.000
t x T	2.762	6	0.460	1179	0.000
Error	0.014	36	0.0001		
Total	35.624	47			
j) RU					
tiempo (t)	1256.654	3	418.885	18662	0.000
trat. (T)	240.788	2	120.394	5364	0.000
t x T	296.438	6	49.406	2201	0.000
Error	0.808	36	0.022		
Total	1794.687	47			

3. Estudio del crecimiento, fijación y asimilación de nitrógeno en *Phaseolus vulgaris* a lo largo de la ontogenia del cultivo.

Tabla A 3.1. Peso seco de parte aérea (PSPA), raíz (PSR) y planta completa (PSP) expresados en g planta⁻¹, relación raíz/parte aérea (RPA), superficie foliar en cm² planta⁻¹, en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium. tropici* CIAT899 a lo largo de la ontogenia.

Días	PSPA	PSR	PSP	RPA	SF
15	0.69	0.28	0.99	0.41	156
18	1.20	0.36	1.63	0.31	235
21	1.42	0.46	1.99	0.35	290
24	1.81	0.46	2.39	0.25	445
27	2.31	0.49	2.96	0.24	496
30	2.74	0.60	3.52	0.18	535
34	3.05	0.64	3.88	0.19	687
37	3.96	0.67	4.83	0.17	773
40	4.12	0.73	5.14	0.18	813
43	4.21	0.96	5.49	0.24	1087
46	4.66	1.08	5.96	0.23	1041
49	5.06	1.15	6.48	0.23	1059
MDS (0.05)	0.41	0.11	0.47	0.04	121

Tabla A 3.2. Análisis de la varianza correspondientes al peso seco de parte aérea (PSPA), raíz (PSR) y planta completa (PSP) expresados en g planta⁻¹, relación raíz/parte aérea (RPA), superficie foliar en cm² planta⁻¹, en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium. tropici* CIAT899 a lo largo de la ontogenia.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Peso seco parte aérea (PSPA)					
Cosecha (C)	141.3	11	12.85	104.1	0.000
Error	7.4	60	0.12		
Total	148.7	71			
b) Peso seco raíz (PSR)					
Cosecha (C)	5.15	11	0.47	48.2	0.000
Error	0.58	60	0.01		
Total	5.73	71			
c) Peso seco parte aérea (PSP)					
Cosecha (C)	217	11	19.74	120	0.000
Error	10	60	0.16		
Total	227	71			
d) Relación raíz/parte aérea (RPA)					
Cosecha (C)	0.35	11	0.032	21.2	0.000
Error	0.09	60	0.001		
Total	0.45	71			
e) Superficie foliar (SF)					
Cosecha (C)	6880917	11	625538	57.4	0.000
Error	653861	60	10898		
Total	7534778	71			

Tabla A 3.3. Peso seco de nódulos (PSN) en g planta⁻¹, peso normalizado de nódulos (PNN) en mg PSN g⁻¹ PSPA, actividad reductora de acetileno específica (ARA) en μmol C₂H₄ g⁻¹ PS h⁻¹, y ARA por planta (ARAP) en μmol C₂H₄ planta⁻¹ h⁻¹ en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium. tropici* CIAT899 a lo largo de la ontogenia.

Días	PSN	PNN	ARA	ARAP
15	0.018	26.4	15.6	0.29
18	0.067	58.6	74.8	5.01
21	0.106	74.6	89.8	9.52
24	0.116	63.9	96.5	11.20
27	0.186	80.5	102.7	19.10
30	0.188	68.5	71.9	13.52
34	0.189	61.9	66.4	12.54
37	0.195	48.3	60.7	11.83
40	0.288	70.4	26.4	7.60
43	0.316	75.4	22.9	7.23
46	0.317	68.1	12.5	3.96
49	0.315	63.3	13.7	4.30
MDS (0.05)	0.043	11.6	11.4	3.13

Tabla A 3.4. Análisis de la varianza correspondientes al peso seco de nódulos (PSN) en g planta⁻¹, peso normalizado de nódulos (PNN) en mg PSN g⁻¹ PSPA, actividad reductora de acetileno específica (ARA) en μmol C₂H₄ g⁻¹ PS h⁻¹, y ARA por planta (ARAP) en μmol C₂H₄ planta⁻¹ h⁻¹ en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium. tropici* CIAT899 a lo largo de la ontogenia.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Peso seco de nódulos (PSN)					
Cosecha (C)	0.588	11	0.053	37.9	0.000
Error	0.084	60	0.001		
Total	0.673	71			
b) Peso normalizado de nódulos (PNN)					
Cosecha (C)	14730	11	1339	13.4	0.000
Error	6007	60	100		
Total	20737	71			
c) Actividad reductora de acetileno (ARA)					
Cosecha (C)	58294	11	5299	54.2	0.000
Error	5869	60	97		
Total	64164	71			
d) ARA por planta (ARAP)					
Cosecha (C)	1600	11	145.4	19.8	0.000
Error	441	60	7.3		
Total	2041	71			

Tabla A 3.5. Actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT), glutamato deshidrogenasa (GDH), aspartato aminotransferasa (AAT), xantina deshidrogenasa (XDH), uricasa y alantoinasa (ALA) en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, contenido de proteína soluble (PRT) en $\text{mg g}^{-1} \text{PF}$, en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium.tropicum* CIAT899 a lo largo de la ontogenia.

Días	GS	GOGAT	GDH	AAT	XDH	Uricasa	ALA	PRT
15	208	29.5	31.1	566	11.1	91	129	7.82
18	313	40.9	38.0	641	21.0	191	221	8.89
21	369	55.4	38.9	710	22.0	201	194	8.42
24	448	53.2	30.0	671	23.3	209	140	8.96
27	412	53.1	23.3	670	23.4	227	168	8.62
30	370	46.8	26.5	647	21.8	201	150	5.45
34	274	38.5	27.8	609	20.5	172	209	7.42
37	315	36.1	27.9	561	18.6	180	76	6.39
40	193	27.0	25.1	433	13.0	165	84	6.31
43	186	24.9	24.0	464	12.3	143	67	5.65
46	144	25.0	21.9	402	12.8	133	55	6.21
49	117	17.2	20.7	360	10.0	99	48	5.14
MDS (0.05)	16	2.5	1.3	16	1.1	7.	22	0.86

Tabla A 3.6. Actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT), glutamato deshidrogenasa (GDH), aspartato aminotransferasa (AAT), xantina deshidrogenasa (XDH), uricasa y alantoinasa (ALA) en $\text{nmol mg}^{-1} \text{proteína min}^{-1}$ en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium.tropicum* CIAT899 a lo largo de la ontogenia.

Días	GS	GOGAT	GDH	AAT	XDH	Uricasa	ALA
15	443	62.9	66.1	1206	23.8	192	315
18	609	79.5	73.9	1246	40.8	369	428
21	526	81.2	55.2	1045	32.3	294	377
24	590	70.1	40.3	872	30.7	276	260
27	436	56.2	37.9	709	24.8	237	338
30	448	56.6	42.6	782	24.5	203	484
34	615	86.5	62.4	1367	46.1	393	494
37	820	94.5	72.7	1462	48.5	470	203
40	509	71.1	66.2	1144	38.1	430	215
43	548	73.3	70.7	1368	36.6	412	196
46	385	67.1	58.2	1078	29.4	269	148
49	379	55.8	67.1	1164	40.5	425	155
MDS (0.05)	40	6	3	39	7	18	49

Tabla A 3.7. Análisis de la varianza correspondientes a la actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT), glutamato deshidrogenasa (GDH), aspartato aminotransferasa (AAT), xantina deshidrogenasa (XDH), uricasa y alantoinasa (ALA) en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, contenido de proteína soluble en $\text{mg g}^{-1} \text{PF}$, en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899 a lo largo de la ontogenia.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Actividad glutamina sintetasa (GS)					
Cosecha (C)	518524	11	47138	371	0.000
Error	4585	36	127		
Total	523109	47			
b) glutamato sintasa (GOGAT)					
Cosecha (C)	5266	11	479	152	0.000
Error	113	36	3		
Total	5380	47			
c) Glutamato deshidrogenasa (GDH)					
Cosecha (C)	1502	11	137	163	0.000
Error	30	36	1		
Total	1532	47			
d) Aspartato aminotransferasa (AAT)					
Cosecha (C)	614712	11	55883	436	0.000
Error	4613	36	128		
Total	619325	47			
e) Xantina deshidrogenasa (XDH)					
Cosecha (C)	1213	11	110	130	0.000
Error	51	36	1		
Total	1264	47			
f) Uricasa (UR)					
Cosecha (C)	91542	11	8322	211	0.000
Error	2361	36	39		
Total	93904	47			
g) Alantoinasa (ALA)					
Cosecha (C)	166911	11	18546	51	0.000
Error	18232	36	365		
Total	185143	47			
k) Proteínas (PRT)					
Cosecha (C)	66.94	11	6.69	18.8	0.000
Error	11.72	36	0.35		
Total	78.66	47			

Tabla A 3.8. Análisis de la varianza correspondientes a la actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT), glutamato deshidrogenasa (GDH), aspartato aminotransferasa (AAT), xantina deshidrogenasa (XDH), uricasa y alantoinasa (ALA) en nmol mg⁻¹ proteína min⁻¹, en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium.tropici* CIAT899 a lo largo de la ontogenia.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Actividad glutamina sintetasa (GS)					
Cosecha (C)	2215614	11	201419	254	0.000
Error	28558	36	793		
Total	2244171	47			
b) glutamato sintasa (GOGAT)					
Cosecha (C)	15816	11	1438	92	0.000
Error	563	36	16		
Total	16379	47			
c) Glutamato deshidrogenasa (GDH)					
Cosecha (C)	4250	11	386	89	0.000
Error	156	36	4		
Total	4406	47			
d) Aspartato aminotransferasa (AAT)					
Cosecha (C)	2432305	11	221119	286	0.000
Error	27806	36	772		
Total	2460111	47			
e) Xantina deshidrogenasa (XDH)					
Cosecha (C)	5577	11	507	20	0.000
Error	911	36	25		
Total	6488	47			
f) Uricasa (UR)					
Cosecha (C)	577166	11	52470	323	0.000
Error	5843	36	162		
Total	583009	47			
g) Alantoinasa (ALA)					
Cosecha (C)	675667	11	61424	53	0.000
Error	42088	36	1169		
Total	717755	47			

Tabla A 3.9. Contenido de alantoina (ALN), ácido alantoico (ALC) en nódulos y raíces expresado en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF, y en savia expresado en $\mu\text{mol ml}^{-1}$ savia en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899 a lo largo de la ontogenia.

Días	Nódulos		Raíces		Savia	
	ALN	ALC	ALN	ALC	ALN	ALC
15	0.09	0.93	0.068	0.073	0.52	1.68
18	0.43	2.78	0.095	0.084	1.00	3.41
21	0.47	3.24	0.080	0.110	1.83	6.09
24	0.42	3.96	0.077	0.076	1.99	5.80
27	0.42	3.75	0.077	0.111	2.39	6.53
30	0.56	3.05	0.069	0.115	1.38	8.84
34	0.21	2.17	0.080	0.228	3.48	8.47
37	0.26	1.32	0.076	0.179	3.48	6.29
40	0.28	1.11	0.078	0.210	1.73	5.49
43	0.25	0.97	0.060	0.151	0.67	5.40
46	0.19	1.09	0.070	0.256	0.09	4.67
49	0.19	0.97	0.065	0.279	0.26	5.08
MDS (0.05)	0.06	0.13	0.014	0.013	0.29	0.51

Tabla A 3.10. Análisis de la varianza correspondientes al contenido de alantoina (ALN), ácido alantoico (ALC) en nódulos y raíces expresado en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF, y en savia expresado en $\mu\text{mol ml}^{-1}$ savia en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899 a lo largo de la ontogenia.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Alantoina en nódulos					
Cosecha (C)	0.616	11	0.056	23.4	0.000
Error	0.143	60	0.002		
Total	0.759	71			
b) Acido alantoico en nódulos					
Cosecha (C)	28.9	11	2.627	221	0.000
Error	0.7	60	0.011		
Total	29.6	71			
c) Alantoina en raíces					
Cosecha (C)	0.013	11	0.0011	7.97	0.000
Error	0.009	60	0.0001		
Total	0.021	71			
d) Acido alantoico en raíces					
Cosecha (C)	0.288	11	0.0262	203	0.000
Error	0.008	60	0.0001		
Total	0.296	71			
e) Alantoina en savia					
Cosecha (C)	86.6	11	7.87	124	0.000
Error	3.8	60	0.06		
Total	90.4	71			
f) Acido alantoico en savia					
Cosecha (C)	257	11	23.4	121	0.000
Error	12	60	0.2		
Total	269	71			

Tabla A 3.11. Contenido de aminoácidos en nódulos y savia expresado en $\mu\text{g g}^{-1}$ PF y $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899 a lo largo de la ontogenia.

Días	Nódulos		Savia	
	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{mol/g}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{mol/ml}$
15	5742	43.47	504	3.92
18	6142	46.50	590	4.46
21	6181	46.79	625	4.73
24	5434	41.14	487	3.68
27	3569	27.02	583	4.41
30	3761	28.47	741	5.61
34	3923	29.70	835	6.32
37	3211	24.31	509	3.85
40	3519	26.64	673	5.10
43	2369	17.93	636	4.81
46	2492	18.87	548	4.15
49	2681	20.29	693	5.24
MDS (0.05)	335	2.53	153	1.16

Tabla A 3.12. Análisis de la varianza correspondientes al contenido de aminoácidos en nódulos y savia expresado en $\mu\text{g g}^{-1}$ PF en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899 a lo largo de la ontogenia.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Aminoácidos en nódulos					
Cosecha (C)	88500725	11	8045520	147	0.000
Error	1962663	60	54518		
Total	90463388	71			
b) Aminoácidos en raíces					
Cosecha (C)	481757	11	43796	3.83	0.001
Error	411742	60	11437		
Total	893499	71			

4. Efecto del estrés salino en la simbiosis: aplicación en el momento de la siembra.

4.1. Estudio de la simbiosis *Phaseolus vulgaris* var. Africa-*Rhizobium tropici* CIAT899.

Tabla A 4.1. Peso seco parte aérea (PSPA), raíz (PSR) y planta completa (PSP) en g planta⁻¹, relación raíz/parte aérea (RPA), en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

Días	NaCl (mM)	PSPA	PSR	PSP	RPA
18	0	1.19	0.36	1.62	0.30
	25	0.79	0.30	1.12	0.39
	50	0.69	0.31	1.01	0.45
	100	0.56	0.23	0.80	0.40
21	0	1.42	0.46	1.98	0.32
	25	1.05	0.36	1.48	0.34
	50	0.72	0.32	1.06	0.45
	100	0.61	0.26	0.88	0.42
24	0	1.80	0.46	2.37	0.26
	25	1.27	0.40	1.74	0.31
	50	0.88	0.37	1.28	0.41
	100	0.69	0.28	0.99	0.40
27	0	2.26	0.49	2.93	0.22
	25	1.44	0.42	1.95	0.29
	50	1.08	0.38	1.50	0.35
	100	0.71	0.29	1.02	0.41
30	0	2.77	0.60	3.56	0.22
	25	1.45	0.58	2.11	0.40
	50	1.07	0.38	1.50	0.36
	100	0.69	0.27	0.98	0.39
MDS (0.05)		0.12	0.09	0.17	0.10

Tabla A 4.2. Análisis de la varianza correspondientes al peso seco parte aérea (PSPA), raíz (PSR) y planta completa (PSP) en g planta⁻¹, relación raíz/parte aérea (RPA), en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Peso seco parte aérea (PSPA)					
tiempo (t)	5.315	4	1.3286	115.596	0.000
trat. (T)	28.001	3	9.3336	812.052	0.000
t x T	6.654	12	0.5545	48.242	0.000
Error	1.149	100	0.0115		
Total	41.119	119			
b) Peso seco raíz (PSR)					
tiempo (t)	0.208	4	0.0521	7.921	0.000
trat. (T)	0.892	3	0.2973	45.187	0.000
t x T	0.479	12	0.0399	6.065	0.000
Error	0.658	100	0.0066		
Total	2.237	119			
c) Peso seco planta (PSP)					
tiempo (t)	8.424	4	2.1060	97.943	0.000
trat. (T)	44.328	3	14.7760	687.199	0.000
t x T	10.735	12	0.8946	41.606	0.000
Error	2.150	100	0.0215		
Total	65.637	119			
d) Relación raíz/parte aérea (RPA)					
tiempo (t)	0.095	4	0.0237	2.943	0.024
trat. (T)	0.425	3	0.1417	17.573	0.000
t x T	0.219	12	0.0183	2.267	0.014
Error	0.806	100	0.0081		
Total	1.545	119			

Tabla A 4.3. Peso seco de nódulos (PSN) en g planta⁻¹, peso normalizado de nódulos (PNN) mg PSN g⁻¹ PSPA, actividad reductora de acetileno (ARA) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ PSN h}^{-1}$, ARA por planta (ARAP) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ planta}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

Días	NaCl (mM)	PSN	PNN	ARA	ARAP
18	0	0.067	56.2	74.8	5.03
	25	0.033	41.7	83.4	2.74
	50	0.016	24.0	35.9	0.59
	100	0.009	16.3	22.6	0.21
21	0	0.105	74.3	89.8	9.48
	25	0.069	66.1	81.5	5.66
	50	0.023	32.0	52.2	1.20
	100	0.012	19.7	18.2	0.22
24	0	0.116	64.4	96.5	11.17
	25	0.074	58.4	92.6	6.85
	50	0.035	40.2	28.2	1.00
	100	0.021	30.3	19.3	0.41
27	0	0.186	82.4	103.2	19.19
	25	0.089	62.3	89.6	8.02
	50	0.038	35.2	23.3	0.89
	100	0.020	28.4	10.6	0.21
30	0	0.188	67.9	72.6	13.66
	25	0.081	55.9	21.0	1.71
	50	0.048	44.6	18.3	0.87
	100	0.018	26.3	9.7	0.18
MDS (0.05)		0.019	16.1	19.0	2.5



Tabla A 4.4. Análisis de la varianza correspondientes al peso seco de nódulos (PSN) en g planta⁻¹, peso normalizado de nódulos (PNN) mg PSN g⁻¹ PSPA, actividad reductora de acetileno (ARA) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ PSN h}^{-1}$, ARA por planta (ARAP) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ planta}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Peso seco de nódulos (PSN)					
tiempo (t)	0.032	4	0.0079	27.492	0.000
trat. (T)	0.250	3	0.0833	290.66	0.000
t x T	0.042	12	0.0035	12.191	0.000
Error	0.029	100	0.0003		
Total	0.352	119			
b) Peso normalizado de nódulos (PNN)					
tiempo (t)	4005	4	1001	5.060	0.001
trat. (T)	50267	3	16756	84.684	0.000
t x T	11260	12	938	4.743	0.000
Error	19786	100	198		
Total	85317	119			
c) Actividad reductora de acetileno (ARA)					
tiempo (t)	15792	4	3948	14.340	0.000
trat. (T)	117501	3	39167	142.261	0.000
t x T	18144	12	1512	5.492	0.000
Error	27532	100	275		
Total	178969	119			
d) ARA por planta (ARAP)					
tiempo (t)	203	4	50.85	10.86	0.000
trat. (T)	2624	3	874.61	186.82	0.000
t x T	431	12	35.91	7.67	0.000
Error	468	100	4.68		
Total	3726	119			

Tabla A 4.5. Actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT), glutamato deshidrogenasa (GDH), aspartato aminotransferasa (AAT), xantina deshidrogenasa (XDH) y uricasa (UR) en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

Días	NaCl (mM)	GS	GOGAT	GDH	AAT	XDH	UR
18	0	313	40.9	38.0	641	21.0	190.6
	25	313	26.4	23.8	589	15.8	135.2
	50	213	20.8	18.3	538	14.1	133.3
	100	170	16.4	32.8	334	6.7	61.7
21	0	359	55.4	37.7	714	22.0	200.6
	25	271	21.3	18.5	469	13.2	138.4
	50	208	16.1	25.3	335	7.3	67.1
	100	179	13.1	34.7	286	7.0	58.8
24	0	448	53.2	30.6	662	23.3	209.5
	25	263	20.7	17.0	446	12.8	120.2
	50	182	12.1	18.5	262	7.9	78.7
	100	173	11.5	21.6	201	8.1	77.2
27	0	412	53.1	35.8	669	23.4	227.0
	25	172	10.9	17.5	238	6.6	76.7
	50	132	9.9	24.6	161	6.0	71.4
	100	127	9.7	24.9	140	5.7	52.3
30	0	370	46.8	35.2	647	21.8	201.3
	25	206	10.1	17.5	232	5.5	66.4
	50	127	5.0	21.4	150	1.2	32.5
	100	115	4.5	24.1	130	1.1	28.4
MDS (0.05)		15	2.3	0.77	14	0.66	8.6

Tabla A 4.6. Análisis de la varianza correspondientes a la actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT), glutamato deshidrogenasa (GDH), aspartato aminotransferasa (AAT), xantina deshidrogenasa (XDH) y uricasa (UR) en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Glutamina sintetasa					
tiempo (t)	50054	4	12514	104	0.000
trat. (T)	638468	3	212823	1767	0.000
t x T	82750	12	6896	57	0.000
Error	7228	60	120		
Total	778501	79			
b) Glutamato sintasa					
tiempo (t)	1108	4	277	108	0.000
trat. (T)	19922	3	6641	2591	0.000
t x T	1167	12	97	38	0.000
Error	154	60	3		
Total	22351	79			
c) Glutamato deshidrogenasa					
tiempo (t)	597	4	149.20	504	0.000
trat. (T)	1757	3	585.64	1979	0.000
t x T	996	12	83.03	281	0.000
Error	18	60	0.30		
Total	3368	79			
d) Aspartato aminotransferasa					
tiempo (t)	638473	4	159618	1552	0.000
trat. (T)	2324243	3	774748	7532	0.000
t x T	294866	12	24572	239	0.000
Error	6172	60	103		
Total	3263753	79			
e) Xantina deshidrogenasa					
tiempo (t)	525	4	131.31	603	0.000
trat. (T)	3227	3	1075.70	4940	0.000
t x T	291	12	24.27	111	0.000
Error	13	60	0.22		
Total	4057	79			
f) Uricasa					
tiempo (t)	30359	4	7590	203	0.000
trat. (T)	238378	3	79459	2123	0.000
t x T	20965	12	1747	47	0.000
Error	2246	60	37		
Total	291948	79			

Tabla A 4.7. Contenido de alantoína (ALN), ácido alantoico (ALC) y ureidos (ALN+ALC) en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

Parámetro	NaCl (mM)	Días de cultivo				
		18	21	24	27	30
ALN	0	0.43	0.47	0.42	0.42	0.56
	10	0.14	0.13	0.31	0.54	0.35
	25	0.31	0.20	0.54	0.50	0.35
	50	0.27	0.19	0.53	0.47	0.29
MDS (0.05) 0.08						
ALC	0	2.78	3.24	3.96	3.75	3.05
	10	1.44	0.91	2.25	0.88	0.51
	25	0.32	0.36	0.48	0.74	0.48
	50	0.30	0.28	0.42	0.53	0.40
MDS (0.05) 0.11						
Ureidos	0	3.21	3.71	4.38	4.17	3.61
	10	1.58	1.04	2.56	1.42	0.86
	25	0.63	0.56	1.02	1.24	0.83
	50	0.57	0.47	0.95	1.00	0.69
MDS (0.05) 0.13						

Tabla A 4.8. Análisis de la varianza correspondientes al contenido de alantoína (ALN), ácido alantoico (ALC) y ureidos (ALN+ALC) en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculada con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Alantoína					
tiempo (t)	0.607	4	0.152	48.591	0.000
trat. (T)	0.191	3	0.063	20.336	0.000
t x T	0.492	12	0.041	13.127	0.000
Error	0.187	60	0.003		
Total	1.477	79			
b) Acido alantoico					
tiempo (t)	4.77	4	1.191	181.79	0.000
trat. (T)	114.97	3	38.324	5848.17	0.000
t x T	6.91	12	0.576	87.90	0.000
Error	0.39	60	0.007		
Total	127.04	79			
c) Ureidos					
tiempo (t)	7.75	4	1.938	236.70	0.000
trat. (T)	120.78	3	40.260	4917.67	0.000
t x T	4.73	12	0.394	48.11	0.000
Error	0.49	60	0.008		
Total	133.75	79			

Tabla A 4.9. Contenido de aminoácidos (AA) en nódulos (N), raíces (R) y hojas (H) expresado en $\mu\text{g g}^{-1}$ PF y en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

Días	NaCl (mM)	AA ($\mu\text{g/g}$)			AA ($\mu\text{mol/g}$)		
		N	R	H	N	R	H
18	0	4600	538	838	34.8	4.1	6.3
	25	4230	1195	896	32.0	9.0	6.8
	50	3378	1136	866	25.6	8.8	6.5
	100	3106	912	952	23.5	6.9	7.2
21	0	3223	824	686	24.4	6.2	5.2
	25	3507	864	657	26.5	6.5	5.0
	50	2745	953	673	20.8	7.2	5.1
	100	2507	831	947	19.0	6.3	7.2
24	0	4215	315	508	31.9	2.4	3.8
	25	2896	941	940	21.9	7.1	7.1
	50	2367	891	899	17.9	6.7	6.8
	100	1694	874	1610	12.8	6.6	12.2
27	0	4654	557	679	35.2	4.2	5.1
	25	2363	774	906	17.9	5.9	6.9
	50	1849	755	1369	14.0	5.7	10.4
	100	1696	615	1525	12.8	4.6	11.5
30	0	3331	1335	918	25.2	10.1	6.9
	25	1673	683	1196	12.7	5.2	9.0
	50	1665	586	845	12.6	4.4	6.4
	100	1439	558	700	10.9	4.2	5.3
MDS (0.05)		268	107	85	2.0	0.8	0.6

Tabla A 4.10. Análisis de la varianza correspondientes al contenido de aminoácidos (AA) en nódulos (N), raíces (R) y hojas (H) expresado en $\mu\text{g g}^{-1}$ PF y en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Aminoácidos en nódulos					
tiempo (t)	27239789	4	6809947	190.08	0.000
trat. (T)	42430951	3	14143650	394.78	0.000
t x T	11447005	12	953917	26.63	0.000
Error	2149607	60	35827		
Total	83267353	79			
b) Aminoácidos en raíces					
tiempo (t)	720749	4	180187	31.33	0.000
trat. (T)	442638	3	147546	25.66	0.000
t x T	3500438	12	291703	50.72	0.000
Error	345068	60	5751		
Total	5008892	79			
c) Aminoácidos en hojas					
tiempo (t)	1235069	4	308767	84.87	0.000
trat. (T)	1780577	3	593526	163.14	0.000
t x T	3378023	12	281502	77.38	0.000
Error	218288	60	3638		
Total	6611956	79			

4.2. Estudio de la simbiosis *Phaseolus vulgaris* var. Coco-*Rhizobium tropici* CIAT899.

Tabla A 4.11. Peso seco parte aérea (PSPA), raíz (PSR), planta completa (PSP) en g⁻¹ planta, relación raíz/parte aérea (RPA), en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

Días	NaCl (mM)	PSPA	PSR	PSP	RPA
18	0	0.73	0.32	1.12	0.44
	10	0.83	0.27	1.16	0.32
	25	0.70	0.27	1.04	0.40
	50	0.56	0.25	0.85	0.44
21	0	0.82	0.33	1.23	0.41
	10	0.92	0.32	1.33	0.35
	25	0.85	0.27	1.21	0.32
	50	0.55	0.27	0.87	0.50
24	0	1.32	0.34	1.76	0.27
	10	1.23	0.34	1.67	0.28
	25	1.07	0.35	1.50	0.34
	50	0.60	0.35	1.00	0.58
27	0	1.44	0.39	1.94	0.27
	10	1.28	0.36	1.76	0.28
	25	1.10	0.36	1.54	0.33
	50	0.62	0.35	1.02	0.57
30	0	1.75	0.52	2.42	0.31
	10	1.82	0.66	2.64	0.36
	25	1.41	0.50	2.36	0.36
	50	0.66	0.38	1.11	0.58
MDS (0.05)		0.22	0.10	0.28	0.11

Tabla A 4.12. Análisis de la varianza correspondientes al peso seco parte aérea (PSPA), raíz (PSR), planta completa (PSP) en g^{-1} planta, relación raíz/parte aérea (RPA), en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Peso seco parte aérea (PSPA)					
tiempo (t)	7.550	4	1.887	50.104	0.000
trat. (T)	7.665	3	2.555	67.818	0.000
t x T	2.305	12	0.192	5.098	0.000
Error	3.767	100	0.038		
Total	21.287	119			
b) Peso seco raíz (PSR)					
tiempo (t)	0.720	4	0.180	21.855	0.000
trat. (T)	0.109	3	0.036	4.431	0.006
t x T	0.331	12	0.028	3.351	0.000
Error	0.824	100	0.008		
Total	1.985	119			
c) Peso seco parte aérea (PSP)					
tiempo (t)	14.577	4	3.644	62.173	0.000
trat. (T)	10.823	3	3.608	61.548	0.000
t x T	4.145	12	0.345	5.893	0.000
Error	5.861	100	0.059		
Total	35.406	119			
d) Relación raíz/parte aérea (RPA)					
tiempo (t)	0.031	4	0.008	0.788	0.535
trat. (T)	0.787	3	0.262	27.012	0.000
t x T	0.272	12	0.023	2.335	0.011
Error	0.971	100	0.010		
Total	2.060	119			

Tabla A 4.13. Peso seco de nódulos (PSN) en g planta⁻¹, peso normalizado de nódulos (PNN) mg PSN g⁻¹ PSPA, actividad reductora de acetileno (ARA) en μmol C₂H₄ g⁻¹ PS h⁻¹, ARA por planta (ARAP) en μmol C₂H₄ planta⁻¹ h⁻¹ en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

Días	NaCl (mM)	PSN	PNN	ARA	ARAP
18	0	0.064	86.1	75.6	4.55
	10	0.052	64.5	113.6	5.82
	25	0.064	92.7	96.1	6.32
	50	0.044	78.4	34.2	1.50
21	0	0.075	91.7	121.0	9.08
	10	0.091	99.2	115.8	10.53
	25	0.076	89.3	93.9	7.13
	50	0.050	91.4	34.6	1.73
24	0	0.095	73.5	146.7	14.23
	10	0.096	77.8	115.5	11.08
	25	0.082	76.4	67.9	5.57
	50	0.051	84.9	45.9	2.34
27	0	0.108	74.9	177.5	18.46
	10	0.111	86.5	113.0	12.54
	25	0.083	75.4	130.4	10.82
	50	0.054	94.8	16.5	0.89
30	0	0.151	84.6	109.7	16.94
	10	0.162	89.8	66.9	10.90
	25	0.127	92.5	44.4	5.80
	50	0.074	110.4	3.1	0.27
MDS (0.05)		0.033	36.3	37.8	4.87

Tabla A 4.14. Análisis de la varianza correspondientes al peso seco de nódulos (PSN) en g planta⁻¹, peso normalizado de nódulos (PNN) mg PSN g⁻¹ PSPA, actividad reductora de acetileno (ARA) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ PS h}^{-1}$, ARA por planta (ARAP) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ planta}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Peso seco de nódulos (PSN)					
tiempo (t)	0.068	4	0.017	20.572	0.000
trat. (T)	0.040	3	0.013	16.165	0.000
t x T	0.021	12	0.002	2.139	0.021
Error	0.083	100	0.001		
Total	0.212	119			
b) Peso normalizado de nódulos (PNN)					
tiempo (t)	6598	4	1650	1.639	0.170
trat. (T)	3268	3	1089	1.082	0.360
t x T	15579	12	1298	1.290	0.236
Error	100644	100	1006		
Total	126089	119			
c) Actividad reductora de acetileno (ARA)					
tiempo (t)	37779	4	9445	8.675	0.000
trat. (T)	164069	3	54690	50.232	0.000
t x T	40654	12	3388	3.112	0.001
Error	108875	100	1089		
Total	351377	119			
d) ARA por planta (ARAP)					
tiempo (t)	401	4	100	5.546	0.000
trat. (T)	2050	3	683	37.814	0.000
t x T	772	12	64	3.561	0.000
Error	1807	100	18		
Total	5030	119			

Tabla A 4.15. Actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT), glutamato deshidrogenasa (GDH), aspartato aminotransferasa (AAT), xantina deshidrogenasa (XDH) y uricasa (UR) en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

Días	NaCl (mM)	GS	GOGAT	GDH	AAT	XDH	UR
18	0	407	35.9	34.8	548	20.9	111.6
	10	388	37.5	27.4	539	20.2	128.4
	25	318	33.9	21.1	409	18.2	99.1
	50	236	26.8	19.6	325	13.0	80.2
21	0	371	41.6	34.4	557	24.4	125.6
	10	313	33.3	22.7	493	19.9	99.1
	25	247	31.4	21.9	420	15.8	88.8
	50	152	22.9	27.1	394	12.9	83.6
24	0	302	29.5	29.5	501	22.5	126.4
	10	283	33.2	24.3	478	18.2	104.3
	25	196	26.7	20.5	371	14.9	60.9
	50	148	19.9	16.0	277	8.5	52.6
27	0	226	39.8	24.3	426	21.6	118.8
	10	212	34.1	20.0	466	15.5	81.9
	25	139	18.2	20.1	374	9.2	53.6
	50	87	10.8	16.1	259	5.6	43.0
30	0	291	28.7	21.0	478	19.1	81.4
	10	152	17.4	16.1	328	12.0	49.7
	25	98	11.1	11.8	164	6.6	35.2
	50	23	3.0	8.6	99	0.6	26.1
MDS (0.05)		16	2.1	1.5	12	0.9	3.9

Tabla A 4.16. Análisis de la varianza correspondientes a la actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT), glutamato deshidrogenasa (GDH), aspartato aminotransferasa (AAT), xantina deshidrogenasa (XDH) y uricasa (UR) en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Glutamina sintetasa					
tiempo (t)	404255	4	101064	772	0.000
trat. (T)	413375	3	137792	1052	0.000
t x T	33174	12	2765	21	0.000
Error	7857	60	131		
Total	858660	79			
b) Glutamato sintasa					
tiempo (t)	3443	4	861	394	0.000
trat. (T)	3921	3	1307	599	0.000
t x T	1036	12	86	40	0.000
Error	131	60	2		
Total	8531	79			
c) Glutamato deshidrogenasa					
tiempo (t)	1534	4	383	348	0.000
trat. (T)	1502	3	501	454	0.000
t x T	339	12	28	26	0.000
Error	66	60	1		
Total	3441	79			
d) Aspartato aminotransferasa					
tiempo (t)	405636	4	101409	1350	0.000
trat. (T)	670314	3	223438	2974	0.000
t x T	107613	12	8968	119	0.000
Error	4507	60	75		
Total	1188070	79			
e) Xantina deshidrogenasa					
tiempo (t)	869	4	217.4	478	0.000
trat. (T)	2019	3	673.1	1480	0.000
t x T	193	12	16.1	35	0.000
Error	27	60	0.5		
Total	3109	79			
e) Uricasa					
tiempo (t)	32710	4	8178	1051	0.000
trat. (T)	37779	3	12593	1618	0.000
t x T	7033	12	586	75	0.000
Error	467	60	8		
Total	77989	79			

Tabla A 4.17. Contenido de alantoína (ALN), ácido alantoico (ALC) y ureidos (ALN+ALC) expresado en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF h^{-1} en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

Parámetro	NaCl (mM)	Días de cultivo				
		18	21	24	27	30
ALN	0	0.16	0.41	0.15	0.12	0.18
	10	0.16	0.18	0.11	0.14	0.16
	25	0.15	0.14	0.34	0.20	0.21
	50	0.24	0.10	0.34	0.17	0.16
MDS (0.05) 0.067						
ALC	0	2.07	1.74	2.15	1.92	1.56
	10	1.55	1.63	1.65	1.34	1.10
	25	1.44	1.09	0.86	0.75	0.45
	50	0.69	0.75	0.51	0.44	0.28
MDS (0.05) 0.063						
Ureidos	0	2.17	2.16	2.30	2.05	1.74
	10	1.71	1.81	1.76	1.48	1.26
	25	1.59	1.23	1.20	0.95	0.66
	50	0.93	0.86	0.86	0.61	0.44
MDS (0.05) 0.075						

Tabla A 4.18. Análisis de la varianza correspondientes al contenido de alantoína (ALN), ácido alantoico (ALC) y ureidos (ALN+ALC) expresado en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF h^{-1} en nódulos de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Alantoína					
tiempo (t)	0.060	4	0.015	6.655	0.000
trat. (T)	0.045	3	0.015	6.735	0.001
t x T	0.403	12	0.034	15.022	0.000
Error	0.134	60	0.002		
Total	0.642	79			
b) Acido alantoico					
tiempo (t)	3.202	4	0.800	403	0.000
trat. (T)	20.825	3	6.942	3497	0.000
t x T	1.307	12	0.109	55	0.000
Error	0.119	60	0.002		
Total	25.453	79			
c) Ureidos					
tiempo (t)	3.614	4	0.904	324	0.000
trat. (T)	20.347	3	6.782	2430	0.000
t x T	0.560	12	0.047	17	0.000
Error	0.167	60	0.003		
Total	24.689	79			

Tabla A 4.19. Contenido de aminoácidos (AA) en nódulos (N), raíces (R) y hojas (H) expresado en $\mu\text{g g}^{-1}$ PF y en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

Días	NaCl (mM)	AA ($\mu\text{g/g}$)			AA ($\mu\text{mol/g}$)		
		N	R	H	N	R	H
18	0	5484	750	683	41.5	5.68	5.17
	10	5081	844	983	38.5	6.39	7.38
	25	4443	862	777	33.6	6.52	5.91
	50	2970	820	712	22.4	6.21	5.42
21	0	5992	664	685	45.4	5.03	5.34
	10	5798	786	897	43.9	5.87	6.73
	25	4540	1119	810	34.4	8.48	6.41
	50	4089	700	651	30.9	5.30	5.12
24	0	4871	1018	697	36.9	7.71	5.47
	10	5081	992	649	38.5	7.51	5.10
	25	3768	1208	738	28.4	9.15	5.80
	50	2274	815	1086	17.2	6.17	8.53
27	0	4895	1060	734	37.1	8.02	5.76
	10	3442	471	733	26.0	6.68	5.75
	25	2025	467	701	15.3	6.62	5.51
	50	2000	471	892	15.1	5.35	7.00
30	0	4717	903	725	35.7	6.84	5.71
	10	3879	880	776	29.4	6.66	6.11
	25	2258	1153	913	17.1	8.73	7.31
	50	1726	685	1062	13.1	5.18	8.57
MDS (0.05)		292	130	804	2.2	1.10	0.63

Tabla A 4.20. Análisis de la varianza correspondientes al contenido de aminoácidos (AA) en nódulos (N), raíces (R) y hojas (H) expresado en $\mu\text{g g}^{-1}$ PF en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Aminoácidos en nódulos					
tiempo (t)	48236976	4	12059244	283	0.000
trat. (T)	82669064	3	27556355	646	0.000
t x T	8453970	12	704498	17	0.000
Error	2561090	60	42685		
Total	141920000	79			
b) Aminoácidos en raíces					
tiempo (t)	1330385	4	332596	39.4	0.000
trat. (T)	770655	3	256885	30.4	0.000
t x T	1579111	12	131593	15.6	0.000
Error	506667	60	8444		
Total	4186818	79			
c) Aminoácidos en hojas					
tiempo (t)	121056	4	30264	9.38	0.000
trat. (T)	314669	3	104890	32.50	0.000
t x T	899696	12	74975	23.23	0.000
Error	193645	60	3227		
Total	1529068	79			

4.3. Comparación de las dos simbiosis.

Tabla A 4.21. Análisis de la varianza correspondientes al peso seco de planta completa (PSP) en g planta⁻¹, relación raíz/parte aérea (RPA), peso seco de nódulos (PSN) en g planta⁻¹, actividad reductora de acetileno (ARA) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ PSN h}^{-1}$ y ARA por planta (ARAP) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ planta}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Peso seco de planta (PSP)					
variedad (v)	6.90	1	6.90	155.40	0.000
tiempo (t)	18.32	4	4.58	103.14	0.000
trat. (T)	30.34	2	15.17	341.72	0.000
v x t	1.13	4	0.28	6.36	0.000
v x T	3.68	2	1.84	41.42	0.000
t x T	8.90	8	1.11	25.07	0.000
v x t x T	1.56	8	0.20	4.40	0.000
Error	6.66	150	0.04		
Total	77.49	179			
b) Relación raíz/parte aérea (RPA)					
variedad (v)	0.16	1	0.162	20.13	0.000
tiempo (t)	0.06	4	0.014	1.73	0.147
trat. (T)	0.90	2	0.450	55.84	0.000
v x t	0.02	4	0.006	0.70	0.591
v x T	0.14	2	0.068	8.43	0.000
t x T	0.13	8	0.016	2.02	0.048
v x t x T	0.19	8	0.023	2.88	0.005
Error	1.21	150	0.008		
Total	2.80	179			
c) Peso seco de nódulos (PSN)					
variedad (v)	0.0005	1	0.0005	0.95	0.342
tiempo (t)	0.0763	4	0.0191	36.46	0.000
trat. (T)	0.1492	2	0.0746	142.70	0.000
v x t	0.0089	4	0.0022	4.24	0.003
v x T	0.0315	2	0.0157	30.08	0.000
t x T	0.0305	8	0.0038	7.30	0.000
v x t x T	0.0082	8	0.0010	1.96	0.056
Error	0.0784	150	0.0005		
Total	0.3834	179			
d) Actividad reductora de acetileno (ARA)					
variedad (v)	7718	1	7718	11.42	0.001
tiempo (t)	40190	4	10047	14.87	0.000
trat. (T)	200041	2	100020	148.02	0.000
v x t	9882	4	2471	3.66	0.007
v x T	10532	2	5266	7.79	0.001
t x T	27794	8	3474	5.14	0.000
v x t x T	22960	8	2870	4.25	0.000
Error	101355	150	676		
Total	420472	179			

e) ARA por planta (ARAP)

variedad (v)	39	1	39	3.91	0.050
tiempo (t)	559	4	140	13.83	0.000
trat. (T)	3641	2	1820	180.23	0.000
v x t	50	4	13	1.25	0.294
v x T	24	2	12	1.20	0.305
t x T	797	8	100	9.87	0.000
v x t x T	235	8	29	2.91	0.005
Error	1515	150	10		
Total	6861	179			

Tabla A 4.22 Análisis de la varianza correspondientes a la actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GG), xantina deshidrogenasa (XDH) y uricasa en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ y el contenido de ureidos en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF}$ en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Glutamina sintetasa (GS)					
variedad (v)	74364	1	74364	566	0.000
tiempo (t)	231668	4	57917	441	0.000
trat. (T)	814913	2	407457	3101	0.000
v x t	82551	4	20638	157	0.000
v x T	1885	2	943	7	0.001
t x T	54484	8	6810	52	0.000
v x t x T	54500	8	6813	52	0.000
Error	11824	90	131		
Total	1326189	119			
b) Glutamato sintasa (GG)					
variedad (v)	68	1	68	24	0.000
tiempo (t)	3164	4	791	281	0.000
trat. (T)	16919	2	8459	3006	0.000
v x t	311	4	78	28	0.000
v x T	2680	2	1340	476	0.000
t x T	1674	8	209	74	0.000
v x t x T	301	8	38	13	0.000
Error	253	90	3		
Total	25370	119			
c) Xantina deshidrogenasa (XDH)					
variedad (v)	24	1	24	69	0.000
tiempo (t)	1064	4	266	771	0.000
trat. (T)	4218	2	2109	6111	0.000
v x t	54	4	14	39	0.000
v x T	31	2	16	45	0.000
t x T	421	8	53	152	0.000
v x t x T	31	8	4	11	0.000
Error	31	90	0.3		
Total	5873	119			

d) Uricasa					
variedad (v)	70284	1	70284	2623	0.000
tiempo (t)	46731	4	11683	436	0.000
trat. (T)	172917	2	86459	3227	0.000
v x t	2003	4	501	19	0.000
v x T	23077	2	11538	431	0.000
t x T	17398	8	2175	81	0.000
v x t x T	6218	8	777	29	0.000
Error	2411	90	27		
Total	341039	119			

e) Ureidos					
variedad (v)	15.91	1	15.91	2331	0.000
tiempo (t)	6.23	4	1.56	228	0.000
trat. (T)	99.62	2	49.81	7296	0.000
v x t	4.21	4	1.05	154	0.000
v x T	14.61	2	7.30	1070	0.000
t x T	2.96	8	0.37	54	0.000
v x t x T	1.57	8	0.20	29	0.000
Error	0.61	90	0.01		
Total	145.72	119			

5. Efecto del cloruro sódico aplicado a la simbiosis ya establecida.

5.1. Estudio de la simbiosis *Phaseolus vulgaris* var. *Africa-Rhizobium tropici* CIAT899.

Tabla A 5.1. Peso seco de parte aérea (PSPA), raíz (PSR) y planta completa (PSP), expresado en g planta⁻¹, relación raíz/parte aérea (RPA), en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. *Africa* inoculadas *Rhizobium tropici* CIAT899, con cuatro dosis de NaCl aplicadas en el periodo vegetativo. (DdT: días después del tratamiento)

DdT	NaCl (mM)	PSPA	PSR	PSP	RPA
0	0	1.20	0.36	1.60	0.24
	0	1.42	0.46	1.93	0.32
3	25	1.40	0.42	1.90	0.30
	50	1.35	0.44	1.83	0.33
	100	1.33	0.46	1.89	0.35
6	0	1.80	0.46	2.37	0.25
	25	1.58	0.39	2.06	0.25
	50	1.69	0.49	2.28	0.29
	100	1.62	0.54	2.26	0.34
9	0	2.26	0.49	2.93	0.22
	25	1.85	0.44	2.43	0.24
	50	1.73	0.49	2.36	0.28
	100	1.55	0.48	2.13	0.31
12	0	2.77	0.60	3.54	0.22
	25	2.36	0.62	3.17	0.26
	50	2.10	0.50	2.73	0.24
	100	1.84	0.58	2.55	0.31
MDS (0.05)		0.20	0.10	0.27	0.05

Tabla A 5.2. Peso seco de nódulos (PSN) en g planta⁻¹, peso normalizado de nódulos (PNN) en mg PSN g⁻¹ PSPA, actividad reductora de acetileno (ARA) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ PS h}^{-1}$ y actividad reductora de acetileno por planta (ARAP) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ PS h}^{-1}$ en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. *Africa* inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899 con cuatro dosis de NaCl aplicadas en el periodo vegetativo. (DdT: días después del tratamiento)

DdT	NaCl (mM)	PSN	PNN	ARA	ARAP
0	0	0.066	56.4	74.8	5.01
	0	0.106	74.3	89.8	9.61
3	25	0.084	60.1	87.4	7.30
	50	0.086	63.4	53.8	4.68
	100	0.090	67.8	54.7	4.83
6	0	0.116	64.6	96.5	11.12
	25	0.096	61.3	81.2	7.91
	50	0.095	56.5	66.7	6.61
	100	0.103	64.3	48.8	5.06
9	0	0.186	82.6	103.2	19.18
	25	0.138	74.7	75.9	10.44
	50	0.146	84.7	29.4	4.27
	100	0.111	71.3	25.2	2.78
12	0	0.188	67.9	72.6	13.66
	25	0.169	71.6	61.9	10.47
	50	0.138	66.6	24.7	3.47
	100	0.133	72.6	18.2	2.43
MDS (0.05)		0.010	11.1	14.4	2.11

Tabla A 5.3. Análisis de la varianza correspondientes al peso seco de parte aérea (PSPA), raíz (PSR) y planta completa (PSP), expresado en g planta⁻¹, relación raíz/parte aérea (RPA), en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, con cuatro dosis de NaCl aplicadas en el periodo vegetativo.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Peso seco parte aérea (PSPA)					
tiempo (t)	9.949	3	3.316	111.279	0.000
trat. (T)	2.889	3	0.963	32.323	0.000
t x T	1.761	9	0.195	6.568	0.000
Error	2.384	80			
Total	16.948	95			
b) Peso seco raíz (PSR)					
tiempo (t)	0.2473	3	0.0824	11.404	0.000
trat. (T)	0.0353	3	0.0117	1.629	0.189
t x T	0.1045	9	0.0116	1.607	0.127
Error	0.5784	80	0.0072		
Total	0.9657	95			
c) Peso seco parte aérea (PSP)					
tiempo (t)	15.0210	3	5.0070	91.573	0.000
trat. (T)	3.2725	3	1.0908	19.951	0.000
t x T	2.6115	9	0.2901	5.307	0.000
Error	4.3742	80	0.0546		
Total	25.2795	95			
d) Relación raíz/parte aérea (RPA)					
tiempo (t)	0.0696	3	0.0232	13.764	0.000
trat. (T)	0.0824	3	0.0274	16.187	0.000
t x T	0.0206	9	0.0022	1.353	0.224
Error	0.1358	80	0.0016		
Total	0.3086	95			

Tabla A 5.4. Análisis de la varianza correspondientes al peso seco de nódulos (PSN) en g planta⁻¹, peso normalizado de nódulos (PNN) en mg PSN g⁻¹ PSPA, actividad reductora de acetileno (ARA) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ PS h}^{-1}$ y actividad reductora de acetileno por planta (ARAP) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ PS h}^{-1}$ en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899 con cuatro dosis de NaCl aplicadas en el periodo vegetativo.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Peso seco de nódulos (PSN)					
tiempo (t)	0.0739	3	0.0246	81.170	0.000
trat. (T)	0.0166	3	0.0055	18.290	0.000
t x T	0.0163	9	0.0018	5.982	0.000
Error	0.0243	80	0.0003		
Total	0.1313	95			
b) Peso normalizado de nódulos (PNN)					
tiempo (t)	3552	3	1184	12.637	0.000
trat. (T)	101	3	33	0.361	0.781
t x T	2772	9	308	3.287	0.002
Error	7496	80	93		
Total	13922	95			
c) Actividad reductora de acetileno (ARA)					
tiempo (t)	12966	3	4322	27.36	0.000
trat. (T)	48087	3	16029	101.49	0.000
t x T	5099	9	566	3.58	0.001
Error	12634	80	157		
Total	78788	95			
d) ARA por planta (ARAP)					
tiempo (t)	81	3	27.25	8.11	0.000
trat. (T)	1327	3	442.37	131.64	0.000
t x T	383	9	42.59	12.67	0.000
Error	268	80	3.36		
Total	2061	95			

Tabla A 5.5. Actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT), glutamato deshidrogenasa (GDH), aspartato aminotransferasa (AAT), xantina deshidrogenasa (XDH) y uricasa (UR), expresadas en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, contenido de proteína soluble (PRT) expresado en $\text{mg g}^{-1} \text{PF}$ en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, con cuatro dosis de NaCl aplicadas en el periodo vegetativo. (DdT: días después del tratamiento).

DdT	NaCl (mM)	GS	GOGAT	GDH	AAT	XDH	UR	PRT
0	0	313	40.9	38.0	641	21.0	190	8.57
3	0	359	55.4	37.7	713	22.0	201	11.38
	25	367	56.3	43.3	730	24.4	226	10.95
	50	329	44.9	33.5	616	23.6	240	9.10
	100	340	41.9	38.4	628	20.5	226	7.84
6	0	448	53.2	30.6	662	23.3	209	12.66
	25	353	52.4	35.5	652	23.2	217	11.50
	50	323	41.7	34.8	640	21.6	220	11.13
	100	287	30.7	34.9	607	18.0	202	9.55
9	0	412	53.1	35.8	669	23.4	227	15.74
	25	336	46.8	32.6	646	23.2	204	13.46
	50	258	35.5	32.6	556	17.3	197	12.43
	100	238	28.7	35.9	476	17.0	208	10.68
12	0	370	46.7	35.2	647	21.8	201	13.78
	25	298	41.6	37.9	618	19.0	167	11.55
	50	226	23.3	31.7	414	15.9	145	8.52
	100	173	21.3	31.8	398	12.1	105	6.21
MDS (0.05)		19	2.5	2.0	18	1.0	20	0.62

Tabla A 5.6. Actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT), glutamato deshidrogenasa (GDH), aspartato aminotransferasa (AAT), xantina deshidrogenasa (XDH) y uricasa (UR), expresadas en $\text{nmol mg}^{-1} \text{proteína min}^{-1}$ en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas *Rhizobium tropici* CIAT899, con cuatro dosis de NaCl aplicadas en el periodo vegetativo. (DdT: días después del tratamiento).

DdT	NaCl (mM)	GS	GOGAT	GDH	AAT	XDH	UR
0	0	609	79.5	73.9	1246	40.8	369
3	0	526	81.2	55.2	1045	32.3	294
	25	558	85.6	65.9	1112	37.1	345
	50	602	82.2	61.3	1129	43.2	439
	100	723	89.1	81.5	1337	43.7	480
6	0	590	70.1	40.3	872	30.7	276
	25	512	76.0	51.5	945	33.6	315
	50	484	62.4	52.1	958	32.4	330
	100	502	53.5	60.8	1060	31.5	353
9	0	436	56.2	37.9	709	24.8	237
	25	416	57.9	40.3	800	28.7	253
	50	346	47.6	43.8	746	23.2	264
	100	371	44.8	56.0	744	26.6	324
12	0	448	56.6	42.6	782	24.5	203
	25	431	60.0	54.7	891	27.4	242
	50	442	45.5	62.0	809	31.1	284
	100	464	57.2	85.4	1068	32.6	282
MDS (0.05)		30	4.8	3.4	28	1.6	18

Tabla A 5.7. Análisis de la varianza correspondientes a la actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT), glutamato deshidrogenasa (GDH), aspartato aminotransferasa (AAT), xantina deshidrogenasa (XDH) y uricasa (UR), expresadas en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ y contenido de proteína soluble (PRT) expresado en $\text{mg g}^{-1} \text{PF}$ en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, con cuatro dosis de NaCl aplicadas en el periodo vegetativo.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Glutamina sintetasa					
tiempo (t)	76931	3	25643	120	0.000
trat. (T)	180218	3	60073	281	0.000
t x T	44786	9	4976	23	0.000
Error	10234	48	213		
Total	312171	63			
b) Glutamato sintasa					
tiempo (t)	2279	3	759	197	0.000
trat. (T)	5062	3	1687	438	0.000
t x T	352	9	39	10	0.000
Error	184	48	4		
Total	7879	63			
c) Glutamato deshidrogenasa					
tiempo (t)	199	3	66.6	33.4	0.000
trat. (T)	142	3	47.3	23.7	0.000
t x T	263	9	29.1	14.6	0.000
Error	96	48	2.0		
Total	700	63			
d) Aspartato aminotransferasa					
tiempo (t)	216193	3	72064	445	0.000
trat. (T)	257940	3	85980	531	0.000
t x T	89855	9	9983	61	0.000
Error	7761	48	161		
Total	571750	63			
e) Xantina deshidrogenasa					
tiempo (t)	305	3	101.9	202	0.000
trat. (T)	324	3	108.0	214	0.000
t x T	92	9	10.2	20	0.000
Error	24	48	0.5		
Total	746	63			
f) Uricasa					
tiempo (t)	57622	3	19207	287	0.000
trat. (T)	3301	3	1100	16	0.000
t x T	12777	9	1419	21	0.000
Error	3215	48	67		
Total	76917	63			
e) Proteína					
tiempo (t)	107	3	35.8	228	0.000
trat. (T)	205	3	68.5	438	0.000
t x T	33	9	3.7	23	0.000
Error	7	48	0.2		
Total	353	63			

Tabla A 5.8. Análisis de la varianza correspondientes a la actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT), glutamato deshidrogenasa (GDH), aspartato aminotransferasa (AAT), xantina deshidrogenasa (XDH) y uricasa (UR), expresadas en $\text{nmol mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$ en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas *Rhizobium tropici* CIAT899, con cuatro dosis de NaCl aplicadas en el periodo vegetativo.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Glutamina sintetasa					
tiempo (t)	400789	3	133596	303	0.000
trat. (T)	20960	3	6987	16	0.000
t x T	117427	9	13047	30	0.000
Error	21173	48	441		
Total	560350	63			
b) Glutamato sintasa					
tiempo (t)	10580	3	3527	303	0.000
trat. (T)	1078	3	359	31	0.000
t x T	1191	9	132	11	0.000
Error	559	48	12		
Total	13408	63			
c) Glutamato deshidrogenasa					
tiempo (t)	4496	3	1499	269	0.000
trat. (T)	6034	3	2011	360	0.000
t x T	1018	9	113	20	0.000
Error	268	48	6		
Total	11816	63			
d) Aspartato aminotransferasa					
tiempo (t)	1373614	3	457871	1159	0.000
trat. (T)	339284	3	113095	286	0.000
t x T	139408	9	15490	39	0.000
Error	18959	48	395		
Total	1871265	63			
e) Xantina deshidrogenasa					
tiempo (t)	1544	3	515	425	0.000
trat. (T)	273	3	91	75	0.000
t x T	326	9	36	30	0.000
Error	58	48	1		
Total	2201	63			
f) Uricasa					
tiempo (t)	180806	3	60269	379	0.000
trat. (T)	105951	3	35317	222	0.000
t x T	29486	9	3276	21	0.000
Error	7641	48	159		
Total	323883	63			

Tabla A 5.9. Contenido de alantoína (ALN), ácido alantoico (ALC) y ureidos (ALN+ALC), expresado en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas *Rhizobium tropici* CIAT899, con cuatro dosis de NaCl aplicadas en el periodo vegetativo.

Parámetro	NaCl (mM)	Días después del tratamiento				
		0	3	6	9	12
ALN	0	0.43	0.47	0.42	0.42	0.56
	25		0.42	0.45	0.44	0.55
	50		0.48	0.42	0.42	0.44
	100		0.52	0.33	0.29	0.33
			MDS (0.05) 0.13			
ALC	0	2.78	3.24	3.96	3.75	3.05
	25		3.60	3.73	2.54	1.96
	50		3.10	2.78	1.93	1.23
	100		2.45	2.23	1.62	1.12
			MDS (0.05) 0.16			
Ureidos	0	3.21	3.71	4.38	4.17	3.61
	25		4.02	4.18	2.98	2.51
	50		3.58	3.20	2.35	1.67
	100		2.97	2.56	1.91	1.45
			MDS (0.05) 0.12			

Tabla A 5.10. Análisis de la varianza correspondientes al contenido de alantoína (ALN), ácido alantoico (ALC) y ureidos (ALN+ALC), expresado en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas *Rhizobium tropici* CIAT899, con cuatro dosis de NaCl aplicadas en el periodo vegetativo.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Alantoína					
tiempo (t)	0.126	3	0.042	4.517	0.007
trat. (T)	0.079	3	0.026	2.837	0.048
t x T	0.329	9	0.037	3.929	0.001
Error	0.446	48	0.009		
Total	0.980	63			
b) Acido alantoico					
tiempo (t)	18.67	3	6.225	418	0.000
trat. (T)	25.64	3	8.549	578	0.000
t x T	5.12	9	0.569	38	0.000
Error	0.71	48	0.015		
Total	50.16	63			
c) Ureidos					
tiempo (t)	18.90	3	6.301	423	0.000
trat. (T)	26.57	3	8.857	595	0.000
t x T	5.85	9	0.651	43	0.000
Error	0.71	48	0.015		
Total	52.04	63			

Tabla A 5.11. Contenido de aminoácidos (AA) en nódulos (N), raíces (R) y hojas (H) expresado en $\mu\text{g g}^{-1}$ PF y en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, con cuatro dosis de NaCl aplicadas en el periodo vegetativo. (DdT: días después del tratamiento)

DdT	NaCl (mM)	AA ($\mu\text{g/g}$)			AA ($\mu\text{mol/g}$)		
		N	R	H	N	R	H
0	0	4600	538	838	34.8	4.04	6.34
	0	3223	824	686	24.4	6.24	4.94
3	25	4323	971	923	32.7	7.35	6.65
	50	4015	715	708	30.4	5.41	5.10
	100	4885	1123	682	37.0	8.50	4.89
6	0	4215	315	508	31.9	2.39	3.66
	25	4623	413	620	35.0	3.13	4.47
	50	5210	844	623	39.4	6.39	4.01
	100	4569	1148	834	34.6	8.25	5.42
9	0	4654	557	680	35.2	4.22	4.37
	25	5754	779	577	43.5	5.90	3.79
	50	6346	941	436	48.0	7.12	2.84
	100	6515	1202	525	49.3	9.10	3.41
12	0	3331	1336	919	25.2	10.11	6.04
	25	4738	1036	901	35.9	7.84	5.92
	50	3579	997	554	27.1	7.55	3.60
	100	5438	741	827	41.2	5.61	5.56
MDS (0.05)		355	170	94	2.7	1.26	0.64

Tabla A 5.12. Análisis de la varianza correspondientes al contenido de aminoácidos (AA) en nódulos (N), raíces (R) y hojas (H) expresado en $\mu\text{g g}^{-1}$ PF en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, con cuatro dosis de NaCl aplicadas en el periodo vegetativo.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Aminoácidos en nódulos					
tiempo (t)	28469042	3	9489680	133	0.000
trat. (T)	18722594	3	6240864	88	0.000
t x T	9354158	9	1039350	14	0.000
Error	3401026	48	70854		
Total	59946819	63			
b) Aminoácidos en raíces					
tiempo (t)	995909	3	331969	20	0.000
trat. (T)	819154	3	273051	16	0.000
t x T	2958251	9	328694	19	0.000
Error	795184	48	16566		
Total	5568498	63			
c) Aminoácidos en hojas					
tiempo (t)	575896	3	191965	40	0.000
trat. (T)	273538	3	91179	19	0.000
t x T	576749	9	64083	13	0.000
Error	228457	48	4760		
Total	1654640	63			

5.2. Estudio de la simbiosis *Phaseolus vulgaris* var. Coco-*Rhizobium tropici* CIAT899.

Tabla A 5.13. Peso seco de parte aérea (PSPA), raíz (PSR) y planta completa (PSP), expresado en g planta⁻¹, relación raíz/parte aérea (RPA), en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, con cuatro dosis de NaCl aplicadas en el periodo vegetativo. (DdT: días después del tratamiento)

DdT	NaCl (mM)	PSPA	PSR	PSP	RPA
0	0	0.73	0.32	1.12	0.44
	0	0.82	0.33	1.23	0.41
3	10	0.82	0.34	1.21	0.41
	25	0.92	0.31	1.27	0.34
	50	0.83	0.39	1.27	0.45
6	0	1.32	0.34	1.76	0.27
	10	1.13	0.29	1.50	0.26
	25	1.01	0.31	1.40	0.31
	50	0.88	0.36	1.30	0.42
9	0	1.44	0.39	1.94	0.27
	10	1.37	0.39	1.86	0.29
	25	1.35	0.54	1.99	0.39
	50	1.29	0.52	1.89	0.41
12	0	1.75	0.52	2.42	0.31
	10	1.71	0.56	2.28	0.35
	25	1.52	0.55	2.15	0.37
	50	1.44	0.57	2.09	0.40
MDS (0.05)		0.48	0.12	0.32	0.10

Tabla A 5.14. Peso seco de nódulos (PSN) en g planta⁻¹, peso normalizado de nódulos (PNN) en mg PSN g⁻¹ PSPA, actividad reductora de acetileno (ARA) en μmol C₂H₄ g⁻¹ PS h⁻¹ y ARA por planta (ARAP) en μmol C₂H₄ g⁻¹ PS h⁻¹ en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, con cuatro dosis de NaCl aplicadas en el periodo vegetativo. (DdT: días después del tratamiento)

DdT	NaCl (mM)	PSN	PNN	ARA	ARAP
0	0	0.064	86.1	75.6	4.55
	0	0.075	91.7	121.0	9.08
3	10	0.048	58.8	89.5	4.53
	25	0.041	44.8	66.6	2.83
	50	0.045	55.6	58.4	2.48
6	0	0.095	73.5	146.7	14.23
	10	0.081	71.6	151.0	11.96
	25	0.082	80.6	73.7	6.02
	50	0.053	60.6	61.9	3.60
9	0	0.108	74.9	177.5	18.46
	10	0.099	72.7	129.3	12.96
	25	0.090	66.4	84.4	7.65
	50	0.071	55.8	58.9	4.23
12	0	0.151	84.6	109.7	16.94
	10	0.117	68.2	89.7	10.62
	25	0.085	56.3	53.3	4.47
	50	0.076	53.6	24.4	1.93
MDS (0.05)		0.025	15.7	40.8	4.44

Tabla A 5.15. Análisis de la varianza correspondientes al peso seco de parte aérea (PSPA), raíz (PSR) y planta completa (PSP), expresado en g planta⁻¹, relación raíz/parte aérea (RPA), en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, con cuatro dosis de NaCl aplicadas en el periodo vegetativo.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Peso seco parte aérea (PSPA)					
tiempo (t)	6.989	3	2.330	58.970	0.000
trat. (T)	0.742	3	0.247	6.262	0.001
t x T	0.328	9	0.036	0.922	0.511
Error	3.161	80	0.040		
Total	11.220	95			
b) Peso seco raíz (PSR)					
tiempo (t)	0.795	3	0.265	23.436	0.000
trat. (T)	0.088	3	0.029	2.585	0.059
t x T	0.084	9	0.009	0.825	0.595
Error	0.905	80	0.011		
Total	1.872	95			
c) Peso seco planta (PSP)					
tiempo (t)	13.712	3	4.571	64.363	0.000
trat. (T)	0.613	3	0.204	2.876	0.041
t x T	0.577	9	0.064	0.903	0.527
Error	5.681	80	0.071		
Total	20.582	95			
d) Relación raíz/parte aérea (RPA)					
tiempo (t)	0.061	3	0.020	2.905	0.040
trat. (T)	0.201	3	0.067	9.607	0.000
t x T	0.065	9	0.007	1.039	0.417
Error	0.558	80	0.007		
Total	0.886	95			

Tabla A 5.16. Análisis de la varianza correspondientes al peso seco de nódulos (PSN) en g planta⁻¹, peso normalizado de nódulos (PNN) en mg PSN g⁻¹ PSPA, actividad reductora de acetileno (ARA) en μmol C₂H₄ g⁻¹ PS h⁻¹ y actividad reductora de acetileno por planta (ARAP) en μmol C₂H₄ g⁻¹ PS h⁻¹ en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899 con cuatro dosis de NaCl aplicadas en el periodo vegetativo.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Peso seco de nódulos (PSN)					
tiempo (t)	0.0442	3	0.0147	30.602	0.000
trat. (T)	0.0237	3	0.0079	16.391	0.000
t x T	0.0089	9	0.0010	2.047	0.044
Error	0.0385	80			
Total	0.1152	95			
b) Peso normalizado de nódulos (PNN)					
tiempo (t)	2877	3	959	5.24	0.002
trat. (T)	4867	3	1622	8.87	0.000
t x T	3219	9	358	1.96	0.056
Error	14636	80	183		
Total	25598	95			
c) Actividad reductora de acetileno (ARA)					
tiempo (t)	40878	3	13626	10.80	0.000
trat. (T)	103915	3	34638	27.45	0.000
t x T	15606	9	1734	1.37	0.214
Error	100933	80	1262		
Total	261332	95			
d) ARA por planta (ARAP)					
tiempo (t)	587	3	196	13.13	0.000
trat. (T)	1686	3	562	37.70	0.000
t x T	299	9	33	2.23	0.028
Error	1193	80	15		
Total	3765	95			

Tabla A 5.17. Actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT), glutamato deshidrogenasa (GDH), aspartato aminotransferasa (AAT), xantina deshidrogenasa (XDH) y uricasa (UR), expresadas en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ y contenido de proteína soluble (PRT) expresado en $\text{mg g}^{-1} \text{PF}$ en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, con cuatro dosis de NaCl aplicadas en el periodo vegetativo. (DdT: días después del tratamiento).

DdT	NaCl (mM)	GS	GOGAT	GDH	AAT	XDH	UR	PRT
0	0	407	35.9	34.8	548	20.8	111.6	11.49
3	0	368	41.6	34.4	557	24.4	125.6	13.82
	10	284	45.7	34.1	586	26.0	132.3	14.57
	25	239	33.4	37.4	533	20.5	122.9	13.89
	50	143	41.7	46.8	464	19.3	119.5	9.13
6	0	302	35.7	29.5	501	22.5	126.4	12.45
	10	258	31.1	45.3	599	22.6	139.2	10.46
	25	207	28.3	22.9	511	19.2	119.3	9.21
	50	268	39.5	35.7	689	18.9	106.9	10.84
9	0	286	39.4	24.3	426	27.5	125.2	7.84
	10	261	36.3	32.9	492	21.5	124.2	5.86
	25	156	31.9	26.7	418	18.9	101.3	4.85
	50	164	25.3	30.8	374	13.5	80.4	4.46
12	0	291	28.7	21.0	478	19.1	81.4	8.30
	10	199	32.9	26.7	426	16.9	80.4	4.98
	25	115	19.5	28.5	358	10.9	72.5	4.70
	50	107	16.7	28.4	254	10.1	72.5	4.09
MDS (0.05)		22	3.4	1.7	16	0.9	6.1	0.80

Tabla A 5.18. Actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT), glutamato deshidrogenasa (GDH), aspartato aminotransferasa (AAT), xantina deshidrogenasa (XDH) y uricasa (UR), expresadas en $\text{nmol mg}^{-1} \text{proteína min}^{-1}$ en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, con cuatro dosis de NaCl aplicadas en el periodo vegetativo. (DdT: días después del tratamiento).

DdT	NaCl (mM)	GS	GOGAT	GDH	AAT	XDH	UR
0	0	591	52.0	50.4	796	30.2	162
3	0	444	50.1	41.5	672	29.4	151
	10	326	52.2	39.0	670	29.8	151
	25	287	40.2	44.8	639	24.6	147
	50	262	75.4	85.4	848	35.3	218
6	0	405	47.8	39.6	671	30.1	169
	10	412	49.5	72.2	954	36.0	222
	25	376	51.2	41.4	924	34.7	216
	50	413	60.7	54.9	1059	29.1	164
9	0	609	83.7	51.7	906	58.5	266
	10	742	103.2	93.7	1399	61.2	353
	25	536	109.7	91.9	1436	65.1	348
	50	614	94.7	115.0	1396	50.3	300
12	0	584	57.6	42.1	959	38.4	163
	10	668	110.1	89.5	1427	56.6	269
	25	409	69.0	101.2	1269	38.6	257
	50	436	67.9	115.7	1036	41.1	296
MDS (0.05)		52	6.5	3.6	36	1.8	13

Tabla A 5.19. Análisis de la varianza correspondientes a la actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT), glutamato deshidrogenasa (GDH), aspartato aminotransferasa (AAT), xantina deshidrogenasa (XDH) y uricasa (UR), expresadas en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ y contenido de proteína soluble (PRT) expresado en $\text{mg g}^{-1} \text{PF}$ en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, con cuatro dosis de NaCl aplicadas en el periodo vegetativo.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Glutamina sintetasa					
tiempo (t)	482301	4	120575	473	0.000
trat. (T)	169180	3	56393	221	0.000
t x T	96545	12	8045	32	0.000
Error	15297	60	255		
Total	763323	79			
b) Glutamato sintasa					
tiempo (t)	2190	4	548	93	0.000
trat. (T)	649	3	216	37	0.000
t x T	1100	12	92	16	0.000
Error	353	60	6		
Total	4292	79			
c) Glutamato deshidrogenasa					
tiempo (t)	1478	4	369	260	0.000
trat. (T)	647	3	216	152	0.000
t x T	1198	12	100	70	0.000
Error	85	60	1		
Total	3408	79			
d) Aspartato aminotransferasa					
tiempo (t)	461827	4	115457	905	0.000
trat. (T)	51735	3	17245	135	0.000
t x T	213681	12	17807	140	0.000
Error	7656	60	128		
Total	734900	79			
e) Xantina deshidrogenasa					
tiempo (t)	651	4	163	374	0.000
trat. (T)	526	3	175	403	0.000
t x T	292	12	24	56	0.000
Error	26	60	0.4		
Total	1494	79			
f) Uricasa					
tiempo (t)	24067	4	6017	320	0.000
trat. (T)	4533	3	1511	80	0.000
t x T	3726	12	311	17	0.000
Error	1128	60	19		
Total	33454	79			
e) Proteína					
tiempo (t)	644	3	214.6	680	0.000
trat. (T)	103	3	34.4	109	0.000
t x T	64	9	7.1	22	0.000
Error	15	48	0.3		
Total	826	63			

Tabla A 5.20. Análisis de la varianza correspondientes a la actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT), glutamato deshidrogenasa (GDH), aspartato aminotransferasa (AAT), xantina deshidrogenasa (XDH) y uricasa (UR), expresadas en $\text{nmol mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$ en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas *Rhizobium tropici* CIAT899, con cuatro dosis de NaCl aplicadas en el periodo vegetativo.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Glutamina sintetasa					
tiempo (t)	1007798	4	251950	183	0.000
trat. (T)	157181	3	52394	38	0.000
t x T	194024	12	16169	12	0.000
Error	82652	60	1378		
Total	1441656	79			
b) Glutamato sintasa					
tiempo (t)	26074	4	6518	312	0.000
trat. (T)	2674	3	891	43	0.000
t x T	8388	12	699	33	0.000
Error	1252	60	21		
Total	38388	79			
c) Glutamato deshidrogenasa					
tiempo (t)	24790	4	6198	953	0.000
trat. (T)	15650	3	5217	802	0.000
t x T	13435	12	1120	172	0.000
Error	390	60	7		
Total	54266	79			
d) Aspartato aminotransferasa					
tiempo (t)	3902578	4	975644	1472	0.000
trat. (T)	799227	3	266409	402	0.000
t x T	953873	12	79489	120	0.000
Error	39761	60	663		
Total	5695440	79			
e) Xantina deshidrogenasa					
tiempo (t)	9892	4	2473	1523	0.000
trat. (T)	404	3	135	83	0.000
t x T	1346	12	112	69	0.000
Error	97	60	2		
Total	11740	79			
f) Uricasa					
tiempo (t)	271348	4	67837	800	0.000
trat. (T)	32220	3	10740	127	0.000
t x T	52945	12	4412	52	0.000
Error	5090	60	85		
Total	361603	79			

Tabla A 5.21. Contenido de alantoína (ALN), ácido alantoico (ALC) y ureidos (ALN+ALC), expresado en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, con cuatro dosis de NaCl aplicadas en el periodo vegetativo.

Parámetro	NaCl (mM)	Días después del tratamiento				
		0	3	6	9	12
ALN	0	0.11	0.41	0.46	0.12	0.14
	10		0.52	0.22	0.19	0.11
	25		0.40	0.25	0.12	0.16
	50		0.41	0.18	0.20	0.13
	MDS (0.05) 0.084					
ALC	0	2.01	1.74	2.15	1.92	1.56
	10		1.92	1.91	1.07	1.29
	25		1.44	1.23	1.03	0.89
	50		1.06	1.30	0.72	0.63
	MDS (0.05) 0.064					
Ureidos	0	2.12	2.16	2.38	2.05	1.70
	10		2.44	2.13	1.26	1.41
	25		1.84	1.48	1.15	1.05
	50		1.47	1.49	0.92	0.76
	MDS (0.05) 0.099					

Tabla A 5.22. Análisis de la varianza correspondientes al contenido de alantoína (ALN), ácido alantoico (ALC) y ureidos (ALN+ALC), expresado en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas *Rhizobium tropici* CIAT899, con cuatro dosis de NaCl aplicadas en el periodo vegetativo.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Alantoína					
tiempo (t)	1.161	4	0.290	82.24	0.000
trat. (T)	0.024	3	0.008	2.22	0.095
t x T	0.221	12	0.018	5.22	0.000
Error	0.212	60	0.004		
Total	1.617	79			
b) Acido alantoico					
tiempo (t)	8.455	4	2.114	1036	0.000
trat. (T)	5.754	3	1.918	940	0.000
t x T	2.917	12	0.243	119	0.000
Error	0.122	60	0.002		
Total	17.249	79			
c) Ureidos					
tiempo (t)	10.067	4	2.517	518	0.000
trat. (T)	6.503	3	2.168	446	0.000
t x T	3.007	12	0.251	52	0.000
Error	0.292	60	0.005		
Total	19.868	79			

Tabla A 5.23. Contenido de aminoácidos (AA) en nódulos (N), raíces (R) y hojas (H) expresado en $\mu\text{g g}^{-1}$ PF y en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, con cuatro dosis de NaCl aplicadas en el periodo vegetativo. (DdT: días después del tratamiento)

DdT	NaCl (mM)	AA ($\mu\text{g/g}$)			AA ($\mu\text{mol/g}$)		
		N	R	H	N	R	H
0	0	5483	750	740	41.5	5.68	5.60
	0	5992	664	765	45.3	5.03	5.79
3	10	5847	1978	860	44.3	15.00	6.51
	25	5417	1826	764	41.0	13.82	5.79
	50	3805	1890	621	28.8	14.30	4.70
6	0	4871	1018	784	36.9	7.71	5.93
	10	5300	1193	1873	40.1	9.03	14.18
	25	5455	1133	1382	41.3	8.58	10.46
	50	4165	1030	1119	31.5	7.80	8.47
9	0	5725	1239	913	43.3	9.38	6.91
	10	6319	2041	1044	47.8	15.45	7.90
	25	6451	2309	840	48.8	17.48	6.36
	50	5396	2064	948	40.8	15.62	7.17
12	0	4718	904	818	35.7	6.84	6.19
	10	5993	1806	889	45.4	13.67	6.73
	25	4236	2245	692	32.1	16.99	5.24
	50	5819	1831	933	44.0	13.86	7.06
MDS (0.05)		296	285	154	4.5	2.16	1.17

Tabla A 5.24. Análisis de la varianza correspondientes al contenido de aminoácidos (AA) en nódulos (N), raíces (R) y hojas (H) expresado en $\mu\text{g g}^{-1}$ PF en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, con cuatro dosis de NaCl aplicadas en el periodo vegetativo.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Aminoácidos en nódulos					
tiempo (t)	9560546	4	2390137	14	0.000
trat. (T)	7341774	3	2447258	14	0.000
t x T	20409822	12	1700819	10	0.000
Error	10511250	60	175187		
Total	47823392	79			
b) Aminoácidos en raíces					
tiempo (t)	14453715	4	3613429	89	0.000
trat. (T)	6701382	3	2233794	55	0.000
t x T	4433681	12	369473	9	0.000
Error	2438855	60	40648		
Total	28027632	79			
c) Aminoácidos en hojas					
tiempo (t)	3268655	4	817164	69	0.000
trat. (T)	854360	3	284787	24	0.000
t x T	2016288	12	168024	14	0.000
Error	711606	60	11860		
Total	6850908	79			

5.3. Comparación de las dos simbiosis.

Tabla A 5.25. Análisis de la varianza correspondientes al peso seco de planta completa (PSP) en g planta⁻¹, relación raíz/parte aérea (RPA), peso seco de nódulos (PSN) en g planta⁻¹, actividad reductora de acetileno (ARA) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ PSN h}^{-1}$ y ARA por planta (ARAP) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ planta}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. África y var. Coco inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, con cuatro dosis de NaCl aplicadas en el periodo vegetativo.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Peso seco de planta (PSP)					
variedad (v)	19.686	1	19.686	307.13	0.000
tiempo (t)	24.461	3	8.154	127.21	0.000
trat. (T)	2.435	2	1.217	18.99	0.000
v x t	0.491	3	0.164	2.55	0.059
v x T	0.228	2	0.114	1.78	0.173
t x T	0.940	6	0.157	2.44	0.029
v x t x T	0.978	6	0.163	2.54	0.024
Error	7.692	120	0.064		
Total	56.911	143			
b) Relación raíz/parte aérea (RPA)					
variedad (v)	0.292	1	0.292	59.98	0.000
tiempo (t)	0.061	3	0.020	4.19	0.007
trat. (T)	0.143	2	0.072	14.70	0.000
v x t	0.025	3	0.008	1.74	0.163
v x T	0.049	2	0.025	5.07	0.008
t x T	0.036	6	0.006	1.23	0.295
v x t x T	0.013	6	0.002	0.46	0.841
Error	0.584	120	0.005		
Total	1.204	143			
c) Peso seco de nódulos (PSN)					
variedad (v)	0.0865	1	0.0865	202.76	0.000
tiempo (t)	0.0950	3	0.0317	74.19	0.000
trat. (T)	0.0310	2	0.0155	36.33	0.000
v x t	0.0094	3	0.0031	7.31	0.000
v x T	0.0015	2	0.0007	1.73	0.182
t x T	0.0054	6	0.0009	2.12	0.056
v x t x T	0.0123	6	0.0020	4.79	0.000
Error	0.0512	120	0.0003		
Total	0.2923	143			
d) Actividad reductora de acetileno (ARA)					
variedad (v)	14411	1	14411	19.09	0.000
tiempo (t)	28870	3	9623	12.75	0.000
trat. (T)	106202	2	53101	70.35	0.000
v x t	6334	3	2111	2.80	0.043
v x T	14648	2	7324	9.70	0.000
t x T	10472	6	1745	2.31	0.038
v x t x T	6471	6	1078	1.43	0.209
Error	90573	120	755		
Total	277981	143			

e) ARA por planta (ARAP)

variedad (v)	53	1	53	5.3	0.023
tiempo (t)	455	3	152	15.4	0.000
trat. (T)	2303	2	1151	117.2	0.000
v x t	55	3	18	1.9	0.142
v x T	125	2	62	6.3	0.002
t x T	374	6	62	6.3	0.000
v x t x T	176	6	29	3.0	0.009
Error	1179	120	10		
Total	4720	143			

Tabla A 5.26 Análisis de la varianza correspondientes a la actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GG), xantina deshidrogenasa (XDH) y uricasa en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ y el contenido de ureidos en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF}$ en nódulos de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa y var. Coco inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, con cuatro dosis de NaCl aplicadas en el periodo vegetativo.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Glutamina sintetasa (GS)					
variedad (v)	341079	1	341079	1294	0.000
tiempo (t)	95881	3	31960	121	0.000
trat. (T)	281097	2	140548	533	0.000
v x t	3611	3	1204	5	0.006
v x T	22290	2	11145	42	0.000
t x T	24892	6	4149	16	0.000
v x t x T	47421	6	7904	30	0.000
Error	18983	72	264		
Total	835256	95			
b) Glutamato sintasa (GG)					
variedad (v)	4797	1	4797	1108	0.000
tiempo (t)	3412	3	1137	263	0.000
trat. (T)	1837	2	918	212	0.000
v x t	26	3	9	2	0.125
v x T	973	2	486	112	0.000
t x T	652	6	109	25	0.000
v x t x T	186	6	31	7	0.000
Error	312	72	4		
Total	12193	95			
c) Xantina deshidrogenasa (XDH)					
variedad (v)	175	1	175.1	473	0.000
tiempo (t)	603	3	201.1	543	0.000
trat. (T)	450	2	224.9	608	0.000
v x t	47	3	15.7	42	0.000
v x T	179	2	89.3	241	0.000
t x T	192	6	32.0	86	0.000
v x t x T	26	6	4.3	12	0.000
Error	27	72	0.4		
Total	1698	95			

d) Uricasa					
variedad (v)	226523	1	226523	4719.8	0.000
tiempo (t)	43375	3	14458	301.2	0.000
trat. (T)	1600	2	800	16.7	0.000
v x t	1435	3	478	10.0	0.000
v x T	1650	2	825	17.2	0.000
t x T	6006	6	1001	20.9	0.000
v x t x T	2243	6	374	7.8	0.000
Error	3456	72	48		
Total	286286	95			
e) Ureidos					
variedad (v)	77.89	1	77.89	7792	0.000
tiempo (t)	15.78	3	5.26	526	0.000
trat. (T)	18.14	2	9.07	907	0.000
v x t	1.79	3	0.60	60	0.000
v x T	0.72	2	0.36	36	0.000
t x T	3.86	6	0.64	64	0.000
v x t x T	2.06	6	0.34	34	0.000
Error	0.72	72	0.01		
Total	120.96	95			

6. Aplicación de ácido abscísico exógeno en condiciones de salinidad.

6.1. Estudio de la simbiosis *Phaseolus vulgaris* var. Africa-*Rhizobium tropici* CIAT899 en presencia de ABA y de NaCl.Tabla A 6.1. Peso seco parte aérea (PSPA), raíz (PSR), planta completa (PSP) en g planta⁻¹, relación raíz/parte aérea (RPA) en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con ABA y NaCl.

Días	ABA (μM)	NaCl (mM)	PSPA	PSR	PSP	RPA
21	0	0	1.42	0.46	1.98	0.32
		100	1.33	0.46	1.89	0.35
	1	0	0.92	0.28	1.23	0.30
		100	0.96	0.37	1.37	0.39
	10	0	1.17	0.38	1.59	0.33
		100	0.06	0.29	1.38	0.27
24	0	0	1.80	0.45	2.36	0.25
		100	1.62	0.54	2.26	0.34
	1	0	1.48	0.47	1.99	0.33
		100	1.22	0.36	1.64	0.30
	10	0	1.29	0.35	1.71	0.27
		100	1.05	0.35	1.46	0.33
MDS (0.05)			0.22	0.10	0.28	0.08

Tabla A 6.2. Peso seco de nódulos (PSN) en g planta⁻¹, peso normalizado de nódulos (PNN) en mg PSN g⁻¹ PSPA, actividad reductora de acetileno (ARA) en μmol C₂H₄ g⁻¹ PSN h⁻¹ y ARA por planta (ARAP) en μmol C₂H₄ planta⁻¹ h⁻¹ en plantas de *Phaseolus vulgaris* variedad Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con ABA y NaCl.

Días	ABA (μM)	NaCl (mM)	PSN	PNN	ARA	ARAP
21	0	0	0.106	74.3	89.8	9.61
		100	0.090	67.8	54.7	4.83
	1	0	0.030	32.3	80.9	2.40
		100	0.036	37.5	78.3	2.83
	10	0	0.044	39.2	74.3	3.01
		100	0.037	36.3	71.8	2.12
24	0	0	0.116	64.6	96.5	11.12
		100	0.103	64.3	48.8	5.06
	1	0	0.043	33.6	36.9	1.57
		100	0.062	50.2	37.4	2.40
	10	0	0.070	54.3	73.4	5.13
		100	0.052	50.0	38.7	1.92
MDS (0.05)			0.020	18.8	29.9	1.85

Tabla A 6.3. Análisis de la varianza correspondientes al peso seco parte aérea (PSPA), raíz (PSR) y planta completa (PSP) en g planta⁻¹, relación raíz/parte aérea (RPA), en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con ABA y NaCl.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Peso seco parte aérea (PSPA)					
tiempo (t)	1.258	1	1.258	33.950	0.000
trat. ABA (A)	2.520	2	1.260	33.995	0.000
trat. Sal (S)	0.355	1	0.355	9.572	0.003
t x A	0.406	2	0.203	5.471	0.007
t x S	0.137	1	0.137	3.704	0.059
A x S	0.012	2	0.006	0.158	0.854
t x A x T	0.041	2	0.021	0.559	0.575
Error	2.224	60	0.037		
Total	6.953	71			
b) Peso seco raíz (PSR)					
tiempo (t)	0.037	1	0.037	5.397	0.024
trat. ABA (A)	0.246	2	0.123	17.861	0.000
trat. Sal (S)	0.000	1	0.000	0.000	0.986
t x A	0.017	2	0.009	1.241	0.296
t x S	0.000	1	0.000	0.044	0.837
A x S	0.025	2	0.012	1.808	0.173
t x A x T	0.078	2	0.039	5.650	0.006
Error	0.413	60	0.007		
Total	0.816	71			
c) Peso seco planta (PSP)					
tiempo (t)	1.924	1	1.924	32.821	0.000
trat. ABA (A)	5.295	2	2.648	45.171	0.000
trat. Sal (S)	0.381	1	0.381	6.503	0.013
t x A	0.553	2	0.276	4.716	0.013
t x S	0.148	1	0.148	2.530	0.117
A x S	0.066	2	0.033	0.566	0.571
t x A x T	0.216	2	0.108	1.846	0.167
Error	3.517	60	0.059		
Total	12.101	71			
d) Relación raíz/parte aérea (RPA)					
tiempo (t)	0.010	1	0.010	2.255	0.139
trat. ABA (A)	0.010	2	0.005	1.129	0.330
trat. Sal (S)	0.014	1	0.014	3.242	0.077
t x A	0.008	2	0.004	0.853	0.431
t x S	0.001	1	0.001	0.326	0.577
A x S	0.009	2	0.004	0.970	0.385
t x A x T	0.043	2	0.021	4.813	0.012
Error	0.265	60	0.004		
Total	0.360	71			

Tabla A 6.4. Análisis de la varianza correspondientes al peso seco de nódulos (PSN) en g planta⁻¹, peso normalizado de nódulos (PNN) en mg PSN g⁻¹ PSPA, actividad reductora de acetileno (ARA) en μmol C₂H₄ g⁻¹ PSN h⁻¹ y ARA por planta (ARAP) en μmol C₂H₄ planta⁻¹ h⁻¹ en plantas de *Phaseolus vulgaris* variedad Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con ABA y NaCl.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Peso seco de nódulos (PSN)					
tiempo (t)	0.0053	1	0.00525	14.952	0.000
trat. ABA (A)	0.0524	2	0.02621	74.637	0.000
trat. Sal (S)	0.0004	1	0.00041	1.164	0.285
t x A	0.0003	2	0.00013	0.384	0.683
t x S	0.0000	1	0.00001	0.023	0.881
A x S	0.0028	2	0.00138	3.930	0.025
t x A x T	0.0004	2	0.00021	0.597	0.554
Error	0.0211	60	0.00035		
Total	0.0826	71			
b) Peso normalizado de nódulos (PNN)					
tiempo (t)	437	1	437	1.647	0.204
trat. ABA (A)	11411	2	5705	21.518	0.000
trat. Sal (S)	29	1	29	0.109	0.746
t x A	1358	2	679	2.562	0.086
t x S	131	1	131	0.494	0.492
A x S	826	2	413	1.557	0.219
t x A x T	124	2	62	0.234	0.792
Error	15908	60	265		
Total	30224	71			
c) Actividad reductora de acetileno (ARA)					
tiempo (t)	31872	1	31872	47.384	0.000
trat. ABA (A)	9570	2	4785	7.114	0.002
trat. Sal (S)	8122	1	8122	12.074	0.001
t x A	41986	2	20993	31.210	0.000
t x S	657	1	657	0.977	0.338
A x S	4326	2	2163	3.216	0.047
t x A x T	1253	2	626	0.931	0.400
Error	40359	60	673		
Total	138145	71			
d) ARA por planta (ARAP)					
tiempo (t)	1.226	1	1.226	0.480	0.499
trat. ABA (A)	322.462	2	161.231	63.119	0.000
trat. Sal (S)	96.199	1	96.199	37.660	0.000
t x A	49.850	2	24.925	9.758	0.000
t x S	4.500	1	4.500	1.762	0.190
A x S	106.865	2	53.433	20.918	0.000
t x A x T	6.606	2	3.303	1.293	0.282
Error	153.265	60	2.554		
Total	740.973	71			

Tabla A 6.5. Actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GG), glutamato deshidrogenasa (GDH), aspartato aminotransferasa (AAT), xantina deshidrogenasa (XDH) y uricasa en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con ABA y NaCl.

Días	ABA (μM)	NaCl (mM)	GS	GG	GDH	AAT	XDH	Uricasa
21	0	0	359	55.4	37.7	714	22.0	201
		100	340	41.9	38.3	629	20.5	226
	1	0	171	35.3	29.5	594	16.1	147
		100	151	28.8	26.9	653	14.3	108
	10	0	135	34.4	32.1	637	13.6	129
		100	176	34.7	27.0	634	13.7	128
24	0	0	448	53.2	30.6	662	23.3	209
		100	288	30.7	34.9	608	18.0	202
	1	0	167	42.8	24.3	535	17.5	149
		100	119	37.6	24.8	563	13.0	117
	10	0	189	30.3	15.0	545	14.9	122
		100	119	28.2	22.5	538	10.1	100
MDS (0.05)			17	3.2	1.6	24	0.6	14

Tabla A 6.6. Actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GG), glutamato deshidrogenasa (GDH), aspartato aminotransferasa (AAT), xantina deshidrogenasa (XDH) y uricasa en $\text{nmol mg}^{-1} \text{proteína min}^{-1}$ en nódulos de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con ABA y NaCl.

Días	ABA (μM)	NaCl (mM)	GS	GG	GDH	AAT	XDH	Uricasa
21	0	0	526	81.2	55.2	1045	32.3	294
		100	723	89.0	81.5	1336	43.6	480
	1	0	249	51.4	42.9	864	23.4	214
		100	212	40.4	37.7	916	20.1	152
	10	0	193	49.2	45.9	911	19.4	184
		100	246	48.6	37.8	886	19.1	180
24	0	0	590	70.1	40.4	872	30.7	276
		100	502	53.5	60.9	1061	31.5	353
	1	0	223	57.1	32.4	714	23.4	198
		100	169	53.3	35.1	798	18.4	167
	10	0	314	50.3	24.8	904	24.8	203
		100	208	49.3	39.3	938	17.7	174
MDS (0.05)			25	4.8	2.6	36	1.2	21

Tabla A 6.7. Análisis de la varianza correspondientes a la actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GG), glutamato deshidrogenasa (GDH), aspartato aminotransferasa (AAT), xantina deshidrogenasa (XDH) y uricasa en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con ABA y NaCl.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Glutamina sintetasa (GS)					
tiempo (t)	2	1	2	0.01	0.908
trat. ABA (A)	449527	2	224763	1678.65	0.000
trat. Sal (S)	25462	1	25462	190.16	0.000
t x A	2619	2	1309	9.78	0.000
t x S	26163	1	26163	195.40	0.000
A x S	12085	2	6043	45.13	0.000
t x A x T	6817	2	3408	25.46	0.000
Error	4820	36	134		
Total	527494	47			
b) Glutamato sintasa (GG)					
tiempo (t)	19	1	19	3.89	0.056
trat. ABA (A)	1502	2	751	150.17	0.000
trat. Sal (S)	818	1	818	163.66	0.000
t x A	538	2	269	53.83	0.000
t x S	35	1	35	6.92	0.013
A x S	626	2	313	62.59	0.000
t x A x T	54	2	27	5.45	0.009
Error	180	36	5		
Total	3772	47			
c) Glutamato deshidrogenasa (GDH)					
tiempo (t)	518.6	1	518.6	393.5	0.000
trat. ABA (A)	1133.0	2	566.5	429.8	0.000
trat. Sal (S)	9.3	1	9.3	7.1	0.012
t x A	112.7	2	56.3	42.7	0.000
t x S	124.2	1	124.2	94.2	0.000
A x S	25.4	2	12.7	9.6	0.000
t x A x T	58.0	2	29.0	22.0	0.000
Error	47.4	36	1.3		
Total	2028.6	47			
d) Aspartato aminotransferasa (AAT)					
tiempo (t)	55656	1	55656	203.22	0.000
trat. ABA (A)	46266	2	23133	84.47	0.000
trat. Sal (S)	1302	1	1302	4.76	0.036
t x A	6914	2	3457	12.62	0.000
t x S	7	1	7	0.03	0.874
A x S	25788	2	12894	47.08	0.000
t x A x T	1888	2	944	3.45	0.043
Error	9859	36	274		
Total	147681	47			

e) Xantina deshidrogenasa (XDH)					
tiempo (t)	3.48	1	3.48	17.11	0.000
trat. ABA (A)	535.43	2	267.72	1316.08	0.000
trat. Sal (S)	106.73	1	106.73	524.68	0.000
t x A	2.70	2	1.35	6.65	0.004
t x S	44.29	1	44.29	217.74	0.000
A x S	2.24	2	1.12	5.50	0.008
t x A x T	2.05	2	1.03	5.05	0.012
Error	7.32	36	0.20		
Total	704.26	47			
f) Uricasa					
tiempo (t)	516	1	516	5.77	0.022
trat. ABA (A)	76887	2	38444	429.64	0.000
trat. Sal (S)	1838	1	1838	20.55	0.000
t x A	1050	2	525	5.87	0.006
t x S	759	1	759	8.48	0.006
A x S	3905	2	1953	21.82	0.000
t x A x T	876	2	438	4.90	0.013
Error	3221	36	89		
Total	89053	47			

Tabla A 6.8. Análisis de la varianza correspondientes a la actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GG), glutamato deshidrogenasa (GDH), aspartato aminotransferasa (AAT), xantina deshidrogenasa (XDH) y uricasa en nmol mg⁻¹ proteína min⁻¹ en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con ABA y NaCl.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Glutamina sintetasa (GS)					
tiempo (t)	6859	1	6859	22.7	0.000
trat. ABA (A)	1376382	2	688191	2277.6	0.000
trat. Sal (S)	420	1	420	1.4	0.246
t x A	29247	2	14623	48.4	0.000
t x S	70662	1	70662	233.9	0.000
A x S	22677	2	11339	37.5	0.000
t x A x T	35633	2	17816	59.0	0.000
Error	10878	36	302		
Total	1552757	47			
b) Glutamato sintasa (GG)					
tiempo (t)	226	1	226	20.4	0.000
trat. ABA (A)	5911	2	2956	266.6	0.000
trat. Sal (S)	212	1	212	19.1	0.000
t x A	2295	2	1148	103.5	0.000
t x S	105	1	105	9.4	0.004
A x S	86	2	43	3.9	0.030
t x A x T	541	2	271	24.4	0.000
Error	399	36	11		
Total	9776	47			

c) Glutamato deshidrogenasa (GDH)

tiempo (t)	1546	1	1546	455	0.000
trat. ABA (A)	5383	2	2692	793	0.000
trat. Sal (S)	857	1	857	252	0.000
t x A	264	2	132	39	0.000
t x S	204	1	204	60	0.000
A x S	1379	2	690	203	0.000
t x A x T	402	2	201	59	0.000
Error	122	36	3		
Total	10158	47			

d) Aspartato aminotransferasa (AAT)

tiempo (t)	149978	1	149978	237.6	0.000
trat. ABA (A)	539103	2	269552	427.0	0.000
trat. Sal (S)	130031	1	130031	206.0	0.000
t x A	124742	2	62371	98.8	0.000
t x S	38	1	38	0.1	0.809
A x S	118076	2	59038	93.5	0.000
t x A x T	14980	2	7490	11.9	0.000
Error	22727	36	631		
Total	1099675	47			

e) Xantina deshidrogenasa (XDH)

tiempo (t)	44	1	44	65	0.000
trat. ABA (A)	2026	2	1013	1513	0.000
trat. Sal (S)	5	1	5	7	0.013
t x A	163	2	81	122	0.000
t x S	122	1	122	183	0.000
A x S	268	2	134	200	0.000
t x A x T	40	2	20	30	0.000
Error	24	36	1		
Total	2690	47			

f) Uricasa

tiempo (t)	5899	1	5899	29	0.000
trat. ABA (A)	296191	2	148096	716	0.000
trat. Sal (S)	6217	1	6217	30	0.000
t x A	15282	2	7641	37	0.000
t x S	3594	1	3594	17	0.000
A x S	73184	2	36592	177	0.000
t x A x T	9824	2	4912	24	0.000
Error	7451	36	207		
Total	417642	47			

Tabla A 6.9. Contenido de prolina (PRL) y aminoácidos (AA) en $\mu\text{g g}^{-1}$ PF, ureidos en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF y proteína (PRT) en mg g^{-1} PF, en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con ABA y NaCl.

Parámetro	Días	NaCl (mM)	ABA (μM)		
			0	1	10
PRL	21	0	75.5	84.1	79.2
		100	115.2	90.0	78.6
	24	0	99.8	98.9	65.7
		100	144.2	71.5	77.2
	MDS (0.05) 7.2				
	AA	21	0	3223	3872
100			4885	4032	3744
24		0	4215	4332	3184
		100	4569	3900	3008
MDS (0.05) 478					
Ureidos		21	0	3.71	3.43
	100		2.97	2.92	2.73
	24	0	4.34	4.93	3.99
		100	2.56	2.33	3.08
	MDS (0.05) 0.15				
	PRT	21	0	11.4	11.4
100			7.8	11.9	11.9
24		0	12.6	12.5	10.0
		100	9.5	11.7	9.5
MDS (0.05) 0.84					

Tabla A 6.10. Análisis de la varianza correspondientes al contenido de prolina (PRL) y aminoácidos (AA) en $\mu\text{g g}^{-1}$ PF, ureidos en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF y proteína en mg g^{-1} PF, en nódulos de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con ABA y NaCl.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Prolina (PRL)					
tiempo (t)	400	1	400	16	0.000
trat. ABA (A)	9343	2	4671	183	0.000
trat. Sal (S)	1798	1	1798	71	0.000
t x A	2672	2	1336	52	0.000
t x S	90	1	90	4	0.069
A x S	5852	2	2926	115	0.000
t x A x T	1184	2	592	23	0.000
Error	917	36	25		
Total	22256	47			
b) Aminoácidos (AA)					
tiempo (t)	509	1	509	0.01	0.947
trat. ABA (A)	6635564	2	3317782	29.89	0.000
trat. Sal (S)	1103387	1	1103387	9.94	0.003
t x A	1655236	2	827618	7.46	0.002
t x S	1806051	1	1806051	16.27	0.000
A x S	3038148	2	1519074	13.69	0.000
t x A x T	437657	2	218828	1.97	0.154
Error	3995467	36	110985		
Total	18672019	47			
c) Ureidos					
tiempo (t)	3.547	1	3.547	335	0.000
trat. ABA (A)	1.640	2	0.820	77	0.000
trat. Sal (S)	12.124	1	12.124	1145	0.000
t x A	1.851	2	0.925	87	0.000
t x S	6.875	1	6.875	649	0.000
A x S	4.048	2	2.024	191	0.000
t x A x T	0.556	2	0.278	26	0.000
Error	0.381	36	0.011		
Total	31.022	47			
d) Proteína (PRT)					
tiempo (t)	0.002	1	0.002	0.006	0.942
trat. ABA (A)	20.053	2	10.027	29.073	0.000
trat. Sal (S)	17.133	1	17.133	49.677	0.000
t x A	25.550	2	12.775	37.042	0.000
t x S	0.739	1	0.739	2.144	0.152
A x S	27.121	2	13.561	39.320	0.000
t x A x T	1.361	2	0.681	1.973	0.154
Error	12.416	36	0.345		
Total	104.374	47			

Tabla A 6.11. Contenido de prolina (PRL), aminoácidos (AA), azúcares totales solubles (ATS) en $\mu\text{g g}^{-1}$ PF, clorofilas (CLF) en $\mu\text{g ml}^{-1}$ en hojas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con ABA y NaCl.

Parámetro	Días	NaCl (mM)	ABA (μM)			
			0	1	10	
PRL	21	0	18.9	26.7	30.4	
		100	32.4	36.3	29.3	
	24	0	14.7	22.3	23.3	
		100	37.3	33.9	31.2	
	MDS (0.05) 2.5					
	AA	21	0	686	1145	1073
100			682	1291	918	
24		0	508	1083	891	
		100	834	1174	1217	
MDS (0.05) 123						
ATS		21	0	3016	2742	4072
	100		3666	3298	3974	
	24	0	2286	2899	3274	
		100	4115	3755	3891	
	MDS (0.05) 169					
	CLF	21	0	9.1	12.2	11.2
100			10.0	9.9	11.3	
24		0	10.5	9.0	10.1	
		100	9.5	7.0	10.0	
MDS (0.05) 0.097						

Tabla A 6.12. Análisis de la varianza correspondientes al contenido de prolina (PRL), aminoácidos (AA), azúcares totales solubles (ATS) en $\mu\text{g g}^{-1}$ PF, clorofilas (CLF) en $\mu\text{g ml}^{-1}$ en hojas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con ABA y NaCl.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Prolina (PRL)					
tiempo (t)	44	1	44	14	0.001
trat. ABA (A)	133	2	66	22	0.000
trat. Sal (S)	1370	1	1370	455	0.000
t x A	30	2	15	5	0.012
t x S	134	1	134	44	0.000
A x S	425	2	213	71	0.000
t x A x T	34	2	17	6	0.008
Error	108	36	3		
Total	2278	47			
b) Aminoácidos (AA)					
tiempo (t)	2536	1	2536	0.35	0.567
trat. ABA (A)	2067201	2	1033601	140.86	0.000
trat. Sal (S)	177644	1	177644	24.21	0.000
t x A	44369	2	22185	3.02	0.061
t x S	191162	1	191162	26.05	0.000
A x S	11518	2	5759	0.79	0.464
t x A x T	152316	2	76158	10.38	0.000
Error	264153	36	7338		
Total	2910900	47			
c) Azúcares solubles totales (ATS)					
tiempo (t)	0.100	1	0.100	7.2	0.011
trat. ABA (A)	3.669	2	1.835	131.4	0.000
trat. Sal (S)	6.482	1	6.482	464.4	0.000
t x A	1.132	2	0.566	40.5	0.000
t x S	1.609	1	1.609	115.2	0.000
A x S	1.926	2	0.963	69.0	0.000
t x A x T	0.387	2	0.193	13.9	0.000
Error	0.503	36	0.014		
Total	15.807	47			
d) Clorofilas (CLF)					
tiempo (t)	19.156	1	19.156	4152	0.000
trat. ABA (A)	11.760	2	5.880	1275	0.000
trat. Sal (S)	6.393	1	6.393	1386	0.000
t x A	24.819	2	12.409	2690	0.000
t x S	1.266	1	1.266	274	0.000
A x S	12.056	2	6.028	1307	0.000
t x A x T	2.583	2	1.291	280	0.000
Error	0.166	36	0.005		
Total	78.199	47			

6.2. Estudio de la simbiosis *Phaseolus vulgaris* var. Coco-*Rhizobium tropici* CIAT899 en presencia de ABA y de NaCl.

Tabla A 6.13. Peso seco parte aérea (PSPA), peso seco raíz (PSR), peso seco planta (PSP) en g planta⁻¹ y relación raíz/parte aérea (RPA) en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con ABA y NaCl.

Días	ABA (μM)	NaCl (mM)	PSPA	PSR	PSP	RPA
21	0	0	0.91	0.31	1.28	0.34
		100	0.59	0.27	0.88	0.46
	1	0	0.79	0.27	1.09	0.33
		100	0.78	0.26	1.09	0.35
	10	0	0.71	0.31	1.07	0.44
		100	0.62	0.27	0.95	0.44
24	0	0	1.32	0.35	1.76	0.27
		100	0.81	0.30	1.15	0.38
	1	0	0.84	0.30	1.20	0.36
		100	0.86	0.31	1.22	0.36
	10	0	0.96	0.38	1.41	0.39
		100	0.83	0.40	1.28	0.49
MDS (0.05)			0.14	0.09	0.19	0.09

Tabla A 6.14. Peso seco de nódulos (PSN) en g planta⁻¹, peso normalizado de nódulos (PNN) en mg PSN g⁻¹ PSPA, actividad reductora de acetileno (ARA) en μmol C₂H₄ g⁻¹ PSN h⁻¹ y ARA por planta (ARAP) en μmol C₂H₄ planta⁻¹ h⁻¹ en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con ABA y NaCl.

Días	ABA (μM)	NaCl (mM)	PSN	PNN	ARA	ARAP
21	0	0	0.062	67.7	121.4	7.6
		100	0.019	32.3	35.1	0.7
	1	0	0.034	43.2	46.0	1.5
		100	0.042	53.1	47.5	1.9
	10	0	0.056	78.2	56.3	3.2
		100	0.052	84.1	51.5	2.5
24	0	0	0.095	73.5	146.7	14.0
		100	0.039	50.1	37.6	1.3
	1	0	0.057	66.7	54.2	3.3
		100	0.053	63.6	49.6	2.3
	10	0	0.075	78.3	36.7	2.9
		100	0.050	59.5	37.3	1.8
MDS (0.05)			0.021	26.0	30.9	2.6

Tabla A 6.15. Análisis de la varianza correspondientes al peso seco parte aérea (PSPA), peso seco raíz (PSR), peso seco planta (PSP) en g planta⁻¹ y relación raíz/parte aérea (RPA) en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con ABA y NaCl.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Peso seco parte aérea (PSPA)					
tiempo (t)	0.730	1	0.730	52.77	0.000
trat. ABA (A)	0.207	2	0.103	7.48	0.001
trat. Sal (S)	0.532	1	0.532	38.49	0.000
t x A	0.195	2	0.097	7.04	0.002
t x S	0.024	1	0.024	1.74	0.193
A x S	0.581	2	0.291	21.02	0.000
t x A x T	0.038	2	0.019	1.39	0.258
Error	0.830	60	0.014		
Total	3.137	71			
b) Peso seco raíz (PSR)					
tiempo (t)	0.0567	1	0.0567	9.38	0.003
trat. ABA (A)	0.0348	2	0.0174	2.87	0.064
trat. Sal (S)	0.0041	1	0.0041	0.68	0.421
t x A	0.0137	2	0.0068	1.13	0.330
t x S	0.0028	1	0.0028	0.46	0.506
A x S	0.0060	2	0.0030	0.50	0.611
t x A x T	0.0033	2	0.0017	0.27	0.762
Error	0.3630	60	0.0061		
Total	0.4844	71			
c) Peso seco parte aérea (PSP)					
tiempo (t)	1.360	1	1.360	48.00	0.000
trat. ABA (A)	0.180	2	0.090	3.17	0.049
trat. Sal (S)	0.777	1	0.777	27.43	0.000
t x A	0.227	2	0.113	4.00	0.023
t x S	0.018	1	0.018	0.63	0.439
A x S	0.866	2	0.433	15.28	0.000
t x A x T	0.050	2	0.025	0.88	0.419
Error	1.700	60	0.028		
Total	5.177	71			
d) Relación raíz/parte aérea (RPA)					
tiempo (t)	0.0066	1	0.0066	1.18	0.281
trat. ABA (A)	0.1181	2	0.0590	10.64	0.000
trat. Sal (S)	0.0549	1	0.0549	9.90	0.003
t x A	0.0292	2	0.0146	2.63	0.080
t x S	0.0024	1	0.0024	0.44	0.517
A x S	0.0349	2	0.0174	3.15	0.050
t x A x T	0.0129	2	0.0064	1.16	0.321
Error	0.3329	60	0.0055		
Total	0.5918	71			

Tabla A 6.16. Análisis de la varianza correspondientes al peso seco de nódulos (PSN) en g planta⁻¹, peso normalizado de nódulos (PNN) en mg PSN g⁻¹ PSPA, actividad reductora de acetileno (ARA) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ PSN h}^{-1}$ y ARA por planta (ARAP) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ planta}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con ABA y NaCl.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Peso seco de nódulos (PSN)					
tiempo (t)	0.0054	1	0.00543	15.98	0.000
trat. ABA (A)	0.0017	2	0.00083	2.44	0.095
trat. Sal (S)	0.0077	1	0.00770	22.67	0.000
t x A	0.0009	2	0.00047	1.38	0.261
t x S	0.0010	1	0.00099	2.92	0.093
A x S	0.0083	2	0.00413	12.15	0.000
t x A x T	0.0001	2	0.00004	0.12	0.889
Error	0.0204	60	0.00034		
Total	0.0454	71			
b) Peso normalizado de nódulos (PNN)					
tiempo (t)	539	1	539	1.06	0.307
trat. ABA (A)	5621	2	2810	5.54	0.006
trat. Sal (S)	2099	1	2099	4.14	0.046
t x A	2914	2	1457	2.87	0.064
t x S	330	1	330	0.65	0.432
A x S	3402	2	1701	3.36	0.042
t x A x T	1056	2	528	1.04	0.359
Error	30416	60	507		
Total	46376	71			
c) Actividad reductora de acetileno (ARA)					
tiempo (t)	9	1	9	0.01	0.910
trat. ABA (A)	23038	2	11519	16.12	0.000
trat. Sal (S)	20544	1	20544	28.76	0.000
t x A	3032	2	1516	2.12	0.129
t x S	277	1	277	0.39	0.542
A x S	36766	2	18383	25.73	0.000
t x A x T	603	2	302	0.42	0.658
Error	42864	60	714		
Total	127133	71			
d) ARA por planta (ARAP)					
tiempo (t)	34.8	1	34.8	6.69	0.012
trat. ABA (A)	193.3	2	96.7	18.56	0.000
trat. Sal (S)	241.0	1	241.0	46.29	0.000
t x A	51.2	2	25.6	4.92	0.011
t x S	27.8	1	27.8	5.35	0.024
A x S	342.3	2	171.2	32.87	0.000
t x A x T	25.1	2	12.6	2.42	0.098
Error	312.4	60	5.2		
Total	1228.1	71			

Tabla A 6.17. Actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GG), glutamato deshidrogenasa (GDH), aspartato aminotransferasa (AAT), xantina deshidrogenasa (XDH) y uricasa en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con ABA y NaCl.

Días	ABA (μM)	NaCl (mM)	GS	GG	GDH	AAT	XDH	Uricasa
21	0	0	368	41.6	34.4	557	24.4	126
		100	115	20.0	31.1	508	16.4	80
	1	0	176	34.3	35.3	547	20.7	109
		100	211	36.1	38.9	632	21.9	118
	10	0	253	34.4	22.5	600	15.9	100
		100	278	37.0	21.8	575	20.4	106
24	0	0	302	35.7	29.5	501	22.5	126
		100	279	39.7	21.3	578	16.7	111
	1	0	245	31.6	23.4	558	20.5	119
		100	172	33.0	25.3	543	15.9	97
	10	0	308	30.2	22.6	515	16.5	119
		100	147	18.6	23.1	521	14.6	104
MDS (0.05)			21	3.2	1.6	25	0.6	8

Tabla A 6.18. Actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GG), glutamato deshidrogenasa (GDH), aspartato aminotransferasa (AAT), xantina deshidrogenasa (XDH) y uricasa en $\text{nmol mg}^{-1} \text{proteína min}^{-1}$ en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con ABA y NaCl.

Días	ABA (μM)	NaCl (mM)	GS	GG	GDH	AAT	XDH	Uricasa
21	0	0	444	50.1	41.5	672	29.4	151
		100	173	30.1	46.7	762	24.6	120
	1	0	238	46.4	47.8	741	28.0	148
		100	283	48.6	52.3	850	29.5	159
	10	0	345	46.9	30.7	817	21.6	136
		100	375	50.0	29.5	776	27.6	143
24	0	0	405	47.8	39.6	671	30.1	169
		100	415	59.1	31.7	860	24.8	166
	1	0	336	43.4	32.1	767	28.2	164
		100	310	59.5	45.5	978	28.7	174
	10	0	464	45.5	34.1	776	24.9	180
		100	296	37.5	46.5	1048	29.4	210
MDS (0.05)			32	4.8	2.2	35	0.9	14

Tabla A 6.19. Análisis de la varianza correspondientes a la actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GG), glutamato deshidrogenasa (GDH), aspartato aminotransferasa (AAT), xantina deshidrogenasa (XDH) y uricasa en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con ABA y NaCl.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Glutamina sintetasa (GS)					
tiempo (t)	900	1	900	4.25	0.047
trat. ABA (A)	36085	2	18043	85.11	0.000
trat. Sal (S)	67713	1	67713	319.41	0.000
t x A	15200	2	7600	35.85	0.000
t x S	1336	1	1336	6.30	0.017
A x S	28875	2	14437	68.10	0.000
t x A x T	97284	2	48642	229.45	0.000
Error	7632	36	212		
Total	255024	47			
b) Glutamato sintasa (GG)					
tiempo (t)	70	1	70	14.14	0.001
trat. ABA (A)	167	2	83	16.77	0.000
trat. Sal (S)	180	1	180	36.14	0.000
t x A	664	2	332	66.81	0.000
t x S	39	1	39	7.85	0.008
A x S	218	2	109	21.93	0.000
t x A x T	815	2	408	81.99	0.000
Error	179	36	5		
Total	2332	47			
c) Glutamato deshidrogenasa (GDH)					
tiempo (t)	502	1	502	396.2	0.000
trat. ABA (A)	600	2	300	236.6	0.000
trat. Sal (S)	13	1	13	10.4	0.003
t x A	366	2	183	144.6	0.000
t x S	10	1	10	7.7	0.009
A x S	151	2	75	59.4	0.000
t x A x T	18	2	9	7.3	0.002
Error	46	36	1		
Total	1706	47			
d) Aspartato aminotransferasa (AAT)					
tiempo (t)	13652	1	13652	45.91	0.000
trat. ABA (A)	9190	2	4595	15.45	0.000
trat. Sal (S)	1996	1	1996	6.71	0.014
t x A	11874	2	5937	19.96	0.000
t x S	1087	1	1087	3.66	0.064
A x S	3800	2	1900	6.39	0.004
t x A x T	25952	2	12976	43.63	0.000
Error	10707	36	297		
Total	78259	47			

e) Xantina deshidrogenasa (XDH)					
tiempo (t)	54.9	1	54.9	284.5	0.000
trat. ABA (A)	97.0	2	48.5	251.4	0.000
trat. Sal (S)	70.7	1	70.7	366.8	0.000
t x A	11.7	2	5.8	30.3	0.000
t x S	34.9	1	34.9	180.7	0.000
A x S	138.3	2	69.2	358.7	0.000
t x A x T	46.1	2	23.1	119.6	0.000
Error	6.9	36	0.2		
Total	460.4	47			
f) Uricasa					
tiempo (t)	510	1	510	13.60	0.001
trat. ABA (A)	124	2	62	1.66	0.205
trat. Sal (S)	2344	1	2344	62.57	0.000
t x A	980	2	490	13.08	0.000
t x S	160	1	160	4.26	0.046
A x S	1599	2	800	21.35	0.000
t x A x T	2254	2	1127	30.08	0.000
Error	1349	36	37		
Total	9319	47			

Tabla A 6.20. Análisis de la varianza correspondientes a la actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GG), glutamato deshidrogenasa (GDH), aspartato aminotransferasa (AAT), xantina deshidrogenasa (XDH) y uricasa en nmol mg^{-1} proteína min^{-1} en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con ABA y NaCl.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Glutamina sintetasa (GS)					
tiempo (t)	44855	1	44855	90.82	0.000
trat. ABA (A)	57568	2	28784	58.28	0.000
trat. Sal (S)	48041	1	48041	97.27	0.000
t x A	13069	2	6535	13.23	0.000
t x S	52	1	52	0.10	0.752
A x S	39655	2	19827	40.15	0.000
t x A x T	123036	2	61518	124.56	0.000
Error	17780	36	494		
Total	344056	47			
b) Glutamato sintasa (GG)					
tiempo (t)	143	1	143	12.72	0.001
trat. ABA (A)	164	2	82	7.28	0.002
trat. Sal (S)	7	1	7	0.63	0.442
t x A	824	2	412	36.71	0.000
t x S	386	1	386	34.41	0.000
A x S	429	2	214	19.09	0.000
t x A x T	911	2	456	40.58	0.000
Error	404	36	11		
Total	3268	47			

c) Glutamato deshidrogenasa (GDH)

tiempo (t)	120	1	120	49.6	0.000
trat. ABA (A)	683	2	341	140.8	0.000
trat. Sal (S)	233	1	233	96.3	0.000
t x A	1086	2	543	224.0	0.000
t x S	31	1	31	12.7	0.001
A x S	221	2	111	45.6	0.000
t x A x T	404	2	202	83.4	0.000
Error	87	36	2		
Total	2866	47			

d) Aspartato aminotransferasa (AAT)

tiempo (t)	76948	1	76948	130.23	0.000
trat. ABA (A)	116045	2	58022	98.20	0.000
trat. Sal (S)	229937	1	229937	389.17	0.000
t x A	8961	2	4481	7.58	0.002
t x S	88557	1	88557	149.88	0.000
A x S	4040	2	2020	3.42	0.044
t x A x T	29886	2	14943	25.29	0.000
Error	21270	36	591		
Total	575645	47			

e) Xantina deshidrogenasa (XDH)

tiempo (t)	10.03	1	10.03	25.8	0.000
trat. ABA (A)	58.50	2	29.25	75.3	0.000
trat. Sal (S)	1.76	1	1.76	4.5	0.040
t x A	17.14	2	8.57	22.1	0.000
t x S	3.05	1	3.05	7.9	0.008
A x S	212.45	2	106.22	273.6	0.000
t x A x T	0.43	2	0.22	0.6	0.578
Error	13.98	36	0.39		
Total	317.33	47			

f) Uricasa

tiempo (t)	14096	1	14096	152.36	0.000
trat. ABA (A)	1990	2	995	10.75	0.000
trat. Sal (S)	172	1	172	1.86	0.181
t x A	3131	2	1565	16.92	0.000
t x S	857	1	857	9.26	0.004
A x S	2789	2	1395	15.07	0.000
t x A x T	481	2	241	2.60	0.088
Error	3331	36	93		
Total	26848	47			

Tabla A 6.21. Contenido de prolina (PRL) y aminoácidos (AA) en $\mu\text{g g}^{-1}$ PF, ureidos en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF y proteína en mg g^{-1} PF, en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con ABA y NaCl.

Parámetro	Días	NaCl (mM)	ABA (μM)			
			0	1	10	
PRL	21	0	113.2	82.4	80.4	
		100	123.3	118.7	85.7	
	24	0	140.4	86.8	80.2	
		100	111.7	92.6	110.5	
				MDS (0.05) 4.0		
	AA	21	0	5871	4514	4054
100			5405	7108	4324	
24		0	4742	3811	3811	
		100	5811	4946	4243	
			MDS (0.05) 433			
Ureidos		21	0	1.72	1.79	1.56
	100		1.58	2.10	1.67	
	24	0	1.90	1.99	1.92	
		100	1.72	2.06	1.86	
				MDS (0.05) 0.14		
	PRT	21	0	13.8	12.3	12.2
100			11.1	12.4	12.3	
24		0	12.4	12.1	11.1	
		100	11.2	9.2	8.3	
			MDS (0.05) 1.08			

Tabla A 6.22. Análisis de la varianza correspondientes al contenido de prolina (PRL) y aminoácidos (AA) en el PF, ureidos en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF y proteína (PRT) en mg g^{-1} PF, en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con ABA y NaCl.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Prolina (PRL)					
tiempo (t)	114	1	114	14	0.001
trat. ABA (A)	9839	2	4919	619	0.000
trat. Sal (S)	1174	1	1174	148	0.000
t x A	1203	2	601	76	0.000
t x S	657	1	657	83	0.000
A x S	2211	2	1105	139	0.000
t x A x T	2410	2	1205	152	0.000
Error	286	36	8		
Total	17892	47			
b) Aminoácidos (AA)					
tiempo (t)	8107480	1	8107480	89.0	0.000
trat. ABA (A)	11327965	2	5663983	62.2	0.000
trat. Sal (S)	8889392	1	8889392	97.6	0.000
t x A	4066494	2	2033247	22.3	0.000
t x S	1334205	1	1334205	14.6	0.001
A x S	8148932	2	4074466	44.7	0.000
t x A x T	9414016	2	4707008	51.7	0.000
Error	3279505	36	91097		
Total	54567989	47			
c) Ureidos					
tiempo (t)	0.340	1	0.340	37.33	0.000
trat. ABA (A)	0.662	2	0.331	36.38	0.000
trat. Sal (S)	0.003	1	0.003	0.33	0.575
t x A	0.058	2	0.029	3.19	0.053
t x S	0.075	1	0.075	8.21	0.007
A x S	0.243	2	0.122	13.36	0.000
t x A x T	0.024	2	0.012	1.30	0.286
Error	0.328	36	0.009		
Total	1.732	47			
d) Proteína (PRT)					
tiempo (t)	32.02	1	32.02	56.90	0.000
trat. ABA (A)	10.89	2	5.44	9.67	0.000
trat. Sal (S)	29.69	1	29.69	52.76	0.000
t x A	7.82	2	3.91	6.95	0.003
t x S	6.46	1	6.46	11.48	0.002
A x S	1.03	2	0.51	0.91	0.410
t x A x T	12.99	2	6.49	11.54	0.000
Error	20.26	36	0.56		
Total	121.16	47			

Tabla A 6.23. Contenido de prolina (PRL), aminoácidos (AA), azúcares totales solubles (ATS) en $\mu\text{g g}^{-1}$ PF, clorofilas (CLF) en $\mu\text{g ml}^{-1}$ en hojas de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con ABA y NaCl.

Parámetro	Días	NaCl (mM)	ABA (μM)		
			0	1	10
PRL	21	0	16.4	31.7	37.6
		100	38.5	46.7	37.9
	24	0	20.6	38.9	34.1
		100	46.4	47.2	37.7
	MDS (0.05) 2.7				
	AA	21	0	765	1521
100			1626	1445	1165
24		0	784	1365	1234
		100	1280	1211	858
MDS (0.05) 109					
ATS		21	0	2318	2597
	100		2713	2899	2677
	24	0	4080	3143	2904
		100	3159	3238	3256
	MDS (0.05) 163				
	CLF	21	0	8.2	8.4
100			10.0	8.6	11.9
24		0	8.3	10.9	11.8
		100	11.9	10.5	9.2
MDS (0.05) 0.10					

Tabla A 6.24. Análisis de la varianza correspondientes al contenido de prolina (PRL), aminoácidos (AA), azúcares totales solubles (ATS) en $\mu\text{g g}^{-1}$ PF, clorofilas (CLF) en $\mu\text{g ml}^{-1}$ en hojas de *Phaseolus vulgaris* var. Coco inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con ABA y NaCl.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Prolina (PRL)					
tiempo (t)	86.6	1	86.6	24.17	0.000
trat. ABA (A)	918.9	2	459.4	128.16	0.000
trat. Sal (S)	1890.6	1	1890.6	527.38	0.000
t x A	133.7	2	66.9	18.65	0.000
t x S	0.1	1	0.1	0.02	0.904
A x S	979.5	2	489.8	136.62	0.000
t x A x T	69.7	2	34.8	9.72	0.000
Error	129.1	36	3.6		
Total	4208.1	47			
b) Aminoácidos (AA)					
tiempo (t)	447181	1	447181	77.83	0.000
trat. ABA (A)	564658	2	282329	49.14	0.000
trat. Sal (S)	66083	1	66083	11.50	0.002
t x A	3635	2	1817	0.32	0.731
t x S	137924	1	137924	24.00	0.000
A x S	1998479	2	999239	173.90	0.000
t x A x T	146291	2	73145	12.73	0.000
Error	206854	36	5746		
Total	3571103	47			
c) Azúcares solubles totales (ATS)					
tiempo (t)	4777313	1	4777313	366.78	0.000
trat. ABA (A)	203213	2	101607	7.80	0.002
trat. Sal (S)	3769	1	3769	0.29	0.600
t x A	1374612	2	687306	52.77	0.000
t x S	371471	1	371470	28.52	0.000
A x S	481409	2	240704	18.48	0.000
t x A x T	1634731	2	817365	62.75	0.000
Error	468905	36	13025		
Total	9315423	47			
d) Clorofilas (CLF)					
tiempo (t)	6.58	1	6.58	1432	0.000
trat. ABA (A)	22.70	2	11.35	2470	0.000
trat. Sal (S)	3.44	1	3.44	749	0.000
t x A	22.48	2	11.24	2445	0.000
t x S	1.58	1	1.58	344	0.000
A x S	28.72	2	14.36	3124	0.000
t x A x T	13.19	2	6.60	1435	0.000
Error	0.17	36	0.00		
Total	98.86	47			

6.3. Comparación de las dos simbiosis.

Tabla A 6.25. Análisis de la varianza correspondientes al peso seco de planta completa (PSP) en g planta⁻¹, relación raíz/parte aérea (RPA), peso seco de nódulos (PSN) en g planta⁻¹, actividad nitrogenasa (ARA) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ PSN h}^{-1}$ y ARAP en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ planta}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con ABA y NaCl.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Peso seco de planta (PSP)					
variedad (V)	10.497	1	10.497	241.49	0.000
tiempo (t)	3.259	1	3.259	74.98	0.000
trat. ABA (A)	3.685	2	1.842	42.39	0.000
trat. Sal (S)	1.123	1	1.123	25.84	0.000
V x t	0.024	1	0.024	0.56	0.463
V x A	1.790	2	0.895	20.59	0.000
V x S	0.035	1	0.035	0.80	0.382
t x A	0.161	2	0.080	1.85	0.162
t x S	0.134	1	0.134	3.09	0.081
A x S	0.399	2	0.199	4.58	0.012
V x t x A	0.619	2	0.309	7.12	0.001
V x t x S	0.032	1	0.032	0.73	0.404
V x A x S	0.534	2	0.267	6.14	0.003
t x A x S	0.066	2	0.033	0.76	0.470
V x t x A x S	0.200	2	0.100	2.31	0.104
Error	5.216	120	0.043		
Total	27.775	143			
b) Relación raíz/parte aérea (RPA)					
variedad (V)	0.1612	1	0.1612	32.329	0.000
tiempo (t)	0.0164	1	0.0164	3.281	0.073
trat. ABA (A)	0.0322	2	0.0161	3.227	0.043
trat. Sal (S)	0.0627	1	0.0627	12.572	0.001
V x t	0.0002	1	0.0002	0.036	0.853
V x A	0.0959	2	0.0479	9.614	0.000
V x S	0.0066	1	0.0066	1.316	0.254
t x A	0.0259	2	0.0130	2.599	0.079
t x S	0.0038	1	0.0038	0.765	0.393
A x S	0.0334	2	0.0167	3.349	0.038
V x t x A	0.0108	2	0.0054	1.083	0.342
V x t x S	0.0001	1	0.0001	0.013	0.910
V x A x S	0.0101	2	0.0050	1.011	0.367
t x A x S	0.0440	2	0.0220	4.417	0.014
V x t x A x S	0.0114	2	0.0057	1.142	0.323
Error	0.5983	120	0.0050		
Total	1.1129	143			
c) Peso seco de nódulos (PSN)					
variedad (V)	0.0060	1	0.00603	17.476	0.000
tiempo (t)	0.0107	1	0.01068	30.914	0.000
trat. ABA (A)	0.0295	2	0.01473	42.653	0.000
trat. Sal (S)	0.0058	1	0.00583	16.873	0.000
V x t	0.0000	1	0.00000	0.002	0.964
V x A	0.0246	2	0.01231	35.647	0.000
V x S	0.0023	1	0.00228	6.599	0.011
t x A	0.0001	2	0.00007	0.199	0.820
t x S	0.0004	1	0.00041	1.184	0.279
A x S	0.0092	2	0.00462	13.378	0.000

VxtxA	0.0011	2	0.00053	1.543	0.218
VxtxS	0.0006	1	0.00059	1.707	0.194
VxAxS	0.0018	2	0.00089	2.565	0.081
txAxS	0.0004	2	0.00021	0.618	0.541
VxtxAxS	0.0001	2	0.00004	0.105	0.900
Error	0.0414	120	0.00005		
Total	0.1340	143			

d) Actividad nitrogenasa (ARA)

variedad (V)	9616	1	9616	13.87	0.000
tiempo (t)	15392	1	15392	22.19	0.000
trat. ABA (A)	14051	2	7026	10.13	0.000
trat. Sal (S)	27249	1	27249	39.29	0.000
Vxt	16490	1	16490	23.78	0.000
VxA	18557	2	9278	13.38	0.000
VxS	1416	1	1416	2.04	0.156
txA	21412	2	10706	15.44	0.000
txS	894	1	894	1.29	0.259
AxS	32190	2	16095	23.21	0.000
VxtxA	23606	2	11803	17.02	0.000
VxtxS	40	1	40	0.06	0.812
VxAxS	8902	2	4451	6.42	0.002
txAxS	595	2	298	0.43	0.652
VxtxAxS	1260	2	630	0.91	0.406
Error	83222	120	694		
Total	274894	143			

e) ARA total por planta (ARAP)

variedad (V)	41.07	1	41.07	10.58	0.002
tiempo (t)	11.49	1	11.49	2.96	0.088
trat. ABA (A)	505.14	2	252.57	65.09	0.000
trat. Sal (S)	320.87	1	320.87	82.69	0.000
Vxt	24.56	1	24.56	6.33	0.013
VxA	10.62	2	5.31	1.37	0.258
VxS	16.34	1	16.34	4.21	0.042
txA	54.42	2	27.21	7.01	0.001
txS	27.37	1	27.37	7.05	0.009
AxS	401.24	2	200.62	51.70	0.000
VxtxA	46.66	2	23.33	6.01	0.003
VxtxS	4.98	1	4.98	1.28	0.260
VxAxS	47.95	2	23.98	6.18	0.003
txAxS	15.76	2	7.88	2.03	0.136
VxtxAxS	15.99	2	8.00	2.06	0.132
Error	465.66	120	3.88		
Total	2010.14	143			

Tabla A 6.26. Análisis de la varianza correspondientes a la actividad glutamina sintetasa, glutamato sintasa, xantina deshidrogenasa y uricasa en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con ABA y NaCl.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Glutamina sintetasa (GS)					
variedad (V)	6162	1	6162	35.63	0.000
tiempo (t)	410	1	410	2.37	0.128
trat. ABA (A)	336860	2	168430	973.90	0.000
trat. Sal (S)	88109	1	88109	509.47	0.000
V x t	492	1	492	2.85	0.096
V x A	148752	2	74376	430.06	0.000
V x S	5065	1	5065	29.29	0.000
t x A	11619	2	5810	33.59	0.000
t x S	19661	1	19661	113.69	0.000
A x S	35086	2	17543	101.44	0.000
V x t x A	6199	2	3100	17.92	0.000
V x t x S	7837	1	7837	45.32	0.000
V x A x S	5874	2	2937	16.98	0.000
t x A x S	37231	2	18616	107.64	0.000
V x t x A x S	66869	2	33435	193.33	0.000
Error	12452	72	173		
Total	788681	95			
b) Glutamato sintasa (GOGAT)					
variedad (V)	626.01	1	626.01	125.58	0.000
tiempo (t)	81.85	1	81.85	16.42	0.000
trat. ABA (A)	1240.71	2	620.36	124.44	0.000
trat. Sal (S)	882.29	1	882.29	176.99	0.000
V x t	7.89	1	7.89	1.58	0.212
V x A	427.53	2	213.77	42.88	0.000
V x S	115.53	1	115.53	23.18	0.000
t x A	521.72	2	260.86	52.33	0.000
t x S	0.07	1	0.07	0.01	0.910
A x S	649.73	2	324.87	65.17	0.000
V x t x A	680.71	2	340.35	68.28	0.000
V x t x S	73.53	1	73.53	14.75	0.000
V x A x S	194.19	2	97.09	19.48	0.000
t x A x S	275.14	2	137.57	27.60	0.000
V x t x A x S	594.44	2	297.22	59.62	0.000
Error	358.92	72	4.99		
Total	6730.27	95			
c) Xantina deshidrogenasa (XDH)					
variedad (V)	142.85	1	142.85	721.04	0.000
tiempo (t)	42.99	1	42.99	217.00	0.000
trat. ABA (A)	488.11	2	244.06	1231.86	0.000
trat. Sal (S)	175.61	1	175.61	886.36	0.000
V x t	15.35	1	15.35	77.50	0.000
V x A	144.28	2	72.14	364.12	0.000
V x S	1.85	1	1.85	9.32	0.003
t x A	5.54	2	2.77	13.99	0.000
t x S	78.86	1	78.86	398.05	0.000
A x S	86.18	2	43.09	217.49	0.000
V x t x A	8.83	2	4.42	22.29	0.000
V x t x S	0.28	1	0.28	1.43	0.236

V x A x S	54.38	2	27.19	137.24	0.000
t x A x S	25.03	2	12.52	63.17	0.000
V x t x A x S	23.13	2	11.57	58.37	0.000
Error	14.26	72	0.20		
Total	1307.55	95			
d) Uricasa					
variedad (V)	45680	1	45680	719.7	0.000
tiempo (t)	0	1	0	0.0	0.990
trat. ABA (A)	40369	2	20184	318.0	0.000
trat. Sal (S)	4167	1	4167	65.7	0.000
V x t	1026	1	1026	16.2	0.000
V x A	36642	2	18321	288.7	0.000
V x S	15	1	15	0.2	0.630
t x A	309	2	155	2.4	0.095
t x S	807	1	807	12.7	0.001
A x S	767	2	384	6.0	0.004
V x t x A	1721	2	860	13.6	0.000
V x t x S	111	1	111	1.8	0.190
V x A x S	4737	2	2369	37.3	0.000
t x A x S	453	2	227	3.6	0.033
V x t x A x S	2677	2	1338	21.1	0.000
Error	4570	72	63		
Total	144051	95			

Tabla A 6.27. Análisis de la varianza correspondientes al contenido de prolina y ureidos en nódulos y el contenido de prolina y azúcares totales solubles en hojas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, tratadas con ABA y NaCl.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Prolina en nódulos					
variedad (V)	3535	1	3535	211.58	0.000
tiempo (t)	470	1	470	28.12	0.000
trat. ABA (A)	19061	2	9530	570.35	0.000
trat. Sal (S)	2939	1	2939	175.87	0.000
V x t	44	1	44	2.61	0.111
V x A	121	2	60	3.61	0.032
V x S	33	1	33	1.99	0.163
t x A	2262	2	1131	67.69	0.000
t x S	616	1	616	36.87	0.000
A x S	513	2	257	15.36	0.000
V x t x A	1613	2	806	48.26	0.000
V x t x S	130	1	130	7.81	0.007
V x A x S	7549	2	3775	225.89	0.000
t x A x S	2692	2	1346	80.56	0.000
V x t x A x S	902	2	451	26.98	0.000
Error	1203	72	17		
Total	43684	95			
b) Ureidos en nódulos					
variedad (V)	50.102	1	50.102	5090.07	0.000
tiempo (t)	3.041	1	3.041	308.93	0.000
trat. ABA (A)	1.637	2	0.819	83.17	0.000
trat. Sal (S)	5.872	1	5.872	596.61	0.000

Vxt	0.846	1	0.846	85.91	0.000
VxA	0.665	2	0.332	33.77	0.000
VxS	6.255	1	6.255	635.45	0.000
txA	1.177	2	0.588	59.78	0.000
txS	4.192	1	4.192	425.84	0.000
AxS	1.934	2	0.967	98.26	0.000
VxtxA	0.732	2	0.366	37.20	0.000
VxtxS	2.758	1	2.758	280.22	0.000
VxAxS	2.357	2	1.179	119.75	0.000
txAxS	0.395	2	0.197	20.05	0.000
VxtxAxS	0.185	2	0.092	9.38	0.000
Error	0.709	72	0.010		
Total	82.856	95			

c) Prolina en hojas

variedad (V)	1563.64	1	1563.64	474.03	0.000
tiempo (t)	3.65	1	3.65	1.11	0.297
trat. ABA (A)	873.91	2	436.95	132.47	0.000
trat. Sal (S)	3239.34	1	3239.34	982.02	0.000
Vxt	126.65	1	126.65	38.39	0.000
VxA	177.90	2	88.95	26.97	0.000
VxS	20.94	1	20.94	6.35	0.014
txA	116.34	2	58.17	17.64	0.000
txS	69.49	1	69.49	21.07	0.000
AxS	1346.97	2	673.48	204.17	0.000
VxtxA	47.72	2	23.86	7.23	0.001
VxtxS	64.11	1	64.11	19.43	0.000
VxAxS	57.84	2	28.92	8.77	0.000
txAxS	99.99	2	49.99	15.16	0.000
VxtxAxS	3.27	2	1.63	0.50	0.612
Error	237.50	72	3.30		
Total	8049.24	95			

d) Azúcares en hojas

variedad (V)	4526682	1	4526682	336	0.000
tiempo (t)	1746208	1	1746208	129	0.000
trat. ABA (A)	1334737	2	667369	49	0.000
trat. Sal (S)	3399434	1	3399434	252	0.000
Vxt	3131535	1	3131535	232	0.000
VxA	2537789	2	1268894	94	0.000
VxS	3086819	1	3086819	229	0.000
txA	1261344	2	630672	47	0.000
txS	217038	1	217038	16	0.000
AxS	431167	2	215583	16	0.000
VxtxA	1244831	2	622415	46	0.000
VxtxS	1763089	1	1763089	131	0.000
VxAxS	1975879	2	987939	73	0.000
txAxS	502155	2	251077	19	0.000
VxtxAxS	1519413	2	759707	56	0.000
Error	971420	72	13492		
Total	29649537	95			

7. Nutrición mineral.

7.1. Efecto del nitrato sobre el Contenido de macronutrientes en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa.

Tabla A 7.1. Contenido de N, Ca, Mg y K en parte aérea y raíz expresado en porcentaje de peso seco, en plantas de *Phaseolus vulgaris* var Africa en simbiosis con *Rhizobium tropici* CIAT899, durante el desarrollo del cultivo y con cinco dosis de KNO₃.

Parte aérea					Raíz				
KNO ₃	Días de cultivo				KNO ₃	Días de cultivo			
	18	28	34	40		18	28	34	40
N					N				
0	3.10	3.70	3.41	3.05	0	2.18	1.94	1.97	1.87
1	2.64	3.69	3.47	3.02	1	2.03	2.08	2.16	1.90
2	2.62	3.73	3.09	2.82	2	2.14	2.28	2.10	2.43
5	3.57	3.12	3.04	2.85	5	2.48	2.30	2.27	2.27
10	3.70	3.46	3.11	2.84	10	2.67	1.99	2.19	2.06
MDS (0.05) 0.18					MDS(0.05) 0.14				
Ca					Ca				
0	0.46	0.63	0.65	0.71	0	0.39	0.37	0.58	0.52
1	0.56	0.68	0.67	0.83	1	0.46	0.35	0.56	0.61
2	0.57	0.69	0.82	0.84	2	0.59	0.41	0.65	0.61
5	0.57	0.69	0.86	0.86	5	0.44	0.54	0.60	0.73
10	0.70	0.72	0.73	0.77	10	0.50	0.50	0.62	0.90
MDS (0.05) 0.06					MDS(0.05) 0.09				
Mg					Mg				
0	0.51	0.60	0.42	0.34	0	0.39	0.35	0.49	0.48
1	0.54	0.64	0.37	0.34	1	0.46	0.35	0.56	0.43
2	0.68	0.77	0.42	0.39	2	0.45	0.40	0.45	0.55
5	0.77	0.57	0.47	0.38	5	0.46	0.49	0.43	0.47
10	0.94	0.53	0.44	0.39	10	0.63	0.44	0.70	0.61
MDS (0.05) 0.08					MDS (0.05) 0.12				
K					K				
0	3.47	3.47	3.46	3.23	0	4.80	4.28	4.99	4.57
1	3.31	3.26	3.47	3.14	1	4.42	4.89	4.58	4.40
2	4.03	3.67	3.73	3.24	2	4.76	4.86	5.09	5.63
5	4.16	3.28	3.42	4.19	5	5.40	5.33	5.04	4.60
10	5.28	5.19	3.61	5.30	10	5.44	4.03	5.25	3.92
MDS (0.05) 0.30					MDS (0.05) 0.73				

Tabla A 7.2. Análisis de la varianza correspondientes al contenido de N, Ca, Mg y K en parte aérea, en porcentaje de peso seco, en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, a lo largo del cultivo con cinco dosis de KNO₃.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Nitrógeno (N%)					
tiempo (t)	3.057	3	1.019	81.0	0.000
trat. (T)	0.489	4	0.122	9.7	0.000
t x T	4.011	12	0.334	26.6	0.000
Error	0.503	40	0.012		
Total	8.061	59			
b) Calcio (Ca%)					
tiempo (t)	0.432	3	0.144	101.5	0.000
trat. (T)	0.145	4	0.036	25.5	0.000
t x T	0.103	12	0.008	6.0	0.000
Error	0.057	40	0.001		
Total	0.737	59			
c) Magnesio (Mg%)					
tiempo (t)	1.060	3	0.353	168.3	0.000
trat. (T)	0.122	4	0.030	14.5	0.000
t x T	0.368	12	0.031	16.6	0.000
Error	0.084	40	0.002		
Total	1.635	59			
d) Potasio (K%)					
tiempo (t)	0.69	3	0.232	7.2	0.001
trat. (T)	33.29	4	8.321	258.5	0.000
t x T	2.93	12	0.244	7.6	0.000
Error	1.29	40	0.032		
Total	38.20	59			

Tabla A 7.3. Análisis de la varianza correspondientes al contenido de N, Ca, Mg y K en raíz, en porcentaje de peso seco, en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, a lo largo del cultivo con cinco dosis de KNO₃.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Nitrógeno (N%,)					
tiempo (t)	0.379	3	0.126	17.0	0.000
trat. (T)	0.987	4	0.247	33.1	0.000
t x T	1.032	12	0.086	11.5	0.000
Error	0.298	40	0.007		
Total		59			
b) Calcio (Ca%,)					
tiempo (t)	0.556	3	0.185	67.2	0.000
trat. (T)	0.216	4	0.054	19.6	0.000
t x T	0.213	12	0.018	6.4	0.000
Error	0.110	40	0.003		
Total	1.096	59			
c) Magnesio (Mg%,)					
tiempo (t)	0.127	3	0.042	8.3	0.000
trat. (T)	0.204	4	0.051	10.0	0.000
t x T	0.134	12	0.011	2.2	0.031
Error	0.204	40	0.005		
Total	0.669	59			
d) Potasio (K%,)					
tiempo (t)	1.61	3	0.539	2.72	0.057
trat. (T)	3.08	4	0.772	3.90	0.009
t x T	7.91	12	0.659	3.33	0.002
Error	7.91	40	0.198		
Total	20.53	59			

Tabla A 7.4. Contenido de N, Ca, Mg y K en parte aérea y raíz expresado en mg planta⁻¹, en plantas de *Phaseolus vulgaris* var Africa en simbiosis con *Rhizobium tropici* CIAT899, durante el desarrollo del cultivo y con cinco dosis de nitrato KNO₃.

Parte aérea					Raíz				
KNO ₃	Días de cultivo				KNO ₃	Días de cultivo			
	18	28	34	40		18	28	34	40
	N					N			
0	20.5	80.4	92.2	104.5	0	6.8	8.3	10.0	10.6
1	31.4	83.3	105.8	124.4	1	7.3	10.2	13.8	13.8
2	28.8	86.6	100.9	136.9	2	7.7	12.1	13.0	21.1
5	38.2	103.1	146.8	185.6	5	11.2	18.2	22.0	25.5
10	49.2	148.4	177.5	218.9	10	14.4	17.7	24.0	25.3
	MDS (0.05) 6.4					MDS(0.05) 1.2			
	Ca					Ca			
0	3.0	13.7	17.5	24.5	0	1.21	1.60	2.94	2.96
1	6.7	15.4	20.4	34.0	1	1.66	1.70	3.58	4.43
2	6.3	16.1	26.7	40.9	2	2.12	2.17	4.03	5.31
5	6.1	22.9	41.5	56.1	5	1.98	4.24	5.82	8.21
10	9.3	30.9	41.6	59.4	10	2.70	4.48	6.82	11.11
	MDS (0.05) 2.5					MDS(0.05) 0.69			
	Mg					Mg			
0	3.4	13.1	11.4	11.8	0	1.22	1.50	2.52	2.74
1	6.4	14.5	11.3	13.9	1	1.66	1.70	3.58	3.14
2	7.5	17.8	13.8	18.7	2	1.62	2.10	2.81	4.76
5	8.2	18.9	22.9	24.8	5	2.07	3.90	4.14	5.30
10	12.5	22.6	24.9	30.3	10	3.38	3.92	7.66	7.50
	MDS (0.05) 1.6					MDS (0.05) 0.89			
	K					K			
0	22.9	75.3	93.3	110.7	0	14.9	18.4	25.4	26.1
1	39.4	73.6	105.8	129.4	1	15.9	23.9	29.3	32.1
2	44.4	85.1	121.9	157.1	2	17.1	25.7	31.6	48.9
5	44.5	108.3	165.3	273.4	5	24.3	42.1	48.8	51.5
10	70.2	222.8	319.8	408.6	10	29.4	35.9	57.7	48.2
	MDS (0.05) 16.0					MDS (0.05) 4.1			

Tabla A 7.5. Análisis de la varianza correspondientes al contenido de N, Ca, Mg y K en parte aérea, en mg planta⁻¹, en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, a lo largo del cultivo con cinco dosis de KNO₃.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Nitrógeno (N)					
tiempo (t)	118508	3	39503	2670	0.000
trat. (T)	43510	4	10877	735	0.000
t x T	9745	12	812	55	0.000
Error	592	40	15		
Total	172354	59			
b) Calcio (Ca)					
tiempo (t)	10804	3	3601.4	1620	0.000
trat. (T)	3565	4	891.2	401	0.000
t x T	1283	12	106.9	48	0.000
Error	89	40	2.2		
Total	15741	59			
c) Magnesio (Mg)					
tiempo (t)	1308	3	435.9	438	0.000
trat. (T)	1298	4	324.6	326	0.000
t x T	220	12	18.3	18	0.000
Error	40	40	1.0		
Total	2865	59			
d) Potasio (K)					
tiempo (t)	238955	3	79652	853	0.000
trat. (T)	258665	4	64666	692	0.000
t x T	82798	12	6900	74	0.000
Error	3736	40	93		
Total	584154	59			

Tabla A 7.6. Análisis de la varianza correspondientes al contenido de N, Ca, Mg y K en raíz, en mg planta⁻¹, en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, a lo largo del cultivo con cinco dosis de KNO₃.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Nitrógeno (N_r)					
tiempo (t)	808	3	269.2	490	0.000
trat. (T)	1184	4	296.0	539	0.000
t x T	173	12	14.3	26	0.000
Error	22	40	0.6		
Total	2186	59			
b) Calcio (Ca_r)					
tiempo (t)	176	3	59.0	334	0.000
trat. (T)	135	4	33.9	192	0.000
t x T	50	12	4.2	23	0.000
Error	7	40	0.2		
Total	370	59			
c) Magnesio (Mg_r)					
tiempo (t)	71	3	23.9	82.6	0.000
trat. (T)	98	4	24.5	84.7	0.000
t x T	21	12	1.8	6.3	0.000
Error	11	40	0.3		
Total	203	59			
d) Potasio (K_r)					
tiempo (t)	4119	3	1372.9	224	0.000
trat. (T)	4478	4	1119.6	182	0.000
t x T	1022	12	85.2	14	0.000
Error	246	40	6.1		
Total	9865	59			

7.2. Efecto del NaCl aplicado en el periodo vegetativo sobre el contenido de macronutrientes en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa.

Tabla A 7.7. Concentración de N, P, K, Ca, Mg y Na como porcentaje de peso seco en parte aérea y raíz de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa en simbiosis con *Rhizobium tropici* CIAT899 tratadas con cuatro dosis de NaCl el periodo vegetativo (DdT: días después del tratamiento).

Parte aérea					Raíz				
DdT	NaCl				DdT	NaCl			
	0	25	50	100		0	25	50	100
N					N				
3	2.30	2.22	2.45	2.08	3	2.02	1.98	2.01	2.06
6	2.27	2.54	2.46	2.07	6	1.90	1.95	1.90	1.87
9	2.49	2.58	2.21	2.20	9	1.93	1.95	1.98	1.95
12	2.26	2.49	1.93	2.44	12	2.03	1.90	1.87	1.90
MDS (0.05) 0.13					MDS(0.05) 0.09				
P					P				
3	0.46	0.42	0.49	0.38	3	1.21	1.14	1.05	1.19
6	0.41	0.44	0.50	0.41	6	1.27	1.10	1.13	1.10
9	0.42	0.46	0.48	0.46	9	1.15	1.08	1.15	1.08
12	0.48	0.40	0.43	0.47	12	0.60	1.16	1.17	1.16
MDS (0.05) 0.04					MDS(0.05) 0.05				
K					K				
3	3.99	4.18	4.58	4.15	3	4.63	4.36	3.70	3.59
6	3.86	4.23	4.58	4.15	6	4.79	3.40	2.76	2.82
9	3.72	4.36	4.55	4.39	9	4.74	3.46	2.79	2.50
12	3.70	4.04	4.60	4.63	12	4.84	3.67	2.26	1.94
MDS (0.05) 0.24					MDS (0.05) 0.34				
Ca					Ca				
3	0.77	0.71	0.78	0.67	3	1.04	0.93	0.80	0.86
6	0.78	0.75	0.83	0.72	6	1.03	0.93	0.88	0.86
9	0.79	0.79	0.79	0.77	9	1.09	1.03	0.81	0.72
12	0.83	0.77	0.82	0.77	12	0.92	0.89	0.76	0.75
MDS (0.05) 0.06					MDS(0.05) 0.07				
Mg					Mg				
3	0.58	0.55	0.60	0.53	3	1.47	1.73	1.58	1.43
6	0.56	0.56	0.61	0.54	6	1.63	1.47	1.27	1.52
9	0.48	0.65	0.63	0.61	9	1.50	1.73	1.38	1.58
12	0.50	0.50	0.63	0.63	12	1.68	1.43	1.37	1.45
MDS (0.05) 0.03					MDS(0.05) 0.11				
Na					Na				
3	0.027	0.023	0.059	0.613	3	0.39	1.70	2.80	3.35
6	0.013	0.022	0.133	1.233	6	0.32	2.23	3.62	4.09
9	0.003	0.047	0.393	1.497	9	0.34	2.98	4.51	5.09
12	0.034	0.050	0.483	1.033	12	0.21	2.23	4.97	5.96
MDS (0.05) 0.032					MDS (0.05) 0.21				

Tabla A 7.8. Análisis de la varianza correspondientes al contenido en N, P, K, Ca, Mg y Na, en porcentaje de peso seco, en parte aérea de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899 tratadas con cuatro dosis de sal en el periodo vegetativo.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Nitrógeno (N%)					
tiempo (t)	0.082	3	0.027	4.703	0.008
trat. (T)	0.434	3	0.144	24.784	0.000
t x T	1.078	9	0.119	20.490	0.000
Error	0.187	32	0.006		
Total	1.782	47			
b) Fósforo (P%)					
tiempo (t)	0.0015	3	0.0005	0.666	0.579
trat. (T)	0.0172	3	0.0057	7.639	0.000
t x T	0.0408	9	0.0045	6.017	0.000
Error	0.0241	32	7.5406E-4		
Total	0.0837	47			
c) Potasio (K%)					
tiempo (t)	0.020	3	0.006	0.308	0.819
trat. (T)	3.621	3	1.206	56.929	0.000
t x T	0.782	9	0.021	4.099	0.001
Error	0.678	32			
Total		47			
d) Calcio (Ca%)					
tiempo (t)	0.027	3	0.0090	6.198	0.002
trat. (T)	0.041	3	0.0138	1.134	0.000
t x T	0.015	9	0.0016	0.368	0.000
Error	0.047	32	0.0014		
Total	0.130	47			
e) Magnesio (Mg%)					
tiempo (t)	0.0063	3	0.0021	5.176	0.005
trat. (T)	0.0460	3	0.0153	57.379	0.000
t x T	0.0746	9	0.0082	20.201	0.000
Error	0.0131	32	4.1042E-4		
Total	0.1401	47			
f) Sodio (Na%)					
tiempo (t)	0.591	3	0.197	524.9	0.000
trat. (T)	9.223	3	3.074	8183.2	0.000
t x T	1.032	9	0.114	305.2	0.000
Error	0.012	32	3.756E-4		
Total	10.858	47			

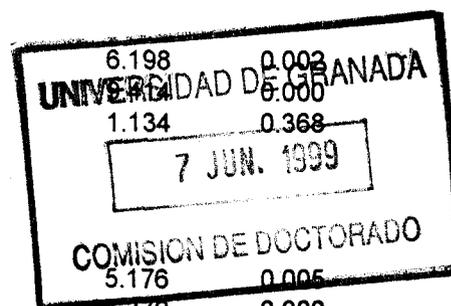


Tabla A 7.9. Análisis de la varianza correspondientes al contenido en N, P, K, Ca, Mg y Na, en porcentaje de peso seco, en raíz de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. África inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899 tratadas con cuatro dosis de sal en el periodo vegetativo.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Nitrógeno (N%,)					
tiempo (t)	0.082	3	0.0275	8.68	0.000
trat. (T)	0.006	3	0.0021	0.65	0.585
t x T	0.065	9	0.0072	2.28	0.041
Error	0.101	32	0.0032		
Total	0.255	47			
b) Fósforo (P%,)					
tiempo (t)	0.125	3	0.0417	50.19	0.000
trat. (T)	0.041	3	0.0139	16.65	0.000
t x T	0.785	9	0.0872	104.76	0.000
Error	0.027	32	8.322E-4		
Total	0.978	47			
c) Potasio (K%,)					
tiempo (t)	5.39	3	1.798	43.42	0.000
trat. (T)	31.52	3	10.504	253.62	0.000
t x T	3.95	9	0.439	10.61	0.000
Error	1.32	32	0.041		
Total	42.19	47			
d) Calcio (Ca%,)					
tiempo (t)	0.068	3	0.0227	12.62	0.000
trat. (T)	0.407	3	0.1357	75.33	0.000
t x T	0.081	9	0.0090	4.98	0.000
Error	0.058	32	0.0018		
Total	0.614	47			
e) Magnesio (Mg%,)					
tiempo (t)	0.068	3	0.0226	5.17	0.000
trat. (T)	0.269	3	0.0898	20.52	0.000
t x T	0.470	9	0.0522	11.92	0.000
Error	0.140	32	0.0044		
Total	0.947	47			
f) Sodio (Na%,)					
tiempo (t)	13.05	3	4.35	278.8	0.000
trat. (T)	133.7	3	44.57	2856.8	0.000
t x T	9.62	9	1.07	68.5	0.000
Error	0.50	32	0.02		
Total	156.91	47			

Tabla A 7.10. Concentración de N, P y K, Ca, Mg y Na en mg planta⁻¹ en parte aérea y raíz de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa en simbiosis con *Rhizobium tropici* CIAT899 tratadas con cuatro dosis de NaCl en el periodo vegetativo (DdT: días después del tratamiento).

Parte aérea					Raíz				
DdT	NaCl				DdT	NaCl			
	0	25	50	100		0	25	50	100
N					N				
3	32.7	31.1	33.2	27.7	3	9.23	8.30	8.89	9.58
6	40.7	40.0	41.6	33.5	6	8.78	7.62	9.27	10.06
9	56.1	47.7	38.2	34.1	9	9.42	8.55	9.62	9.47
12	62.6	58.7	40.5	44.8	12	12.30	11.84	9.37	11.06
MDS (0.05) 3.04					MDS(0.05) 0.49				
P					P				
3	6.57	5.94	6.69	5.08	3	5.51	4.79	4.64	5.55
6	7.39	6.89	8.56	6.58	6	5.87	4.29	5.50	5.91
9	9.50	8.48	8.27	7.11	9	5.64	4.74	5.57	5.22
12	13.41	9.53	9.01	8.71	12	3.65	7.20	5.85	6.77
MDS (0.05) 0.87					MDS(0.05) 0.23				
K					K				
3	56.6	58.3	62.0	55.4	3	21.2	18.3	16.4	16.7
6	69.3	66.7	77.5	67.1	6	22.1	13.3	13.5	15.1
9	84.0	80.8	78.8	68.1	9	23.2	15.1	13.5	12.1
12	102.3	95.4	96.5	85.0	12	29.3	22.9	11.3	11.2
MDS (0.05) 4.16					MDS (0.05) 1.66				
Ca					Ca				
3	10.9	9.9	10.6	9.0	3	4.75	3.91	3.56	3.98
6	14.0	11.9	14.1	11.6	6	4.74	3.63	4.31	4.64
9	17.8	14.7	13.7	11.9	9	5.31	4.53	3.95	3.49
12	23.1	18.1	17.1	14.1	12	5.59	5.52	3.82	4.34
MDS (0.05) 1.2					MDS(0.05) 0.35				
Mg					Mg				
3	8.28	7.68	8.08	7.11	3	6.70	7.26	7.01	6.66
6	10.06	8.89	10.33	8.83	6	7.55	5.72	6.18	8.14
9	10.83	12.04	10.90	9.47	9	7.33	7.58	6.72	7.68
12	13.75	11.80	13.20	11.57	12	10.18	8.93	6.83	8.44
MDS (0.05) 0.63					MDS(0.05) 0.57				
Na					Na				
3	0.39	0.32	0.80	8.18	3	1.77	7.12	12.40	15.56
6	0.23	0.35	2.26	19.93	6	1.46	8.69	17.66	21.98
9	0.07	0.86	6.81	23.23	9	1.68	13.07	21.92	24.69
12	0.95	1.19	10.13	18.97	12	1.29	13.89	24.85	34.71
MDS (0.05) 0.57					MDS (0.05) 1.11				

Tabla A 7.11. Análisis de la varianza correspondientes al contenido en N, P, K, Ca, Mg y Na, en mg planta⁻¹, en parte aérea de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899 tratadas con cuatro dosis de sal en el periodo vegetativo.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Nitrógeno (N)					
tiempo (t)	2679	3	892.9	268	0.000
trat. (T)	1226	3	408.7	123	0.000
t x T	846	9	94.0	28	0.000
Error	107	32	3.3		
Total	4858	47			
b) Fósforo (P)					
tiempo (t)	107.4	3	35.8	130	0.000
trat. (T)	34.3	3	11.4	41	0.000
t x T	29.1	9	3.2	12	0.000
Error	8.8	32	0.3		
Total	179.6	47			
c) Potasio (K)					
tiempo (t)	8527	3	2842.3	454	0.000
trat. (T)	721	3	240.3	38	0.000
t x T	473	9	52.6	8	0.000
Error	200	32	6.3		
Total	9922	47			
d) Calcio (Ca)					
tiempo (t)	402	3	134.1	262	0.000
trat. (T)	139	3	46.4	91	0.000
t x T	63	9	7.0	14	0.000
Error	16	32	0.5		
Total	621	47			
e) Magnesio (Mg)					
tiempo (t)	148.0	3	49.3	340	0.000
trat. (T)	17.2	3	5.7	40	0.000
t x T	11.3	9	1.3	9	0.000
Error	4.6	32	0.1		
Total	181.1	47			
f) Sodio (Na)					
tiempo (t)	230	3	76.7	641	0.000
trat. (T)	2334	3	778.1	6504	0.000
t x T	320	9	35.6	297	0.000
Error	4	32	0.1		
Total	2888	47			

Tabla A 7.12. Análisis de la varianza correspondientes al contenido en N, P, K, Ca, Mg y Na, en mg planta⁻¹, en raíz de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899 tratadas con cuatro dosis de sal en el periodo vegetativo.

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Nitrógeno (N_r)					
tiempo (t)	39.5	3	13.2	153	0.000
trat. (T)	8.1	3	2.7	31	0.000
t x T	21.0	9	2.3	27	0.000
Error	2.8	32	0.1		
Total	71.4	47			
b) Fósforo (P_r)					
tiempo (t)	3.7	3	1.2	64	0.000
trat. (T)	3.4	3	1.1	59	0.000
t x T	27.8	9	3.1	160	0.000
Error	0.6	32	0.0		
Total	35.5	47			
c) Potasio (K_r)					
tiempo (t)	71	3	23.8	24	0.000
trat. (T)	834	3	277.9	278	0.000
t x T	305	9	33.9	34	0.000
Error	32	32	1.0		
Total	1242	47			
d) Calcio (Ca_r)					
tiempo (t)	3.7	3	1.2	28	0.000
trat. (T)	9.7	3	3.2	75	0.000
t x T	7.3	9	0.8	19	0.000
Error	1.4	32	0.0		
Total	22.1	47			
e) Magnesio (Mg_r)					
tiempo (t)	23.1	3	7.7	66	0.000
trat. (T)	10.9	3	3.6	31	0.000
t x T	20.4	9	2.3	19	0.000
Error	3.7	32	0.1		
Total	58.1	47			
f) Sodio (Na_r)					
tiempo (t)	588	3	196.1	441	0.000
trat. (T)	3573	3	1191.1	2679	0.000
t x T	344	9	38.2	86	0.000
Error	14	32	0.4		
Total	4520	47			



Biblioteca Universitaria de Granada



01053003