



Original/Alimentos funcionales

Medicago sativa L: mejora y nuevos aspectos de su valor nutritivo y funcional por coinoculación bacteriana

Rosario Martínez¹, Elena Nebot¹, Jesús María Porres¹, Garyfallia Kapravelou¹, Ana del Moral², Chouhra Talbi³, Eulogio José Bedmar³ y María López-Jurado¹

¹Departamento de Fisiología, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Granada. ²Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Granada. ³Departamento de Microbiología de Suelos y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada, España.

Resumen

Objetivo: estudiar el efecto de la inoculación con *Ensifer meliloti* y *Halomonas maura* sobre el crecimiento y el valor nutricional y funcional de la leguminosa *Medicago sativa* L., cultivada bajo condiciones de salinidad.

Método: las plantas de *M. sativa* se cultivaron con una solución de mezcla de sales CaSO₄, MgCl, NaCl and NaHCO₃ y se coinocularon con su rizobio específico y la bacteria *H. maura*. Se determinaron los parámetros fisiológicos de las plantas, así como el contenido en nitrógeno y minerales, y se llevó a cabo un proceso de digestibilidad *in vitro*.

Resultados: la salinidad ejerció un efecto negativo sobre las plantas; sin embargo, la coinoculación de las mismas incrementó su productividad, el contenido en nitrógeno, minerales totales, Ca y Mg. Además, los parámetros fisiológicos de potencial hídrico y concentración de leghemoglobina se incrementaron. Tanto la salinidad como la coinoculación de las plantas aumentaron la capacidad antioxidante de la leguminosa en los dializados y retenidos obtenidos tras someter a la planta a un proceso de digestibilidad *in vitro*.

Conclusión: la coinoculación con *E. meliloti* y *H. maura* podría mejorar el cultivo de la alfalfa bajo condiciones específicas de salinidad, aumentando su composición nutricional y funcional, pudiendo considerarse en la formulación de suplementos nutricionales para el consumo humano.

(Nutr Hosp. 2015;32:2741-2748)

DOI:10.3305/nh.2015.32.6.9849

Palabras clave: Alfalfa. Estrés salino. Potencial hídrico. Leghemoglobina. Peroxidación lipídica.

MEDICAGO SATIVA L: IMPROVEMENT AND NEW APPROACHES OF ITS NUTRITIONAL AND FUNCTIONAL VALUE BY BACTERIAL CO-INOCULATION

Abstract

Objective: to study the effect of co-inoculation with *Ensifer meliloti* and *Halomonas maura* of the leguminous *Medicago sativa* L., on growth, nutritional and functional value, grown under salinity conditions.

Methods: plants of *M. sativa* were grown in a solution with a mixture of salts (CaSO₄, MgCl, NaCl and NaHCO₃) and were co-inoculated with its specific rhizobium and the halophilic moderated bacterium *H. maura*. Different physiologic parameters were determined, as well as, nitrogen and minerals content. Furthermore, an assay of *in vitro* digestibility was carried out.

Results: salinity had a negative effect on the plants; however, co-inoculation increased yield, nitrogen content, total minerals, Ca and Mg. Moreover, physiologic parameters as water potential and leghemoglobin content in fresh nodules were higher compared to those of plants inoculated only with *E. meliloti*. Both, salinity and bacterial treatment with *E. meliloti* and *H. maura* increased the antioxidant capacity of the legume, in dialyzates and retentates collected after an *in vitro* digestibility assay.

Conclusion: co-inoculation of plants with *E. meliloti* and *H. maura* could improve the alfalfa yield under specific salinity conditions, increasing the nutritional and functional value of the plants. *M. sativa* could be considered in the formulations of nutritional supplements for the human diet.

(Nutr Hosp. 2015;32:2741-2748)

DOI:10.3305/nh.2015.32.6.9849

Key words: Alfalfa. Saline stress. Water potential. Leghemoglobin. Lipid peroxidation.

Correspondencia: Rosario Martínez.
Campus Universitario de la Cartuja, s/n.
CP 18071. Granada, España.
E-mail: rosariomz@ugr.es

Recibido: 1-IX-2015.

Aceptado: 9-X-2015.

Abreviaturas.

PGPR: Rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas.

SMA-SO: Solución mineral artificial, mimetizando suelos salinos Solonchak órtico.

SDW: Peso seco de la parte aérea.

RDW: Peso seco de la raíz.

TY: Medio de cultivo bacteriano de extracto de levadura – triptona.

MY: Medio de cultivo bacteriano de extracto de levadura – malta.

CE: Conductividad eléctrica.

E: Inoculante *E. meliloti*.

EH: Inoculante *E. meliloti* + *H. maura*.

Lb: Leghemoglobina.

Ψ_w: Potencial hídrico.

UCA: Unidad de capacidad antioxidante.

TBARs: Especies reactivas del ácido tiobarbitúrico.

Introducción

La familia Leguminosae (Fabaceae) es una amplia familia que incluye de 17.000 a 19.000 especies de plantas que juegan un importante papel ecológico¹. Son capaces de establecer asociaciones simbióticas con bacterias del suelo del orden Rhizobiales de las Alphaproteobacteria, generalmente conocidas con el nombre de rizobios, otras bacterias Alphaproteobacteria no rizobiales² y Betaproteobacteria del género *Burkholderia*³. Estas bacterias tienen la capacidad de fijar N₂, y debido a esta asociación, las leguminosas pueden crecer en suelos áridos deficientes en nitrógeno, y actuar como plantas pioneras para estabilizar y colonizar suelos, consecuentemente previniendo la erosión y desertificación de los mismos. Además, desde una perspectiva nutricional y funcional, las leguminosas son una importante fuente de proteínas, carbohidratos complejos, vitaminas, minerales y compuestos antioxidantes⁴.

Debido a la posible contaminación de los vegetales con componentes potencialmente dañinos para la salud humana, hay una preocupación creciente dirigida a la búsqueda de alternativas para la sustitución de fertilizantes o sustancias agroquímicas por productos biológicos. Entre ellos, las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas, comúnmente conocidos como PGPR, son una herramienta muy atractiva para este propósito⁵. Estos microorganismos pueden influir sobre el crecimiento de las plantas produciendo compuestos como la fitohormona ácido indol acético, la enzima ACC desaminasa, sideróforos o moléculas quelantes de iones de Fe³⁺. Los microorganismos PGPRs pueden también movilizar nutrientes hacia las plantas o proporcionar nitrógeno a través de la fijación biológica de nitrógeno no simbiótica.

Cerca del 40 % de la superficie terrestre de todo el mundo está categorizada como ecosistemas áridos o semiáridos donde los estreses de tipo abiótico, como

la salinidad o la sequía, limitan extraordinariamente la producción de los cultivos⁶. En la simbiosis leguminosa – rizobio, tanto la planta como la bacteria son sensibles a la salinidad, siendo la relación simbiótica en sí más sensible a la sal o al estrés osmótico que el rizobio en vida libre. La salinidad afecta a los pasos iniciales de la interacción simbiótica, entre ellos, a la colonización de la raíz, la infección del nódulo y el desarrollo del mismo⁷ así como a la actividad fijadora del N₂⁸.

Medicago sativa L. (alfalfa) es una leguminosa forrajera plurianual de una buena calidad y alta productividad, con un alto contenido de proteína cruda (16% a 22%) y que en los últimos años está creciendo su interés para su uso en nutrición humana⁹. Es parcialmente resistente al estrés salino¹⁰ haciendo esta característica que sea de un gran interés agronómico. *Ensifer* (anteriormente *Sinorhizobium*) *meliloti* es el microsimbionte específico de la alfalfa y algunas de sus cepas son capaces de tolerar altas concentraciones de NaCl.

Halomonas maura es una bacteria halófila moderada que fue aislada por primera vez en una salina de Asilah, en Marruecos¹¹, esta bacteria tiene la capacidad de excretar grandes cantidades de un exopolisacárido conocido con el nombre de maurano¹² y es capaz de fijar nitrógeno bajo condiciones microanaeróbicas¹³. Todas estas propiedades hacen de *H. maura* una bacteria versátil fisiológicamente con interés tanto ecológico como biotecnológico¹⁴.

Xeric calcigypsid (Solonchak órtico)¹⁵ son suelos salinos, áridos, poco fértiles y normalmente incultivables que en España se encuentran bien representados en el Sureste¹⁶. En este trabajo, nosotros hemos estudiado el efecto de la co-inoculación de las plantas de alfalfa con *E. meliloti* y *H. maura* cultivándolas con una solución mineral artificial (SMA) mimetizando las condiciones naturales de los suelos solonchak órtico (SO), (SMA-SO) con el objetivo de usar estos tipos de suelos para prácticas agrícolas. Además, se investigaron beneficios potenciales para las plantas debido al alto contenido en sales de la SMA-SO.

Material y método.

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.

Las células de *E. meliloti* cepa 1021 se cultivaron rutinariamente en medio de extracto de levadura – triptona, TY¹⁷. *H. maura* cepa S-30 se cultivó en medio de extracto de levadura – malta, MY suplementado con sales minerales al 7,5% p/v como fue descrito por Quesada *et al.*,¹⁸. Las células crecieron a 30°C. El efecto del estrés osmótico sobre el crecimiento bacteriano se analizó por determinación del número de células viables después del crecimiento de ambas cepas en medio TY y MY suplementado con 0, 25, 50, 100, 200, 300 y 400 mM de NaCl. La viabilidad de las células después de 96 h de crecimiento fue determinado mediante un ensayo de conteo en placa.

Condiciones de cultivo de las plantas.

Las semillas de alfalfa (*M. sativa* L. var. Aragón) se esterilizaron en superficie mediante inmersión en una solución de HgCl₂ al 2,5% durante 9 min, las semillas se lavaron con agua estéril y se mantuvieron en remojo con agua estéril durante 2 h. Después se colocaron en placas Petri, sobre una solución de agar – agua al 1% p/v y se dejaron germinar en oscuridad a 30°C. Tres días después, se seleccionaron plántulas uniformes y se plantaron en jarras tipo Leonard autoclavadas¹⁹ que contenían vermiculita y una solución de riego libre de nitrógeno²⁰. Para mimetizar las condiciones de los suelos SO, la solución libre de nitrógeno fue suplementada con una mezcla de sales de CaSO₄, NaCl, MgCl₂·6H₂O y NaHCO₃ para alcanzar la fuerza iónica final de 50 y 100 mM (Tabla I). La conductividad eléctrica (CE) de la solución de riego SMA-SO fue determinada con un conductímetro que tenía una célula de conductividad G-0,5 × 2 (Beckman Instruments, Inc., USA) (Tabla I). Las plántulas (5/jarra) se inocularon en el momento de la plantación con 1 mL de *E. meliloti* (inoculante E) o una mezcla (1:1 ratio, aproximadamente 10⁸ UFC/ mL cada uno) de *E. meliloti* 1021 y *H. maura* S30 (inoculante EH). Las plantas crecieron durante 60 días en condiciones de invernadero con un fotoperiodo de luz/oscuridad de 16/8 h y 25/18 °C. La luz necesaria fue suplementada por luz blanca incandescente Sylvania (500 mmol m⁻² s⁻¹, 400–700 nm) en el ápice de las plantas. La cosecha de las plantas se llevó a cabo cuando éstas se encontraban al 10% de floración en cada uno de los tratamientos.

Parámetros fisiológicos de las plantas.

El potencial hídrico (Ψ_w) se determinó en las primeras hojas de las plantas totalmente expandidas usando una cámara para muestras C52 conectada a un psicómetro HR-33T (Wescor, Logan UT, USA). El contenido en leghemoglobina (Lb) de los nódulos de las plantas fue

Tabla I
Concentración de CaSO₄, MgCl₂·6H₂O, NaCl y NaHCO₃ usada para suplementar la solución libre de nitrógeno²⁰ para imitar las condiciones de los suelos tipo Solonchak órtico. La conductividad eléctrica (CE) de las soluciones también se muestra y se expresa como mS/cm

	Concentración de sales		
	0 mM	50 mM	100 mM
CaSO ₄ (g/L)	-	1,24	2,15
MgCl ₂ ·6H ₂ O (g/L)	-	0,826	1,5
NaCl (g/L)	-	0,76	1,29
NaHCO ₃ (g/L)	-	0,70	1,22
CE (mS/cm)	0,57	4,10	6,49

medido tal y como fue descrito por Talbi *et al.*²¹. El peso seco de las plantas (tanto la parte aérea como la raíz) se determinó después de secar el material fresco de las plantas en estufa a 60 °C durante 48 h. El contenido en N de la parte aérea de las plantas se determinó por el método de Kjeldahl. Los minerales totales de la parte aérea de las plantas de alfalfa se obtuvieron tras la calcinación del material seco en una mufla a 450°C, después se disolvieron en HCl 6 N y se usaron para el análisis del contenido en minerales. El contenido en Ca, Mg y Zn se determinó por espectrofotometría de absorción atómica utilizando un espectrofotómetro Perkin-Elmer AAnalyst 300. El Na se midió por espectrofotometría de emisión atómica usando el mismo equipo. Para la determinación de Mg y Na, se añadió cloruro de lantano a las muestras para prevenir cualquier posible interferencia con los iones fosfatos. El fósforo fue determinado espectrofotométricamente de acuerdo al método de Chen *et al.*²².

Ensayos biológicos in vitro de las plantas de alfalfa.

Para determinar la capacidad antioxidante de las plantas de alfalfa cultivadas bajo condiciones de salinidad se llevó a cabo el método *in vitro* de Miller *et al.*,²³ con modificaciones²⁴. Esencialmente, las muestras de la parte aérea de las plantas de alfalfa (0,4 g) se digirieron durante 2 h en un vial de digestión de 50 mL a 37°C en un baño de agua con agitación. Las mezclas de digestión contenían 1 mL de solución de pepsina y 5 mL de una mezcla de sales biliares y pancreatina. Retenidos y dializados se obtuvieron después de la dialización de los viales de digestión contra una bolsa de diálisis que contenían 10 mL de agua bidestilada y NaHCO₃.

Ensayo de la peroxidación lipídica y reacción del ácido tiobarbitúrico.

Se prepararon homogeneizados de cerebro de rata de 250 – 300 g de peso que se encontraban bajo un fotoperíodo de luz/oscuridad de 12/12 horas y a 25 °C. Los animales se mantuvieron con acceso libre al alimento y al agua; se anestesiaron con pentobarbital y los cerebros fueron recogidos y homogeneizados usando el método modificado de Oboh *et al.*,²⁵. Brevemente, el cerebro completo fue homogeneizado en tampón frío 1,15% KCl suplementado con 0,1% Triton X-100 y fue centrifugado a 7.000 rpm durante 25 min a 4°C. El sobrenadante fue recogido y se almacenó a -20 °C hasta que se utilizó. Las ratas procedían de la Unidad de Experimentación Animal de la Universidad de Granada. El cuidado y mantenimiento de los animales se realizó siguiendo las guías de la Directiva de la Comunidad Europea²⁶ así como el Comité de Ética para Experimentación Animal de la Universidad de Granada.

Como marcador de peroxidación lipídica, las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) en los

homogeneizados de cerebro se determinaron mediante el método de Ohkawa *et al.*,²⁷ con modificaciones como siguen: se añadieron 100 μL de homogeneizado de cerebro a una mezcla que contenía 100 μL de FeCl_3 5 mM, 100 μL de H_2O_2 1 mM, 1300 μL de KCl 0,15% y finalmente se suplementó con 150 μL de dializado o retenido de alfalfa. Las mezclas de oxidación conteniendo homogeneizado de cerebro, FeCl_3 , H_2O_2 y 1450 μL de KCl 0,15% se utilizaron como controles. Como blanco, la actividad antioxidante se determinó en soluciones de mezclas de digestión utilizadas para los experimentos de dializabilidad mencionados anteriormente. Todas las muestras se incubaron durante 1 h a 37 °C. La reacción de oxidación se paró por adición de 1500 μL de HCl 0,25 N y 15% ácido tricloroacético, ácido dietilentriamino-pentaacético 1,34 mM, 0,5 % butilhidroxitolueno, 300 μL de sodio dodecil sulfato al 8,1% y 300 μL ácido tio-barbitúrico al 3%. Después las muestras se incubaron a 75 °C durante 1 h, se enfriaron a temperatura ambiente y se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 min. Finalmente, los sobrenadantes se recogieron y se midió la absorbancia a 532 nm para detectar la formación de TBARS.

El porcentaje de inhibición se calculó usando la ecuación: % inhibición = $[100 - (100 * (A_1/A_0))]$, donde A_0 es la A_{532} del control y A_1 es A_{532} de las diferentes muestras. Una unidad de capacidad antioxidante (UCA) se define como la cantidad de muestra que es capaz de inhibir el 50% de la formación de TBARS.

Análisis estadístico.

El número total de réplicas es dado en cada tabla. Para cada parámetro, los resultados se analizaron con un análisis de la varianza de dos vías (ANOVA), y diferencias significativas entre medias se analizaron por el test de Duncan, $p < 0,05$. Todos los análisis fueron realizados con el Paquete estadístico para Ciencias Sociales (IBM-SPSS para Windows®, versión 22.0, Amonk, NY).

Resultados

Osmotolerancia de las cepas bacterianas

El número de células viables de la cepa 1021 no fueron significativamente diferentes en ninguna de las concentraciones salinas en las que se cultivaron las bacterias. *H. maura* no fue capaz de crecer por debajo de 45 mM, pero creció bien a 50 y 100 mM (datos no mostrados). La formación de nódulos no se observó cuando las plantas fueron inoculadas solo con *H. maura*.

Parámetros fisiológicos.

Las plantas que fueron inoculadas con el inoculante E (*E. meliloti*) tuvieron valores del peso seco de la parte aérea (SDW) y del peso seco de la raíz (RDW) menores

que aquellas plantas que se trataron con el inoculante EH (*E. meliloti*+*H. maura*) cuando crecieron en ausencia de sales (Tabla II). El crecimiento de las plantas de alfalfa en cualquiera de los tratamientos salinos se vio reducido significativamente tanto en su SDW como en el RDW independientemente del inoculante bacteriano utilizado (Tabla II). En la concentración de sales 50 mM, el SDW de las plantas que fueron inoculadas con el inoculante EH fue significativamente superior al de aquellas plantas que crecieron en la misma concentración de sales pero tratadas solo con el inoculante E (Tabla II). La salinidad disminuyó significativamente el contenido en nitrógeno de la parte aérea de las plantas de la leguminosa, sin embargo, a la concentración de sales de 50 mM el contenido en nitrógeno fue similar en las plantas tratadas con inoculante EH y en las plantas que crecieron en ausencia de sales (Tabla II). Mientras que no se encontraron diferencias en el contenido en minerales totales de las plantas que crecieron en ausencia de sales inoculadas bien con el inoculante E o bien con el inoculante EH, aquellas plantas que fueron tratadas con el inoculante E aumentaron su contenido en minerales cuando se cultivaron en la solución de sales 100 mM comparadas con las plantas que crecieron en ausencia de sales; y las plantas de alfalfa que se cultivaron con el co-inoculante EH aumentaron este contenido en minerales totales en presencia de las dos concentraciones de sales, 50 mM y 100 mM (Tabla II).

Con respecto al potencial hídrico de las hojas de las plantas de alfalfa, se observó que la inoculación bacteriana no afectó a este parámetro en ausencia de sales (Tabla II). Aquellas plantas que se trataron con el inoculante E, tuvieron un Ψ_w significativamente menor cuando crecieron en presencia de sales; sin embargo los valores de Ψ_w en las plantas que se co-inoculaban con las dos bacterias y crecieron a 50 y 100 mM tuvieron valores similares a las plantas que crecieron en ausencia de sales (Tabla II).

En ausencia de sales, el contenido en Lb de los nódulos de las plantas tratadas con el inoculante E fue significativamente superior que en los nódulos de las plantas inoculadas con EH. El crecimiento de la leguminosa a 50 y 100 mM de concentración salina redujo significativamente el contenido en Lb de las plantas que fueron inoculadas con inoculante E comparado con los valores obtenidos para las plantas que crecieron en ausencia de sales. Sin embargo, en las dos concentraciones salinas de 50 y 100 mM, el contenido en Lb de los nódulos de las plantas fue superior en las plantas inoculadas con EH con respecto a las plantas utilizadas como control, no tratadas con sales SMA-SO (Tabla II).

Contenido en Ca, Mg, P, Na y Zn

El contenido en Ca y Na de la parte aérea de las plantas fue similar en las plantas que crecieron en ausencia del tratamiento salino independientemente del inoculante bacteriano utilizado, y la concentración de

Tabla II

Peso seco de la parte aérea (SDW), peso seco de la raíz (RDW), contenido en N total y cenizas, Potencial hídrico (Ψ_w) y contenido en leghemoglobina (Lb) de *M. sativa* cultivada en SMA-SO con diferentes concentraciones de sales.

I.B.	[Sales] (mM)	SDW (g)	RDW (g)	N (g/100 g SDW)	Minerales (g/ 100 g SDW)	Ψ_w (Mpa)	Lb (mg/g nódulo fresco)
E	0	1,52a	0,93a	3,41a	9,22a	- 3,55a	13,71a
	50	0,66c	0,57b	2,96b	9,04a	- 4,97b	12,77b
	100	0,56c	0,46b	2,65b	10,93b	- 4,93b	12,30b
EH	0	1,69a	1,01a	3,46a	8,81a	- 3,46a	11,87b
	50	0,91b	0,65b	3,52a	10,15b	- 3,64a	15,42a
	100	0,69c	0,63b	2,93b	10,44b	- 4,08a	14,35a
	EEM	0,091	0,080	0,131	0,319	0,260	0,281

I.B: inoculante bacteriano; E: inoculante *E. meliloti*; EH: inoculante *E. meliloti*+*H. maura*; SMA-SO: solución mineral artificial similar a suelos tipo Solonchak órtico. a,b,c en una misma columna representan diferencias significativas de acuerdo a una ANOVA y test de Duncan (n=6; p<0,05). EEM: error estándar de la media del pool.

cada uno de estos cationes se vio incrementada significativamente al aumentar la concentración de sales en la que las plantas crecieron (Tabla III). La más alta concentración de Ca se obtuvo en las plantas que fueron tratadas con el inoculante EH y crecieron a 100 mM de SMA-OS (Tabla III).

En ausencia de sales, el contenido en Mg fue significativamente superior en las plantas inoculadas con E comparadas con las plantas inoculadas con EH. El cultivo en la solución SMA-OS aumentó el contenido en Mg de las plantas, un efecto que se observó en las plantas que crecieron a 100 mM y se inocularon con E, y a 50 y 100 mM cuando las plantas se trataron con el inoculante EH (Tabla III).

Las plantas de alfalfa tratadas con el inoculante E, tuvieron un mayor contenido en P que aquellas que se trataron con el inoculante EH cuando estas crecieron en ausencia de sales SMA-OS. El incremento de la concentración de sales de la solución de riego afectó

negativamente al contenido en P (Tabla III). El contenido en Zn no se vio afectado por el tratamiento de sales, pero a 100 mM de SMA-OS fue significativamente superior en las plantas tratadas con el inoculante EH (Tabla III).

Capacidad antioxidante

La actividad antioxidante en los retenidos y dializados fue similar para las plantas que crecieron en ausencia de cualquier tratamiento salino independientemente del inoculante bacteriano utilizado, E o EH (Tabla IV). En presencia de SMA-OS 50 mM, las plantas que se inocularon con E tuvieron una actividad antioxidante similar a la de las plantas control, pero a 100 mM esta actividad aumentó significativamente (Tabla IV). Sin embargo, las plantas de alfalfa tratadas con el inoculante EH, incrementaron su actividad antioxidante tanto en

Tabla III

Contenido en Ca, Mg, P, Na, y Zn en la parte aérea de las plantas de *M. sativa* cultivadas en una SMA-SO con diferentes concentraciones de sales

I.B.	[Sales] (mM)	Ca (mg/g SDW)	Na (mg/g SDW)	Mg (mg/g SDW)	P (mg/g SDW)	Zn (μ g/g SDW)
E	0	6,31 c	0,71 c	3,22 c	3,35 a	12,72 ab
	50	11,31 b	6,20 b	2,87 d	1,8 c	12,11 ab
	100	11,87 b	9,98 a	4,18 b	1,75 c	11,19 b
EH	0	5,73 c	0,82 c	2,54 d	2,81b	13,94 a
	50	12,45 b	6,47 b	3,57 c	1,80 c	13,21 a
	100	14,09 a	9,85 a	4,61 a	1,78 c	13,37 a
	EEM	0,393	0,248	0,114	0,059	0,451

I.B: inoculante bacteriano; E: inoculante *E. meliloti*; EH: inoculante *E. meliloti*+*H. maura*; SMA-SO: solución mineral artificial similar a suelos tipo Solonchak órtico. a,b,c,d en una misma columna representan diferencias significativas de acuerdo a una ANOVA y test de Duncan (n=6; p<0,05). EEM: error estándar de la media del pool.

Tabla IV

Capacidad antioxidante de los dializados y retenidos de la parte aérea de las plantas de M. sativa cultivadas en una SMA-SO con diferentes concentraciones de sales. Los datos representan cuatro réplicas independientes.

Los valores se expresan como UCA/mL

I.B.	[Sales] (mM)	Dializados	Retenidos
Blanco		4,54 c	5,99 c
E	0	3,41 ce	5,48 c
	50	3,80 ce	3,78 d
	100	20,61 a	29,20 a
EH	0	2,98 e	5,58 c
	50	13,85 b	16,02 b
	100	19,75 a	30,16 a
	EEM	0,666	0,802

I.B: inoculante bacteriano; E: inoculante *E. meliloti*; EH: inoculante *E. meliloti* + *H. maura*; SMA-SO: solución mineral artificial similar a suelos tipo Solonchak órtico; UCA: unidad de capacidad antioxidante. a,b,c,d,e en una misma columna representan diferencias significativas de acuerdo a una ANOVA y test de Duncan (n=4; p<0,05). EEM: error estándar de la media del pool.

los retenidos como en los dializados, cuando las plantas crecieron en cualquiera de las concentraciones de la SMA-OS, 50 y 100 mM (Tabla IV).

Discusión

El crecimiento y productividad de muchas especies vegetales bajo condiciones de salinidad, se ve afectado negativamente debido a los efectos iónicos y osmóticos sobre los procesos metabólicos y el balance nutricional, conduciendo a funciones fisiológicas dañadas como relaciones hídricas desfavorecidas y maquinaria fotosintética afectada²⁸. En este estudio se eligieron la pareja simbiótica *E. meliloti* cepa 1021 y el cultivar Aragón de *M. sativa*, debido principalmente a que la bacteria es capaz de crecer bien hasta concentraciones salinas de 500 mM y la alfalfa no limita su crecimiento y desarrollo a 75 mM de NaCl cuando se inocula con la cepa 1021²⁹. Ya que *H. maura* produce grandes cantidades del exopolisacárido maurano y es capaz de fijar N₂ en condiciones de vida libre, estudiamos si la inoculación con *H. maura* S-30 de la alfalfa nodulada por *E. meliloti* 1021 podría ayudar al crecimiento de las plantas bajo condiciones específicas de salinidad, típica de suelos abundantes en el Sureste de España, y si esta co-inoculación mejoraría las propiedades nutricionales y funcionales de las plantas de alfalfa.

En general, la co-inoculación de *E. meliloti* y *H. maura* mejoró la productividad de las plantas, el contenido en nitrógeno, así como algunas de las propiedades fisiológicas como el potencial hídrico y el contenido en leghemoglobina (Tabla II). Si esto se debe a la producción de maurano o a la movilización de nutrientes minerales desde la solución del suelo a la planta no se puede dilucidar en el presente trabajo. No obstante, el maurano pudo incrementar la resistencia de la planta al estrés osmótico favoreciendo la agregación del suelo³⁰ y se ha

demostrado que puede incrementar la retención de agua en el intestino grueso³¹, lo que sugiere que el exopolisacárido podría estar involucrado en la retención de agua en el ambiente de la raíz. Además, el ácido glucurónico, la manosa, galactosa y glucosa son componentes del maurano¹² y todo ellos o bien sus productos metabólicos, podrían actuar como nutrientes para las plantas.

El N de la parte aérea de las plantas provino principalmente de la fijación atmosférica de este N₂ llevada a cabo por *E. meliloti* en las plantas que fueron cultivadas en ausencia de tratamiento salino. En la presencia de sales, el contenido en N fue mayor en las plantas que se inocularon con las dos bacterias, y en estas plantas el contenido de Lb en los nódulos fue superior, lo que sugiere que la funcionalidad en estos nódulos fue superior, y esto se correspondió con un mayor contenido de N en estas plantas de alfalfa (Tabla II). Además, *H. maura* S-30 es una bacteria fijadora de nitrógeno en vida libre¹³ y podría haber incrementado la biodisponibilidad de N para la planta en la rizosfera de la misma. El contenido mineral de las plantas de alfalfa incrementó concomitantemente con la concentración de sales de la SMA-SO, lo que indica que las sales en la solución de riego se absorbieron activamente por las raíces de las plantas. El efecto positivo de la doble inoculación se observó en las más altas concentraciones de Ca y Mg, en los que la SMA-OS está enriquecida lo que supone una mejora en el valor nutritivo de la leguminosa. Este enriquecimiento podría deberse a la acción combinada de las bacterias con los exudados derivados de las raíces de las plantas; el maurano gracias a su composición podría ser capaz de formar complejos minerales con el Ca y el Mg¹² favoreciendo su solubilización, y haciéndolos más disponibles para su absorción por las raíces de la planta. La presencia de exudados en la rizosfera con cantidades limitadas de citrato, malato y succinato, está involucrada en la solubilización de minerales como el hierro, el aluminio y el fósforo³². Por consiguiente,

es posible que el maurano conjuntamente con los exudados radiculares podría contribuir a la movilización y asimilación de los minerales de la solución de riego. El aumento del contenido en minerales por co-inoculación bacteriana ha sido descrita por Alagawadi y Gaur³³ en relación a la absorción de P, que aumentó cuando las plantas de garbanzo (*Cicer arietinum*) se co-inocularon con *Rhizobium* F75 y *Bacillus polymaxa* H5, ya que esta última bacteria tiene la capacidad de aumentar la solubilidad de los fosfatos del suelo.

La capacidad antioxidante en los dializados y retenidos de la parte aérea de las plantas de alfalfa incrementó con el incremento de la concentración de sales de la SMA-SO (Tabla IV). Se ha demostrado previamente, que el cultivo de las plantas bajo condiciones de salinidad es capaz de alterar la actividad antioxidante de distintas especies vegetales como el brócoli³⁴, la lechuga³⁵ y el pimiento³⁶. En un trabajo reciente llevado a cabo por Colla *et al.*,³⁷ se demostró que el incremento de la concentración de NaCl en un cultivo de alcachofa y cardo, aumentó el contenido en polifenoles totales de las plantas. La capacidad para inhibir la peroxidación lipídica puede ser atribuida a la actividad de las sustancias antioxidantes presentes en las plantas, y que protegen contra la acción oxidante del hierro quelándolo, y previniendo así la producción de radicales hidroxilos y la propagación de la peroxidación lipídica; o bien, atrapando los radicales libres formados en la reacción³⁸. La co-inoculación mejoró la capacidad antioxidante tanto en los dializados como en los retenidos. Resultados similares han sido descritos en el trabajo llevado a cabo por Nautiyal *et al.*,³⁹ donde se ha demostrado una mejora de la capacidad antioxidante de la parte aérea de la leguminosa *Trigonella foenum-graecum* mediante la co-inoculación con el organismo promotor del crecimiento *Bacillus lentimorbus* cepa NRRL B-30488.

Basándonos en nuestros resultados *in vitro*, es posible que la alfalfa incluida en la dieta humana pudiera ejercer ambos efectos, sistémico debido a su componente absorbible (dializados) y efecto local sobre el tracto digestivo debido a su componente no absorbible (retenidos).

Tomando en conjunto todos estos resultados, se muestra que la alfalfa podría cultivarse bajo condiciones específicas de salinidad cuando se inoculan con su microsimbionte *E. meliloti*, y la co-inoculación con *H. maura* S-30 podría mejorar el crecimiento de las plantas y sus propiedades fisiológicas, nutricionales y funcionales. El crecimiento de las plantas de alfalfa en suelos salinos áridos podría ayudar a mejorar la fertilidad de los suelos e incorporarse a las prácticas agrícolas, así como las plantas de alfalfa podrían utilizarse como suplementos nutricionales con sus mejoradas propiedades nutricionales y funcionales.

Agradecimientos

Este trabajo forma parte de la Tesis Doctoral de Rosario Martínez y ha sido financiado por European

Regional Development Fund (ERDF) y cofinanciado por los proyectos P07-AGR-2704 y RNM-4746 de la Junta de Andalucía (España). Queremos agradecer a los grupos AGR-145 y BIO-275 así como al Profesor José Aguilar su ayuda.

Referencias

1. Grether, R.—Reseña de ‘Legumes of the world’ de Lewis, G.; Schrire, B.; Mackinder, B.; Lock, M.JF—Boletín de la Sociedad Botánica de México. — 75-77, (2005).
2. Velázquez, E. in *Proteobacteria: Phylogeny, metabolic diversity and ecological effects* 37–56 (Nova Science Publishers Inc, 2010).
3. Mishra, R. P. N. *et al.* Genetic diversity of *Mimosa pudica* rhizobial symbionts in soils of French Guiana: investigating the origin and diversity of *Burkholderia phymatum* and other beta-rhizobia. *FEMS Microbiol Ecol* 79, 487–503 (2012).
4. Bouchenak, M. & Lamri-Senhadji, M. Nutritional quality of legumes, and their role in cardiometabolic risk prevention: a review. *J Med Food* 16, 185–198 (2013).
5. Lugtenberg, B. & Kamilova, F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol* 63, 541–556 (2009).
6. Zahran, H. H. in *Microbial Strategies for Crop Improvement* (eds. Khan, M. S., Zaidi, A. & Musarrat, J.) 227–254 (Springer Berlin Heidelberg, 2009). at <http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-01979-1_11>
7. Bouhmouch, I., Souad-Mouhsine, B., Brhada, F. & Aurag, J. Influence of host cultivars and *Rhizobium* species on the growth and symbiotic performance of *Phaseolus vulgaris* under salt stress. *J Plant Physiol* 162, 1103–1113 (2005).
8. Shamseldin, A. & Werner, D. High salt and high pH tolerance of new isolated *Rhizobium* etli strains from Egyptian soils. *Curr Microbiol* 50, 11–16 (2005).
9. Zanin, V. in (Association pour la promotion des extraits foliaires en nutrition, 1998).
10. Farissi, M. *et al.* Growth, Nutrients Concentrations, and Enzymes Involved in Plants Nutrition of Alfalfa Populations under Saline Conditions. *J Agric Sci Technol* 16, 301–314 (2014).
11. Bouchotroch, S., Quesada, E., del Moral, A., Llamas, I. & Béjar, V. *Halomonas maura* sp. nov., a novel moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 1625–1632 (2001).
12. Arias, S. *et al.* Mauran, an exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium *Halomonas maura*, with a novel composition and interesting properties for biotechnology. *Extremophiles* 7, 319–326 (2003).
13. Argandoña, M. *et al.* The moderately halophilic bacterium *Halomonas maura* is a free-living diazotroph. *FEMS Microbiol Lett* 244, 69–74 (2005).
14. Llamas, I. *et al.* *Halomonas maura* is a physiologically versatile bacterium of both ecological and biotechnological interest. *Antonie Van Leeuwenhoek* 89, 395–403 (2006).
15. Soil Survey Staff. *Keys to Soil Taxonomy*. (USDA-Natural Resources Conservation Service, 2010).
16. Aguilar J, A. J. *Proyecto Lucdeme: mapa de suelos: escala 1:100.000: Baza-994*. (ICONA, 1990).
17. Beringer, J. E. R Factor Transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Microbiol* 84, 188–198 (1974).
18. Quesada, E., Bejar, V. & Calvo, C. Exopolysaccharide production by *Volcaniella eurihalina*. *Experientia* 49, 1037–1041 (1993).
19. Leonard, L. T. A Simple Assembly for Use in the Testing of Cultures of Rhizobia. *J Bacteriol* 45, 523–527 (1943).
20. Rigaud, J. & Puppo, A. Indole-3-acetic Acid Catabolism by Soybean Bacteroids. *J Gen Microbiol* 88, 223–228 (1975).
21. Talbi, C. *et al.* *Burkholderia phymatum* improves salt tolerance of symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Soil* 367, 673–685 (2012).
22. Chen, P. S., Toribara, T. Y. & Warner, H. Microdetermination of Phosphorus. *Anal Chem* 28, 1756–1758 (1956).

23. Miller, D. D., Schrickler, B. R., Rasmussen, R. R. & Van Campen, D. An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *Am J Clin Nutr* 34, 2248–2256 (1981).
24. Porres, J. M., Aranda, P., López-Jurado, M. & Urbano, G. Nutritional evaluation of protein, phosphorus, calcium and magnesium bioavailability from lupin (*Lupinus albus* var. multolupa)-based diets in growing rats: effect of α -galactoside oligosaccharide extraction and phytase supplementation. *Br J Nutr* 95, 1102–1111 (2006).
25. Oboh, G., Puntel, R. L. & Rocha, J. B. T. Hot pepper (*Capsicum annuum*, Tepin and *Capsicum chinense*, Habanero) prevents Fe²⁺-induced lipid peroxidation in brain – in vitro. *Food Chem* 102, 178–185 (2007).
26. European Union Council. Directional on the protection of animals used for scientific purposes. *Official J Eur Union* 276, 33–79 (2010).
27. Ohkawa, H., Ohishi, N. & Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95, 351–358 (1979).
28. Greenway, H. & Munns, R. Mechanisms of Salt Tolerance in Nonhalophytes. *Annu Rev Plant Physiol* 31, 149–190 (1980).
29. Domínguez-Ferreras, A., Muñoz, S., Olivares, J., Soto, M. J. & Sanjuán, J. Role of Potassium Uptake Systems in *Sinorhizobium meliloti* Osmoadaptation and Symbiotic Performance. *J Bacteriol* 191, 2133–2143 (2009).
30. Davey, M. E. & O’toole, G. A. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 847–867 (2000).
31. Martínez, R. *et al.* Effect of an exopolysaccharide produced by *Halomonas maura* on the digestive utilization of minerals in 58, 83–84 (Ann Nutr Metab, 2011).
32. Lipton, D. S., Blanchar, R. W. & Blevins, D. G. Citrate, Malate, and Succinate Concentration in Exudates from P-Sufficient and P-Stressed *Medicago sativa* L. Seedlings I. *Plant Physiol* 85, 315–317 (1987).
33. Alagawadi, A. R. & Gaur, A. C. Associative effect of *Rhizobium* and phosphate-solubilizing bacteria on the yield and nutrient uptake of chickpea. *Plant Soil* 105, 241–246 (1988).
34. López-Berenguer, C., Martínez-Ballesta, M. del C., Moreno, D. A., Carvajal, M. & García-Viguera, C. Growing Hardier Crops for Better Health: Salinity Tolerance and the Nutritional Value of Broccoli. *J Agric Food Chem* 57, 572–578 (2009).
35. Mahmoudi, H. *et al.* The Impact of Genotype and Salinity on Physiological Function, Secondary Metabolite Accumulation, and Antioxidative Responses in Lettuce. *J Agric Food Chem* 58, 5122–5130 (2010).
36. Navarro, J. M., Flores, P., Garrido, C. & Martinez, V. Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. *Food Chem* 96, 66–73 (2006).
37. Colla, G. *et al.* Effects of saline stress on mineral composition, phenolic acids and flavonoids in leaves of artichoke and cardoon genotypes grown in floating system. *J Sci Food Agric* 93, 1119–1127 (2013).
38. Fraga, C. G. & Oteiza, P. I. Iron toxicity and antioxidant nutrients. *Toxicology* 180, 23–32 (2002).
39. Nautiyal, C. S., Govindarajan, R., Lavania, M. & Pushpan-gadan, P. Novel mechanism of modulating natural antioxidants in functional foods: involvement of plant growth promoting *Rhizobacteria* NRRL B-30488. *J Agric Food Chem* 56, 4474–4481 (2008).