

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS



Metabolismo carbonado nodular en
Medicago truncatula-*Sinorhizobium meliloti*,
Lotus japonicus-*Mesorhizobium loti* en estrés
salino: implicación de la trehalosa

Miguel López Gómez

TESIS DOCTORAL

Granada 2007

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL

Metabolismo carbonado nodular en
Medicago truncatula-Sinorhizobium meliloti,
Lotus japonicus-Mesorhizobium loti en estrés
salino: implicación de la trehalosa

MIGUEL LÓPEZ GÓMEZ

TESIS DOCTORAL

Granada 2007

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL

Memoria para aspirar al Grado de
Doctor por el Licenciado en Ciencias
Biológicas D. Miguel López Gómez.

Directores:

Fdo: Carmen Lluch Plá
Catedrático de Fisiología Vegetal
Facultad de Ciencias
Universidad de Granada

Fdo. José Antonio Herrera-Cervera
Profesor Contratado Doctor
Facultad de Ciencias
Universidad de Granada

Esta Tesis Doctoral se ha realizado en el Laboratorio de Fijación de Nitrógeno del Departamento de Fisiología Vegetal de la Universidad de Granada, con ayuda de una beca del Plan de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Ciencia y Tecnología asociada al proyecto BOS2002-04182-C02-02, titulado “Simbiosis *Rhizobium*-leguminosa: contribución relativa de los simbiosites en la adaptación del metabolismo nodular al estrés salino” y por el PAI de la Junta de Andalucía (Grupo AGR-139). Durante el periodo de disfrute de dicha beca, se realizaron dos estancias breves gracias a ayudas del MCYT en el Departamento de Horticultura y Agronomía del Centro de Investigación y Desarrollo Agrícola de la Universidad Estatal de Ohio (EE.UU.), bajo la supervisión del Doctor John G. Streeter. Parte de los resultados presentados en esta Tesis Doctoral han sido publicados en las siguientes revistas internacionales:

NA Tejera, C Iribarne, **M López**, J Herrera-Cervera, C Lluch
Physiological implications of trehalase from Phaseolus vulgaris root nodules: partial purification and characterization.
Plant Physiology and Biochemistry. 43, 355-361, **2005**

JG Streeter, **ML Gómez**
Three enzymes for trehalose synthesis in Bradyrhizobium cultured bacteria and bacteroids from soybean nodules
Applied and Environmental Microbiology. 72, 4250-4255, **2006**

M López, JA Herrera-Cervera, C Lluch, NA Tejera
Trehalose metabolism in root nodules of the model legume Lotus japonicus in response to salt stress
Physiologia Plantarum 128 (4), 701–709, **2006**

M López, JA Herrera-Cervera, C Iribarne, NA Tejera, C Lluch
Growth and nitrogen fixation in Lotus japonicus and Medicago truncatula under NaCl stress: nodule carbon metabolism
Journal of Plant Physiology (en prensa)

M. López, NA Tejera, C Lluch
Differential tolerance to salt stress of legume models Lotus japonicus and Medicago truncatula: photosynthetic and nutritional responses
Environmental and Experimental Botany (enviado)

Asimismo parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han sido presentados en los siguientes congresos y reuniones científicas:

M López, NA Tejera, F Pieckenstain, C Lluch, JA Herrera-Cervera
Trehalose metabolism in nodules of Medicago truncatula under salt stress.
Join Annual Meeting of the American Society of Plant Biologists and the
Canadian Society of Plant Physiologist
Boston, Massachussets, USA 5-9 Agosto **2006**

M López, NA Tejera, JR Barranco-Gresa, C Lluch, JA Herrera-Cervera
*Trehalose metabolism in nodules of Lotus japonicus under salt stress: effect
of validamycin A.*
7th European Nitrogen Fixation conference
University of Aarhus, Dinamarca 22-26 Julio 2006

M López, JA Herrera-Cervera, J Sanjuán, C Lluch, JG Streeter
*Metabolismo de la trehalosa en la adaptación a la salinidad de
Sinorhizobium meliloti y Mesorhizobium loti*
XI Reunión Nacional de Fijación de Nitrógeno
El Escorial, España 5-8 Junio **2006**

M López, C Iribarne, JR Barranco, F Pieckenstein, JA Herrera-Cervera
*Aspectos bioquímicos y moleculares del metabolismo de la trehalosa en
nódulos de Medicago treuncatula: efecto del tratamiento salino*
IX Congreso Luso-Español de Fisiología Vegetal
Évora, Portugal 18-21 Septiembre **2005**

J Herrera-Cervera, **M López**, NA Tejera, C Lluch
*Partial cloning and expression analysis under salt stress of MTTR1, and a
Medicago truncatula gene for trehalase*
Comparative Biochemistry and Physiology A. 141, 347-348, **2005**
Barcelona, España Julio 2005

JA Herrera-Cervera, **M López**, NA Tejera, J Sanjuán, C Lluch
*Trehalase metabolism and insolation of parcial cDNA of tehalase gene in
Medicago truncatula*
6th European Nitrogen Fixation conference
Toulouse, Francia 24-27 Julio **2004**

M López, JA Herrera-Cervera, C Iribarne, A Ocaña, C Lluch
*Actividad trehalasa y metabolismo carbonado en nódulos de Medicago
truncatula bajo condiciones de estrés salino*
X Reunión Nacional de Fijación de Nitrógeno
Granada, España 15-18 Junio **2004**

NA Tejera, C Iribarne, **M López**, JA Herrera-Cervera, C Lluch
*Purificación y caracterización de la enzima trehalasa nodular de Phaseolus
vulgaris*
X Reunión Nacional de Fijación de Nitrógeno
Granada, España 15-18 Junio **2004**

ABREVIATURAS

Aa	Aminoácidos totales
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Alm	Almidón
ANA	Actividad nitrogenasa aparente
ANT	Actividad nitrogenasa total
AOA	Ácido oxalacético
ARN	Ácido ribonucleico
Ast	Azúcares solubles totales
ATP	Adenosina trifosfato
Ca	Clorofila a
Cb	Clorofila b
DEPC	Dietil-pirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfósido
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
D.O.	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etiléndiaminotetraacético
F ₀	Fluorescencia inicial
F _m	Fluorescencia máxima
F _v	Fluorescencia variable
HEPES	Ácido hidroxietilpiperacina-etanosulfónico
HK	Hexoquinasa
IA	Invertasa alalina
ICDH	Isocitrato deshidrogenasa
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
LDH	Lactato deshidrogenasa
Lb	Leghemoglobina
MDH	Malato deshidrogenasa
MES	Ácido morfolinoetanosulfónico
MOPS	Ácido morfolinopropanosulfónico
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
TFN	Tasa de fijación de nitrógeno
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPC	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
PF	Peso fresco
PK	Piruvato quinasa
PMSF	Fenimetilsulfonilfluoruro
PNN	Peso normalizado de nódulo
Pro	Prolina
PSN	Peso seco de nódulo

PSP	Peso seco de planta
PSPA	Peso seco de parte aérea
PSR	Peso seco de raíz
PT	Pigmentos totales
RPA	Relación raíz parte aérea
RT	Reversotranscripción
SDS	Dodecilo sulfato sódico
SS	Sacarosa sintasa
TPP	Trehalosa-6 fosfato fosfatasa
TPS	Trehalosa-6 fosfato sintasa
TRE	Trehalasa
UDP	Uridina difosfato
UFC	Unidades formadoras de colonias
x+c	Xantofilas más carotenos
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

I. INTRODUCCIÓN	7
1. Importancia de la fijación biológica del nitrógeno	9
1.1. Implicaciones medioambientales	10
2. Simbiosis <i>Rhizobium</i>-leguminosa	11
2.1. Las leguminosas	11
2.1.1. Leguminosas modelo: <i>Lotus japonicus</i> y <i>Medicago truncatula</i>	12
2.2. <i>Rhizobium</i> : <i>Sinorhizobium meliloti</i> y <i>Mesorhizobium loti</i>	13
2.3. Establecimiento de la simbiosis: formación del nódulo	14
2.4. Tipos de nódulos	16
2.5. Funcionamiento del nódulo	18
2.5.1. Nitrogenasa	18
2.5.2. Intercambio de metabolitos	20
2.6. Asimilación del amonio	23
2.7. Metabolismo carbonado	24
3. Trehalosa	30
3.1. Distribución y localización	30
3.2. Metabolismo	31
3.2.1. Biosíntesis	31
3.2.1.1. Vía trehalosa 6 fosfato sintasa: TPS	31
3.2.1.2. Vía maltooligosiltrehalosa sintasa: MOTS	33
3.2.1.3. Vía trehalosa sintasa: TS	34
3.2.2. Catabolismo	34
3.3. Funciones de la trehalosa en plantas	35
3.4. Trehalosa en la simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa	38
3.4.1. Localización	38
3.4.2. Metabolismo	39
3.4.3. Funciones	41
3.4.3.1. En rizobio en vida libre	41
3.4.3.2. En nódulo	42
4. Salinidad	43
4.1. Implicaciones agroambientales	44
4.2. Salinidad en <i>Rhizobium</i> en vida libre	45
4.2.1. Mecanismos de osmorregulación en <i>Rhizobium</i>	45
4.3. Efecto de la salinidad en la planta	46
4.3.1. Mecanismos de osmorregulación en plantas	49
4.4. Efecto en la simbiosis	54
4.4.1. En la leguminosa	54
4.4.2. En el nódulo	56
II. OBJETO	59

III. MATERIAL Y MÉTODOS	65
1. Material biológico	67
1.1. Microorganismos.....	67
1.1.1. Medios de cultivo.....	67
1.1.2. Antibióticos.....	68
1.1.3. Conservación de las cepas bacterianas.....	68
1.1.4. Curvas de crecimiento de <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	69
1.2. Material vegetal.....	69
1.2.1. Solución nutritiva para plantas.....	69
2. Cultivo de plantas	70
2.1. Esterilización y germinación de las semillas.....	71
2.2. Preparación del inóculo	72
2.3. Siembra e inoculación	72
2.4. Condiciones de la cámara de cultivo.....	73
3. Experimentos realizados	73
3.1. Simbiosis <i>M. truncatula</i> - <i>S. meliloti</i> y <i>L. japonicus</i> - <i>M. loti</i> :.....	73
a) Efecto del estrés salino desde el inicio del cultivo (<i>long-term</i>).....	73
b) Evolución ontogénica del crecimiento, fijación de nitrógeno y del metabolismo carbonado nodular: efecto del NaCl (<i>short-term</i>).....	74
c) Influencia de la validamicina A en condiciones de salinidad.....	75
3.2. Estudio comparativo entre cepas isogénicas de <i>S. meliloti</i> con la biosíntesis de trehalosa alterada en simbiosis con <i>M. sativa</i> en respuesta a la salinidad	75
3.3. Estudio bioquímico y molecular de la trehalasa nodular	76
3.3.1. Purificación y caracterización de la trehalasa de nódulos de <i>Phaseolus vulgaris</i> y <i>Medicago sativa</i>	76
3.3.2. Clonación y estudio de la expresión del gen que codifica para trehalasa en <i>M. truncatula</i> en salinidad	76
3.4. Metabolismo de la trehalosa en <i>B. japonicum</i> en vida libre y en simbiosis con <i>Glycine max</i> en ambiente salino	77
4. Metodología empleada	78
4.1. Recolección de las plantas.....	78
4.2. Fijación de nitrógeno.....	79
4.2.1. Desarrollo nodular.....	79
4.2.2. Actividad nitrogenasa	79
4.2.3. Leghemoglobina.....	80
4.3. Aislamiento de bacteroides	80
4.4. Actividad fotosintética	81
4.4.1. Eficiencia fotosintética.....	81
4.4.2. Pigmentos fotosintéticos: clorofilas totales.....	82
4.4.3. Contenido total de clorofila (SPAD).....	83

4.5. Actividades enzimáticas	83
4.5.1. Preparación de los extractos	
4.5.2. Valoración de actividades: oxidación-reducción de NAD(P)H/NAD(P) ⁺	84
4.5.2.1. Sacarosa sintasa	86
4.5.2.2. Hexoquinasa	86
4.5.2.3. Fosfoenolpiruvato carboxilasa	87
4.5.2.4. Malato deshidrogenasa	87
4.5.2.5. Isocitrato deshidrogenasa	88
4.5.2.6. Trehalosa-6 fosfato sintasa	88
4.5.3. Valoración de otras actividades enzimáticas	89
4.5.3.1. Invertasa alcalina	89
4.5.3.2. Trehalosa-6 fosfato fosfatasa	90
4.5.3.3. Trehalasa	90
4.5.3.4. Trehalosa sintasa y maltooligosiltrehalosa sintasa	91
4.6. Determinaciones analíticas	93
4.6.1. Contenido de carbohidratos	93
4.6.1.1. Sacarosa, maltosa, trehalosa, glucosa y fructosa: cromatografía gaseosa	93
4.6.1.2. Azúcares solubles totales	93
4.6.1.3. Almidón	94
4.6.2. Compuestos nitrogenados	95
4.6.2.1. Aminoácidos libres	95
4.6.2.2. Prolina	95
4.6.2.3. Proteína soluble	96
4.6.3. Elementos minerales	96
4.6.3.1. Determinación de nitrógeno y fósforo	96
4.6.3.2. Determinación de sodio y potasio	96
4.6.3.3. Determinación de calcio y magnesio	97
4.6.3.4. Determinación de cloruro	97
4.7. Purificación y caracterización de la trehalasa de nódulos de <i>P. vulgaris</i> y <i>M. sativa</i>	97
4.7.1. Purificación	97
4.7.1.1. Preparación del extracto	97
4.7.1.2. Precipitación con sulfato de amonio	98
4.7.1.3. Cromatografía de intercambio iónico	98
4.7.1.4. Cromatografía de exclusión molecular	98
4.7.1.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida	99
4.7.2. Caracterización	100
4.7.2.1. Especificidad de sustratos	100
4.7.2.2. Efecto de distintos iones	100
4.7.2.3. Respuesta al pH y la temperatura	100
4.7.3. Obtención de anticuerpos	100

4.7.3.1. Inmunización del conejo.....	100
4.7.3.2. Obtención del suero	101
4.7.3.3. Titulación de anticuerpos.....	101
4.7.3.4. Ensayo de especificidad de los anticuerpos: “Western blot”	101
4.8. Clonación y expresión del gen que codifica para la trehalasa de	
<i>M. truncatula</i>	103
4.8.1. Preparación y transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	103
4.8.2. Técnicas moleculares	104
4.8.2.1. Extracción de ARN.....	104
4.8.2.2. Cuantificación del ARN	105
4.8.2.3. Visualización del ARN mediante electroforesis en geles	
de agarosa.....	105
4.8.2.4. Tratamiento del ARN con DNasa.....	106
4.8.2.5. Síntesis de ADNc.....	107
4.8.2.6. Manipulación del ADN y clonación de ADNc.....	108
a) Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.....	108
b) Ligación en el vector de clonación	
c) Digestión total de ADN con endonucleasas de restricción	109
d) Separación e identificación de fragmentos de restricción:	
electroforesis en gel de agarosa	110
e) Revelado de geles y fotografía.....	110
f) Secuenciación de ADN.....	110
g) Análisis informático de secuencias de ADN y proteínas.....	110
4.8.2.7. Análisis de la expresión génica: PCR cuantitativa	111
5. Presentación y estudio estadístico de los resultados.....	113
IV. RESULTADOS	115
1. Efecto del estrés salino en la simbiosis <i>M. truncatula</i>-<i>S. meliloti</i>	
 y <i>L. japonicus</i>-<i>M. loti</i> desde el inicio del cultivo (<i>long-term</i>).....	117
1.1. Análisis de crecimiento	117
1.2. Fijación de nitrógeno.....	119
1.3. Metabolismo carbonado	121
1.4. Metabolismo de la trehalosa.....	123
1.5. Contenido de carbohidratos del nódulo.....	124
1.6. Contenido de metabolitos	128
1.7. Eficiencia fotosintética	131
1.8. Contenido de nutrientes.....	135
2. Evolución ontogénica del crecimiento, fijación de nitrógeno y metabolismo	
 carbonado nodular en las simbiosis <i>M. truncatula</i>-<i>S. meliloti</i> y <i>L. japonicus</i>-	
 <i>M. loti</i>: efecto del NaCl (<i>short-term</i>)	151
2.1. Análisis de crecimiento	151
2.2. Fijación de nitrógeno.....	153

2.3. Metabolismo carbonado	156
2.4. Metabolismo de la trehalosa.....	160
2.5. Contenido de carbohidratos.....	162
2.6. Otros metabolitos	166
2.8. Pigmentos fotosintéticos.....	170
3. Influencia de la validamicina A en la simbiosis <i>M. truncatula</i>-<i>S. meliloti</i> y <i>L. japonicus</i>-<i>M. loti</i> en condiciones de salinidad.....	179
3.1. Análisis de crecimiento	179
3.2. Fijación de nitrógeno.....	181
3.3 Metabolismo carbonado	183
3.4. Metabolismo de la trehalosa.....	186
3.5. Contenido de carbohidratos.....	188
3.6 Eficiencia fotosintética.....	193
4. Estudio comparativo entre cepas isogénicas de <i>S. meliloti</i> con la biosíntesis de trehalosa alterada en simbiosis con <i>M. sativa</i> en respuesta a la salinidad.....	203
4.1 Análisis de crecimiento	203
4.2 Fijación de nitrógeno.....	204
4.3. Metabolismo carbonado	207
4.4. Metabolismo de la trehalosa.....	209
4.5. Contenido de carbohidratos.....	211
5. Estudio bioquímico y molecular de la trehalasa.....	215
5.1. Purificación, caracterización e inmunodetección de la trehalasa de nódulos de <i>P. vulgaris</i>	215
5.1.1. Purificación	215
5.1.2. Caracterización.....	216
5.1.2.1. Determinación del peso molecular	216
5.1.2.2. Efecto del pH.....	217
5.1.2.3. Estabilidad térmica y temperatura óptima	218
5.1.2.4. Especificidad de sustrato	219
5.1.2.5. Parámetros cinéticos	220
5.1.2.6. Activadores e inhibidores	221
5.1.3. Inmunodetección de la trehalasa en <i>P. vulgaris</i>	222
5.1.3.1. En hoja, raíz, nódulo y flor	222
5.1.3.2. En la ontogenia del nódulo	223
5.2. Purificación y caracterización de la trehalasa de nódulos de <i>M. sativa</i>	225
5.2.1. Purificación	225
5.2.2. Caracterización.....	225
5.2.2.1. Efecto del pH	225
5.2.2.2. Estabilidad térmica y temperatura óptima	226
5.2.2.3. Especificidad de sustrato	227
5.2.2.4. Activadores e inhibidores	228

5.3. Clonación y análisis de expresión del gen que codifica para la trehalasa nodular de <i>M. truncatula</i>	229
5.3.1. Clonación del ADNc.....	229
5.3.2. Expresión del gen <i>MTTRE1</i> en diferentes tejidos.....	233
5.3.3. Expresión de <i>MTTRE1</i> en condiciones de salinidad.....	234
6. Metabolismo de la trehalosa en <i>B. japonicum</i> en vida libre y en simbiosis con <i>Glycine max</i> en ambiente salino	237
6.1. En vida libre.....	237
6.1.1. Curvas de crecimiento.....	237
6.1.2. Contenido de trehalosa.....	238
6.1.3. Actividades enzimáticas.....	239
6.2. Simbiosis <i>G. max</i> - <i>B. japonicum</i>	240
6.2.1. Análisis de crecimiento.....	240
6.2.2. Fijación de nitrógeno.....	240
6.2.3. Metabolismo de la trehalosa: bacteroide y citosol nodular.....	241
6.2.4. Contenido de azúcares del nódulo.....	243
V. DISCUSIÓN	245
VI. CONCLUSIONES	273
VII. BIBLIOGRAFÍA	277
VIII. APÉNDICE	315

I. INTRODUCCIÓN

1. Importancia de la fijación biológica del nitrógeno

Después del carbono y el agua, el nitrógeno es el nutriente más limitante para el crecimiento de la planta (Vance 1998) y la productividad agraria (Bohlool 1992). La aplicación de fertilizantes y la fijación biológica del nitrógeno constituyen las principales fuentes de nitrógeno para los cultivos en general y las leguminosas en particular (Sprent 2001). Este proceso es fundamental en el ciclo biogeoquímico del nitrógeno, ya que permite reducir el nitrógeno atmosférico a amonio por un conjunto de organismos procariotas conocidos como diazotrofos. Debido a la naturaleza inerte del dinitrógeno gaseoso (N_2), su reducción es energéticamente muy costosa, por esta razón, la mayoría de bacterias diazotróficas han desarrollado asociaciones simbióticas con plantas de las que obtienen la energía necesaria para llevar a cabo la fijación de nitrógeno (Lum y Hirsh 2003). El proceso opuesto mediante el cual el nitrógeno combinado es devuelto a la atmósfera es también realizado por bacterias y se denomina desnitrificación (Sameshima-Saito 2006)

En la agricultura, la fijación simbiótica del nitrógeno está fundamentalmente confinada a especies de leguminosas que establecen asociaciones con bacterias que en conjunto se les conoce como rizobios. Se calcula que anualmente se fijan entre 40 y 48 millones de toneladas de nitrógeno por las leguminosas cultivadas (Jenkinson 2001), lo que equivaldría un ahorro de hasta 10 billones de dólares en fertilizantes (Graham y Vance 2003). Además de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, existen otro tipo de asociaciones entre organismos fijadores de nitrógeno y plantas como es el caso de cianobacterias del género *Anabaena* y helechos del género *Azolla*, que se emplean como fuente de nitrógeno atmosférico en cultivos de arroz (Jensen y Hauggaard-Nielsen 2003). También las bacterias del género *Frankia* establecen simbiosis poco específicas con plantas leñosas no leguminosas, denominadas actinorrizas, que desarrollan nódulos en las raíces quedando el simbionte confinado en el cortex nodular, (Leary *et al.*, 2006) y los endófitos diazotrofos que se han aislado de gramíneas entre los que se encuentran especies de los géneros *Gluconacetobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum* y *Burkholderia*, siendo *G. diazotrophicus* utilizada como modelo de bacteria endófito fijadora de N_2 debido a su hábitat endófito obligado (Tejera *et al.*, 2006).

1.1. Implicaciones medioambientales

La producción industrial de amonio a partir del N₂ atmosférico mediante el proceso de Haber-Bosch y su utilización como fertilizante, permitió la llamada revolución verde, que produjo un notable incremento en la productividad de cereales en diversos países (Vance 1998), sin embargo, la aplicación de fertilizantes de origen industrial tiene elevados costes ambientales: **(a)** se requieren 1.5 kg de combustible fósil por cada Kg de fertilizante producido con la consiguiente producción de CO₂ y su contribución al efecto invernadero (Jensen y Hauggaard-Nielsen 2003); **(b)** se correlaciona con el aumento de los niveles de óxido nitroso (N₂O) en la troposfera (Ledley *et al.*, 1999), sin olvidar que este gas tiene una elevada potencialidad para contribuir también al efecto invernadero y a la disminución de la capa de ozono; **(c)** otro efecto negativo está relacionado con las pérdidas del nitrato por lixiviación, que son significativas y conducen a la contaminación de las aguas subterráneas (Jenkinson 2001).

El proceso natural de fijación biológica del nitrógeno, tiene un papel crucial para evitar los problemas derivados del uso de fertilizantes de origen industrial y permitir el desarrollo de sistemas agrícolas sostenibles. Según Vance y Graham (1995) el incremento en el uso de la fijación biológica del nitrógeno en la agricultura contribuiría a:

- a)** Reducir hasta en un 50% la producción de fertilizantes para cubrir la demanda de los cultivos, con la consiguiente reducción de la emisión de CO₂.
- b)** Evitar la contaminación de las aguas debido a que el nitrógeno fijado biológicamente, es directamente asimilado por la planta.
- c)** Disminuir la dependencia de los cultivos del uso de fertilizantes con el consiguiente ahorro en los costes de producción agrícola.

Por tanto, se impone la fijación biológica del nitrógeno para el desarrollo de sistemas agrícolas respetuosos con el medio ambiente, capaz de cubrir la demanda de alimentos de una población en aumento (Becker *et al.*, 1995).

2. Simbiosis *Rhizobium*-leguminosa

2.1. Las leguminosas

Con aproximadamente 20000 especies y 750 géneros, las leguminosas constituyen la tercera familia de plantas superiores en número de especies y la segunda después de las gramíneas en importancia agronómica (Gepts *et al.*, 2005), aunque solo una pequeña fracción del número total de especies de este grupo botánico es explotado agronómicamente por el hombre. A pesar de esto, es un hecho ampliamente aceptado la importancia económica, social, ecológica y agrícola de las leguminosas, que se basa en aspectos como: **a)** la potencialidad en la producción de proteínas vegetales para el consumo humano y fabricación de piensos para animales de leguminosas grano como soja, judía, haba y guisante, entre otras especies (Graham y Vance 2003); **b)** su utilización como pasto y forraje para el consumo animal como es el caso de las forrajeras alfalfa, lotus y trébol (Doyle y Luckow 2003); **c)** el efecto beneficioso para el medio ambiente, al poder utilizar el nitrógeno atmosférico como alternativa a los fertilizantes químicos (Broughton *et al.*, 2003); **d)** la capacidad para colonizar ecosistemas naturales mejorando la fertilidad del suelo, participando en la recuperación de suelos marginales y permitiendo el asentamiento de otras especies vegetales al quedar incorporado a la materia orgánica del suelo el nitrógeno fijado (Vance 1998). Algunos de estos aspectos, conducen a considerar a las leguminosas como cultivos potencialmente importantes como sustitutivos de la proteína animal y en la lucha contra la desertización (FAO 1995).

El 90% de las especies de leguminosas son capaces de establecer simbiosis con bacterias fijadoras, que les permiten fijar nitrógeno atmosférico y ser menos dependientes del nitrógeno del suelo (Sprent 2001). La simbiosis entre leguminosas y rizobios, ocurre en el interior de unos órganos altamente especializados denominados nódulos, que se localizan en raíces y en algunas ocasiones en tallos (Howieson *et al.*, 2000). La arquitectura de estos nódulos suministra las condiciones anatómicas y fisiológicas necesarias para que se lleve a cabo la fijación de nitrógeno y el intercambio de nutrientes entre los simbiosiontes (Lum y Hirsh 2003).

2.1.1. Leguminosas modelo: *Lotus japonicus* y *Medicago truncatula*

Arabidopsis thaliana es considerada planta modelo de estudios genéticos y genómicos, y los esfuerzos empleados para descifrar el genoma de esta planta, han dado como resultado numerosos trabajos de investigación que han puesto al descubierto gran información sobre los mecanismos implicados en diversos aspectos del metabolismo de plantas. Esta información está disponible en www.arabidopsis.org. (Steuer *et al.*, 2007; Rossignol *et al.*, 2006; Gelvin 2006).

A diferencia de *Arabidopsis*, las leguminosas de interés agrícola son relativamente pobres como sistemas modelo para la investigación genética y genómica, debido a que muchas de ellas son tetraploides o tienen genomas muy grandes. No obstante, *Lotus japonicus* y *Medicago truncatula* han sido internacionalmente adoptadas como modelos para la investigación en genómica de leguminosas (Stougaard 2001), debido a que ambas tienen un genoma diploide, *L. japonicus* $2n=12$ y *M. truncatula* $2n=16$, pequeño con aproximadamente 470 Mb/C (Young *et al.*, 2005; Ito *et al.*, 2000), además son autógamias, tienen un tiempo corto de generación, gran producción de semillas, son fáciles de transformar y actualmente incluso se dispone de mutantes (Riely *et al.*, 2007, Heckmann *et al.*, 2006). *L. japonicus* y *M. truncatula* presentan una diferencia interesante cuando se asocian con sus rizobios específicos *Sinorhizobium meliloti* y *Mesorhizobium loti*, como es la formación de nódulos indeterminados y determinados respectivamente, una de las razones por la cual, al abordar el estudio del genoma en ambas especies (VandenBosch y Stacey 2003), se favorece el estudio molecular de las simbiosis que forman los dos tipos de nódulos (Udvardi 2001). Es interesante señalar que los genomas de los correspondientes microsimbiontes *S. meliloti* y *M. loti* se han secuenciado completamente (Kaneko *et al.*, 2000; Galibert *et al.*, 2001).

El género *Medicago*, originario del área mediterránea, tiene interés agronómico y ganadero en base a su capacidad para establecer colonias nativas adaptadas a los cambios climáticos sufridos históricamente en estas zonas. La secuenciación del genoma de *M. truncatula* esta prácticamente concluida (www.medicago.org, www.noble.org/medicago), lo que ha permitido desarrollar numerosos estudios moleculares, incluyendo investigaciones de expresión y regulación de genes que se expresan durante el desarrollo de esta especie (Town 2006). Sin embargo, se han descuidado

los estudios bioquímicos y fisiológicos, que ayudarían a aplicar los avances genómicos y proteómicos de *M. truncatula* para conocer el funcionamiento y mejora de la planta.

El genero *Lotus* comprende numerosas especies como *L. corniculatus*, *L. creticus* o *L. tenuis* con características interesantes entre las que se incluyen su tolerancia y capacidad de adaptación a condiciones de sequía o a suelos con una elevada salinidad, lo que las hacen interesantes ecológica y agronómicamente, incluso algunas especies de *Lotus*, constituyen una alternativa para la implantación de pastizales en zonas marginales (Teakle *et al.*, 2006). La secuenciación del genoma de *L. japonicus*, se inició por Sato *et al.*, (2001), actualmente se encuentra disponible más del 50% de las regiones eucromáticas del genoma de *Lotus* en la base de datos pública de ADN, y en la página web de Kazusa DNA Research Institute (<http://www.kazusa.org.jp/lotus/>).

2.2. *Rhizobium*: *Sinorhizobium meliloti* y *Mesorhizobium loti*

Los rizobios son bacterias aerobias gram-negativas que pueden fijar nitrógeno en vida libre o en simbiosis, y habitualmente viven como saprófitos en el suelo compitiendo con bacterias quimioheterótrofas (Sprent 1979). Los rizobios integran un grupo taxonómicamente heterogéneo cuya clasificación se encuentra en constante revisión y evolución. Esto se puede comprobar en el *Taxonomic Outline of the Prokaryotic Genera* (Garrity *et al.*, 2005) del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2ª ed.) en el que la familia *Rhizobiaceae* ha variado en algunos géneros y se le han añadido otros nuevos como muestra Kuykendall *et al.* (2005) y Willems (2006).

Sinorhizobium meliloti es conocido por su capacidad de inducir la formación de nódulos indeterminados en raíces de *Medicago*, *Melilotus* y *Trigonella sp.* Se trata de un rizobio de crecimiento rápido con un genoma de tamaño moderado (6.6 Mb), lo que favorece la realización de estudios genómicos que han permitido analizar el perfil completo de expresión génica de *S. meliloti* en el proceso de nodulación y en la adaptación a diferentes condiciones de estrés (Djordjevic *et al.*, 2003). El genoma de *S. meliloti*, está constituido por tres replicones independientes: un cromosoma de 3.7 Mb y dos megaplásmidos de 1.4 y 1.7 Mb, comúnmente descritos como pSymA y pSymB respectivamente, que contienen genes

esenciales para la simbiosis. El cromosoma fue secuenciado por Galibert *et al.* (2001). La secuenciación del megaplásmido pSymA se realizó por Barnett y colaboradores (2001), mientras que del megaplásmido pSymB la llevó a cabo Finan *et al.* (2001). La secuencia completa de *S. meliloti* se encuentra disponible en <http://sequence.toulouse.inra.fr/meliloti.html>.

Mesorhizobium loti es un rizobio capaz de formar nódulos determinados y llevar a cabo la fijación de nitrógeno con varias especies de *Lotus*. Para comprender el sistema genético requerido en el proceso de fijación simbiótica del nitrógeno así como para la transferencia horizontal de genes entre microsimbiontes naturales, se inició el análisis del genoma de *M. loti*, habiéndose determinado su secuencia completa (Kaneko *et al.*, 2000). El genoma de *M. loti* está constituido por un único cromosoma de 7036 pb y dos plásmidos designados: pMLa de 351.911 pb y pMLb de 208.315 pb (Hattori *et al.*, 2002; Kaneko *et al.*, 2000).

2.3. Establecimiento de la simbiosis: formación del nódulo

El proceso de nodulación comprende una secuencia de etapas que comienzan por la quimioatracción del rizobio hacia la raíz, iniciándose el contacto físico entre los dos simbioses (Caetano-Anollés 1997). En esta fase inicial, denominada preinfección, el rizobio debe competir con otros microorganismos presentes en la rizosfera hasta adherirse a la superficie de la raíz. La quimioatracción entre planta y bacteria se debe al intercambio de señales entre ambos simbioses, que conduce al reconocimiento específico entre la bacteria y el hospedador (Hirsch 1992). En esta etapa, la bacteria responde a la síntesis de compuestos que excretan las plantas, flavonoides y betaínas principalmente (Phillips 2000) en los exudados radicales, y en respuesta a estos exudados, la bacteria sintetiza señales simbióticas de naturaleza lipooligosacáridica llamadas también factores de nodulación, que desencadenan el reconocimiento por los pelos radicales de la planta y la activación de los genes específicos en el inicio del desarrollo simbiótico en la planta (Cullimore *et al.*, 2001; Miklashevichs *et al.*, 2001). Esta interacción entre los factores NOD y la raíz se encuentra mediada por receptores responsables de la percepción y transducción de la señal que inicia el desarrollo del nódulo radical (Endre *et al.*, 2002; Stracke *et al.*, 2002; Madsen *et al.*, 2003). Hay estudios que también revelan que las fitohormonas se encuentran implicadas en el control de las señales

simbióticas, especialmente el etileno, las auxinas y las citoquininas, (Mulder *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2006).

Cuando los rizobios entran en contacto con los pelos radicales, quedan adheridos a estos mediante lectinas y son encerrados por una deformación y curvatura de los pelos denominada “curling” (Van Rhijn 2001). Esta curvatura está precedida por, la despolarización de la membrana (Lhuissier *et al.*, 2001; Shaw y Long 2003a), el cambio en el flujo de iones de calcio (Lévy *et al.*, 2004), el eflujo de protones, la reorganización de los filamentos de actina y el incremento de las corrientes citoplásmicas (Shaw y Long 2003a).

El proceso de infección continúa con la formación y desarrollo del cordón de infección, mediante la invaginación de la membrana citoplásmica del pelo radical, que se prolonga atravesando varias capas de células corticales de la raíz, al mismo tiempo que los rizobios van avanzando y multiplicándose activamente (Brewin 2004; Monaham-Giovanelli *et al.*, 2006). Simultáneamente al proceso de infección, se produce la inducción de la división celular en el cortex de la raíz, formándose el llamado primordio nodular, en cuyas células se liberan los rizobios mediante endocitosis de la membrana vegetal, formando una estructura denominada simbiosoma (Hirsch 1992).

El término simbiosoma, acuñado por Roth *et al.* (1988), define al orgánulo nodular compuesto por una membrana derivada del hospedador, denominada membrana peribacteroidal (MPB), que rodea al microsimbionte (bacteroide), el cual mantiene su propia membrana (membrana bacteroidal, MB). La membrana peribacteroidal se origina por endocitosis del cordón de infección con vesículas procedentes del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi, resultando una encapsulación de la bacteria en la membrana vegetal. Los simbiosomas recién formados proliferan en la célula hospedadora por división celular, diferenciándose los rizobios en bacteroides fijadores de nitrógeno. Las células maduras infectadas contienen varios miles de simbiosomas (Day *et al.*, 2000).

En la actualidad, la investigación en este campo se dirige hacia el conocimiento de la expresión génica y la función de los genes, para lo que la proteómica se está convirtiendo en objetivo de estudio tras el periodo pos-genómico (Jorrín *et al.*, 2006), en este sentido se avanza en el estudio del proteoma de *M. truncatula* (Bestel-Corre *et al.*, 2004; Dumas-Gaudot *et al.*,

2004; Gallardo *et al.*, 2003), y esfuerzos similares se realizan en el transcriptoma de nódulos de *L. japonicus* (Colebatch *et al.*, 2004) para lograr integrar los cambios en el transcriptoma del nódulo con las diferencias metabólicas que tienen lugar en él al llevar a cabo el proceso de fijación de nitrógeno.

Mediante la realización de análisis “*in silico*” y con macroarrays, Tesfaye *et al.* (2006) dando continuidad al estudio de Fedorova *et al.* (2002) en la identificación de genes específicos del nódulo mediante el análisis del transcriptoma de *M. truncatula* en diferentes condiciones de aporte de nitrógeno, y particularmente enfocado en los genes implicados en el metabolismo carbonado y nitrogenado, han identificado varios cientos de genes que se activan en diferentes etapas de la simbiosis implicados en funciones celulares relacionadas con la eficiencia simbiótica, y en facilitar los procesos de transporte a través de la membrana peribacteroidea (Küster *et al.*, 2007). En la interacción simbiótica entre *M. truncatula* y *S. meliloti*, se han identificado hasta 756 genes implicados en las diferentes etapas del proceso de nodulación, mediante el estudio de macro y microarrays que contenían en torno a 6000 sondas obtenidas a partir de tres librerías de ADNc (El Yahyaoui *et al.*, 2004).

En estudios realizados con arrays de 18144 secuencias de ADNc obtenidos de *L. japonicus*, se ha observado un incremento en la expresión de hasta 1076 genes durante todo el proceso de nodulación en su interacción con *M. loti* (Kouchi *et al.*, 2004). Estos resultados aportan datos para el avance en la investigación de los mecanismos moleculares implicados en el complejo proceso del establecimiento de la simbiosis.

2.4. Tipos de nódulos

Los nódulos radicales pueden mostrar importantes diferencias en cuanto al desarrollo del cordón de infección (Rae *et al.*, 1992), en la presencia o no de meristemo apical, en la forma, en la organización histológica y anatomía, en la vía de asimilación del amonio y por tanto en el tipo de metabolitos nitrogenados que exportan (Sprent *et al.*, 1989). En base a estas diferencias, se pueden observar dos tipos de nódulos: indeterminados y determinados (Fig. 1). Se ha postulado que la evolución de la nodulación va en dirección nódulos indeterminados a determinados, pero es difícil

correlacionar tal evolución con la filogenia de los simbiontes (Doyle y Doyle 1997).

Nódulos indeterminados: presentes en leguminosas de clima templado como *Lupinus*, *Vicia* o *Medicago*, son de forma alargada con un meristemo nodular persistente y con un cordón de infección ancho. A lo largo del eje longitudinal del nódulo desde el ápice hasta su conexión con la raíz se distinguen cuatro zonas: **a)** zona meristemática (zona I), donde se forman los distintos tejidos del nódulo en desarrollo; **b)** zona de 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 donde se lleva a cabo la fijación activa del nitrógeno, aunque existen también células no infectadas cuyo papel es el soporte metabólico del 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; Timmers *et al.*, 2000).

Nódulos determinados: se encuentran en leguminosas de origen tropical como *Glycine*, *Phaseolus*, *Vigna* y *Lotus*, son nódulos efímeros de estructura globular, 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. Este tipo de nódulos carecen de meristemo indeterminado, quedando la actividad meristemática, que se sitúa en la zona central, restringida a un periodo corto. El tejido central contiene células infectadas y no infectadas encontrándose todas ellas en el mismo estado de desarrollo. Las células no infectadas están especializadas en la asimilación y transporte de ureidos procedentes del nitrógeno fijado (Sprent *et al.*, 1989). Otra característica que diferencia los nódulos indeterminados de los determinados es que éstos acumulan polímeros de reserva de poli- β -hidroxibutirato (PHB) (Trainer y Charles 2006).

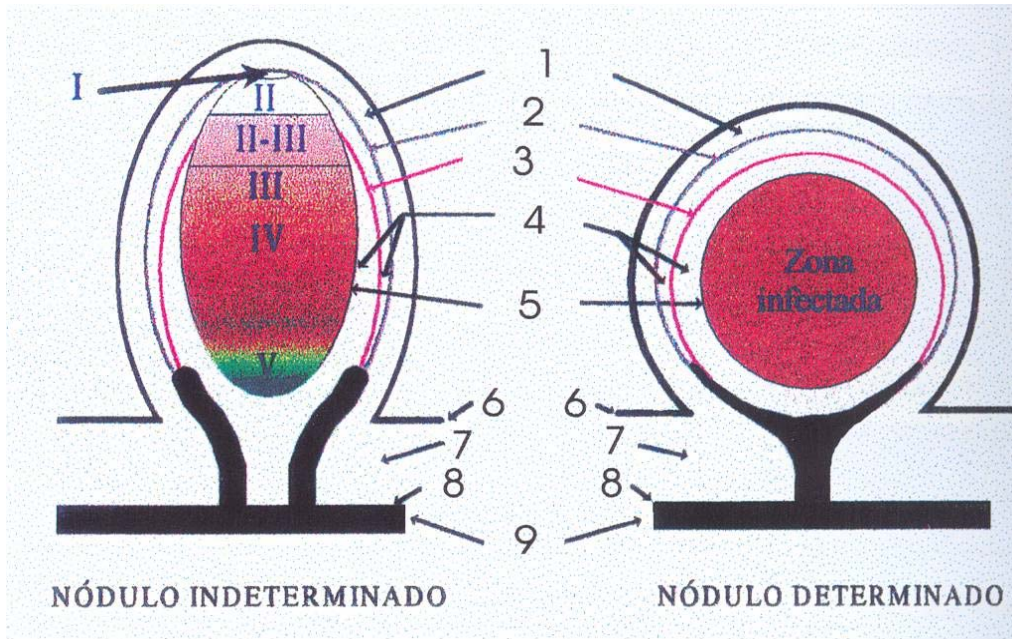


Figura 1 Diferentes zonas de los nódulos radicales de leguminosas. **1** Cortez externo. **2** Endodermis. **3** Haces vasculares. **4** Parénquima **5** Cortez interno. **6** Epidermis de la raíz. **7** Cortez radical. **8** Endodermis de la raíz. **9** Haces vasculares de la raíz.

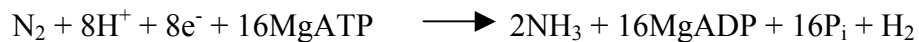
2.5. Funcionamiento del nódulo

2.5.1. Nitrogenasa

La fijación del nitrógeno es catalizada por el complejo enzimático nitrogenasa, que se encuentra exclusivamente en procariontes y cuya estructura varía poco entre los distintos organismos fijadores de nitrógeno (Smith 2002). Este complejo consta de dos ferrosulfoproteínas que se inactivan de forma irreversible en presencia de O_2 , la Fe-proteína (dinitrogenasa reductasa, componente II) es un dímero con una masa molecular de 62 kDa y la FeMo-proteína (dinitrogenasa, componente I) es un tetrámero con una masa molecular de 220 kDa (Dos Santos *et al.*, 2004)

La reducción de nitrógeno por la nitrogenasa, incluye tres transferencias de electrones (Smith 2002; Igarashi y Seefeldt 2003):

1. La reducción de la Fe-proteína por flavodoxina o ferredoxina.
2. La transferencia sucesiva de electrones desde la Fe-proteína a la FeMo-proteína en un proceso dependiente de MgATP, con una estequiometría mínima de 2 MgATP hidrolizados por electrón transferido.
3. La transferencia de electrones al nitrógeno, que tiene lugar en el centro activo del enzima, en el cofactor de molibdeno (FeMoco) de la FeMo-proteína.



El complejo nitrogenasa cataliza simultáneamente la reducción de protones a hidrógeno, que se libera al exterior en la simbiosis, al no disponer las cepas de rizobios de la capacidad de metabolizarlo (fenotipo *hup*⁻). Esta formación de H₂ por la nitrogenasa se considera una reacción poco rentable que reduce la eficiencia de la enzima alrededor de un 25% (Phillips 1980), pero que puede ser superado por cepas que reciclan el hidrógeno (*hup*⁺) (Palacios *et al.*, 2005; Brito *et al.*, 2005).

La ecuación descrita anteriormente, evidencia que la fijación biológica del nitrógeno es un proceso que requiere un alto consumo energético, de manera que se necesitaría entre el 10 y el 20% del carbono procedente de la fotosíntesis para este proceso (Gordon 1999). Los fotoasimilados procedentes de la parte aérea de la planta, son la principal fuente de energía y de esqueletos carbonados para el desarrollo y mantenimiento del nódulo, la respiración bacteroidal, y la fijación del nitrógeno (Schubert 1986).

El complejo enzimático de la nitrogenasa es extremadamente sensible al daño irreversible provocado por el oxígeno, por lo que su actividad se encuentra limitada a condiciones microaeróbicas. Sin embargo, el oxígeno es necesario para la respiración mitocondrial que garantiza el suministro de energía en forma de ATP, imprescindible para la fijación de nitrógeno, y es por ello que los nódulos de leguminosas adoptan las condiciones necesarias de microaerobiosis para que se lleve a cabo la fijación del nitrógeno (Minchin 1997). El gradiente de protones a través de la membrana peribacteroidal, ha sido propuesto como un sensor para la regulación de la

respiración mitocondrial y bacteroidal, de modo que controla la concentración de oxígeno y el suministro de carbono al bacteroide (Streeter 1995).

La protección frente al oxígeno de la nitrogenasa se debe a una barrera celular a la difusión del oxígeno, en combinación con una molécula específica de la simbiosis denominada leghemoglobina (Janes *et al.*, 2000; Wei y Layzell 2006). La leghemoglobina es una hemoproteína con hierro que condiciona el color rosado del nódulo fijador. Esta molécula, facilita la difusión del oxígeno a través del citosol vegetal hasta el bacteroide en condiciones que permiten la fosforilación oxidativa sin inactivar la nitrogenasa (Appleby 1984). Además, la leghemoglobina puede servir como almacén intracelular de oxígeno, de forma que los nódulos puedan acumular una elevada concentración de oxígeno a bajas tensiones (Minchin 1997).

2.5.2. Intercambio de metabolitos

Un aspecto interesante de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa en el nódulo es el relacionado con el intercambio de metabolitos entre ambos simbioses, en los que se incluyen compuestos carbonados (procedentes de la planta), compuestos nitrogenados (procedentes del amonio fijado por la bacteria) (Lodwig 2003) y nutrientes, para lo que existen transportadores localizados en la membrana peribacteroidea (Benedito *et al.*, 2006):

a) Transpote de amonio:

El amonio es el producto final de la nitrogenasa, por lo que existe un fuerte eflujo desde el bacteroide al citosol nodular a través de un canal en la membrana peribacteroidea que ha sido identificado en nódulos de soja y guisante (Obermeyer y Tyerman 2005; Mouritzen y Rosendahl 1997; Whitehead *et al.*, 1998). Este canal permite el eflujo de amonio acoplado al potencial generado a ambos lados de la membrana peribacteroidea por ATPasas que bombean H^+ al espacio peribacteroideo (Andreev *et al.*, 1999). En nódulos de soja se han identificado transcritos de un gen *GmSAT1*, considerado como una nodulina, que codifica para un canal de amonio e iones monovalentes a través de la membrana peribacteroidea (Kaiser *et al.*, 1998). Posteriormente se han identificado transcritos pertenecientes a dos familias de transportadores de amonio en plantas: AMT1 y AMT 2, en nódulos de *L. japonicus* (Ulrike *et al.*, 2003).

b) ATP-asas:

Se ha detectado una elevada actividad ATP-asa en vesículas aisladas de membrana peribacteroidea con un rango de pH de entre 4.5-8.5, caracterizadas por una baja especificidad de sustrato y ausencia de selectividad entre el Mg^{2+} y el Ca^{2+} como estimuladores. La ATP-asa dependiente de Mg^{2+} fue moderadamente sensible a algunos inhibidores como el vanadato y el nitrato mientras que la dependiente de Ca^{2+} al NaF (Andreev *et al.*, 1997).

c) Acuaporinas:

Entre el 10% y el 15% de la proteína total de la membrana del simbiosoma está constituido por una proteína intrínseca de membrana específica del nódulo conocida como nodulina-26 (Rivers *et al.*, 1997). Esta proteína se identificó con canales de agua denominados acuaporinas, que permiten el flujo de agua y otros solutos como el glicerol a través de la membrana peribacteroidea. En nódulos de *L. japonicus* se han identificado dos tipos de nodulinas, de las cuales una es ortóloga de la nodulina-26, mientras que la otra pertenece a la subfamilia de las proteínas intrínsecas del tonoplasto (TIP) (Guenther y Roberts 2000).

d) Transporte de aminoácidos:

Se ha propuesto un sistema de transporte de nitrógeno en forma de aminoácidos en lugar de amonio (revisado por Day *et al.*, 2000). La alanina, sintetizada a partir de amonio y piruvato en una reacción catalizada por la alanina deshidrogenasa en el bacteroide, es el principal aminoácido transportado según Waters *et al.*, (1998), además, la alanina deshidrogenasa se expresa fuertemente en bacteroides de *B. japonicum* en nódulos de soja (Göttfert *et al.*, 2000). El transporte de alanina a través de la membrana peribacteroidea, mostró una cinética asociada a un canal más que a un transportador específico (Whitehead *et al.*, 1998). Otro aminoácido como aspartato, también es producido en el bacteroide (Rosendahl *et al.*, 1992) y transportado mediante un transportador descrito en membrana peribacteroidea de guisante (Rudbeck *et al.*, 1999). Este transportador cataliza un simporte aspartato- H^+ y es impulsado por un gradiente de pH

entre el interior del simbiosoma y el citosol nodular (Rudbeck *et al.*, 1999). Lodwing *et al.* 2003 consideran que el sistema de transporte de aminoácidos del bacteroide al citosol nodular, actuaría como un mecanismo de regulación de la asimilación del amonio.

e) Transporte de dicarboxilatos:

Los ácidos dicarboxílicos son los principales productos carbonados suministrados a los bacteroides para llevar a cabo la fijación del nitrógeno y la respiración bacteroidal (Rosendahl *et al.*, 1990). La entrada de ácidos dicarboxílicos al interior del bacteroide se puede llevar a cabo por un doble sistema, uno a favor de gradiente y otro activo mediante una proteína transportadora localizada en la membrana interna del bacteroide (Streeter 1987). Este sistema es constitutivo e idéntico para el malato, succinato y fumarato, ya que está formado por una única permeasa codificada por el gen *dtcA*, el producto de otros dos genes *dtcB* y *dtcC*, forman un sistema regulador de dos componentes que dirigen la disponibilidad de carbohidratos e interaccionan con el factor NtrA, que regula la transcripción de *dtcA* (Udvardy y Day 1997). En *Alder glutinosa*, solo se han detectado transcritos de genes de la familia *dtcA* en nódulos y no en otros órganos de la planta, determinándose por inmunodetección su localización en la membrana peribacteroidea (Jeong *et al.*, 2004). Mutantes de rizobios que carecen de este transportador de dicarboxilatos, son deficientes en la fijación de nitrógeno en asociación con la planta hospedadora (Finan *et al.*, 1988).

f) Transportador de hierro:

El hierro es un nutriente esencial para la fijación de nitrógeno, ya que forma parte del cofactor FeMoco de la nitrogenasa y de la Fe-proteína, así como de proteínas de la cadena de transporte electrónico y de la leghemoglobina. Se han desarrollado dos estrategias para la entrada de hierro en el bacteroide, la primera involucra el transporte del hierro en forma de quelato con ácidos orgánicos como el citrato-férrico que ayuda a la solubilización del Fe^{2+} , mientras que la segunda estrategia, involucra la reducción inicial del Fe^{3+} a Fe^{2+} por una quelato-reductasa plasmática (Day *et al.*, 2001). El aporte de hierro al bacteroide, requiere de un transportador

de iones divalentes con capacidad para transportar hierro, que ha sido identificado en nódulos de soja como proteína vegetal GmDmt1, que se expresa en la membrana peribacteroidea de nódulos de soja (Kaiser *et al.*, 2003).

g) Transportador de potasio:

Se ha observado una relativamente alta permeabilidad al potasio en la membrana peribacteroidea de nódulos de judía, que aporta evidencia de la existencia de un canal permeable al potasio sensible al tetraetilamonio (Andreev *et al.*, 2005). El primer transportador de potasio de la familia KUP aislado y caracterizado de una leguminosa fue LjKUP en *L. japonicus*, aunque *LjKUP* se expresó en toda la planta, los niveles de expresión más altas se encontraron en nódulos (Desbrosses *et al.*, 2004).

h) Transportador de zinc:

El zinc es un micronutriente esencial que debe ser aportado por la planta al bacteroide, para lo que existen transportadores específicos de la familia ZIP (Day *et al.*, 2001). El primer miembro de esta familia identificado en la membrana peribacteroidea de nódulos de soja (GmZIP1), fue descrito por Moreau *et al.* (2002) y consta de 8 dominios de proteína transmembrana, altamente selectivo para el zinc localizado en la membrana del simbiosoma. También ha sido caracterizado en *M. truncatula* una familia de seis genes *MtZIP* que codifican para proteínas ricas en histidina que transportan metales (López-Millán *et al.*, 2004).

i) Transportador de sulfato:

Estudios proteómicos realizados en nódulos de *L. japonicus* indicaron la presencia de un transportador de sulfato SST1 localizado en la membrana del simbiosoma. Además, se han identificado dos genes *sst1* y *sst2* que se expresan específicamente en el nódulo y que codifican una proteína homologa con transportadores de sulfato en eucariotas (Krusell *et al.*, 2005).

2.6. Asimilación del amonio

El amonio es incorporado por las enzimas del ciclo de la glutamina sintasa (Cullimore y Bennett 1988) a una molécula de glutamina y después es exportada desde el citoplasma al xilema o bien en forma de asparagina o de derivados de las purinas, conocidos como ureidos dependiendo del tipo de nódulos: en indeterminados, se transporta principalmente como asparagina la cual es sintetizada por una asparagina sintetasa dependiente de glutamina (Kahn *et al.*, 1998), y en determinados, como ureidos (alantoína y el ácido alantóico) (Schubert 1986; Atkins y Smith 2000). El transporte de ureidos presenta ventajas (Argillier *et al.*, 1989): **a)** se pueden utilizar para estimar la actividad fijadora del nitrógeno; **b)** el coste metabólico en ATP de la síntesis de ureidos se estima en menos del 50% de lo que necesita la asparagina por átomo de nitrógeno; **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)** las leguminosas transportadoras de ureidos toleran mejor la presencia de nitrato o amonio en el medio radical.

2.7. Metabolismo carbonado

La sacarosa, es un disacárido formado por una molécula de glucosa y otra de fructosa, constituye la fuente de carbono que prioritariamente requiere el nódulo para llevar a cabo la fijación de nitrógeno, y procede de la fotosíntesis vía floema (Gordon *et al.*, 1987; Streeter 1987). A partir de librerías de ADNc de nódulos de *L. japonicus*, se ha identificado un gen *LjSUT4* que codifica para un transportador de sacarosa con un elevado grado de identidad con transportadores de sacarosa de otras plantas (Flemetakis *et al.*, 2003).

Una vez en el cortex nodular, la sacarosa difunde hasta el interior de las células de la zona infectada del nódulo. Debido a que la sacarosa no puede ser directamente utilizada por los bacteroides, esta debe ser hidrolizada en el citoplasma de la célula vegetal. Las rutas que se conocen para la hidrólisis de sacarosa en nódulos, están catalizadas por la invertasa alcalina y/o la sacarosa sintasa, ambas en el citosol nodular (Kahn *et al.*, 1998) siendo la actividad de esta última la prioritaria (Day y Copeland, 1991). Estas enzimas contribuyen de forma distinta en el metabolismo de la sacarosa según el estadio de crecimiento en el que se encuentre la planta (Koch 2004), de hecho, en un estudio de la actividad sacarosa sintasa e

invertasa alcalina a lo largo de la ontogenia del nódulo de *Vicia faba*, Ocaña *et al.* (1998), encontraron que durante el crecimiento vegetativo, la sacarosa sintasa era la principal enzima implicada en la degradación de sacarosa, mientras que en el periodo reproductor, la invertasa alcalina incrementaba su actividad compensando el descenso de la actividad sintasa.

La **sacarosa sintasa** es un homotetrámero mediante el cual, el disacárido es hidrolizado en UDP-glucosa y fructosa de forma reversible en una gran variedad de sumideros no fotosintéticos incluyendo al nódulo. Esta proteína representa en el nódulo una proporción significativa, del orden del 0.5 al 1%, siendo esta actividad en nódulo 70 y 20 veces mayor que en hojas y raíz respectivamente (Gordon *et al.*, 1999). La proteína está codificada por uno de los genes específicos del nódulo que se expresan durante el proceso de nodulación, se trata de la nodulina-100 (N-100), que se expresa en etapas avanzadas de la implantación y el establecimiento de la simbiosis (Thummler y Verna 1987).

Los productos resultantes de la reacción que cataliza, son utilizados para sustentar la fijación de nitrógeno, hecho que quedó demostrado en trabajos como: **1)** el de Anthon y Emerich (1990), que observaron que la actividad sacarosa sintasa aumentaba coincidiendo con el establecimiento de la fijación del nitrógeno y la aparición de la leghemoglobina; **2)** el de Gordon *et al.*, (1999) que utilizando mutantes de guisante deficientes en un 90% de la actividad sacarosa sintasa, fueron incapaces de realizar fijación de nitrógeno de forma efectiva; **3)** los realizados con nódulos de soja incapaces de fijar nitrógeno, en los cuales no se observó inducción de esta enzima (Xie *et al.*, 2003); **4)** y los estudios de hibridación *in situ* e inmunolocalización de la enzima, que demostraron que el ARNm de la misma, así como la proteína, se encuentran en células efectivas y no efectivas de la zona simbiótica de nódulos determinados e indeterminados (Gordon *et al.*, 1995; Van Ghelue *et al.*, 1996). Estas observaciones sugieren que la expresión de esta enzima en nódulos está estrechamente acoplada a la actividad nitrogenasa (Arrese-Igor *et al.*, 1999)

En los nódulos radicales, esta enzima puede relacionarse con cuatro funciones (Kahn *et al.*, 1998):

- a) Actúa en el paso inicial del metabolismo carbonado produciendo hexosas, que por distintas vías oxidativas producen la energía y el poder reductor utilizado por la nitrogenasa.

- b)** Los productos de la hidrólisis que cataliza, proporcionan sustratos carbonados que participan en la síntesis de aminoácidos a expensas del amonio producido por los bacteroides.
- c)** La UDP-glucosa puede integrarse en la síntesis de polisacáridos de la pared celular, necesaria en los momentos iniciales de la simbiosis y de otros azúcares y nucleótidos.
- d)** Este mismo producto de la hidrólisis puede ser convertido en ADP-glucosa, necesaria para la síntesis de almidón que se almacena en los amiloplastos de células infectadas y no infectadas.

La **invertasa** es una hidrolasa que degrada irreversiblemente la sacarosa en glucosa y fructosa (Copeland *et al.*, 1990). Varios estudios indican que las invertasas están implicadas en una gran variedad de procesos que incluyen: **a)** la formación de metabolitos secundarios (Baumert *et al.*, 2001; Arnold y Schultz 2002), **b)** la respuesta a estrés salino (Fukushida *et al.*, 2001; Balibrea *et al.*, 2003), **c)** la interacción planta-patógeno (Roitsch *et al.*, 2003), **d)** y las interacciones simbióticas, tales como planta-*rhizobium* (Chopra *et al.*, 2003) y planta-micorriza (Blee y Anderson 2002).

En función de su solubilidad, pH óptimo y punto isoelectrico se pueden distinguir tres tipos diferentes de isoenzimas de invertasas: la invertasa vacuolar, la asociada a pared celular, llamada también apoplástica, extracelular o periplásmica, y la citosólica. La invertasa vacuolar y la asociada a la pared celular tienen propiedades enzimáticas y bioquímicas similares, ambos tipos tienen un pH óptimo ácido y son glicoproteínas (Pagny *et al.*, 2003). La invertasa citosólica es también conocida como neutra o alcalina por su pH óptimo de 6.0-8.0, siendo esta clave en nódulos de leguminosas (Flemetakis *et al.*, 2006).

En la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, el conocimiento sobre el papel fisiológico de la invertasa citoplásmica alcalina es aún limitado, aunque ha sido purificada y caracterizada en nódulos de garbanzo, donde mostró una temperatura óptima de 37°C y un pH de 7.0, la K_m para la sacarosa fue 14.2 mM y la enzima se inhibió por varios iones metálicos (Asthir y Singh 1997). Esta invertasa, parece ser la principal enzima involucrada en la hidrólisis de sacarosa en nódulos inmaduros de soja, y su actividad específica se mantiene elevada durante el desarrollo del nódulo, en contraste con la

actividad sacarosa sintasa que es inapreciable en nódulos inmaduros y se incrementa con la actividad nitrogenasa (Anthon y Emerich 1990).

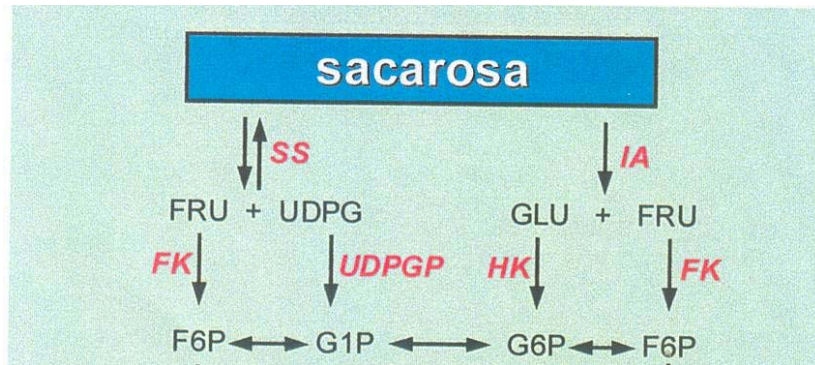


Figura 2 Vías de degradación de sacarosa en el nódulo.

La vía glucolítica se inicia con la glucosa y la fructosa producidas por la hidrólisis de la sacarosa que deben ser fosforiladas para formar las correspondientes hexosas-6P por kinasas específicas (Copeland y Turner 1987), **hexoquinasa** y **fructoquinasa** respectivamente. La glucosa-P y la fructosa-P, entran en esta vía o en la **vía oxidativa de las pentosas fosfato**. El producto final de la vía glucolítica, oxalacetato o pirúvico, viene determinado por la actividad relativa de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) o piruvato quinasa (Kahn *et al.*, 1998).

En nódulos de leguminosas la producción de oxalacetato está favorecida, debido a que la **fosfoenolpiruvato carboxilasa** es una enzima citosólica muy abundante en los nódulos (>1-2% de la proteína soluble), que cataliza la incorporación del CO₂ respiratorio, en forma de HCO₃⁻, en el fosfoenolpiruvato proveniente de la glucólisis (Gordon 1991). Una gran interdependencia entre la actividad PEPC y la nitrogenasa en el nódulo ha sido descrita por Schulze *et al.* (1998) y Nomura *et al.* (2006).

Se considera que esta enzima está involucrada en diferentes aspectos de la fijación de nitrógeno en nódulos de leguminosas, entre los que se incluyen:

- a) Síntesis de los ácidos orgánicos, málico y succínico, utilizados como sustratos respiratorios por los bacteroides (Rosendahl *et al.*, 1990) para el funcionamiento de la actividad nitrogenasa.

- b) Suministro de esqueletos carbonados para la asimilación del amonio. El oxalacetato es básico para formar aspartato y glutamina en nódulos productores de ureidos (Christeller *et al.*, 1977).
- c) Los ácidos orgánicos producidos pueden mantener el balance intracelular de pH y equilibrar el transporte de iones (Israel y Jackson 1982).
- d) Recicla el CO₂ procedente de la respiración, contribuyendo a la economía del carbono en los nódulos (Derroche y Carrayol 1988). Se estima que el 32% del carbono respirado es reasimilado en los nódulos por esta enzima (Rainbird *et al.*, 1984).

La PEPC nodular es de origen vegetal, debido a que no se detecta en bacteroides (Miller *et al.*, 1987), sin embargo su localización en el nódulo ha sido objeto de controversia; estudios inmunocitoquímicos han demostrado que la PEPC se encuentra tanto en células infectadas como no infectadas (Robinson *et al.*, 1996), aunque se ha descrito que las células no infectadas de nódulos de soja contienen una mayor actividad que las infectadas (Kouchi *et al.*, 1988).

La PEPC ha sido parcialmente purificada y caracterizada en nódulos de *Vicia faba*, comprobándose que la enzima es un homotetrámero con un peso molecular de 443 kDa, que mostró un pH óptimo de 8.25, además se demostró que su inhibición por malato o su activación por glucosa-6 fosfato dependían del pH en el que se desarrollara la reacción (Ocaña *et al.*, 1996). La enzima se encuentra sujeta a regulación postraduccional mediante una fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (Xu *et al.*, 2007), y alostericamente por metabolitos como la glucosa-6 fosfato y triosas fosfato que la activan, y malato y aspartato que la inhiben (Vance *et al.*, 1994), sin embargo, los mecanismos de regulación metabólica que determinan la interdependencia entre PEPC y nitrogenasa son poco conocidos.

El oxalacetato es rápidamente transformado en malato a través de actividad **malato deshidrogenasa** (MDH). Se ha confirmado en los nódulos la presencia de tres formas de MDH: citosólica, bacteroidal y mitocondrial (Garnczaska y Ratajczak 1999) cuyos genes se expresan entre 5 y 15 veces más que en el resto de los tejidos de la planta (Miller *et al.*, 1998). Estas isoformas tienen un papel crucial en el suministro de malato requerido por los bacteroides para llevar a cabo la fijación de N₂ (Vance 1997). Una

isoforma particular de MDH ha sido purificada en nódulos de alfalfa con unas características cinéticas que conducen la reacción hacia la producción de grandes cantidades de malato en nódulos (Miller *et al.*, 1998). El malato es el sustrato preferente para la fijación de nitrógeno (Delgado *et al.*, 1993), debido a que representa un potencial de adaptación a las condiciones de microaerobiosis existentes en el simbiosoma, que afectan a los ciclos oxidativos mitocondriales y citoplásmicos, aunque otros ácidos dicarboxílicos como el succinato y fumarato, son compuestos carbonados utilizados por el bacteroide (Ferri *et al.*, 2000; Soussi *et al.*, 2001).

El ácido oxalacético también puede ser metabolizado a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. La primera reacción que ocurre es la condensación del ácido oxalacético con acetil-CoA, formando el ácido isocítrico. La **isocitrato deshidrogenasa** (ICDH) cataliza la descarboxilación oxidativa del isocitrato a α -cetoglutarato, reacción acoplada a la reducción de un piridín nucleótido. Hasta ahora se han descrito cuatro isoformas de ICDH dependientes de NADP⁺ en plantas con diferente localización en la célula: mitocondrial, cloroplástica, peroxisomal y citosólica (Gálvez *et al.*, 1999).

Se ha propuesto a la ICDH como fuente de α -cetoglutarato que regula el flujo de carbono hacia las vías de asimilación del nitrógeno (Gallardo *et al.*, 1995), considerándose de especial importancia en nódulos de leguminosas para la síntesis de aminoácidos (Hanning y Heldt 1993; Gálvez *et al.*, 1999). La producción de NADPH es esencial en situaciones de estrés oxidativo, ya que el NADPH es necesario para el ciclo ascorbato-glutation, que reduce el peróxido de hidrógeno a agua (Hodges *et al.*, 2003). Recientemente se ha detectado la inducción de la expresión génica de la ICDH y el incremento en su actividad en nódulos de guisante en condiciones de estrés oxidativo, confirmando su papel clave en el reciclado de NADPH para alimentar el ciclo ascorbato-glutation (Marino *et al.*, 2007).

El intenso metabolismo de la sacarosa a ácidos dicarboxílicos acoplada a su uso por el bacteroide (fig. 3), refleja la adaptación simbiótica del metabolismo carbonado para la producción de energía en un ambiente bajo en oxígeno. Esta adaptación de la planta, implica el control y la expresión coordinada de tres enzimas críticas, la sacarosa sintasa, la fosfoenolpiruvato carboxilasa y la malato deshidrogenasa (Kahn *et al.*, 1998).

Algunos de los procesos que conlleva el metabolismo carbonado nodular están bien caracterizados, sin embargo, el metabolismo de la trehalosa en nódulos, su síntesis, degradación así como su función están poco estudiadas. Debe incidirse en que la trehalosa es un azúcar no estructural abundante en nódulos de algunas leguminosas, pudiendo llegar a constituir cerca del 1% del peso seco total del nódulo, además, a diferencia del resto de tejidos vegetales, los nódulos de las leguminosas presentan una alta actividad trehalasa, enzima responsable de la hidrólisis de trehalosa (Müller *et al.*, 1995b). Tanto la trehalosa como la trehalasa, podrían tener un papel regulador del metabolismo carbonado en plantas, interviniendo en el transporte de sustratos carbonados al nódulo (Müller *et al.*, 1999), lo cual resulta de interés primordial en el funcionamiento del bacteroide.

3. Trehalosa

3.1. Distribución y localización

La trehalosa es un disacárido no reductor formado por dos moléculas de glucosa unidas por un enlace α,α (α -D-glucopiranosil-1, 1- α -D-glucopiranosido) con una amplia distribución en la naturaleza. La trehalosa fue aislada por primera vez en 1832 por Wiggers como un azúcar desconocido procedente de un hongo que infecta al centeno (Panek 1991). Un cuarto de siglo después, el químico Berthelot descubrió el mismo azúcar en la cutícula del escarabajo *Larinus*, parásito de plantas, conocido como “trahalamana”, lo que inspiró a Berthelot para denominarlo “trehalosa” (Elbein 1974).

En general, la trehalosa se encuentra en diferentes organismos como levaduras, hongos, bacterias, insectos y otros invertebrados, así como en plantas vasculares como *Selaginella lepidophylla* (Rosa de Jericó) (Phillips *et al.*, 2002) o en plantas resistentes a la desecación como *Myrothamnus flabellifolius* (Bianchi *et al.*, 1993; Atar-Zwillenberg 1998). También se ha detectado trehalosa, aunque a bajas concentraciones en tabaco, patata y *Arabidopsis* indicando una mayor presencia en angiospermas (Goddijn y Van Dun 1999; Vogel *et al.*, 2001; Müller *et al.*, 2001b). Además, la trehalosa se acumula en ocasiones en plantas infectadas por patógenos (Brodmann *et al.*, 2002), en órganos simbióticos como raíces micorrizadas (Schubert *et al.*, 1992) o nódulos fijadores de nitrógeno (Streeter 1980).

Aunque algunos de los procesos que conlleva el metabolismo carbonado nodular están bien caracterizados, muchas rutas, su función y su regulación permanecen todavía desconocidas. Un ejemplo de ello se refiere al metabolismo de la trehalosa en nódulos, su síntesis, degradación así como sus funciones son poco conocidas. Debe incidirse en que la trehalosa es uno de los azúcares no estructurales abundante en nódulos de algunas leguminosas pudiendo llegar a constituir cerca del 1% del peso seco total del nódulo (Müller et al., 1995). Además a diferencia del resto de tejidos vegetales, los nódulos de las leguminosas presentan una alta actividad trehalasa, enzima responsable de la hidrólisis de trehalosa. Tanto la trehalosa como trehalasa, podrían tener un papel regulador del metabolismo carbonado en plantas, interviniendo en este sentido en el transporte de sustratos carbonados al nódulo (Müller et al., 1999), lo cual resulta de interés primordial para el funcionamiento del bacteroide.

3.2. Metabolismo

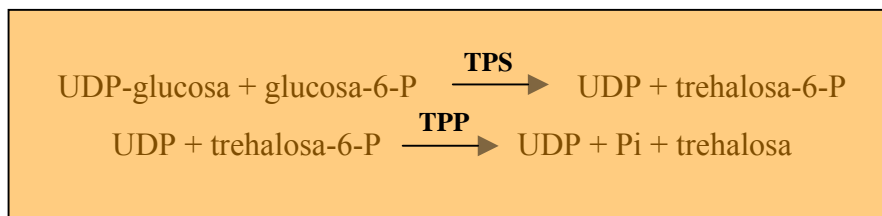
3.2.1. Biosíntesis

Se han propuesto tres rutas metabólicas independientes para la síntesis de trehalosa. La ruta más común es la de la trehalosa 6-fosfato sintasa (**TPS**), que forma trehalosa-6-fosfato a partir de UDP-glucosa y glucosa-6-fosfato con su posterior desfosforilación para formar trehalosa. Otras dos rutas adicionales para la síntesis de trehalosa fueron descritas durante la pasada década (De Smet *et al.*, 2000), en la primera de ellas intervienen una maltooligosiltrehalosa sintasa (**MOTS**) y una maltooligosiltrehalosa tetrahidrolasa, la segunda ruta comprende una reacción de transglucosilación sencilla, produciendo trehalosa a partir de maltosa por acción de una trehalosa sintasa (**TS**).

3.2.1.1. Vía trehalosa 6 fosfato sintasa: TPS

Cabib y Leloir (1958) describieron que la trehalosa en **levaduras** era sintetizada mediante una ruta análoga a la síntesis de la sacarosa a partir de UDP-glucosa y glucosa-6-fosfato en dos pasos, en el primero de ellos, la trehalosa-6-fosfato sintasa (**TPS**; UDP-glucosa: D-glucosa-6-P glucosiltransferasa) transfiere el residuo glucosil desde la UDP-glucosa a la

glucosa-6-fosfato para formar trehalosa-6-fosfato, en el segundo, la trehalosa-6-fosfato es transformada en trehalosa y fosforo inorgánico por una trehalosa-6-fosfato fosfatasa específica (**TPP**: trehalosa-6-fosfohidrolasa).



En *Saccharomyces cerevisiae*, ambas enzimas (TPS y TPP), forman un complejo multimérico denominado trehalosa sintasa junto con subunidades adicionales que regulan su actividad. La trehalosa-6-fosfato sintasa está codificada por el gen *tps1*, la trehalosa-6-fosfato fosfatasa por *tps2* y los componentes reguladores del complejo trehalosa-6-fosfato sintasa/fosfatasa por *tps3* y *tsl1* (Bell *et al.*, 1998).

En *Escherichia coli*, el segundo modelo mejor estudiado de esta ruta, trehalosa-6-fosfato sintasa y trehalosa-6-fosfato fosfatasa están codificados por los genes *otsA* y *otsB* (**o**smotic trehalose synthesis). La proteína OtsA tiene homología con la longitud total de TPS1, el extremo C-terminal de TPS2 y una región interna de TPS3, mientras que la OtsB tiene homología con el extremo C-terminal de TPS2, pero no con el resto de subunidades (Kaasen *et al.*, 1994). Genes homólogos de *otsA/B* o *tps/tpp* se han descrito en algunas enterobacterias y en *Mycobacterium* spp. (De Smet *et al.*, 2000).

La comparación de las secuencias de los genes *tps* y *tpp* de *E. coli* con bases de datos de secuencias de genes de **plantas**, reveló la presencia de genes homólogos en *A. thaliana* y *S. lepidophylla* (Van Dijck *et al.*, 2002) así como en arroz, tabaco patata y girasol (Goddijn y Van Dun 1999), de los que se demostró su funcionalidad mediante complementación de mutantes de levaduras incapaces de sintetizar trehalosa (Blázquez *et al.*, 1998; Vogel *et al.*, 1998). Los genes *AtTPS1*, *AtTPPA* y *AtTPPB* fueron clonados en *A. thaliana* (Vogel *et al.*, 1998; Eastmond *et al.*, 2002) y más recientemente en *Nicotiana tabacum* el de la trehalosa-6-fosfato fosfatasa (*NtTPPL*) (Wang *et al.*, 2005).

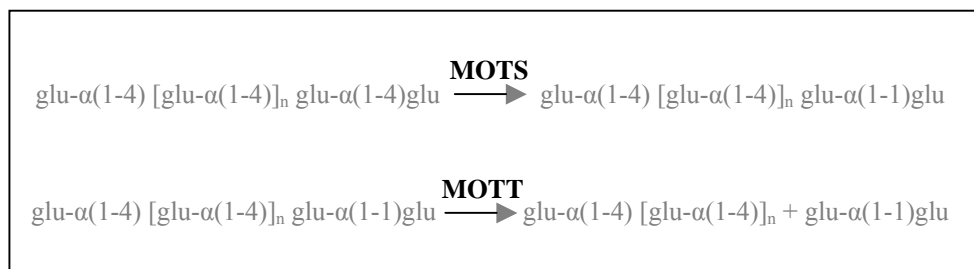
Salminen y Streeter (1986) publicaron la síntesis de trehalosa a partir de UDP-glucosa y glucosa-6-P en **nódulos** de soja por la vía de OtsA/B. Sin

embargo, el mismo grupo indicó la imposibilidad de obtener mutantes mediante inserción de transposones, incapaces de sintetizar trehalosa (Streeter y Bhagwat 1999), lo que indicaba la existencia de otras vías alternativas para la síntesis de trehalosa.

La síntesis de trehalosa por esta vía es muy variable entre las especies de *Rhizobium*: algunas producen cantidades insignificantes, mientras que otras acumulan cantidades que pueden oscilar entre el 90% y el 100% de los disacáridos (Streeter 1995). En *B. japonicum* la trehalosa es el principal carbohidrato entre los disacáridos acumulados, regularmente lo acumulan en la fase estacionaria, aunque las concentraciones pueden variar ampliamente (Streeter 1985). Sin embargo, Müller *et al.* (1994a) informaron de que existen cepas de *B. lupini* y *Rhizobium* sp. NGR234 que no acumulan trehalosa.

3.2.1.2. Vía maltooligosiltrehalosa sintasa: MOTS

Una ruta alternativa para la síntesis de trehalosa a partir de polímeros de glucosa fue identificada en *Arthrobacter* sp. cepa Q36 aislada del suelo (Maruta *et al.*, 1996a). La trehalosa es sintetizada por una transglucosilación intramolecular: el enlace α 1-4 terminal de una variedad de maltooligosacáridos con una longitud de cadena de 4 o más residuos, es transformado en un enlace α 1-1 por la maltooligosiltrehalosa sintasa (**MOTS**, codificada por el gen *treY*). El disacárido terminal es posteriormente separado por acción de una maltooligosiltrehalosa tetrahidrolasa (**MOTT**, codificada por el gen *treZ*), generándose una molécula de trehalosa (Maruta *et al.*, 1996a; Maruta *et al.*, 1996b):

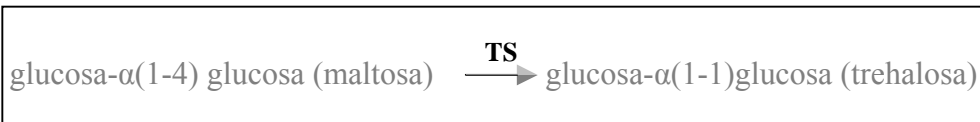


En experimentos realizados *in vitro* en *Rhizobium* sp, se ha comprobado que ambas enzimas (MOT sintasa y MOT tetrahidrolasa) son capaces de transformar la amilosa en trehalosa (Maruta *et al.*, 1996b).

Streeter y Bhagwat (1999) analizaron la capacidad de sintetizar trehalosa por esta vía en una gran variedad de especies de rizobios, describiendo la presencia de esta actividad en *B. japonicum*, *B. elkanii*, *Rhizobium* sp. NGR234, *S. meliloti*, *R. tropici*, *R. leguminosarum* bv *viciae*, *R. leguminosarum* bv *trifolii* y *Azorhizobium caulinodans*, no obstante, la síntesis de trehalosa a partir de maltooligosacáridos no pudo ser detectada en *R. tropici* o *R. etli*. Esta ruta ha sido descrita en otros organismos en los que se incluyen *Sulfolobus acidocaldarius* (Nakada *et al.*, 1995a, 1995b), *Brevibacterium hevolum* (Kim *et al.*, 2000) y *Mycobacterium* spp. (De Smet *et al.*, 2000).

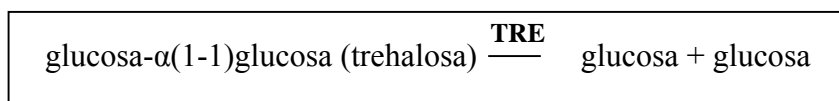
3.2.1.3. Vía trehalosa sintasa: TS

La vía trehalosa sintasa ha sido identificada en *Pimelobacter* sp. R48, *Thermus* spp. (Nishimoto *et al.*, 1995) y en *Mycobacterium* spp. (De Smet *et al.*, 2000). Como en la ruta MOTS, la trehalosa se forma por transglucosilación intramolecular. Tanto la proteína TreY (MOTS) como TreS (TS) catalizan una α -1,1-transglucosilación, aunque difieren en el número adicional de residuos de glucosa unidos al centro activo (De Smet *et al.*, 2000). En la vía TS, el enlace α (1-4) de la maltosa es transformado en α (1-1) de la trehalosa por acción de la actividad trehalosa sintasa codificada por *treS*:



3.2.2. Catabolismo

La trehalasa (α -glucosido-1-glucohidrolasa) degrada la trehalosa en dos unidades de glucosa en plantas, habiéndose detectado en numerosos organismos tanto procariotas como eucariotas (Elbein 1974). El gen que codifica para la trehalasa en diferentes órganos de la planta ha sido identificado en *A. thaliana* (Müller *et al.*, 2001b).



La actividad trehalasa se detecta en diferentes grupos taxonómicos en plantas superiores (Müller *et al.*, 1995b) manteniendo los niveles de trehalosa celular en concentraciones bajas para evitar la interacción de la acumulación de trehalosa en el metabolismo carbonado (Müller *et al.*, 1999).

Se ha postulado que la trehalasa podría desempeñar un papel en los mecanismos de defensa frente a patógenos, esta hipótesis se apoya en experimentos realizados con *A. thaliana*, en los que la expresión del gen de la trehalasa (*AtTRE1*) se indujo fuertemente cuando las plantas se infectan con un patógeno productor de trehalosa como *Plasmodiophora brassicae* (Brodmann *et al.*, 2002), también intervendría en la degradación de la trehalosa producida por microorganismos asociados a plantas, como rizobios en nódulos de leguminosas (Müller *et al.*, 1995b) o hongos micorrícicos asociados a raíces (Schubert *et al.*, 1992).

3.3. Funciones de la trehalosa en plantas

Dependiendo del sistema biológico, se han propuesto diversas funciones para la trehalosa. Entre estas se incluyen: fuente de carbono y energía en bacterias, reserva y transporte de carbohidratos en hongos, soluto compatible frente a estreses en bacterias y levaduras, componente de la pared celular en micobacterias y posible molécula señal en el flujo de carbono en plantas.

En plantas a la trehalosa se la relaciona con los siguientes procesos:

a) Estabilización de moléculas y estructuras celulares:

Su particular estructura determina que es un azúcar no reductor y con propiedades físicas muy interesantes como alta hidrofiliidad, estabilidad química y la ausencia de uniones internas de hidrógeno, estas características favorecen que al asociarse con las proteínas, no interfiera con la estructura de éstas, con lo cual, mantiene su forma y concentra el agua disponible cerca de ellas y por tanto protege, estabiliza y evita la alteración de moléculas proteicas y estructuras en las células, además puede ser rápidamente hidrolizada o metabolizada (Schiraldi *et al.*, 2002). Cuando la proteína está sujeta a condiciones desnaturalizantes, la trehalosa inhibe los

movimientos que conducen a este proceso y facilita su estabilización (Sampedro y Uribe 2004).

b) Reserva energética:

La trehalosa puede formar parte de la reserva de carbohidratos de la planta, puesto que se acumula en células y/o en órganos reproductores (Elbein 1974; Thevelein 1984).

c) Regula el crecimiento de la planta:

Vogel *et al.* (1998) sugirieron que la trehalosa o los intermediarios relacionados con su metabolismo, podrían actuar como reguladores del crecimiento y desarrollo en plantas. Esta sugerencia se basa en el comportamiento de plantas de tabaco que cuando sobreexpresan genes *tps* heterólogos de la síntesis de trehalosa procedentes de levaduras o de *E. coli*, muestran retraso en el crecimiento, se forman hojas aciculadas, crecimiento achaparrado además de efectos pleiotrópicos (Romero *et al.*, 1997). Incluso se ha descrito que la ausencia de trehalosa-6 fosfato sintasa en plantas de *A. thaliana*, impide el desarrollo embrionario (Gómez *et al.*, 2006), el inicio de la floración y retrasa la senescencia de la planta (Anja *et al.*, 2004).

d) Regula el metabolismo de carbohidratos:

Se ha comprobado que la trehalosa estimula tanto la síntesis de fructosa como la de sacarosa (Wagner *et al.*, 1986), lo que sugiere que puede influir en la síntesis de carbohidratos de reserva y en su distribución en la planta. Sin embargo, estudios más recientes han demostrado el papel del precursor de la trehalosa (trehalosa-6 fosfato) como molécula reguladora del metabolismo carbonado (Eastmond y Gram. 2003). Lunn *et al.* (2006) descubrieron que el aumento de los niveles de trehalosa-6 fosfato producían un aumento de la síntesis de almidón mediado por la ADP-glucosa pirofosforilasa, estos resultados apoyan el hecho de que la trehalosa-6 fosfato, actúe como molécula reguladora del contenido de azúcares en plantas, descrito previamente por Avonce *et al.* (2004), así como su papel en la mediación de los cambios en la tasa de síntesis de almidón (Kolbe *et al.*, 2005).

e) Regula la glucolisis:

La trehalosa-6 fosfato, precursor de la trehalosa, controla el flujo de la glucolisis, debido a que inhibe la hexoquinasa, jugando un importante papel en la regulación de las primeras etapas de este proceso oxidativo en plantas (Wingler 2002). Incluso, en mutantes de *A. thaliana* en ausencia del gen *tps* de la trehalosa-6 fosfato sintasa, se demuestra que mejora la acumulación de glucosa durante la maduración del embrión (Eastmond *et al.*, 2002).

f) Regula el metabolismo fotosintético:

Plantas transgénicas que expresan genes *tps* de *E. coli*, que codifican para la trehalosa-6 fosfato sintasa, exhiben un aumento del proceso fotosintético; sin embargo, se reduce cuando expresan genes *tpp*, que codifican para la trehalosa-6 fosfato fosfatasa (Paul *et al.*, 2001). Además, la trehalosa afecta a la actividad de enzimas involucradas en la acumulación de asimilados procedentes de la fotosíntesis como el almidón (Fritzius *et al.*, 2001) y la sacarosa (Müller *et al.*, 1998).

g) Protector frente al estrés:

Dentro de la versatilidad de la trehalosa, se la sitúa como protector en respuesta a diferentes condiciones de estrés, tales como calor, frío, estrés hídrico y salino en diversos organismos (Elbein *et al.*, 2003). Este efecto se ha observado en condiciones de estrés hídrico en plantas de judía (Farías-Rodríguez *et al.*, 1998) y de soja (Müller *et al.*, 1996) que acumularon trehalosa. Recientemente Bae *et al.*, (2005), han descrito un nuevo papel de la trehalosa en la protección frente al estrés mediante la inducción de proteínas de respuesta al estrés en *A. thaliana*. En los últimos años, han proliferado las plantas transgénicas con niveles de solutos compatibles incrementados (Rontein *et al.*, 2002), incluyendo la trehalosa, con el fin de obtener plantas más resistentes a condiciones de estrés (Penna 2003). La modificación de los niveles de trehalosa en los tejidos vegetales mediante la sobreproducción de la misma, ha sido llevada a cabo con éxito en arroz (Jang *et al.*, 2003) y en tabaco (Romero *et al.*, 1997; Pilon-Smits *et al.*, 1998; Romero *et al.*, 2002).

h) Otras funciones:

Es usada comercialmente como aditivo para la conservación de enzimas, durante la liofilización y la criopreservación celular, de hecho, la trehalosa ha sido legalizada como aditivo alimentario por el sistema de regulación europeo, siguiendo la aprobación de la US Food and Drug Administration (Schiraldi *et al.*, 2002).

3.4. Trehalosa en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa

3.4.1. Localización

En 1980 Streeter describió la presencia de trehalosa como carbohidrato mayoritario en nódulos de soja cuando es activo el proceso de fijación de nitrógeno, aunque fueron detectadas cantidades traza en otras partes de la planta. Se asumía que la trehalosa no era un disacárido frecuente en planta, por lo que se especuló que la trehalosa detectada en los diversos órganos del vegetal podría derivar del nódulo. Estudios posteriores, demostraron que la trehalosa estaba presente en otros nódulos de leguminosas estudiados. Así, Phillips *et al.* (1984) detectaron trehalosa en nódulos de soja (*Glycine max*), de trébol blanco (*Trifolium repens*), e incluso en los nódulos de no leguminosas como *Agnus glutinosa* y *Elaeagnus angustifolia*. Streeter (1985) también encontró acumulación de trehalosa en nódulos de cacahuete (*Arachis hypogenus*), alfalfa (*Medicago sativa*), judía (*Phaseolus vulgaris*), guisante (*Pisum sativum*), soja (*G. max*), trébol (*T. repens*) y *Lotus corniculatus*.

Se ha propuesto que la trehalosa en nódulos de leguminosas podría ser sintetizada por el bacteroide (Streeter 1987), en base a la observación de que entre los mono y disacáridos del nódulo, solo la trehalosa está presente en una concentración mayor en el bacteroide que en el citosol nodular. Este mismo autor también describió que en bacteroides aislados de nódulos de soja se sintetizaba trehalosa (Streeter 1985).

La distribución de la trehalosa en el nódulo varía según su etapa de desarrollo: en nódulos jóvenes el mayor contenido se localiza en el citosol vegetal, y solo una pequeña porción en bacteroides, en nódulos senescentes esta distribución es la opuesta, localizándose hasta un 90% de la trehalosa en los bacteroides (Streeter 1985), este incremento en la retención de

trehalosa por los bacteroides con la edad, podría ser indicativo de que su función varía durante el desarrollo del nódulo.

3.4.2. Metabolismo

La ruta de **biosíntesis** más estudiada en nódulos es la TPS cuya enzima clave es la trehalosa-6 fosfato sintasa, que es activa en bacteroides de nódulos de soja, no obstante, esta actividad varía según la cepa de rizobio utilizada para formar el nódulo, de hecho, los bacteroides formados por *B japonicum* 61A76, tienen 1.8 veces más actividad TPS que la detectada en bacteroides procedentes de la cepa de *B.japonicum* USDA 110 (Salminen y Streeter 1986). Esto se correlaciona con la relativamente alta acumulación de trehalosa encontrada en nódulos formados por la cepa 61A76 de esta misma bacteria (Streeter 1985).

La actividad trehalosa-6-fosfato fosfatasa, segunda enzima de la vía TPS, a diferencia de la trehalosa-6-fosfato sintasa, no es específica de bacteroides, encontrándose tanto en bacteroide como en el citosol de la célula hospedadora en proporciones similares (Salminem y Streeter 1986).

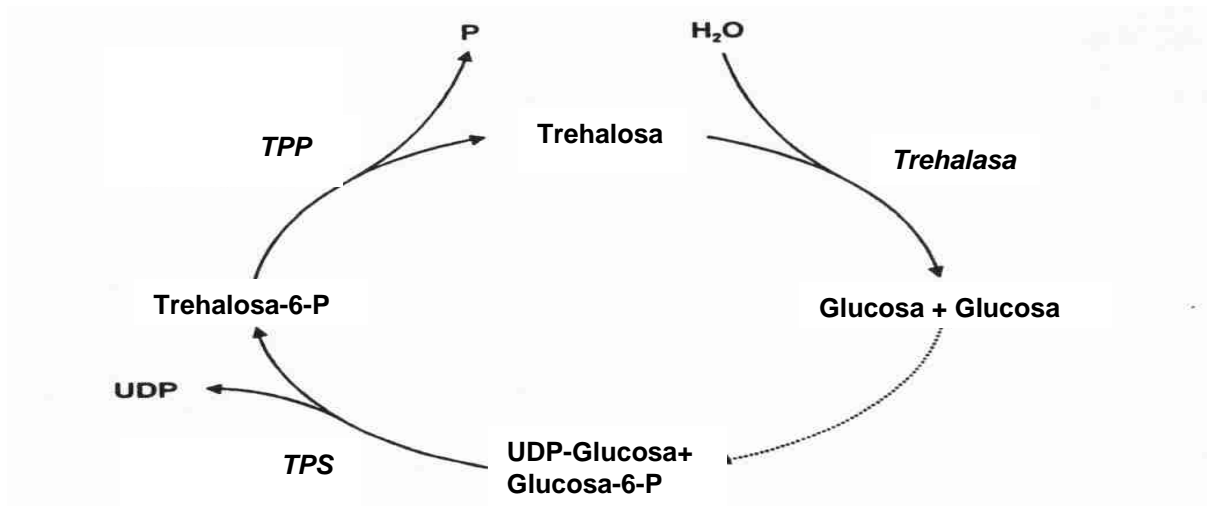


Figura 4. Metabolismo de la trehalosa en nódulos de leguminosas.

La **enzima degradadora** de trehalosa en los nódulos de soja es la **trehalasa**, según describieron Salminen y Streeter 1986, detectándose en bacteroides y citosol nodular, donde la actividad era mayor. Mellor (1988),

con nódulos de soja también, detectó mayor actividad trehalasa en el citosol, alguna en el espacio peribacteroideo y ninguna en bacteroide, en contraste, Kinnback y Werner (1991), trabajando con la misma especie de leguminosa, encontraron actividad trehalasa 8 veces superior en el espacio peribacteroideo que en el citosol nodular, por lo que la compartimentación de la trehalasa es bastante discutida. Sin embargo, se asume que la actividad trehalasa está asociada y potenciada en el nódulo y que se trata de una proteína de origen vegetal, que se encuentra en otros órganos de la planta con menor actividad, (Müller *et al.*, 1994a).

El peso molecular de la trehalasa purificada de nódulos de soja, determinado mediante electroforesis en geles de poliacrilamida SDS fue de 54 kDa, identificándose como un monómero, la caracterización de esta actividad enzimática, reveló que tiene dos pH óptimos que se sitúan en pH 3.8 y 6.6 (Müller *et al.*, 1992). Previamente se había sugerido que el pH ácido, carecía de relevancia fisiológica, excepto si la enzima estuviera asociada con la vacuola como se demostró en levaduras (Keller *et al.*, 1982), sin embargo, se ha detectado una acidificación del espacio peribacteroideo, debido a las ATPasas localizadas en la membrana peribacteroidea (Andreev *et al.*, 1999), y a la cadena de transporte electrónico respiratoria del bacteroide que bombean protones al espacio peribacteroideo, por lo cual el pH ácido podría tener una relevancia fisiológica en nódulos.

Entre los inhibidores específicos de la trehalasa nodular se encuentra la validamicina A, que previamente fue utilizada como un inhibidor altamente específico de trehalasas en hongos (Asano *et al.*, 1987), insectos (Asano *et al.*, 1990) y plantas (Kendall *et al.*, 1990; Goddijn *et al.* 1999). Este compuesto ha supuesto una herramienta útil para el estudio de las posibles funciones de la trehalasa en el metabolismo nodular, como demuestra el trabajo publicado por Müller *et al.* (1995a). El trehazolín también ha sido descrito como inhibidor específico de la trehalasa en experimentos realizados con la enzima purificada de gusanos de seda, no ejerciendo ningún efecto sobre otras glucosidasas (Ando *et al.*, 1995).

La trehalasa ha sido descrita en nódulos de *Lablab purpureus*, *Psophocarpus tetragonolobus*, *P. vulgaris*, *G. max*, *Lupinus albus*, *P. sativum*, *Vicia faba*, *Leucaena leucocephala*, *Vigna unguiculata*, *C. arietinum*, *T. repens* y *M. sativa*, no observándose correlación entre el contenido de trehalosa y la actividad trehalasa en nódulos de estas leguminosas, no

obstante, se ha evidenciado: **a)** la actividad trehalasa es mayor en nódulos efectivos que en nódulos inefectivos, **b)** la activación de esta enzima está más correlacionada con la fijación de nitrógeno que con la disponibilidad de sustrato, **c)** la regulación de la trehalasa en nódulos es más compleja que la mera inducción por el sustrato (Müller *et al.*, 1994a). Esta regulación no parece que ocurra a nivel transcripcional, debido a que el gen *GmTRE1*, que codifica para la trehalasa de nódulos de soja, se expresa a niveles bajos pero constantes en muchos tejidos (Aeschbacher *et al.*, 1999). En raíces de soja se ha demostrado que un tratamiento con la auxina incrementa la actividad trehalasa (Müller *et al.*, 1995a), por lo que la auxina producida por el microsimbionte, podría ser la inductora de la trehalasa en el nódulo.

Además de la trehalasa, se han detectado otras dos enzimas responsables de la degradación de trehalosa: **fosfotrehalasa**, que actúa sobre trehalosa-6-fosfato y forma glucosa y glucosa-6-fosfato, y la **trehalosa fosforilasa** que origina glucosa y β -glucosa-1-fosfato (Salminen y Streeter 1986). Es interesante señalar que cuando la trehalasa se encuentra en exceso y funciona la trehalosa-6-fosfato sintasa, se debe requerir una estrecha regulación y compartimentación de todas las enzimas catabólicas para que se produzca la acumulación de trehalosa en el nódulo.

3.4.3. Funciones

3.4.3.1. En rizobio en vida libre

a) Fuente de carbono:

La capacidad de crecer en un medio con trehalosa como única fuente de carbono es habitual en algunos rizobios, a excepción de ciertas especies de *Bradyrhizobium* (Glenn y Dilworth 1981; Streeter 1985). Incluso se han descrito dos transportadores de alta afinidad para la trehalosa en *S. meliloti* dependientes de uniones ATP-proteína, localizados en el periplasma (Willis y Walker 1999; Jensen *et al.*, 2002). Se ha demostrado que la trehalosa se encuentra presente en los exudados radicales de *M. sativa* (Phillips y Streit 1997) y por tanto la capacidad de utilizar trehalosa como fuente de carbono puede ser útil al rizobio, para competir por la colonización de la raíz (Jensen *et al.*, 2002).

b) Osmoprotector:

La acumulación de trehalosa se asocia con el incremento de la tolerancia de los rizobios frente a varios tipos de estrés (Argüelles *et al.*, 2000). Se ha identificado a la trehalosa como soluto compatible que se acumula durante la fase estacionaria en algunos rizobios en condiciones hiperosmóticas (Ghittoni y Bueno 1996; Dardanelli *et al.*, 2000). También se ha comprobado como la adición exógena de trehalosa estimuló el crecimiento de *S. meliloti* cultivado en situación de estrés salino (Gouffi *et al.*, 1999).

c) Adaptación a condiciones microaeróbicas:

Hoelzle y Streeter (1990), realizaron experimentos en base a la hipótesis de que la producción de trehalosa por rizobios en vida libre podría ser inducida en condiciones microaeróbicas, después de observar que *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *R. fredii* y *S. meliloti* no acumularon trehalosa, o solo niveles de 4.8 µg por mg de proteína, cuando crecieron con un 21% de oxígeno, mientras que cuando se cultivaron estas bacterias con 1% de oxígeno, se formó significativamente más trehalosa, hasta 85.6 µg por mg de proteína, no obstante, cuando la tensión de oxígeno fue de nuevo cambiada de 1% a 21%, la trehalosa acumulada fue metabolizada. Los mecanismos bioquímicos de acumulación de trehalosa en condiciones de tensión de oxígeno baja, podrían deberse a un incremento de la síntesis, a una disminución de la degradación o a ambos procesos.

3.4.3.2. En nódulo

La función de la trehalosa en el metabolismo nodular ha sido examinada a través de dos estrategias, que provocan la alteración de su nivel en el nódulo, bien por la adición del inhibidor de la trehalasa, o por la adición exógena de trehalosa (Müller *et al.*, 1995a; Müller *et al.*, 1998). En estas condiciones se ha podido deducir que la trehalosa puede actuar como análogo de la sacarosa, producto carbonado mayoritario en el nódulo, lo que podría inducir a alteraciones en el metabolismo carbonado afectando directamente al proceso de fijación de nitrógeno (Gordon *et al.*, 1997). En

estas observaciones, también se especula que la trehalosa pueda ser secretada por los bacteroides con el fin de influenciar el transporte de sacarosa al nódulo, favoreciendo la fijación de nitrógeno (Müller *et al.*, 1999), esta hipótesis se refuerza con el hecho de que los nódulos colonizados por cepas productoras de trehalosa, tienen menor cantidad de sacarosa y un aumento en las actividades sacarosa sintasa e invertasa alcalina (Müller *et al.*, 1998).

La acumulación de trehalosa en los nódulos, puede relacionarse con la protección frente a diversos factores abióticos como estrés salino, sequía o nitratos, (Müller *et al.*, 1996; Farías-Rodríguez *et al.*, 1998) En plantas de *M. sativa* infectadas con *R. meliloti*, las concentraciones de maltosa y trehalosa se incrementaron significativamente con 0.15M de NaCl, especialmente en raíces (4.6 y 3.5 veces respectivamente) y bacteroides (3.0 y 4.4 veces), sin embargo, estos azúcares permanecieron como compuestos minoritarios: menos del 2.5% del total de carbohidratos, por lo que la concentración era demasiado baja como para contribuir eficientemente a la osmorregulación (Fougère *et al.*, 1991).

En nódulos de soja, se ha descrito un incremento de trehalosa en condiciones de estrés hídrico, aunque esta acumulación era dependiente de la cepa de *Bradyrhizobium* utilizada en la inoculación (Müller *et al.*, 1996). En judía, el incremento de trehalosa durante el estrés hídrico, varió según la cepa de rizobio y el cultivar entre 2 y 48 veces; aquellos cultivares con más trehalosa en el nódulo, mostraron un elevado contenido relativo de agua en hoja y fueron más resistentes a la sequía (Farías-Rodríguez *et al.*, 1998).

En plantas noduladas de soja a las que se les aplicó nitrato, se produjo un descenso paralelo de la actividad nitrogenasa y del contenido de trehalosa en el nódulo (Müller *et al.*, 1994b), este hecho es análogo a la disminución de trehalosa observada en nódulos de soja cuando proceden de cepas mutantes fix- (Xie *et al.*, 2003), lo que demuestra la relación entre contenido de trehalosa en nódulo y proceso de fijación de nitrógeno.

4. Salinidad

Cualquier condición desfavorable o sustancia que afecte o bloquee el metabolismo, desarrollo o crecimiento de la planta puede considerarse como un estrés, que puede estar inducido por factores naturales o antropogénicos.

Se puede diferenciar el efecto que produce el estrés a corto plazo (*short term*) y a largo plazo (*long term*), considerándose 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 que eventualmente conllevaría la muerte de la planta (Lichtenthaler 1996).

4.1. Implicaciones agroambientales

La salinidad del suelo es uno de los factores ambientales que limita en mayor medida la distribución y productividad de los principales cultivos. Se calcula que aproximadamente la salinidad afecta al 20% de la tierra cultivable en el mundo y al 40% de la irrigada (Sahi *et al.*, 2006). Este es un problema característico de regiones clasificadas como áridas y semiáridas, que comprenden el 25% de la tierra total del planeta (Yamaguchi y Blumwald 2005), y que se considera endémico en el área mediterránea. Consecuentemente, el desarrollo de investigaciones que potencien el rendimiento de los cultivos en suelos salinos, representa una prioridad en la investigación actual.

En las últimas décadas se han realizado experimentos y estudios encaminados a lograr la tolerancia o adaptación de los cultivos a la salinidad a través de estrategias como: **a)** Técnicas convencionales de mejora y selección de genotipos tolerantes (Ashraf 2002); **b)** Identificación de marcadores o características agronómicas que confieran tolerancia como pueden ser la supervivencia y altura de la planta (Noble y Rogers 1992), el desarrollo del área foliar (Franco *et al.*, 1993), el control de daños en hojas (Munns 1993) y el mantenimiento de la tasa de crecimiento relativo (Cramer *et al.*, 1990); **c)** Mapeo de las regiones del genoma asociadas con la variación de rasgos cuantitativos, e identificación de marcadores moleculares que permitan la selección de especies o genotipos tolerantes (Yamaguchi y Blumwald 2005); **d)** Obtención de plantas transgénicas por introducción de genes o alteración de la expresión de otros ya existentes que afecten al grado de tolerancia a la salinidad (Yamaguchi y Blumwald 2005).

4.2. Salinidad en *Rhizobium* en vida libre

El incremento de la salinidad externa, conlleva efectos adversos sobre las poblaciones de rizobios debido al aumento de la concentración de iones en el citosol (Sleator y Hill 2001), a la salida de agua de la célula y por tanto la reducción del turgor celular. Un examen por microscopía óptica revela modificaciones en las células de *Rhizobium*, que presentan formas dilatadas, curvadas, espiraladas, alargadas o formando estructuras filamentosas. Zahran *et al.*, (1992) explican que estos cambios morfológicos de *Rhizobium*, vienen determinados por la inhibición de la división celular por el estrés salino. Además se han descrito otros cambios morfológicos y ultraestructurales en la célula bacteriana, observándose en el contenido celular una separación en zonas claras y oscuras (Zahran *et al.*, 1997), así como cambios en el patrón de polisacáridos extracelulares (Soussi *et al.*, 2001; Zahran 1999).

La respuesta a la salinidad es un fenómeno que implica numerosos procesos fisiológicos y bioquímicos, que se reflejan en cambios en la expresión y en la actividad de enzimas, proteínas y transportadores (Djordjevic *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2004). Rüberg *et al.* (2003) determinaron que una exposición prolongada de *S. meliloti* a 380 mM NaCl, provocaba una inhibición de la biosíntesis de aminoácidos, de la absorción de hierro, de la motilidad, la quimiotaxis y una activación de genes relacionados con biosíntesis de polisacáridos y el transporte de pequeñas moléculas como aminoácidos, aminas, péptidos, aniones y alcoholes. Domínguez-Ferreras *et al.* (2006) encontraron que en células de *S. meliloti* en condiciones de salinidad e hiperosmóticas, se producía la inducción de un gran número de genes cuya función era desconocida, siendo el 64% de estos de localización plasmídica, mientras que se reprimieron otros genes que en un 85% se localizaban en el cromosoma. Además se ha demostrado que cepas mutantes de *Rhizobium* con capacidad de adaptación limitada a condiciones de elevada salinidad, tienen deficiencias en su capacidad simbiótica (Nogales *et al.*, 2002).

4.2.1. Mecanismos de osmorregulación en *Rhizobium*

Una estrategia común de casi todos los organismos incluyendo los rizobios expuestos a ambientes hiperosmóticos, es el reestablecimiento de la

presión de turgor como consecuencia de la pérdida de agua, mediante la acumulación de elevadas cantidades de solutos orgánicos denominados solutos compatibles (Miller *et al.*, 1996; Zahran 1999), que contrarrestan la deshidratación celular sin interferir con el metabolismo de la célula (Yancey *et al.*, 1982). Los solutos compatibles que se acumulan en *Rhizobium*, tanto por síntesis de novo como por absorción del medio, son entre otros glutamato, prolina, ectoína, glucosilglicerol, glicina betaína o 3-dimetilsulfonio-propionato (Boncompagni *et al.*, 1999).

En rizobios, la trehalosa, ha sido descrita como osmolito compatible en respuesta al estrés salino (Galinski 1995; Leslie *et al.*, 1995). De hecho, en *S. meliloti* y *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, la trehalosa se acumula como osmolito en respuesta a 0.4 M NaCl y 0.23 M NaCl respectivamente (Breedvelt *et al.*, 1993). También en la cepa de *Bradyrhizobium* sp. USDA 3187 tolerante a la salinidad, se ha observado un aumento en la síntesis y acumulación de trehalosa en condiciones hiperosmóticas (Dardanelli *et al.*, 2000). En *S. meliloti*, se ha descrito una fase de crecimiento dependiente de la acumulación secuencial de diferentes solutos compatibles en respuesta a la salinidad, apareciendo la trehalosa durante la fase estacionaria como el tercer mayor osmolito acumulado (Talibart *et al.*, 1997).

Gouffi *et al.* (1999), estudiando el efecto de la adición de bajas concentraciones de trehalosa exógena junto con otros disacáridos en el medio de cultivo de *S. meliloti*, observaron que en condiciones de salinidad: **a)** la trehalosa junto con la sacarosa y la maltosa fueron capaces de restaurar la tasa de crecimiento de los cultivos estresados a niveles de crecimiento en condiciones normales, **b)** estos disacáridos fueron absorbidos desde el medio y metabolizados estimulando la síntesis de otros osmolitos como el glutamato, **c)** el nivel de trehalosa endógena acumulada permanece inalterado por la adición de trehalosa exógena.

4.3. Efecto de la salinidad en la planta

El efecto adverso de la salinidad en el crecimiento y desarrollo de la planta se debe a la combinación de dos componentes: el estrés osmótico provocado por la disminución de la disponibilidad de agua para la planta, y la toxicidad iónica relacionada con una excesiva absorción de iones como

Na⁺ y/o Cl⁻ (Munns 2002). Ambos componentes conllevan un rango de efectos entre los que se observan:

a) Inhibición del crecimiento de la planta:

La limitación del crecimiento se ha relacionado con un descenso en la tasa de expansión de las hojas asociada con una disminución de la división y elongación celular (Hasegawa *et al.*, 2000), también con la menor capacidad de la raíz para extraer agua del suelo (Alarcón *et al.*, 1994). Estos autores han evidenciado que en condiciones de salinidad, el crecimiento estaría regulado por el estado hídrico radical, que depende del potencial hídrico del suelo.

b) Alteración de las relaciones hídricas:

El cierre de los estomas es la respuesta más rápida de la planta a condiciones de salinidad, debido a la reducción de la presión de turgor en las células de guardia (Bartels y Sunkar 2005). Además se produce una disminución de la transpiración de la planta, con la consiguiente inhibición del transporte de nutrientes por el xilema desde la raíz (Hasegawa *et al.*, 2000).

c) Disminución de la fotosíntesis:

El proceso fotosintético es uno de los más afectados por la salinidad pudiendo deberse a factores relacionados con la disminución del transporte electrónico y de la fotofosforilación (Ortiz-López *et al.*, 1991), o bien asociados con la inhibición de las actividades enzimáticas estromáticas del cloroplasto (Kaise y Heber 1981), como la rubisco, enzima clave en la asimilación del carbono en la fotosíntesis, que presenta una gran sensibilidad a la elevada concentración de sales (Flowers *et al.*, 1977).

La cinética de emisión de fluorescencia por la clorofila refleja la funcionalidad del aparato fotosintético, habiendo demostrado ser un sistema rápido, preciso y no destructivo utilizado para conocer el daño causado en el aparato fotosintético por varios tipos de estreses entre los que se incluye la salinidad (Ranjbarfordoei *et al.*, 2006; Sixto *et al.*, 2006). Los parámetros de

emisión de fluorescencia por la clorofila a (F_0 , F_v/F_m y F_m) aportan información sobre el proceso fotoquímico en la fotosíntesis (Papageorgiou y Govindjee 2005), siendo la relación F_v/F_m el índice más utilizado ya que se encuentra directamente relacionado con la eficiencia fotoquímica del fotosistema II. La respuesta de emisión de fluorescencia de la clorofila al incremento de la salinidad en *Prunus dulcis*, cambió significativamente mediante un incremento en F_0 , F_0/F_m y un descenso de F_m , F_v/F_m (Ranjbarfordoei *et al.*, 2006). Éstas alteraciones en los parámetros de fluorescencia han sido descritos tanto en plantas anuales como perennes en condiciones de salinidad (Netondo *et al.*, 2004), donde se ha observado que la sal inhibe el transporte de electrones en el fotosistema II, y disminuye la relación F_v/F_m , con la consiguiente reducción del rendimiento cuántico máximo. La disminución de la clorofila es considerada como un marcador de estrés salino (Singh y Dubey 1995), por este motivo, la determinación del nivel de clorofila mediante un sistema no destructivo como el medidor SPAD, basado en la luz absorbida por la clorofila a 650 nm λ , permite conocer el daño causado por la salinidad al proceso fotoquímico (Torres-Netto *et al.*, 2002).

d) Desequilibrio nutricional:

En condiciones de elevada salinidad se observa una disminución de la relación K^+/Na^+ en las células, debido a la inhibición de transportadores de membrana en raíz dependientes del gradiente electroquímico generado por las ATPasas (Andreev *et al.*, 1997), y las interferencias causadas por el Na^+ con nutrientes como el K^+ y el Ca^{2+} (Zhu 1998). El exceso de Cl^- también produce un desequilibrio en el potencial de membrana así como en la regulación de los gradientes de pH intracelular (Phillip y Broadley 2001).

e) Estrés oxidativo:

Un efecto indirecto de la salinidad que provoca un adelantamiento de la senescencia de la planta, es el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno como el radical superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales hidroxilo (OH^\cdot), entre otras especies reactivas de oxígeno y/o nitrógeno (Apel y Hirt 2004). Para evitar la acumulación de estas moléculas, las plantas han desarrollado sistemas de eliminación que

incluyen moléculas antioxidantes como carotenoides, ascorbato, glutatión y tocoferol, y enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa, catalasa, ascorbato peroxidasa y glutatión reductasa (Bandeoglu *et al.*, 2004).

f) Alteración del metabolismo del nitrógeno:

La salinidad afecta tanto a la absorción del nitrato como a su asimilación debido a la alteración de las actividades enzimáticas implicadas en su reducción a amonio como la nitrato reductasa (Parida y Das 2004), así como las encargadas de la asimilación del amonio glutamato sintasa y glutamina sintetasa, cuya respuesta ante la salinidad varió entre diferentes especies y tejidos de la planta (Zhou *et al.*, 2004). También se observa una inhibición de la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos (Ullrich 2002).

g) Cambios hormonales:

En general, un incremento de la salinidad se asocia con un descenso en los niveles de auxinas, citoquininas y giberelinas en los tejidos de la planta, mientras que el nivel de ácido abscísico se incrementa (La Rosa *et al.*, 1987) lo que indica que estos cambios podrían estar implicados en procesos relacionados con la adaptación de la planta al estrés salino (Zhu 2002). Se ha sugerido que el ABA puede actuar como mediador en las respuestas de la planta a condiciones hiperomóticas, como en la estimulación de la síntesis de prolina (Ábrahám *et al.*, 2003), o la reducción del crecimiento (Mäkelä *et al.*, 2003). El tratamiento con ABA exógeno inhibe la abscisión de hojas e incrementa la tolerancia a la salinidad en cítricos (Gómez-Cárdenas *et al.*, 2003).

4.3.1. Mecanismos de osmorregulación en plantas

La adaptación a la salinidad es un proceso complejo que provoca una serie de respuestas en la planta como: el incremento en la expresión de determinados genes, acumulación de solutos compatibles, control de la homeostasis iónica, producción de antioxidantes y alteración transitoria del nivel de hormonas (Bartels y Sunkar 2005), entre otros posibles mecanismos:

a) Cambios en la expresión génica:

La respuesta al estrés salino induce cambios a nivel transcripcional y postranscripcional, implicando la activación de diversos genes específicos, incluyendo a algunos con efectos pleiotrópicos (Yang y Yen 2002). Estos genes se encuentran relacionados con diferentes procesos, como la percepción y señalización del estrés que lleva a cambios celulares, bioquímicos y morfológicos en la planta (Bartels y Sunkar 2005; Chinnusamy *et al.*, 2004; Vinocur y Altman 2005). El estudio de los perfiles de transcripción basados en el estudio de micro y macroarray, ha aportado cuantiosa información a cerca de los niveles de expresión de un gran número de genes que codifican para proteínas enzimáticas, relacionadas con la biosíntesis de osmolitos, factores de transcripción, helicasas, proteínas de unión al ARN, chaperonas, etc. (Mukhopdhyay *et al.*, 2004; Sottosanto *et al.* 2004; Taji *et al.*, 2004).

b) Acumulación de osmolitos

Como se ha comentado, también las plantas sintetizan solutos compatibles en respuesta al estrés salino (Burg *et al.*, 1996), se trata de moléculas no tóxicas como aminoácidos, glicina betaína, azúcares o polialcoholes que no interfieren con el metabolismo de la célula aunque se encuentren en elevadas concentraciones (revisado por Chen y Murata 2002). Estas moléculas intervienen en el mantenimiento de la presión de turgor (Yancey *et al.*, 1982) aunque se discuten otras funciones de estos solutos compatibles (Rhodes *et al.*, 2002).

Varios estudios fisiológicos han sugerido que en condiciones de estrés salino, carbohidratos no estructurales como la sacarosa, hexosas o polioles, se acumulan en diferente grado según las especies vegetales (Ashraf y Harris 2004). Además se ha observado una correlación entre la acumulación de pinitol y la tolerancia al estrés osmótico en plantas de soja (Streeter *et al.*, 2001), así como el papel de determinados azúcares en la tolerancia al estrés osmótico en experimentos con plantas de *A. thaliana* transformadas (Taji *et al.*, 2002). El incremento de la concentración de azúcares en muchos casos se relaciona con el aumento de la hidrólisis de almidón lo que requiere actividades enzimáticas hidrolíticas (Bartels y Sunkar 2005). La hipótesis actual es que los azúcares pueden actuar en la protección frente al estrés

osmótico al mismo tiempo que contribuyen a la estabilización de membranas y otras estructuras, no se sabe si por sí mismos o en conjunción con otras moléculas como las proteínas LEA (Bartels y Sunkar 2005).

Se han encontrado cantidades sustanciales de **trehalosa** en las llamadas plantas de resurrección *M. flavelifolia* y *Sporobolus stapfianus* (Phillips *et al.*, 2002), habiendo sido descrita como osmolito compatible y como osmoprotector (Hounsa *et al.*, 1998), también se le ha atribuido un efecto supresor de la muerte celular programada (Yamada *et al.*, 2003). Se han obtenido plantas de arroz transgénicas que sobreexpresan los genes *otsA* y *otsB* de *E. coli* para la síntesis de trehalosa, que acumularon de 3 a 10 veces más trehalosa que las no transformadas y con una mayor adaptación a la salinidad (Garg *et al.*, 2002). También se han obtenido plantas de tabaco transgénicas que sobreexpresaron el gen *TPS1* (trehalosa-6-fosfato sintasa) de levaduras, que mostraron un menor daño oxidativo y una mejor homeostasis iónica en condiciones de estrés salino (Romero *et al.*, 2002).

La **prolina** es acumulada por un gran número de plantas en respuesta al estrés hídrico y salino (Ashraf y Fooland 2007). Además del ajuste osmótico, se le han atribuido otras funciones como protección de la integridad de la membrana plasmática (Mansour 1998), sumidero de energía y poder reductor (Verbruggen *et al.*, 1996), fuente de carbono y nitrógeno (Peng y Verna 1996) o antioxidante (Hong *et al.*, 2000). Maggaio *et al.* (2002) defienden que la prolina puede actuar como molécula señal capaz de activar múltiples respuestas en el proceso de adaptación al estrés salino. Evidencias directas de la función de la prolina en el estrés osmótico se han obtenido mediante el uso de plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum*, *Oriza sativa* y *A. thaliana* (Hong *et al.*, 2000; Roosens *et al.*, 2002), en todos los casos las plantas presentaron elevadas cantidades de prolina que mejoraron su tolerancia al estrés. Sin embargo, la función de la prolina como osmorregulador ha sido cuestionada por Lutts *et al.* (1996), que encontraron que la prolina no intervenía en el ajuste osmótico en plantas estresadas de arroz, y que su acumulación parecía ser un síntoma del daño provocado por el estrés más que un indicador de la tolerancia a la salinidad. A pesar de estas observaciones, la concentración de prolina en muchas plantas tolerantes a la salinidad es mayor que en las plantas sensibles (Petruša y Winicov 1997).

Otros **compuestos nitrogenados** que actuarían como osmolitos compatibles en plantas en condiciones de estrés salino son: **glicinabetaína**, β -alaninabetaína, prolinabetaína, etc, conocidos como compuestos cuaternarios de amonio. En varias especies vegetales se ha encontrado una correlación entre el potencial osmótico de la hoja y estos compuestos, que además son conocidos por tener efectos osmoprotectores en la célula (Rhodes *et al.*, 1993). La glicina betaína es el más abundante en la plantas en condiciones de estrés salino (Mansour 2000; Ashraf y Fooland 2007), acumulándose en una gran variedad de cultivos incluyendo el arroz (Mohanty *et al.*, 2002). Las **poliaminas**, son también compuestos nitrogenados con dos o más grupos amino, las más comunes en plantas son la putrescina, espermidina y espermina (Mansour 2000). La contribución de las poliaminas al ajuste osmótico es pequeña en comparación con otros compuestos nitrogenados (Kakkar y Rai 1997), sin embargo en semillas de guisante, las tres moléculas de poliaminas disminuyeron el efecto negativo de la salinidad (Ivanova *et al.*, 1991).

c) Homeostásis iónica

El mantenimiento del equilibrio iónico en el citoplasma de las células es uno de los procesos clave en los mecanismos de tolerancia a la salinidad, debido a que en estas condiciones, los suelos contienen una elevada relación de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, Na^+/K^+ , $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ y $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ (Bartels y Sunkar 2005). Se ha prestado una especial atención en la hipótesis de que el Na^+ y el Cl^- puedan ser tóxicos para las plantas y causantes de un desequilibrio iónico, debido a la existencia de una correlación positiva entre tolerancia a la salinidad y la exclusión del Na^+ (Cramer 1992). En un ambiente hipersalino, mediado por una elevada concentración de NaCl, no solo se observa una perturbación de los niveles de Na^+ y Cl^- de la planta, sino que también se ven alterados los niveles de otros iones como el K^+ y el Ca^{2+} (Niu *et al.*, 1995). El desequilibrio iónico conllevaría además una disminución en la disponibilidad de nutrientes (Grattan y Grieve 1999), como se observa en los tejidos de la hoja donde la disminución de los niveles de K^+ y Ca^{2+} (Cramer 2002) podría deberse a diferentes causas: **1)** el antagonismo entre el Na^+ , y K^+ o Ca^{2+} por la entrada de la raíz (Hoire y Schroeder 2004), **2)** el efecto del Na^+ sobre el transporte de K^+ y Ca^{2+} en el xilema (Lynch y

Läuchli 1985) o **3**) la inhibición indirecta del proceso de absorción por la disminución de la actividad H⁺-ATPasa (Suhayda *et al.*, 1990).

Los transportadores de iones se considera que juegan un papel importante en los mecanismos de tolerancia a la salinidad regulando la homeostasis iónica (Apse y Blumwald 2002; Zhu 2003; Rus *et al.*, 2001). La ruptura de la homeostasis del K⁺, se debería a la capacidad del Na⁺ por competir en la unión al transportador de K⁺ (Hasegawa *et al.*, 2000), atenuando la adquisición de este nutriente esencial para las células, un ejemplo de ello sería el transportador AtHKT de *A. thaliana*, el cual es selectivo al Na⁺ y en menor medida al K⁺ (Uozomi *et al.*, 2000).

El mantenimiento de una elevada relación K⁺/Na⁺ en el citosol es un requerimiento clave para el crecimiento de las plantas en suelos con una elevada concentración de sal (Glenn *et al.*, 1999), para ello las plantas han desarrollado diferentes estrategias implicadas en prevenir el exceso de Na⁺ en la célula:

C.1 Restricción del transporte del Na⁺ en la planta, proponiéndose un modelo en el que el transportador selectivo para el Na⁺ AtHKT1, mediaría la carga y descarga de éste en el floema a nivel de hojas y raíces (Berthomieu *et al.*, 2003), desempeñando así un papel importante en el mecanismo de restricción al Na⁺ en el transporte a larga distancia, en condiciones de salinidad (Hoire y Schroeder 2004).

C.2 Compartimentación del Na⁺ en la vacuola mediante un antiporte Na⁺/H⁺ en el tonoplasto (Apse *et al.*, 1999). Este antiporte está impulsado por un gradiente electroquímico de H⁺ generado por una H⁺-ATPasa y una PP_i-asa del tonoplasto (Blumwald 1987). La sobreexpresión de *AtNHX1*, un antiporte vacuolar Na⁺/H⁺ en *A. thaliana*, favoreció que las plantas fueran capaces de crecer en una elevada concentración de sal (Apse *et al.*, 1999), también en arroz la sobreexpresión de un gen homólogo *OsNHX1* le confirió un incremento de tolerancia a la salinidad (Fukuda *et al.*, 2004).

C.3 Exclusión del Na⁺ al medio externo vía membrana plasmática por un antiporte Na⁺/H⁺, que a semejanza del antiporte vacuolar Na⁺/H⁺, está impulsado por una H⁺-ATPasa de membrana que genera un gradiente electroquímico de protones permitiéndole funcionar (Pardo *et*

al., 2006). La sobreexpresión de *AtSOS1* que codifica para un transportador Na^+/H^+ de membrana plasmática en *A. thaliana*, mejoró la tolerancia a la salinidad restringiendo la permeabilidad del Na^+ y disminuyendo su acumulación en las células de la planta (Shi *et al.*, 2003)

Experimentalmente, se ha evidenciado la implicación del Ca^{2+} en los mecanismos de adaptación a la salinidad. Un aporte exógeno de Ca^{2+} , reduce el efecto tóxico del NaCl, presumiblemente facilitando una mayor relación K^+/Na^+ (Liu y Zhu 1997) y potenciando la señal de transducción del estrés, lo que conduce a una adaptación a la salinidad (Sanders *et al.*, 1999). Condiciones de elevada salinidad también conducen a un incremento en el Ca^{2+} citosólico, que es transportado desde el apoplasto a compartimentos intracelulares (Knight *et al.*, 1997).

4.4. Efecto en la simbiosis

Se ha observado que las leguminosas de origen templado, que presentan nódulos indeterminados, son más tolerantes a la sal que las leguminosas tropicales, dada su capacidad para regenerar las zonas afectadas por el estrés (Bordeleau y Prévost 1994). Sin embargo, se ha demostrado también la recuperación de nódulos determinados sometidos a este tipo de estrés (James *et al.*, 1993). La salinidad limita la productividad en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, debido a su efecto adverso tanto en la planta como en el nódulo.

4.4.1. En la leguminosa

Los efectos negativos de la salinidad en leguminosas afectan a procesos como:

a) Nutrición mineral de la planta:

En este sentido, se ha comprobado que un suplemento de B y Ca recupera el balance nutricional en plantas de guisante, con el consiguiente incremento de la tolerancia a la salinidad y el desarrollo y función del nódulo (El-Hamdaoui *et al.*, 2003). Concretamente, se ha observado una

relación entre el descenso en el contenido de Fe, provocado por la salinidad, que puede ser revertido por el B y Ca (Bolaños *et al.*, 2006). Tejera *et al.* (2006) indicaron que una mayor tolerancia a la salinidad en diferentes cultivares de garbanzo en condiciones simbióticas, estaba relacionada con el mantenimiento de una elevada relación K/Na, y una reducción de la acumulación de Na en las hojas. Resultados similares se obtuvieron en cultivares de *P. vulgaris* que lograron mantener una elevada relación K/Na mediante la exclusión del Na en la parte aérea (Khadri *et al.*, 2007). Cordovilla *et al.* (1995a) observaron en la simbiosis *R. leguminosarum*-*V. faba* en condiciones de salinidad y nitratos un efecto antagónico entre la entrada de Na y K, que condujo a un descenso de los niveles de K, también observaron que la adquisición de Ca y K fue similar en raíz y parte aérea, mientras que la absorción de Mg, mostró diferencias notables entre ambos órganos. En un estudio realizado con *V. faba*, *P. sativum*, *G. max* y *P. vulgaris*, la salinidad indujo cambios en la distribución de los macronutrientes, que varió en función de su sensibilidad, las dos leguminosas más sensibles, *V. faba* y *P. sativum*, acumularon Ca y Mg en la parte aérea y Na en toda la planta, por el contrario, *G. max* y *P. vulgaris* acumularon Mg en raíces y Ca en parte aérea y raíz simultáneamente (Cordovilla *et al.*, 1995b).

b) Eficiencia fotosintética:

Se ha confirmado que la fijación de nitrógeno en nódulos de soja, conlleva un incremento del proceso fotoquímico, para cubrir los requerimientos energéticos del nódulo, habiéndose detectado un mayor “quenching” fotoquímico (Maury *et al.*, 1993), sin embargo, en condiciones de estrés salino se ha detectado un descenso significativo de la eficiencia fotoquímica del fotosistema II en plantas de *M. sativa*, junto con una disminución del contenido de clorofila, tasa de asimilación de dióxido de carbono y conductancia estomática (Smethurst y Zavala 2003). También en *P. vulgaris* se ha detectado un efecto negativo por la salinidad en la eficiencia del fotosistema II junto con una disminución del contenido de clorofila (Olivera 2003).

4.4.2. En el nódulo

El efecto negativo de la salinidad afecta a diferentes procesos como:

a) Infección y desarrollo del nódulo:

Se ha observado que la salinidad provoca una alteración en la estructura del pelo radical y una inhibición de los puntos de unión de rizobios a los pelos radicales (Zahran y Sprent 1986), así como una disminución en el número (Craig *et al.*, 1991) y tamaño de los nódulos (Hafeez *et al.*, 1988).

b) Respiración nodular:

Se ha podido constatar que en nódulos de plantas de soja y alfalfa expuestas a NaCl, la respiración nodular se altera, disminuyendo drásticamente su actividad (Serraj *et al.*, 1994; Serraj y Devron 1998). También en bacteroides de judía (Ferri *et al.*, 2000) y guisante (Delgado *et al.*, 1994) la respiración bacteroidal se reduce por la salinidad, detectándose además cambios en los ácidos dicarboxílicos utilizados como sustratos respiratorios en estas condiciones.

c) Efectividad de la nitrogenasa:

Se especula que la salinidad pueda causar una serie de alteraciones en el funcionamiento del nódulo que afectaría a la nitrogenasa como: cambios en la permeabilidad a la difusión de oxígeno, habiéndose propuesto por varios autores un modelo osmótico de regulación de la permeabilidad del cortex nodular al oxígeno (Purcell y Sinclair 1994; Serraj 2002), o el descenso del suministro de fotoasimilados por el floema debido a la reducción de la actividad fotosintética (Serraj 2002), aunque no parece ser el mayor factor implicado en la inhibición de la nitrogenasa (Soussi *et al.*, 1998).

d) Asimilación del amonio:

Las enzimas implicadas en este proceso como la glutamina sintetasa y la NADH-glutamato sintasa disminuyeron su actividad en nódulos de *V. faba*, detectándose en la primera de ellas una mayor sensibilidad a la

salinidad (Cordovilla *et al.*, 1994). El mismo efecto también se observó en nódulos de *C. arietinum* con una dosis 100 mM NaCl (Soussi *et al.*, 1998), y en los de *P. vulgaris*, donde además se observó una disminución de la actividad xantina deshidrogenasa y uricasa, implicadas en el metabolismo de purinas, con la consiguiente reducción del contenido de ureidos e incremento del contenido de aminoácidos en nódulos (Khadri *et al.*, 2001).

e) Metabolismo carbonado:

Concretamente se ha detectado un descenso en la actividad sacarosa sintasa en nódulos de guisante en condiciones de estrés salino (Fernández-Pascual *et al.*, 1996), así como la implicación de esta enzima en la respuesta a un amplio rango de estreses abióticos en los nódulos de soja (Arrese-Igor *et al.*, 1999), que afectaron negativamente a la fijación de nitrógeno (Gordon *et al.*, 1997). También se ha observado una inhibición de la actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa y malato deshidrogenasa en distintas variedades de judía a las que se les aplicó el tratamiento salino al inicio del cultivo (Pliego *et al.*, 2001), mientras que en nódulos de guisante (Delgado *et al.*, 1993) y garbanzo (Soussi *et al.*, 1998) estas actividades se indujeron con la sal, lo que se relacionó con una mayor tolerancia de estas especies a la salinidad.

f) Producción de especies reactivas de oxígeno:

Los nódulos de leguminosas tienen un elevado potencial para producir especies reactivas de oxígeno, debido al ambiente reductor en el que se encuentran (Gorgocena *et al.*, 1995). Los tiol-tripéptidos, el glutatión y el homoglutatión entre otros, tienen múltiples funciones, incluyendo la protección contra la toxicidad de los radicales libres, habiendo sido los tres genes implicados en la síntesis de glutatión y homoglutatión caracterizados en nódulos de *L. japonicus* presentándose como genes de copia única en el genoma (Matamoros *et al.*, 2003a). Además de las especies reactivas de oxígeno, Matamoros *et al.* (2003b), recoge el término de especies reactivas de nitrógeno para referirse a moléculas como el óxido nítrico o el peroxynitrito, de gran importancia en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. El hierro es potencialmente tóxico ya que puede catalizar la formación de radicales hidroxilo, por lo que debe estar perfectamente equilibrado para

evitar su toxicidad, por este motivo en el nódulo se encuentra abundantemente una proteína llamada ferritina, capaz de actuar como un reservorio de hierro para la síntesis de nitrogenasa y leghemoglobina, evitando de esta forma su efecto tóxico (Matamoros *et al.*, 2003b). La acumulación de especies reactivas de oxígeno, se encuentra relacionada con el proceso de senescencia del nódulo y junto con hormonas como el ácido abscísico, coordinan los mecanismos moleculares implicados en este proceso (Puppo *et al.*, 2005). Los niveles de catalasa nodular están correlacionados con la eficiencia de la fijación de nitrógeno, mientras que la superóxido dismutasa y la dehidroascorbato reductasa parecen estar implicadas en los mecanismos de tolerancia de los nódulos a la salinidad (Tejera *et al.*, 2004).

II. OBJETO

La salinidad en suelo y aguas de riego provoca un efecto adverso en los cultivos agrícolas, especialmente en zonas áridas o semiáridas. En estas condiciones el crecimiento de la planta está condicionado por una menor disponibilidad de agua, un desequilibrio nutricional provocado por la toxicidad iónica específica, o una combinación de estos procesos. El exceso de sales en el suelo también constituye un factor limitante para el crecimiento y actividad de las bacterias del suelo que forman simbiosis con leguminosas, colectivamente llamadas rizobios.

La simbiosis que se establece entre cultivos de leguminosas y los rizobios, obtiene el nitrógeno procedente de la atmósfera mediante la llamada fijación biológica del nitrógeno. La sensibilidad de este proceso al estrés salino, requiere la adaptación de ambos simbios. Es conocido que la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa es más sensible a la sal y al estrés osmótico que el rizobio, puesto que al incrementarse la osmolaridad extracelular se inhibe el crecimiento y supervivencia de la bacteria en el suelo, afectándose el proceso de infección y el desarrollo del nódulo, así como su funcionamiento y por tanto la capacidad de fijar nitrógeno. Se ha puesto de manifiesto que el incremento de la tolerancia por parte de la bacteria puede mejorar el funcionamiento de la simbiosis en condiciones de estrés salino, y por tanto, el crecimiento de la planta en tales condiciones adversas.

La adaptación de las plantas a la salinidad es un fenómeno complejo que involucra cambios morfológicos y del desarrollo, acompañados por la modificación de procesos fisiológicos y metabólicos. Entre los mecanismos de respuesta al estrés osmótico, uno de los más comunes es la acumulación de solutos compatibles intracelulares, que incluso en altas concentraciones no interfieren con los procesos celulares vitales. Además, algunos solutos compatibles son efectivos estabilizantes de enzimas y estructuras macromoleculares, proporcionando protección frente a otros estreses como altas temperaturas, congelación o desecación.

La trehalosa es un disacárido (α -D-glucopiranosil α -D-glucopiranosido), reconocido como osmoprotector que se sintetiza en diversos organismos, como levaduras, hongos, bacterias, y en plantas vasculares, donde se acumula cuando estos están expuestos a diversas condiciones de estrés. Este disacárido no abunda en plantas, aunque la

enzima que lo hidroliza, la trehalasa, sí se ha encontrado en tejidos y órganos vegetales de algunas especies.

Está bien establecido que los rizobios, transformados en bacteroides en el interior de los nódulos de las leguminosas, sintetizan trehalosa en diferentes cantidades dependiendo de la especie bacteriana, y que parte de esta trehalosa es exportada al citosol nodular. Al contrario que en el resto de tejidos vegetales, los nódulos de las leguminosas presentan una elevada actividad trehalasa, que probablemente es inducida por la trehalosa producida por el microsimbionte. Trehalosa y trehalasa pueden desempeñar un papel regulador del metabolismo carbonado nodular, sugiriéndose que la trehalosa del microsimbionte transformado en bacteroide, controlaría el transporte de sustratos carbonados producidos por la planta (sacarosa) como fuente de energía para llevar a cabo la fijación de nitrógeno atmosférico. Por tanto, la trehalosa podría actuar como molécula señal en el metabolismo de carbohidratos del nódulo en condiciones de estrés salino, al considerarla análoga de la sacarosa, debido a la relación existente entre los niveles de trehalosa y las actividades sacarosa sintasa e invertasa alcalina nodular.

En leguminosas, los estudios a nivel celular y molecular en relación con la tolerancia de la simbiosis a la sal son limitados. La capacidad de los nódulos radicales de mantener una fijación de nitrógeno eficiente en condiciones adversas, viene determinada por los procesos energéticos, respiración nodular y bacteroidal, y la exportación e importación de asimilados. En los mecanismos de adaptación de leguminosas simbióticas al estrés salino, interviene el intercambio de solutos compatibles con capacidad osmoprotectora entre la planta y el microsimbionte. Es interesante por tanto, considerar el papel de los azúcares, y en especial el de la trehalosa, presente en cepas de *Rhizobium* y en nódulos de leguminosas, así como el de la trehalasa de la planta inducida en el nódulo. Por ello, la finalidad de este trabajo es conocer cómo los mecanismos de adaptación de los simbioses, bacteria y planta, al estrés osmótico, pueden conjugarse para mejorar el rendimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa en condiciones de estrés salino.

Este trabajo se ha llevado a cabo en dos simbiosis modelo: la establecida entre *M. truncatula*-*S. meliloti*, en la que se forman nódulos determinados, y la formada por *L. japonicus*-*M. loti*, con nódulos determinados. Ambos tipos de nódulos muestran diferencias en su génesis,

en su anatomía final, y en el metabolismo nitrogenado. Por otra parte, las dos especies de leguminosas implicadas son consideradas modelos en estudios genómicos, proteómicos y transcritómicos, siendo además especies forrajeras de interés agronómico y ecológico, ya que pueden ser cultivadas en suelos deteriorados y/o con problemas de salinidad.

El objetivo general se ha abordado con distintos estudios:

a) Inicialmente, se ha estudiando **la tolerancia a la salinidad en ambas simbiosis en experimentos en los que el NaCl se adicionó al inicio del cultivo (*long-term*)**, para determinar el rango de concentración de sal que afecta al crecimiento de la planta, al proceso simbiótico, al metabolismo carbonado nodular, al proceso fotosintético y al estado nutricional del cultivo.

b) A continuación, se abordó en las dos simbiosis propuestas **el efecto de NaCl cuando los nódulos están formados** (simbiosis establecida), es decir, adicionado en el crecimiento vegetativo, estudiándose la evolución a lo largo de la ontogenia de los procesos metabólicos antes mencionados, centrandó la atención en cuatro estados fenológicos del desarrollo de la planta.

c) Se ha completado este bloque de experimentos con el **estudio del efecto de la validamicina A** (inhibidor de la trehalasa) en ambas simbiosis, puesto que esta puede favorecer la acumulación de trehalosa en el nódulo y mitigar el efecto negativo de la sal.

d) Se finaliza con la **purificación, caracterización y expresión del gen de la trehalasa nodular** procedente de nódulos determinados e indeterminados.

Éste objetivo general se complementa con dos tipos de experimentos:

a) En el primero de ellos se aborda un **estudio comparativo entre cuatro simbiosis** formadas por la cepa parental de *S. meliloti* 1021 con *M. sativa* y tres cepas isogénicas **alteradas en distintas vías de síntesis de trehalosa**, cedidas por el Dr. Juan Sanjuán (Estación Experimental de Zaidín-CSIC).

b) En el segundo se estudia el efecto del NaCl en el crecimiento y **metabolismo de la trehalosa en *B. japonicum* USDA 110**, y en el **metabolismo de la trehalosa bacteroidal y citosólico** en nódulos de soja durante las estancias realizadas en el laboratorio del Dr. J.G. Streeter en el Centro de Investigación y Desarrollo Agrícola de la Universidad Estatal de Ohio (EE.UU.).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material biológico

1.1. Microorganismos

Las cepas de *Sinorhizobium meliloti* GR4 (Casadesus 1979) y *Mesorhizobium loti* R7A (Sullivan et al., 1995) proceden del Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental de Zaidín (Consejo Superior de Investigaciones Científicas). Para inocular *Phaseolus vulgaris* se utilizó *Rhizobium tropici* CIAT899, originaria del CIAT (Colombia), la cual fue seleccionada según trabajos previos de Zúñiga (1997). La cepa *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, utilizada en el experimento con *G. max* y en vida libre procede del US Department of Agriculture Beltsville *Rhizobium* Culture Collection. Además se utilizó la cepa *Sinorhizobium meliloti* 1021 (parental) y tres mutantes en la síntesis de trehalosa: ots-, mots-, ots-mots- (doble mutante), que fueron construidas por la doctoranda D^a Ana Domínguez Ferreras, perteneciente al grupo dirigido por el Dr. Juan Sanjuán Pinilla del Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental de Zaidín (CSIC).

1.1.1. Medios de cultivo

El medio de cultivo empleado en el crecimiento, preparación de los inóculos y conservación de las cepas de *S. meliloti*, *M. loti* R7A y *R. tropici* CIAT 899 fue TY descrito por Beringer (1974) y cuya composición se expone a continuación.

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
pH	7.0

El medio de cultivo para el crecimiento de *B. japonicum* USDA 110 fue:

Medio AG	
Arabinosa	1.0 g
Gluconato	1.0 g
Extracto de levadura	1.0 g
Agar (medio sólido)	15.0 g
Agua destilada	1000 ml
pH	7.0

Para el cultivo de las cepas de *E. coli* se ha utilizado el medio de Luria-Bertani (LB, Miller, 1972):

Medio LB	
Triptona	10.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
NaCl	5.0 g
Agar (medio sólido)	15.0 g
Agua destilada	1000 ml
pH	7.0

El pH se ajustó con NaOH. La esterilización se llevó a cabo en autoclave, a 117 °C durante 20 min.

1.1.2. Antibióticos

La adición de antibióticos a los medios de cultivo se hizo a partir de soluciones concentradas de los mismos en agua desionizada o, en caso de la tetraciclina y del cloranfenicol, en agua-etanol al 50%. La esterilización de los antibióticos se llevó a cabo mediante el empleo de unidades de filtración Minisart[®] NML (Sartorius), de 0.2 µm de tamaño de poro.

1.1.3. Conservación de las cepas bacterianas

En la conservación de las bacterias para uso rutinario se utilizaron placas de petri, las cuales se mantuvieron a 4°C y se resembraron 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 en glicerol al 20 % (v/v).

1.1.4. Curvas de crecimiento de *Bradyrhizobium japonicum*

El estudio del efecto de la sal sobre el crecimiento de *B. japonicum* se realizó añadiendo 0 y 40 mM NaCl al medio de cultivo, los cultivos se incubaron a 30°C en agitación (225 rpm) en tubos de ensayo (3 tubos/tratamiento) que contenían 5 ml de medio, inoculados a partir de preinóculos crecidos durante 4 días. El crecimiento se determinó mediante lectura de la absorbancia (D.O.) a 600 nm de longitud de onda, las lecturas se realizaron cada 24 h desde el inicio del cultivo.

Simultáneamente se retiraron alícuotas de cada tubo para determinar el número de unidades formadoras de colonias en cada momento. Para ello se prepararon diluciones seriadas y siembra de 0.1 ml de las diluciones en placas (3 placas/dilución) de medio AG, las placas se incubaron a 30°C.

1.2. Material vegetal

Las especies vegetales utilizadas fueron *Medicago truncatula* var. R108 suministradas por el Dr. A. Kondorosi (INRA París, Francia), *Lotus japonicus* var. Gifu suministrada por J. Stougaard (Universidad de Aarhus, Dinamarca), *Phaseolus vulgaris* var. Contender, *Medicago sativa* (Semillas Bolivar) y *Glycine max* var. Flint

1.2.1. Solución nutritiva para plantas

La solución nutritiva utilizada para el cultivo de *M. truncatula*, *M. sativa* y *P. vulgaris* fue la descrita por Rigaud y Puppo (1975).

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	0.120 mg
Agua		1000 ml	

Para el cultivo de *L. japonicus* se utilizó la solución nutritiva de Hornum (Handberg y Stougard 1992):

Macronutrientes		Micronutrientes	
KH ₂ PO ₄	0.100 g	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.8 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.300 g	MnSO ₄ ·2H ₂ O	1.2 mg
CaCl ₂	0.200 g	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.4 mg
Na ₂ FeEDTA	0.025 g	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.4 mg
		H ₃ BO ₃	1.2 mg
Agua		1000 ml	

Para el cultivo de *G. max* se utilizó la solución nutritiva (Streeter 1985):

Macronutrientes		Micronutrientes	
KH ₂ PO ₄	35 mg	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	10 mg
K ₂ HPO ₄	10 mg	MnSO ₄ ·H ₂ O	1.7 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	60 mg	CuSO ₄ ·5H ₂ O	2.5 mg
K ₂ SO ₄	90 mg	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.5 mg
CaCl ₂	110 mg	CoSO ₄ ·6H ₂ O	0.5 mg
MgCl ₂	50 mg	H ₃ BO ₃	2 mg
Na ₂ FeEDTA			
Agua		1000 ml	

El pH de la solución se ajustó a 6.8 con NaOH. La esterilización se llevó a cabo a 117 °C durante 30 min.

2. Cultivo de plantas

El cultivo de plantas de *M. truncatula*, *M. sativa* y *L. japonicus* se llevó a cabo en semilleros con 60 pocillos de 200 ml de capacidad utilizando vermiculita como sustrato inerte, que permite un adecuado desarrollo radical gracias a su porosidad. La vermiculita se esterilizó en autoclave a 117°C durante 1 h, mientras que los semilleros y las bandejas se esterilizaron en una solución de lejía al 20%. Los semilleros se colocaron sobre bandejas en las que se vertía la solución nutritiva que ascendía por capilaridad.

Para la **obtención de semillas** de *M. truncatula* y *L. japonicus* se establecieron cultivos en las condiciones anteriormente descritas. Teniendo en cuenta que en *M. truncatula* el inicio de la floración coincidió con la 6°

semana de cultivo y en *L. japonicus* con la 8ª semana, el tiempo de generación en ambas especies fue de algo más de 3 meses.

Las plantas de *P. vulgaris* se cultivaron en jarras Leonard modificadas (Leonard 1943) de 1.5 l de capacidad, con vermiculita como sustrato inerte. Las jarras 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. Una vez preparadas las jarras se esterilizaron en autoclave a 117°C durante 1.5 h. En cada jarra se sembraron 2 semillas pregerminadas.

Las plantas de *G. max* se cultivaron en macetas de cerámica con aproximadamente 4 l de arena de cuarzo. Las macetas con la arena se autoclavaron antes de la siembra, en cada maceta se sembraron 12 semillas.

2.1. Esterilización y germinación de las semillas

Las semillas de *M. truncatula* y *L. japonicus* fueron previamente **escarificadas** mediante inmersión en ácido sulfúrico concentrado (96%) durante 5 min, posteriormente se lavaron con abundante agua estéril para proceder a su esterilización.

Las semillas de *M. truncatula* fueron esterilizadas con hipoclorito de sodio comercial al 5 % (v/v) durante 3 min y a continuación se lavaron varias veces con abundante agua destilada estéril, con objeto de eliminar los restos de la solución esterilizante, se pregerminaron en placas de agar-agua al 0.8% y se mantuvieron en oscuridad 48 h a 12°C.

Las semillas de *L. japonicus* se esterilizaron en una solución de hipoclorito de sodio al 20% adicionada con Tween 20 al 2% (v/v) durante 20 min, a continuación se lavaron varias veces con abundante agua destilada estéril, se pregerminaron en las condiciones mencionadas anteriormente y se mantuvieron en oscuridad 4 días a 28°C.

La esterilización de las semillas de *M. sativa* se realizó en superficie por inmersión en HgCl₂ al 2.5% durante 10 min, trascurrido este tiempo, se lavaron con agua estéril y se dejaron en imbibición durante 2 h, la pregerminación se realizó tal como se ha descrito para *M. truncatula*.

Las semillas de *P. vulgaris* fueron esterilizadas con hipoclorito de sodio al 5% (v/v) durante 3 min, a continuación se lavaron varias veces con abundante agua destilada. Tras este proceso se dejaron en imbibición durante 2 h y posteriormente se trasladaron a semilleros de vermiculita estéril convenientemente humedecida. 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 28°C en estufa de germinación.

Las semillas de *G. max* se esterilizaron en una solución de etanol al 70% (v/v) durante 10 min antes de su siembra en el sistema de cultivo descrito en el apartado 2.

2.2. Preparación del inóculo

Los inóculos de *S. meliloti* GR4, *M. loti* R7A y *R. tropici* CIAT 899, se obtuvieron a partir de cultivos frescos crecidos en medio sólido durante 72 h a 30°C, los de *B. japonicum* USDA110 requirieron 7 días. Las bacterias, fueron posteriormente crecidas en medio líquido a 30°C hasta alcanzar una densidad óptica equivalente a una suspensión bacteriana de aproximadamente 10^9 células viables ml^{-1} . Las plantas fueron inoculadas con 1ml de esta suspensión en el momento de la siembra.

2.3. Siembra e inoculación

Las semillas pregerminadas de *M. truncatula*, *M. sativa* y *L. japonicus* se colocaron de una en una en cada pocillo del semillero, aplicándose a cada una de ellas 1 ml del inóculo correspondiente. Una vez inoculadas se cubrieron con vermiculita y sobre la superficie de la vermiculita se colocó una capa de perlita estéril, que disminuye el riesgo de contaminación y las pérdidas de agua por evaporación. Se realizaron reinoculaciones durante las 3 semanas sucesivas al inicio del cultivo para las tres especies indicadas.

Las semillas pregerminadas de *P. vulgaris* se colocaron en las jarras Leonard, cubriéndose con vermiculita y una capa de perlita estéril, cada semilla se inoculó con 1 ml de cultivo de *R. tropici* CIAT 899.

Las semillas de *G. max* se sembraron tras su esterilización a 1 cm de profundidad en la arena de cuarzo previamente humedecida y esterilizada, a cada semilla se le adicionó 1 ml de cultivo de *B. japonicum* USDA110.

2.4. Condiciones de la cámara de cultivo

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

- Fotoperiodo: 16 h luz/ 8 h oscuridad.
- Temperatura: 23 °C día/ 18 °C noche \pm 1°C.
- Humedad relativa: 55 % día/ 75 % noche.
- Intensidad luminosa: 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (400-700 nm) en la superficie de las macetas, suministrada por lámparas fluorescentes Sylvania Cool-White (F72T12-CW-VHO) y lámparas incandescentes de 40 vatios (30 % del total de vatios).

Los semilleros y las jarras se distribuyeron sobre la mesa de cultivo completamente al azar, cambiándose de forma periódica de lugar. En las bandejas se añadió solución nutritiva estéril cada dos días.

Las plantas de soja fueron cultivadas en invernaderos provistos de un sistema de ventilación que mantuvo la temperatura entre 28° y 21°C días/noche.

3. Experimentos realizados

3.1. Simbiosis *M. truncatula*-*S. meliloti* y *L. japonicus*-*M. loti*:

a) Efecto del estrés salino desde el inicio del cultivo (*long-term*)

Se estudió la respuesta de las simbiosis con diferentes dosis de sal (0, 25 y 50 mM NaCl). Las plantas se recolectaron en el periodo de fructificación, (10 semanas *M. truncatula* y 12 semanas *L. japonicus*). El experimento se realizó dos veces, determinándose los siguientes parámetros:

- Análisis de crecimiento: peso seco de parte aérea (PSPA), raíz (PSR) y total por planta (PSP), relación raíz/parte aérea (RPA).

- Fijación de nitrógeno y nodulación: actividad nitrogenasa aparente (ANA) y total (ANT), tasa de fijación de nitrógeno (TFN), peso seco (PSN) y peso normalizado de nódulos (PNN) y contenido de leghemoglobina (Lb).
- Actividades enzimáticas del metabolismo carbonado y de la trehalosa en nódulo: sacarosa sintasa (SS), invertasa alcalina (IA), hexoquinasa (HK), fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), malato deshidrogenasa (MDH), isocitrato deshidrogenasa (ICDH), trehalosa-6 fosfato sintasa (TPS), trehalosa-6 fosfato fosfatasa (TPP) y trehalasa (TRE).
- Contenido de azúcares solubles totales (Ast), almidón (Alm), aminoácidos (Aa) y prolina (Pro) en hoja, raíz y nódulo, y sacarosa, maltosa, fructosa, glucosa y trehalosa en nódulo.
- Estado nutricional: concentración y contenido de nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, sodio y cloro en parte aérea y raíz.
- Actividad fotosintética: fluorescencia inicial (F_0), fluorescencia máxima (F_m), relación F_0/F_m , rendimiento fotosintético (F_v/F_m), contenido de pigmentos fotosintéticos (Ca, Cb, xantofilas+catotenos y pigmentos totales) y clorofila en unidades SPAD.

b) Evolución ontogénica del crecimiento, fijación de nitrógeno y del metabolismo carbonado nodular: efecto del NaCl (*short-term*)

Se estudió el efecto del NaCl aplicado a la solución nutritiva cuando el proceso simbiótico (nódulo) está establecido, y se siguió la evolución de distintos parámetros relacionados con el crecimiento, fijación de nitrógeno y el metabolismo carbonado nodular en cuatro estados fenológicos del cultivo: **crecimiento vegetativo, periodo de floración, inicio de fructificación y plena fructificación**. El experimento se realizó dos veces, determinándose en cada estadio fenológico los siguientes parámetros:

- Análisis de crecimiento, fijación de nitrógeno y actividades enzimáticas del metabolismo carbonado en general y de la trehalosa en particular en citosol nodular, mediante los parámetros que se indican en el apartado 3.1.
- Contenido de azúcares solubles totales, almidón, aminoácidos y prolina en hoja y nódulo, y sacarosa, fructosa, glucosa y trehalosa en nódulo.

- Actividad fotosintética: contenido de pigmentos fotosintéticos (Ca, Cb, xantofilas+carotenos y pigmentos totales).

c) Influencia de la validamicina A en condiciones de salinidad

La validamicina A es un inhibidor de la actividad trehalasa que podría favorecer la acumulación de trehalosa y alterar el metabolismo nodular cuando el NaCl está en el medio. Los tratamientos que se ensayaron fueron: **1)** control, **2)** 30 μ M validamicina A, **3)** 50 mM NaCl y **4)** 30 μ M validamicina A + 50 mM NaCl, que se aplicaron a la solución nutritiva desde el inicio del cultivo. La recolección se llevó a cabo en el inicio de floración: 6 semanas para *M. truncatula* y 8 semanas para *L. japonicus*. Los experimentos se repitieron dos veces y en todos ellos se realizaron las siguientes determinaciones:

- Análisis de crecimiento, nodulación, fijación de nitrógeno y actividades enzimáticas del metabolismo carbonado y de la trehalosa en particular en citosol nodular tal como se indica en el apartado (3.1).
- Contenido de azúcares solubles totales, almidón, sacarosa, fructosa, glucosa y trehalosa en nódulo.
- Actividad fotosintética: fluorescencia inicial (F_0), fluorescencia máxima (F_m), relación F_0/F_m , rendimiento fotosintético (F_v/F_m) y contenido de pigmentos fotosintéticos (Ca, Cb, xantofilas+carotenos y pigmentos totales).

3.2. Estudio comparativo entre cepas isogénicas de *S. meliloti* con la biosíntesis de trehalosa alterada en simbiosis con *M. sativa* en respuesta a la salinidad

Se utilizan cuatro cepas de *S. meliloti*, en dos de ellas las vías de síntesis de trehalosa TPS y MOTS habían sido mutadas (ots-, mots-), en la tercera las dos vías anteriores eran inactivas (doble mutante), y la cepa parental 1021 que se utilizó como control. En todas las simbiosis se aplicó 40 mM NaCl al inicio del cultivo, manteniéndose un control sin sal. La recolección se realizó al inicio de la floración. Se determinaron parámetros relacionados con:

- Crecimiento de las plantas, fijación de nitrógeno y actividades enzimáticas del metabolismo carbonado en general y de la trehalosa en particular en nódulo como se indica en el apartado (3.1).
- Contenido de sacarosa, fructosa, glucosa, maltosa y trehalosa en nódulo.

3.3. Estudio bioquímico y molecular de la trehalasa nodular

3.3.1. Purificación y caracterización de la trehalasa de nódulos de *Phaseolus vulgaris* y *Medicago sativa*

Plantas de *P. vulgaris* var. contender inoculadas con *R. tropici* CIAT 899, se cosecharon a los 32 días (floración), y se separaron los nódulos, que se conservaron en congelador a -80 C . La purificación se llevó a cabo mediante los siguientes pasos: **1)** precipitación con sulfato de amonio, **2)** separación por columnas de intercambio iónico, **3)** separación por columna de gel filtración y **4)** separación por electroforesis en geles de poliacrilamida nativa y SDS.

La caracterización de la enzima purificada consistió en:

- a) Determinación del peso molecular.
- b) Comportamiento frente al pH, sustratos orgánicos e iones metálicos.
- c) Termoestabilidad y temperatura óptima de la enzima.
- d) Representación de Lineweaver-Burk de la curva de saturación de la trehalasa frente al sustrato para obtener K_m y V_{max} .

Además se llevó a cabo la obtención de anticuerpos policlonales y la titulación de los mismos para la **inmunodetección** de la proteína en extractos crudos de hoja, raíz nódulo y flor de *P. vulgaris*.

3.3.2. Clonación y estudio de la expresión del gen que codifica para trehalasa en *M. truncatula* en salinidad

La clonación del gen de la trehalasa se realizó a partir de ADNc de nódulos de *M. truncatula* utilizando cebadores específicos con los que se amplificó mediante PCR un fragmento de 774 pares de bases, que codifica

258 aa de la proteína. Para el estudio de la expresión de este gen en diferentes órganos de *M. truncatula*, se llevaron a cabo experimentos de RT-PCR a partir de preparaciones de ARN obtenidas de nódulos, raíces y hojas. Como control de expresión constitutiva se utilizó el ARN ribosómico 18S y además se incluyó un gen de expresión nodular *Mtenod40*.

Para el estudio de la expresión del gen de la trehalasa (*MTTRE1*) en condiciones de salinidad, se cultivaron plantas de *M. truncatula* inoculadas con *S. meliloti* GR4, como se indica en el apartado 2 de esta sección. A las 7 semanas de cultivo (floración avanzada), las plantas fueron extraídas del semillero, sumergiendo la raíz en solución nutritiva a la que se adicionó las dosis 150 mM y 250 mM de NaCl, incluyéndose siempre un control sin sal. En cada tratamiento se recolectaron los nódulos a las 2, 4, y 8 horas de aplicación del NaCl, y fueron inmediatamente congelados en nitrógeno líquido. A partir de este material se obtuvo el ADNc para llevar a cabo los correspondientes análisis de expresión mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

3.4. Metabolismo de la trehalosa en *Bradyrhizobium japonicum* en vida libre y en simbiosis con *Glycine max* en ambiente salino

Para los estudios en vida libre se utilizó la cepa de *B. japonicum* USDA 110 que creció en medio AG (1.1.1.) y con 0 y 40 mM NaCl. Los estudios en simbiosis se realizaron con plantas de soja inoculadas con *B. japonicum* USDA 110 tratadas con 100 mM NaCl dos semanas antes de su cosecha, en ese momento se valoró el crecimiento y nodulación de la planta y se procedió a aislar bacteroides del nódulo.

a) Las determinaciones realizadas con bacterias en **vida libre** fueron:

- Curvas de crecimiento, determinándose el la D.O. y las unidades formadoras de colonias (UFC), así como el contenido de trehalosa en las diferentes fases de crecimiento de los cultivos de *B. japonicum*.
- Actividades implicadas en la síntesis de trehalosa en *B. japonicum* USDA 110.

b) Las determinaciones realizadas en **simbiosis** fueron:

- Análisis de crecimiento y nodulación de las plantas: peso seco parte aérea, raíz, planta completa, nódulos y relación raíz/parte aérea y peso normalizado de nódulos.
- Actividades enzimáticas del metabolismo de la trehalosa en bacteroides: trehalosa sintasa, maltooligosiltrehalosa sintasa y trehalosa-6 fosfato sintasa y en citosol nodular la actividad trehalasa.
- Contenido de sacarosa, maltosa, glucosa y trehalosa en citosol nodular.

4. Metodología empleada

4.1. Recolección de las plantas

En la recolección de plantas de *M. truncatula*, *M. sativa* y *L. japonicus*, se seleccionaron de forma aleatoria 10 plantas de las 60 existentes por tratamiento, en las que se determinó los parámetros relacionados con el crecimiento y la actividad nitrogenasa. Para ello, se aislaron los nódulos de cada planta, se separó la raíz de la parte aérea, se registró su peso fresco, y a continuación, se procedió al secado del material vegetal en estufa de corriente forzada de aire a 70°C durante 24 h, pasado este tiempo, se determinó el peso seco de cada órgano.

El resto de plantas se extrajeron de los semilleros, se lavaron las raíces con abundante agua para eliminar los restos de vermiculita, en cada tratamiento se separaron tres grupos de plantas de forma aleatoria para realizar repeticiones y se separó parte aérea, raíz y nódulos, el material vegetal se conservó a -80°C hasta su posterior utilización en las determinaciones metabólicas y analíticas.

La recolección de plantas de *P. vulgaris* y *G. max* se realizó por el mismo procedimiento descrito, conservando únicamente los nódulos de *P. vulgaris* a -80°C, mientras que con los de *G. max* se procedió después de su cosecha a llevar a cabo las determinaciones indicadas en el apartado 3.6.

4.2. Fijación de nitrógeno

4.2.1. Desarrollo nodular

Una vez secado el material vegetal en estufa con corriente forzada de aire a 70°C, se determinó el peso seco de los nódulos mediante la obtención de un factor PS/PF calculado a partir de varias muestras pesadas cada día antes y después del secado.

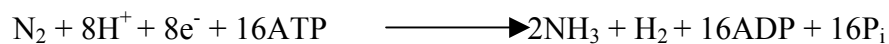
Se calculó el **peso normalizado de nódulos (PNN)**:

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

Este parámetro es el resultado de dividir el peso seco de nódulos por el peso seco de la parte aérea. Los resultados se expresan en mg PSN mg⁻¹ PSPA.

4.2.2. Actividad nitrogenasa

El ensayo para la determinación de la actividad fijadora de nitrógeno se realiza mediante el análisis de intercambio de gases según Witty y Minchin (1998), consistente en la medición de la evolución de H₂ que se produce junto con la reducción de N₂ a NH₃ de acuerdo con la siguiente ecuación:



La medida del H₂ producido por los nódulos en una corriente de aire proporciona la actividad nitrogenasa aparente (ANA), ya que solo dos de los ocho electrones son empleados para la producción de H₂, mientras que el resto se utiliza para reducir el N₂ a NH₃. Para medir la actividad total de la nitrogenasa (TNA), se pasa una corriente de Ar/O₂ en una proporción 80/20% a través de los nódulos. En este caso todos los electrones son usados para la producción de H₂. Para determinar la tasa de fijación de N₂ se utiliza la ecuación:

$$\text{Tasa de fijación de N}_2 = (\text{TNA} - \text{ANA})/3$$

Se pone 3 en el denominador porque para reducir N_2 a NH_3 se requieren tres pares de electrones, mientras que la reducción de H^+ a H_2 requiere solo de un par de electrones.

4.2.3. Leghemoglobina

El contenido de leghemoglobina en nódulos se determinó por fluorimetría según el método de La Rue y Child (1978). Para la preparación de los extractos se maceraron 0.3 g de nódulos con 6 ml de medio de extracción (ferricianuro de potasio 0.02% y bicarbonato de sodio 0.1%) y posteriormente el homogenizado se centrifugó a 23000 g. La concentración de leghemoglobina en el sobrenadante se determinó después de incubar 0.05 ml de extracto con 3.15 ml de ácido oxálico a 120°C durante 30 min. La fluorescencia de las muestras se registró en un fluorímetro Shimadzu RS-540 a la longitud de onda de excitación de 405 nm. Los resultados se expresaron como mg de leghemoglobina g^{-1} PF.

4.3. Aislamiento de bacteroides de nódulos

Los nódulos de *G. max* se pesaron y maceraron en un mortero a 4°C con tampón fosfato 100 mM pH 7.5, adicionado con manitol 150 mM, DTT 2 mM y EDTA 1 mM, en una proporción 1/2 (p/v). Después de su filtrado a través de una gasa, el homogenado se centrifugó a 500 g durante 10 min, a fin de eliminar todos los restos de tejido. A continuación, el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se centrifugó de nuevo a 6000 g durante 10 min, obteniéndose así el sobrenadante, y el pellet que contenía los bacteroides. El sobrenadante fue de nuevo centrifugado a 48000 g para su utilización como **extracto crudo de proteína del citosol nodular**.

Los bacteroides se lavaron mediante su resuspensión en el tampón donde se homogeneizaron los nódulos, y se volvieron a recoger por centrifugación a 6000 g durante 10 min. Finalmente los bacteroides se resuspendieron en tampón Tris 10 mM pH 7.5 que contenía $MgCl_2$ 40 mM, KCl 10 mM, EDTA 3 mM y DTT 1mM. La suspensión de bacteroides se sonicó en un baño de hielo usando un sonicador Branson (modelo 350) con un 50% de pulso durante 10 min, para lo que se añadió 50 μ l de Triton X-100 al 1% y facilitar así la ruptura de las membranas. La mezcla sonicada se

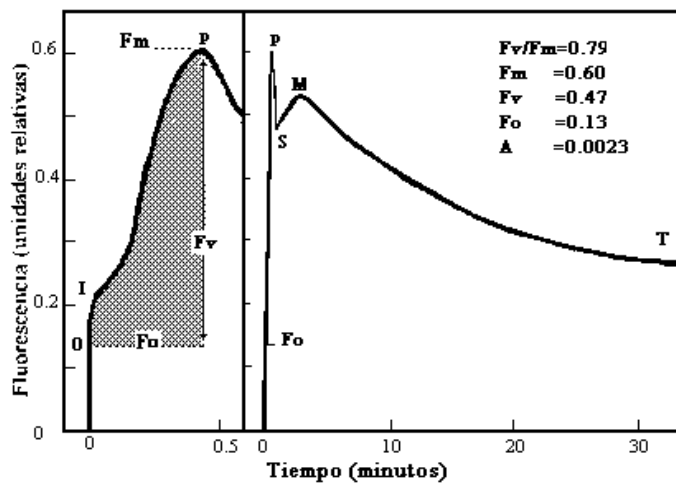
centrifugó a 48000 g durante 10 min, usándose el sobrenadante como **extracto crudo de proteína del bacteroide**.

4.4. Actividad fotosintética

4.4.1. Eficiencia fotosintética

Las medidas se realizaron usando un fluorímetro (ADC:OSI 5 FL de ADC BioScientific Ltd.). Para ello, se midió la fluorescencia en la cara adaxial de la hoja correspondiente al segundo trifolio. Dado que un requisito imprescindible es una óptima adaptación de la hoja a la oscuridad, siguiendo las instrucciones del equipo, se encontró que era suficiente un tiempo de 30 minutos, que fue utilizado en todas las mediciones. La iluminación se aplicó mediante 6 LEDs (Ligh Emitting Diodes) a una intensidad saturante de 2400 $\mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, correspondientes a una luz actínica no modulada, con un pico a 650 nm de λ , recogiendo la fluorescencia emitida durante un tiempo de 5 segundos.

La obtención de datos de fluorescencia se realizó mediante una cinética de inducción de fluorescencia de la clorofila denominada efecto Kautsky:



Esta curva se obtuvo al iluminar una hoja que se encontraba adaptada a la oscuridad y en la cual todos los centros de reacción del fotosistema II estaban abiertos. Al iluminar la hoja, la fluorescencia de las clorofilas se elevó rápidamente desde un nivel F_0 de fluorescencia mínima, hasta un

máximo F_m de fluorescencia máxima que se obtuvo a luz saturante. A partir de esta curva de inducción de fluorescencia, se obtuvieron los parámetros fluorescencia basal (F_0), fluorescencia máxima (F_m), fluorescencia variable (F_v) que corresponde a la diferencia entre la fluorescencia máxima y la fluorescencia basal ($F_v = F_m - F_0$) y la relación entre fluorescencia variable y fluorescencia máxima (F_v/F_m), indicador de la funcionalidad de la conversión fotoquímica de energía luminosa en el fotosistema II. También se determinó el rendimiento cuántico basal de los procesos no fotoquímicos del fotosistema II, F_0/F_m , que incluye la influencia de la emisión de fluorescencia por la clorofila y la disipación de energía en hojas adaptadas a la oscuridad.

4.4.2. Pigmentos fotosintéticos: clorofilas totales

El contenido de clorofilas totales, clorofila a, clorofila b y xantofilas más carotenos, 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 3750 g durante 10 min, pasando todas las clorofilas a la fase de cloroformo. Se eliminó la fase superior con ayuda de una micropipeta, y se filtró la fase cloroformica con papel filtro. A continuación, el volumen obtenido se diluyó con un factor 5 en cloroformo. A partir de aquí, se procedió a tomar alícuotas para la determinación del contenido de los distintos pigmentos fotosintéticos, que se efectuó mediante la lectura de la D.O a las longitudes de onda 470, 648 y 666 nm, utilizando como blanco cloroformo. Los resultados se expresaron en $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Las ecuaciones utilizadas para la cuantificación de la concentración de los distintos pigmentos fotosintéticos fueron:

$$C_a = 109 A_{666} - 12 A_{648}$$

$$C_b = 1638 A_{648} - 457 A_{666}$$

$$C_{x+c} = (1000 A_{470} - 284 C_a - 14211 C_b)/174$$

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

4.4.3. Contenido total de clorofila (SPAD)

Las clorofilas totales se determinaron mediante un medidor portátil SPAD 502, Minolta Camera Co. El fundamento de la medida se basa en registrar la luz transmitida por la hoja en dos regiones del espectro, donde la absorción por parte de las clorofilas es muy diferente. Para ello, el medidor utiliza dos LEDs, uno rojo (con un pico de emisión a 650 nm de longitud de onda) y otro infrarrojo (cuya máxima emisión se sitúa a 940 nm de longitud de onda). La fracción de esta luz, que es transmitida por la hoja se recoge mediante un fotodiodo de silicio, se convierte a una señal eléctrica analógica y se procesa para ser convertida a unidades SPAD (relativas), de contenido de clorofila total (a+b) presente en la hoja. Los valores presentados son unidades SPAD.

4.5. Actividades enzimáticas

4.5.1. Preparación de extractos

Para la determinación de las actividades enzimáticas en **nódulos** de *M. truncatula*, *L. japonicus* y *M. sativa*, el tejido fresco se homogeneizó en mortero con medio de extracción en una proporción de peso/volumen igual a 1/12, y polivinilpolipirrolidona insoluble en una cantidad equivalente al 33 % del peso fresco de la muestra. El homogeneizado se filtró a través de doble capa de gasa y a continuación se clarificó por centrifugación a 30000 g durante 20 min en una centrífuga refrigerada Sorvall Superspeed RC-5B (DuPont Instruments). Se obtuvo así una solución con las proteínas solubles del citosol y sin restos de tejido que se empleó como extracto para la determinación de las distintas actividades enzimáticas ensayadas. Todo el proceso de extracción se llevó a cabo a 4°C y, dependiendo de la actividad a determinar, los medios de extracción utilizados fueron los siguientes:

a) Tampón maleico-KOH 100 mM pH 6.8 adicionado con: sacarosa 100 mM, β -mercaptoetanol al 2 % (v/v) y etilenglicol al 20 % (v/v), para determinar la actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa, malato deshidrogenasa e isocitrato deshidrogenasa.

b) Tampón fosfato potásico 50 mM pH 8 adicionado de 1 mM EDTA y 20% etilenglicol para la actividad sacarosa sintasa y hexoquinasa.

c) Tampón MES 0.1 M pH 6.3 adicionado de EDTA 2 mM y PMSF 2 mM para la actividad trehalasa e invertasa alcalina.

d) Tampón fosfato sódico 0.1 M pH 7.5 adicionado de manitol 0.15 M, DTT 2 mM y EDTA 1 mM para la actividad trehalosa-6 fosfato sintasa y trehalosa-6 fosfato fosfatasa.

Los extractos de proteína de *B. japonicum* se obtuvieron centrifugando las células a 22000 g 10 min, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en tampón fosfato 0.2 M pH 7.0. La mezcla se volvió a centrifugar de nuevo en las mismas condiciones y las células finalmente se resuspendieron en 5 ml de tampón tris 10 mM pH 7.5 que contenía MgCl₂ 40 mM, KCl 10 mM, EDTA 3 mM y DTT 1 mM. A la mezcla se añadió 50 µl de Triton X-100 al 1% y se sonicó en un baño de hielo usando un sonicador Branson (modelo 350). La mezcla sonicada se centrifugó a 48000 g 10 min utilizándose el sobrenadante como extracto crudo de proteína.

Los extractos crudos de proteína de *B. japonicum*, bacteroide y del citosol nodular de *G. max*, obtenidos como se detalla e al apartado 4.3, se filtraron a través de una columna de Sephadex G-25, utilizando Blue dextran como marcador de la posición de las proteínas. Durante la filtración, el extracto crudo de bacteroide y *B. japonicum* se dividió en dos porciones, una de ellas se filtró a través de una columna equilibrada con tampón Tris 10 mM pH 7.5, utilizándose para la determinación de la actividad trehalosa-6 fosfato sintasa, mientras que la otra se filtró a través de una columna equilibrada con tampón fosfato 10 mM pH 7.0, utilizándose este mismo como tampón de elución, para las actividades trehalosa sintasa y maltooligosiltrehalosa sintasa.

4.5.2. Valoración de actividades: oxidación-reducción de NAD(P)H/NAD(P)⁺

Las actividades enzimáticas sacarosa sintasa, hexoquinasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa, malato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa y trehalosa-6P sintasa, 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 densidad óptica (D.O.) 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 reacción se inició con la adición del extracto o el sustrato a la mezcla de reacción, que varió según la enzima estudiada. Se registró la variación lineal de D.O. en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1604 termostatzado. En todas las actividades enzimáticas se prepararon 4 repeticiones y un control sin sustrato para corregir las posibles oxidaciones o reducciones endógenas de NAD(P)H/NAD(P)⁺, según la reacción. El cálculo de las actividades enzimáticas acopladas a la reacción de óxido-reducción NAD(P)H/NAD(P)⁺, se realizó en base a la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad } [\mu\text{mol g}^{-1} \text{ PF h}^{-1}] = \frac{(\Delta \text{ D.O. min}^{-1}) \times V \times V_T \times 60}{10^{-6} \times \epsilon \times d \times v \times \text{PF}}$$

donde:

$\Delta \text{ D.O. min}^{-1}$ = incremento medio de densidad óptica por minuto

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 = $6.22 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$

d = ancho de la cubeta (1 cm)

v = volumen de extracto añadido a la mezcla en ml

PF = peso fresco de muestra utilizada para preparar el extracto

60 = factor para expresar la actividad por horas

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

4.5.2.1. Sacarosa sintasa

La actividad sacarosa sintasa (EC 2.4.1.13.) hidroliza la sacarosa en presencia de UDP, produciendo UDP-glucosa que a su vez es oxidada por la UDP-glucosa deshidrogenasa en presencia de NAD^+ que se reduce, pudiéndose medir el incremento de absorbancia a 340 nm:

La mezcla de reacción optimizada a partir de la descrita por Morell y Copeland, (1985) fue la siguiente:

Tampón bicina-KOH pH 8.5.....	100.0 mM
Sacarosa.....	100.0 mM
UDP.....	2.0 mM
UDPG deshidrogenasa.....	0.025 U
NAD^+	1.5 Mm

La reacción se inició con la adición de 100 μl de extracto para completar un volumen final de 1 ml. La actividad sacarosa sintasa se expresó en $\mu\text{mol NAD}^+_{\text{red}} \text{mg proteína}^{-1} \text{h}^{-1}$

4.5.2.2. Hexoquinasa

La actividad hexoquinasa (EC 2.7.1.1.) fosforila la glucosa utilizando una molécula de ATP. La determinación de esta actividad se llevó a cabo según Levi y Preiss (1978), mediante la determinación espectrofotométrica de la producción de NADPH que se genera a 30°C durante 10 min en un volumen final de 1 ml del siguiente medio de reacción:

Tampón HEPES pH 7.8.....	50.0 mM
MgCl_2	5.0 mM
NADP^+	1.0 mM
ATP.....	0.5 mM
Glucosa.....	1.2 mM
Glucosa 6P deshidrogenasa.....	3 U

La reacción se inició al adicionar una alícuota de 50 μl de extracto a la mezcla de reacción. La actividad se expresó como $\mu\text{mol NADP}^+_{\text{red}} \text{mg}^{-1}$ proteína h^{-1} .

4.5.2.3. Fosfoenolpiruvato carboxilasa

La actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa (EC 4.1.1.31) cataliza la transformación de fosfoenolpiruvato en oxalacetato, el cual es reducido a malato por acción de la malato deshidrogenasa mediante la oxidación de NADH.

Se valoró espectrofotométricamente siguiendo la disminución de absorbancia a 340 nm provocada por la oxidación del NADH en una reacción acoplada a la actividad malato deshidrogenasa endógena.

El ensayo optimizado a partir del descrito por Vance *et al.* (1983) se realizó a 30°C con la siguiente mezcla de reacción:

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

La reacción se inició al añadir 25 μl de extracto hasta completar un volumen final de 1 ml. La actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa se expresó como $\mu\text{mol NADH}_{\text{ox}} \text{mg}$ proteína h^{-1} .

4.5.2.4. Malato deshidrogenasa

La actividad malato deshidrogenasa (EC 1.1.1.37) transforma el malato en oxalacetato mediante un proceso reversible. Debido a la elevada actividad de esta enzima, para la determinación de la misma, los extractos fueron diluidos 100 veces. La mezcla de reacción fue la siguiente:

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

La reacción se inicia con la adición de 10 μ l del extracto diluido para completar un volumen final de 1 ml. La actividad MDH se expresó en μ mol NADH_{ox} mg proteína⁻¹ h⁻¹.

4.5.2.5. Isocitrato deshidrogenasa

La actividad NADP⁺-isocitrato deshidrogenasa (EC 1.1.1.42) cataliza el paso de isocitrato a α -cetoglutarato mediante un proceso reversible. La mezcla de reacción fue la siguiente:

Tampón bicina-KOH pH 8.5.....	100.0 mM
Isocitrato.....	1.0 mM
MgCl ₂	5.0 mM
NADP ⁺	0.2 Mm

La determinación de la actividad NADP⁺-isocitrato deshidrogenasa citosólica de nódulos se optimizó a partir de la metodología descrita por Chen *et al.* (1988) La reacción se inicia con la adición de 10 μ l de extracto para completar un volumen final de 1 ml. La actividad ICDH se expresó en μ mol NADP⁺_{red} mg proteína⁻¹ h⁻¹.

4.5.2.6. Trehalosa-6 fosfato sintasa

La actividad trehalosa-6 fosfato sintasa (EC 2.11.1.15.) cataliza la formación de una molécula de trehalosa-6 fosfato a partir de UDP-glucosa y glucosa-6 fosfato. Fue determinada según el método descrito por Salminen y Streeter (1986). La mezcla de reacción se componía de:

Tampón Tris pH 7.5.....	50 mM
MgCl ₂	100 mM
EDTA.....	3 mM
KCl.....	25 mM
UDP-glucosa.....	8 mM
Glucosa-6P.....	30 mM

La reacción se inició con la adición de 40 µl de extracto hasta completar un volumen final de 200 µl. Después de 1 h de incubación a 30°C se determinó el UDP formado acoplando las reacciones catalizadas por las actividades piruvato kinasa y lactato deshidrogenasa. La mezcla de reacción contenía:

Tampón Tris pH 7.5.....	50.00 mM
MgCl ₂	10.00 mM
PEP.....	5.00 mM
NADH.....	0.24 mM
PK.....	3.5 U
LDH.....	5.0 U

Esta reacción se inició con la adición de los 200 µl de la reacción anterior que contiene el UDP formado tras el periodo de incubación. La actividad trehalosa-6 fosfato sintasa se expresó en nmol UDP mg⁻¹ proteína h⁻¹.

4.5.3. Valoración de otras actividades enzimáticas

4.5.3.1. Invertasa alcalina

La actividad invertasa alcalina (EC 2.3.1.26) hidroliza la sacarosa en una molécula de glucosa y otra de fructosa. El procedimiento para el ensayo de esta actividad se optimizó a partir del descrito por Morell y Copeland, (1984). La mezcla de reacción fue la siguiente:

Tampón fosfato potásico pH 7.5.....	20 mM
Sacarosa.....	100 mM

La reacción se inició con la adición de 40 μl de extracto (4.5.1.) para completar un volumen final de 200 μl . Tras 30 min de incubación a 30°C, la reacción se paró hirviendo durante 2 min. Posteriormente la glucosa generada se determina por el método de la glucosa oxidasa-peroxidasa usando un kit comercial (ATOM), en el que el peróxido de hidrógeno forma un complejo coloreado que se cuantificó por espectrofotometría a 500 nm. La actividad invertasa alcalina se expresó en $\text{nmol glucosa mg}^{-1} \text{ proteína h}^{-1}$

4.5.3.2. Trehalosa-6 fosfato fosfatasa

La actividad trehalosa-6 fosfato fosfatasa (EC 3.1.3.12.) cataliza la formación de una molécula de trehalosa mediante la eliminación del P_i de la trehalosa-6 fosfato. La mezcla de reacción se componía de:

Tampón Tris pH 7.5.....	25 mM
MgCl_2	10 mM
Trehalosa 6P.....	1 mM

La reacción se inició con la adición de 50 μl de extracto (4.5.1) hasta completar un volumen final de 250 μl . La mezcla se incubó durante 2h a 37°C. La actividad fue determinada en función del P_i generado que fue determinado según la técnica de Bartlett (1958). La actividad se expresó en $\text{nmol P}_i \text{ mg}^{-1} \text{ proteína h}^{-1}$.

4.5.3.3. Trehalasa

• Método 1

La actividad trehalasa (EC 3.2.1.28.) responsable de degradar trehalosa generando dos moléculas de glucosa, se determinó según Müller *et al.* (1994a) en extractos de nódulos de *M. trusatula*, *M. sativa*, *L. japonicus* y *P. vulgaris*. La mezcla de reacción fue la siguiente:

Tampón MES pH 6.3.....50 mM

Trehalosa.....100 mM

Para iniciar la reacción se adiciona 40 μ l de extracto (4.5.1.) hasta un volumen final de 200 μ l. Después 1 h de incubación a 37°C, la reacción se detuvo hirviendo 2 min. Posteriormente la glucosa generada fue determinada por el método de la glucosa oxidasa-peroxidasa, usando un kit comercial (ATOM) descrito en la invertasa alcalina. La actividad trehalasa se expresó en nmol glucosa mg^{-1} proteína h^{-1} .

• Método 2

En el experimento realizado con nódulos de *G. max*, se utilizó un método diferente para la determinación de la actividad trehalasa que se describe a continuación:

La mezcla de reacción estaba formada por el extracto de proteína del citosol al que se le adicionó trehalosa hasta una concentración 10 mM con el que se inició la reacción. Como control se utilizó una mezcla en la que la proteína se inactivó por tratamiento térmico. La mezcla se incubó durante 15 min deteniéndose la reacción calentando a 100°C. La mezcla se centrifugó a 7000 g 5 min para eliminar la proteína, y el sobrenadante se transfirió a viales de cromatografía gaseosa para la determinación de la concentración de trehalosa como se indica en el apartado 4.6.1.1. La actividad se expresó en nmol trehalosa mg^{-1} proteína min^{-1} .

4.5.3.4. Trehalosa sintasa y maltooligosiltrehalosa sintasa

El ensayo para la determinación de la actividad trehalosa sintasa y maltooligosiltrehalosa sintasa fue similar exceptuando los sustratos utilizados en la mezcla de reacción.

La actividad trehalosa sintasa (EC 5.4.99.16.) cataliza la formación de una molécula de trehalosa a partir de una molécula de maltosa mediante transglucosilación del enlace $\alpha(1-4)$ de la maltosa a $\alpha(1-1)$ de la trehalosa. La mezcla de reacción estaba formada por:

Tampón fosfato pH 7.0.....10 mM

Maltosa.....8 mM

La actividad maltooligosiltrehalosa sintasa (EC 5.4.99.15.) cataliza la formación de una molécula de trehalosa por una transglucosilación intramolecular del enlace α (1-4) terminal de una variedad de maltooligosacáridos con una longitud de cadena de 4 o más residuos. En este caso la mezcla de reacción estaba formada por:

Tampón fosfato pH 7.0.....10 mM

Maltoheptulosa.....2.5 Mm

Las mezclas de reacción para cada actividad enzimática, se colocaron en tubos de microcentrífuga a los que se les añadió un volumen de 200 μ l de extracto proteico por reacción. A las mezclas control se le adicionó el mismo volumen de extracto de proteína, que previamente había sido inactivado mediante tratamiento térmico. Previamente al inicio de la reacción, la mezcla formada por el extracto proteico y el tampón de reacción fue preincubada con trehazolín a una concentración final de 80 nM durante 30 min a 30°C, con el fin de inactivar restos de actividad trehalasa del citosol nodular, que impedirían la acumulación de la trehalosa formada en el transcurso de ambas reacciones. Las mezclas de reacción con los respectivos sustratos se incubaron durante 3 y 6 horas cada una, a fin de asegurar que el incremento en la concentración del producto de la reacción se debe a la actividad de la enzima. Las reacciones se detuvieron calentando a 100°C. La mezcla de reacción de la actividad MOTS fue incubada con amiloglucosidasa para degradar los intermediarios maltooligosiltrehalosa, y maximizar así el rendimiento de trehalosa generada. Finalmente, las mezclas fueron centrifugadas a 7000 g 5 min para eliminar la proteína, y el sobrenadante fue transferido a viales de cromatografía gaseosa para la determinación de la concentración de trehalosa, maltosa y glucosa como se indica en el apartado 4.6.1. Las actividades de ambas actividades se expresaron en nmol de trehalosa mg^{-1} proteína h^{-1} .

4.6. Determinaciones analíticas

4.6.1. Contenido de carbohidratos

4.6.1.1. Sacarosa, maltosa, trehalosa, glucosa y fructosa: cromatografía gaseosa

a) Preparación del extracto y derivatización de la muestra

Los nódulos se homogeneizaron en metanol al 80%, y los carbohidratos solubles se extrajeron a 60°C durante 10 min, posteriormente el extracto se centrifugó a 12000 rpm 10 min. La extracción se repitió 3 veces recogiendo los sobrenadantes que posteriormente se secaron al vacío en viales para cromatografía gaseosa. El residuo resultante se resuspendió en 125 µl de piridina purificada más 125 µl de STOX (Pierce Biotechnology, Inc.), consistente en una mezcla de piridina más hidroxilamina, además de β-phenylglucosa como estándar interno. La mezcla se agitó con vortex y se incubó durante 30 min a 70°C. Después de enfriar a temperatura ambiente, las muestras se derivatizaron añadiendo 200 µl de hexametildisilazane (HMDS) y 20 µl de ácido trifluoroacético (TFA), dejando transcurrir la reacción durante una hora a temperatura ambiente.

b) Valoración de azúcares

Los derivados obtenidos tras la reacción de derivatización, se analizaron en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 Series II equipado con una columna empaquetada de 3% OV-17 Chromosorb WHP. El área de los picos se cuantificó mediante un integrador Hewlett-Packard 3396A.

4.6.1.2. Azúcares solubles totales

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 etanol al 96 %, en una proporción 1/12 (peso fresco de muestra/volumen de medio). Tras la maceración se centrifugó a 3500 g durante 10 min. El sobrenadante se utilizó para la determinación de azúcares solubles totales, aminoácidos y prolina, mientras que el pellet se utilizó para el almidón.

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), en una proporción 1/10 (peso fresco de muestra/volumen de medio). Tras la maceración se centrifugó a 3750 g durante 10 min. Al sobrenadante obtenido se le añadió 15 ml de agua destilada y 1 ml de triclorometano, se agitó y se dejó en reposo hasta la aparición de dos fases (24 h), una transparente y una verde. La fase transparente se utilizó para la determinación de azúcares solubles totales, aminoácidos y prolina, mientras que el pellet se utilizó para el almidón.

La valoración colorimétrica de los azúcares solubles totales se siguió por el método propuesto por Irigoyen *et al.* (1992). A alícuotas de 0.05 ml de extracto se les añadió 3 ml de reactivo de antrona, consistente en ácido sulfúrico diluido al 72% más antrona en una proporción de 0.15 g/100 ml, a continuación los tubos se agitaron vigorosamente y se llevaron a un baño en ebullición durante 10 min, tras los cuales se enfriaron rápidamente en hielo. La D.O. 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 mg de glucosa g⁻¹ PF.

4.6.1.3. Almidón

La detección de almidón se llevó a cabo tomando el residuo que quedó de la extracción para la valoración de azúcares solubles totales, aminoácidos libres y prolina e incubándolo en una estufa a 70°C durante 24 h. Posteriormente, se le adicionaron 4 ml de agua destilada y se calentó a 100°C durante una hora. Después de enfriar a temperatura ambiente, se le adicionó 1 ml de tampón acetato 8.5 mM pH 4.5 que contenía 0.8 mg ml⁻¹ de α -amiloglucosidasa. Tras mezclar en vórtex, se incubó a 50°C durante 24 h en agitación con el fin de asegurar la completa degradación del almidón (Kiniry 1993). La glucosa resultante de la degradación del almidón, se determinó por el método colorimétrico de la glucosa oxidasa peroxidasa, mediante el kit comercial (ATOM) utilizado para las actividades invertasa alcalina y trehalasa.

Para el cálculo de la concentración de almidón se preparó una curva patrón con glucosa, entre 100 y 600 $\mu\text{g/ml}$ expresándose en mg glucosa g^{-1} PF.

4.6.2. Compuestos nitrogenados

4.6.2.1. Aminoácidos libres

Se utilizaron los extractos preparados para determinar azúcares solubles totales (4.6.1.2.). La determinación de aminoácidos se realizó siguiendo el método de Yemm y Cocking (1955). A alícuotas de 0.5 ml de muestra se adicionaron 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. Los tubos se agitaron y se incubaron a 100°C durante 15 min. A continuación se detuvo la reacción enfriando en hielo, se añadió 5 ml de isopropanol al 50 % y se tomaron los valores de D.O. a 570 nm.

Como referencia se preparó una curva patrón a partir de asparagina (Sigma). El contenido en aminoácidos se expresó en mg de asparagina por g^{-1} PF de muestra.

4.6.2.2. Prolina

Se utilizaron alícuotas del extracto preparado para valorar azúcares solubles totales y aminoácidos. A 3 ml de extracto crudo se les adicionó 1.5 ml de ninhidrina, [preparada al 25 % (p/v) en una solución formada por ácido acético glacial al 60% (v/v) y ácido fosfórico al 40 % (v/v)], y 15 ml de ácido acético glacial. Esta mezcla se incubó durante 60 min a 100°C , la reacción se detuvo enfriando en hielo y a continuación se añadieron 2 ml de benceno, se agitó fuertemente y la fase superior se utilizó para medir la D.O. a 520 nm. Como blanco se empleó agua destilada.

Para el cálculo de la concentración de prolina se preparó una curva patrón con prolina (Sigma) en cantidades comprendidas entre 2.5 y 20 μg siguiendo el procedimiento ya descrito. El contenido de prolina se expresó como μg de prolina en g^{-1} PF.

4.6.2.3. Proteína soluble

El contenido de proteínas solubles en los extractos utilizados para determinar las actividades enzimáticas, se estimó mediante el método de Lowry *et al.* (1951), con las modificaciones introducidas por Markwell *et al.* (1978). A 50 μl de muestra se adicionaron 950 μl de NaOH 0.4 N y 3 ml de reactivo A. Se agitaron los tubos e incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. A continuación, se adicionó 0.3 ml de reactivo de Folin-Cicolteau (reactivo de fenol) diluido 1:1 en agua destilada y se incubó a temperatura ambiente 30 min midiéndose la D.O. a 660 nm. Los resultados, expresados como mg g^{-1} PF, se obtuvieron a partir de una curva patrón de albúmina de concentraciones comprendidas entre 10 y 80 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

El reactivo A presentó 100 partes de reactivo B y una de reactivo C. El reactivo B está formado por: Na_2CO_3 2.0% (p/v), NaOH 0.4% (p/v), tartrato de sodio y potasio 0.16% (p/v), dodecil sulfato sódico (SDS) 1% (p/v). El reactivo C contiene $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4.0% (p/v).

4.6.3. Elementos minerales

El material vegetal seco y molido (polvo fino y homogéneo), se sometió a un proceso de digestión mediado por microondas para descomponer y disolver las matrices vegetales con objeto de determinar el estado nutricional de la planta a través del contenido de algunos nutrientes en parte aérea y raíz (Mingorance, 2002).

4.6.3.1. Determinación de nitrógeno y fósforo

El nitrógeno y el fósforo se determinaron colorimetricamente mediante un sistema automático de análisis de flujo continuo de aire segmentado (Bran+Luebbe TRACCS 2000, Bran+Luebbe, GMBH). Los valores de estos y todos los elementos minerales determinados se expresaron en porcentaje y en mg planta^{-1} .

4.6.3.2. Determinación de sodio y potasio

Se realizó por fotometría de llama, utilizando un fotómetro 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.

4.6.3.3. Determinación de calcio y magnesio

Estos elementos se determinaron 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 realizó directamente sobre el mineralizado, pero para el calcio se adicionó lantano, debido a que se pueden formar compuestos difícilmente atomizables en la llama, que pueden interferir por sus características refractarias. Las lecturas de ambos macronutrientes se realizaron directamente en un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer 5000.

4.6.3.4. Determinación de cloruro

El contenido de cloruro se determinó por el método colorimétrico de Iwasaki *et al.* (1982). En las muestras de tejido vegetal seco y molido (0.1 g) se realizó la extracción de cloruro con 10 ml de agua desionizada por agitación en los tubos de rosca, durante 2 h. Para la reacción se tomaron 2.5 ml del extracto, previamente filtrado con papel de filtro, y se mezclaron con 2 ml de solución de nitrato férrico y 1 ml de solución saturada de tiocianato de mercurio. A continuación la reacción se dejó en reposo 15 min y se realizó la lectura de D.O. a 460 nm frente a una curva de KCl de 10-100 µM.

4.7. Purificación y caracterización de la trehalasa de nódulos de *P. vulgaris*

4.7.1. Purificación

4.7.1.1. Preparación del extracto

Los nódulos de *P. vulgaris* se homogeneizaron sobre hielo en tampón de extracción Tris-HCl 50 mM pH 8 que contenía 5% (p/v) sacarosa, β-mercaptoetanol 6 mM y 33% de polivinilpolipirrolidona (PVPP) insoluble.

El homogenizado se filtró a través de doble capa de gasa y se centrifugó a 30000 g durante 30 min a 4°C. El sobrenadante, separado de los restos de tejido, fue utilizado en los sucesivos pasos de purificación. La actividad trehalasa se determinó como se indica en el apartado 4.5.3.3. (método 1).

4.7.1.2. Precipitación con sulfato de amonio

En el extracto, en continua agitación sobre baño de hielo, se aplicaron lentamente pequeñas cantidades de sulfato de amonio hasta alcanzar un 30 % de saturación. El precipitado obtenido se dejó reposar 1 h a 4°C y a continuación se centrifugó a 17000 g durante 10 min. El sobrenadante obtenido se llevó al 70 % de saturación con sulfato amónico, de igual forma que en el paso anterior. Una vez centrifugado, el precipitado se resuspendió en tampón Tris 25 mM pH 8 y se sometió a diálisis durante toda la noche con el mismo tampón a 4°C.

4.7.1.3. Cromatografía de intercambio iónico

El dializado fue aplicado a una columna (2 × 60 cm) de intercambio iónico DEAE-Sefarosa equilibrada con tampón Tris HCl 25 mM (pH 8). Las proteínas se fijaron a la columna a una velocidad de flujo de 44 ml h⁻¹, controlado por una bomba peristáltica Eyela MP-3 (Tokio Rikakikai Company). Después de lavar la columna con el tampón, las proteínas fueron eluidas con un gradiente lineal de NaCl 0-250 mM, para lo cual se utilizó un formador de gradientes (GM1, Pharmacia). Con ayuda de un colector de fracciones (Redifrac 100, Pharmacia), se recogieron fracciones de 1 ml. Las fracciones con actividad trehalasa se reunieron y se dializaron frente al mismo tampón. Este paso de purificación por intercambio iónico fue repetido utilizando una columna DEAE-Sefarosa de 1 × 20 cm. Las fracciones con actividad trehalasa fueron de nuevo dializadas y concentradas en un volumen de 1.5 ml mediante ultrafiltración utilizando una célula Amicon 8050, provista de una membrana Diaflo YM-10.

4.7.1.4. Cromatografía de exclusión molecular

El extracto concentrado mediante la ultrafiltración se sometió a una cromatografía de exclusión molecular con el doble propósito de determinar

el peso molecular nativo de la trehalasa y conseguir un mayor grado de purificación. Para ello se utilizó una columna de vidrio (Bio-Rad) de 2×60 cm, rellena de Sephacrill S-300 “fast flow”. El montaje y preparación de la columna se realizó de acuerdo con las indicaciones del proveedor de la resina (Pharmacia). Una vez empaquetada la resina se procedió a su equilibrado con 5 volúmenes de tampón Tris HCl 25 mM (pH 8). El flujo de trabajo fue de 32 ml h^{-1} . La muestra se cargó en la columna, eluyéndose con el mismo tampón y la enzima fue de nuevo concentrada por ultrafiltración.

En el calibrado de la columna para la determinación del peso molecular de la trehalasa se utilizó un kit de proteínas patrón formado por: anhidrasa carbónica (29 kDa), albúmina bobina (66 kDa), alcohol deshidrogenasa (150 kDa), β -amilasa (200 kDa), apoferritina (443 kDa) y tiroglobulina (669 kDa) (MW-GF-1000, Sigma). Cada proteína fue eluída en 1 ml de tampón y pasada por separado a través de la columna. El volumen de elución se calculó recogiendo fracciones de 0.5 ml, determinado el pico de elución de la proteína por medida de D.O. a 280 nm.

El calibrado de la columna se llevó a cabo mediante el cálculo del volumen muerto, el volumen total de la columna y el volumen de elución de cada muestra, para lo cual se utilizó el azul dextrano ($PM \approx 2 \cdot 10^3$ kDa).

4.7.1.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida

El extracto enzimático parcialmente purificado se separó en gel de poliacrilamida no desnaturizante al 7.5 % (Caba *et al.*, 1997) a 150 voltios y 4°C , y la identificación de las bandas correspondiente a la enzima se realizó mediante tinción por actividad, cortándose en pequeños fragmentos la banda correspondiente a la enzima de donde fue extraída con 1 ml de tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.5.

La pureza de la preparación de la enzima anteriormente obtenida, se verificó por electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida con SDS siguiendo en sistema discontinuo de Laemmli (Laemmli, 1970). La identificación de las bandas se realizó mediante tinción con azul Coomassi R-250 y tinción con plata, y en la determinación de peso molecular se utilizó un patrón de peso molecular Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad).

4.7.2. Caracterización

4.7.2.1. Especificidad de sustratos

La actividad de la enzima se determinó con diversos glucósidos a una concentración 50 mM: trehalosa, sacarosa, maltosa, melódica, celobiosa, rafinosa, lactosa y turanosa. Los resultados se expresaron como porcentajes relativos de actividad respecto de la trehalosa.

4.7.2.2. Efecto de distintos iones

El ensayo de la actividad enzimática en presencia de distintos iones se evaluó incubando la enzima durante 15 min con las siguientes sales a una concentración 10 mM: NaCl, MnCl₂, MgCl₂, LiCl, CoCl, KCl, CaCl₂, FeCl₃, HgCl y EDTA (1 mM). Los resultados se expresaron como porcentaje respecto a la reacción control sin la adición de iones.

4.7.2.3. Respuesta al pH y la temperatura

Para estudiar el efecto del pH en la actividad trehalasa, se utilizaron tres tampones: tampón citrato/NaOH 50 mM (pH 3.0-5.4), tampón MES/KOH 50 mM (5.4-7.2), y tampón tricina/KOH 50 mM (7.2-9.0). La actividad se midió por el procedimiento descrito en el apartado 4.4.4.3.

La temperatura óptima de la enzima se valoró entre 25°C y 75°C y para la termoestabilidad, la enzima se preincubó sin trehalosa durante 30 min añadiéndose posteriormente el sustrato a la mezcla de reacción descrita en el apartado 4.5.3.3. Los resultados se expresaron como porcentaje relativo de actividad respecto de la máxima obtenida.

4.7.3. Obtención de anticuerpos

4.7.3.1. Inmunización del conejo

Los anticuerpos se obtuvieron mediante la inmunización de un conejo a partir de la enzima purificada como se describe en el apartado anterior (4.7.1.), utilizándose el adyuvante de Freud como potenciador de la respuesta inmunológica.

Las inyecciones y sangrías para la obtención del suero fueron realizadas en el Animalario de la Universidad de Granada según el calendario de la tabla:

Días	0	14	28	42	49	84	94	126	136
Dosis inyectadas(μg)	150	100	100	100		100		100	
Nº de dosis	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a		5 ^a		6 ^a	
Sangrías (ml)					10		10		10
Nº de sangría					1 ^a		2 ^a		3 ^a

4.7.3.2. Obtención del suero

La sangre extraída en cada una de las extracciones se repartió en tubos de centrífuga y se dejó en reposo durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugarona 11000 g durante 15 min, quedando el suero en la parte superior, separado de la fase celular. El suero se repartió en tubos de microcentrífuga y se almacenó a -80°C .

4.7.3.3. Titulación de anticuerpos

El suero fue filtrado por un filtro Millipore de $0.45 \mu\text{M}$, y a continuación se pasó por una columna preparada de protein-A (Sigma No: PURE-1A) siguiendo el protocolo indicado para la obtención de los anticuerpos. A continuación los anticuerpos purificados se pasaron por una columna de afinidad (HiTrap NHS-activated HP) a la que previamente se unió trehalasa comercial (Sigma) según el protocolo del proveedor.

4.7.3.4. Ensayo de especificidad de los anticuerpos: “Western blot”

a) Transferencia de proteínas:

Consiste en transferir las proteínas desde un gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa para lo que se empleó un equipo de transferencia Bio-Rad. La electroforesis se realizó en condiciones desnaturalizantes como se detalla en el apartado 4.7.5. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se equilibró durante 10 min en tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM pH 8.3 y metanol 20% v/v). A continuación, se preparó la unidad de transferencia formada por una esponja, papel de filtro, el gel de poliacrilamida, la membrana de nitrocelulosa, papel de filtro y otra esponja, todo ello humedecido en el tampón de transferencia en el orden indicado formando una estructura tipo “sandwich” que se colocó en el soporte con la correspondiente orientación y se introdujo en la cubeta de transferencia siguiendo la orientación adecuada entre los polos. La transferencia se realizó a una intensidad de 100V (350 mA) durante 70 min.

b) Tinción con anticuerpos:

Una vez realizada la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se trató según el siguiente protocolo:

1. Una vez lavada la membrana con abundante agua, se procede a su bloqueo con una solución compuesta por: PBS (8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄, 0.24 g KH₂PO₄ en 1 l de H₂O, pH 7.2) y leche desnatada en polvo al 5% (p/v) durante 2 h.
2. Lavar la membrana varias veces con PBS + Tween 20 al 0.1% (PBST).
3. Incubar con una solución del anticuerpo primario (anti-Trehalasa) en PBST (dilución 1:4000), leche en polvo al 1% (p/v), durante toda la noche en agitación a 4°C.
4. Lavar 4 veces la membrana con PBST dejando en el último lavado 5 min en agitación.
5. Incubar durante 1 h a temperatura ambiente en agitación con el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo ligado con peroxidasa) diluido 1:25000 en PBST con leche en polvo al 5%.
6. Lavar con PBST para eliminar el exceso de anticuerpo secundario.

7. El revelado de las bandas se realizó sobre la membrana de nitrocelulosa añadiendo una solución de 4-cloro-1-naftol en metanol (a 4°C) a una concentración de 3 mg ml⁻¹ a la cual se le añaden 5 volúmenes de PBS y H₂O₂ al 0.01% (v/v). Se deja incubando a temperatura ambiente hasta que aparecen bandas, momento en el que se para la reacción lavando la membrana con agua.

4.8. Clonación y expresión del gen que codifica la trehalasa de *M. truncatula*

4.8.1. Preparación y transformación de células competentes de *E. coli*

La preparación de células competentes de *E. coli* se ha realizado esencialmente según la técnica descrita por Lederberg y Cohen (1974). A partir de un cultivo de la cepa de *E. coli* a transformar, se inoculó medio LB (1 ml cultivo/100 de medio) y se incubó en agitación a 37 °C hasta que el cultivo alcanzó una D.O.₆₀₀ de 0.6. Tras dejar enfriar en hielo, las células se centrifugaron (10000 rpm, 5 min, 4°C), se resuspendieron en 1 volumen de una solución de MgCl₂ 0.1 M preenfriada a 4°C, y se centrifugó de nuevo (5000 rpm, 5 min, 4°C). A continuación, las células se resuspendieron en 1/2 volumen de una solución de CaCl₂ 0.1 M preenfriada a 4°C y, tras dejarlas en hielo un mínimo de 30 min, se centrifugaron (5000 rpm, 5 min, 4°C) y se resuspendieron suavemente en 1/10 volumen de una solución de CaCl₂ 0.1 M y glicerol al 20% preenfriada a 4°C. Las células así preparadas se repartieron en alícuotas de 100 µl en tubos eppendorf preenfriados a 4°C, que se conservaron a -80°C hasta su uso.

Para la transformación de células competentes con ADN plasmídico se siguió la técnica descrita por Rodríguez y Tait (1983), modificada como se indica a continuación. A alícuotas de 100 µl de células se adicionó ADN (0.05-0.5 µg) y la mezcla, después de su incubación en hielo un mínimo de 30 min, se sometió a un choque de calor de 42°C durante 2 min. Posteriormente, la mezcla se incubó 5 min en hielo, se le adicionó 1 ml de medio LB y se incubó a 37°C durante 60-90 min. Transcurrido este tiempo se sembraron alícuotas de 0.1 ml en placas de medio LB adicionado de los correspondientes antibióticos.

4.8.2. Técnicas moleculares

4.8.2.1. Extracción de ARN

● Método 1:

El ARN se extrajo de nódulos partiendo de 100 mg de peso fresco de tejido previamente congelado en nitrógeno líquido y almacenado a -80°C. El procedimiento fue el siguiente:

1. Homogeneizar en un mortero con nitrógeno líquido el material de partida.
2. Añadir 1800µl de tampón REB y homogeneizar.
3. Dejar descongelar y añadir 1800 µl de fenol:cloroformo:isoamílico en proporción 50:24:1.
4. Traspasar el material a tubos estériles de 2 ml, agitar cuidadosamente por inversión varias veces y mantener en hielo.
5. Centrifugar 10 min a 12000 rpm a 4°C, recoger la fase acuosa y reextraer con 900 µl de fenol:cloroformo:isoamílico en proporción 50:24:1. cloroformo:isoamílico (24:1).
6. Centrifugar 10 min a 12000 rpm a 4°C, recoger la fase acuosa y reextraer con 900 µl de cloroformo:isoamílico (24:1).
7. Recoger la fase acuosa y pasarla a un tubo nuevo, medir el volumen y adicionar 1/3 del volumen de la muestra de LiCl 8M, poco a poco en el vortex a baja velocidad hasta alcanzar una concentración final de 2M.
8. Incubar en hielo durante toda la noche.
9. Centrifugar a la máxima velocidad en una microcentrífuga durante 30 min a 4°C.
10. Eliminar el sobrenadante, lavar el precipitado con 300 µl de LiCl 2M frío, y centrifugar de nuevo en las mismas condiciones.
11. Recoger el precipitado en 200 µl de tampón TE y precipitar de nuevo con 2.5 volúmenes de etanol al 100% y 0.1 volúmenes de acetato sódico 3M pH 5.2
12. Incubar toda la noche a -20°C.
13. Recoger por centrifugación a la máxima velocidad durante 30 min a 4°C.

14. Lavar el precipitado con 300 μ l de etanol al 75% y volver a centrifugar 5 min en las mismas condiciones.
15. Secar el tubo con cuidado y resuspender el precipitado en 50 μ l de agua DEPC.

Tampón REB: Tris-HCl 25 mM, EDTA 25 mM, NaCl 75 mM, SDS 1%, β -mercaptoetanol 1M. Preparar en agua DEPC.

Tampón TE: Tris 10 mM pH 8.0, EDTA 1mM pH 8.0. Preparar en agua DEPC.

Agua-DEPC: Añadir 1 ml de dietil-pirocarbonato por cada litro de agua destilada. Agitar durante toda la noche. Autoclavar y agitar durante 30 min en una campana extractora para eliminar gases tóxicos.

● **Método 2:**

La extracción de ARN de hoja, raíz y nódulo, se llevó a cabo también mediante el uso de un kit comercial (Nucleospin RNA Plant) y siguiendo las instrucciones proporcionadas por el proveedor.

4.8.2.2. Cuantificación del ARN

La cuantificación del ARN se realizó espectrofotométricamente, para ello se utilizaron cubetas de cuarzo. La absorbancia de una alícuota de 1 μ l de muestra 10 veces diluida en agua DEPC fue medida a 260 nm. Cada unidad de absorbancia a 260 nm fue considerada como 40 μ g / ml de ARN total.

4.8.2.3. Visualización del ARN mediante electroforesis en geles de agarosa

Para determinar la calidad del ARN extraído se procedió a la separación electroforética de 1 μ g de ARN en geles desnaturizantes de agarosa que contenían formaldehído. Para ello se diluyó la muestra en tampón de muestra y tampón de carga 1x. A continuación, se desnaturizó el ARN incubando esta solución a 65°C durante 15 min. La separación se

realizó en geles de agarosa al 0.6% en tampón MOPS estéril que contenía un 1.85% de formaldehído. La electroforesis se desarrolló en tampón MOPS a un voltaje constante de 80V. Para visualizar el ARN se expuso el gel a luz ultravioleta.

Tampón de muestra: 50% formamida desionizada, 14% formaldehído. Esta solución se prepara en tampón MOPS.

Tampón de carga 10x: 50% sacarosa, 0.3% azul de bromofenol. Esta solución se prepara en tampón MOPS.

Tampón MOPS: 200 mM MOPS pH 7.0, 50 mM acetato sódico, 10 mM EDTA.

4.8.2.4. Tratamiento del ARN con DNasa

Se tratan 30 µl de ARN en un volumen final de 50 µl, para lo que en un tubo de microcentrífuga se añaden los siguientes componentes:

- 30 µl de ARN
- 5 µl tampón 10x
- 2 µl inhibidor de la RNasa (60U)
- 1 µl DNasa (20U)
- 5 µl MgCl₂ 25 mM

1. Incubar la mezcla a 37°C durante 30 min.
2. Añadir 150 µl de agua DEPC hasta un volumen final de 200 µl.
3. Añadir un volumen (200 µl) de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1).
4. Centrifugar 5 min a 12000 rpm.
5. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio. Repetir la extracción con fenol:cloroformo:isoamílico.
6. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio midiendo el volumen.
7. Precipitar el ARN con 0.1 vol de Acetato Na 3M pH 5.2 y 2.5 vol de etanol al 100%.
8. Incubar toda la noche a -20°C.

9. Centrifugar 30 min a 13000 rpm a 4°C.
10. Eliminar el sobrenadante y lavar el precipitado con 500 µl de etanol al 80%.
11. Centrifugar durante 10 min a 13000 rpm a 4°C.
12. Eliminar el sobrenadante cuidadosamente y secar el precipitado al vacío.
13. Resuspender el precipitado en 20 µl de agua-DEPC. Conservar el ARN a -80°C.

4.8.2.5. Síntesis de ADNc

El ADNc se sintetizó a partir de 1.5 µg de ARN total mediante retrotranscripción *in vitro* usando un oligo-dT₁₇ (o primers al azar) y la enzima reversotranscriptasa proporcionada por el kit RT-PCR Master Plus de la casa Eppendorff de acuerdo a las indicaciones incluidas en el mismo:

1. Mezclar en un tubo de microcentrífuga:
 - 1.5 µg de ARN total
 - 1 µl de dNTPs 10 mM
 - 1.5 µl de oligo-dT₁₇ (1 µg/ml) o hexámeros
 - Agua-DEPC hasta 12 µl
2. Mezclar por pipeteo e incubar la mezcla a 65°C durante 5 min.
3. Poner los tubos en hielo y añadir:
 - 4 µl Tampón de primera cadena (5x)
 - 2 µl DTT 0.1 M
 - 1 µl Inhibidor de RNasa RNaseOUT (40 U/µl)
4. Mezclar suavemente e incubar a 42°C durante 2 min.
5. Añadir 1 µl de enzima SuperScript II RT (200U) y mezclar pipeteando.
6. Incubar a 25°C durante 10 min.
7. Incubar a 42°C durane 50 min.
8. Inactivar la reacción incubando a 70°C durante 15 min.

9. Guardar el ADNc a -20°C hasta su uso.

4.8.2.6. Manipulación del ADN y clonación de ADNc

La clonación de fragmentos parciales de los genes de trehalasa, *enod40* y *Rib18S* se llevó a cabo mediante amplificación por PCR a partir de los ADNc de nódulos y usando cebadores específicos diseñados a partir de las secuencias parciales de clones EST depositados en los bancos de datos (tabla 1).

Tabla 1. Secuencia y tamaño de los cebadores utilizados para la clonación de los genes de trehalasa, *enod40* y *Rib18S* en nódulos de *M. truncatula*

Gen	Oligo	Secuencia 5'3'	Tamaño
<i>Tre</i>	<i>MtTre1</i>	TATGAGATATACGCTAGGAC	774 pb
	<i>MtTre2</i>	GCCTTCAACTAACATGTGTT	
<i>Enod40</i>	<i>Mtenod40F</i>	AGGCAACTTCCCCACTACCT	572 pb
	<i>Mtenod40R</i>	GTCAGCTGCAAATTGAGTGA	
<i>Rib</i>	<i>RibF</i>	AAAAGGTCGACGCGGGCT	300 pb
	<i>RibR</i>	CGACAGAAGGGACGAGAC	

a) Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

La purificación de la banda de ADN del gel de agarosa se realizó utilizando un kit (Nucleospin Extract) siguiendo las instrucciones del proveedor.

b) Ligación en el vector de clonación

Los productos de PCR generados se clonaron en el vector pPCRScript (Stratagene) para su secuenciación y posterior análisis, cada mezcla de reacción contenía:

- 1 µl de vector de clonación
- 1 µl de tampón de clonación 10x
- 0.5 µl de ATPr
- X µl de producto de PCR
- 1 µl de enzima de restricción *SrfI* (5U/µl)
- 1 µl de ligasa de ADN T4 (4U/µl)
- Completar con agua hasta alcanzar los 10 µl

El cálculo de la relación molar entre inserto y vector de clonación se realizó mediante la siguiente ecuación:

$$X \text{ ng de PCR} = \frac{(\text{n}^\circ \text{ pb del producto de PCR})(10 \text{ ng de vector pPCR Script})}{2961 \text{ pb del vector pPCR Script}}$$

c) Digestión total de ADN con endonucleasas de restricción

La digestión total de ADN con enzimas de restricción se llevó a cabo en las condiciones óptimas para cada enzima, siguiendo las indicaciones, en cuanto a temperatura y tampón, recomendadas por Boehringer, Mannheim, Alemania.

Las digestiones con más de una enzima de restricción se realizaron simultáneamente cuando las enzimas requerían el mismo tampón y temperatura. En caso contrario, y siempre que fue factible, se digirió primero con la enzima que requería el tampón de menor fuerza iónica, adicionando posteriormente el tampón y la enzima para la segunda digestión. Cuando esto no fue posible, se llevó a cabo primero la digestión con una enzima, se limpió luego el ADN mediante tratamiento con fenol-cloroformo, se precipitó con etanol y, posteriormente, se resuspendió en agua, llevándose a cabo entonces la digestión con la segunda enzima.

d) Separación e identificación de fragmentos de restricción: electroforesis en gel de agarosa

La separación de fragmentos de restricción se ha llevado a cabo mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa sumergidos en TBE (Tris 89 mM, EDTA-Na₂ 2.5 mM, BO₃H₂ 89 mM, pH 8.2). La concentración de agarosa ha sido del 0.7% o del 1%, según el tamaño de los fragmentos a resolver. El voltaje usual de trabajo ha sido de 120 V en cubetas de electroforesis GNA 200 (Pharmacia) y de 80 V en cubetas de electroforesis GNA 100 (Pharmacia). Como tampón de carga se ha utilizado una mezcla de sacarosa al 40% y azul de bromofenol al 0.25%, ambos preparados en agua. Se ha empleado 1 µl de tampón de carga por cada 5 µl de solución de ADN.

e) Revelado de geles y fotografía

Las muestras de ADN presentes en los geles de agarosa se revelaron sumergiéndolos en agua a la que previamente se adicionan unas gotas de una solución de bromuro de etidio (1 mg/ml), durante 15-20 min. Posteriormente se observaron con luz UV (260 nm) en un transiluminador (Vilver Lourmat). Las fotografías de los geles se han realizado con una videocámara acoplada a un sistema de impresión de imágenes (Gelprinter vm509).

f) Secuenciación de ADN

La secuenciación se llevó a cabo usando un secuenciador automático (Pharmacia).

g) Análisis informático de secuencias de ADN y proteínas

Los análisis de las secuencias de ADN y proteínas, búsqueda de sitios de restricción, localización de posibles marcos abiertos de lectura (ORFs), etc., se han realizado con los siguientes programas y paquetes informáticos: Vector NTI[®], Fasta y Clustal W. Los bancos de datos consultados fueron EMBL, Genebank a través del servidor NCBI (<http://www.ncbi.nih.gov/>) y del EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/>).

4.8.2.7. Análisis de la expresión génica: PCR cuantitativa

El estudio de la expresión del gen de la trehalasa se realizó mediante PCR en tiempo real, basada en la utilización de fluoróforos específicos que permiten monitorizar en tiempo real lo que está ocurriendo en cada ciclo de amplificación. El mecanismo de detección utilizado fue inespecífico mediante fluorocromos intercalantes (SYBR Green) que detectan todo el ADN de doble cadena producido durante la reacción de PCR. Para llevar a cabo este estudio, se extrajo el ARN de los nódulos y se sintetizaron los correspondientes ADNc mediante transcripción inversa del mismo modo descrito en el apartado 4.8.2.5.

El diseño de la PCR a tiempo real recomienda el uso de fragmentos o amplicones de un determinado tamaño que sea adecuado para un mejor rendimiento de la amplificación. Por ello se diseñaron los cebadores para el amplicón de la trehalasa y para el amplicón usado como control constitutivo (el factor de elongación *EF1- α*) de manera que tuviesen la misma temperatura de anillamiento y los productos de PCR tuvieran tamaños similares.

Los oligos utilizados fueron (tabla 2):

Tabla 2. Secuencia y tamaño de los cebadores utilizados para la clonación de los genes trehalasa y *EF1- α* en nódulos de *M. truncatula*

Gen	Oligo	Secuencia 5'3'	Tamaño
<i>Tre</i>	<i>qMtTreF</i>	CATCAGCTGCTGAATCAGGA	313 pb
	<i>qMtTreR</i>	TGGTGCAGGGTATCCCAAAC	
<i>EF1-α</i>	<i>qMtEFIF</i>	AGGCAACTTCCCCACTACCT	289 pb
	<i>qMtEFIR</i>	GTCAGCTGCAAATTGAGTGA	

Las PCRs cuantitativas a tiempo real se realizaron en un termociclador iCycler (BioRad).

Cada mezcla de reacción contenía:

1 μ l de ADNc
2.5 μ l de tampón 10X
1.5 μ l MgCl₂ 50 mM
5 μ l dNTPs 1 mM
0.5 μ l Cebador 5' 10 μ M
0.5 μ l Cebador 3' 10 μ M
2.5 μ l Solución SyBrGreen 1X en agua Mili-Q
0.1 μ l Taq DNA
Completar con agua hasta alcanzar los 25 μ l

Solución de SyBrGreen (500X): 18 μ l DMSO, 1 μ l fluoresceína (BioRad), 1 μ l SyBrGreen (Invitrogen). Guardar en oscuridad.

El programa de PCR consistió en 5 min de incubación a 95°C para activar la Taq de “arranque caliente” (Hot Start), seguido de 35 ciclos de 30s a 95°C, 45s a 55°C La fluorescencia emitida por el SyBrGreen se midió al final de la extensión de cada ciclo.

La especificidad de la amplificación por PCR se comprobó mediante la realización de una curva de desnaturalización del amplicón una vez finalizada la PCR. Para ello se efectuó un calentamiento desde 70°C a 100°C incrementado la temperatura 1°C por minuto.

Las cuantificaciones se realizaron a partir de tres reacciones de PCR independientes por cada muestra biológica, analizándose la expresión del gen de interés en dos muestras biológicas independientes. El ciclo umbral (Ct) es calculado por el software que acompaña al equipo de la PCR cuantitativa en tiempo real, y es el ciclo en el que comienza a detectarse el amplicón. Los resultados obtenidos se estandarizaron a los niveles del factor de elongación *EFI- α* (cebadores *qMtEFIF* y *qMtEFIR*). Los niveles relativos de transcrito se calcularon usando el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ descrito por Livak y Schmittgen (2001). Este método permite presentar los datos como el cambio en la expresión génica normalizado respecto de la expresión de un gen de referencia endógeno (*EFI- α*), y en relación al tratamiento control. Para el tratamiento control, $\Delta\Delta C_t$ equivale a cero por lo que 2^0 es igual a 1 y el

cambio en la expresión génica relativo al control es 1 por definición. Para las muestras tratadas, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ indica las veces de cambio en la expresión génica en relación al control.

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, USA) 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.

IV. RESULTADOS

1. Efecto del estrés salino en la simbiosis *M. truncatula*-*S. meliloti* y *L. japonicus*-*M. loti* desde el inicio del cultivo (*long-term*)

En este experimento se estudia el efecto de la salinidad en el crecimiento, proceso fotosintético, fijación de nitrógeno, metabolismo nodular y estado nutricional de la planta comparando dos simbiosis: *M. truncatula*-*S. meliloti* GR4 (nódulos indeterminados) y *L. japonicus*-*M. loti* R7A (nódulos determinados). Para ello, las plantas fueron tratadas con 25 y 50 mM de NaCl desde el inicio del cultivo, que se prolongó hasta plena fructificación en ambas especies (10 semanas *M. truncatula* y 12 semanas *L. japonicus*), cuando se llevó a cabo la recolecta.

1.1. Análisis de crecimiento

Los parámetros estudiados relacionados con el crecimiento de los cultivos se detallan en la figura 1.1., en la que se expone el peso seco de la parte aérea (PSPA) y raíz (PSR), peso seco total de la planta (PSP) y la relación raíz/parte aérea (RPA). Los datos numéricos y el análisis de la varianza se reflejan en las tablas del apéndice de la A 1.1 a la A. 1.4.

La salinidad provocó una disminución en el crecimiento de las plantas que fue proporcional a la dosis de sal en el medio. Con la dosis 25 mM de NaCl, la disminución fue del 40% en *M. truncatula* y del 30% en *L. japonicus*, mientras que con 50 mM NaCl, los porcentajes fueron del 50% y 40% respectivamente. Tanto el peso seco de parte aérea como el de raíz experimentaron un comportamiento similar, presentando porcentajes de disminución semejantes a los del peso seco total de la planta, excepto en raíz de *M. truncatula*, que con la dosis mayor de sal decreció un 64% respecto al de plantas control.

La relación raíz/parte aérea, considerada como un índice de equilibrio entre el crecimiento de los dos órganos, mostró diferente comportamiento entre una y otra especie; mientras que en *M. truncatula* experimentó un descenso que solo fue estadísticamente significativo con la dosis mayor de sal, en *L. japonicus* no se observan diferencias significativas en ningún tratamiento.

Resultados

En cuanto a las diferencias que se observan entre ambas especies en el peso seco total de la planta, podemos decir que *M. truncatula* produce 3 veces más biomasa respecto de *L. japonicus* en condiciones control, sin embargo, esta diferencia disminuye a 2.4 con la dosis 50 mM de NaCl, lo que indica que el efecto negativo de la salinidad es menor en *L. japonicus*.

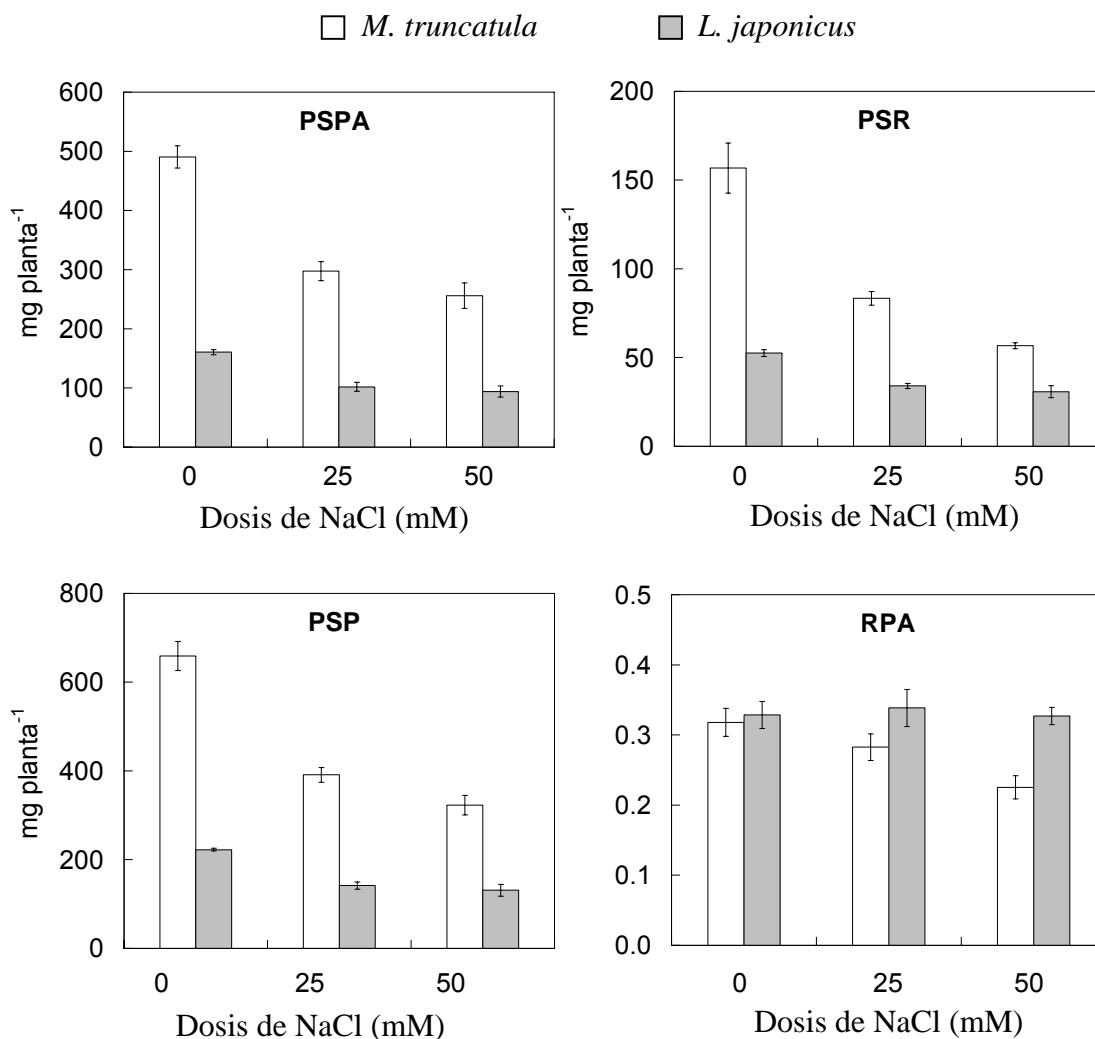


Figura 1.1. Peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de raíz (PSR), peso seco de planta (PSP) y relación raíz/parte aérea (RPA) de *M. truncatula* y *L. japonicus* inoculadas con *S. meliloti* GR4 y *M. loti* R7A y tratadas con 0, 25 y 50 mM NaCl. Cada barra es la media de 10 réplicas \pm SE.

1.2. Fijación de nitrógeno

Relacionados con el proceso de fijación de nitrógeno, se han evaluado los parámetros representados en la figura 1.2, en la que se contempla la actividad nitrogenasa aparente (ANA), actividad nitrogenasa total (ANT), tasa de fijación de nitrógeno (TFN), contenido de leghemoglobina, peso seco de nódulos (PSN) y peso normalizado de nódulos (PNN). Datos numéricos y estudio de la varianza en las tablas A 1.5 a A 1.8 del apéndice.

El análisis de los parámetros relacionados con la actividad nitrogenasa (ANA, ANT y TFN), muestra diferencias en la eficiencia de la fijación de nitrógeno en ambas especies, ya que se detectaron valores 3 y 4 veces superiores en *L. japonicus* que en *M. truncatula*. Sin embargo, en *M. truncatula* el efecto negativo de la salinidad fue menor, ya que con 25 mM NaCl solo se registró una caída en la ANA del 25%, y no se observaron diferencias significativas en la ANT ni en TFN, por el contrario, en *L. japonicus* con la misma dosis de NaCl se produjo un descenso en la ANT y en la TFN del 30% y del 40% respectivamente. Con la dosis 50 mM de sal, los tres parámetros relacionados con la actividad nitrogenasa en *M. truncatula*: ANA, ANT y TFN se redujeron un 25%, 40% y 50% respectivamente, mientras que en *L. japonicus*, en los tres parámetros mencionados se observó el mismo efecto, es decir, una reducción del 65%. Se ha comprobado la correlación positiva y significativa de estos parámetros con los de crecimiento de planta (tablas 1.6 y 1.7).

Los nódulos determinados de *L. japonicus* contenían 1.6 veces más leghemoglobina que los indeterminados de *M. truncatula*. En cuanto a su comportamiento en relación con la salinidad, se observó un efecto distinto en ambas especies: en nódulos de *M. truncatula* se produjo una disminución del 43% y 83% con las dosis 25 y 50 mM NaCl respectivamente, mientras que en los de *L. japonicus* se incrementó un 28% con 25 mM, y no varió con 50 mM de NaCl. El 90% de la variabilidad observada en los datos obtenidos de este parámetro se relacionan con el tratamiento salino en ambas simbiosis (tabla A. 1.6 y A. 1.8 del apéndice).

En el diagrama de barras de la figura 1.2, se aprecia como el peso seco de nódulos en *M. truncatula* no experimentó variaciones significativas con la dosis de sal, mientras que en *L. japonicus* si se produce una disminución, aunque no proporcional al aumento de sal. Cuando la masa nodular de la planta se relaciona con el crecimiento de la parte aérea, se obtiene lo que se

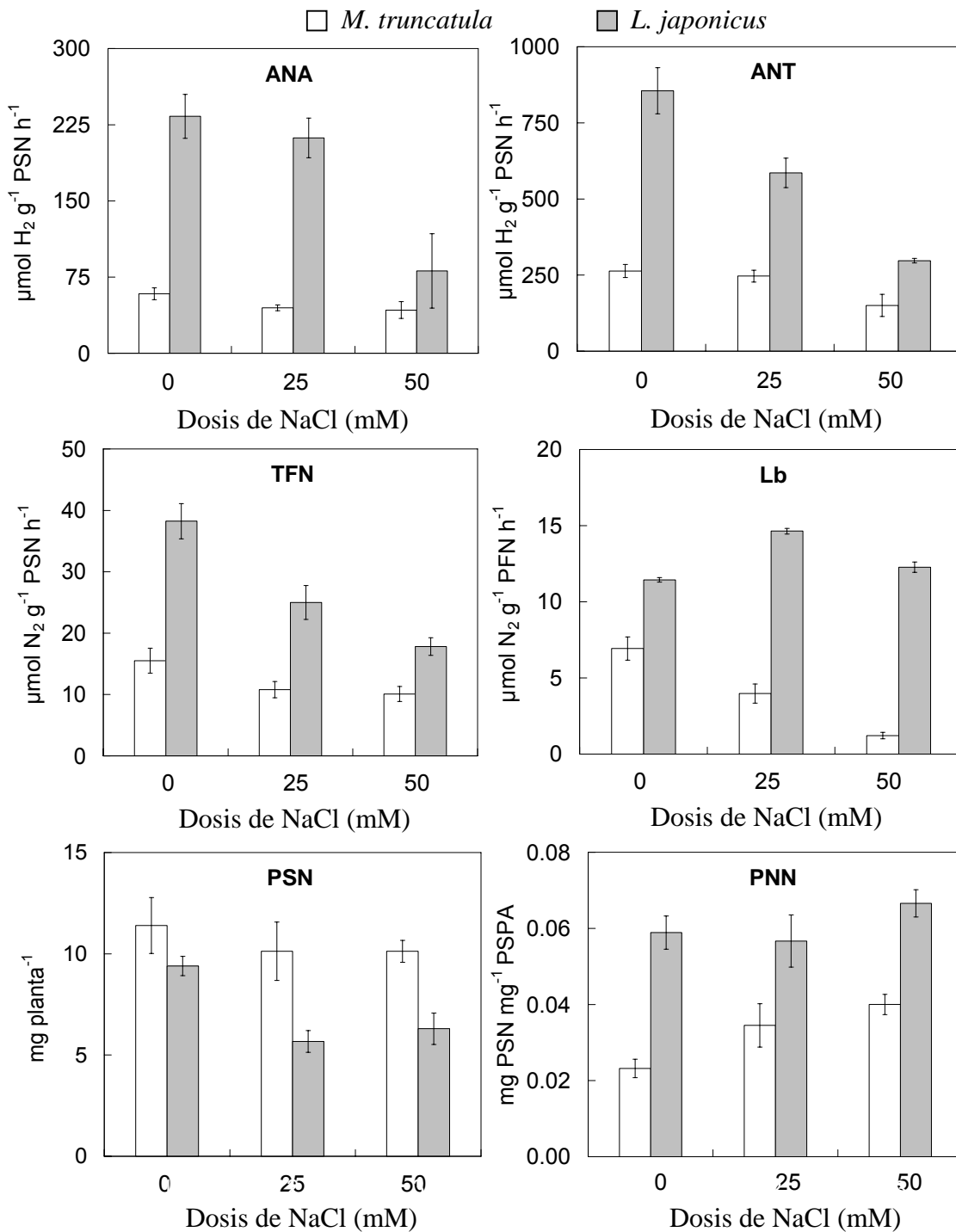


Figura 1.2. Actividad nitrogenasa aparente (ANA), actividad nitrogenasa total (ANT), tasa de fijación de nitrógeno (TFN), contenido de leghemoglobina (Lb), peso seco de nódulos (PSN) y peso normalizado de nódulos (PNN) de plantas de *M. truncatula* y *L. japonicus* inoculadas con *S. meliloti* GR4 y *M. loti* R7A y tratadas con 0, 25 y 50 mM NaCl. Cada barra es la media de 10 réplicas \pm SE.

denomina el peso normalizado de nódulos (PNN), considerado un índice idóneo para relacionar la posible incidencia de ciertos factores como la salinidad sobre el crecimiento de los nódulos en relación con la parte aérea de la planta, en este experimento, se observa que este parámetro es mayor en la simbiosis de *L. japonicus* que en la de *M. truncatula*. Un aspecto destacable, fue el aumento del peso normalizado de los nódulos de *M. truncatula* con la salinidad, que además presentó un alto índice de correlación negativa con los parámetros de crecimiento, los de fijación de nitrógeno (excepto TFN), las actividades enzimáticas del metabolismo carbonado nodular y con el contenido de azúcares del nódulo (tabla 1.6).

1.3. Metabolismo carbonado

En la figura 1.3. se muestran las actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo carbonado determinadas en el citosol nodular: sacarosa sintasa (SS), invertasa alcalina (IA), hexoquinasa (HK), fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), malato deshidrogenasa (MDH) e isocitrato deshidrogenasa (ICDH). En el apéndice se reúnen los datos numéricos expresados por peso fresco (A 1.43 y A 1.45) y por mg proteína (A1.9 y A 1.11) de ambas simbiosis.

Se aprecia que la actividad IA es mayor que la SS en ambas simbiosis con una relación 15:1, no obstante, los nódulos de *L. japonicus* tienen mayor actividad SS e IA que los de *M. truncatula*, tanto en condiciones control como con sal. Estas actividades, mostraron una fuerte inhibición por efecto de la salinidad, en nódulos de *M. truncatula*, la actividad SS se redujo un 50% con 25 mM NaCl y un 75% con 50 mM NaCl respecto del control, mientras que la IA un 22% y 52% en las mismas condiciones. Estos resultados contrastan con los obtenidos en nódulos de *L. japonicus*, donde ambas actividades mostraron una menor sensibilidad a la salinidad, la SS solo disminuyó con la dosis mayor de sal un 30%, mientras que la IA se redujo un 10% con ambas dosis de sal. En nódulos de *M. truncatula*, estas actividades exhiben una correlación positiva y significativa con los parámetros de crecimiento y fijación de nitrógeno (tabla 1.6).

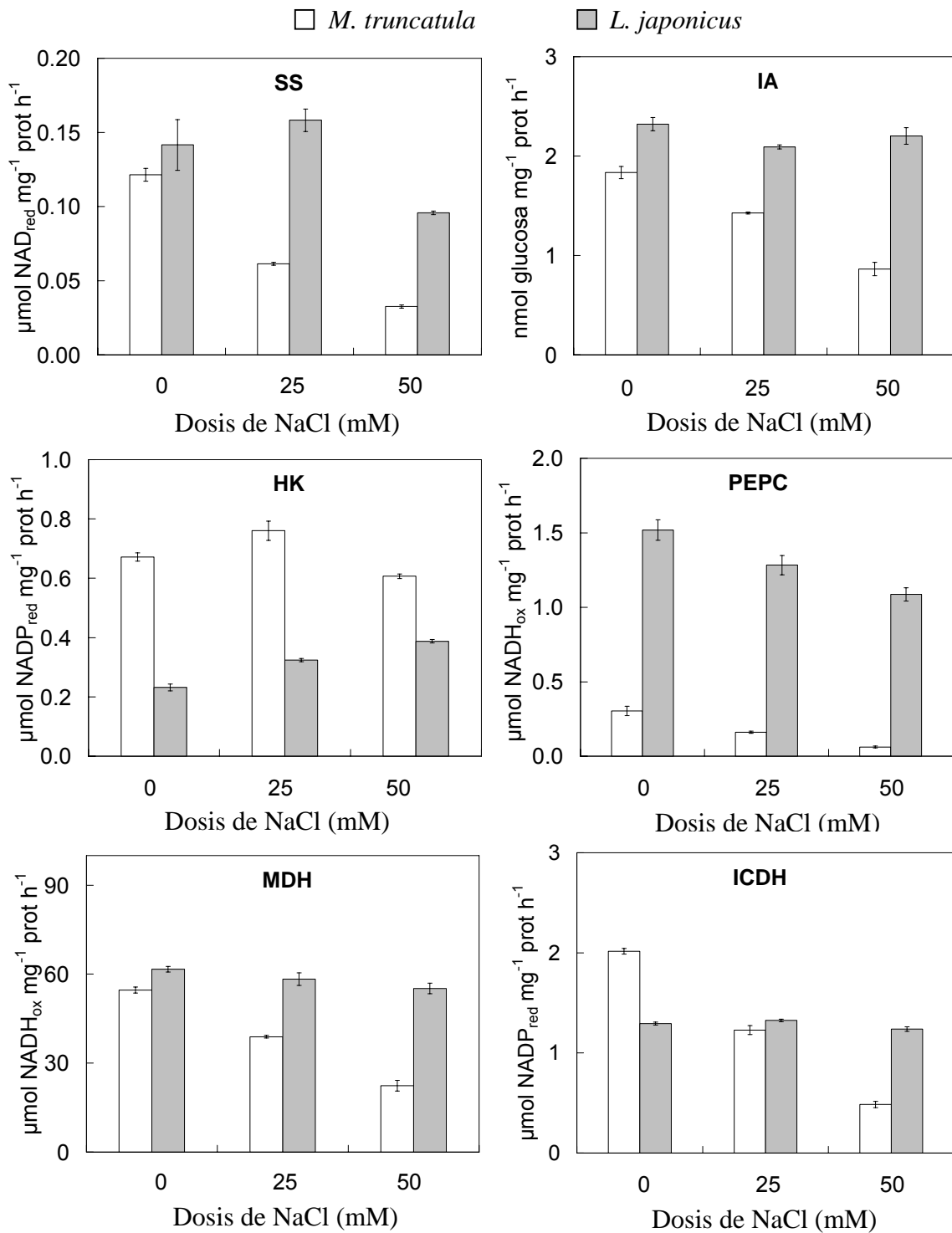


Figura 1.3. Actividad sacarosa sintasa (SS), invertasa alcalina (IA), hexoquinasa (HK), fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), malato deshidrogenasa (MDH) e isocitrato deshidrogenasa (ICDH), en nódulos de *M. truncatula* y *L. japonicus*. inoculadas con *S. meliloti* GR4 y *M. loti* R7A y tratadas con 0, 25 y 50 mM NaCl. Cada barra es la media de 4 réplicas \pm SE.

La actividad HK es tres veces más activa en nódulos de *M. truncatula* que en los de *L. japonicus*, y en condiciones de salinidad presentó comportamientos distintos según la simbiosis: mientras que en nódulos de *M. truncatula* no se observaron variaciones significativas de esta actividad, que solo se incrementó ligeramente (13%) con la dosis menor de sal, en los de *L. japonicus* aumentó un 39% y 67% con 25 y 50 mM NaCl respectivamente. La correlación de esta enzima en nódulos de *L. japonicus* con el crecimiento (PSP, PSPA y PSR) así como con la actividad nitrogenasa (ANA, ANTy TFN) fue negativa ($P \leq 0.01$), tal como se comprueba en la tabla 1.7.

Como puede observarse en el diagrama de barras de la figura 1.3, las actividades MDH y PEPC, fueron más sensibles a la sal en nódulos de *M. truncatula*, donde decrecieron proporcionalmente al incremento de la salinidad, llegando a reducirse un 60% y un 80% respectivamente con 50 mM NaCl. Por el contrario, en nódulos de *L. japonicus* esta reducción no superó el 11% (MDH), y el 28% (PEPC). Es destacable que la carboxilasa presentó una actividad 5 veces superior en nódulos de *L. japonicus* respecto a los de *M. truncatula* en condiciones control, tendencia que se intensificó con 25 mM (8 veces) y 50 mM (11 veces) de NaCl. Tanto en nódulos de *L. japonicus* como en los de *M. truncatula* MDH y PEPC mostraron valores de correlación positiva y significativa ($P \leq 0.01$) con los parámetros relacionados con fijación de nitrógeno y crecimiento (tablas 1.6 y 1.7).

La actividad ICDH fue un 50% mayor en nódulos de *M. truncatula* que en los de *L. japonicus*, en los que permaneció estable al no afectarse por el NaCl, mientras que en *M. truncatula* sí mostró un efecto negativo por el NaCl, ya que se redujo un 75% con 50 mM. En esta simbiosis, esta actividad enzimática presentó una buena correlación ($P \leq 0.01$) con el crecimiento de la planta y todos los parámetros estudiados relacionados con la fijación de nitrógeno.

1.4. Metabolismo de la trehalosa

En la figura 1.4 se exponen la actividad trehalosa-6 fosfato sintasa (TPS) y trehalosa-6 fosfato fosfatasa (TPP), implicadas en la síntesis de trehalosa, así como la actividad trehalasa (TRE), responsable de su hidrólisis en el nódulo de las simbiosis objeto de estudio.

Se puede establecer que la actividad TPS es más activa en nódulos de *M. truncatula* que en los de *L. japonicus*, sin embargo, se detecta que la actividad TPP y TRE en *L. japonicus* multiplica por 3.3 y 1.4 respectivamente el valor detectado en *M. truncatula*. Tanto la síntesis como la degradación se inhibieron por la sal en el medio de cultivo en nódulos de *M. truncatula* y *L. japonicus*. La actividad TPS nodular decreció un 50% con 25 mM NaCl en ambas simbiosis y un 55% y 35% con 50 mM en la de *M. truncatula* y *L. japonicus* respectivamente.

La actividad TPP mostró una tendencia similar a la TPS en nódulos de *M. truncatula*, disminuyendo un 50% y 80% con 25 y 50 mM NaCl respectivamente. La correlación entre TPS y TPP en *M. truncatula* fue altamente significativa y positiva ($r=0.97$) (tabla 1.6), sin embargo, en nódulos de *L. japonicus* esta correlación fue negativa ($r=-0.99$) (tabla 1.7), detectándose que la actividad TPP es más tolerante e incrementa su actividad un 60% en respuesta a la salinidad. La actividad trehalasa, disminuyó de forma estadísticamente significativa con la dosis 50 mM de sal un 50% y un 25% en nódulos de *M. truncatula* y de *L. japonicus* respectivamente. Esta actividad fue aproximadamente un 30% superior en los nódulos determinados (*Lotus*) que en los indeterminados (*Medicago*). El grado de correlación positiva entre la trehalasa y los datos de crecimiento y fijación de nitrógeno, fue alto, especialmente con estos últimos, en ambas especies vegetales (tablas 1.6 y 1.7).

Se puede generalizar que las actividades enzimáticas implicadas en el metabolismo de la trehalosa se correlacionan con las otras del metabolismo carbonado estudiadas y con el contenido de carbohidratos determinados en *M. truncatula* (tabla 1.6), mientras que las correlaciones de las enzimas del metabolismo de la trehalosa en *L. japonicus* (tabla 1.7) son más aleatorias. También se puede admitir que la variabilidad en los datos obtenidos relativos a las tres actividades mencionadas es en un 99% debido a la salinidad en *M. truncatula* (A.1.14) y entre un 85% y 95% en *L. japonicus* (A 1.16).

1.5. Contenido carbohidratos del nódulo

En la figura 1.5 se reflejan el contenido de los mono y disacáridos evaluados en nódulos: sacarosa, maltosa, fructosa, glucosa y trehalosa. Los

datos numéricos de estos carbohidratos en nódulos de *M. truncatula* se encuentran en la tabla A 1.17, y los correspondientes a nódulos de *L. japonicus* en la A 1.19, los estudios de varianza de ambas tablas se corresponden con la A 1.18 y A 1.20, todas ellas en el apéndice.

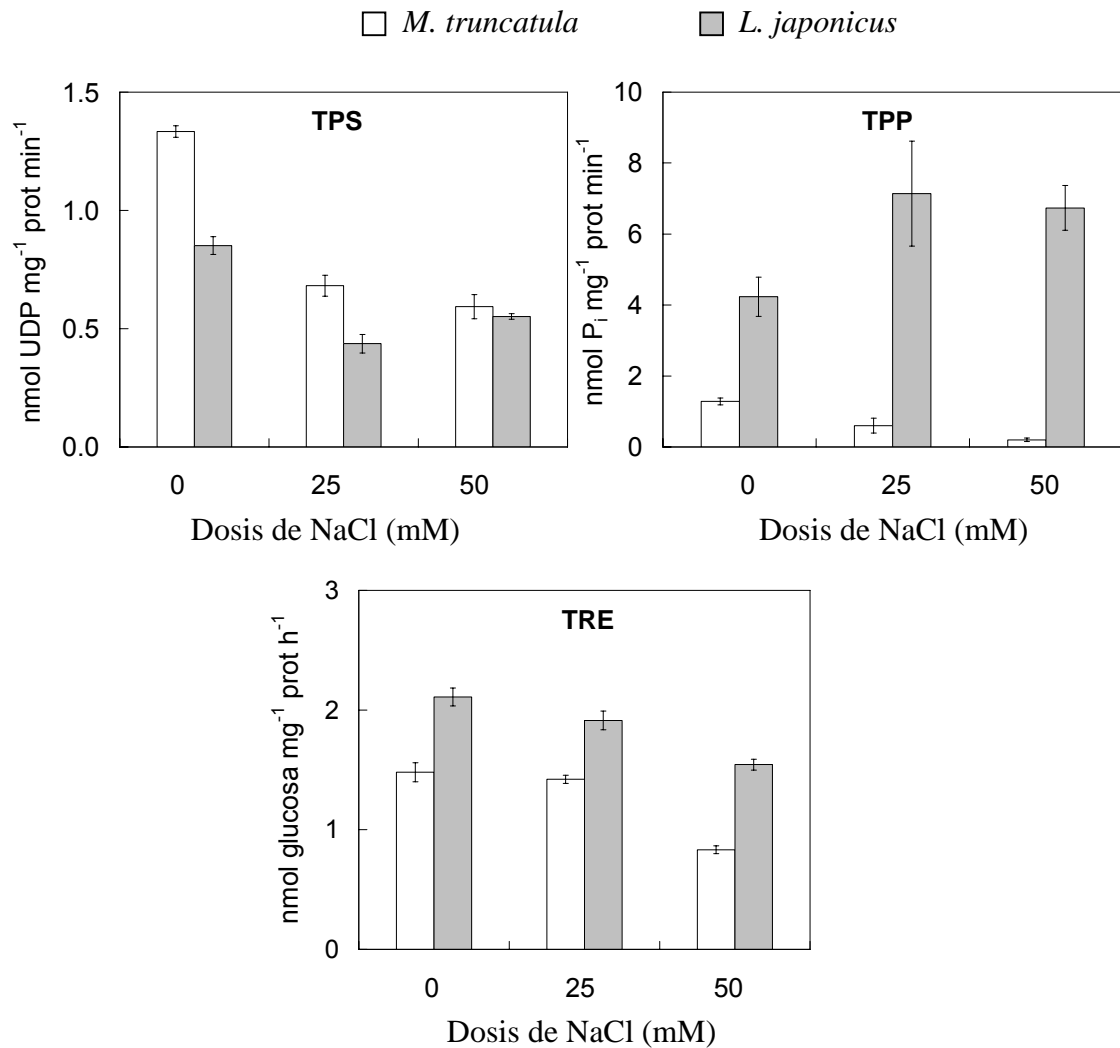


Figura 1.4. Actividad trehalosa-6 fosfato sintasa (TPS), trehalosa-6 fosfato fosfatasa (TPP) y trehalasa (TRE) en nódulos de *M. truncatula* y *L. japonicus* inoculadas con *S. meliloti* GR4 y *M. loti* R7A y tratadas con 0, 25 y 50 mM NaCl. Cada barra es la media de 4 réplicas \pm SE.

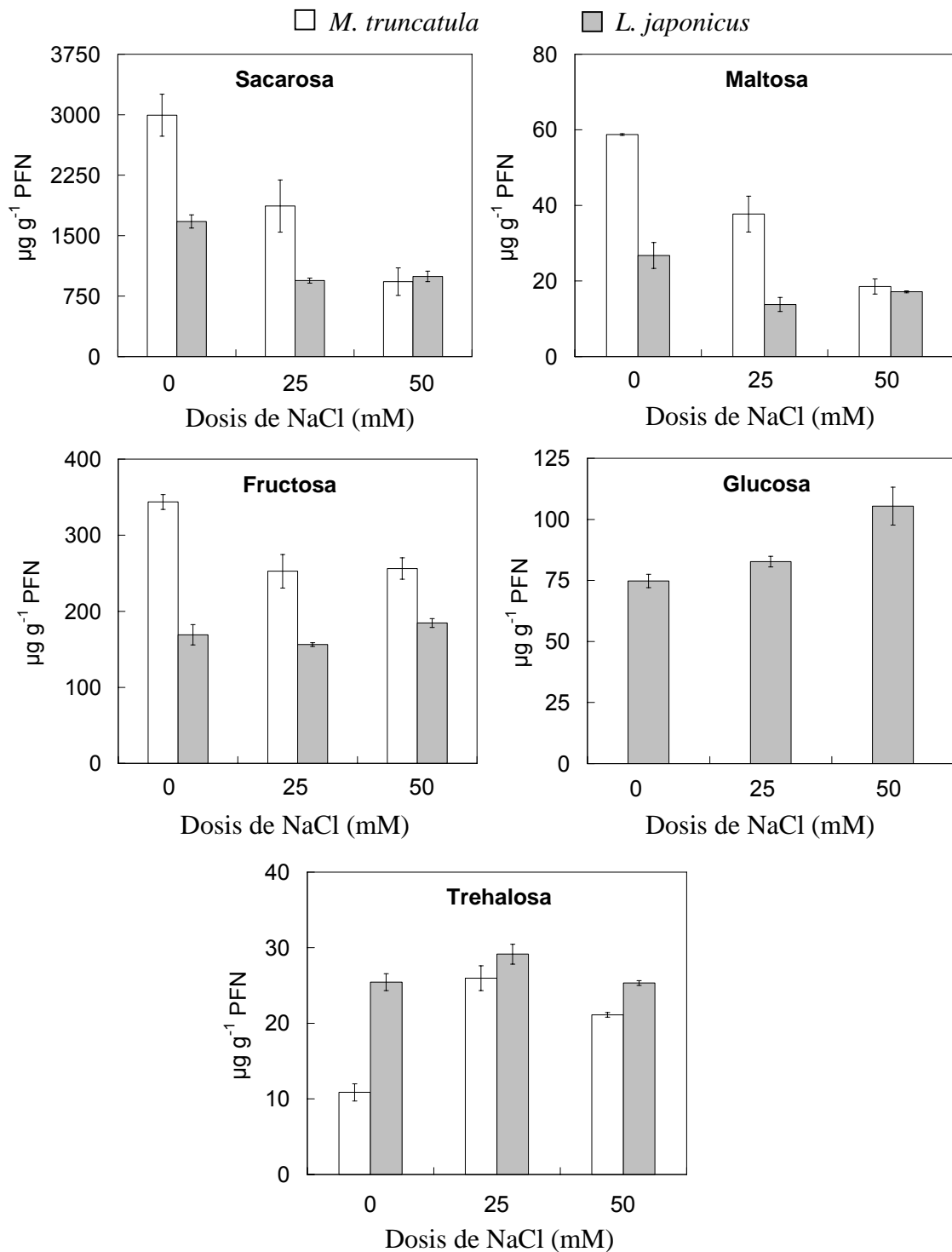


Figura 1.5. Contenido de sacarosa, maltosa, fructosa, glucosa y trehalosa en nódulos de *M. truncatula* y *L. japonicus* inoculadas con *S. meliloti* GR4 y *M. loti* R7A y tratadas con 0, 25 y 50 mM NaCl. Cada barra es la media de 3 réplicas \pm SE.

Como se puede observar en la figura 1.5, el carbohidrato mayoritario en nódulos de ambas leguminosas es la sacarosa, que se encuentra en *M. truncatula* en una proporción 50 veces superior al contenido de maltosa y 270 veces superior al de trehalosa, mientras que en *L. japonicus* el contenido de sacarosa fue 65 veces mayor al de maltosa y trehalosa. También se aprecia que los nódulos control de *M. truncatula* acumulan casi el doble de sacarosa, maltosa y fructosa que los de *L. japonicus*, ocurriendo lo contrario con la trehalosa.

En condiciones de estrés salino, tanto el contenido de **sacarosa** como el de **maltosa** experimentó un comportamiento similar en ambas especies: **a)** en nódulos de *M. truncatula*, la cantidad de ambos azúcares decreció en un 40% y 70% con 25 y 50 mM respectivamente; **b)** en los de *L. japonicus* el descenso fue de un 40% aproximadamente con las dos dosis de NaCl. En la tabla 1.6 se aprecia una correlación positiva entre el nivel de sacarosa con la actividad de las dos enzimas responsables de su degradación en nódulo de *M. truncatula* SS ($r=0.99$) e IA ($r=0.99$), mientras que en la tabla 1.7 de *L. japonicus* solo se observa una correlación positiva significativa con la actividad IA ($r=0.91$).

En cuanto al contenido de **fructosa** nodular, la sal indujo efectos distintos según la especie, en nódulos de *M. truncatula* la fructosa decreció un 25%, y en los de *L. japonicus* apenas se observaron variaciones. Por el contrario, la **glucosa** no se detectó en nódulos de *M. truncatula* y se incrementó un 40% en los de *L. japonicus* con 50 mM NaCl. El contenido de glucosa en nódulos de *L. japonicus* se correlaciona negativamente con la actividad nitrogenasa (ANA, TNA y TFN) y con la sacarosa sintasa, malato deshidrogenasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa y trehalasa nodular (tabla 1.7).

El contenido de **trehalosa** detectado en nódulos de ambas especies, representó algo más del 2% del contenido total de carbohidratos estudiados en el nódulo, no obstante, en los determinados de *L. japonicus* se detectó 2.5 veces más trehalosa que en los indeterminados de *M. truncatula*. Se observó una respuesta diferente a la salinidad que la descrita para el contenido de sacarosa y maltosa en nódulos de las dos leguminosas, la concentración de trehalosa aumentó con la sal, siendo este incremento superior en los de *M. truncatula* donde se multiplicó por 2.5 con 25 mM NaCl y por 2 con 50 mM NaCl, mientras que en los de *L. japonicus* este incremento fue del 14%

con 25 mM de sal. El contenido de trehalosa nodular en *M. truncatula* (tabla 1.6) se correlaciona negativamente con los parámetros de crecimiento, PSN y con el contenido de fructosa, mientras que en *L. japonicus* (tabla 1.7) se correlaciona positivamente con el contenido de leghemoglobina y de fructosa.

1.6. Contenido de metabolitos

Se determinaron otros metabolitos que pueden actuar como osmolitos ante el estrés salino, como azúcares solubles totales (Ast), almidón (Alm) aminoácidos (Aa) y prolina (Pro) que se representan en la figura 1.6. y 1.7, y en la tablas de la A 1.21 a la A 1.28 del apéndice entre los que se incluyen el análisis de varianza de los datos implicados.

En nódulos de *M. truncatula*, el contenido de **azúcares solubles totales** presentó valores superiores a los obtenidos en hoja y raíz, y fue casi 3 veces superior al detectado en nódulos de *L. japonicus*, además se observa que el NaCl induce respuestas distintas en cada uno de los órganos estudiados; mientras que en nódulos decreció un 25%-50%, en hojas incrementó un 50% y 80% con 25 y 50 mM NaCl respectivamente, y en raíz no sufrió variaciones significativas. En *L. japonicus*, el mayor contenido de azúcares solubles totales se encontró en hojas (a diferencia de *M. truncatula*) suponiendo 2.5 veces y un 35% más que el detectado en nódulos y raíz respectivamente, además, el medio salino provocó un incremento del contenido de azúcares en todos los órganos: en hoja entre un 20% y 25%, en raíz fue 2 y 2.5 veces mayor con 25 y 50 mM NaCl respectivamente, y en nódulo solo se observa con 25 mM de sal (20%).

El contenido de **almidón**, tanto en *L. japonicus* como *M. truncatula* fue superior en hojas que en nódulos, concretamente la relación fue de 2.3 veces en *M. truncatula* y 9.3 en *L. japonicus*, no obstante se constata, que en hojas y nódulos de *M. truncatula* hay 3 y 12 veces más que en *L. japonicus*. La respuesta a la salinidad fue diferente en cada una de las simbiosis: mientras en *M. truncatula* el contenido de almidón disminuyó en hoja y nódulo de forma proporcional al aumento de sal, en *L. japonicus* se observó el efecto contrario en ambos órganos, ya que el NaCl en el medio incrementó el contenido de almidón un 50% con 25 mM NaCl y lo duplicó con 50 mM tanto en hoja como en nódulo. Estos resultados llevan a obtener

una correlación positiva y significativa entre el contenido de almidón y la actividad SS en nódulos de *M. truncatula* ($r=0.95$), mientras que en *L. japonicus* esta correlación es negativa ($r=-0.86$) (tablas 1.6 y 1.7).

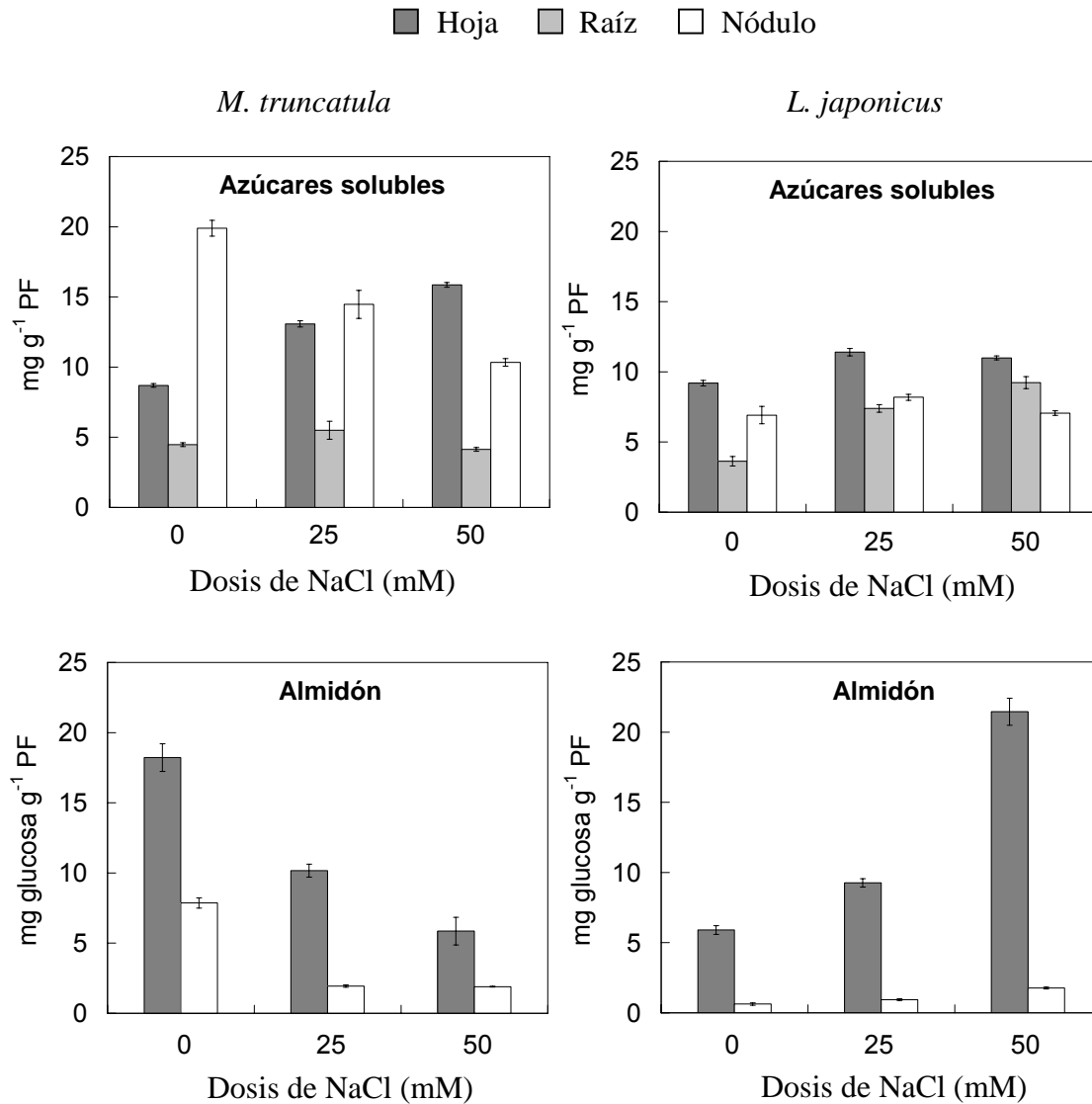


Figura 1.6. Contenido de azúcares solubles y almidón en hoja, raíz y nódulos de *M. truncatula* y *L. japonicus* inoculadas con *S. meliloti* GR4 y *M. loti* R7A y tratadas con 0, 25 y 50 mM NaCl. Cada barra es la media de 3 réplicas \pm SE.

En las dos especies se observa (fig. 1.7) que en plantas control el contenido de **aminoácidos** en nódulos es 2 veces mayor que en raíz y 5 veces mayor que en hojas, incluso se detecta que el contenido de aminoácidos en raíz, nódulos y hojas de *L. japonicus* es entre un 60% y 75% mayor al obtenido en estos mismos órganos de *M. truncatula*. En *M. truncatula* la salinidad redujo el contenido de aminoácidos en nódulos un 20% y 80% con 25 y 50 mM NaCl respectivamente, sin embargo, en hojas se incrementó ligeramente y no se modificó en raíz, mientras que en *L. japonicus* tan solo se observa una disminución del 20% de este contenido en nódulo y raíz con 50 mM NaCl, y en hojas no se altera.

Se observa que la acumulación de **prolina** en *M. truncatula* fue superior en nódulo que en hoja y raíz. En *L. japonicus* se acumula prioritariamente en hoja, no se detecta en raíz y en nódulo un 60% de los detectado en hoja, además en hojas de *L. japonicus* hay 7 veces más prolina que en hojas de *M. truncatula* y en nódulos de *M. truncatula* un 30% más que en los de *L. japonicus*.

En respuesta a la salinidad, en *M. truncatula* la prolina se acumuló en mayor cantidad en hojas, donde el contenido fue 9 y 21 veces mayor respecto del control con las dosis 25 y 50 mM NaCl respectivamente, en raíz este aumento fue del 100% y del 40%, y en nódulo decreció un 54% y 30% con las mismas dosis de NaCl. En *L. japonicus* los niveles de prolina solo aumentaron en raíz, donde pasaron de niveles indetectables en plantas control a niveles cercanos a los $100\mu\text{g g}^{-1}\text{PFN}$ con la dosis 50 mM de sal, sin embargo en nódulos, la cantidad de prolina se redujo en un 25% con esta dosis de sal, mientras que en hojas el descenso fue del 60% y del 15% con 25 y 50 mM NaCl respectivamente. Las correlaciones observadas en el contenido de prolina son distintas en nódulos de *M. truncatula* y de *L. japonicus*, en el primer caso se correlacionan con el crecimiento de la planta y no con los datos de fijación de nitrógeno, mientras que en *L. japonicus* se observa lo contrario (tablas 1.6 y 1.7).

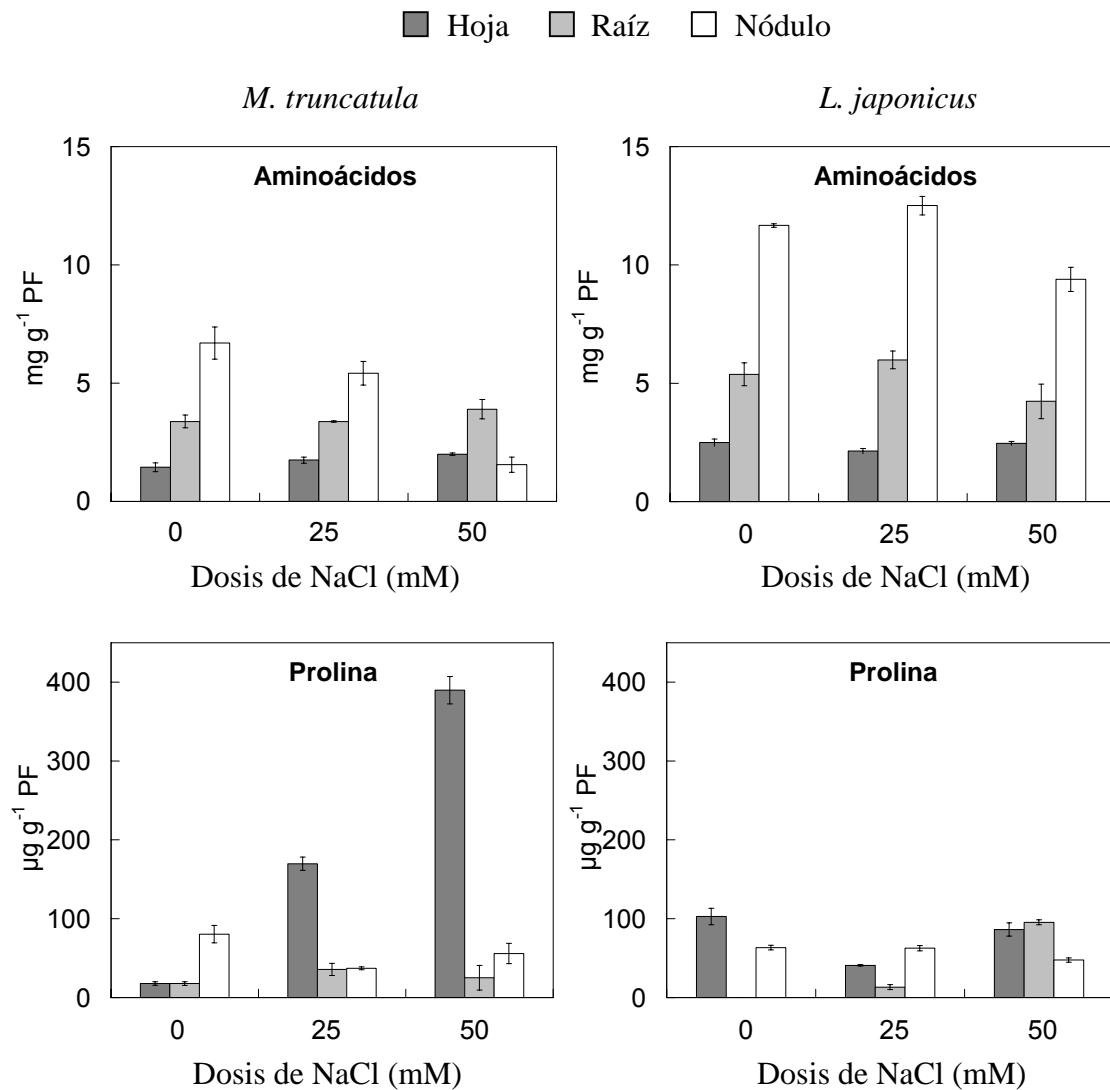


Figura 1.7. Contenido de aminoácidos y prolina en hoja, raíz y nódulos de *M. truncatula* y *L. japonicus* inoculadas con *S. meliloti* GR4 y *M. loti* R7A y tratadas con 0, 25 y 50 mM NaCl. Cada barra es la media de 3 réplicas \pm SE.

1.7. Eficiencia fotosintética

La eficiencia fotosintética ha sido evaluada mediante los parámetros de fluorescencia que se muestran en la figura 1.8. Los datos obtenidos se exponen en la tabla A. 1.29 (*M. truncatula*) y A. 1.31 (*L. japonicus*), en las consecutivas se detalla el estudio de la varianza de los datos indicados.

Resultados

La fluorescencia inicial (F_0) y la fluorescencia máxima (F_m) es entre el 30%-40% superior en plantas de *M. truncatula* que en *L. japonicus*. La fluorescencia inicial se observa que no experimentó variaciones significativas en ninguna de las dos especies por efecto de la salinidad, sin embargo, la fluorescencia máxima emitida por los centros de reacción del fotosistema II tras un pulso de luz saturante, decreció un 15% por efecto de la salinidad con la dosis mayor de sal en ambas especies.

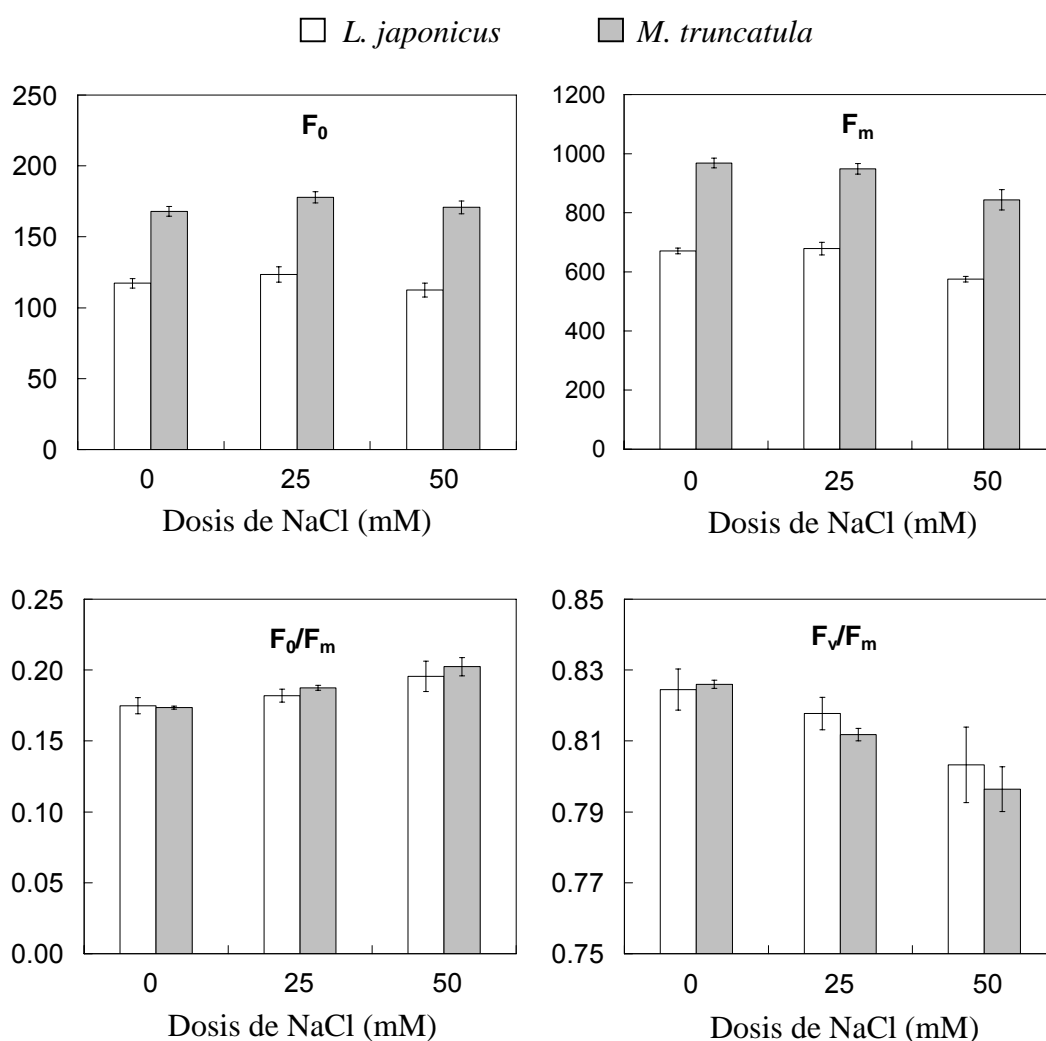


Figura 1.8. Fluorescencia inicial (F_0), fluorescencia máxima (F_m), relación F_0/F_m y relación F_v/F_m en unidades relativas en *M. truncatula* y *L. japonicus* inoculadas con *S. meliloti* GR4 y *M. loti* R7A y tratadas con 0, 25 y 50 mM NaCl. Cada barra es la media de 10 réplicas + SE.

La eficiencia fotoquímica del fotosistema II, expresada por el coeficiente F_v/F_m , decreció de forma proporcional al incremento de la dosis de sal, sin embargo, este descenso fue más significativo en *M. truncatula* donde el valor de este coeficiente se situó por debajo de 0.8. También se determinó el coeficiente F_0/F_m , indicador del rendimiento no fotoquímico del PSII, que indica tanto la influencia de la fluorescencia emitida por la clorofila, como la disipación de energía cuando todos los centros de reacción están abiertos en hojas adaptadas a la oscuridad. Este coeficiente (F_0/F_m) se incrementa cuando las plantas están estresadas o dañadas, como observamos en la figura 1.8., el incremento fue mayor en *M. truncatula* (7% y un 16% con las dosis 25 y 50 mM respectivamente) que en *L. japonicus*, (4% y 12%). En ambas especies se produce una correlación positiva y significativa entre el índice F_v/F_m , y los parámetros de crecimiento (tablas 1.8 y 1.9) y la actividad nitrogenasa (tablas 1.12 y 1.13), lo que relaciona la disminución de la actividad fotosintética con el proceso de fijación de nitrógeno y con el crecimiento de la planta.

En la tabla 1.1 se expone el contenido de pigmentos fotosintéticos, representados por clorofila a, clorofila b, suma de carotenos y xantofilas, relación clorofila a/clorofila b y pigmentos totales. Se puede observar que en *L. japonicus* el contenido de los pigmentos encontrados duplica a los de *M. truncatula*, aspecto que no afecta a la relación Ca/b. La clorofila a disminuyó significativamente con el aumento de la salinidad, en *M. truncatula* este descenso solo se produjo con la dosis 50 mM NaCl y fue del 55%, en *L. japonicus* fue del 15% y 32% con 25 y 50 mM respectivamente. La concentración de clorofila b mostró un comportamiento similar en *M. truncatula* al disminuir con la dosis mayor de sal (70%), mientras que en *L. japonicus* decreció con ambas dosis. La relación clorofila a/clorofila b solo se incrementó de forma significativa (40%) en *M. truncatula* con 50 mM NaCl.

El contenido de xantofilas + carotenos también fue 2.4 veces mayor en *L. japonicus* que en *M. truncatula* y solo sufrió variaciones por efecto de la salinidad con la dosis mayor de sal, que le hizo disminuir un 36% y 27% en *M. truncatula* y *L. japonicus* respectivamente. El efecto de la sal en el contenido total de pigmentos fotosintéticos es negativo, aunque en *M. truncatula* se observa una mayor sensibilidad con un descenso del 56%

Resultados

con 50 mM respecto de *L. japonicus* donde decreció un 32%. Con 25 mM el descenso solo fue estadísticamente significativo en *L. japonicus* (16%).

Se puede establecer que en *M. truncatula* todos los pigmentos fotosintéticos determinados se correlacionan positiva y significativamente con parámetros relativos a fijación de nitrógeno (ANT, TFN, Lb, PNN) (tabla 1.12), enzimas del metabolismo carbonado excepto HK y TPS (tabla 1.10), con todos los parámetros de fluorescencia (tabla 1.12), y con el contenido de sacarosa, maltosa, aminoácidos y azúcares solubles totales en nódulo (tabla 1.14). Las correlaciones más significativas encontradas en los datos de pigmentos fotosintéticos de *L. japonicus* son las relacionadas con PSPA, PSR y PSP, así como con el contenido de nitrógeno, potasio, calcio y sodio en raíz y parte aérea y con los parámetros de fluorescencia (tabla 1.9). Además existen correlaciones altamente significativas ($P \leq 0.001$) con la actividad HK, PEPC, MDH y TRE (tabla 1.11) y con el contenido de glucosa y almidón nodular (tabla 1.15).

Tabla 1.1. Contenido de clorofila a (Ca), clorofila b (Cb) en $\mu\text{g g}^{-1}$ PF relación clorofila a/clorofila b (Ca/b), xantofilas más carotenos (X+C) y suma de pigmentos totales (PT) en hojas de *M. truncatula* y *L. japonicus*

Especie	NaCl(mM)	Ca	Cb	Ca/b	X+C	PT
<i>M. truncatula</i>	0	380 ^b	128 ^b	2.952 ^a	67 ^a	575 ^b
	25	327 ^b	116 ^b	2.818 ^a	60 ^a	503 ^b
	50	171 ^a	41 ^a	4.137 ^b	43 ^a	255 ^a
MDS (0.05)		79	16	0.389	25	118
<i>L. japonicus</i>	0	737 ^c	248 ^b	2.766 ^a	160 ^b	1166 ^c
	25	626 ^b	207 ^a	3.222 ^a	149 ^b	978 ^b
	50	503 ^a	185 ^a	2.715 ^a	117 ^a	800 ^a
MDS (0.05)		45	31	0.882	21	114

Además de la determinación del contenido de clorofilas mediante su extracción con disolventes orgánicos, se realizó la determinación de clorofila con un método no destructivo basado en la luz transmitida por la hoja en dos regiones del espectro, donde la absorción por parte de las clorofilas es diferente. La concentración de clorofila se expresa en unidades relativas, los valores obtenidos fueron casi el doble en *L. japonicus* que en

M. truncatula y sufrieron el mismo descenso por efecto de la salinidad que la clorofila a y b. Los valores de clorofila (fig. 1.9) mostraron una correlación positiva con los de clorofila a y b: *M. truncatula* fueron $r = 0.83$, 0.89 y para *L. japonicus* $r = 0.99$, 0.97 . (tablas 1.8 y 1.9).

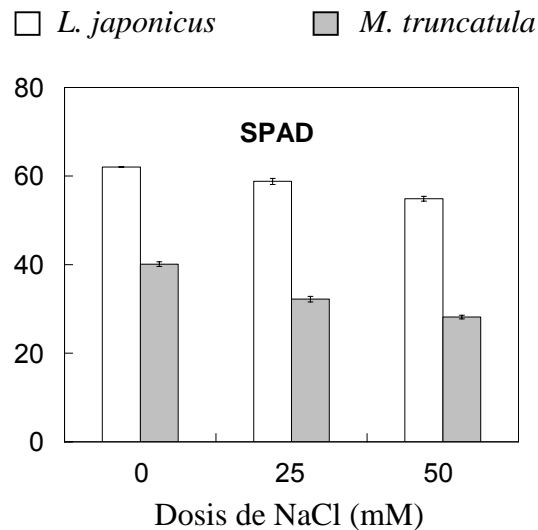


Figura 1.9. Contenido de clorofila en unidades relativas en hojas de *M. truncatula* y *L. japonicus* inoculadas con *S. meliloti* GR4 y *M. loti* R7A y tratadas con 0, 25 y 50 mM NaCl. Cada barra es la media de 10 réplicas \pm SE.

En general se puede admitir al estudiar las tablas 1.12 (*M. truncatula*) y 1.13 (*L. japonicus*) que las correlaciones existentes entre los parámetros de fluorescencia (F_m , F_0/F_m y F_v/F_m) y pigmentos fotosintéticos (clorofila a, b, X+C, PT y SPAD) son muy significativas en ambas leguminosas.

1.8. Contenido de nutrientes

La concentración de distintos nutrientes en porcentaje de peso seco, analizados en parte aérea y raíz, se exponen en las tablas 1.2 (*M. truncatula*) y 1.3 (*L. japonicus*). El estudio estadístico de la varianza se recopila en las tablas A 1.35 y A 1.36 para parte aérea y raíz de *M. truncatula* y A 1.37 y A 1.38 para parte aérea y raíz de *L. japonicus*.

Resultados

Tabla 1.2. Contenido de nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), sodio (Na) y cloro (Cl), expresado en % en parte aérea y raíz de *M. truncatula*

Parte aérea							
NaCl (mM)	N	P	K	Ca	Mg	Na	Cl
0	1.84 ^a	0.79 ^c	3.46 ^a	0.82 ^a	0.43 ^c	0.04 ^c	1.39 ^c
25	1.73 ^a	1.08 ^b	1.87 ^b	0.79 ^a	0.51 ^b	2.26 ^b	3.00 ^b
50	1.99 ^a	1.34 ^a	1.45 ^c	0.72 ^b	0.61 ^a	3.99 ^a	4.77 ^a
MDS (P ≤ 0.05)	0.17	0.02	0.17	0.03	0.04	0.07	0.05
Raíz							
0	1.02 ^b	0.44 ^c	4.19 ^a	0.73 ^a	6.10 ^a	0.07 ^c	
25	1.38 ^a	0.61 ^b	2.95 ^b	0.69 ^b	5.37 ^b	2.37 ^a	
50	1.26 ^a	0.90 ^a	2.83 ^b	0.65 ^c	6.71 ^a	2.14 ^b	
MDS (P ≤ 0.05)	0.13	0.08	0.23	0.03	0.61	0.06	

En general, el nitrógeno se acumula principalmente en parte aérea tanto en *M. truncatula* como en *L. japonicus*, observándose que el porcentaje en parte aérea y en raíz de *L. japonicus* duplica al obtenido en *M. truncatula*. En respuesta a la salinidad, en raíz de *M. truncatula* se incrementó la concentración de nitrógeno, mientras que en la de *L. japonicus* se observó una disminución no significativa proporcional a la dosis de sal, sin embargo en parte aérea solo se observaron reducciones significativas en *L. japonicus* que fueron del 13% y del 28% con 25 y 50 mM de NaCl respectivamente.

Al estudiar los datos obtenidos del porcentaje de fósforo, se comprueba que se acumula prioritariamente en raíz en *L. japonicus* y en parte aérea en *M. truncatula*, guardando una relación 1:2 en ambas especies. La salinidad tanto en parte aérea como en raíz de *M. truncatula*, favorece el aumento de la concentración de fósforo, llegando a duplicarse en raíz con la dosis mayor de sal y a incrementarse un 85% en parte aérea. Sin embargo, en *L. japonicus*, la concentración de fósforo solo aumentó en parte aérea con la dosis baja de sal (25 mM) duplicándose, mientras que en la raíz decreció entre un 30%-40% en condiciones de estrés.

Tabla 1.3. Contenido de nitrógeno (N), fósforo (P), calcio (Ca), magnesio (Mg), sodio (Na), potasio (K) y cloro (Cl), expresado en % en parte aérea y raíz de *L. japonicus*

Parte aérea							
NaCl (mM)	N	P	K	Ca	Mg	Na	Cl
0	3.91 ^a	0.28 ^b	2.68 ^a	0.44 ^a	0.61 ^c	0.11 ^b	
25	3.47 ^b	0.41 ^a	2.45 ^a	0.35 ^b	0.74 ^a	0.70 ^a	
50	2.88 ^c	0.26 ^b	2.26 ^b	0.24 ^c	0.71 ^b	0.74 ^a	
MDS (P ≤ 0.05)	0.29	0.09	0.24	0.03	0.01	0.05	
Raíz							
0	2.81 ^a	0.74 ^a	0.50 ^c	0.43 ^a	2.54 ^a	3.15 ^a	
25	2.64 ^a	0.47 ^b	1.10 ^b	0.32 ^b	1.42 ^b	2.68 ^b	
50	2.44 ^a	0.51 ^b	1.23 ^a	0.27 ^b	1.22 ^b	2.09 ^c	
MDS (P ≤ 0.05)	0.43	0.17	0.12	0.08	0.37	0.38	

La concentración de potasio en plantas control de *M. truncatula* fue un 20% superior en raíz que en parte aérea, mientras que en *L. japonicus* el contenido de la parte aérea fue 5.4 veces superior al de raíz. El potasio experimentó un descenso en condiciones de salinidad más acentuado en la parte aérea de *M. truncatula* (60%), mientras que en la de *L. japonicus* disminuyó solo un 15% con la mayor concentración de sal. En raíz, la concentración de potasio disminuyó un 35% con la dosis 50 mM NaCl en ambas leguminosas.

El porcentaje de calcio es doble en *M. truncatula* que en *L. japonicus*, comprobándose en ambos casos que tanto parte aérea como raíz presentaron porcentajes similares. El efecto de la salinidad sobre este nutriente fue similar en ambas especies: en *M. truncatula* disminuyó ligeramente con la salinidad (13%) en ambos órganos, y en *L. japonicus* el descenso fue del 13% en parte aérea y del 9% en raíz. La concentración de calcio en parte aérea y raíz de *L. japonicus* (tabla 1.9) y de parte aérea de *M. truncatula* (tabla 1.8) se correlaciona positivamente con el crecimiento de la planta y el contenido de pigmentos fotosintéticos.

En cuanto a la concentración de magnesio, se observa que se acumula en raíz, en *M. truncatula* 14 veces y en *L. japonicus* 4 veces más que en parte aérea. La salinidad provocó que la concentración de este elemento en

Resultados

M. truncatula aumentara un 42% en parte aérea y un 10% en raíz con la máxima concentración de NaCl (50mM), mientras que en *L. japonicus*, con la misma dosis se produjo un incremento del 10% en parte aérea y una disminución de 50% en raíz.

Tabla 1.4. Contenido de nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), sodio (Na) y cloro (Cl), expresado en mg planta⁻¹ en parte aérea y raíz de *M. truncatula*

Parte aérea							
NaCl (mM)	N	P	K	Ca	Mg	Na	Cl
0	1.18 ^a	0.51 ^a	2.25 ^a	0.53 ^a	0.27 ^a	1.18 ^a	0.90 ^b
25	0.78 ^b	0.48 ^a	0.83 ^b	0.35 ^b	0.23 ^a	0.78 ^b	1.36 ^a
50	0.31 ^c	0.21 ^b	0.22 ^c	0.11 ^c	0.09 ^b	0.31 ^c	0.75 ^b
MDS (P ≤ 0.05)	0.21	0.13	0.39	0.12	0.07	0.20	0.16
Raíz							
0	0.13 ^b	0.05 ^b	0.56 ^a	0.09 ^a	0.82 ^a	0.00 ^c	
25	0.18 ^a	0.08 ^a	0.38 ^b	0.09 ^a	0.70 ^a	0.31 ^a	
50	0.05 ^c	0.03 ^c	0.12 ^c	0.02 ^b	0.28 ^b	0.09 ^b	
MDS (P ≤ 0.05)	0.02	0.01	0.08	0.01	0.13	0.03	

El porcentaje de sodio en parte aérea y raíz de *M. truncatula* es indetectable y como consecuencia del aumento de la salinidad en el medio, se produce un aumento sustancial en la planta, proporcional a la dosis de sal en el caso de la parte aérea (50 veces con 25mM y 100 veces con 50mM NaCl). Curiosamente en *L. japonicus* se observa que en plantas control la parte aérea tiene casi el triple de Na que en *M. truncatula*, y 7 veces más en raíz, además, se detecta que el incremento del porcentaje de Na en parte aérea y raíz por el NaCl en el medio no es tan espectacular como el encontrado en *M. truncatula*.

El cloruro, que solo pudo ser determinado en la parte aérea de *M. truncatula*, experimentó un comportamiento semejante al descrito para el sodio en la parte aérea, se confirma que los tratamientos salinos (25 y 50 mM NaCl) provocan un aumento espectacular que duplica y triplica el contenido de cloruro obtenido en tratamientos control.

Los índices de correlación que se muestran en las tablas 1.8 y 1.9 indican un alto grado de correlación negativa entre el contenido de Na y Cl

con el crecimiento y el contenido de pigmentos fotosintéticos en ambas especies. También destaca el alto grado de correlación entre el contenido de nitrógeno de la parte aérea y los datos relacionados con el crecimiento y pigmentos fotosintéticos en *L. japonicus*. El fósforo tanto en parte aérea como en raíz de *M. truncatula*, mostró una correlación negativa con los datos de crecimiento y de clorofila. También se puede apreciar en la tabla 1.8 (*M. truncatula*) la buena correlación entre el porcentaje de nutrientes en hoja y raíz, y ocho de las nueve actividades enzimáticas del metabolismo carbonado estudiadas en este trabajo.

Cuando se estudian las tablas 1.4 y 1.5 relativas al contenido de nutrientes e hoja y raíz en ambas especies expresado en mg planta⁻¹, se puede generalizar que: **a)** *M. truncatula* acumula más nutrientes que *L. japonicus*, **b)** el nitrógeno, fósforo, potasio y calcio se encuentran en mayor proporción en parte aérea y el magnesio en raíz en ambas especies, **c)** el efecto de la salinidad se manifiesta con mayor intensidad en el contenido de potasio y calcio en parte aérea y raíz de ambas especies, **d)** el contenido de Na en parte aérea de *M. truncatula* disminuyó proporcionalmente a la dosis de sal, mientras que en *L. japonicus* se multiplicó por 4 con las dos dosis.

Tabla 1.5. Contenido de nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), sodio (Na) y cloro (Cl), expresado en mg planta⁻¹ en parte aérea y raíz de *L. japonicus*

Parte aérea							
NaCl (mM)	N	P	K	Ca	Mg	Na	Cl
0	0.63 ^a	0.05 ^a	0.43 ^a	0.07 ^a	0.10 ^a	0.02 ^b	
25	0.35 ^b	0.04 ^a	0.25 ^b	0.04 ^b	0.07 ^b	0.07 ^a	
50	0.27 ^c	0.02 ^b	0.21 ^b	0.02 ^c	0.07 ^b	0.07 ^a	
MDS (P ≤ 0.05)	0.02	0.01	0.02	0.00	0.00	0.00	
Raíz							
0	0.15 ^a	0.04 ^a	0.16 ^a	0.02 ^a	0.13 ^a	0.03 ^b	
25	0.09 ^b	0.02 ^b	0.09 ^b	0.01 ^b	0.05 ^b	0.04 ^a	
50	0.07 ^c	0.02 ^b	0.06 ^c	0.01 ^b	0.04 ^b	0.04 ^a	
MDS (P ≤ 0.05)	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	

Tabla 1.6 Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con el crecimiento (PSPA, PSR, PSP, R/PA), fijación del nitrógeno (ANA, TNA, TFN, Lb, PSN, PNN), actividades enzimáticas (SS, IA, HK, PEPC)

	PSPA	PSR	PSP	R/PA	ANA	TNA	TFN	Lb	PSN	PNN	SS	IA	HK	PEPC
PSPA	1.00													
PSR	1.00	1.00												
PSP	1.00	1.00	1.00											
R/PA	0.88	0.92	0.89	1.00										
ANA	1.00	0.99	1.00	0.86	1.00									
TNA	0.74	0.80	0.76	0.97	0.71	1.00								
TFN	0.68	0.74	0.70	0.94	0.64	1.00	1.00							
Lb	0.94	0.97	0.95	0.99	0.93	0.92	0.88	1.00						
PSN	0.99	0.97	0.98	0.79	0.99	0.62	0.54	0.88	1.00					
PNN	-0.99	-1.00	-1.00	-0.93	-0.99	-0.82	-0.76	-0.98	-0.96	1.00				
SS	0.99	1.00	0.99	0.94	0.98	0.83	0.78	0.98	0.95	-1.00	1.00			
IA	0.90	0.94	0.91	1.00	0.88	0.96	0.93	0.99	0.82	-0.95	0.96	1.00		
HK	0.08	0.17	0.10	0.54	0.03	0.73	0.79	0.40	-0.09	-0.20	0.23	0.50	1.00	
PEPC	0.97	0.99	0.97	0.97	0.96	0.88	0.84	1.00	0.91	-0.99	1.00	0.98	0.32	1.00
MDH	0.93	0.96	0.94	0.99	0.91	0.93	0.90	1.00	0.86	-0.97	0.98	1.00	0.43	0.99
ICDH	0.94	0.97	0.95	0.99	0.93	0.92	0.88	1.00	0.87	-0.98	0.98	0.99	0.40	1.00
TPS	1.00	0.99	1.00	0.85	1.00	0.70	0.63	0.92	0.99	-0.98	0.98	0.87	0.02	0.95
TPP	0.98	0.99	0.98	0.96	0.97	0.86	0.81	0.99	0.93	-1.00	1.00	0.97	0.28	1.00
TRE	0.70	0.76	0.72	0.95	0.66	1.00	1.00	0.90	0.57	-0.78	0.80	0.94	0.77	0.85
Sac	0.95	0.98	0.96	0.98	0.94	0.91	0.87	1.00	0.89	-0.98	0.99	0.99	0.37	1.00
Mal	0.95	0.97	0.95	0.99	0.93	0.92	0.88	1.00	0.88	-0.98	0.98	0.99	0.40	1.00
Fru	0.98	0.96	0.97	0.77	0.99	0.59	0.51	0.86	1.00	-0.95	0.94	0.80	-0.13	0.90
Treh	-0.88	-0.84	-0.87	-0.56	-0.91	-0.34	-0.25	-0.68	-0.95	0.82	-0.80	-0.59	0.40	-0.74
Ast	0.96	0.98	0.97	0.98	0.95	0.90	0.85	1.00	0.90	-0.99	0.99	0.99	0.35	1.00
Alm	0.99	0.97	0.98	0.79	0.99	0.62	0.55	0.88	1.00	-0.96	0.95	0.82	-0.08	0.92
Aa	0.80	0.85	0.82	0.99	0.77	0.99	0.98	0.95	0.69	-0.87	0.89	0.98	0.66	0.93
Pro	0.82	0.76	0.80	0.45	0.85	0.22	0.13	0.58	0.90	-0.74	0.72	0.49	-0.51	0.65

Tabla 1.7 Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con el crecimiento (PSPA, PSR, PSP, R/PA), fijación del nitrógeno (ANA, TNA, TFN, Lb, PSN, PNN), actividades enzimáticas (SS, IA, HK, PEPC, MDH)

	<i>PSPA</i>	<i>PSR</i>	<i>PSP</i>	<i>R/PA</i>	<i>ANA</i>	<i>TNA</i>	<i>TFN</i>	<i>Lb</i>	<i>PSN</i>	<i>PNN</i>	<i>SS</i>	<i>IA</i>	<i>HK</i>	<i>PEPC</i>	<i>MDH</i>
PSPA	1.00														
PSR	1.00	1.00													
PSP	1.00	1.00	1.00												
R/PA	-0.28	-0.26	-0.29	1.00											
ANA	0.69	0.71	0.69	0.50	1.00										
TNA	0.91	0.92	0.91	0.15	0.93	1.00									
TFN	0.96	0.97	0.96	0.00	0.87	0.99	1.00								
Lb	-0.62	-0.60	-0.62	0.93	0.14	-0.23	-0.37	1.00							
PSN	0.96	0.96	0.97	-0.53	0.48	0.76	0.85	-0.80	1.00						
PNN	-0.43	-0.45	-0.42	-0.75	-0.95	-0.77	-0.67	-0.44	-0.18	1.00					
SS	0.36	0.39	0.36	0.79	0.92	0.72	0.61	0.50	0.11	-1.00	1.00				
IA	0.82	0.81	0.82	-0.78	0.15	0.51	0.63	-0.96	0.94	0.16	-0.23	1.00			
HK	-0.95	-0.96	-0.95	-0.02	-0.88	-0.99	-1.00	0.35	-0.84	0.68	-0.63	-0.61	1.00		
PEPC	0.93	0.94	0.93	0.07	0.90	1.00	1.00	-0.30	0.81	-0.72	0.67	0.57	-1.00	1.00	
MDH	0.92	0.93	0.92	0.11	0.92	1.00	0.99	-0.27	0.79	-0.74	0.70	0.54	-1.00	1.00	
ICDH	0.25	0.28	0.25	0.86	0.87	0.64	0.52	0.60	-0.01	-0.98	0.99	-0.34	-0.54	0.58	
TPS	0.93	0.92	0.93	-0.62	0.37	0.69	0.79	-0.87	0.99	-0.06	-0.01	0.97	-0.77	0.74	
TPP	-0.97	-0.97	-0.97	0.50	-0.50	-0.78	-0.87	0.79	-1.00	0.20	-0.13	-0.93	0.85	-0.83	
TRE	0.83	0.85	0.83	0.30	0.98	0.99	0.95	-0.08	0.66	-0.86	0.82	0.37	-0.96	0.97	
Sac	0.99	0.98	0.99	-0.44	0.56	0.82	0.90	-0.75	1.00	-0.27	0.20	0.91	-0.89	0.86	
Mal	0.94	0.93	0.94	-0.60	0.39	0.70	0.80	-0.86	1.00	-0.08	0.01	0.97	-0.78	0.75	
Fru	-0.16	-0.19	-0.16	-0.90	-0.83	-0.56	-0.43	-0.67	0.10	0.96	-0.98	0.43	0.46	-0.50	
Glu	-0.77	-0.79	-0.77	-0.39	-0.99	-0.97	-0.92	-0.02	-0.58	0.90	-0.87	-0.27	0.93	-0.95	
Treh	-0.38	-0.35	-0.38	1.00	0.41	0.05	-0.10	0.96	-0.61	-0.67	0.73	-0.84	0.08	-0.03	
Ast	-0.49	-0.47	-0.49	0.97	0.29	-0.08	-0.22	0.99	-0.70	-0.58	0.63	-0.90	0.20	-0.15	
Alm	-0.78	-0.80	-0.78	-0.38	-0.99	-0.97	-0.93	0.00	-0.59	0.90	-0.86	-0.29	0.93	-0.95	
Aa	0.36	0.39	0.36	0.79	0.92	0.72	0.61	0.51	0.10	-1.00	1.00	-0.24	-0.63	0.67	
Pro	0.62	0.65	0.62	0.57	1.00	0.90	0.82	0.22	0.40	-0.97	0.95	0.07	-0.83	0.86	

Tabla 1.8 Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con el crecimiento (PSPA, PSR, PSP, R/PA), emisión de fluorescencia (F_0 , F_m , F_0/F_m , F_v/F_m , SPAD) y contenido de pigmentos fotosintéticos (Ca, Cb, x+c, PT, Ca/b, N pa, P pa, K pa, Ca pa, Mg pa, Na pa, Cl pa, N r, P r, K r, Ca r, Mg r, Na r)

	PSPA	PSR	PSP	R/PA	F_0	F_m	F_0/F_m	F_v/F_m	SPAD	Ca	Cb	x+c	PT	Ca/b	N pa	P pa
PSPA	1.00															
PSR	1.00	1.00														
PSP	1.00	1.00	1.00													
R/PA	0.88	0.92	0.89	1.00												
F_0	-0.60	-0.52	-0.57	-0.14	1.00											
F_m	0.74	0.80	0.76	0.97	0.09	1.00										
F_0/F_m	-0.87	-0.91	-0.88	-1.00	0.12	-0.98	1.00									
F_v/F_m	0.93	0.96	0.94	0.99	-0.25	0.94	-0.99	1.00								
SPAD	0.99	1.00	0.99	0.95	-0.45	0.85	-0.94	0.98	1.00							
Ca	0.81	0.86	0.82	0.99	-0.01	1.00	-0.99	0.97	0.90	1.00						
Cb	0.73	0.79	0.75	0.97	0.11	1.00	-0.97	0.93	0.84	0.99	1.00					
x+c	0.82	0.87	0.83	0.99	-0.03	0.99	-1.00	0.97	0.91	1.00	0.99	1.00				
PT	0.79	0.84	0.80	0.99	0.03	1.00	-0.99	0.96	0.88	1.00	1.00	1.00	1.00			
Ca/b	-0.56	-0.64	-0.58	-0.89	-0.33	-0.97	0.90	-0.83	-0.70	-0.94	-0.98	-0.94	-0.95	1.00		
N pa	-0.25	-0.34	-0.27	-0.68	-0.63	-0.83	0.69	-0.59	-0.41	-0.77	-0.84	-0.76	-0.79	0.94	1.00	
P pa	-0.94	-0.97	-0.95	-0.99	0.29	-0.92	0.98	-1.00	-0.99	-0.96	-0.92	-0.96	-0.95	0.81	0.56	1.00
K pa	0.85	0.90	0.87	1.00	-0.09	0.98	-1.00	0.99	0.93	1.00	0.98	1.00	0.99	-0.91	-0.72	-0.98
Ca pa	-0.91	-0.94	-0.92	-1.00	0.20	-0.96	1.00	-1.00	-0.96	-0.98	-0.95	-0.99	-0.97	0.86	0.64	1.00
Mg pa	-0.96	-0.98	-0.97	-0.98	0.34	-0.90	0.97	-1.00	-0.99	-0.94	-0.89	-0.95	-0.93	0.77	0.51	1.00
Na pa	1.00	1.00	1.00	0.90	-0.57	0.77	-0.89	0.94	0.99	0.83	0.75	0.84	0.81	-0.59	-0.28	-0.95
Cl pa	-0.93	-0.96	-0.94	-0.99	0.25	-0.94	0.99	-1.00	-0.98	-0.97	-0.93	-0.97	-0.96	0.83	0.59	1.00
N r	-0.88	-0.83	-0.87	-0.55	0.90	-0.34	0.54	-0.64	-0.79	-0.43	-0.32	-0.45	-0.40	0.11	-0.24	0.67
P r	-0.88	-0.92	-0.89	-1.00	0.14	-0.97	1.00	-0.99	-0.95	-0.99	-0.97	-0.99	-0.99	0.89	0.68	0.99
K r	0.92	0.95	0.93	1.00	-0.23	0.95	-0.99	1.00	0.97	0.98	0.94	0.98	0.97	-0.85	-0.61	-1.00
Ca r	-0.11	-0.21	-0.14	-0.57	-0.73	-0.75	0.59	-0.47	-0.28	-0.68	-0.76	-0.66	-0.70	0.89	0.99	0.44
Mg r	-0.97	-0.94	-0.96	-0.73	0.78	-0.55	0.72	-0.80	-0.91	-0.63	-0.53	-0.65	-0.61	0.34	-0.01	0.83
Na r	1.00	0.98	0.99	0.83	-0.67	0.68	-0.82	0.89	0.97	0.75	0.66	0.76	0.73	-0.48	-0.16	-0.91

Tabla 1.9 Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con el crecimiento (PSPA, PSR, PSP, R/PA), emisión de fluorescencia (F_0 , F_m , F_0/F_m , F_v/F_m , SPAD) y contenido de pigmentos fotosintéticos (Ca, Cb, x+c, PT, Ca/b, N pa)

	PSPA	PSR	PSP	R/PA	F_0	F_v	F_0/F_m	F_v/F_m	SPAD	Ca	Cb	x+c	PT	Ca/b	N pa
PSPA	1.00														
PSR	1.00	1.00													
PSP	1.00	1.00	1.00												
R/PA	-0.28	-0.26	-0.29	1.00											
F_0	0.03	0.06	0.03	0.95	1.00										
F_v	0.58	0.60	0.57	0.62	0.83	1.00									
F_0/F_m	-0.82	-0.84	-0.82	-0.31	-0.59	-0.94	1.00								
F_v/F_m	0.81	0.83	0.81	0.33	0.61	0.95	-1.00	1.00							
SPAD	0.89	0.90	0.89	0.18	0.48	0.88	-0.99	0.99	1.00						
Ca	0.90	0.91	0.90	0.16	0.46	0.87	-0.99	0.98	1.00	1.00					
Cb	0.97	0.98	0.97	-0.05	0.27	0.76	-0.93	0.93	0.97	0.98	1.00				
x+c	0.78	0.80	0.78	0.38	0.65	0.96	-1.00	1.00	0.98	0.97	0.91	1.00			
PT	0.92	0.93	0.92	0.11	0.41	0.85	-0.98	0.97	1.00	1.00	0.99	0.96	1.00		
Ca/b	-0.32	-0.29	-0.32	1.00	0.94	0.59	-0.28	0.30	0.15	0.12	-0.08	0.35	0.07	1.00	
N pa	0.88	0.89	0.87	0.21	0.51	0.90	-0.99	0.99	1.00	1.00	0.97	0.99	0.99	0.18	1.00
P pa	-0.25	-0.23	-0.26	1.00	0.96	0.64	-0.34	0.36	0.21	0.19	-0.01	0.41	0.14	1.00	0.25
K pa	0.93	0.94	0.93	0.09	0.40	0.84	-0.97	0.97	1.00	1.00	0.99	0.96	1.00	0.05	0.99
Ca pa	0.89	0.90	0.88	0.19	0.49	0.89	-0.99	0.99	1.00	1.00	0.97	0.98	1.00	0.16	1.00
Mg pa	-0.96	-0.95	-0.96	0.54	0.25	-0.33	0.63	-0.62	-0.73	-0.75	-0.86	-0.57	-0.78	0.57	-0.71
Na pa	-1.00	-1.00	-1.00	0.33	0.01	-0.54	0.80	-0.79	-0.87	-0.88	-0.96	-0.75	-0.90	0.36	-0.85
N r	0.89	0.91	0.89	0.18	0.47	0.88	-0.99	0.99	1.00	1.00	0.98	0.98	1.00	0.14	1.00
P r	0.97	0.96	0.97	-0.51	-0.21	0.36	-0.66	0.65	0.76	0.77	0.88	0.60	0.80	-0.54	0.73
K r	0.89	0.90	0.89	0.19	0.49	0.89	-0.99	0.99	1.00	1.00	0.97	0.98	1.00	0.16	1.00
Ca r	0.98	0.98	0.98	-0.07	0.25	0.74	-0.93	0.92	0.97	0.97	1.00	0.90	0.98	-0.10	0.96
Mg r	1.00	1.00	1.00	-0.25	0.07	0.61	-0.84	0.83	0.91	0.92	0.98	0.80	0.94	-0.28	0.89
Na r	-1.00	-1.00	-1.00	0.23	-0.08	-0.62	0.85	-0.84	-0.91	-0.92	-0.98	-0.81	-0.94	0.27	-0.90

Tabla 1.10 Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con las actividades enzimáticas (SS, IA, HK, PEPC, MDH, ICDH, TPS, TPP y TRE); emisión de fluorescencia (F_0 , F_m , F_0/F_m , F_v/F_m , SPAD), contenido de pigmentos fotosintéticos (Ca, Cb, X+C, PT, Ca/b) y contenido de nutrientes (N, P, K, Na, Mg, Ca, Cl) en parte aérea (pa) y raíz (r) de

plantas de *M truncatula*

	SS	IA	HK	PEPC	MDH	ICDH	TPS	TPP	TRE	F ₀	F _m	F ₀ /F _m	F _v /F _m	SPAD	Ca	Cb	x+c	PT	Ca/b	N pa	P pa	K pa	Ca pa	Mg pa	Na pa	Cl pa	N r	P r	K r	Ca r	Mg r	Na r		
SS	1.00																																	
IA	0.96	1.00																																
HK	0.23	0.50	1.00																															
PEPC	1.00	0.98	0.32	1.00																														
MDH	0.98	1.00	0.43	0.99	1.00																													
ICDH	0.98	0.99	0.40	1.00	1.00	1.00																												
TPS	0.98	0.87	0.02	0.95	0.91	0.92	1.00																											
TPP	1.00	0.97	0.28	1.00	0.99	0.99	0.97	1.00																										
TRE	0.80	0.94	0.77	0.85	0.91	0.90	0.66	0.83	1.00																									
F ₀	-0.46	-0.19	0.76	-0.38	-0.26	-0.29	-0.64	-0.42	0.16	1.00																								
F _m	0.84	0.96	0.72	0.89	0.94	0.92	0.70	0.87	1.00	0.09	1.00																							
F ₀ /F _m	-0.94	-1.00	-0.56	-0.97	-0.99	-0.98	-0.84	-0.95	-0.96	0.12	-0.98	1.00																						
F _v /F _m	0.97	1.00	0.44	0.99	1.00	1.00	0.91	0.99	0.91	-0.25	0.94	-0.99	1.00																					
SPAD	1.00	0.96	0.25	1.00	0.98	0.99	0.97	1.00	0.81	-0.45	0.85	-0.94	0.98	1.00																				
Ca	0.89	0.98	0.65	0.93	0.97	0.96	0.77	0.91	0.99	-0.01	1.00	-0.99	0.97	0.90	1.00																			
Cb	0.83	0.95	0.74	0.88	0.93	0.92	0.69	0.86	1.00	0.11	1.00	-0.97	0.93	0.84	0.99	1.00																		
x+c	0.90	0.99	0.63	0.94	0.97	0.96	0.79	0.92	0.98	-0.03	0.99	-1.00	0.97	0.91	1.00	0.99	1.00																	
PT	0.87	0.98	0.67	0.92	0.96	0.95	0.75	0.90	0.99	0.03	1.00	-0.99	0.96	0.88	1.00	1.00	1.00	1.00																
Ca/b	-0.68	-0.87	-0.87	-0.75	-0.82	-0.81	-0.51	-0.72	-0.98	-0.33	-0.97	0.90	-0.83	-0.70	-0.94	-0.98	-0.94	-0.95	1.00															
N pa	-0.39	-0.64	-0.98	-0.48	-0.58	-0.56	-0.19	-0.44	-0.87	-0.63	-0.83	0.69	-0.59	-0.41	-0.77	-0.84	-0.76	-0.79	0.94	1.00														
P pa	-0.98	-0.99	-0.40	-1.00	-1.00	-1.00	-0.92	-0.99	-0.90	0.29	-0.92	0.98	-1.00	-0.99	-0.96	-0.92	-0.96	-0.95	0.81	0.56	1.00													
K pa	0.99	0.92	0.11	0.98	0.94	0.95	1.00	0.99	0.72	-0.57	0.77	-0.89	0.94	0.99	0.83	0.75	0.84	0.81	-0.59	-0.28	-0.95	1.00												
Ca pa	0.92	1.00	0.58	0.96	0.98	0.98	0.82	0.94	0.97	-0.09	0.98	-1.00	0.99	0.93	1.00	0.98	1.00	0.99	-0.91	-0.72	-0.98	0.87	1.00											
Mg pa	-0.96	-1.00	-0.49	-0.98	-1.00	-1.00	-0.88	-0.97	-0.94	0.20	-0.96	1.00	-1.00	-0.96	-0.98	-0.95	-0.99	-0.97	0.86	0.64	1.00	-0.92	-0.99	1.00										
Na pa	-0.99	-0.99	-0.35	-1.00	-1.00	-1.00	-0.94	-1.00	-0.87	0.34	-0.90	0.97	-1.00	-0.99	-0.94	-0.89	-0.95	-0.93	0.77	0.51	1.00	-0.97	-0.97	0.99	1.00									
Cl pa	-0.97	-1.00	-0.44	-0.99	-1.00	-1.00	-0.90	-0.98	-0.91	0.25	-0.94	0.99	-1.00	-0.98	-0.97	-0.93	-0.97	-0.96	0.83	0.59	1.00	-0.94	-0.99	1.00	1.00	1.00								
N r	-0.80	-0.59	0.40	-0.74	-0.65	-0.68	-0.91	-0.77	-0.28	0.90	-0.34	0.54	-0.64	-0.79	-0.43	-0.32	-0.45	-0.40	0.11	-0.24	0.67	-0.87	-0.51	0.60	0.71	0.64	1.00							
P r	-0.94	-1.00	-0.54	-0.97	-0.99	-0.99	-0.85	-0.96	-0.95	0.14	-0.97	1.00	-0.99	-0.95	-0.99	-0.97	-0.99	-0.99	0.89	0.68	0.99	-0.90	-1.00	1.00	0.98	0.99	0.55	1.00						
K r	0.97	0.86	-0.02	0.94	0.89	0.91	1.00	0.96	0.63	-0.67	0.68	-0.82	0.89	0.97	0.75	0.66	0.76	0.73	-0.48	-0.16	-0.91	0.99	0.80	-0.86	-0.93	-0.89	-0.92	-0.83	1.00					
Ca r	0.97	1.00	0.47	0.99	1.00	1.00	0.89	0.98	0.92	-0.23	0.95	-0.99	1.00	0.97	0.98	0.94	0.98	0.97	-0.85	-0.61	-1.00	0.93	0.99	-1.00	-0.99	-1.00	-0.62	-1.00	0.88	1.00				
Mg r	-0.27	-0.53	-1.00	-0.36	-0.47	-0.44	-0.06	-0.32	-0.79	-0.73	-0.75	0.59	-0.47	-0.28	-0.68	-0.76	-0.66	-0.70	0.89	0.99	0.44	-0.15	-0.61	0.53	0.39	0.48	-0.37	0.57	-0.02	-0.50	1.00			
Na r	-0.92	-0.76	0.18	-0.87	-0.81	-0.83	-0.98	-0.89	-0.49	0.78	-0.55	0.72	-0.80	-0.91	-0.63	-0.53	-0.65	-0.61	0.34	-0.01	0.83	-0.96	-0.69	0.77	0.86	0.80	0.97	0.73	-0.99	-0.79	-0.14	1.00		

Valor crítico

P ≤ 0.05 0.01 0.001

0.81 0.91 0.97

Tabla 1.11 Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con las actividades enzimáticas (SS, IA, HK, PEPC, MDH, ICDH, TPS, TPP y TRE); emisión de fluorescencia (F_0 , F_m , F_0/F_m , F_v/F_m , SPAD), contenido de pigmentos fotosintéticos (Ca, Cb, X+C, PT, Ca/b) y contenido de nutrientes (N, P, K, Na, Mg, Ca, Cl) en parte aérea (pa) y raíz (r) de plantas de *L. japonicus*

	SS	IA	HK	PEPC	MDH	ICDH	TPS	TPP	TRE	F_0	F_v	F_0/F_m	F_v/F_m	SPAD	Ca	Cb	x+c	PT	Ca/b	N pa	P pa	K pa	Ca pa	Mg pa	Na pa	N r	P r	K r	Ca r	Mg r	Na r			
SS	1.00																																	
IA	-0.23	1.00																																
HK	-0.63	-0.61	1.00																															
PEPC	0.67	0.57	-1.00	1.00																														
MDH	0.70	0.54	-1.00	1.00	1.00																													
ICDH	0.99	-0.34	-0.54	0.58	0.61	1.00																												
TPS	-0.01	0.97	-0.77	0.74	0.71	-0.13	1.00																											
TPP	-0.13	-0.93	0.85	-0.83	-0.81	-0.02	-0.99	1.00																										
TRE	0.82	0.37	-0.96	0.97	0.98	0.75	0.56	-0.68	1.00																									
F_0	0.94	-0.55	-0.33	0.38	0.42	0.97	-0.34	0.21	0.58	1.00																								
F_v	0.97	0.01	-0.80	0.83	0.85	0.94	0.23	-0.37	0.93	0.83	1.00																							
F_0/F_m	-0.83	-0.35	0.96	-0.97	-0.98	-0.76	-0.55	0.67	-1.00	-0.59	-0.94	1.00																						
F_v/F_m	0.84	0.33	-0.95	0.97	0.97	0.77	0.54	-0.65	1.00	0.61	0.95	-1.00	1.00																					
SPAD	0.75	0.47	-0.99	0.99	1.00	0.66	0.66	-0.76	0.99	0.48	0.88	-0.99	0.99	1.00																				
Ca	0.73	0.50	-0.99	1.00	1.00	0.64	0.68	-0.78	0.99	0.46	0.87	-0.99	0.98	1.00	1.00																			
Cb	0.58	0.66	-1.00	0.99	0.99	0.48	0.81	-0.89	0.94	0.27	0.76	-0.93	0.93	0.97	0.98	1.00																		
x+c	0.87	0.28	-0.93	0.95	0.96	0.80	0.49	-0.61	1.00	0.65	0.96	-1.00	1.00	0.98	0.97	0.91	1.00																	
PT	0.70	0.54	-1.00	1.00	1.00	0.61	0.71	-0.81	0.98	0.41	0.85	-0.98	0.97	1.00	1.00	0.99	0.96	1.00																
Ca/b	0.77	-0.80	0.01	0.04	0.08	0.84	-0.65	0.53	0.26	0.94	0.59	-0.28	0.30	0.15	0.12	-0.08	0.35	0.07	1.00															
N pa	0.77	0.45	-0.98	0.99	0.99	0.69	0.63	-0.74	1.00	0.51	0.90	-0.99	0.99	1.00	1.00	0.97	0.99	0.99	0.18	1.00														
P pa	0.81	-0.76	-0.06	0.11	0.14	0.87	-0.59	0.47	0.33	0.96	0.64	-0.34	0.36	0.21	0.19	-0.01	0.41	0.14	1.00	0.25	1.00													
K pa	0.68	0.55	-1.00	1.00	1.00	0.59	0.73	-0.82	0.98	0.40	0.84	-0.97	0.97	1.00	1.00	0.99	0.96	1.00	0.05	0.99	0.12	1.00												
Ca pa	0.75	0.46	-0.99	0.99	1.00	0.67	0.65	-0.75	0.99	0.49	0.89	-0.99	0.99	1.00	1.00	0.97	0.98	1.00	0.16	1.00	0.23	0.99	1.00											
Mg pa	-0.09	-0.95	0.83	-0.80	-0.78	0.03	-1.00	1.00	-0.64	0.25	-0.33	0.63	-0.62	-0.73	-0.75	-0.86	-0.57	-0.78	0.57	-0.71	0.51	-0.79	-0.72	1.00										
Na pa	-0.32	-0.85	0.94	-0.92	-0.90	-0.21	-0.94	0.98	-0.81	0.01	-0.54	0.80	-0.79	-0.87	-0.88	-0.96	-0.75	-0.90	0.36	-0.85	0.29	-0.91	-0.86	0.97	1.00									
N r	0.74	0.48	-0.99	0.99	1.00	0.66	0.66	-0.76	0.99	0.47	0.88	-0.99	0.99	1.00	1.00	0.98	0.98	1.00	0.14	1.00	0.21	1.00	1.00	-0.73	-0.87	1.00								
P r	0.13	0.94	-0.85	0.82	0.80	0.01	0.99	-1.00	0.67	-0.21	0.36	-0.66	0.65	0.76	0.77	0.88	0.60	0.80	-0.54	0.73	-0.48	0.81	0.75	-1.00	-0.98	0.76	1.00							
K r	0.75	0.47	-0.99	0.99	1.00	0.67	0.65	-0.75	0.99	0.49	0.89	-0.99	0.99	1.00	1.00	0.97	0.98	1.00	0.16	1.00	0.22	0.99	1.00	-0.72	-0.87	1.00	0.75	1.00						
Ca r	0.56	0.68	-1.00	0.99	0.98	0.46	0.83	-0.90	0.93	0.25	0.74	-0.93	0.92	0.97	0.97	1.00	0.90	0.98	-0.10	0.96	-0.04	0.99	0.97	-0.88	-0.97	0.97	0.89	0.97	1.00					
Mg r	0.40	0.80	-0.96	0.95	0.93	0.29	0.91	-0.96	0.85	0.07	0.61	-0.84	0.83	0.91	0.92	0.98	0.80	0.94	-0.28	0.89	-0.22	0.94	0.90	-0.95	-1.00	0.91	0.96	0.90	0.98	1.00				
Na r	-0.41	-0.79	0.97	-0.95	-0.94	-0.30	-0.91	0.96	-0.86	-0.08	-0.62	0.85	-0.84	-0.91	-0.92	-0.98	-0.81	-0.94	0.27	-0.90	0.20	-0.95	-0.91	0.94	1.00	-0.92	-0.96	-0.91	-0.99	-1.00	1.00			

Valor crítico
 $P \leq$ 0.05 0.01 0.001
 0.81 0.91 0.97

Tabla 1.12 Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con fijación de nitrógeno (ANA, TNA, TFN, Lb, PSN, PNN) emisión de fluorescencia (F_0 , F_m , F_0/F_m , F_v/F_m , SPAD), contenido de pigmentos fotosintéticos (Ca, Cb, X+C, PT, Ca/b) y contenido de nutrientes (N, P, K, Na, Mg, Ca, Cl) en parte aérea (pa) y raíz (r) de plantas de *M. truncatula*

	ANA	TNA	TFN	Lb	PSN	PNN	F_0	F_m	F_0/F_m	F_v/F_m	SPAD	Ca	Cb	x+c	PT	Ca/b	N pa	P pa	K pa	Ca pa	Mg pa	Na pa	Cl pa	N r	P r	K r	Ca r	Mg r	Na r								
ANA	1.00																																				
TNA	0.71	1.00																																			
TFN	0.64	1.00	1.00																																		
Lb	0.93	0.92	0.88	1.00																																	
PSN	0.99	0.62	0.54	0.88	1.00																																
PNN	-0.99	-0.82	-0.76	-0.98	-0.96	1.00																															
F_0	-0.63	0.10	0.19	-0.30	-0.72	0.49	1.00																														
F_m	0.71	1.00	1.00	0.92	0.62	-0.82	0.09	1.00																													
F_0/F_m	-0.85	-0.97	-0.95	-0.98	-0.78	0.92	0.12	-0.98	1.00																												
F_v/F_m	0.91	0.94	0.90	1.00	0.85	-0.97	-0.25	0.94	-0.99	1.00																											
SPAD	0.98	0.84	0.79	0.99	0.94	-1.00	-0.45	0.85	-0.94	0.98	1.00																										
Ca	0.78	0.99	0.98	0.96	0.70	-0.87	-0.01	1.00	-0.99	0.97	0.90	1.00																									
Cb	0.70	1.00	1.00	0.92	0.61	-0.81	0.11	1.00	-0.97	0.93	0.84	0.99	1.00																								
x+c	0.79	0.99	0.98	0.96	0.71	-0.88	-0.03	0.99	-1.00	0.97	0.91	1.00	0.99	1.00																							
PT	0.76	1.00	0.99	0.95	0.67	-0.86	0.03	1.00	-0.99	0.96	0.88	1.00	1.00	1.00	1.00																						
Ca/b	-0.52	-0.97	-0.99	-0.80	-0.42	0.66	-0.33	-0.97	0.90	-0.83	-0.70	-0.94	-0.98	-0.94	-0.95	1.00																					
N pa	-0.20	-0.84	-0.88	-0.55	-0.08	0.36	-0.63	-0.83	0.69	-0.59	-0.41	-0.77	-0.84	-0.76	-0.79	0.94	1.00																				
P pa	-0.93	-0.92	-0.88	-1.00	-0.87	0.98	0.29	-0.92	0.98	-1.00	-0.99	-0.96	-0.92	-0.96	-0.95	0.81	0.56	1.00																			
K pa	1.00	0.76	0.70	0.95	0.98	-1.00	-0.57	0.77	-0.89	0.94	0.99	0.83	0.75	0.84	0.81	-0.59	-0.28	-0.95	1.00																		
Ca pa	0.83	0.98	0.96	0.98	0.76	-0.91	-0.09	0.98	-1.00	0.99	0.93	1.00	0.98	1.00	0.99	-0.91	-0.72	-0.98	0.87	1.00																	
Mg pa	-0.88	-0.95	-0.93	-0.99	-0.82	0.95	0.20	-0.96	1.00	-1.00	-0.96	-0.98	-0.95	-0.99	-0.97	0.86	0.64	1.00	-0.92	-0.99	1.00																
Na pa	-0.94	-0.90	-0.86	-1.00	-0.90	0.99	0.34	-0.90	0.97	-1.00	-0.99	-0.94	-0.89	-0.95	-0.93	0.77	0.51	1.00	-0.97	-0.97	0.99	1.00															
Cl pa	-0.91	-0.94	-0.90	-1.00	-0.85	0.97	0.25	-0.94	0.99	-1.00	-0.98	-0.97	-0.93	-0.97	-0.96	0.83	0.59	1.00	-0.94	-0.99	1.00	1.00	1.00														
N r	-0.90	-0.33	-0.25	-0.68	-0.95	0.82	0.90	-0.34	0.54	-0.64	-0.79	-0.43	-0.32	-0.45	-0.40	0.11	-0.24	0.67	-0.87	-0.51	0.60	0.71	0.64	1.00													
P r	-0.86	-0.97	-0.94	-0.99	-0.79	0.93	0.14	-0.97	1.00	-0.99	-0.95	-0.99	-0.97	-0.99	-0.99	0.89	0.68	0.99	-0.90	-1.00	1.00	0.98	0.99	0.55	1.00												
K r	1.00	0.67	0.61	0.91	1.00	-0.98	-0.67	0.68	-0.82	0.89	0.97	0.75	0.66	0.76	0.73	-0.48	-0.16	-0.91	0.99	0.80	-0.86	-0.93	-0.89	-0.92	-0.83	1.00											
Ca r	0.90	0.95	0.91	1.00	0.84	-0.96	-0.23	0.95	-0.99	1.00	0.97	0.98	0.94	0.98	0.97	-0.85	-0.61	-1.00	0.93	0.99	-1.00	-0.99	-1.00	-0.62	-1.00	0.88	1.00										
Mg r	-0.07	-0.75	-0.81	-0.44	0.05	0.24	-0.73	-0.75	0.59	-0.47	-0.28	-0.68	-0.76	-0.66	-0.70	0.89	0.99	0.44	-0.15	-0.61	0.53	0.39	0.48	-0.37	0.57	-0.02	-0.50	1.00									
Na r	-0.98	-0.54	-0.47	-0.83	-1.00	0.93	0.78	-0.55	0.72	-0.80	-0.91	-0.63	-0.53	-0.65	-0.61	0.34	-0.01	0.83	-0.96	-0.69	0.77	0.86	0.80	0.97	0.73	-0.99	-0.79	-0.14	1.00								

Valor crítico
 $P \leq$ 0.05 0.01 0.001
0.81 0.91 0.97

Tabla 1.13 Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con fijación de nitrógeno (ANA, TNA, TFN, Lb, PSN, PNN) emisión de fluorescencia (F_0 , F_m , F_0/F_m , F_v/F_m , SPAD), contenido de p

	ANA	TNA	TFN	Lb	PSN	PNN	F_0	F_v	F_0/F_m	F_v/F_m	SPAD	Ca	Cb	x+c	PT	Ca/b	
ANA	1.00																
TNA	0.93	1.00															
TFN	0.87	0.99	1.00														
Lb	0.14	-0.23	-0.37	1.00													
PSN	0.48	0.76	0.85	-0.80	1.00												
PNN	-0.95	-0.77	-0.67	-0.44	-0.18	1.00											
F_0	0.74	0.45	0.31	0.77	-0.23	-0.92	1.00										
F_v	0.99	0.87	0.78	0.28	0.34	-0.98	0.83	1.00									
F_0/F_m	-0.98	-0.99	-0.95	0.06	-0.64	0.87	-0.59	-0.94	1.00								
F_v/F_m	0.98	0.98	0.94	-0.05	0.63	-0.87	0.61	0.95	-1.00	1.00							
SPAD	0.94	1.00	0.98	-0.20	0.74	-0.79	0.48	0.88	-0.99	0.99	1.00						
Ca	0.93	1.00	0.99	-0.22	0.76	-0.77	0.46	0.87	-0.99	0.98	1.00	1.00					
Cb	0.84	0.98	1.00	-0.41	0.87	-0.63	0.27	0.76	-0.93	0.93	0.97	0.98	1.00				
x+c	0.99	0.97	0.93	0.01	0.59	-0.90	0.65	0.96	-1.00	1.00	0.98	0.97	0.91	1.00			
PT	0.92	1.00	0.99	-0.27	0.79	-0.74	0.41	0.85	-0.98	0.97	1.00	1.00	0.99	0.96	1.00		
Ca/b	0.47	0.11	-0.04	0.94	-0.56	-0.72	0.94	0.59	-0.28	0.30	0.15	0.12	-0.08	0.35	0.07	1.00	
N pa	0.95	1.00	0.98	-0.17	0.72	-0.81	0.51	0.90	-0.99	0.99	1.00	1.00	0.97	0.99	0.99	0.1	
P pa	0.53	0.18	0.03	0.92	-0.50	-0.77	0.96	0.64	-0.34	0.36	0.21	0.19	-0.01	0.41	0.14	1.00	
Ca pa	0.91	1.00	1.00	-0.29	0.80	-0.73	0.40	0.84	-0.97	0.97	1.00	1.00	0.99	0.96	1.00	0.0	
Mg pa	0.95	1.00	0.98	-0.19	0.73	-0.80	0.49	0.89	-0.99	0.99	1.00	1.00	0.97	0.98	1.00	0.1	
Na pa	-0.46	-0.75	-0.84	0.82	-1.00	0.16	0.25	-0.33	0.63	-0.62	-0.73	-0.75	-0.86	-0.57	-0.78	0.5	
K pa	-0.66	-0.89	-0.95	0.65	-0.98	0.39	0.01	-0.54	0.80	-0.79	-0.87	-0.88	-0.96	-0.75	-0.90	0.3	
N r	0.94	1.00	0.98	-0.20	0.74	-0.79	0.47	0.88	-0.99	0.99	1.00	1.00	0.98	0.98	1.00	0.1	
P r	0.49	0.78	0.86	-0.79	1.00	-0.20	-0.21	0.36	-0.66	0.65	0.76	0.77	0.88	0.60	0.80	-0.5	
Ca r	0.95	1.00	0.98	-0.19	0.73	-0.80	0.49	0.89	-0.99	0.99	1.00	1.00	0.97	0.98	1.00	0.1	
Mg r	0.83	0.98	1.00	-0.44	0.88	-0.61	0.25	0.74	-0.93	0.92	0.97	0.97	1.00	0.90	0.98	-0.1	
Na r	0.72	0.92	0.97	-0.59	0.96	-0.46	0.07	0.61	-0.84	0.83	0.91	0.92	0.98	0.80	0.94	-0.2	
K r	-0.73	-0.93	-0.97	0.58	-0.95	0.47	-0.08	-0.62	0.85	-0.84	-0.91	-0.92	-0.98	-0.81	-0.94	0.2	

Tabla 1.14 Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con el contenido de carbohidratos (Sac, Mal, Fru, Treh, Ast), aminoácidos (Aa), prolina

	<i>Sac</i>	<i>Mal</i>	<i>Fru</i>	<i>Treh</i>	<i>Ast</i>	<i>Aa</i>	<i>Pro</i>	<i>Alm</i>	<i>F₀</i>
Sac	1.00								
Mal	1.00	1.00							
Fru	0.87	0.86	1.00						
Treh	-0.70	-0.68	-0.96	1.00					
Ast	1.00	1.00	0.89	-0.72	1.00				
Aa	0.94	0.95	0.67	-0.43	0.94	1.00			
Pro	0.61	0.59	0.92	-0.99	0.63	0.31	1.00		
Alm	0.89	0.88	1.00	-0.95	0.90	0.70	0.90	1.00	
F ₀	-0.33	-0.30	-0.74	0.90	-0.35	0.00	-0.95	-0.72	1.00
F _m	0.91	0.92	0.60	-0.35	0.90	1.00	0.23	0.63	0.09
F ₀ /F _m	-0.98	-0.98	-0.75	0.54	-0.97	-0.99	-0.43	-0.78	0.12
F _v /F _m	1.00	1.00	0.84	-0.65	0.99	0.97	0.55	0.86	-0.25
SPAD	0.99	0.99	0.93	-0.79	0.99	0.89	0.71	0.95	-0.45
Ca	0.95	0.95	0.67	-0.44	0.94	1.00	0.32	0.70	-0.01
Cb	0.90	0.91	0.58	-0.33	0.89	0.99	0.21	0.61	0.11
x+c	0.95	0.96	0.69	-0.46	0.95	1.00	0.34	0.72	-0.03
PT	0.94	0.94	0.65	-0.41	0.93	1.00	0.29	0.68	0.03
Ca/b	-0.78	-0.80	-0.39	0.11	-0.77	-0.94	0.01	-0.42	-0.33

Tabla 1.15 Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con el contenido de carbohidratos (Sac, Mal, Fru, Treh, Ast), aminoácidos (Aa), prolina (Prot), emisión de fluorescencia (F_0 , F_m , F_0/F_m , F_v/F_m , SPAD) y contenido de pigmentos fotosintéticos (Ca, Cb, X+C, PT, Ca/b) en plantas de *L. japonicus*

	Sac	Mal	Fru	Glu	Treh	Ast	Aa	Pro	Alm	F_0	F_v	F_0/F_m	F_v/F_m	SPAD	Ca	Cb	x+c	PT	Ca/b	
Sac	1.00																			
Mal	0.98	1.00																		
Fru	0.01	0.20	1.00																	
Glu	-0.65	-0.50	0.75	1.00																
Treh	-0.53	-0.68	-0.85	-0.29	1.00															
Ast	-0.63	-0.77	-0.78	-0.17	0.99	1.00														
Aa	0.20	0.01	-0.98	-0.87	0.73	0.64	1.00													
Pro	0.48	0.31	-0.87	-0.98	0.49	0.37	0.95	1.00												
Alm	-0.66	-0.51	0.74	1.00	-0.28	-0.16	-0.86	-0.98	1.00											
F_0	-0.14	-0.32	-0.99	-0.66	0.91	0.86	0.94	0.80	-0.65	1.00										
F_v	0.43	0.25	-0.90	-0.96	0.54	0.43	0.97	1.00	-0.96	0.83	1.00									
F_0/F_m	-0.71	-0.57	0.69	1.00	-0.22	-0.09	-0.83	-0.96	1.00	-0.59	-0.94	1.00								
F_v/F_m	0.70	0.55	-0.71	-1.00	0.23	0.11	0.84	0.96	-1.00	0.61	0.95	-1.00	1.00							
SPAD	0.80	0.67	-0.59	-0.98	0.08	-0.04	0.74	0.91	-0.98	0.48	0.88	-0.99	0.99	1.00						
Ca	0.82	0.69	-0.57	-0.97	0.06	-0.07	0.73	0.90	-0.97	0.46	0.87	-0.99	0.98	1.00	1.00					
Cb	0.92	0.82	-0.39	-0.90	-0.15	-0.27	0.57	0.79	-0.91	0.27	0.76	-0.93	0.93	0.97	0.98	1.00				
x+c	0.66	0.51	-0.74	-1.00	0.28	0.16	0.86	0.98	-1.00	0.65	0.96	-1.00	1.00	0.98	0.97	0.91	1.00			
PT	0.84	0.73	-0.53	-0.96	0.01	-0.12	0.69	0.88	-0.96	0.41	0.85	-0.98	0.97	1.00	1.00	0.99	0.96	1.00		
Ca/b	-0.47	-0.63	-0.88	-0.36	1.00	0.98	0.77	0.54	-0.34	0.94	0.59	-0.28	0.30	0.15	0.12	-0.08	0.35	0.07		1.00

Valor crítico
 $P \leq$ 0.05 0.01 0.001
0.81 0.91 0.97

2. Evolución ontogénica del metabolismo carbonado nodular en las simbiosis *M. truncatula*-*S. meliloti* y *L. japonicus*-*M. loti*: efecto del NaCl (*short-term*)

En las simbiosis: *M. truncatula*-*S. meliloti* GR4 y *L. japonicus*-*M. loti* R7A, se estudió el efecto que el NaCl, aplicado cuando están establecidas (nódulos formados), ejerce en los procesos relacionados con el crecimiento de la planta, fijación de N₂ y metabolismo carbonado nodular en diferentes estados fenológicos del cultivo. La aplicación del tratamiento salino se inició a las 5 (*M. truncatula*) y 7 semanas (*L. japonicus*), cuando ambos cultivos se encontraban en crecimiento vegetativo. Las dosis de NaCl utilizadas fueron de 50 mM (*M. truncatula*) y 100 mM (*L. japonicus*) en base a los resultados obtenidos en el experimento anterior.

La recolecta de las plantas se realizó coincidiendo con 4 estados fenológicos del desarrollo:

-Crecimiento vegetativo: *M. truncatula* 5s y *L. japonicus* 7s.

-Floración: *M. truncatula* 7s y *L. japonicus* 9s con 14 días de tratamiento salino (dts).

-Inicio de fructificación: *M. truncatula* 8s y *L. japonicus* 10s, con 21 (dts).

-Plena fructificación: *M. truncatula* 9s y *L. japonicus* 11s, con 28 (dts).

2.1. Análisis de crecimiento

El crecimiento expresado como peso seco de parte aérea, peso seco de raíz, peso seco de la planta y relación raíz/parte aérea a lo largo del tiempo de cultivo, con los tratamientos de sal se expone en la figura 2.1. Los datos numéricos se encuentran en las tablas A 2.1 (*M. truncatula*) y A 2.3 (*L. japonicus*), junto con el estudio estadístico de los mismos, que se encuentra en las tablas A 2.2 y A 2.4 del apéndice de esta memoria.

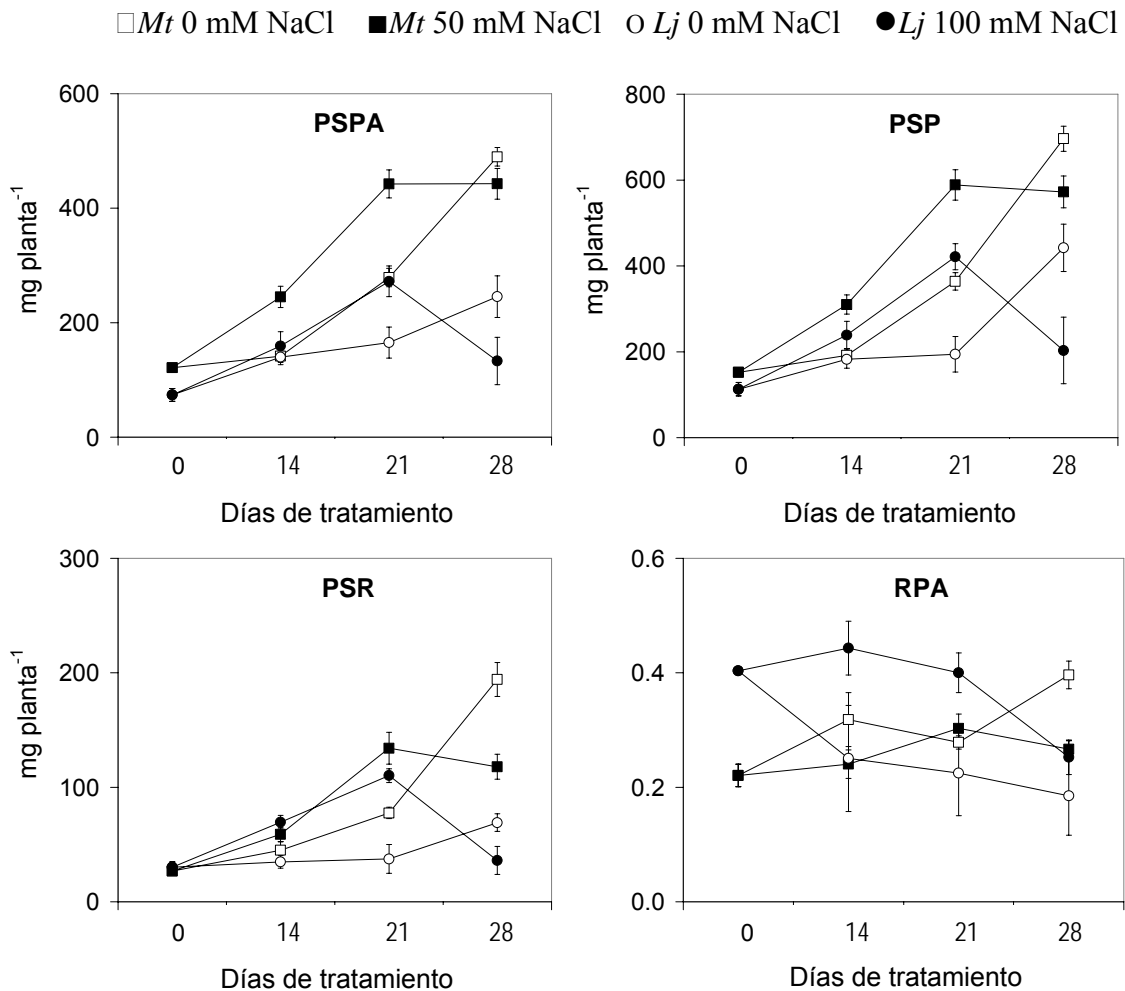


Figura 2.1. Peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de raíz (PSR), peso seco de planta (PSP) y relación raíz/parte aérea (RPA) de *M. truncatula* y *L. japonicus* inoculadas con *S. meliloti* GR4 y *M. loti* R7A y tratadas con 50 y 100 mM de NaCl a los 14, 21 y 28 días de tratamiento. Cada punto es la media de 10 réplicas + SE.

El PSP de *M. truncatula* se multiplicó por 4 en el tiempo transcurrido entre el primer y último muestreo en plantas control, mientras que en las tratadas con sal se multiplicó por 3. En el inicio de fructificación (21 días), se observó que el PSP en condiciones de salinidad fue un 60% mayor, a lo que contribuyó tanto el PSPA como el PSR, que se incrementaron en porcentaje similar. En *L. japonicus* también fue el PSP de las plantas tratadas con sal un 31% mayor en el periodo de floración y un

115% a los 21 dts (inicio de fructificación), siendo la respuesta a la salinidad superior en el PSR que en el PSPA, ya que las diferencias fueron del 100% y 200% en PSR y del 14% y 65% en el PSPA a los 14 y 21 días respectivamente. Esta tendencia a aumentar el crecimiento de las plantas con tratamiento salino respecto de las control, se invirtió en la última toma de muestras realizada en ambas especies, cuando se encontraban en fructificación, concretamente el PSPA, PSR y PSP decrecieron el 10%, 40% y 20% respectivamente en *M. truncatula*, mientras que en *L. japonicus* el descenso fue del 50% aproximadamente en cada una de las partes de la planta y en la planta completa.

La RPA reflejó los cambios inducidos por la salinidad en raíz y parte aérea, de forma que en *L. japonicus*, la contribución de la raíz al incremento del peso seco de la planta en condiciones de estrés se reflejó en el aumento de la RPA, mientras que en *M. truncatula* se observó un efecto distinto con la reducción de RPA, que fue del 30% a los 14 y 28 dts.

El análisis de la varianza realizado a los parámetros de crecimiento y representados en las tablas A 2.2 (*M. truncatula*) y A 2.4 (*L. japonicus*) del apéndice, determina que la mayor variabilidad de los parámetros de crecimiento se debió a la edad del cultivo en *M. truncatula* (80%), mientras que en *L. japonicus* la interacción entre las variables tiempo y salinidad fue responsable en un 40% de la variación y la edad del cultivo del 45%.

2.2. Fijación de nitrógeno

En la figura 2.2. se muestran los parámetros relacionados con la fijación de nitrógeno: actividad nitrogenasa aparente, actividad nitrogenasa total, tasa de fijación de N₂, contenido de leghemoglobina, peso seco de nódulos y peso normalizado de nódulos. Los datos numéricos correspondientes a estas figuras se encuentran en las tablas A 2.5 (*M. truncatula*) y A 2.7 (*L. japonicus*) del apéndice.

La actividad nitrogenasa aparente, registra un descenso en nódulos de ambas especies entre la recogida a tiempo cero, (crecimiento vegetativo), y la realizada cuando las plantas se encontraban en floración, este descenso fue del 25% en *M. truncatula* y del 60% en *L. japonicus*. En condiciones de salinidad la disminución de actividad fue del 40% en *M. truncatula*, mientras que en *L. japonicus* fue del 50% en floración. En las tomas de

muestras realizadas a los 21 y 28 dts se observó que: **a)** en *M. truncatula* la ANA fue entre el 15% y el 10% menor en los nódulos procedentes de plantas con sal, **b)** en *L. japonicus*, la ANA fue el 50% menor.

La actividad nitrogenasa total presentó un comportamiento similar al de la aparente, mostrando un descenso del 30% entre el crecimiento vegetativo y la etapa de floración en ambas especies. En nódulos de *M. truncatula*, en floración (14 dts) fue cuando se observó un efecto significativo del NaCl, ya que provocó una disminución del 25% respecto a los controles sin sal. En nódulos de *L. japonicus*, la ANT registró una marcada inhibición por la sal a los 21 y 28 dts, ya que como se observa en la figura 2.2 fue un 50% inferior, de forma similar a lo observado con la ANA.

La tasa de fijación de N₂ mostró una tendencia parecida a los parámetros anteriores tanto en nódulos de *M. truncatula* como en los de *L. japonicus*. En *M. truncatula*, la TFN disminuyó en el tiempo transcurrido entre la toma de muestras inicial y final un 60%, tanto en nódulos control como en los tratados con sal, aunque se puede señalar que a las dos semanas de tratamiento salino (14 días), se observó un 30% más de TFN en las plantas control que en las tratadas con sal. En *L. japonicus* la TFN decreció por efecto de la salinidad a lo largo de todo el cultivo, encontrándose las mayores diferencias respecto a los nódulos sin sal al final del tiempo de experimentación.

En cuanto al contenido de leghemoglobina en nódulos, se puede apreciar en la figura 2.2, que la concentración de este pigmento fue en todos los muestreos entre 2 y 4 veces superior en los de *L. japonicus* (determinados) que en los de *M. truncatula* (indeterminados). En *M. truncatula*, el contenido de leghemoglobina nodular se redujo de forma significativa al pasar de floración (14 días) a fructificación (21 días), favoreciendo la salinidad una disminución aún mayor, que provocó que el contenido de leghemoglobina fuera aproximadamente un 50% menor en nódulos de plantas con sal en los últimos muestreos (21 y 28 días). En *L. japonicus* la concentración de Lb decreció un 30% en nódulos de plantas control a lo largo de los 28 días de cultivo, mientras que en los tratados con sal solo disminuyó un 15%.

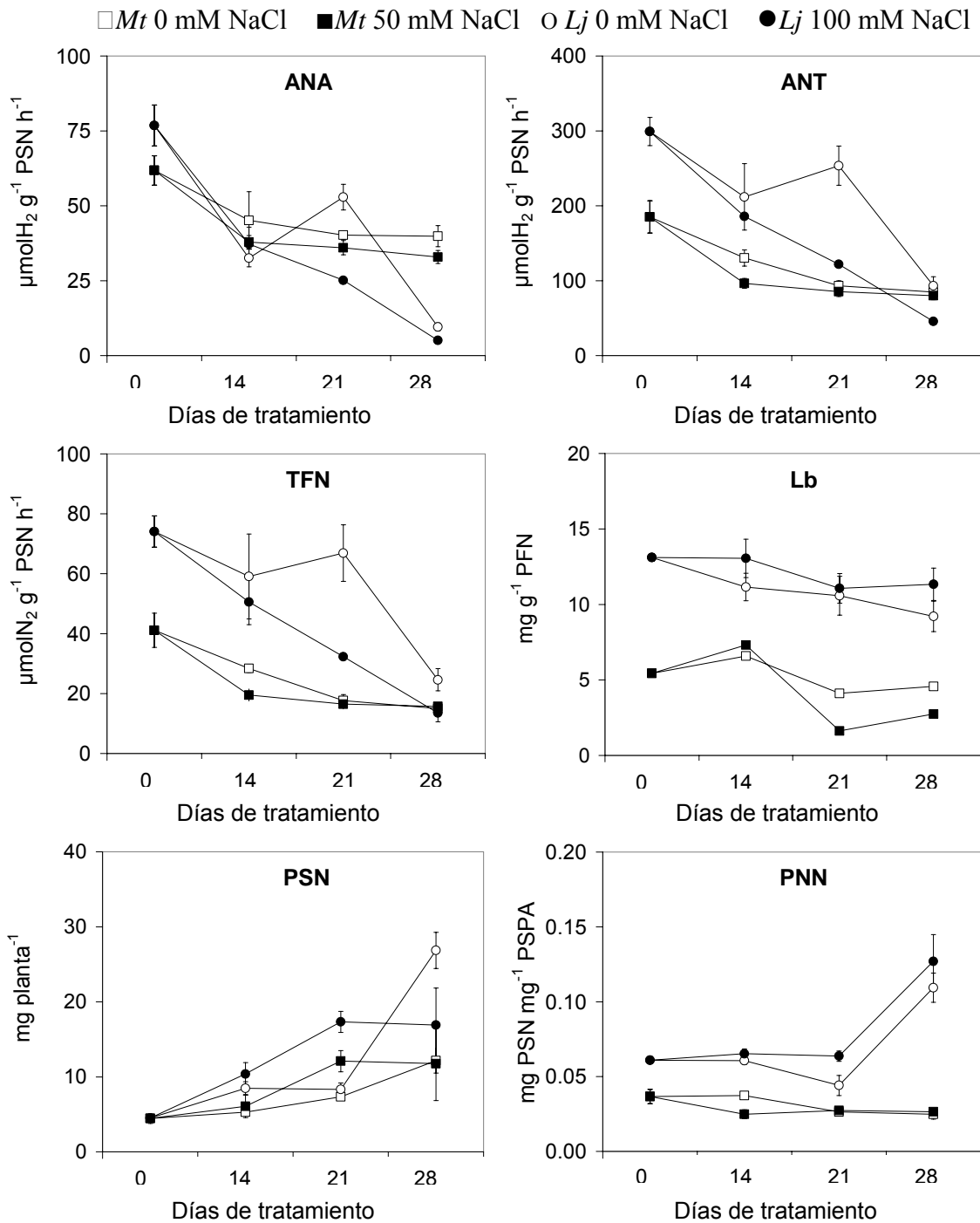


Figura 2.2. Actividad nitrogenasa aparente (ANA), actividad nitrogenasa total (ANT), tasa de fijación de nitrógeno (TFN), contenido de leghemoglobina (Lb), peso seco de nódulos (PSN) y peso normalizado de nódulos (PNN) de *M. truncatula* y *L. japonicus* inoculadas con *S. meliloti* GR4 y *M. loti* R7A tratadas con 50 y 100 mM de NaCl a los 14, 21 y 28 días de tratamiento. Cada punto es la media de 10 réplicas + SE.

El PSN a lo largo de los 28 días en los que se realizaron las recolectas aumentó en ambas especies, siendo este incremento más acentuado en los de *L. japonicus*, donde se multiplicó por 3, mientras que en los de *M. truncatula* por 2.3. La salinidad tuvo un efecto similar en los nódulos de las dos especies, en los que se observó que tanto a los 14 como 21 días un incremento del PSN. Sin embargo, en *M. truncatula* a los 28 días (fructificación), el tratamiento salino logró igualar el PSN control y con sal, mientras que en *L. japonicus*, el PSN de las plantas control fue un 35% superior. El PNN de *M. truncatula* no experimentó variaciones significativas a lo largo de la ontogenia, mientras que en *L. japonicus*, durante la etapa de fructificación (28 días), aumentó hasta duplicarse, lo que indica que el incremento del PSN es proporcionalmente mayor que el del PSPA (fig. 2.1).

El análisis de la varianza de los datos relacionados con la fijación de nitrógeno en *M. truncatula*, representados en la tabla A 2.6 del apéndice, indica que la variabilidad observada en la tasa de fijación de nitrógeno y el contenido de leghemoglobina, puede asignarse en un 75% al factor tiempo del cultivo, mientras que en *L. japonicus* (tabla A 2.8 del apéndice), este factor fue responsable en un 80% de la variabilidad detectada en la actividad nitrogenasa aparente. En *M. truncatula*, ANT, TFN y Lb se correlacionan negativamente y de forma significativa ($P \leq 0.01$) con los parámetros de crecimiento (PSPA, PSR y PSP), en *L. japonicus* se observa una correlación positiva del PSN y negativa de la Lb nodular con los parámetros de crecimiento mencionados.

2.3. Metabolismo carbonado

Se determinaron diversas actividades enzimáticas del metabolismo carbonado nodular como: sacarosa sintasa, invertasa alcalina, hexoquinasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa, malato deshidrogenasa e isocitrato deshidrogenasa. Las actividades de estas enzimas se han expresado por $\text{mg}^{-1} \text{prot h}^{-1}$ y se exponen en la figura 2.3, y en las tablas A 2.9 a A 2.12 del apéndice. Además, en las tablas A 2.30 (*M. truncatula*) y A 2.32 (*L. japonicus*) se expresan por $\text{g}^{-1} \text{PF}$.

La actividad sintasa nodular fue más activa en el crecimiento vegetativo, coincidente con el primer muestreo realizado tanto en nódulos

de *M. truncatula* como en los de *L. japonicus*, decreciendo esta actividad a lo largo del tiempo de experimentación en un 15% y 20% respectivamente. La salinidad provocó un descenso de esta actividad a los 14 días de aplicación de NaCl (floración) del 30% en nódulos de *M. truncatula* y del 25% en los de *L. japonicus*. A los 28 días de tratamiento (fructificación), la disminución en nódulos con sal respecto de los control fue del 50% en *M. truncatula* y del 60% en *L. japonicus*. En la tabla 2.3 se puede apreciar que esta actividad se correlaciona significativamente ($P \leq 0.01$) con parámetros de crecimiento, fijación de nitrógeno y con la mayoría de las actividades enzimáticas del metabolismo carbonado estudiadas.

La actividad IA nodular tuvo un comportamiento similar a la sintasa en el tiempo de experimentación, ya que decreció entre el 40% y 50% a los 28 días en nódulos de *M. truncatula* y *L. japonicus* respectivamente, como se observa en la figura 2.3, respecto al crecimiento vegetativo. En ambas especies, el efecto negativo de la salinidad, fue menor al observado en la sintasa, ya que se redujo aproximadamente un 15% respecto a nódulos de plantas control en todos de los tiempos de experimentación estudiados, excepto a los 28 días (fructificación) en *M. truncatula*, donde la actividad invertasa alcalina en los nódulos de plantas tratadas con 50 mM NaCl, superó a la de nódulos de plantas control en un 39%. En *L. japonicus* tanto la actividad SS como IA presentaron una correlación negativa con el contenido de sacarosa nodular (tabla 2.8).

La actividad HK en general, tendió a decrecer en el tiempo de experimentación en nódulos de ambas especies. La respuesta a la salinidad varió entre éstas, en los de *M. truncatula* en la recolecta realizada a los 21 y 28 dts (inicio y plena fructificación), se produjo un aumento de actividad en nódulos de plantas en condiciones de estrés, mientras que en los de *L. japonicus*, la salinidad mantuvo la actividad HK un 35% por debajo del control a lo largo del cultivo. La actividad HK nodular de *M. truncatula* (tabla 2.3), presenta una correlación significativa ($P \leq 0.05$) y negativa con la actividad PEPC, MDH e ICDH, así como con las tres enzimas relacionadas con el metabolismo de la trehalosa, mientras que en *L. japonicus* (tabla 2.4), la correlación con las actividades PEPC, MDH e ICDH es positiva.

Resultados

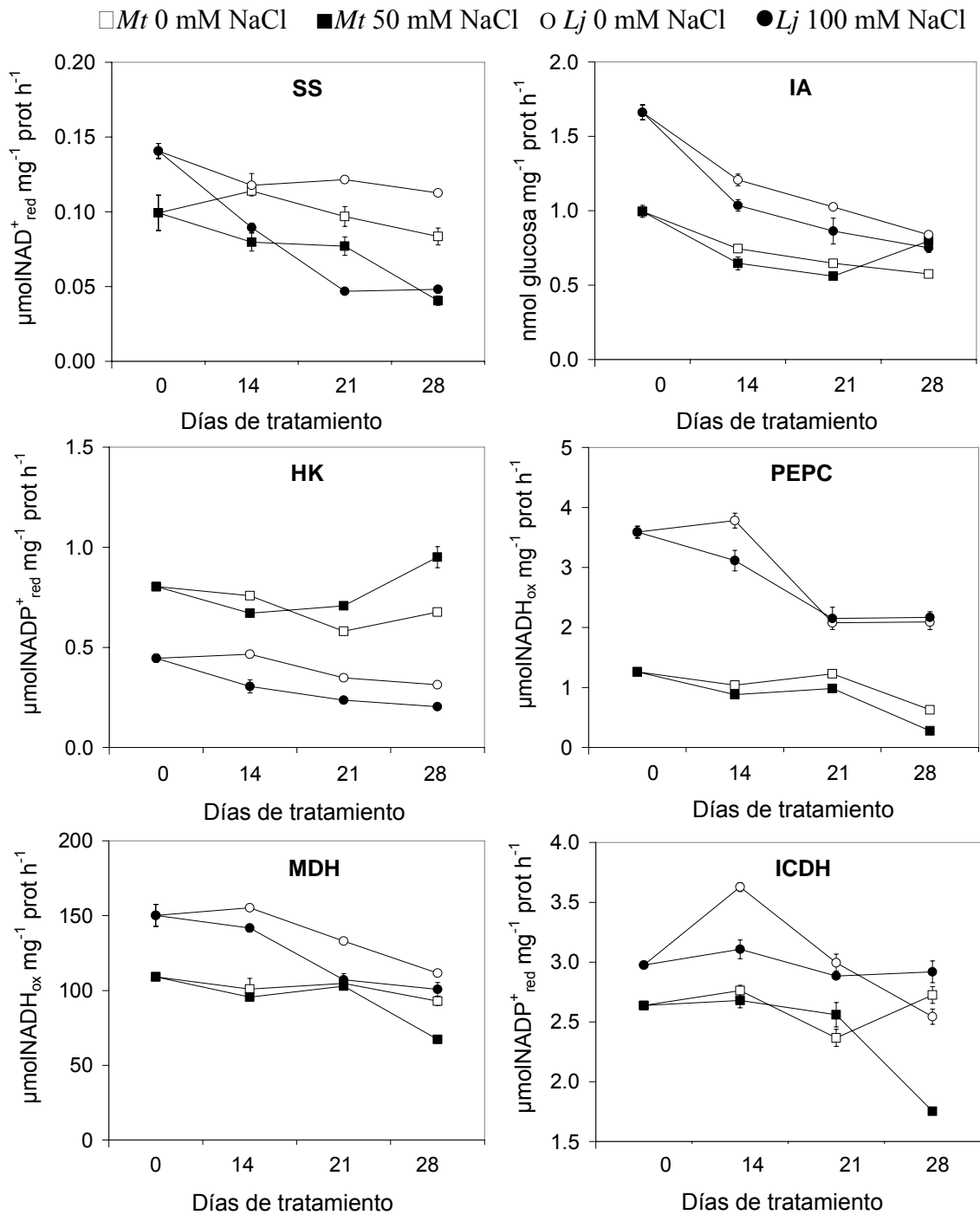


Figura 2.3. Actividad sacarosa sintasa (SS), invertasa alcalina (IA), hexoquinasa (HK), fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), malato deshidrogenasa (MDH) e isocitrato deshidrogenasa (ICDH), en nódulos de *M. truncatula* y *L. japonicus* inoculadas con *S. meliloti* GR4 y *M. loti* R7A, tratadas con 50 y 100 mM de NaCl a los 14, 21 y 28 días de tratamiento. Cada punto es la media de 4 réplicas \pm SE.

En cuanto a las actividades enzimáticas PEPC, MDH e ICDH implicadas en la síntesis de ácidos dicarboxílicos, se observa que en nódulos de *M. truncatula*, no experimentan cambios importantes entre la etapa de crecimiento vegetativo y el inicio de la fructificación (21 dts), momento a partir del cual su actividad decae siendo un 50% y 15% menor respectivamente a los 28 dts respecto a la inicial. En nódulos de *L. japonicus* es a partir de la floración (14 días) cuando comienza a decaer la actividad de ambas enzimas, concretamente un 45% la PEPC y un 30% la MDH, hasta los 28 dts. En nódulos de *M. truncatula*, el efecto de la salinidad se manifestó de forma significativa a los 28 dts, en plena fructificación, cuando se observa la mayor diferencia entre la actividad en nódulos de plantas control y con sal, la disminución fue del 55%, 30% y 35% para PEPC, MDH e ICDH respectivamente. En nódulos de *L. japonicus*, la respuesta a la salinidad varió según la actividad enzimática nodular: **a)** la PEPC se redujo un 20% a los 14 días de aplicación del tratamiento, **b)** la MDH mostró una disminución de entre el 10% y el 20% en cada una de las determinaciones realizadas, y **c)** la ICDH se mantuvo prácticamente estable a lo largo de los 28 días en condiciones de salinidad.

Un aspecto destacable es la mayor actividad de estas enzimas (PEPC, MDH y ICDH) en nódulos de *L. japonicus* respecto de los de *M. truncatula*, siendo esta diferencia 3 veces superior en la actividad carboxilasa. El análisis de varianza (tablas A 2.10 y A 2.12 del apéndice) indica que lo que mayoritariamente establece la variabilidad detectada en estas tres actividades enzimáticas es la edad del cultivo (80-60% *M. truncatula* y 90-80% *L. japonicus*). Además se observa una correlación positiva entre MDH y PEPC ($r=0.86$, $r=0.84$ en *M. truncatula* y $r=0.76$ y $r=0.51$ en *L. japonicus*) y la actividad de la SS nodular (tablas 2.3 y 2.4).

Se puede concluir que: **a)** la máxima actividad de las enzimas estudiadas se detecta en el crecimiento vegetativo tanto en nódulos de *M. truncatula* como en los de *L. japonicus*, excepto la actividad ICDH que fue máxima en el inicio de floración, **b)** la salinidad ejerce un efecto negativo más intenso sobre estas actividades enzimáticas en nódulos de *M. truncatula* que en los de *L. japonicus*

2.4. Metabolismo de la trehalosa

En la figura 2.4 se representan las actividades enzimáticas relacionadas con la síntesis (TPS y TPP) y degradación de trehalosa (TRE) en nódulo. Los datos numéricos se encuentran en las tablas del apéndice A 2.13 (*M. truncatula*) y A 2.15 (*L. japonicus*), las mismas actividades expresadas por g PFN se encuentran en las tablas A 2.35 (*M. truncatula*) y A 2.37 (*L. japonicus*) del apéndice.

La actividad TPS en nódulos de *M. truncatula* y *L. japonicus* se incrementó durante la etapa de floración, siendo a los 21 días de tratamiento (inicio de fructificación) cuando se obtuvo la máxima actividad, este incremento fue más del doble en *M. truncatula* y el 33% en *L. japonicus*. En *M. truncatula*, tanto en nódulos de plantas control como en los procedentes de plantas tratadas con sal, a los 28 dts la actividad fue un 50% y 25% mayor respectivamente respecto al tiempo cero (crecimiento vegetativo). La salinidad en ambas especies provocó que esta actividad se inhibiera en cada uno de los tiempos de experimentación estudiados: **a**) en *M. truncatula* el efecto de la salinidad fue mayor en el inicio de fructificación (21 días), cuando la diferencia observada fue del 65%, mientras que a los 28 días fue del 20%, **b**) en *L. japonicus*, se inhibió con la sal un 15%, 30% y 20% en las determinaciones realizadas a los 14, 21 y 28 días respectivamente.

La actividad TPP tuvo un comportamiento similar en las dos especies estudiadas, aumentando al pasar de la fase del crecimiento vegetativo al periodo reproductor (14 días), este incremento fue mayor en *M. truncatula* (88%) que en *L. japonicus* (20%). La actividad TPP fue 6 veces superior en nódulos de *L. japonicus* que en los de *M. truncatula*. La salinidad, condicionó: **a**) que esta actividad fuera un 20% y un 10% menor en nódulos de *M. truncatula* y de *L. japonicus* respectivamente a los 14 días de tratamiento; **b**) que en la última recolecta (28 días), la actividad TPP disminuyera por efecto de la sal en nódulos de *M. truncatula* (40%) y en los de *L. japonicus* (25%). La correlación entre TPS y TPP fue positiva y significativa ($r=0.67$ y $r=0.78$ en *M. truncatula* y *L. japonicus* respectivamente) (tablas 2.3 y 2.4).

La actividad trehalasa mostró en nódulos de *M. truncatula* una actividad máxima a los 14 días, coincidiendo con el periodo de floración, a partir de este momento en las cosechas siguientes la actividad decreció, siendo a los 28 días un 20% inferior respecto del primer muestreo

(crecimiento vegetativo). La sal en cada uno de los muestreos provocó una disminución de la actividad TRE nodular en *M. truncatula*, que se fue acentuando conforme aumentaba el tiempo de exposición a la sal, pasando la diferencia del 10% a los 14 días, al 30% a los 28 días.

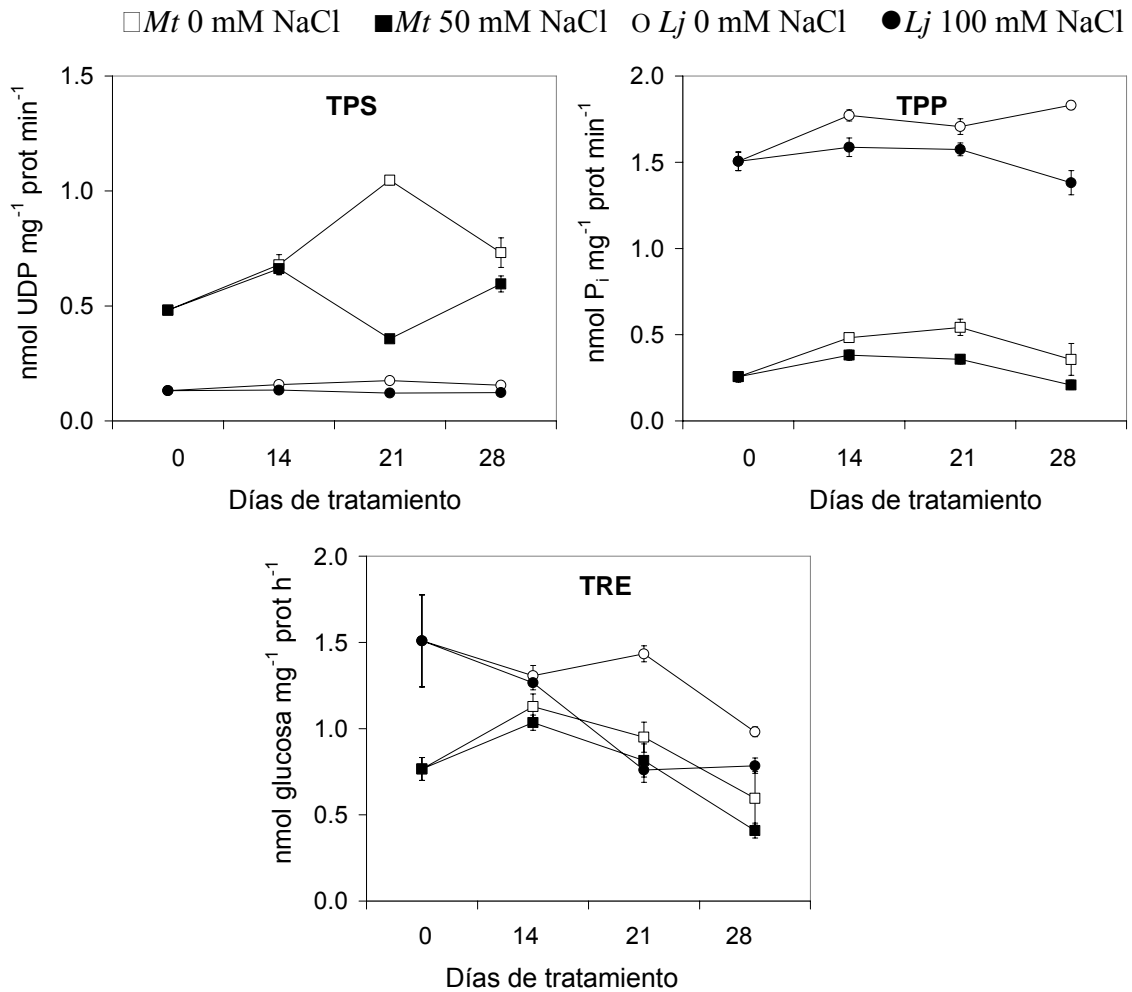


Figura 2.4. Actividad trehalosa-6 fosfato sintasa (TPS), trehalosa-6 fosfato fosfatasa (TPP) y trehalasa (TRE) en nódulos de *M. truncatula* y *L. japonicus* inoculadas con *S. meliloti* GR4 y *M. loti* R7A, tratadas con 50 y 100 mM de NaCl a los 14, 21 y 28 días de tratamiento. Cada punto es la media de 4 réplicas \pm SE.

Se aprecia en general que: **a)** la máxima actividad de las enzimas de la biosíntesis de trehalosa se obtiene al inicio de fructificación en nódulos de *M. truncatula* y *L. japonicus*, mientras que la actividad catabólica es máxima en etapas anteriores, **b)** la actividad TPS es mayor en *M. truncatula* y la TPP y TRE en *L. japonicus*, **c)** se detecta que TPP y TRE son más sensibles a la sal en nódulos de *M. truncatula*.

En nódulos de *L. japonicus* la actividad TRE disminuyó a partir de la primera recogida, siendo la actividad un 35% inferior a los 28 días. La salinidad afectó negativamente a esta actividad a partir de los 21 días de tratamiento, provocando una disminución del 20% al final del tiempo de experimentación. Es interesante destacar el alto grado de correlación existente ($P \leq 0.001$) entre la actividad TRE y las actividades SS, IA, HK y MDH en nódulos de *L. japonicus* (tabla 2.4).

2.5. Contenido de carbohidratos

En la figura 2.5 se representa el contenido de sacarosa, maltosa, glucosa, fructosa y trehalosa determinados en nódulos. Los datos numéricos junto con los análisis de varianza se encuentran en las tablas de la A 2.17 a la A 2.20 del apéndice (ambas inclusive).

En *M. truncatula*, el contenido de **sacarosa** nodular se incrementó a los 21 días, coincidiendo con el inicio de fructificación, mientras que en plantas con sal no se observaron cambios significativos en la sacarosa en ninguno de los muestreos. En cambio, en nódulos de *L. japonicus*: **a)** el contenido de sacarosa se incrementó en el tiempo de experimentación, multiplicándose por 1.4, 3 y 7 veces respecto al muestreo inicial (crecimiento vegetativo) en la segunda, tercera y cuarta recolecta respectivamente, **b)** cuando se adicionó sal, este parámetro experimentó un rápido incremento, multiplicándose por 8 en los 14 primeros días y alcanzando el máximo contenido a los 21 días, cuando la diferencia respecto de nódulos control fue de 3.3 veces.

El contenido de **maltosa** nodular respondió de forma diferente en cada una de las especies: en nódulos de *M. truncatula* disminuyó un 57% en floración (14 días), y se incrementó a los 28 días hasta alcanzar niveles similares a los detectados en el crecimiento vegetativo, mientras que en condiciones de estrés salino, decreció en los primeros 14 días de aplicación

del tratamiento un 30%, manteniéndose en valores similares hasta el último muestreo. En *L. japonicus*, el contenido de maltosa nodular casi se duplicó en floración, cuadruplicándose en condiciones de estrés salino respecto a nódulos de plantas control en cada uno de los muestreos. La cantidad inicial de maltosa nodular fue 5 veces superior en nódulos de *L. japonicus* (determinados) que en los de *M. truncatula* (indeterminados).

Se observa que el contenido de **fructosa** en nódulos de *M. truncatula* es el doble del que se detecta en los de *L. japonicus*. En *M. truncatula* este parámetro aumentó coincidiendo con el inicio de fructificación (21 días), mientras que en nódulos de plantas con sal, disminuyó siendo un 30% inferior a los 28 días de tratamiento. En nódulos de *L. japonicus*, el contenido de fructosa apenas si mostró modificaciones a lo largo de la ontogenia, mostrando solo un incremento del 20% en fructificación, mientras que la salinidad provocó que se duplicara a los 14 días (floración), disminuyendo en las dos semanas posteriores, aunque se mantuvo en niveles superiores a los detectados en nódulos de plantas control, un 50% y un 25% a los 21 y 28 días respectivamente.

El contenido de **glucosa** fue 10 veces superior en nódulos de *M. truncatula* que en los de *L. japonicus* en el crecimiento vegetativo, manteniéndose esta diferencia con ligeras modificaciones en los diferentes muestreos. Durante la etapa de floración (14 días), la glucosa disminuyó en nódulos de *M. truncatula* un 30%, aunque recuperó el nivel obtenido en el crecimiento vegetativo en el inicio de fructificación (21 días). En condiciones de estrés salino, fue un 30% y 12% menor a los 21 y 28 días respecto de los nódulos de plantas control. En *L. japonicus* se observa que el contenido de glucosa en la ontogenia se mantiene con incrementos poco significativos, llegando a duplicarse en fructificación (28 días), en respuesta a la salinidad se logran incrementos en floración (14 días) e inicio de fructificación (21 días), siendo el contenido de glucosa el doble que en los nódulos control en ambos muestreos.

Se puede establecer que el contenido de sacarosa es mayor en nódulos de *M. truncatula*, de hecho se observa que es 5, 3 y 2.5 veces mayor que la detectada en nódulos de *L. japonicus* en las sucesivas etapas de crecimiento estudiadas. Algo semejante se puede describir respecto al contenido de glucosa, en la que se detectan incluso diferencias mayores. El contenido de fructosa y maltosa también fue mayor en nódulos de

M. truncatula, oscilando las diferencias entre 1.3 y 5 veces más de lo detectado en los de *L. japonicus*.

En relación a la evolución del contenido de carbohidratos acumulados en el nódulo durante la ontogenia, se puede establecer que en nódulos de *L. japonicus* el máximo contenido se detecta en plena fructificación, mientras que en los de *M. truncatula* el máximo nivel de sacarosa y fructosa se detecta al inicio de fructificación, manteniéndose la maltosa y glucosa constantes en los sucesivos estados fenológicos.

Es interesante destacar que en *L. japonicus* el contenido de sacarosa, maltosa y glucosa nodular se correlacionan negativamente con determinadas actividades del metabolismo carbonado (SS, IA, HK, PEPC, MDH, TPS y TRE), y positivamente con el contenido de carbohidratos determinados (sacarosa, maltosa, fructosa, glucosa y azúcares solubles totales) (tabla 2.8).

En cuanto a la **trehalosa**, se detectó una cantidad tres veces superior en nódulos de *L. japonicus* respecto a los de *M. truncatula*, en los que el contenido se mantuvo estable a lo largo del tiempo de experimentación, sin embargo, en nódulos de *L. japonicus* se incrementó un 20% a lo largo del tiempo de experimentación estudiado. La salinidad: **a**) en *M. truncatula*, provocó una disminución de la trehalosa acumulada que fue del 20% al inicio de la fructificación y del 70% en plena fructificación, **b**) en nódulos de *L. japonicus*, provocó que el contenido de trehalosa fuera más del doble en floración y un 60% y 40% menor en el inicio y plena fructificación, coincidiendo con la senescencia del nódulo.

El contenido de trehalosa nodular de *L. japonicus* presentó una correlación positiva y significativa ($P \leq 0.01$) con los parámetros relacionados con la fijación de nitrógeno: ANT, TFN y PSN, así como con el PSP (tabla 2.6), en *M. truncatula* podemos destacar la correlación negativa ($r = -0.97$) de la de trehalosa con la actividad HK y positiva con la mayoría de las actividades enzimáticas del metabolismo carbonado estudiadas (SS, PEPC, MDH, TPS y TRE) (tabla 2.7).

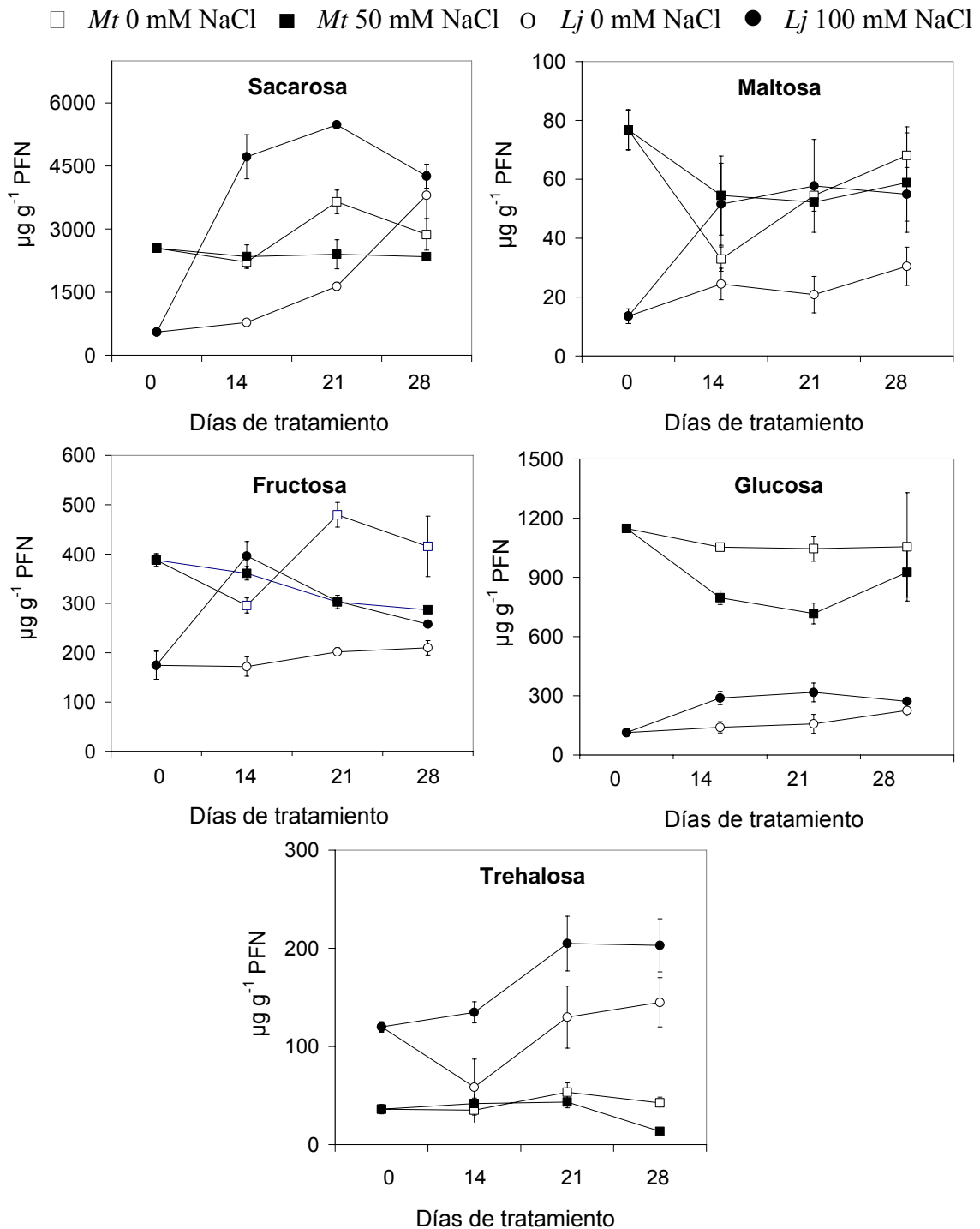


Figura 2.5. Contenido de sacarosa, maltosa, fructosa, glucosa y trehalosa en nódulos de *M. truncatula* y *L. japonicus* inoculadas con *S. meliloti* GR4 y *M. loti* R7A, tratadas con 50 y 100 mM de NaCl a los 14, 21 y 28 días de tratamiento. Cada punto es la media de 4 réplicas \pm SE.

2.6. Otros metabolitos

Se determinó el contenido de azúcares solubles totales, almidón, aminoácidos y prolina en hoja y nódulo de *M. truncatula* y *L. japonicus* en cuatro etapas del crecimiento. Los datos numéricos se recogen en las tablas de la A. 2.21 a la A.2.24 (*M. truncatula*) y la A. 2.25 a la A. 2.28 (*L. japonicus*) del apéndice.

Al estudiar la evolución del contenido de **azúcares solubles totales** se observa que: **a)** tanto en hoja como en nódulo de ambas especies, este parámetro aumenta en el desarrollo del cultivo, **b)** el órgano en el que más se observa este incremento es en hoja de *M. truncatula*, donde se duplica el contenido de Ast en fructificación, y en nódulos de *L. japonicus* donde se multiplicó por 4 a los 28 dts, **c)** el contenido de azúcares solubles totales en nódulos control de *M. truncatula*, es 5 veces mayor que en los de *L. japonicus* en todas las determinaciones realizadas (excepto en la última recolecta), **d)** en *M. truncatula* el contenido de azúcares solubles es mayor en nódulo respecto a hoja, mientras que en *L. japonicus*, la hoja contiene más del doble respecto al nódulo.

La salinidad provocó que el contenido de azúcares en nódulos de *L. japonicus*, se multiplicara por 3 a los 14 días de tratamiento salino, manteniéndose esta diferencia a los 21 días. En hojas de ambas leguminosas la salinidad provocó incrementos variables que oscilaron entre el 20% y 50% en *L. japonicus*, y el 80% y 50% en *M. truncatula*.

El contenido de **almidón** evolucionó de forma distinta en hojas y nódulos de *M. truncatula*: **a)** en hojas se multiplicó por 5 en el inicio y plena fructificación (21 y 28 días), **b)** en nódulos decreció entre un 45% en floración y un 15% a los 28 días. El contenido de almidón en *M. truncatula* es mayor en nódulo que en hoja en crecimiento vegetativo y floración. En *L. japonicus* se observó una diferencia de 16 veces más almidón en hojas que en nódulos en el crecimiento vegetativo, mostrando también una evolución distinta en ambos órganos: en hojas se detecta una disminución (40%-10%), mientras que en nódulos aumenta 7.5 veces en floración y 2 veces en fructificación.

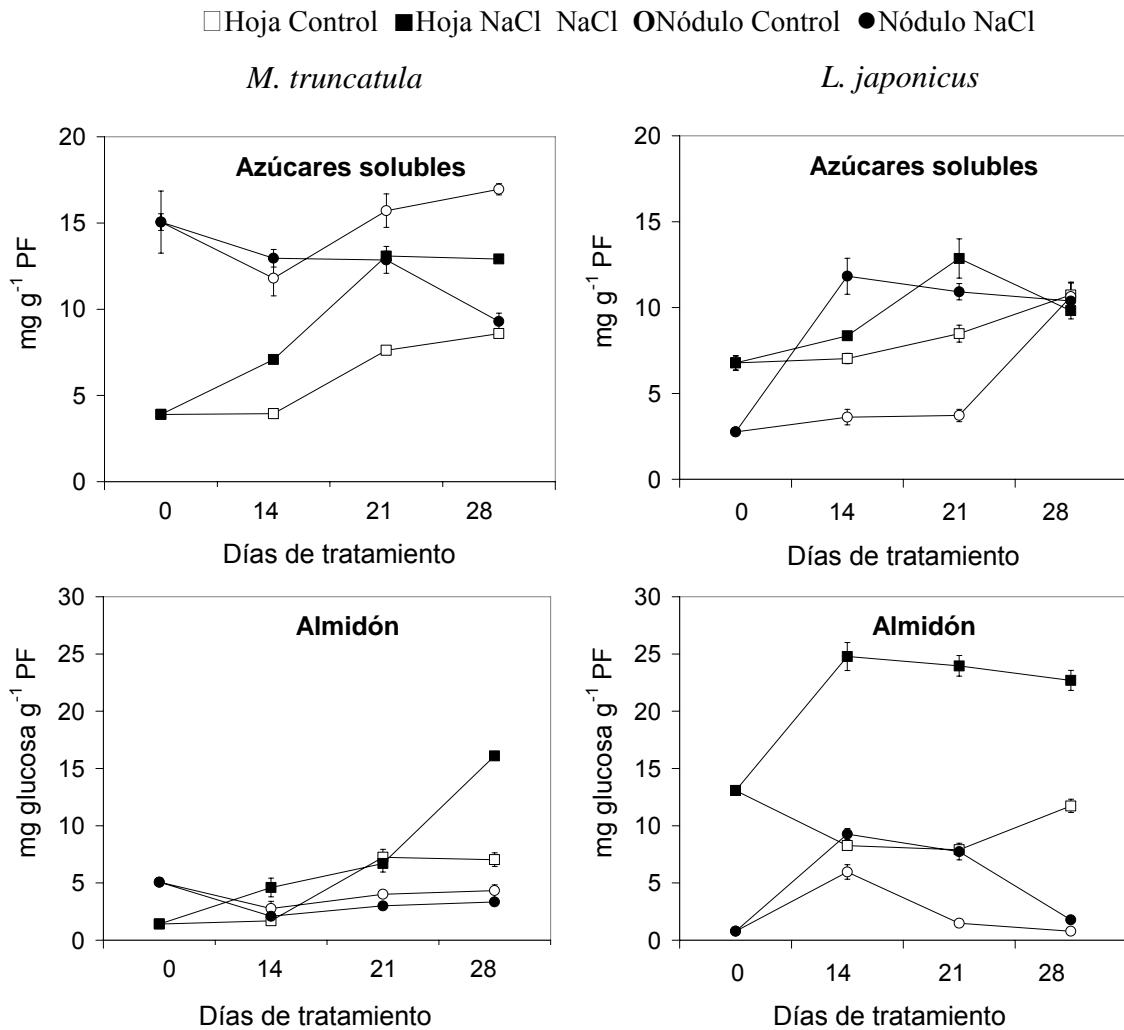


Figura 2.6. Contenido de azúcares solubles totales y almidón en hoja y nódulos de *M. truncatula* y *L. japonicus* inoculadas con *S. meliloti* GR4 y *M. loti* R7A, tratadas con 50 y 100 mM de NaCl a los 14, 21 y 28 días de tratamiento. Cada punto es la media de 3 réplicas + SE.

Se puede asumir que: **a)** el contenido de azúcares solubles y almidón es mayor en nódulos de *M. truncatula* que en los de *L. japonicus*, mientras que *L. japonicus* acumula más ambos metabolitos en hoja, **b)** al estudiar el proceso de ontogenia se detecta que el máximo contenido de azúcares solubles y de almidón en nódulos se alcanza en plena fructificación, tanto en los de *M. truncatula* como en los de *L. japonicus*, mientras que esta respuesta es distinta en hojas de cada especie, **c)** en general la salinidad

provoca una acumulación de estos metabolitos en hoja y nódulos de *L. japonicus* y en hojas de *M. truncatula*, mientras que en los nódulos se produce una reducción respecto al control.

En la figura 2.7 se exponen los datos correspondientes al contenido de aminoácidos y prolina en nódulos y hoja de las dos leguminosas estudiadas. Los datos numéricos se reflejan en las tablas A 2.25 (*M. truncatula*) y A 2.27 (*L. japonicus*) del apéndice.

La salinidad en hojas de *L. japonicus* provocó un incremento del almidón en los 14 primeros días de aplicación, triplicando su contenido respecto al control y manteniéndose esta tendencia hasta el final del estudio, mientras que en nódulos, la salinidad indujo un aumento del 55% en floración, de 5 veces en el inicio de la fructificación y de 2 veces en plena fructificación, mientras que en nódulos de *M. truncatula* disminuyó un 25% en cada uno de los estados de desarrollo del cultivo estudiados.

En general el contenido de **aminoácidos** en nódulos de *M. truncatula* fue mayor que en los de *L. japonicus*, mientras que en parte aérea hay más acumulación en *L. japonicus* que en *M. truncatula*. El contenido de aminoácidos en nódulos presentó comportamientos distintos en cada especie: en *M. truncatula* apenas si se observaron variaciones a lo largo del cultivo, mientras que en nódulos de *L. japonicus* se produjo un aumento a lo largo de las diferentes etapas del cultivo, del 40%, 60% y 70% a los 14, 21 y 28 días respectivamente respecto al dato obtenido en el crecimiento vegetativo. El contenido de aminoácidos en parte aérea de *M. truncatula* aumenta con el crecimiento del cultivo, mientras que en *L. japonicus* alcanza el máximo en floración y se mantiene en el tiempo.

La salinidad en nódulos de *M. truncatula* provocó una disminución del contenido de aminoácidos entre el 25% y 35% en cada uno de los muestreos, mientras que en *L. japonicus* provocó un incremento, que fue del 34%, 7% y 27% a los 14, 21 y 28 días de aplicación de la sal. En hojas de *L. japonicus* la salinidad favoreció la disminución del contenido de aminoácidos del 25% respecto a las de plantas control en todos los muestreos, mientras que en hojas de *M. truncatula* no se afectó significativamente este parámetro.

En relación al contenido de **prolina**, se puede asumir que: **a)** *M. truncatula* acumula más prolina que *L. japonicus*, en concreto, en

crecimiento vegetativo los nódulos de *M. truncatula* tienen 10 veces más prolina que los de *L. japonicus* y 1.5 veces más las hojas, **b)** el estudio evolutivo indica que se acumula en *M. truncatula* y *L. japonicus* tanto en nódulo como en hoja a lo largo del cultivo, obteniéndose los máximos valores a los 28 días en ambos órganos de *M. truncatula*, y a los 21 días en hojas y a los 28 en nódulos de *L. japonicus*.

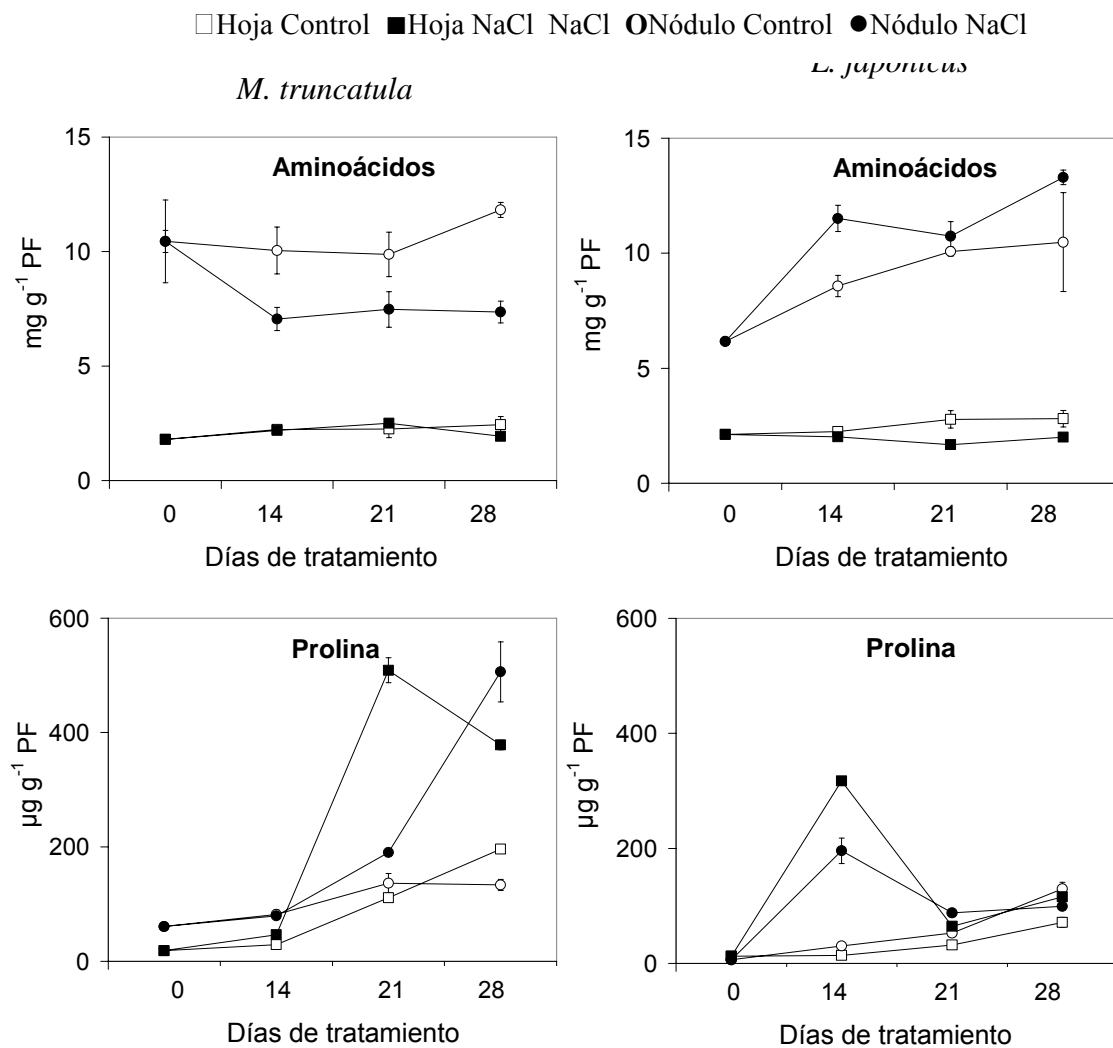


Figura 2.7. Contenido de aminoácidos y prolina en hoja y nódulos de *M. truncatula* y *L. japonicus* inoculadas con *S. meliloti* GR4 y *M. loti* R7A, tratadas con 50 y 100 mM de NaCl a los 14, 21 y 28 días de tratamiento. Cada punto es la media de 3 réplicas \pm SE.

El contenido de prolina respondió a la salinidad con incrementos significativos, aunque variaron según el órgano y la especie. En *M. truncatula* el mayor incremento de la concentración de prolina en respuesta a la salinidad se observó en nódulo a los 28 días, donde se multiplicó por 4 y hoja a los 21 días, donde se multiplicó por 4.6 respecto a los datos obtenidos en el tiempo cero. En *L. japonicus* el efecto de la salinidad se produjo a más corto plazo tanto en hoja como en nódulo, observándose un aumento espectacular de la concentración de prolina a los 14 días, que en hoja fue de 25 veces y en nódulo de 30 veces.

El contenido de prolina en nódulos de *M. truncatula* se correlaciona negativamente con determinadas actividades enzimáticas del metabolismo carbonado (SS, PEPC, MDH e ICDH) (tabla 2.7). Tanto el contenido aminoácidos como el de azúcares se correlacionaron positivamente con el de sacarosa, fructosa y glucosa, y negativamente con las actividades SS e IA en nódulos de *L. japonicus* (tabla 2.8).

2.8. Pigmentos fotosintéticos

En las tablas 2.1 y 2.2 se expone el contenido de pigmentos fotosintéticos, representados por la clorofila a, clorofila b, suma de carotenos y xantofilas, relación clorofila a/clorofila b y pigmentos totales. En las tablas A 2.28 y A 2.29 del apéndice se muestra el análisis de varianza correspondiente a los datos de las tablas 2.1 y 2.2.

El máximo contenido de pigmentos fotosintéticos en *M. truncatula* se registró durante la floración a los 14 días de aplicación del tratamiento salino, momento en el que no se encontraron diferencias significativas entre las plantas control y con sal. A partir de este momento, a los 21 y 28 días, disminuyó el contenido de todos los pigmentos fotosintéticos, acentuándose más este descenso en las plantas con estrés salino, concretamente el descenso fue del 15% en las plantas control y de un 35% en las tratadas con sal al final del cultivo.

Tabla 2.1. Contenido de clorofilas (C) a y b, relación clorofilas a/b, xantofilas y carotenos (X+C), y pigmentos totales (PT), expresados en $\mu\text{g g}^{-1}$ PF de *M. truncatula*

Días	NaCl	Ca	Cb	Ca/b	X+C	PT
0	0	559 ^b	176 ^{bc}	3.17 ^b	112 ^b	847 ^b
14	0	640 ^a	208 ^a	3.08 ^{cb}	122 ^a	970 ^a
	50	667 ^a	213 ^a	3.13 ^b	125 ^a	1005 ^a
21	0	571 ^b	189 ^b	3.02 ^{cb}	96 ^c	856 ^b
	50	480 ^c	160 ^c	3.01 ^c	83 ^d	723 ^c
28	0	535 ^b	172 ^c	3.12 ^b	93 ^c	800 ^b
	50	431 ^d	132 ^d	3.28 ^a	83 ^d	646 ^d
MDS ($P \leq 0.05$)		39	14	0.11	8	58

En *L. japonicus* por el contrario, el nivel máximo de pigmentos fotosintéticos se registró al final del cultivo, momento en el que la salinidad indujo una disminución de su contenido llevándolos a niveles un 30% inferiores a los controles. En los tiempos intermedios de experimentación (14 y 21 días), el efecto de la salinidad a más corto plazo consistió en un aumento de los pigmentos fotosintéticos respecto de los controles. Del contenido total de pigmentos, entre un 60 y un 66% correspondió a la clorofila a y un 20% aproximadamente a la clorofila b, tanto en *L. japonicus* como en *M. truncatula*.

Tabla 2.2. Contenido de clorofilas (C) a y b, relación clorofilas a/b, xantofilas y carotenos (X+C), y pigmentos totales (PT), expresados en $\mu\text{g g}^{-1}$ PF de *L. japonicus*

Días	NaCl	Ca	Cb	Ca/b	X+C	PT
0	0	490 ^c	160 ^{ab}	3.190 ^c	162 ^d	805 ^d
14	0	392 ^e	110 ^d	3.563 ^b	131 ^f	633 ^f
	100	520 ^b	157 ^b	3.303 ^c	171 ^{cd}	848 ^c
21	0	513 ^b	136 ^c	3.517 ^b	176 ^c	836 ^{cd}
	100	635 ^a	160 ^{ab}	3.894 ^a	228 ^a	1009 ^a
28	0	621 ^b	168 ^a	3.608 ^b	194 ^b	968 ^b
	0	419 ^d	116 ^d	3.625 ^b	150 ^e	685 ^e
MDS ($P \leq 0.05$)		11	8	0.249	10	23

Resultados

La relación clorofila a/clorofila b es más alta en *L. japonicus* que en *M. truncatula* independientemente de la edad del cultivo y del tratamiento, mientras que el contenido de pigmentos fotosintéticos (PT) es mayor en *M. truncatula*.

El contenido de pigmentos fotosintéticos en general se correlaciona con el crecimiento de la planta (PSPA, PSR, PSP) en ambas leguminosas (tablas 2.3 y 2.4), siendo esta correlación positiva en *L. japonicus* y negativa en *M. truncatula*.

Tabla 2.3 Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con parámetros de crecimiento (PSPA, PSR, PSP, RPA), fijación de nitrógeno (ANA) plantas de *M. truncatula*

	<i>PSPA</i>	<i>PSR</i>	<i>PSP</i>	<i>RPA</i>	<i>ANA</i>	<i>ANT</i>	<i>TFN</i>	<i>Lb</i>	<i>PSN</i>	<i>PNN</i>	<i>SS</i>
PSPA	1.00										
PSR	0.95	1.00									
PSP	1.00	0.97	1.00								
RPA	0.56	0.77	0.63	1.00							
ANA	-0.50	-0.41	-0.48	-0.37	1.00						
ANT	-0.84	-0.73	-0.82	-0.43	0.79	1.00					
TFN	-0.87	-0.77	-0.85	-0.41	0.66	0.98	1.00				
Lb	-0.71	-0.57	-0.68	-0.18	0.16	0.44	0.48	1.00			
PSN	0.99	0.93	0.98	0.57	-0.50	-0.78	-0.80	-0.78	1.00		
PNN	-0.77	-0.66	-0.75	-0.24	0.48	0.90	0.95	0.34	-0.66	1.00	
SS	-0.70	-0.48	-0.65	0.09	0.44	0.63	0.64	0.55	-0.69	0.61	1.00
IA	-0.62	-0.65	-0.64	-0.63	0.64	0.81	0.80	0.24	-0.57	0.71	0.10
HK	0.06	-0.07	0.03	-0.26	-0.08	0.16	0.22	-0.22	0.15	0.30	-0.56
PEPC	-0.70	-0.61	-0.69	-0.31	0.63	0.64	0.59	0.31	-0.69	0.50	0.84
MDH	-0.56	-0.40	-0.52	-0.08	0.60	0.56	0.50	0.29	-0.55	0.42	0.86
ICDH	-0.40	-0.15	-0.34	0.27	0.29	0.37	0.37	0.56	-0.42	0.31	0.80
TPS	-0.09	-0.02	-0.07	0.18	-0.06	-0.19	-0.21	0.27	-0.19	-0.27	0.25
TPP	-0.27	-0.16	-0.25	0.26	-0.16	-0.07	-0.04	0.29	-0.31	0.01	0.67
TRE	-0.68	-0.61	-0.67	-0.16	0.01	0.30	0.37	0.61	-0.70	0.35	0.77
Ca	-0.70	-0.57	-0.67	-0.13	0.09	0.34	0.39	0.91	-0.77	0.27	0.71
Cb	-0.67	-0.53	-0.64	-0.07	0.07	0.30	0.34	0.84	-0.73	0.25	0.76
Ca/b	0.04	-0.05	0.01	-0.29	0.02	0.10	0.11	0.11	0.03	0.05	-0.58
x+c	-0.83	-0.72	-0.81	-0.33	0.19	0.54	0.60	0.96	-0.87	0.48	0.62
PT	-0.72	-0.59	-0.69	-0.15	0.10	0.36	0.41	0.92	-0.79	0.30	0.72

Tabla 2.4 Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con parámetros de crecimiento (PSPA, PSR, PSP, RPA), fijación de nitrógeno (ANA) plantas de *L. japonicus*

	PSPA	PSR	PSP	RPA	ANA	ANT	TFN	Lb	PSN	PNN	SS
PSPA	1.00										
PSR	0.86	1.00									
PSP	0.96	0.84	1.00								
RPA	-0.15	0.36	-0.14	1.00							
ANA	-0.37	-0.19	-0.38	0.41	1.00						
ANT	0.22	0.07	0.36	-0.22	0.39	1.00					
TFN	0.33	0.13	0.48	-0.33	0.19	0.98	1.00				
Lb	-0.66	-0.19	-0.64	0.84	0.45	-0.34	-0.47	1.00			
PSN	0.76	0.53	0.87	-0.43	-0.60	0.35	0.52	-0.73	1.00		
PNN	0.13	-0.02	0.30	-0.39	-0.67	0.03	0.20	-0.34	0.71	1.00	
SS	-0.47	-0.57	-0.43	-0.17	0.67	0.60	0.48	0.07	-0.45	-0.45	1.00
IA	-0.69	-0.48	-0.65	0.39	0.76	0.16	-0.01	0.61	-0.76	-0.55	0.74
HK	-0.53	-0.54	-0.53	-0.02	0.52	0.27	0.16	0.23	-0.61	-0.56	0.88
PEPC	-0.65	-0.42	-0.61	0.39	0.30	-0.08	-0.17	0.64	-0.68	-0.40	0.51
MDH	-0.61	-0.48	-0.65	0.26	0.55	0.09	-0.04	0.52	-0.79	-0.69	0.76
ICDH	-0.46	-0.38	-0.59	0.13	-0.07	-0.54	-0.57	0.38	-0.68	-0.48	0.19
TPS	0.00	-0.39	-0.11	-0.65	0.19	0.40	0.38	-0.49	-0.11	-0.36	0.65
TPP	0.41	0.10	0.38	-0.49	0.01	0.61	0.64	-0.61	0.24	-0.27	0.51
TRE	-0.65	-0.60	-0.69	0.12	0.77	0.27	0.11	0.42	-0.78	-0.68	0.88
Ca	0.80	0.81	0.83	0.16	0.18	0.54	0.55	-0.36	0.57	-0.03	-0.17
Cb	0.40	0.57	0.51	0.41	0.50	0.70	0.64	0.05	0.29	-0.10	0.13
Ca/b	0.81	0.54	0.67	-0.43	-0.51	-0.18	-0.07	-0.75	0.56	0.10	-0.54
x+c	0.81	0.87	0.79	0.24	0.11	0.28	0.28	-0.30	0.50	-0.07	-0.31
PT	0.76	0.81	0.78	0.22	0.24	0.52	0.51	-0.29	0.51	-0.08	-0.16

Tabla 2.5 Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con parámetros de crecimiento (PSPA, PSR, PSP, RPA), fijación de nitrógeno (ANA (Ast), aminoácidos (Aa), prolina (Pro) y almidón (Alm) en nódulos y con el contenido de pigmentos fotosintéticos (Ca, Cb, Ca/b, X+C, PT) de plantas de *M. truncatula*

	PSPA	PSR	PSP	RPA	ANA	ANT	TFN	Lb	PSN	PNN	Sac
PSPA	1.00										
PSR	0.95	1.00									
PSP	1.00	0.97	1.00								
RPA	0.56	0.77	0.63	1.00							
ANA	-0.50	-0.41	-0.48	-0.37	1.00						
ANT	-0.84	-0.73	-0.82	-0.43	0.79	1.00					
TFN	-0.87	-0.77	-0.85	-0.41	0.66	0.98	1.00				
Lb	-0.71	-0.57	-0.68	-0.18	0.16	0.44	0.48	1.00			
PSN	0.99	0.93	0.98	0.57	-0.50	-0.78	-0.80	-0.78	1.00		
PNN	-0.77	-0.66	-0.75	-0.24	0.48	0.90	0.95	0.34	-0.66	1.00	
Sac	0.10	0.15	0.12	0.15	0.29	-0.14	-0.26	-0.16	0.03	-0.34	1.00
Mal	0.18	0.20	0.18	-0.17	0.67	0.20	0.03	-0.16	0.13	-0.17	0.03
Fru	-0.09	0.03	-0.06	0.07	0.50	0.07	-0.08	0.17	-0.19	-0.26	0.03
Glu	-0.26	-0.19	-0.24	-0.29	0.63	0.31	0.19	0.44	-0.37	-0.09	0.03
Tre	-0.15	-0.01	-0.11	0.18	0.26	0.00	-0.07	0.17	-0.21	-0.16	0.03
Ast	-0.03	0.20	0.03	0.34	0.57	0.17	0.03	0.16	-0.10	-0.11	0.03
Aa	-0.16	0.13	-0.08	0.52	0.51	0.41	0.34	0.23	-0.16	0.33	0.03
Pro	0.59	0.38	0.54	-0.03	-0.47	-0.50	-0.47	-0.63	0.63	-0.36	-0.03
Alm	-0.04	0.08	-0.01	0.05	0.81	0.47	0.33	-0.20	-0.02	0.25	0.03
Ca	-0.70	-0.57	-0.67	-0.13	0.09	0.34	0.39	0.91	-0.77	0.27	-0.03
Cb	-0.67	-0.53	-0.64	-0.07	0.07	0.30	0.34	0.84	-0.73	0.25	0.03
Ca/b	0.04	-0.05	0.01	-0.29	0.02	0.10	0.11	0.11	0.03	0.05	-0.03
x+c	-0.83	-0.72	-0.81	-0.33	0.19	0.54	0.60	0.96	-0.87	0.48	-0.03
PT	-0.72	-0.59	-0.69	-0.15	0.10	0.36	0.41	0.92	-0.79	0.30	-0.03

Tabla 2.6 Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con parámetros de crecimiento (PSPA, PSR, PSP, RPA), fijación de nitrógeno (ANA, TNA, TFN, Lb, PSN, PNN), actividades enzimáticas (SS, IA, HK, PEPC, MDH, ICDH, TPS, TPP, TRE), contenido de carbohidratos

(Sac, Mal, Fru, Glu, Tre), azúcares solubles totales (Ast), aminoácidos (Aa), prolina (Pro) y almidón (Alm) en nódulos y con el contenido de pigmentos fotosintéticos (Ca, Cb, Ca/b, X+C, PT) de plantas de *L. japonicus*

	PSPA	PSR	PSP	RPA	ANA	ANT	TFN	Lb	PSN	PNN	Sac	Mal	Fru	Glu	Tre	Ast	aa	Pro	Alm	Ca	Cb	Ca/b	x+c	PT
PSPA	1.00																							
PSR	0.86	1.00																						
PSP	0.96	0.84	1.00																					
RPA	-0.15	0.36	-0.14	1.00																				
ANA	-0.37	-0.19	-0.38	0.41	1.00																			
ANT	0.22	0.07	0.36	-0.22	0.39	1.00																		
TFN	0.33	0.13	0.48	-0.33	0.19	0.98	1.00																	
Lb	-0.66	-0.19	-0.64	0.84	0.45	-0.34	-0.47	1.00																
PSN	0.76	0.53	0.87	-0.43	-0.60	0.35	0.52	-0.73	1.00															
PNN	0.13	-0.02	0.30	-0.39	-0.67	0.03	0.20	-0.34	0.71	1.00														
Sac	0.68	0.79	0.70	0.24	-0.49	-0.13	-0.01	-0.14	0.65	0.43	1.00													
Mal	0.48	0.64	0.46	0.31	-0.62	-0.48	-0.36	0.04	0.44	0.41	0.92	1.00												
Fru	0.31	0.61	0.29	0.60	-0.18	-0.22	-0.18	0.36	0.15	0.05	0.80	0.81	1.00											
Glu	0.63	0.77	0.63	0.29	-0.53	-0.26	-0.14	-0.07	0.57	0.40	0.99	0.97	0.83	1.00										
Tre	0.59	0.34	0.75	-0.45	-0.19	0.78	0.88	-0.69	0.86	0.52	0.32	-0.01	-0.09	0.19	1.00									
Ast	0.61	0.70	0.69	0.17	-0.55	0.00	0.14	-0.15	0.72	0.56	0.96	0.87	0.78	0.94	0.43	1.00								
aa	0.42	0.33	0.39	-0.19	-0.72	-0.34	-0.18	-0.28	0.56	0.58	0.79	0.82	0.61	0.80	0.16	0.78	1.00							
Pro	0.43	0.51	0.48	0.18	-0.34	0.16	0.26	-0.02	0.50	0.35	0.79	0.67	0.84	0.77	0.36	0.88	0.71	1.00						
Alm	0.29	0.58	0.19	0.61	-0.20	-0.39	-0.37	0.36	-0.13	-0.35	0.46	0.58	0.74	0.54	-0.36	0.41	0.23	0.47	1.00					
Ca	0.80	0.81	0.83	0.16	0.18	0.54	0.55	-0.36	0.57	-0.03	0.55	0.23	0.30	0.46	0.64	0.49	0.08	0.37	0.10	1.00				
Cb	0.40	0.57	0.51	0.41	0.50	0.70	0.64	0.05	0.29	-0.10	0.33	0.01	0.30	0.23	0.54	0.33	-0.21	0.34	0.03	0.85	1.00			
Ca/b	0.81	0.54	0.67	-0.43	-0.51	-0.18	-0.07	-0.75	0.56	0.10	0.47	0.41	0.06	0.46	0.26	0.33	0.51	0.11	0.11	0.42	-0.12	1.00		
x+c	0.81	0.87	0.79	0.24	0.11	0.28	0.28	-0.30	0.50	-0.07	0.63	0.38	0.37	0.56	0.45	0.50	0.17	0.30	0.18	0.95	0.73	0.55	1.00	
PT	0.76	0.81	0.78	0.22	0.24	0.52	0.51	-0.29	0.51	-0.08	0.55	0.23	0.34	0.45	0.58	0.47	0.07	0.36	0.11	1.00	0.87	0.39	0.96	1.00

Valor crítico
 $P \leq$ 0.05 0.01 0.001
0.53 0.66 0.78

Tabla 2.7 Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con las actividades (SS, IA, HK, PEPC, MDH, ICDH, TPS, TPP, TRE), y con el con

	SS	IA	HK	PEPC	MDH	ICDH	TPS	TPP
SS	1.00							
IA	0.10	1.00						
HK	-0.56	0.60	1.00					
PEPC	0.84	0.18	-0.58	1.00				
MDH	0.86	0.02	-0.66	0.95	1.00			
ICDH	0.80	-0.18	-0.60	0.61	0.78	1.00		
TPS	0.25	-0.23	-0.53	0.13	0.04	-0.05	1.00	
TPP	0.67	-0.48	-0.80	0.55	0.53	0.44	0.67	1.00
TRE	0.77	-0.14	-0.59	0.72	0.68	0.66	0.24	0.76
Sac	0.21	-0.24	-0.64	0.33	0.29	-0.05	0.78	0.52
Mal	-0.26	0.36	0.13	-0.05	0.00	-0.10	-0.16	-0.60
Fru	0.36	-0.11	-0.70	0.44	0.44	0.23	0.71	0.44
Glu	0.08	0.40	-0.15	0.14	0.10	0.06	0.39	-0.15
Tre	0.63	-0.48	-0.97	0.71	0.80	0.66	0.41	0.74
Ast	0.52	-0.19	-0.72	0.50	0.64	0.59	0.37	0.36
Aa	0.59	0.13	-0.28	0.29	0.39	0.45	0.36	0.25
Pro	-0.88	0.04	0.69	-0.80	-0.89	-0.94	-0.13	-0.54
Alm	0.17	0.46	0.05	0.23	0.24	-0.01	0.09	-0.24

Tabla 2.8 Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con las actividades (SS, IA, HK, PEPC, MDH, ICDH, TPS, TPP, TRE), y con el con

	SS	IA	HK	PEPC	MDH	ICDH	TPS	TPP
SS	1.00							
IA	0.74	1.00						

HK	0.88	0.83	1.00						
PEPC	0.51	0.79	0.80	1.00					
MDH	0.76	0.81	0.90	0.87	1.00				
ICDH	0.19	0.37	0.57	0.73	0.70	1.00			
TPS	0.65	0.06	0.49	-0.03	0.37	0.18	1.00		
TPP	0.51	-0.04	0.44	0.02	0.27	0.07	0.78	1.00	
TRE	0.88	0.80	0.84	0.62	0.90	0.42	0.54	0.25	1.00
Sac	-0.84	-0.77	-0.90	-0.60	-0.75	-0.49	-0.55	-0.25	-0.25
Mal	-0.95	-0.72	-0.86	-0.42	-0.65	-0.18	-0.66	-0.45	-0.45
Fru	-0.61	-0.42	-0.61	-0.19	-0.25	-0.12	-0.51	-0.32	-0.32
Glu	-0.89	-0.76	-0.89	-0.54	-0.70	-0.37	-0.59	-0.31	-0.31
Tre	0.05	-0.40	-0.24	-0.49	-0.48	-0.75	0.16	0.49	0.49
Ast	-0.75	-0.75	-0.83	-0.51	-0.69	-0.49	-0.52	-0.18	-0.18
Aa	-0.80	-0.92	-0.88	-0.66	-0.73	-0.28	-0.24	-0.25	-0.25
Pro	-0.45	-0.61	-0.60	-0.34	-0.36	-0.34	-0.23	0.00	0.00
Alm	-0.42	-0.15	-0.14	0.25	0.16	0.44	-0.32	-0.01	-0.01

3. Influencia de la validamicina A en la simbiosis *M. truncatula*-*S. meliloti* y *L. japonicus*-*M. loti* en condiciones de salinidad

De nuevo se utilizaron las simbiosis de *M. truncatula* y *L. japonicus* inoculadas con *S. meliloti* GR4 y *M. loti* R7A respectivamente, en las que se adicionó exógenamente validamicina A, inhibidor de la trehalasa, para provocar la acumulación de trehalosa. Se pretende observar como afecta la validamicina A a las simbiosis y su implicación tanto en la acumulación de trehalosa como en el resto de procesos fisiológicos del nódulo en condiciones de estrés salino.

Los tratamientos fueron: **1)** Control, **2)** 30 μ M de validamicina A, **3)** 50 mM de NaCl y **4)** 30 μ M de validamicina más 50 mM de NaCl. La validamicina A y el NaCl y se adicionaron a la solución nutritiva al inicio del cultivo. La recolección se llevó a cabo al inicio de la floración en ambas simbiosis: en *M. truncatula* (6 semanas) y en *L. japonicus* (8 semanas).

3.1. Análisis de crecimiento

En la figura 3.1 se muestran los parámetros relacionados con el crecimiento de la planta representados por peso seco de parte aérea, peso seco de raíz, peso seco de planta y relación raíz/parte aérea, en los diferentes tratamientos.

La validamicina A no afecta significativamente al crecimiento de *M. truncatula*, aunque provoca un aumento del desarrollo radical (30%) que implica que la RPA alcance un valor de 0.51, frente a 0.37 obtenido en plantas control. Por el contrario en *L. japonicus* todos los parámetros de crecimiento estudiados experimentaron un ligero descenso con la validamicina A, que fue del 15% y 20% en el PSPA y PSP respectivamente y del 25% en PSR.

En general, de nuevo se observa que estos parámetros se afectaron negativamente por la salinidad, aunque el efecto es menor en plantas tratadas con validamicina A, ya que la disminución de los parámetros mencionados fue entre el 60-75% en *M. truncatula* y el 25-40% en *L. japonicus* sin validamicina A, mientras que en las plantas con validamicina A, estos porcentajes se redujeron a 45-60% en *M. truncatula* y 10-20% en *L. japonicus*.

Resultados

En el análisis de varianza que se muestra en la tabla A 3.2 (*M. truncatula*) del apéndice, se aprecia que la variabilidad observada en los datos numéricos (PSPA, PSR y PSP) se debe en un 80-85% al tratamiento salino.

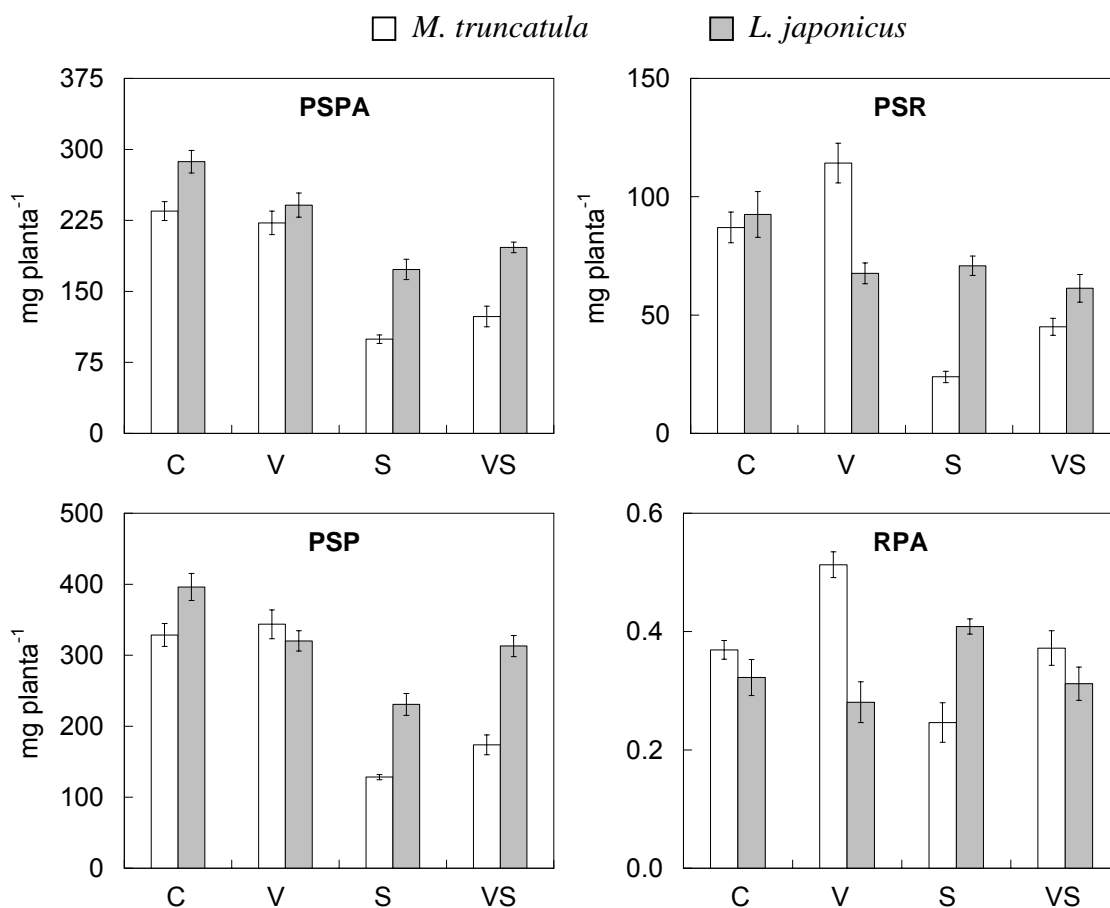


Figura 3.1. Peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de raíz (PSR), peso seco de planta (PSP) y relación raíz/parte aérea (RPA) de *M. truncatula* y *L. japonicus* inoculadas con *S. meliloti* GR4 y *M. loti* R7A control (C), tratadas con 30 μM Val A (V), 50 mM de NaCl (S) y con 30 μM Val A más 50 mM NaCl (VS). Cada barra es la media de 10 réplicas \pm SE.

La relación raíz/parte aérea en *L. japonicus* no varió significativamente con la validamicina A ni con el NaCl, tal como se describió en el experimento 1, sin embargo, el tratamiento conjunto provocó una reducción de la relación RPA del 30%. En *M. truncatula* se observa que la salinidad provocó una disminución de esta en torno al 30%, tanto en las plantas con y sin validamicina A.

3.2. Fijación de nitrógeno

El proceso de fijación de nitrógeno se ha estudiado a través de los parámetros que se recopilan en el diagrama de barras de la figura 3.2, en los que se incluyen los descritos en experimentos anteriores. Los datos numéricos se encuentran en las tablas del apéndice A 3.5 (*M. truncatula*) y A. 3.7 (*L. japonicus*).

En general, en los tres parámetros relacionados con la actividad nitrogenasa nodular se asume que la validamicina A no altera significativamente los valores obtenidos respecto al control en ambas leguminosas, excepto en la TFN donde en nódulos de *L. japonicus* se observa una disminución (20%), mientras que en los de *M. truncatula* un incremento (15%).

La ANA en nódulos de *M. truncatula*, mostró diferencias por efecto de la salinidad dependiendo de la presencia o no de validamicina A, de forma que cuando ésta no estaba presente, se produjo una disminución del 55%, mientras que con validamicina A, esta diferencia solo fue del 25%. En *L. japonicus* se detectó una inhibición de la ANA por la salinidad del 45% independientemente de la presencia de validamicina A. En ambas especies existe una correlación positiva y significativa ($P \leq 0.01$) de ANA con el PSPA y PSR (tablas 3.3 y 3.4).

En cuanto a la ANT en nódulos de *M. truncatula* no se afectó por la salinidad, aunque el tratamiento conjunto con sal y validamicina A redujo la actividad en un 25%. En nódulos de *L. japonicus* se produce una disminución por la validamicina A (10%) y por la salinidad (15%), sumándose el efecto de ambos en el tratamiento conjunto con una disminución del 25%.

La TFN presenta comportamientos diferentes en respuesta a la validamicina A y la sal en las dos especies, la interacción entre salinidad y validamicina A, condiciona que en *M. truncatula* el efecto de la salinidad sobre la TFN sea distinto: sin validamicina A aumenta un 18% y con validamicina se reduce un 13%, en *L. japonicus* la validamicina A aumenta el efecto negativo de la sal sobre la TFN, pasando la reducción del 28% al 31%.

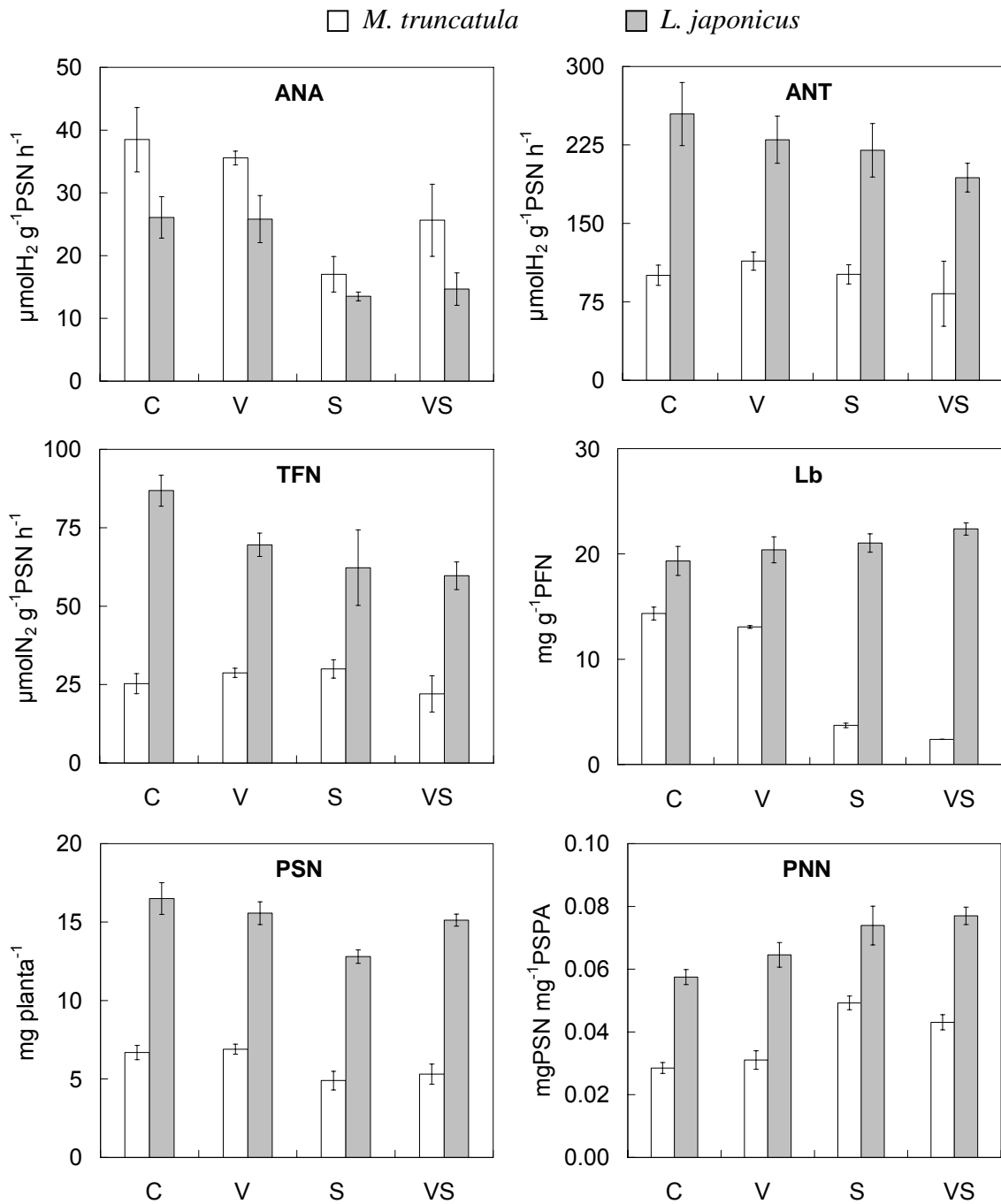


Figura 3.2. Actividad nitrogenasa aparente (ANA), actividad nitrogenasa total (ANT), tasa de fijación de nitrógeno (TFN), contenido de leghemoglobina (Lb), peso seco de nódulos (PSN) y peso normalizado de nódulos (PNN) de *M. truncatula* y *L. japonicus* inoculadas con *S. meliloti* GR4 y *M. loti* R7A control (C), tratadas con 30 μM Val A (V), 50 mM de NaCl (S) y con 30 μM Val A más 50 mM NaCl (VS). Cada barra es la media de 10 réplicas \pm SE.

El contenido de leghemoglobina no se vio afectado de forma significativa por la validamicina A en nódulos de *L. japonicus*, mencionar que en nódulos de *M. truncatula* provocó un descenso del 10%. La salinidad sí tuvo una mayor incidencia, pues en nódulos de *M. truncatula* disminuyó un 80% tanto en presencia o ausencia de validamicina A. Se ha observado que el contenido de Lb en nódulos de *M. truncatula*, mantiene una correlación positiva y significativa ($P \leq 0.01$) con los parámetros relacionados con la fijación de nitrógeno, como ANA y PSN, y con los de crecimiento (tabla 3.4).

La validamicina A no altera significativamente el PSN ni en *M. truncatula* ni en *L. japonicus*, aunque si se observa que induce un aumento del PNN (10-15%) en ambas especies. La interacción con la sal contribuye a reducir su efecto negativo ya que en *M. truncatula*, la reducción del PSN por la salinidad pasa del 27% al 20% con validamicina A, y en *L. japonicus* del 20% al 7%. Resultados similares se pueden describir para el PNN.

3.3. Metabolismo carbonado

Se estudiaron las actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo carbonado nodular comentadas en experimentos anteriores. Estas actividades se expresan por mg de proteína y se exponen en el diagrama de barras de la figura 3.3. Los datos numéricos se encuentran en las tablas A 3.9 (*M. truncatula*) y A 3.11 (*L. japonicus*) del apéndice, donde también se muestran los datos de estas actividades expresados por g PF junto al análisis de varianza correspondiente (tablas A 3.35 a A 3.42).

En nódulos de *M. truncatula*, la actividad **sacarosa sintasa** no se vio afectada por el tratamiento con validamicina A, no obstante, la interacción entre NaCl y validamicina A favoreció que se acentuara el efecto negativo de la sal, ya que la disminución de actividad fue del 75% en las plantas con validamicina A, frente al 60% sin validamicina A. En nódulos de *L. japonicus*, la validamicina A afectó a la actividad sintasa, provocando una disminución del 30% (frente al 45% que provocó la salinidad), la interacción entre ambos factores no atenuó el efecto de la salinidad.

La actividad **invertasa alcalina** en nódulos de *M. truncatula* tuvo un comportamiento similar al de la sintasa, no obstante, la validamicina A redujo un 5% (estadísticamente significativo) esta actividad, que se inhibió en respuesta a la salinidad un 50%. En nódulos de *L. japonicus* la IA mostró una ligera inhibición con la validamicina A, que no superó el 10%, mientras que el efecto de la salinidad fue mayor, con una reducción del 65% de la actividad con o sin validamicina A. Tanto SS como IA nodular mostraron una actividad mayor en nódulos de *L. japonicus* que en los de *M. truncatula* como se observó en el experimento 1, además, existe una correlación significativa ($P \leq 0.01$) entre ambas actividades, así como con los parámetros relacionados con el crecimiento de la planta y la de fijación de nitrógeno (tablas 3.3 y 3.4). El análisis de varianza de estas dos actividades enzimáticas, mostró que en ambos casos la variabilidad observada fue debida en más de un 96% al tratamiento salino (tabla A 3.10 y A 3.12).

En relación con la actividad **hexoquinasa**, se observó que: **a)** en nódulos de *M. truncatula* la validamicina A y la salinidad la redujeron un 5% y 7%, mientras que con el tratamiento conjunto se logra superar esta inhibición provocada por ambos compuestos aumentando un 15% la actividad, **b)** en nódulos de *L. japonicus* la validamicina A provocó un aumento de la actividad del 15%, y favoreció que en condiciones salinas ésta no se modificara, puesto que en ausencia de validamicina A y en presencia de NaCl se produjo una reducción del 10%. La actividad hexoquinasa fue más activa en nódulos de *L. japonicus* que en los de *M. truncatula*.

La validamicina A inhibió la actividad **fosfoenolpiruvato carboxilasa** de ambas especies, ya que como se observa en nódulos de *M. truncatula*, disminuyó un 33%, y en los de *L. japonicus* un 15%. El efecto de la salinidad, tal como se observó en el experimento 1, fue más evidente en nódulos de *M. truncatula*, en los cuales decreció el 50% frente al 25% de reducción que se detectó en los de *L. japonicus*, la acción conjunta de validamicina A y NaCl intensificó la inhibición de esta actividad enzimática en nódulos de *M. truncatula* que llegó a ser del 75%. Esta actividad, tanto en nódulos de *M. truncatula* como en los de *L. japonicus*, muestra correlación positiva y significativa ($P \leq 0.01$) con parámetros de crecimiento (PSP, PSPA y PSR), fijación de nitrógeno (ANA, ANT, Lb y PSN) y con las actividades SS e IA nodular, tal como se aprecia en las tablas 3.3 y 3.4.

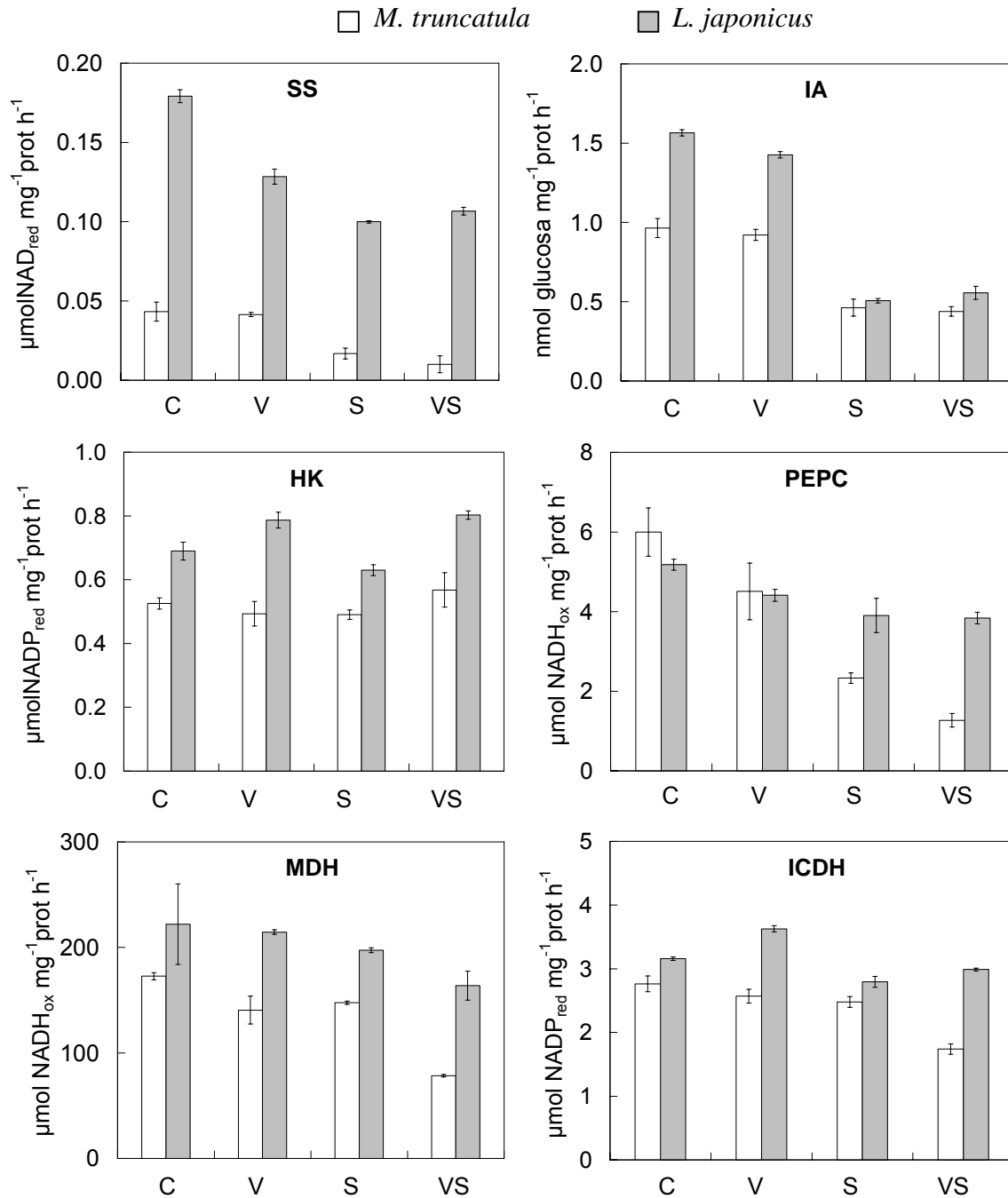


Figura 3.3. Actividad sacarosa sintasa (SS), invertasa alcalina (IA), hexoquinasa (HK), fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), malato deshidrogenasa (MDH) e isocitrato deshidrogenasa (ICDH) en nódulos de *M. truncatula* y *L. japonicus* inoculadas con *S. meliloti* GR4 y *M. loti* R7A control (C), tratadas con 30 μ M Val A (V), 50 mM de NaCl (S) y con 30 μ M Val A más 50 mM NaCl (VS). Cada barra es la media de 4 réplicas \pm SE.

La máxima actividad **malato deshidrogenasa** e **isocitrato deshidrogenasa** en nódulos de *M. truncatula* se detecta en nódulos control, por lo que se deduce que la validamicina A y la sal afectan negativamente a estas actividades, en concreto la MDH nodular se reduce el 20% por efecto de la validamicina A y el 15% por el de la sal, mientras que la ICDH nodular disminuyó un 10% por efecto de ambos tratamientos. Cuando se aplicó validamicina A y NaCl conjuntamente, se potenció el efecto que tenían por separado, provocando una inhibición de ambas enzimas, que en el caso de la MDH fue del 55% y en el de la ICDH del 37%. En nódulos de *L. japonicus*, la validamicina A no afectó a la actividad MDH e incrementó la ICDH el 15%, la interacción entre los dos tratamientos compensó el efecto de cada uno de ellos por separado.

En resumen se puede asumir que: **a)** las actividades enzimáticas son mayores en nódulos de *L. japonicus* que en los de *M. truncatula*, **b)** la validamicina A inhibe cada uno de las enzimas del metabolismo carbonado en ambas especies excepto a las que hidrolizan la sacarosa (SS e IA) en *M. truncatula* y a la MDH e ICDH en *L. japonicus*, **c)** en condiciones de salinidad la validamicina A no modifica las actividades del metabolismo carbonado en *L. japonicus* excepto la MDH, mientras que en *M. truncatula* provoca una inhibición del 50% en todas ellas excepto en la IA y HK.

3.4. Metabolismo de la trehalosa

Las actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo de la trehalosa se muestran en la figura 3.4 y en las tablas del apéndice A 3.13 (*M. truncatula*) y A 3.15 (*L. japonicus*).

En nódulos control, la actividad trehalosa-6 fosfato sintasa fue 3 veces más activa en nódulos de *M. truncatula* que en los de *L. japonicus*, observándose esta misma tendencia en los experimentos 1 y 2. La actividad trehalosa-6 fosfato sintasa apenas se afectó por la validamicina A en ambas simbiosis, sin embargo, la salinidad provocó una disminución de ésta del 50% en nódulos de *M. truncatula* y del 20% en los de *L. japonicus*.. Tanto en nódulos de *L. japonicus* como en los de *M. truncatula*, la actividad TPS se correlacionó con las actividades SS e IA, con el PSPA y con algunos parámetros relacionados con el proceso de fijación de nitrógeno (ANA, PSN, Lb y PNN) (tablas 3.3 y 3.4).

La actividad trehalosa-6 fosfato fosfatasa decreció un 50% en nódulos de *M. truncatula* por efecto de la validamicina A, mientras que el efecto de la salinidad fue menor, con un 20% de disminución, tanto si se encontraba presente o no la validamicina A, sin embargo, en nódulos de *L. japonicus* no varió con la validamicina A, mostrando una alta correlación con la actividad TPS ($r=0.95$).

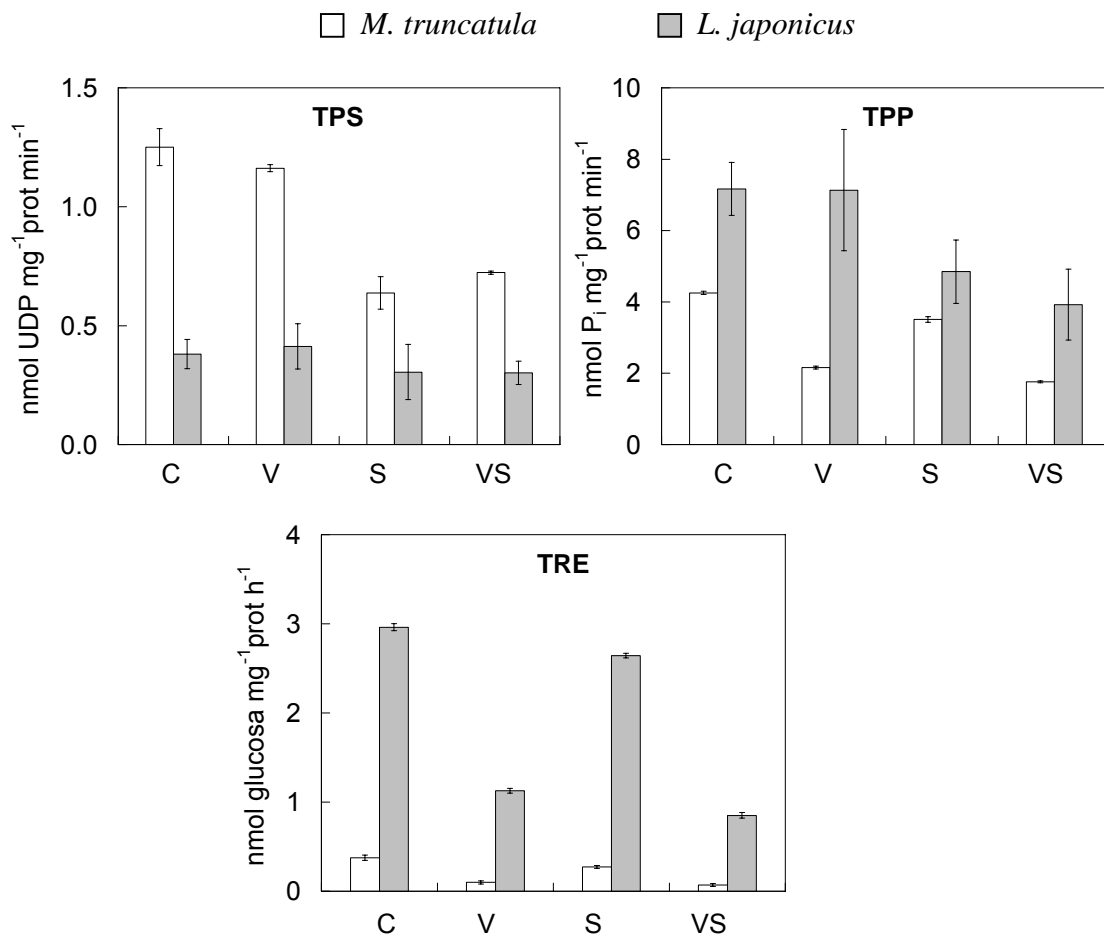


Figura 3.4. Actividad trehalosa-6 fosfato sintasa (TPS), trehalosa-6 fosfato fosfatasa (TPP) y trehalasa (TRE) en nódulos de *M. truncatula* y *L. japonicus* inoculadas con *S. meliloti* GR4 y *M. loti* R7A control (C), tratadas con 30 μ M Val A (V), 50 mM de NaCl (S) y con 30 μ M Val A más 50 mM NaCl (VS). Cada barra es la media de 4 réplicas \pm SE.

La mayor repercusión de la validamicina A se produjo en la actividad trehalasa de nódulos de *M. truncatula* y *L. japonicus*, donde se detectó una inhibición del 75% y 60% respectivamente. La salinidad también afectó negativamente a esta actividad, que se redujo un 25% en nódulos de *M. truncatula* y un 10% en los de *L. japonicus*. Cuando se aplicó validamicina A y NaCl simultáneamente, se sumaron sus efectos negativos, resultando una inhibición mayor de la actividad, que fue del 80% en nódulos de *M. truncatula* y del 70% en los de *L. japonicus*. Es destacable que la trehalasa es entre 8 y 12 veces más activa en nódulos de *L. japonicus* que los de *M. truncatula*, independientemente del tratamiento. El análisis de varianza de los datos de actividad trehalasa, mostró como la variación de ésta se debió en más del 90% al efecto de la validamicina A en las dos especies (tabla A 3.14 y A 3.16).

3.5. Contenido de carbohidratos

En la figura 3.5 se muestran los resultados correspondientes al análisis de algunos carbohidratos (sacarosa, fructosa, glucosa, trehalosa) en hoja, raíz y nódulo de *L. japonicus* y *M. truncatula*, que se expresaron en $\mu\text{g g}^{-1}\text{PF}$ y de azúcares solubles totales y almidón que se expresaron como $\text{mg glucosa g}^{-1}\text{PF}$. Los datos numéricos se pueden encontrar para *M. truncatula* en las tablas A 3.17 (hoja), A 3.19 (raíz) y A 3.21 (nódulo) y para *L. japonicus* A 3.23 (hoja), A 3.25 (raíz) y A 3.27 (nódulo), todos ellos precedidos por los correspondientes estudios de la varianza, en el apartado 3 del apéndice.

En *M. truncatula*, el contenido de **sacarosa** en hoja, raíz y nódulo respondió de igual forma al tratamiento con validamicina A y sal. Como se observa en la figura 3.5, la validamicina A indujo una disminución de la sacarosa de alrededor del 50% en todos los órganos de la planta estudiados, mientras que el contenido de sacarosa se incrementó en respuesta a la salinidad un 75% en nódulo y hoja, y un 55% en raíz. El tratamiento doble tuvo un efecto positivo en hoja, puesto que el contenido de sacarosa se multiplicó por 2.5 respecto del control. Este parámetro presenta una correlación significativa ($P \leq 0.01$) y positiva con los parámetros de crecimiento (tabla 3.3) y el contenido de pigmentos fotosintéticos (tabla 3.5).

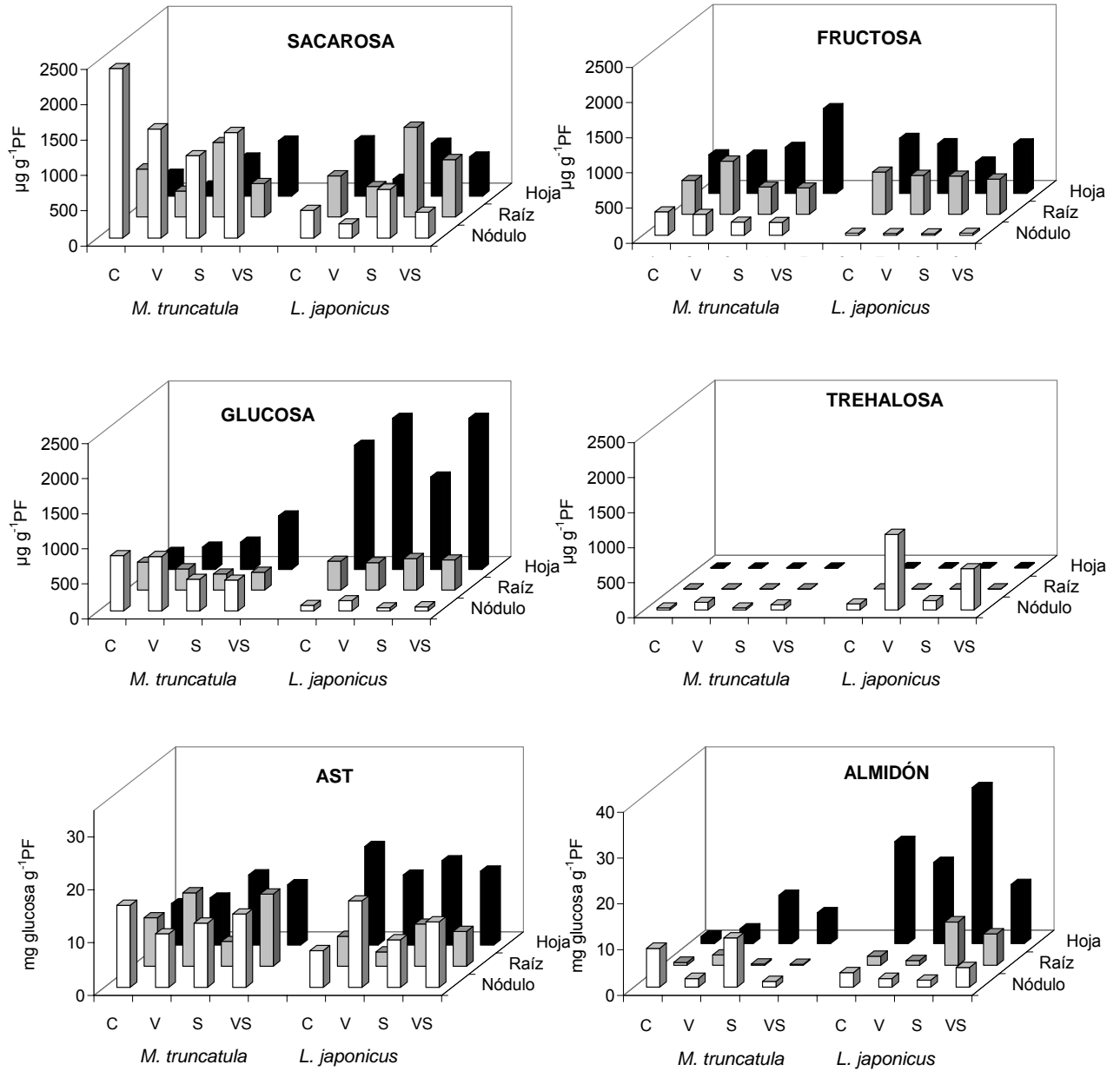


Figura 3.5. Contenido de sacarosa, fructosa, glucosa, trehalosa, azúcares solubles totales (Ast) y almidón en hoja, raíz y nódulo de *M. truncatula* y *L. japonicus* inoculadas con *S. meliloti* GR4 y *M. loti* R7A control (C), tratadas con 30 μM Val A (V), 50 mM de NaCl (S) y con 30 μM Val A más 50 mM NaCl (VS). Cada barra es la media de 3 réplicas.

El mayor contenido de **sacarosa** en *L. japonicus* se detecta en nódulos, donde superó en 3 y 4 veces el de hoja y raíz respectivamente, y entre 2 y 8 veces el de nódulos de *M. truncatula* según el tratamiento. La validamicina A afectó de igual manera a los diferentes órganos de *L. japonicus*, en los que se observó una disminución que fue del 35% en nódulo, el 70% en hoja y el 25% en raíz. La salinidad afectó de forma desigual al contenido de sacarosa en *L. japonicus*: en nódulos se redujo un 50%, mientras que en hoja no se produjeron variaciones significativas y en raíz se incrementó la concentración más del doble. En el tratamiento doble, el NaCl contrarrestó el efecto negativo de la validamicina A en nódulo y hoja. La correlación entre el contenido de sacarosa y las actividades SS e IA en nódulos de *L. japonicus* fueron significativas ($P \leq 0.01$) ($r=0.97$ y $r=0.78$ respectivamente) (tabla 3.4).

El contenido de **fructosa** en **nódulos** solo varió significativamente con la validamicina A en *L. japonicus*, donde decreció un 30%, y compensó el efecto de la salinidad, manteniendo valores similares al control en el tratamiento conjunto de sal y validamicina A, ya que la salinidad aumentó el nivel de fructosa en estos nódulos un 35%, mientras que lo disminuyó en los de *M. truncatula* un 45%. En **raíz** de *M. truncatula* se incrementó el contenido de fructosa un 56% con la validamicina A y disminuyó un 20% con 50 mM NaCl, tanto en presencia como en ausencia de validamicina A. La validamicina A no conllevó variación en este carbohidrato en **hojas** de ambas especies, aunque la interacción de ésta con la sal provocó en *M. truncatula* un aumento de más del doble, y en *L. japonicus* revirtió el efecto negativo de la salinidad. El mayor contenido de fructosa se detectó en hojas en una relación 2 y 4 veces superior a nódulos en *L. japonicus* y *M. truncatula* respectivamente.

El contenido de **glucosa** en **nódulos** de *M. truncatula* no sufrió variación por efecto de la validamicina A, aunque como consecuencia de la salinidad decreció un 40%, efecto que se mantuvo incluso con el tratamiento doble. En este órgano se acumuló casi el doble de glucosa de la detectada en raíz y triplicó el contenido de hoja, tanto en el control como con validamicina A, no evidenciándose este hecho en los tratamientos con sal. En **hoja** de *M. truncatula* se observa que la validamicina A provoca un incremento del 30% de glucosa y la sal del 60%, sumándose el efecto de ambos tratamientos, que triplicaron al contenido del control. En **nódulos** de *L. japonicus*, la validamicina A provocó un aumento del 85% en el

contenido de glucosa y contrarrestó el efecto negativo de la salinidad, reduciendo a la mitad la disminución provocada por la salinidad cuando se aplicaron conjuntamente. En **hojas** de *L. japonicus* la validamicina A aumentó un 22% el nivel de glucosa, independientemente de la salinidad, que la hizo decrecer en un 25%. La cantidad de glucosa en *L. japonicus* fue 4 veces superior en hoja respecto a raíz, y 22 veces respecto a nódulos. El contenido de fructosa y glucosa en nódulos de *M. truncatula* se correlacionó positiva y significativamente ($P \leq 0.01$) con las actividades SS e IA, así como con el crecimiento de la planta (tabla 3.3).

Sin duda, el azúcar que experimentó una mayor variación es respuesta a la validamicina A fue la **trehalosa** en el **nódulo**, que en *L. japonicus* se multiplicó por 13 y en *M. truncatula* por 3.7. En condiciones de salinidad, sin embargo el aumento de la concentración de trehalosa por efecto de la validamicina A fue algo menor: 7 veces en *L. japonicus* y 2.5 veces en *M. truncatula*. La salinidad incrementó el contenido de trehalosa en nódulos de *L. japonicus* un 55%, y no provocó variaciones en los de *M. truncatula*. En **hoja** y **raíz** de *M. truncatula* la interacción entre validamicina A y sal conllevó un incremento del contenido de trehalosa del 13% y 22% respectivamente. En raíz de *L. japonicus* se observó un incremento de la trehalosa del 85% y del 70% inducido por la validamicina A y la sal respectivamente.

Un aspecto destacable fue que la trehalosa prioritariamente se encuentra en el nódulo, puesto que en hoja y raíz se detectan cantidades que en *L. japonicus* fueron 8.5 y 40 y en *M. truncatula* 8.5 y 9.2 veces menor respectivamente, en relación al contenido nodular. El contenido de trehalosa se correlaciona negativamente con la actividad trehalasa ($r = -0.85$) en ambas especies (tablas 3.3 *M. truncatula* y 3.4 *L. japonicus*).

Se establece que en condiciones de salinidad, la validamicina A provoca un efecto distinto dependiendo del órgano, así en hoja favorece la acumulación de sacarosa, fructosa, glucosa y trehalosa en ambas especies, mientras que en raíz se mantienen valores similares excepto para la sacarosa, que disminuye tanto en *M. truncatula* como en *L. japonicus*, en nódulo se observan efectos diferentes dependiendo de la especie y del carbohidrato.

El contenido de **azúcares solubles totales** en *M. truncatula* fue 2 y 1.7 mayor en nódulo que en hoja y raíz respectivamente, la validamicina A aumentó el contenido de azúcares en raíz (98%), y en hoja (14%), disminuyendo un 33% en nódulo. La salinidad en nódulo y raíz produjo una reducción del 20% y el 50% respectivamente, mientras que en hoja se incrementó un 70%, el doble tratamiento supuso que la reducción en el contenido de Ast en nódulo y raíz por la salinidad no fuera tan drástica.

En *L. japonicus* el contenido de **azúcares solubles totales** fue 2.7 y 3.3 veces superior en hoja que en nódulo y raíz respectivamente, no obstante se observaron comportamientos distintos con la validamicina A y el tratamiento salino: **a)** en **hoja** este parámetro disminuyó un 30% y un 15% por efecto de la validamicina A y la salinidad respectivamente; **b)** en **nódulo** aumentó un 135% y un 30% por efecto de la validamicina A y la salinidad respectivamente; y **c)** en **raíz** la validamicina A provocó un descenso del 50% del contenido de azúcares solubles mientras que la salinidad la aumentó un 40%.

El contenido de **almidón** en *M. truncatula* fue 13 veces mayor en nódulos que en raíz y 5 veces que en hojas, la validamicina A afectó de forma diferente a este parámetro en nódulos que en hojas y raíz, ya que se multiplicó por 2 y 3.5 respectivamente, mientras que en nódulos se dividió por 4.5. El efecto más visible de la salinidad se detectó en hojas, puesto que se multiplicó por 6.5. El contenido de almidón en *L. japonicus* fue mayor en hoja, mostrando una relación 7 y 11 veces mayor a la detectada en nódulo y raíz, la validamicina A en todos los órganos estudiados provocó una disminución, más evidente en nódulos y raíz que en hojas. La salinidad provocó un aumento de este parámetro tanto en hoja como en raíz, donde se multiplicó por 4.7, mientras que en nódulos disminuyó el 40%. El tratamiento conjunto (val A+NaCl) condujo a una reducción de este compuesto mayor que la obtenida en los tratamientos simples en nódulo y hoja.

En conjunto, la validamicina A disminuyó el efecto negativo de la salinidad sobre el contenido de azúcares solubles y almidón en hoja de las dos especies, mientras que en raíz de *M. truncatula*, la validamicina A indujo un aumento de ambos parámetros y tuvo el efecto contrario en la de *L. japonicus*.

3.6. Eficiencia fotosintética

La eficiencia fotosintética estudiada mediante los parámetros de fluorescencia emitida por los centros de reacción del fotosistema II se muestran en la figura 3.6. La fluorescencia inicial (F_0) se observa que experimentó variaciones opuestas en las dos especies por efecto de la salinidad: en *M. truncatula* aumentó un 17% mientras que en *L. japonicus* decreció un 25%, sin embargo, la fluorescencia máxima (F_m) solo mostró un efecto de la sal en *L. japonicus* similar al de la F_0 .

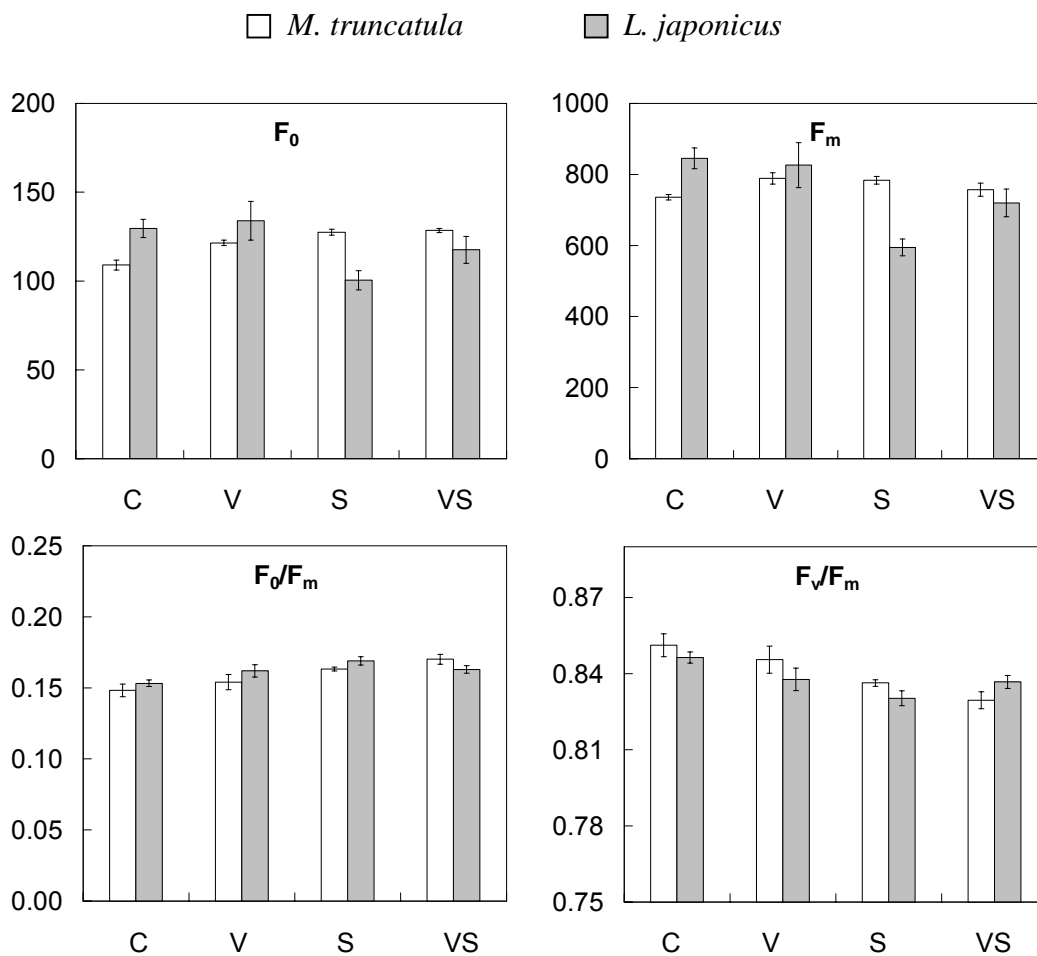


Figura 3.6. Fluorescencia inicial (F_0), fluorescencia máxima (F_m), relación F_0/F_m y relación F_v/F_m en unidades relativas de *M. truncatula* y *L. japonicus* inoculadas con *S. meliloti* GR4 y *M. loti* R7A control (C), tratadas con 30 μ M Val A (V), 50 mM de NaCl (S) y con 30 μ M Val A más 50 mM NaCl (VS). Cada barra es la media de 10 réplicas + SE.

La eficiencia fotoquímica del fotosistema II, expresada por el coeficiente F_v/F_m , también representada en la figura 3.6 solo decreció un 2% en ambas especies. La validamicina A no provocó diferencias significativas en la relación F_v/F_m por lo que no afectaría al proceso fotosintético de la planta. El índice F_0/F_m se incrementó un 10% en *M. truncatula* por efecto de la salinidad no mostrando variaciones significativas por la presencia de validamicina A en el medio, sin embargo en *L. japonicus* la presencia de validamicina A hizo que este índice no se modificara en condiciones de estrés salino.

En la tabla 3.5 (*M. truncatula*) y 3.6 (*L. japonicus*) se observan correlaciones significativas ($P \leq 0.01$) entre F_v/F_m y F_0/F_m y el contenido de pigmentos, parámetros crecimiento (PSPA, PSP y PSR), y de fijación de nitrógeno (ANA, Lb, PSN y PNN).

3.7. Pigmentos fotosintéticos

En las tablas 3.1 y 3.2 se expone el contenido de pigmentos fotosintéticos, representados por la clorofila a, clorofila b, suma de carotenos y xantofilas, relación clorofila a/clorofila b y pigmentos totales.

El efecto de la validamicina A sobre el contenido de pigmentos fotosintéticos fue diferente en cada una de las especies: en *L. japonicus* aumentó un 8% y 14% el contenido de clorofila a y clorofila b, mientras que en *M. truncatula* decrecieron un 14% y 11% respectivamente. Los porcentajes calculados para la clorofila a se mantienen en pigmentos totales en ambas leguminosas.

Tabla 3.1. Contenido de clorofilas (C) a y b, relación clorofilas a/b, xantofilas y carotenos (X+C), y pigmentos totales (PT), expresados en $\mu\text{g g}^{-1}$ PF, en plantas de *M. truncatula*

NaCl(mM)	Val A(μM)	Ca	Cb	Ca/b	X+C	PT
0	0	702 ^a	258 ^a	2.72 ^a	130 ^a	1090 ^a
	30	609 ^b	229 ^b	2.66 ^b	109 ^b	946 ^b
50	0	338 ^d	141 ^d	2.40 ^d	49 ^d	528 ^d
	30	521 ^c	201 ^c	2.60 ^c	95 ^c	817 ^c
MDS ($P \leq 0.05$)		4	2	0.03	3	7

La salinidad tuvo una mayor incidencia en el contenido de pigmentos de *M. truncatula* con una reducción de aproximadamente el 50%, mientras que en *L. japonicus* esta solo fue del 15%. El doble tratamiento con sal y validamicina A, inhibió el efecto negativo de la salinidad en *M. truncatula*, donde se observó un contenido de clorofila y pigmentos totales aproximadamente un 50% mayor respecto de las plantas con sal; en *L. japonicus* sin embargo, la validamicina A potenció el efecto negativo de la sal, aumentando en un 12% aproximadamente la diferencia respecto de las plantas control.

Tabla 3.2. Contenido de clorofilas (C) a y b, relación clorofilas a/b, xantofilas y carotenos (X+C), y pigmentos totales (PT), expresados en $\mu\text{g g}^{-1}$ PF, en plantas de *L. japonicus*

NaCl	Val A(μM)	Ca	Cb	Ca/b	X+C	PT
0	0	1256 ^b	393 ^b	3.206 ^a	466 ^a	2116 ^b
	30	1359 ^a	450 ^a	3.021 ^b	475 ^a	2284 ^a
50	0	1038 ^c	354 ^c	2.943 ^b	383 ^b	1775 ^c
	30	876 ^d	327 ^d	2.682 ^c	371 ^b	1574 ^d
MDS ($P \leq 0.05$)		21	15	0.169	12	24

Las diferencias encontradas entre el contenido de pigmentos en ambas leguminosas oscila entre 1.5 y 2 veces, correspondiendo el contenido mayor a *L. japonicus*, en condiciones de salinidad esta diferencia aumentó llegando a ser entre 2.5 y 3 veces mayor el contenido de pigmentos en *L. japonicus* respecto a *M. truncatula*.

Tabla 3.3 Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con el crecimiento (PSPA, PSR, PSP, RPA), fijación del nitrógeno (ANA, ANT, TFN, Lb, PSN, PNN, SS, IA)

	<i>PSPA</i>	<i>PSR</i>	<i>PSP</i>	<i>RPA</i>	<i>ANA</i>	<i>ANT</i>	<i>TFN</i>	<i>Lb</i>	<i>PSN</i>	<i>PNN</i>	<i>SS</i>	<i>IA</i>
PSPA	1.00											
PSR	0.94	1.00										
PSP	0.99	0.97	1.00									
RPA	0.72	0.90	0.80	1.00								
ANA	0.97	0.91	0.96	0.75	1.00							
ANT	0.56	0.63	0.59	0.43	0.37	1.00						
TFN	0.00	0.06	0.02	-0.11	-0.23	0.81	1.00					
Lb	0.97	0.89	0.96	0.61	0.90	0.69	0.21	1.00				
PSN	0.99	0.98	1.00	0.81	0.96	0.61	0.04	0.95	1.00			
PNN	-0.99	-0.93	-0.98	-0.73	-0.99	-0.46	0.12	-0.94	-0.98	1.00		
SS	0.95	0.88	0.94	0.59	0.86	0.75	0.29	1.00	0.93	-0.91	1.00	
IA	0.98	0.91	0.97	0.65	0.92	0.67	0.17	1.00	0.97	-0.96	0.99	1.00
HK	-0.16	-0.21	-0.18	0.00	0.07	-0.89	-0.99	-0.36	-0.19	0.04	-0.44	-0.32
PEPC	0.87	0.91	0.90	0.71	0.76	0.88	0.45	0.92	0.91	-0.82	0.94	0.92
MDH	0.54	0.35	0.48	-0.07	0.37	0.70	0.61	0.71	0.47	-0.46	0.75	0.67
ICDH	0.63	0.48	0.58	0.09	0.44	0.81	0.66	0.79	0.57	-0.54	0.83	0.75
TPS	1.00	0.92	0.98	0.68	0.97	0.55	0.01	0.98	0.98	-0.99	0.96	0.99
TPP	0.25	-0.06	0.13	-0.49	0.13	0.24	0.32	0.40	0.11	-0.20	0.42	0.35
TRE	0.24	-0.08	0.12	-0.50	0.14	0.18	0.26	0.38	0.10	-0.19	0.39	0.33
Fruc (n)	0.98	0.87	0.95	0.58	0.93	0.60	0.10	0.99	0.94	-0.96	0.98	0.99
Gluc (n)	0.99	0.93	0.98	0.67	0.92	0.68	0.17	1.00	0.97	-0.96	0.99	1.00
Sac (n)	-0.71	-0.86	-0.78	-0.97	-0.80	-0.23	0.33	-0.56	-0.79	0.76	-0.52	-0.61
Tre (n)	0.27	0.58	0.40	0.86	0.32	0.26	-0.06	0.16	0.42	-0.29	0.15	0.20
Ast (n)	0.07	-0.24	-0.05	-0.40	0.18	-0.62	-0.66	0.01	-0.08	-0.14	-0.05	0.00
Alm (n)	-0.17	-0.42	-0.27	-0.76	-0.32	0.17	0.50	0.02	-0.29	0.24	0.06	-0.04

Tabla 3.4 Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con el crecimiento (PSPA, PSR, PSP, RPA), fijación del nitrógeno (ANA, ANT, TFN, Lb, PSN, PNN, SS, AI)

	<i>PSPA</i>	<i>PSR</i>	<i>PSP</i>	<i>RPA</i>	<i>ANA</i>	<i>ANT</i>	<i>TFN</i>	<i>Lb</i>	<i>PSN</i>	<i>PNN</i>	<i>SS</i>	<i>AI</i>
PSPA	1.00											
PSR	0.77	1.00										
PSP	0.93	0.64	1.00									
RPA	-0.58	0.07	-0.67	1.00								
ANA	0.93	0.59	0.78	-0.66	1.00							
ANT	0.81	0.91	0.57	-0.07	0.79	1.00						
TFN	0.94	0.94	0.82	-0.26	0.81	0.93	1.00					
Lb	-0.81	-0.88	-0.56	0.11	-0.81	-1.00	-0.91	1.00				
PSN	0.89	0.46	0.97	-0.83	0.80	0.46	0.70	-0.46	1.00			
PNN	-0.94	-0.84	-0.77	0.38	-0.93	-0.95	-0.96	0.95	-0.70	1.00		
SS	0.97	0.90	0.90	-0.38	0.83	0.86	0.99	-0.84	0.80	-0.94	1.00	
AI	0.95	0.66	0.80	-0.61	1.00	0.83	0.86	-0.85	0.80	-0.96	0.87	1.00
HK	0.12	-0.51	0.32	-0.87	0.20	-0.43	-0.23	0.40	0.52	0.13	-0.09	0.14
PEPC	0.96	0.91	0.85	-0.34	0.86	0.92	1.00	-0.91	0.75	-0.98	0.99	0.91
MDH	0.71	0.74	0.41	-0.11	0.81	0.96	0.80	-0.97	0.35	-0.90	0.71	0.83
ICDH	0.58	0.02	0.46	-0.83	0.82	0.36	0.33	-0.41	0.62	-0.56	0.37	0.76
TPS	0.79	0.41	0.59	-0.66	0.96	0.71	0.66	-0.75	0.66	-0.84	0.65	0.94
TPP	0.84	0.65	0.61	-0.44	0.96	0.89	0.81	-0.92	0.60	-0.95	0.78	0.96
TRE	0.28	0.82	0.10	0.62	0.13	0.71	0.60	-0.67	-0.12	-0.48	0.49	0.21
Fruc (n)	-0.66	-0.06	-0.60	0.92	-0.84	-0.33	-0.39	0.38	-0.76	0.57	-0.45	-0.78
Gluc (n)	0.50	-0.03	0.35	-0.76	0.77	0.34	0.27	-0.39	0.52	-0.51	0.29	0.72
Sac (n)	0.93	0.84	0.95	-0.41	0.73	0.73	0.93	-0.70	0.85	-0.84	0.97	0.78
Tre (n)	0.00	-0.60	0.00	-0.73	0.29	-0.29	-0.31	0.24	0.24	0.08	-0.25	0.20
Ast (n)	-0.16	-0.71	-0.16	-0.62	0.14	-0.40	-0.46	0.34	0.08	0.22	-0.40	0.05
Alm (n)	0.18	-0.04	0.51	-0.41	-0.09	-0.34	0.03	0.38	0.52	0.14	0.18	-0.09

Tabla 3.5 Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con el crecimiento (PSPA, PSR, PSP, RPA), fijación del nitrógeno (ANA, ANT, TFN, Lb, PSN, PNN, SS, AI)

M. truncatula

	<i>PSPA</i>	<i>PSR</i>	<i>PSP</i>	<i>RPA</i>	<i>ANA</i>	<i>ANT</i>	<i>TFN</i>	<i>Lb</i>	<i>PSN</i>	<i>PNN</i>	<i>Fruc (n)</i>	<i>Gluc (n)</i>
<i>PSPA</i>	1.00											
<i>PSR</i>	0.94	1.00										
<i>PSP</i>	0.99	0.97	1.00									
<i>RPA</i>	0.72	0.90	0.80	1.00								
<i>ANA</i>	0.97	0.91	0.96	0.75	1.00							
<i>ANT</i>	0.56	0.63	0.59	0.43	0.37	1.00						
<i>TFN</i>	0.00	0.06	0.02	-0.11	-0.23	0.81	1.00					
<i>Lb</i>	0.97	0.89	0.96	0.61	0.90	0.69	0.21	1.00				
<i>PSN</i>	0.99	0.98	1.00	0.81	0.96	0.61	0.04	0.95	1.00			
<i>PNN</i>	-0.99	-0.93	-0.98	-0.73	-0.99	-0.46	0.12	-0.94	-0.98	1.00		
<i>Fruc (n)</i>	0.98	0.87	0.95	0.58	0.93	0.60	0.10	0.99	0.94	-0.96	1.00	
<i>Gluc (n)</i>	0.99	0.93	0.98	0.67	0.92	0.68	0.17	1.00	0.97	-0.96	0.99	
<i>Sac (n)</i>	-0.71	-0.86	-0.78	-0.97	-0.80	-0.23	0.33	-0.56	-0.79	0.76	-0.57	
<i>Tre (n)</i>	0.27	0.58	0.40	0.86	0.32	0.26	-0.06	0.16	0.42	-0.29	0.10	
<i>Ast (n)</i>	0.07	-0.24	-0.05	-0.40	0.18	-0.62	-0.66	0.01	-0.08	-0.14	0.12	
<i>Alm (n)</i>	-0.17	-0.42	-0.27	-0.76	-0.32	0.17	0.50	0.02	-0.29	0.24	0.02	
<i>Fo</i>	-0.85	-0.61	-0.77	-0.25	-0.81	-0.34	0.05	-0.87	-0.75	0.84	-0.91	
<i>Fm</i>	-0.31	-0.03	-0.21	0.13	-0.44	0.51	0.71	-0.22	-0.18	0.39	-0.34	
<i>Fv/Fm</i>	0.89	0.74	0.85	0.38	0.78	0.70	0.32	0.97	0.84	-0.84	0.96	
<i>F0/Fm</i>	-0.89	-0.74	-0.85	-0.38	-0.78	-0.70	-0.31	-0.96	-0.84	0.84	-0.96	
<i>Ca</i>	0.86	0.86	0.88	0.61	0.73	0.90	0.50	0.94	0.88	-0.80	0.89	
<i>Cb</i>	0.80	0.90	0.85	0.75	0.68	0.91	0.50	0.85	0.86	-0.74	0.79	
<i>Ca/b</i>	0.74	0.55	0.68	0.14	0.61	0.68	0.44	0.87	0.67	-0.68	0.86	
<i>X+C</i>	0.96	0.93	0.97	0.69	0.88	0.76	0.27	0.99	0.97	-0.92	0.97	
<i>PT</i>	0.88	0.89	0.90	0.65	0.75	0.89	0.47	0.94	0.90	-0.82	0.89	

Tabla 3.6 Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con el crecimiento (PSPA, PSR, PSP, RPA), fijación del nitrógeno (ANA, ANT, TFN, Lb) y *japonicus*

	PSPA	PSR	PSP	RPA	ANA	ANT	TFN	Lb	PSN	PNN	Fruc (n)	Gluc (n)
PSPA	1.00											
PSR	0.77	1.00										
PSP	0.93	0.64	1.00									
RPA	-0.58	0.07	-0.67	1.00								
ANA	0.93	0.59	0.78	-0.66	1.00							
ANT	0.81	0.91	0.57	-0.07	0.79	1.00						
TFN	0.94	0.94	0.82	-0.26	0.81	0.93	1.00					
Lb	-0.81	-0.88	-0.56	0.11	-0.81	-1.00	-0.91	1.00				
PSN	0.89	0.46	0.97	-0.83	0.80	0.46	0.70	-0.46	1.00			
PNN	-0.94	-0.84	-0.77	0.38	-0.93	-0.95	-0.96	0.95	-0.70	1.00		
Fruc (n)	-0.66	-0.06	-0.60	0.92	-0.84	-0.33	-0.39	0.38	-0.76	0.57	1.00	
Gluc (n)	0.50	-0.03	0.35	-0.76	0.77	0.34	0.27	-0.39	0.52	-0.51	-0.94	1.00
Sac (n)	0.93	0.84	0.95	-0.41	0.73	0.73	0.93	-0.70	0.85	-0.84	-0.40	-0.40
Tre (n)	0.00	-0.60	0.00	-0.73	0.29	-0.29	-0.31	0.24	0.24	0.08	-0.75	-0.75
Ast (n)	-0.16	-0.71	-0.16	-0.62	0.14	-0.40	-0.46	0.34	0.08	0.22	-0.64	-0.64
Alm (n)	0.18	-0.04	0.51	-0.41	-0.09	-0.34	0.03	0.38	0.52	0.14	-0.04	-0.04
F0	0.84	0.30	0.82	-0.92	0.90	0.47	0.60	-0.49	0.92	-0.72	-0.95	-0.95
Fm	0.92	0.46	0.91	-0.85	0.92	0.57	0.73	-0.58	0.96	-0.80	-0.88	-0.88
F0/Fm	-0.95	-0.75	-0.99	0.56	-0.78	-0.66	-0.89	0.65	-0.93	0.82	0.53	0.53
Fv/Fm	0.95	0.73	0.99	-0.58	0.78	0.65	0.88	-0.64	0.94	-0.81	-0.54	-0.54
Ca	0.95	0.55	0.97	-0.79	0.88	0.58	0.78	-0.58	0.99	-0.80	-0.77	-0.77
Cb	0.94	0.54	0.97	-0.80	0.87	0.57	0.78	-0.57	0.99	-0.79	-0.78	-0.78
Ca/b	0.89	0.44	0.95	-0.86	0.83	0.46	0.69	-0.47	1.00	-0.71	-0.80	-0.80
X+C	0.92	0.51	0.97	-0.81	0.84	0.52	0.75	-0.52	1.00	-0.75	-0.76	-0.76
PT	0.94	0.54	0.97	-0.80	0.87	0.57	0.78	-0.57	0.99	-0.79	-0.77	-0.77

Tabla 3.7 Matriz de coeficientes de correlación simple entre las actividades enzimáticas (SS, IA, HK, PEPC, MDH, ICDH, TPS, TPP, TRE) y fluorescencia y contenido de pigr

	SS	IA	HK	PEPC	MDH	ICDH	TPS	TPP	TRE	Fo	Fm
SS	1.00										
IA	0.99	1.00									
HK	-0.44	-0.32	1.00								
PEPC	0.94	0.92	-0.58	1.00							
MDH	0.75	0.67	-0.70	0.64	1.00						
ICDH	0.83	0.75	-0.75	0.76	0.98	1.00					
TPS	0.96	0.99	-0.17	0.87	0.58	0.65	1.00				
TPP	0.42	0.35	-0.36	0.18	0.85	0.75	0.30	1.00			
TRE	0.39	0.33	-0.30	0.14	0.82	0.71	0.29	1.00	1.00		
Fo	-0.52	-0.50	0.11	-0.23	-0.77	-0.68	-0.49	-0.94	-0.95	1.00	
Fm	-0.26	-0.34	-0.65	0.04	-0.09	-0.01	-0.46	-0.35	-0.40	0.64	1.00
Fv/Fm	0.51	0.44	-0.49	0.31	0.92	0.84	0.37	0.99	0.98	-0.91	-0.26
F0/Fm	-0.51	-0.44	0.48	-0.31	-0.92	-0.84	-0.37	-0.99	-0.98	0.91	0.27
Ca	0.25	0.13	-0.67	0.14	0.82	0.74	0.02	0.88	0.86	-0.67	0.13
Cb	0.01	-0.11	-0.67	-0.05	0.66	0.57	-0.23	0.75	0.72	-0.48	0.31
Ca/b	0.71	0.64	-0.57	0.54	0.98	0.94	0.57	0.92	0.90	-0.88	-0.24
X+C	0.17	0.08	-0.46	0.00	0.77	0.65	0.00	0.94	0.93	-0.78	-0.09
PT	0.20	0.09	-0.64	0.09	0.80	0.70	-0.02	0.88	0.86	-0.66	0.12

Tabla 3.8 Matriz de coeficientes de correlación simple entre las actividades enzimáticas (SS, IA, HK, PEPC, MDH, ICDH, TPS, TPP, TRE) y fluorescencia y contenido de pigr

	SS	AI	HK	PEPC	MDH	ICDH	TPS	TPP	TRE	F0	Fm
SS	1.00										
AI	0.87	1.00									
HK	-0.09	0.14	1.00								
PEPC	0.99	0.91	-0.15	1.00							
MDH	0.71	0.83	-0.38	0.81	1.00						
ICDH	0.37	0.76	0.57	0.42	0.51	1.00					
TPS	0.65	0.94	0.24	0.72	0.80	0.91	1.00				
TPP	0.78	0.96	-0.05	0.85	0.94	0.74	0.95	1.00			
TRE	0.49	0.21	-0.91	0.53	0.58	-0.40	0.01	0.32	1.00		
F0	0.68	0.88	0.59	0.67	0.48	0.88	0.87	0.75	-0.26	1.00	
Fm	0.80	0.91	0.49	0.78	0.53	0.79	0.84	0.77	-0.11	0.98	1.00
F0/Fm	-0.95	-0.81	-0.18	-0.90	-0.49	-0.40	-0.58	-0.64	-0.25	-0.77	-0.87
Fv/Fm	0.95	0.81	0.20	0.90	0.48	0.41	0.59	0.64	0.22	0.78	0.88
Ca	0.86	0.88	0.43	0.83	0.48	0.66	0.75	0.71	-0.02	0.93	0.98
Cb	0.86	0.88	0.44	0.82	0.48	0.66	0.74	0.71	-0.04	0.94	0.98
Ca/b	0.79	0.82	0.54	0.74	0.38	0.68	0.71	0.64	-0.15	0.95	0.98
X+C	0.84	0.84	0.47	0.79	0.41	0.64	0.70	0.65	-0.07	0.93	0.97
PT	0.86	0.87	0.44	0.82	0.47	0.66	0.74	0.70	-0.03	0.93	0.98

4. Estudio comparativo entre cepas isogénicas de *S. meliloti* con la biosíntesis de trehalosa alterada en simbiosis con *M. sativa* en respuesta a la salinidad

Se utilizaron cuatro simbiosis formadas por *M. sativa* inoculadas con la cepa parental *S. meliloti* 1021, la isogénica ots- (en la que se inactiva la vía TPS), la mots- (en la que se inactiva la vía MOTS) y la doble mutante ots- mots-, (con las dos vías anteriores inactivas TPS-MOTS). Todas ellas son tratadas con 40 mM de NaCl y se mantiene un control sin sal, el experimento se llevó hasta floración y se determinó el crecimiento de las plantas, fijación de nitrógeno, metabolismo carbonado en general y de la trehalosa en particular, así como el contenido de carbohidratos en nódulo.

4.1. Análisis de crecimiento

El análisis de los parámetros de crecimiento PSPA, PSR y PSP (fig. 4.1) mostró que en todas las simbiosis con cepas mutantes, el crecimiento de las plantas fue entre un 15% y un 30% menor que en las inoculadas con la parental. En general, la relación raíz/parte aérea no varía significativamente entre las simbiosis ensayadas apreciándose aumentos del 11% y 20% en las simbiosis procedentes de las mutantes simples. Existen correlaciones significativas entre los parámetros de crecimiento determinados (tabla 4.1).

La salinidad afectó más al crecimiento de plantas inoculadas con cepas mutantes, siendo esto más evidente en las inoculadas con la ots-, donde se observó una disminución del PSP del 60% frente al 45% detectado en las inoculadas con la mots- y doble mutante, mientras que con la parental la disminución fue del 18%. La salinidad disminuyó en mayor proporción el PSR frente al PSPA en las plantas inoculadas con la cepa parental y las mutantes ots- y mots-, en las que se observa una reducción entre el 30% y 70% del PSR frente al 12% a 50% en el PSPA, sin embargo, en las inoculadas con la doble mutante, el efecto del NaCl fue similar en parte aérea y raíz, ya que decrecieron un 40% y 50% respectivamente. La relación raíz/parte aérea sufrió un descenso mayor por efecto de la sal en las plantas inoculadas con las mutantes ots-, y mots-, que fue del 50% y 60% respectivamente, mientras que en las inoculadas con la parental y doble mutante, este descenso fue del 20% y 14% respectivamente.

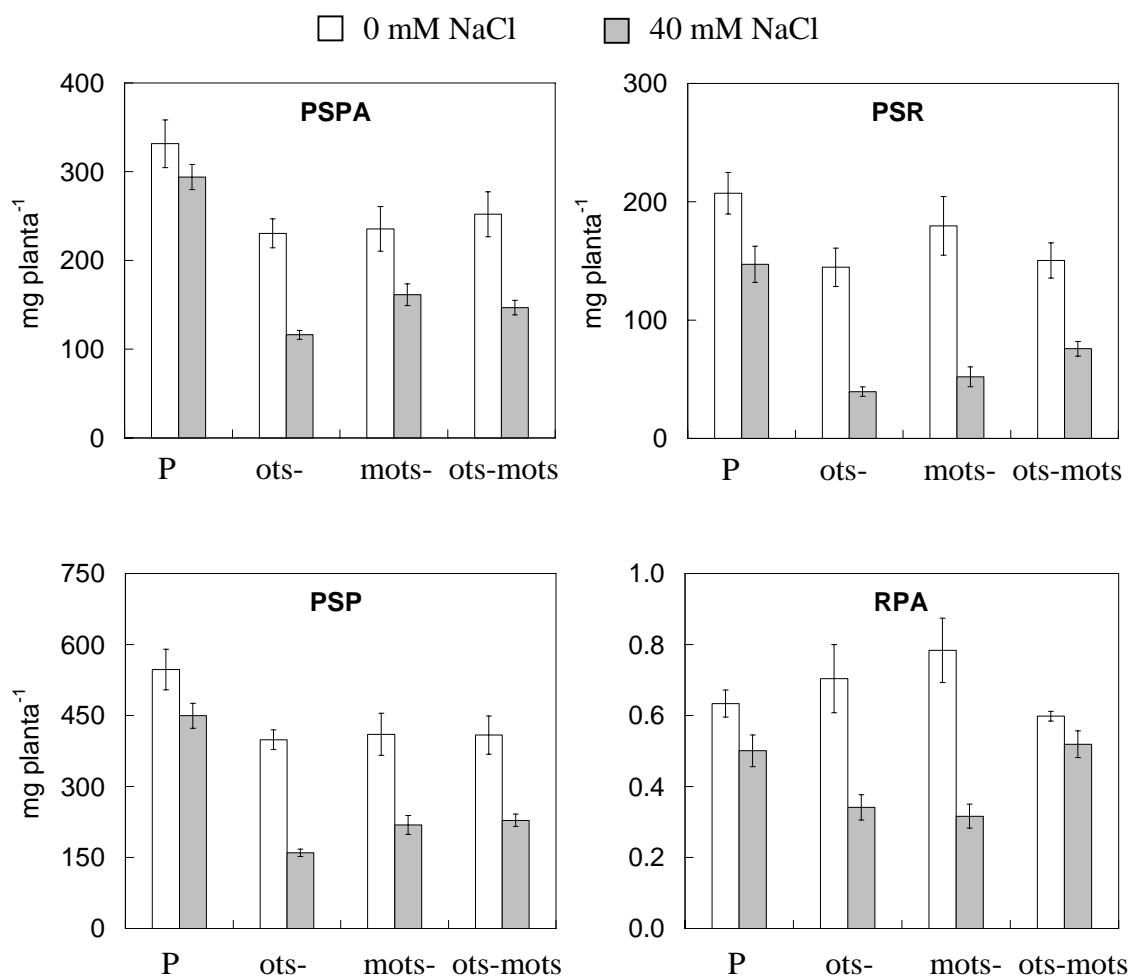


Figura 4.1. Peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de raíz (PSR), peso seco de planta (PSP) y relación raíz/parte aérea (RPA) de *M. sativa* inoculadas con las cepas de *S. meliloti* 1021 parental (P), ots-, mots- y doble mutante ots-mots- y tratadas con 40 mM de NaCl. Cada barra es la media de 10 réplicas \pm SE.

4.2. Fijación de nitrógeno

En la figura 4.2. se muestran los parámetros relacionados con la fijación del nitrógeno: actividad nitrogenasa aparente, actividad nitrogenasa total, tasa de fijación de N₂, peso seco de nódulos y peso normalizado de nódulos. Los datos numéricos se localizan en la tabla A 4.3. junto con el análisis de varianza en la tabla A 4.4. en el apéndice.

Sorprendentemente, tanto la actividad nitrogenasa aparente como la actividad total aumentaron en nódulos de plantas inoculadas con cualquiera de las cepas mutantes respecto de las inoculadas con la parental: **a)** la ANA aumentó entre 2 y 2.6 veces dependiendo de la mutante, **b)** la ANT se incrementó un 30% en nódulos procedentes de las cepas *ots-* y doble mutante, y un 88% en los de la *mots-*, **c)** este efecto solo se observó en la TFN de nódulos de la cepa *mots-* en los que se obtuvo un valor doble respecto del detectado con la parental.

El efecto de la salinidad se detectó con mayor intensidad en nódulos de plantas inoculadas con la cepa doble mutante (*ots-mots-*), donde la ANA, ANT y TFN fue un 80% menor que en los control. En plantas inoculadas con la cepa *ots-*, la ANA, ANT y TFN mostraron una disminución del 60%, 70% y 80% respectivamente por efecto de la sal, resultados similares para ANT y TFN se observan con la cepa parental. La respuesta de la salinidad más suave se observa en los nódulos procedentes de la cepa *mots-*, donde el descenso fue entre el 40% y 45% en los tres parámetros mencionados.

El peso seco de nódulos fue entre un 15% y 25% inferior en plantas inoculadas con mutantes respecto de la parental, mientras que el peso normalizado de nódulo es semejante en las cuatro simbiosis ensayadas. La salinidad afecta al PSN según la cepa: en nódulos de la parental y doble mutante no se observan diferencias significativas con el control, mientras que en los de la *ots-* y *mots-* decrece un 40% y 15% por efecto del NaCl. El PNN se incrementó en todas las plantas inoculadas con mutantes por la salinidad, siendo mayor este efecto en nódulos procedentes de la doble mutante (50%), mientras que este parámetro en plantas control no varió significativamente con el NaCl en el medio de cultivo.

El análisis de varianza de los datos de ANA, ANT y TFN de la tabla A 4.4 del apéndice, muestra que la variabilidad observada se debió en un 50% a la cepa utilizada y en un 33% al efecto de la sal. El PSN se correlaciona positivamente y el PNN negativamente y significativamente con los parámetros de crecimiento (tabla 4.1).

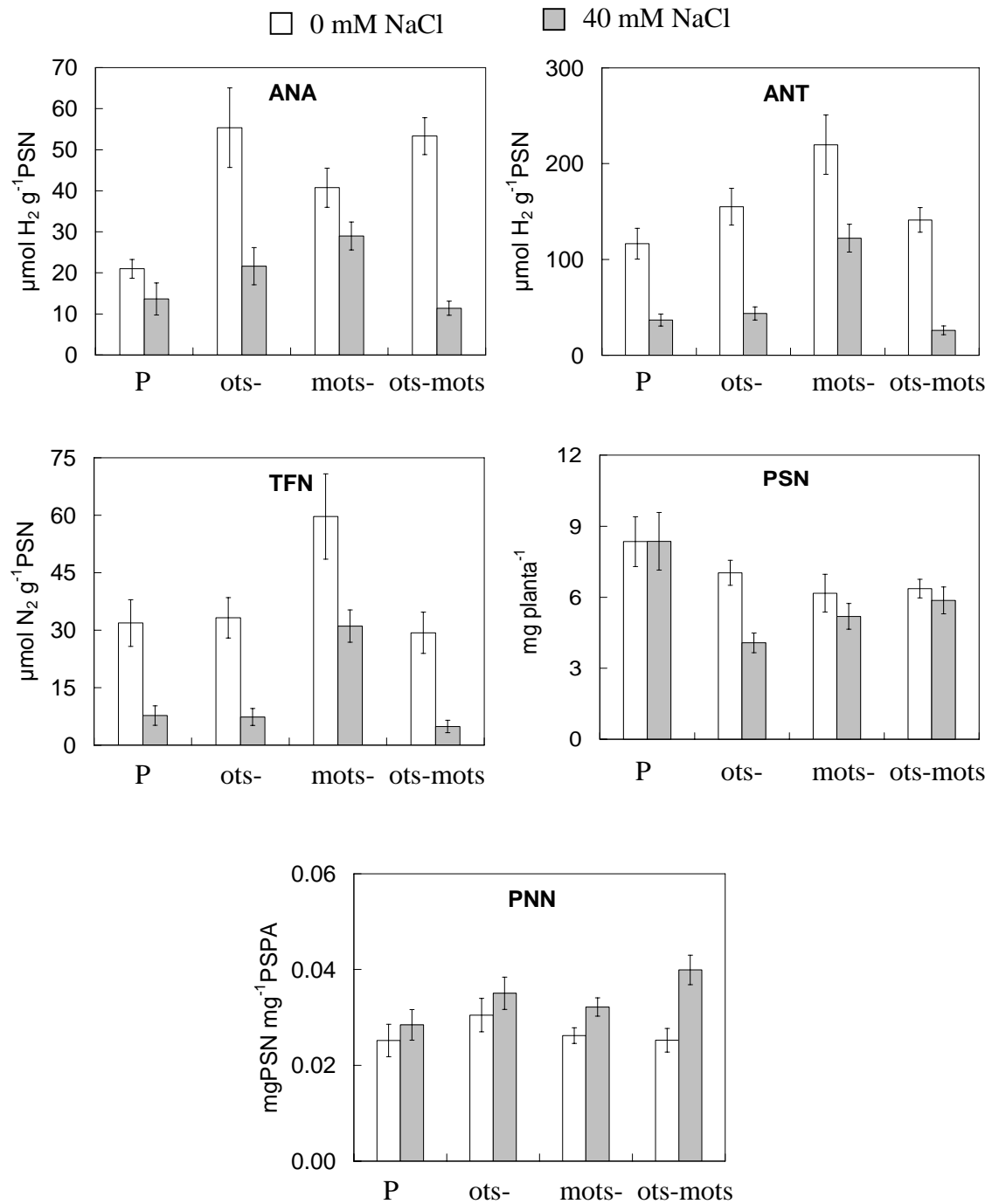


Figura 4.2. Actividad nitrogenasa aparente (ANA), actividad nitrogenasa total (ANT), tasa de fijación de nitrógeno (TFN), peso seco de nódulos (PSN) y peso normalizado de nódulos (PNN) de *M. sativa* inoculadas con las cepas de *S. meliloti* 1021 parental (P), *ots-*, *mots-* y doble mutante *ots-mots-* y tratadas con 40 mM de NaCl. Cada barra es la media de 10 réplicas \pm SE.

4.3. Metabolismo carbonado

En la figura 4.3. se muestran las actividades enzimáticas del metabolismo carbonado en el citosol nodular: sacarosa sintasa, invertasa alcalina, hexoquinasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa, malato deshidrogenasa e isocitrato deshidrogenasa. Los datos numéricos y el estudio de la varianza de los mismos se encuentra en las tablas A 4.5 y A 4.6 del apéndice, también se incluyen los datos numéricos y estadísticos de estas actividades cuando se expresan en g PF^{-1} (tabla A 4.11 y A 4.12).

En general se puede admitir que todas las actividades enzimáticas estudiadas se alteran en nódulos procedentes de mutantes, siendo la actividad menos afectada la **ICDH**, con reducción del 10% en nódulos procedentes de la *ots-* y la doble mutante, y la más afectada la **SS** con reducción del 40% en los mismos nódulos, mientras que solo en esta actividad enzimática se detecta que en los procedentes de la cepa *mots-*, esta actividad duplica el valor obtenido en los de la parental. Otro dato de interés es el observado en las actividades **PEPC** y **MDH** de nódulos procedentes de la doble mutante que no varían respecto a la parental, mientras que en los de las mutantes simples (*ots-* y *mots-*), la inhibición oscila entre el 15% y 25% dependiendo de la cepa y actividad enzimática. También se observa menor actividad **HK** en los nódulos de las simbiosis formadas por cepas mutantes respecto al nivel obtenido en nódulos de la parental, con diferencias en torno al 20%-37%, y en la actividad **IA** en la que solo se detecta un descenso en nódulos procedentes de la cepa *mots-* y la doble mutante.

Al observar el diagrama de barras se puede asumir que la salinidad provoca:

- a) En general en nódulos procedentes de la cepa parental de *S. meliloti* 1021, no afecta negativamente a las actividades enzimáticas estudiadas, ya que solo se aprecia una inhibición de las actividades **IA** y **MDH** del 20 y 30% respectivamente.
- b) En nódulos procedentes de cepas mutantes la mayoría de las actividades enzimáticas se inhibieron por la salinidad, a excepción de la hexoquinasa que no se modificó en ninguna de las simbiosis estudiadas, detectándose incluso que en nódulos procedentes de la cepa *mots-*, esta actividad se incrementó un 40%.

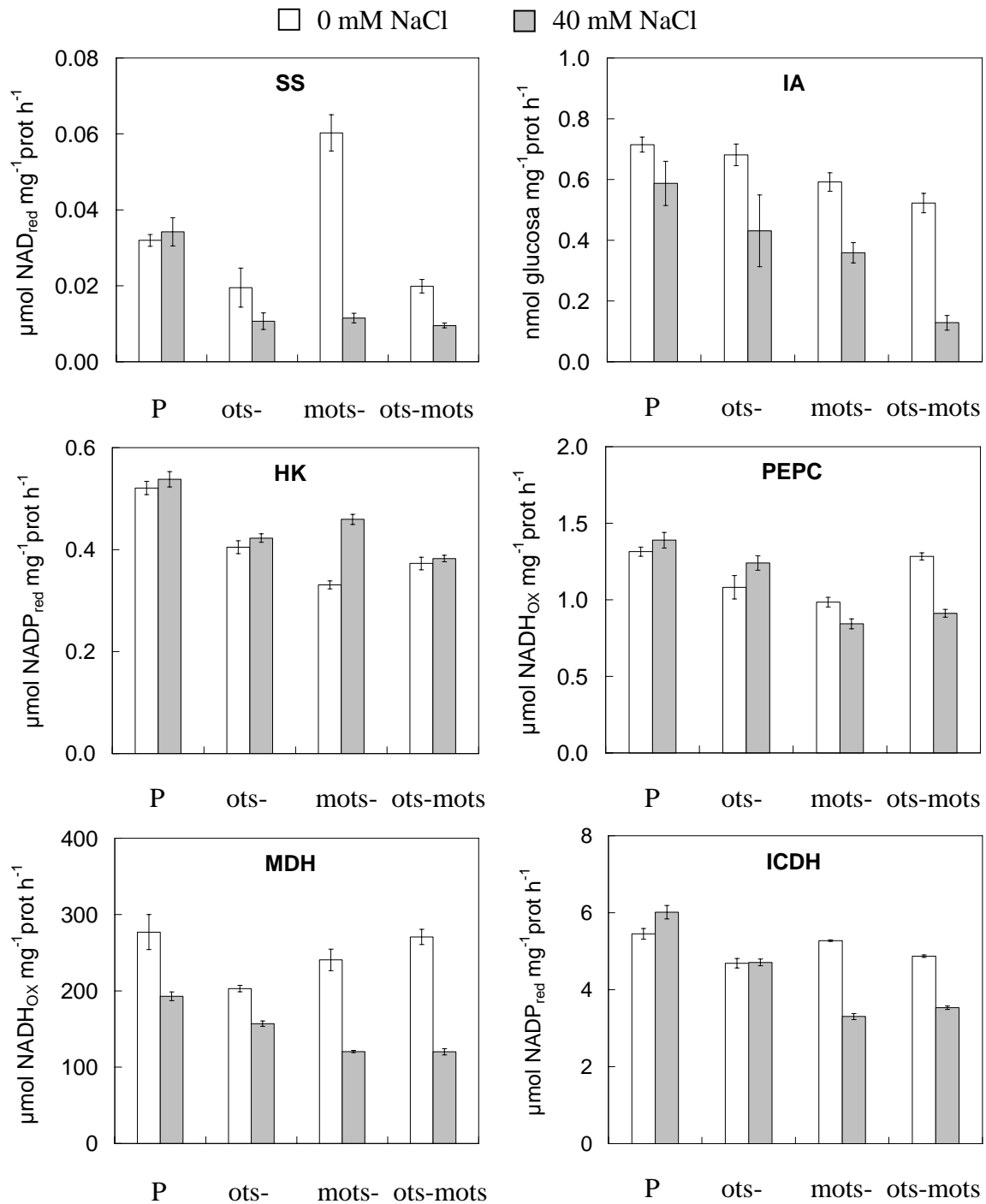


Figura 4.3. Actividad sacarosa sintasa (SS), invertasa alcalina (IA), hexoquinasa (HK), fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), malato deshidrogenasa (MDH) e isocitrato deshidrogenasa (ICDH) en nódulos de *M. sativa* inoculadas con las cepas de *S. meliloti* 1021 parental (P), *ots-*, *mots-* y doble mutante *ots-mots-* y tratadas con 40 mM de NaCl. Cada barra es la media de 4 réplicas \pm SE.

c) Los nódulos de la mutante *ots-* son, junto con los de la parental los menos afectados por el estrés salino, ya que en los de la cepa parental disminuye la actividad IA (20%) y la MDH (30%) y en los de la cepa *ots-* se detecta una inhibición en torno al 40% en las actividades enzimáticas relacionadas con la hidrólisis de sacarosa y del 23% en la MDH, incluso la actividad PEPC aumentó el 14% con esta cepa en respuesta a 40mM NaCl.

d) En las actividades SS, IA, PEPC, MDH e ICDH, el efecto negativo de la salinidad fue mayor en nódulos procedentes de las cepas *mots-* y doble mutante, donde se observó inhibición cercana al 80% en las actividades SS e IA, y en las actividades PEPC, MDH e ICDH entre el 30% y 50%.

Destacar la buena correlación existente entre los parámetros de crecimiento y las actividades IA, MDH, e ICDH nodular (tabla 4.1). Al estudiar la varianza de estas actividades enzimáticas, un porcentaje importante de la variabilidad observada se debe al factor sal, en la HK (90%), en la PEPC (70%), y en la MDH (70%), en las restantes actividades enzimáticas estudiadas, la variabilidad se reparte entre ambos factores (sal y cepa mutante que forma la simbiosis). Estos datos coinciden tanto si la actividad se expresa por proteína (tabla A 4.6) como por peso fresco (tabla A 4.12).

4.4. Metabolismo de la trehalosa

Se determinaron las actividades de la síntesis y degradación de trehalosa: trehalosa-6 fosfato sintasa, trehalosa-6 fosfato fosfatasa y trehalasa, cuyos resultados se exponen en la figura 4.4. Los datos numéricos se reflejan en las tablas A 4.7 (expresado por mg proteína) y A 4.13 (expresado por peso fresco) del apéndice.

Imprevisiblemente, se detectó actividad TPS en los nódulos formados tanto por la cepa parental como por las mutantes, siendo en los de la *mots-* y *ots-mots-* un 35% y 25% mayor, y en los de la *ots-* un 15% menor que en los de la parental. La actividad TPP también se detectó en todos los nódulos aunque fue menor en los de las cepas *ots-* y doble mutante en un 75% y 50% respectivamente y un 37% más activa en los nódulos procedentes de la cepa *mots-*. La actividad trehalasa, solo se modificó respecto de los nódulos formados por la cepa parental en los de la cepa *ots-*, en los que la actividad fue un 40% mayor.

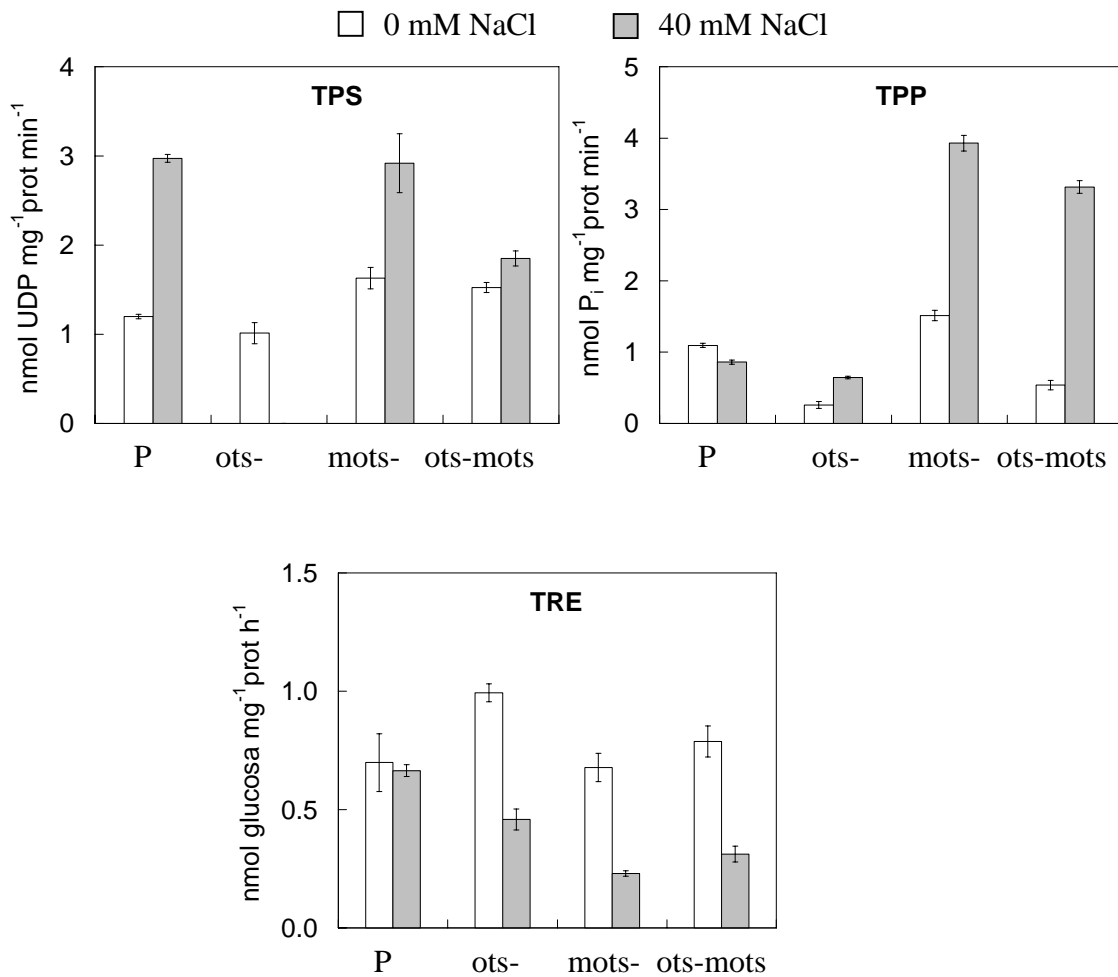


Figura 4.4. Actividad trehalosa-6 fosfato sintasa (TPS), trehalosa-6 fosfato fosfatasa (TPP) y trehalasa (TRE) en nódulos de *M. sativa* inoculadas con las cepas de *S. meliloti* 1021 parental (P), *ots-*, *mots-* y doble mutante *ots-mots-* y tratadas con 40 mM de NaCl. Cada barra es la media de 4 réplicas \pm SE.

La salinidad provocó: **a)** una activación de las dos enzimas de la síntesis de trehalosa en nódulos de la cepa parental con incrementos de 2.3 (TPS) y 1.2 (TPP) sobre la actividad detectada en los control, **b)** este efecto también se detectó en los nódulos procedentes de la cepa *mots-* con incrementos de 1.7 (TPS) y 1.2 (TPP), respecto a lo obtenido en los nódulos sin sal, **c)** en los nódulos de la mutante *ots-* y doble mutante, solo se observa este efecto en la actividad TPP, que aumentó 2.7 y 1.4 veces respecto a los procedentes de esas mismas cepas sin sal, **d)** una reducción de la actividad

trehalasa entre un 55% y 65% en los nódulos de las cepas mutantes, no afectando a la actividad de los nódulos de la cepa parental.

4.5. Contenido de carbohidratos

Se estudió el contenido de diversos mono y disacáridos en los nódulos: fructosa, glucosa, sacarosa, maltosa y trehalosa cuyos valores expresados en $\mu\text{g g}^{-1}\text{PFN}$ se exponen en la figura 4.5. Los datos relativos a estos compuestos se localizan en las tablas del apéndice A 4.9. y A 4.10.

a) Diferencias que se observan debido a las mutantes:

El contenido de carbohidratos en nódulos, solo mostró diferencias significativas respecto de los de la cepa parental en los formados por la cepa *ots-*, en los que el nivel de sacarosa, maltosa fructosa y glucosa, aumentó un 90%, 32%, 37% y 20% respectivamente, mientras que en los nódulos formados por las cepas *mots-* y doble mutante, solo se observaron diferencias en el contenido de glucosa, que decreció un 25% y 60% respectivamente, y en el de maltosa que disminuyó un 20% con ambas cepas.

La mayor concentración de trehalosa, inusualmente se detectó en nódulos de plantas inoculadas con la cepa doble mutante (*ots-mots-*), donde el contenido fue un 22% superior al de nódulos de la cepa parental. En nódulos formados por las cepas *ots-* y *mots-*, el nivel de trehalosa fue un 20% y 28% inferior respecto de la parental.

El carbohidrato mayoritario en todas las simbiosis ensayadas fue la sacarosa seguido de la glucosa, fructosa, maltosa y trehalosa. El contenido glucosa fue la mitad en nódulos de la cepa parental, la tercera parte en los de las mutantes simples, y la quinta parte en los de la doble mutante respecto al contenido de sacarosa. El contenido de fructosa fue en general la sexta parte de la sacarosa obtenida en todas las simbiosis, independientemente de la cepa de procedencia. El contenido de maltosa y trehalosa fue minoritario con valores inferiores al 0.03% respecto del contenido de sacarosa.

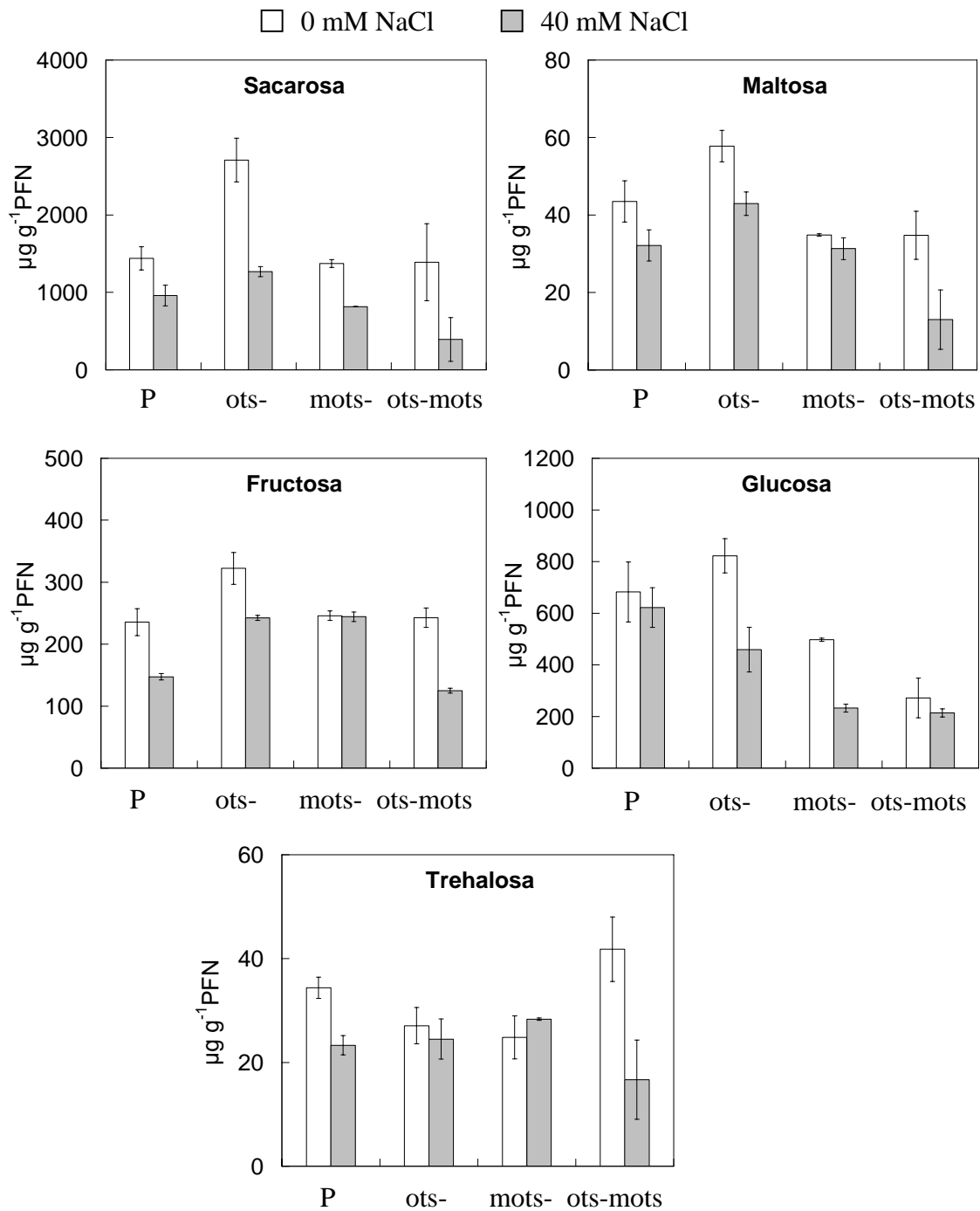


Figura 4.5. Contenido de sacarosa, maltosa, fructosa, glucosa y trehalosa en nódulos de *M. sativa* inoculadas con las cepas de *S. meliloti* 1021 parental (P), *ots-*, *mots-* y doble mutante *ots-mots-* y tratadas con 40 mM de NaCl. Cada barra es la media de 3 réplicas \pm SE.

b) Diferencias que se observan por efecto de la sal:

Los carbohidratos acumulados en nódulos formados por la cepa parental muestran una moderada sensibilidad al NaCl, de hecho, se observan reducciones en el contenido de fructosa (40%), sacarosa (35%), maltosa (25%) y trehalosa (30%). Además, se puede generalizar que la salinidad provocó una disminución en el contenido de carbohidratos en nódulos procedentes de todas las cepas ensayadas, a excepción de los de la cepa *mots-*, en los que solo decreció el contenido de sacarosa y glucosa un 40% y 55% respectivamente.

La **sacarosa** fue el carbohidrato más afectado por la sal, independientemente de la cepa, observándose una disminución que osciló entre el 75% con la doble mutante y el 33% con la cepa parental. La **glucosa** nodular no se afectó por el NaCl ni en nódulos procedentes de la cepa parental, ni en los de la doble mutante, en cambio en los procedentes de las cepas *ots-* y *mots-*, la sal provocó una reducción del 50% de este carbohidrato. El efecto de la salinidad sobre el contenido de **trehalosa** fue más evidente en nódulos formados por la doble mutante, donde el valor fue un 60% inferior respecto del control. Tanto en los nódulos de la cepa parental como en los de la cepa *ots-*, la trehalosa disminuyó con la sal un 30% y un 10% respectivamente, mientras que se incrementó un 14% en los nódulos de la cepa *mots-*.

Tabla 4.1 Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con parámetros de crecimiento (PSPA, PSR, PSP, RPA), fijación de nitrógeno (ANA, ANT, TFN, PSN, PNN) y síntesis de azúcares (SS) de *M. sativa*

	PSPA	PSR	PSP	RPA	ANA	ANT	TFN	PSN	PNN	SS
PSPA	1.00									
PSR	0.92	1.00								
PSP	0.98	0.97	1.00							
RPA	0.58	0.84	0.71	1.00						
ANA	0.14	0.31	0.24	0.51	1.00					
ANT	0.31	0.53	0.41	0.67	0.78	1.00				
TFN	0.33	0.56	0.42	0.65	0.64	0.98	1.00			
PSN	0.93	0.81	0.91	0.53	-0.04	0.08	0.11	1.00		
PNN	-0.82	-0.82	-0.82	-0.54	-0.48	-0.65	-0.64	-0.57	1.00	
SS	0.58	0.74	0.63	0.70	0.16	0.61	0.69	0.44	-0.66	1.00
IA	0.77	0.77	0.79	0.56	0.45	0.53	0.51	0.61	-0.84	0.57
HK	0.45	0.11	0.31	-0.38	-0.54	-0.48	-0.41	0.54	-0.15	-0.12
PEPC	0.60	0.44	0.54	0.08	-0.07	-0.24	-0.28	0.51	-0.50	0.15
MDH	0.80	0.88	0.85	0.70	0.47	0.56	0.53	0.57	-0.89	0.59
ICDH	0.75	0.72	0.74	0.47	0.04	0.13	0.15	0.65	-0.69	0.66
TPS	0.23	0.03	0.14	-0.15	-0.24	-0.06	0.00	0.35	-0.09	0.13
TPP	-0.45	-0.49	-0.50	-0.44	-0.42	-0.16	-0.07	-0.34	0.52	-0.28
TRE	0.64	0.73	0.72	0.75	0.66	0.48	0.38	0.56	-0.64	0.41
Fruc	0.05	0.18	0.13	0.28	0.80	0.70	0.60	-0.13	-0.40	0.07
Gluc	0.50	0.46	0.52	0.33	0.20	0.28	0.28	0.53	-0.39	0.29
Sac	0.30	0.42	0.40	0.53	0.75	0.54	0.43	0.23	-0.42	0.16
Malt	0.29	0.32	0.34	0.29	0.57	0.42	0.34	0.17	-0.46	0.12
Tre	0.49	0.43	0.47	0.18	0.58	0.45	0.37	0.21	-0.74	0.05

5. Estudio bioquímico y molecular de la trehalasa

5.1. Purificación, caracterización e inmunodetección de la trehalasa de nódulos de *Phaseolus vulgaris*

5.1.1. Purificación

La trehalasa de nódulos de *P. vulgaris* fue parcialmente purificada a través de diferentes pasos en los que se incluyen: precipitación fraccionada con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión molecular y electroforesis en geles de poliacrilamida (tabla 5.1).

Se usaron 20 g de tejido nodular fresco para asegurar un proceso efectivo y disponer de enzima purificada para diversos ensayos. El tampón de extracción estaba formado por Tris-HCl 200 mM pH 8.0, sacarosa al 5%, 6 mM β -mecaptoetanol y polivinilpirrolidona (PVPP) en una proporción 33% p/p, como estabilizador.

Tabla 5.1. Purificación parcial de la trehalasa de nódulos de *P. vulgaris*

Etapa de purificación	Actividad total (mU)	Proteína total (mg)	Actividad específica mU mg ⁻¹ prot	Rendimiento (%)	Factor de purificación
Extracto crudo	15140	650.2	23	100	1.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	10571	114.6	92	70	4.0
DEAE Sefarosa (1)	8020	32.0	251	53	10.8
DEAE Sefarosa (2)	7750	27.8	279	51	12.0
Sefacril S-300	5130	6.1	847	34	36.4
Nativa PAGE	4210	0.4	9906	28	425.4

Una vez obtenido el extracto crudo de nódulo, se procedió a concentrar la enzima mediante precipitación fraccionada con sulfato de amonio entre el 30% y 70% de saturación, lográndose un rendimiento del 70% y un factor de purificación de 4.0. Mediante cromatografía en DEAE-sefarosa, del extracto precipitado con sulfato de amonio, se purificó la enzima 4 veces, eluyéndose un solo pico de actividad con un rendimiento del 51%. En el

siguiente paso de gel filtración con sefacril S-300, la enzima se purificó 3 veces. Finalmente la enzima se separó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes (electroforesis-nativa), alcanzándose una purificación total del extracto crudo de 425 veces. Después de la purificación, la actividad específica final de la trehalasa nodular fue de 9906 mU mg⁻¹ proteína con un rendimiento promedio del 28%.

5.1.2. Caracterización

5.1.2.1. Determinación del peso molecular

El peso molecular de la enzima nativa se estimó en 42 kDa mediante columnas de gel filtración, comparando los volúmenes de elución de distintos patrones de proteínas de pesos moleculares conocidos (Fig. 5.1).

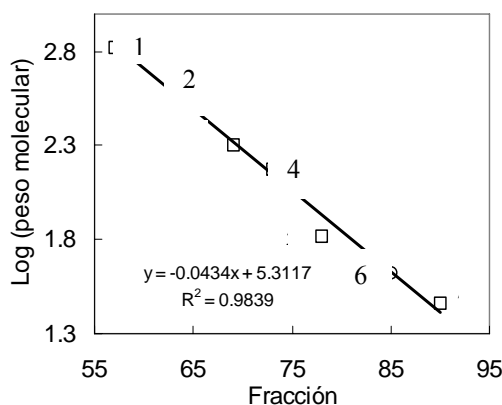


Figura 5.1. Estimación del peso molecular de la trehalasa de nódulos de *P. vulgaris* mediante gel filtración. 1, tiroglobulina (669 kDa); 2, apoferritina (443 kDa); 3, β -amilasa (200 kDa); 4, alcohol deshidrogenasa (150 kDa); 5, albúmina de suero bovino (66 kDa); 6, trehalasa nodular (42 kDa); 7, anhidrasa carbónica (29 kDa).

Además, se determinó el peso molecular de la trehalasa mediante electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida con SDS, y su comparación con proteínas patrón conocidas. El peso molecular nativo de la enzima fue de 45 kDa (Fig. 5.2).

Los datos presentados en la figura 5.2, muestran que la trehalasa de nódulos de *P. vulgaris* emigró como un único polipéptido, lo que sugiere que se trata de una enzima monomérica.

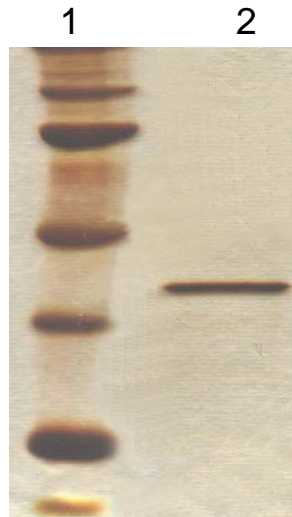


Figura 5.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS de la trehalasa purificada de nódulos de *P. vulgaris*. 1. Marcadores de peso molecular (10 μ l); 2. Enzima purificada (10 μ g).

5.1.2.2. Efecto del pH

Se determinó el efecto del pH, en un amplio rango de 3.6 a 6.6, sobre la actividad trehalasa como se muestra en la figura 5.3, en la que se observa valores de actividad altos en todos los tampones utilizados. La enzima muestra un pH óptimo entorno a 3.9 con tampón citrato/NaOH, mientras que pH inferiores a 3.3 y superiores a 7.5 inhibieron fuertemente la actividad.

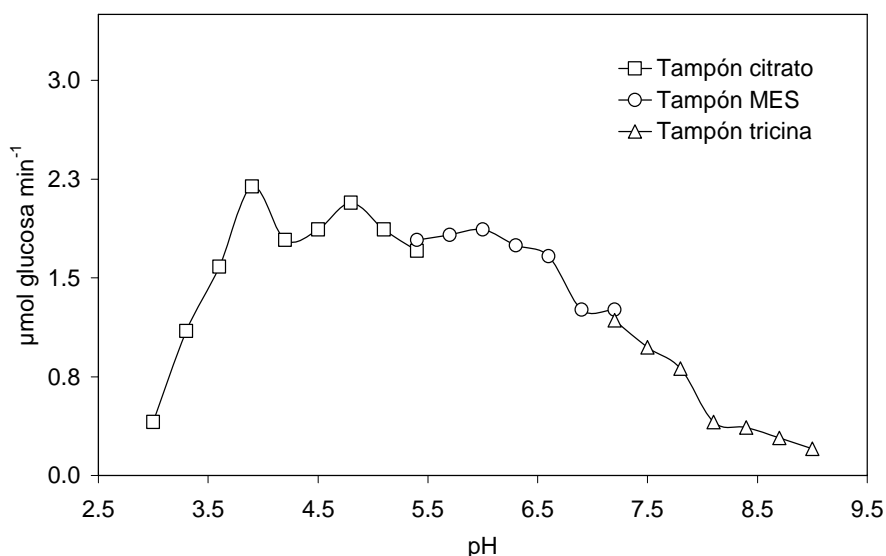


Figura 5.3. Actividad de la trehalasa de nódulos de *P. vulgaris* a diferentes pH. La mezcla de reacción contenía tampones a una concentración 50 mM: □ citrato-NaOH (pH 3.0-5.4), O MES-KOH (pH 5.4-7.2), Δ tricina-KOH (pH 7.2-9.0).

5.1.2.3. Estabilidad térmica y temperatura óptima

La temperatura óptima para la actividad trehalasa se determinó comparando la tasa de hidrólisis de trehalosa a temperaturas comprendidas entre 25°C y 75°C. Este experimento mostró que la temperatura óptima para la trehalasa es 60°C (Fig. 5.4). Además, la enzima es relativamente estable frente al aumento de temperatura, ya que mantiene su actividad intacta después de 30 min de preincubación sin sustrato a 40°C, sin embargo, la preincubación a 45°C y 50°C provocó una pérdida del 40% de la actividad, llegándose a casi la inactivación completa a los 60°C.

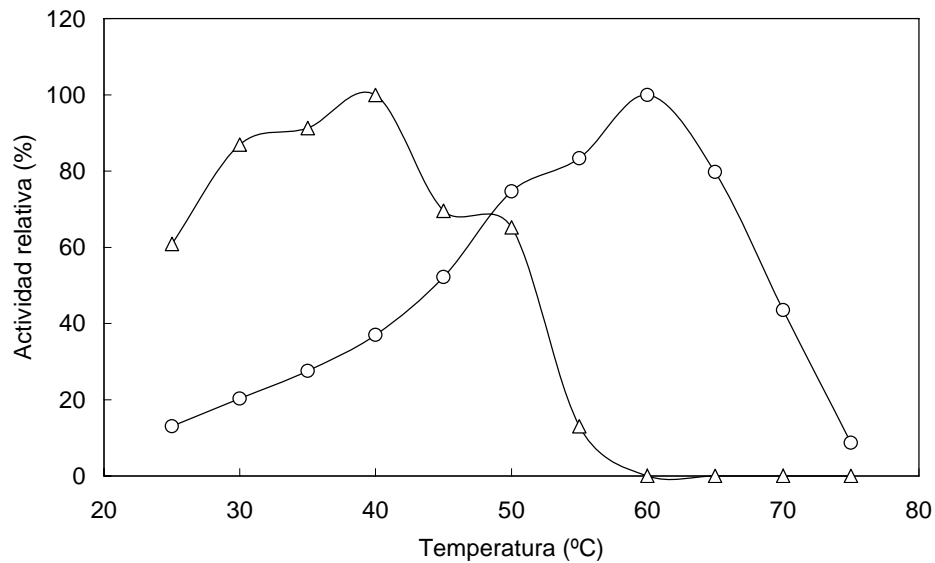


Figura 5.4. Termoestabilidad (Δ) y temperatura óptima (O) de la trehalasa de nódulos de *P. vulgaris*. Para determinar la termoestabilidad, la enzima fue preincubada en MES-KOH pH 6.3 durante 30 min a las temperaturas indicadas, después se añadió a la mezcla trehalosa 100 mM y se midió la actividad.

5.1.2.4. Especificidad de sustrato

Tabla 5.2. Especificidad de sustrato de la trehalasa parcialmente purificada de nódulos de *P. vulgaris*.

Sustratos (50 mM)	Actividad (%)
Trehalosa	100.0
Sacarosa	71.4
Maltosa	17.9
Melobiosa	16.1
Celobiosa	16.1
Rafinosa	5.4
Lactosa	0.0
Turanosa	0.0

La trehalasa purificada de nódulos de *P. vulgaris* no tiene una alta especificidad por el sustrato, ya que como se muestra en la tabla 5.2, es capaz de hidrolizar los enlaces α -glucosidos de la sacarosa, con la que alcanzó un 71% de actividad frente a la trehalosa, mientras que con maltosa, melobiosa y celobiosa, la actividad fue entorno al 17%.

5.1.2.5. Parámetros cinéticos

La determinación de K_m y V_{max} se realizó midiendo la actividad trehalasa con concentraciones crecientes de trehalosa, obteniéndose una curva de saturación de sustrato (Fig.5.5). Debido a que la aproximación a V_{max} se hace asintóticamente, se representa el inverso de la velocidad inicial, frente al inverso de la concentración de sustrato (gráfica de Lineweaver-Burk, Fig. 5.6), obteniendo una línea recta cuya intersección en el eje x es $-1/K_m$, y la intersección en el eje y es $1/V_{max}$. La K_m de la trehalasa fue 0.109 mM a 37°C y pH 6.3, y la V_{max} 217.8 U mg^{-1} prot min^{-1} .

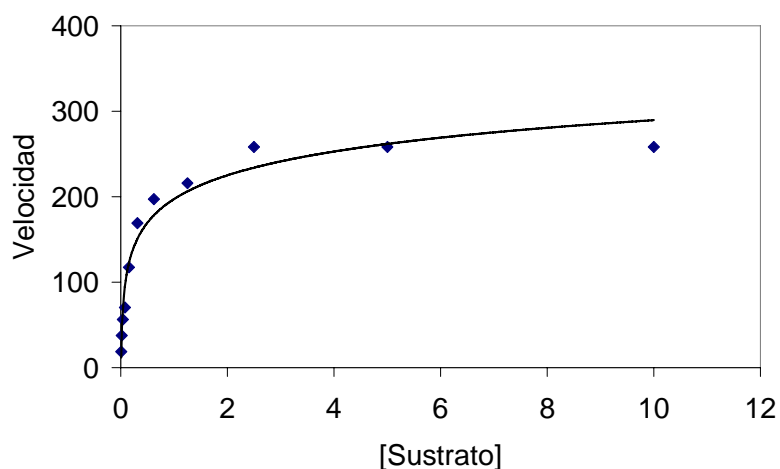


Figura 5.5. Curva de saturación de sustrato de la trehalasa de nódulos de *P. vulgaris*.

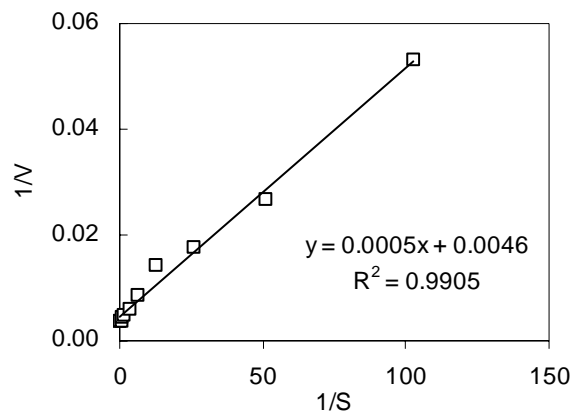


Figura 5.6. Determinación del valor de K_m y V_{max} de la trehalasa de nódulos de *P. vulgaris* en una representación de la gráfica de Lineweaver-Burk.

5.1.2.6. Activadores e inhibidores

Se ensayó el efecto de varios compuestos como posibles activadores o inhibidores de la actividad trehalasa que se muestran en la tabla 5.3. Los iones metálicos Na^+ y Mn^{2+} incrementaron la actividad trehalasa alrededor de un 30% y el Mg^{2+} un 26%, mientras que el EDTA y el Fe^{3+} disminuyeron su actividad un 50% y un 70% respectivamente y el Hg^+ en un 95%.

Tabla 5.3. Influencia de varios efectores sobre la actividad trehalasa de nódulos de *P. vulgaris*. La actividad relativa se expresó en porcentaje de actividad en ausencia de efectores

Efectores (10 mM)	Actividad (%)
Control	100.0
Na^+	133.3
Mn^{2+}	131.4
Mg^{2+}	125.7
Li^+	117.1
Co^{2+}	114.3
K^+	108.6
Ca^{2+}	100.0
Fe^{3+}	20.0
Hg^+	5.7
EDTA	53.6

5.1.3. Inmunodetección de la trehalasa en *P. vulgaris*

Se llevaron a cabo dos tipos de estudios: en el primero de ellos se abordó la localización de la trehalasa en diferentes órganos de la simbiosis *P. vulgaris*-*R. tropici* CIAT 899 en floración (28 días); en el segundo, se siguió la ontogenia de esta proteína nodular en distintos estados fenológicos: crecimiento vegetativo (21 días), floración (28 días) y fructificación (35 días). La trehalasa se detectó por inmunodetección de la proteína en extractos crudos de diferentes órganos mediante western blot, utilizando anticuerpos policlonales específicos anti-trehalasa obtenidos a partir de suero de conejo inmunizado con la proteína purificada de nódulos de *P. vulgaris*.

5.1.3.1. En hoja, raíz, nódulo y flor

La actividad trehalasa en diferentes órganos de *P. vulgaris* se representa en el diagrama de barras de la figura 5.7. Se detectó actividad en todos los órganos de la planta estudiados, correspondiendo la máxima actividad a nódulos, donde fue 5, 3 y 2 veces mayor que la obtenida en hoja, flor y raíz respectivamente.

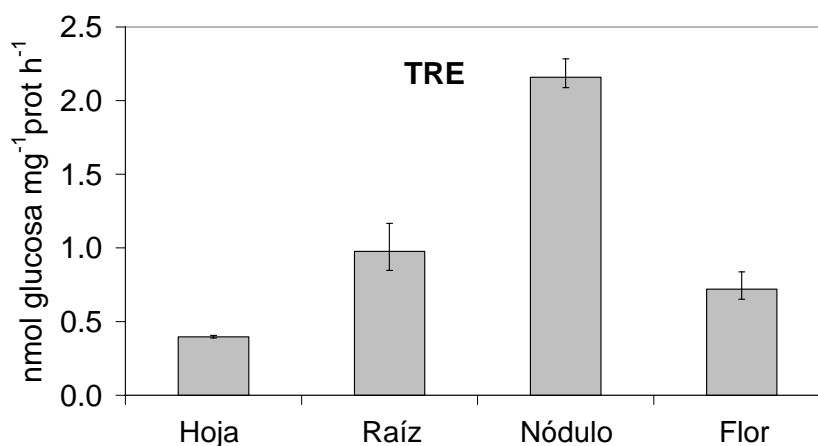


Figura 5.7. Actividad trehalasa en hoja, raíz, nódulo y flor de *P. vulgaris* a los 28 días de cultivo.

La inmunodetección de la proteína de extractos crudos de cada uno de los órganos, mostró una banda visible en nódulo que también se visualiza en

el extracto de raíz no detectándose la proteína en hoja (Fig. 5.7). En flor podemos observar una banda reconocida específicamente por el anticuerpo con un tamaño diferente a la de nódulo y raíz, lo que indicaría la presencia de una isoforma de trehalasa en este órgano.



Figura 5.8. Proteína de la trehalasa en flor (F), raíz (R), hoja (H) y nódulo (N) de *P. vulgaris* a los 28 días de cultivo.

5.1.3.2. En la ontogenia del nódulo

El estudio de la actividad trehalasa en nódulos de *P. vulgaris* en diferentes estados fenológicos del crecimiento y desarrollo de la planta (Fig. 5.9), pone de manifiesto que en el crecimiento vegetativo se detecta mayor actividad, que decrece un 10% en la etapa de floración y un 30% en la de fructificación, cuando los nódulos son senescentes.

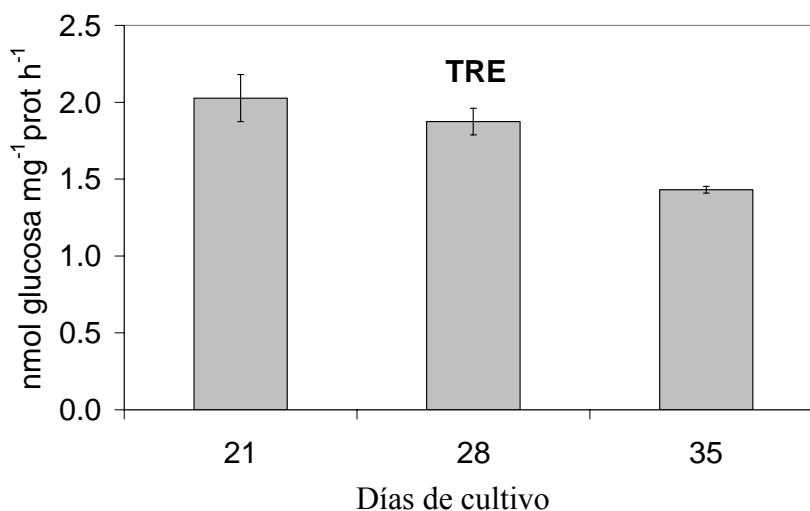


Figura 5.9. Actividad trehalasa en nódulo de *P. vulgaris* a los 21 (vegetativo), 28 (floración) y 35 (senescencia) días de cultivo.

La inmunodetección de la proteína (Fig. 5.10) mostró como el descenso de actividad trehalasa detectado, se corresponde con una disminución en la cantidad de proteína de trehalasa presente en los extractos de nódulo.



Figura 5.10. Proteína de la trehalasa en nódulo de *P. vulgaris* a los 21 (vegetativo), 28 (floración) y 35 (senescencia) días de cultivo.

5.2. Purificación y caracterización de la trehalasa de nódulos de *M. sativa*

5.2.1. Purificación

La purificación de la trehalasa nodular de *M. sativa* se realizó siguiendo el mismo protocolo que para la de *P. vulgaris* (5.1.), a excepción de la electroforesis en gel de poliacrilamida que no se pudo llevar a cabo. El rendimiento en cada uno de las etapas de purificación se indica en la tabla 5.4.

Tabla 5.4. Purificación parcial de la trehalasa de nódulos de *M. sativa*

Etapas de purificación	Rendimiento (%)	Factor de purificación
Extracto crudo	100	1.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ (30-70%)	54	2.5
DEAE Sefarosa (1°)	36	6.0
DEAE Sefarosa (2°)	25	9.0
Sefacril S-300	24	22.0

Una vez obtenido el extracto crudo de nódulo se procedió a concentrar la trehalasa mediante precipitación fraccionada con sulfato de amonio entre el 30% y 70% de saturación, lográndose un rendimiento del 54% y un factor de purificación de 2.5. Por cromatografía en DEAE-sefarosa (del extracto precipitado con sulfato de amonio) se purificó la enzima 9 veces, con un rendimiento del 25%. En el siguiente paso de gel filtración con sefacril S-300, la enzima fue purificada 9 veces con un rendimiento del 24%. El purificado parcial fue utilizado para la caracterización de la enzima.

5.2.2. Caracterización

5.2.2.1. Efecto del pH

Se determinó el efecto del pH en la actividad trehalasa en un rango de 2.7 a 9.0, como se muestra en la figura 5.11, donde se observa una mayor actividad a pH 3.6 y 7.5 con los tampones citrato y tricina respectivamente. La enzima mostró un pH óptimo entorno a 3.9 con el tampón citrato/NaOH,

mientras que valores de pH inferiores a 3.3 y mayores que 7.5 inhibieron fuertemente la actividad.

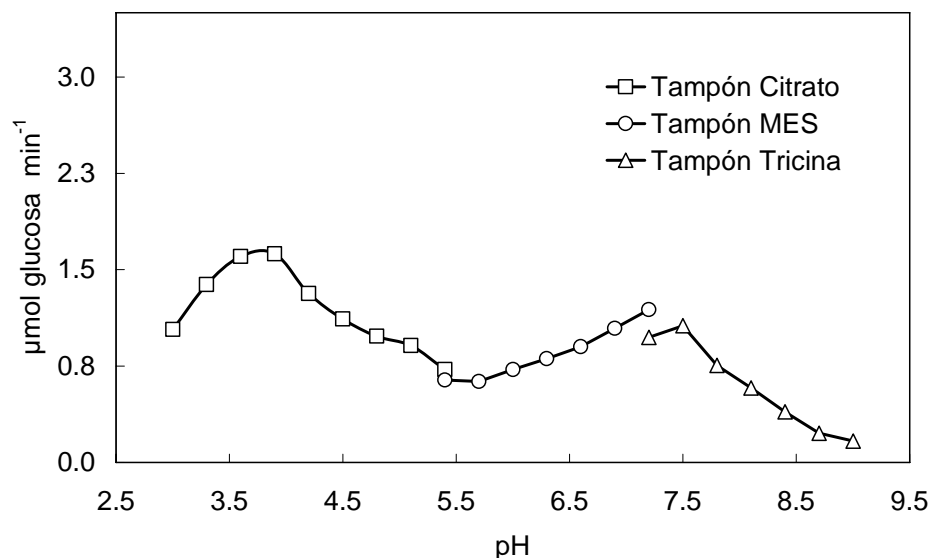


Figura 5.11. Actividad de la trehalasa de nódulos de *M. sativa* a diferentes pH. La mezcla de reacción contenía los tampones a una concentración 50 mM: □ citrato-NaOH (pH 3.0-5.4), O MES-KOH (pH 5.4-7.2), Δ tricina-KOH (pH 7.2-9.0).

5.2.2.2. Estabilidad térmica y temperatura óptima

La temperatura óptima se determinó comparando la tasa de hidrólisis de trehalosa a temperaturas comprendidas entre 25°C y 75°C. Este experimento mostró que la temperatura óptima de la trehalasa es de 60°C (Fig. 5.12). La enzima fue relativamente estable al aumento de temperatura ya que mantuvo su actividad casi intacta después de 30 min de preincubación sin sustrato a 40°C, sin embargo, la preincubación a 45°C y 50°C provocó una pérdida del 15% y 20% de actividad respectivamente, llegándose a casi la inactivación completa a los 60°C.

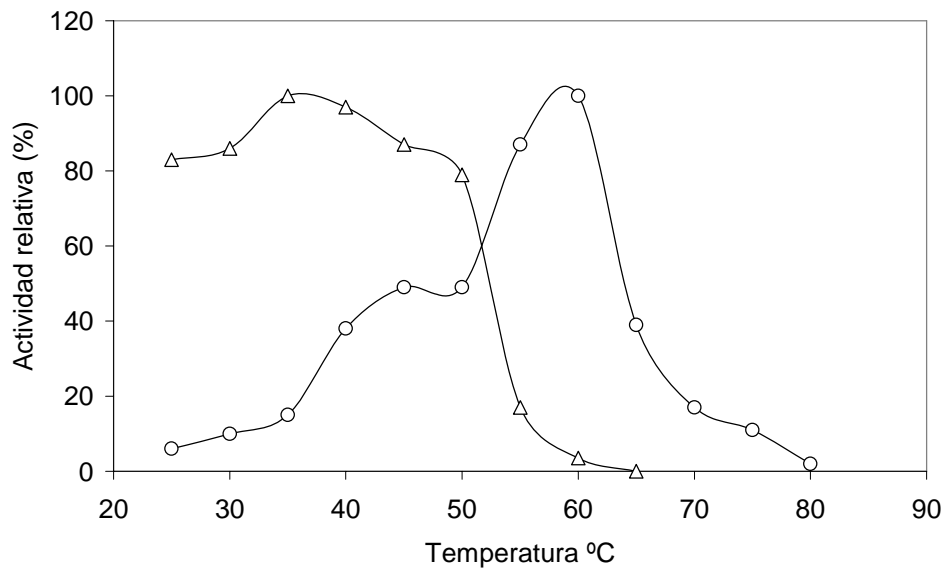


Figura 5.12. Termostabilidad (Δ) y temperatura óptima (O) de la trehalasa nodular de *M. sativa*. Para la determinación de la termostabilidad, la enzima fue preincubada en MES-KOH pH 6.3 durante 30 min a las temperaturas indicadas, después se añadió a la mezcla trehalosa 100 mM y se midió la actividad

5.2.2.3. Especificidad de sustrato

La trehalasa purificada de nódulos de *M. sativa* no tuvo una alta especificidad por el sustrato, ya que como se muestra en la tabla 5.5, fue capaz de hidrolizar los enlaces α -glucosidos de la sacarosa, celobiosa, lactosa, rafinosa, melobiosa, y débilmente el de la maltosa en las proporciones que se especifican en la tabla respecto de la trehalasa.

Tabla 5.5. Especificidad de sustrato para la trehalasa parcialmente purificada de nódulos de *M. sativa*

Sustratos (50 mM)	Actividad (%)
Trehalosa	100.0
Sacarosa	87.2
Celobiosa	70.2
Lactosa	57.4
Rafinosa	57.4
Melobiosa	53.2
Turanosa	38.3
Maltosa	25.5

5.2.2.4. Activadores e inhibidores

Se ensayó el efecto de posibles activadores o inhibidores de la trehalasa, como se muestra en la tabla 5.6. Todos los iones metálicos ensayados excepto el Fe^{3+} y el Hg^+ incrementaron la actividad, siendo este incremento del 44% con el Mn^{2+} y del 34% con el Co^{2+} . Solo actuaron como inhibidores de la actividad enzimática en este estudio el Fe^{3+} , que redujo la actividad un 70% y el Hg^+ que la inactivó completamente.

Tabla 5.6. Influencia de varios efectores sobre la trehalasa de nódulos de *M. sativa*. La actividad relativa se expresó en porcentaje de actividad en ausencia de efectores

Efectores (5 mM)	Actividad (%)
Control	100
Mn^{2+}	144
Co^{2+}	134
Mg^{2+}	131
Na^+	122
EDTA	119
Ca^{2+}	119
Li^+	116
K^+	113
Fe^{3+}	31
Hg^+	0

5.3. Clonación y análisis de expresión del gen que codifica para la trehalasa nodular de *M. truncatula*

5.3.1. Clonación del ADNc

La clonación se realizó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos *MtTre1* y *MtTre2* (material y métodos 4.8.2.6.) a partir de ADNc obtenido de ARN de nódulos, hojas y raíces de *M. truncatula*. La amplificación del ADNc mediante PCR se realizó de forma independiente para cada tejido y obtuvo una banda idéntica para los tres tejidos estudiados. La banda obtenida se clonó en el vector comercial pPCRScripT (Stratagene) en el sitio *SrfI* (*SmaI*) del vector siguiendo los protocolos de ligación y transformación recomendados por el fabricante (Figura 5.13). Los clones obtenidos fueron secuenciados, usando oligonucleótidos (universales y reverso) presentes en el plásmido de clonación, para comprobar la veracidad de los mismos. El tamaño exacto de las bandas que se obtuvieron fue de 774 pares de bases (Figura 2).

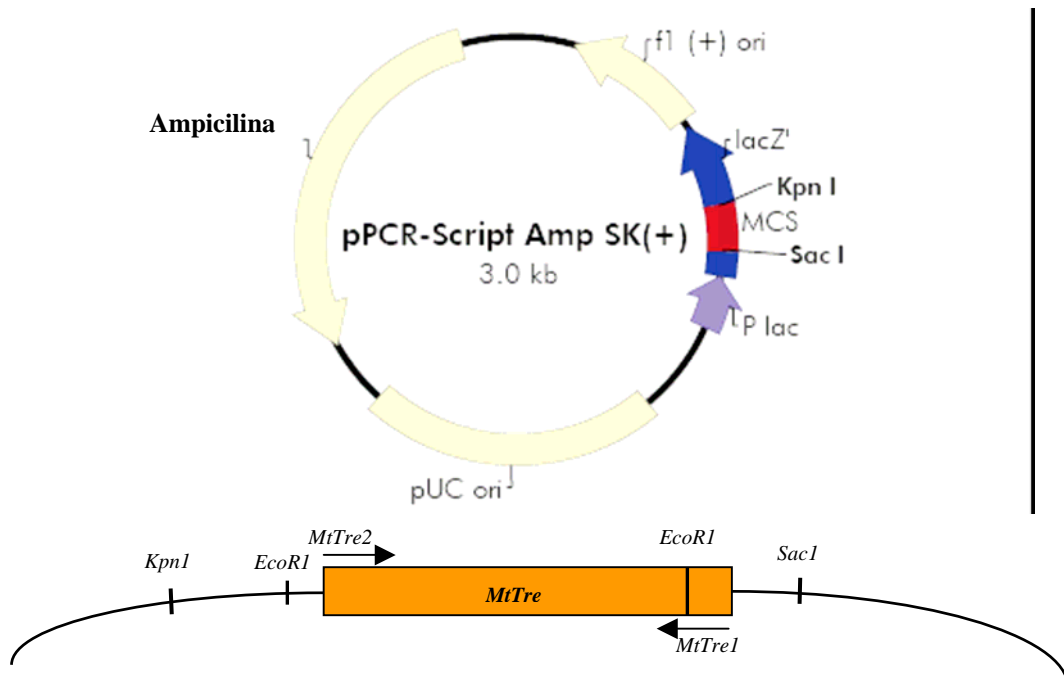


Figura 5.13. Esquema de la clonación de las bandas amplificadas a partir de los ADNc de los diferentes tejidos. Todos los clones obtenidos tenían la misma orientación respecto del sitio *EcoRI* del vector.

Resultados

La secuencia de nucleótidos amplificada fue idéntica en nódulos, raíz y hoja sin encontrarse diferencias a lo largo de toda la secuencia. El análisis de las correspondientes secuencias de aminoácidos (Figura 5.14) reveló que se trataba de una proteína con alta homología con proteínas de trehalasas lo cual nos indicó que la amplificación y clonación se habían llevado a cabo de forma correcta.

Siguiendo la nomenclatura de otras trehalasas de plantas, designamos *MTTRE1* para el gen trehalasa de *Medicago truncatula*. La secuencia de nucleótidos contiene un marco de lectura abierto de 258 aminoácidos, y fue depositada en un banco de genes con el número de acceso EF012278.

```
1  TATGAGATAT ACGCTAGGAC TGGTGATATA GAATTAGTTA AAAGGTCTCT GCCTGCACTA
61 CTGAAAGAGC ACGAGTTTTG GAATTCCAGAT ATACATAAAG TGAACATTTT GGATGCTCAA
121GGTTGCACTC GCACTTTAAA TCGCTATTAT GCAAGGTGGA ACAAACCAAG GCCAGAATCG
181TCCACAATGG ACAAGGCATC TGCTTCCAAG TTCACGACTG TTTCAGAAAA ACAACATTTT
241TACCGTGAAC TAGCATCAGC TGCTGAATCA GGATGGGATT TCAGCACAAAG ATGGATGAGA
301CACCTCCCA ACTTCACAAC ATTGTCTACA ACATCAGTGA TACCTGTTGA TTTAAATGCA
361TTTCTACTTG GGATGGAACT TAATATTGCC TTCTTTGCAA ATGTTACTGG AGATAATAGG
421ACTGCTGAAC ACTTCCTGCA AATTTCTGAT GTTAGAAAGG AGGCAATTAA CTCGGTTTTTC
481TGGAATGCAA ACATGAAACA ATGGCTTGAT TCCTGGCTCA GCAATACCAC ACATGAGAAG
541GTTCAAGTTT GGGATACCCT GCACCAGAAT CAAAATGTAT TTGCTTCCAA TTTTGTTCCT
601TTGTGGATGA AGCCATTTTA CTCAGATGCT TTGCTAGTGA GTGATGTTCT TAAAAGTCTC
661AAAACCTCTG GCCTGCTTCG TGCCGCTGGA GTTGCAACTT CTTTGAGTGA TTCAGGACAG
721CAGTGGGACT TCCCAAATGG TTGGGCTCCA CTTCAACACA TGTTAGTTGA AGGC
```

Figura 5.14. Secuencia nucleotídica parcial del ADNc de *MTTRE1*

```
1  YEIYARTGDI ELVKRSLPAL LKEHEFWNSD IHKVNISDAQ GCTRTLNRYY ARWNKPRPES
61  STMDKASASK FTTVSEKQHF YRELASAAES GWDFSTRWMR HPPNF'TTLST TSVIPVDLNA
121 FLLGMELNIA FFANVTGDNR TAEHFLQISD VRKEAINSVF WNANMKQWLD SWLSNTTHEK
181 VQVWDTLHQN QNVFASNFVP LWMKPFYSDA LLVSDVLKSL KTSGLLRAAG VATSLSDSGQ
241 QWDFPNGWAP LQHMLVG
```

Figura 5.15. Secuencia aminoacídica parcial de la proteína *MTTRE1*

```

ATTRE1 YYTNRSQPPLLSSMVEIYNVTKDEELVRKAIPLLLKEYEFWNSGKHKV
GMTRE1 -----YEIYNSTGDVELVKRSLPALLKEYEFWNSDIHKLT
MTTRE1 -----YEIYARTGDIELVKRSLPALLKEHEFWNSDIHKVN
OSTRE1 -----VLDIYMATGMAFVRRVFPSSLKEHSFWMSEVHNVA

ATTRE1 IRDANGYDHVLSRYYAMWNKPRPESSVFDEESASGFSTMLEKQRTHRDIA
GMTRE1 ILDAQCCTHTLNRYYAKWDKPRPESSIMDKASASNFSSVSEKQQFYRELA
MTTRE1 ISDAQGCTRTLNRYYARWNKPRPESSIMDKASASKFTTVSEKQHFYRELA
OSTRE1 VMDNHGRVHNLSTRYQAMWNKPRPESSATIDEEFASKLSTAA-KEKVFHQVA

ATTRE1 TAAESGCDGFSTRWMRDPPNFTTMAITTSVVPVDLNVFLKMELDIAFMMKV
GMTRE1 SAAESGWDGFSTRWMRNPPNFTTLAITSVIPVDLNAFLLGMELNIALFAKV
MTTRE1 SAAESGWDGFSTRWMRHPPNFTTLLSTTSVIPVDLNAFLLGMELNIAFFANV
OSTRE1 STAETGWDGFSSRWMRDSTDMTTLTSCIIIPVDLNTFLLKMEQDLAFAKLV

ATTRE1 SGDQNGSDRFVKAISKAREKAFQTVFWEKAGQWLDYWLS----SSGENQ-
GMTRE1 TGDNSTAERFLENSDLRKKAMDSIFWNANKKQWLDYWLS-S-TCEEVHVW
MTTRE1 TGDNRTAEHFLOISDVRKEAINSVFWNANMKQWLDYWLSNT-THEKVQVW
OSTRE1 IGESTTSEIFSEASKARHNAIDSVLWNADMEQWLDYWLPTDGNCQGVYQW

ATTRE1 -----NTNVFASNFAPLWINSINS-----DENLVKKVVTALKNSGLIAP
GMTRE1 KNEHQNONVFASNFVPLWMPFYS-----DTSLVSSVVESLKTSGLLRD
MTTRE1 DTLHQNONVFASNFVPLWMPFYS-----DALLVSDVLKSLKTSGLLRA
OSTRE1 KSISQNRRAIFASNFVPLWLNQAHSGLEQFVDEAKSVRVMRSLQKSGLLQP

ATTRE1 AGIITSLTNSGQQWDSPNGWAPLQHEMIVTGL
GMTRE1 AGVATSLTDSGQQWDFPNGWAPLQHMLVEGL
MTTRE1 AGVATSLSDSGQQWDFPNGWAPLQHMLVG--
OSTRE1 AGIATSLSNTGQQWDFPNGWAPLQHMLVEGL

```

Figura 5.16. Alineamientos de las secuencias aminoacídicas de trehalasas de *Arabidopsis thaliana* (ATTRE1), *Glycine max* (GMTRE1), *Medicago truncatula* (MTTRE1) y *Oryza sativa* (OSTRE1).

```

GMTRE1 YEIYNSTGDVELVKRSLPALLKEYEFWNSDIHKLTILDAQCCTHTLNRYY
MTTRE1 YEIYARTGDIELVKRSLPALLKEHEFWNSDIHKVNLSDAQGCTRTLNRYY

GMTRE1 AKWDKPRPESSIMDKASASNFSSVSEKQQFYRELASAAESGWDGFSTRWMR
MTTRE1 ARWNKPRPESSIMDKASASKFTTVSEKQHFYRELASAAESGWDGFSTRWMR

GMTRE1 NPPNFTTLAITSVIPVDLNAFLLGMELNIALFAKVTGDNSTAERFLENSD
MTTRE1 HPPNFTTLLSTTSVIPVDLNAFLLGMELNIAFFANVTGDNRTAEHFLOISD

GMTRE1 LRRKAMDSIFWNANKKQWLDYWLS-STCEEVHVWKNEHQNONVFASNFVP
MTTRE1 VRKEAINSVFWNANMKQWLDYWLSNT-THEKVQVWDTLHQNONVFASNFVP

GMTRE1 LWMKPFYS DTSLVSSVVESLKTSGLLRDAGVATSLTDSGQQWDFPNGWAP
MTTRE1 LWMKPFYS DALLVSDVLKSLKTSGLLRAAGVATSLSDSGQQWDFPNGWAP

GMTRE1 LQHMLVEG
MTTRE1 LQHMLVG-

```

Figura 5.17. Alineamientos de las secuencias aminoacídicas de trehalasas de *Glycine max* (GMTRE1) y *Medicago truncatula* (MTTRE1).

La comparación de la secuencia deducida de aminoácidos de MTTRE1 con las secuencias presentes en las bases de datos reveló que las mejores identidades se obtuvieron con trehalasas de plantas y concretamente con trehalasas de plantas, concretamente con ATTRE1 de *Arabidopsis*, con OSTRE1 de arroz y con GMTRE1 de soja (Figura 5.16). En todos ellos se observa un alto grado de conservación a lo largo de la proteína.

Sin embargo, la trehalasa de *M. truncatula* presenta la mejor identidad con la trehalasa de soja (*Glycine max*), al menos en la secuencia parcial de 258 aminoácidos analizados (Figura 5.17).

En la figura 6 se muestra un árbol filogenético construido con secuencias parciales de proteínas de diferentes trehalasas pertenecientes a organismos de diferentes reinos. El análisis muestra la existencia de 3 subgrupos principales encontrándose todas las de plantas dentro del mismo agrupamiento.

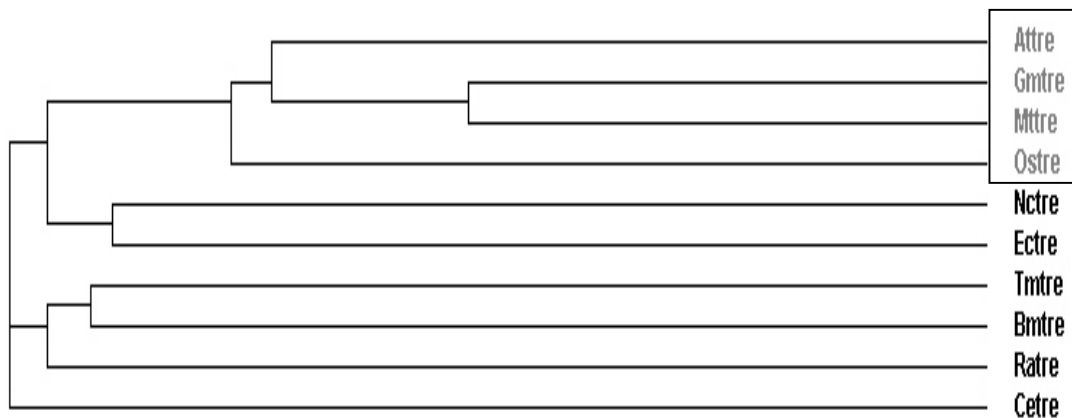


Figura 5.18. Árbol filogenético de las secuencias deducidas de aminoácidos de las trehalasas de diferentes organismos: *Arabidopsis thaliana* (ATTRE), *Glycine max* (GMTRE), *Medicago truncatula* (MTTRE), *Oryza sativa* (OSTRE), *Neurospora crassa* (NCTRE), *Escherichia coli* (ECTRE), *Tenebrio molitor* (TMTRE), *Bombix mori* (BMTRE), *Rattus norvegicus* (RATRE), *Caenorhabditis elegans* (CETRE). El recuadro agrupa a las trehalasas de plantas.

Las identidades (en porcentaje) encontradas con diferentes trehalasas de otros organismos se muestran en la tabla 5.7. MTTRE1 se encuentra altamente conservada y presentó una alta identidad con las trehalasas de

Arabidopsis (58%) y *Oryza sativa* (52%). Identidades menores también se observaron con otros organismos como *Caenorhabditis elegans* (37%), *Mus musculus*, *Homo sapiens* (34%), *Escherichia coli* y *Bombix mori* (32%), sin embargo la mejor identidad se encontró con *G. max* (82%), siendo idéntica casi a lo largo de toda la secuencia. Esta última observación podría sugerir que las trehalasas de leguminosas comparten un ancestro común cercano.

Tabla 5.7. Identidades de proteínas de trehalasa de diferentes organismos con la de *M. truncatula*.

Organismo	% Identidad
<i>Glycine max</i>	82
<i>Arabidopsis</i>	58
<i>Oryza sativa</i>	52
<i>Caenorhabditis elegans</i>	37
<i>Mus musculus</i>	34
<i>Homo sapiens</i>	34
<i>Escherichia coli</i>	32
<i>Bombix mori</i>	32

5.3.2. Expresión del gen *MTTRE1* en diferentes tejidos de *M. truncatula*

La expresión de *MTTRE1* en los diferentes tejidos de *M. truncatula* fue analizada mediante RT-PCR a partir de preparaciones de ARN de los tejidos a estudiar (nódulos, raíces y hojas). Además se incluyó el gen constitutivo *Rib18S* (ARN ribosómico 18 s) y un gen específico de tejido *MTENOD40* (*Enod 40*) como controles. La RT-PCR se realizó alcanzando el mismo número de ciclos para los tres genes. La figura 5.19 muestra que *MTTRE1* se expresa en nódulos con relativa abundancia donde parece estar inducido con respecto a las raíces y hojas. El ribosómico 18s, utilizado como control de expresión constitutivo, mostró una expresión similar en todos los tejidos y *Enod40*, que fue usado como control de expresión tisular, está altamente inducido en nódulos tal y como se esperaba.

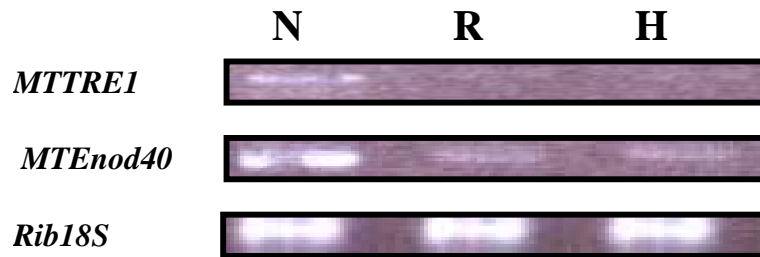


Figura 5.19. Análisis de la expresión de *MTTRE1* en hoja (H), raíz (R) y nódulo (N) de *M. truncatula*. La expresión génica se analizó mediante RT-PCR. Como controles de expresión génica se utilizaron el ADN ribosómico 18S (constitutivo) y *Enod40* (expresión específica de tejido).

5.3.3. Expresión de *MTTRE1* en nódulos de *M. truncatula* en condiciones de salinidad

La expresión de *MTTRE1* se analizó mediante PCR cuantitativa a tiempo real en ARN aislado de nódulos de plantas de *M. truncatula* que previamente fueron tratadas con dosis 150 y 250 mM de NaCl durante 2, 4 y 8 horas incluyéndose en cada tiempo un control al que no se le aplicó sal.

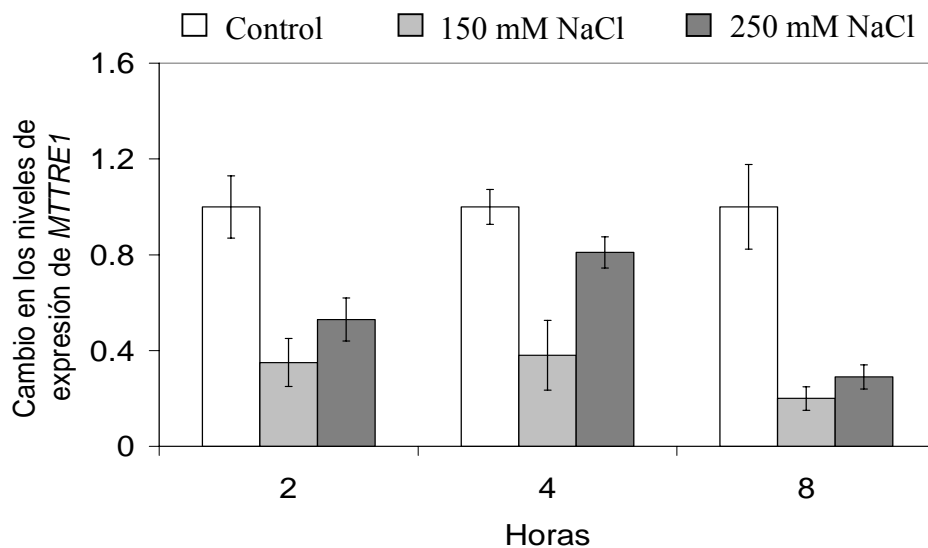


Figura 5.20. Efecto de la salinidad sobre la expresión del gen *MTTRE1* en nódulos de *M. truncatula*. El ARN se extrajo de nódulos de plantas tratadas con 0, 150 y 250 mM NaCl durante 2, 4 y 8 horas. Los ARNs fueron reverso transcritos y la expresión se ensayó mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real usando oligonucleótidos gen-específicos para *MTTRE1* y el factor de elongación *EF1-α*. El cambio inducido en la expresión génica de *MTTRE1* por la salinidad se calculó usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Como se muestra en la figura 5.20, los niveles de transcripción del gen *MTTRE1* disminuyeron con el tratamiento salino en los tres tiempos estudiados, siendo este descenso del 65% a las 2 y 4 horas con 150 mM NaCl y del 80% a las 8 horas. Con la dosis 250 mM de NaCl, el descenso no mostró una progresión en función del tiempo siendo del 50%, 20% y 80% a las 2, 4 y 8 horas respectivamente respecto de los nódulos control.

6. Metabolismo de la trehalosa en *Bradyrhizobium japonicum* en vida libre y en simbiosis con *Glycine max* en ambiente salino

Un primer tipo de experimento se realizó con *B. japonicum* USDA 110 en vida libre, en el que se evaluó el crecimiento en condiciones control y de salinidad (40 mM NaCl) mediante D.O. y recuento de UFC (fig. 6.1.). Además, se determinó el contenido de trehalosa durante el crecimiento del cultivo (fig. 6.2.), y las actividades enzimáticas implicadas en su síntesis con 0 y 40 mM NaCl a los 7 días de cultivo (tabla 6.1.).

En el segundo tipo de experimento, plantas de soja inoculadas con *B. japonicum* USDA 110 y tratadas con 100 mM NaCl dos semanas previas a su cosecha, se recolectaron en floración, y se procedió a estudiar el crecimiento y nodulación de la planta, y a la obtención de bacteroides del nódulo. Para ello se separó la fracción citosólica y bacteroidal y se determinaron las actividades trehalasa, trehalosa sintasa, maltooligosiltrehalosa sintasa y trehalosa-6 fosfato sintasa.

6.1. En vida libre

6.1.1. Curvas de crecimiento

En la figura 6.1 se representan las curvas de crecimiento de *B. japonicum* expresadas como D.O. y UFC con 0 y 40mM NaCl.

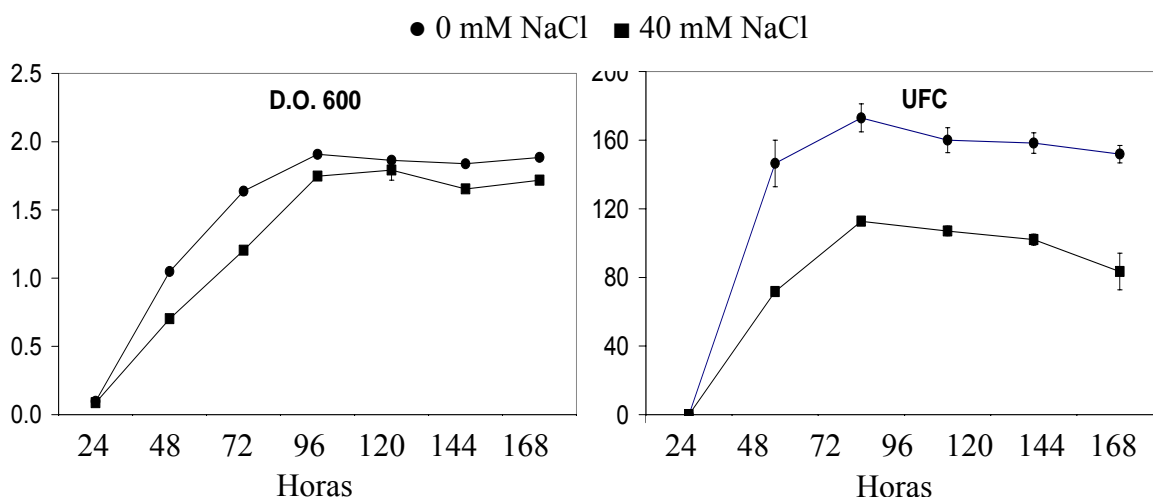


Figura 6.1. Curvas de crecimiento de *B. japonicum* USDA 110 en condiciones control y tratadas con 40 mM NaCl expresada en densidad óptica (D.O.) y unidades formadoras de colonias (UFC). Cada punto es la media de 3 réplicas \pm SE.

Entre las 24 y 72 horas, los cultivos se encontraban en fase de crecimiento logarítmico, alcanzando la fase de crecimiento estacionario a las 96 horas de cultivo.

La mayor diferencia entre la D.O. de cultivos control y con sal se encontró durante la fase de crecimiento logarítmico, cuando la D.O. de los cultivos con sal fue entre el 10% y el 30% menor. Durante la fase de crecimiento estacionario, esta diferencia se redujo, oscilando entre el 4% y el 9% a los 168 horas de cultivo.

Las curvas de crecimiento realizadas mediante recuento de colonias (UFC), mostraron que a las 96 horas de cultivo se obtiene el máximo nivel de células viables, detectándose a las 168 horas un 12% menos de colonias. El mayor efecto de la salinidad se observa a las 72 horas (fase logarítmica) con un 50% menos de colonias en los cultivos con sal. Durante la fase estacionaria de crecimiento, las diferencias entre los control y con sal oscilaron entre el 35% y el 45% a las 168 horas.

6.1.2. Contenido de trehalosa

El contenido de trehalosa tanto si se expresa en función de la D.O. como del número de UFC (figura 6.2), se incrementa durante los 7 días de cultivo, aunque el hecho más destacable es la diferencia en el contenido de trehalosa entre los control y con sal, en los que se observa un mayor contenido.

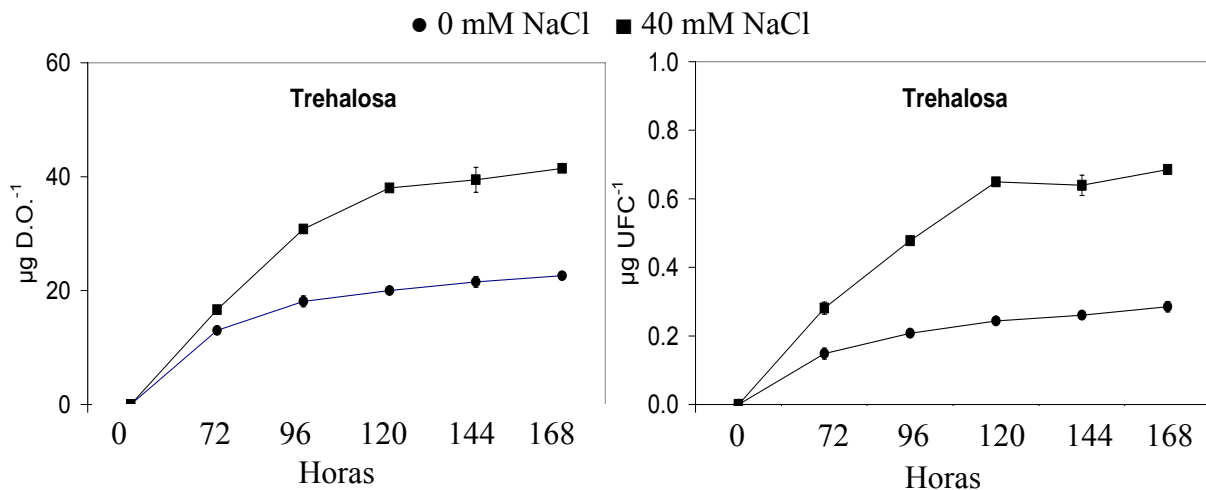


Figura 6.2. Contenido de trehalosa en *B. japonicum* USDA 110 en condiciones control y tratadas con 40 mM NaCl expresada en $\mu\text{g D.O.}^{-1}$ y $\mu\text{g UFC}^{-1}$. Cada punto es la media de 3 réplicas \pm SE.

Cuando el contenido de trehalosa se expresa por D.O., esta diferencia oscila entre el 30% a las 72 horas y el 85% a las 120, 144 y 168 horas, mientras que cuando se expresa en UFC, la diferencia aumenta, oscilando entre el 90% a las 72 horas y alrededor de 2.5 veces más en los otros tiempos de muestreo.

6.1.3. Actividades enzimáticas

Se determinaron las actividades trehalosa-6 fosfato sintasa, maltooligosiltrehalosa sintasa y trehalosa sintasa en *B. japonicum* USDA 110 en vida libre, exponiéndose los resultados en la tabla 6.1 y el análisis de varianza en la tabla A 6.7. del apéndice.

Las tres vías de síntesis de trehalosa conocidas (vía TPS, MOTS y TS), fueron activas en *B. japonicum* USDA 110 en vida libre, siendo la ruta mayoritaria la catalizada por la actividad trehalosa sintasa, seguida de la actividad trehalosa-6 fosfato sintasa. La actividad maltooligosiltrehalosa sintasa solo representó un 3.7% de la actividad trehalosa sintasa.

La salinidad indujo un aumento de la biosíntesis de trehalosa en la bacteria en vida libre, que se manifestó con un incremento en la actividad de las tres vías de síntesis: 80% MOTS, 40% TS y 60% TPS

Tabla 6.1. Actividad trehalosa-6 fosfato sintasa (TPS) expresada en nmol UDP mg⁻¹prot h⁻¹, maltooligosiltrehalosa sintasa (MOTS) y trehalosa sintasa (TS) expresadas en nmol trehalosa mg⁻¹ prot h⁻¹ en *B. japonicum* USDA 110.

NaCl (mM)	TPS	MOTS	TS
0	19.714 ^b	1.232 ^b	32.921 ^a
40	31.156 ^a	2.200 ^a	46.941 ^a
MDS (P ≤ 0.05)	6.023	0.934	11.559

6.2. Simbiosis *G. max*-*B. japonicum*

6.2.1. Análisis de crecimiento

El peso seco parte aérea, peso seco de la raíz, peso seco de la planta y relación raíz/parte aérea que se representan en la figura 6.3, los datos numéricos se exponen en la tabla A 6.1 del apéndice.

El PSPA experimentó un descenso del 65% como consecuencia del tratamiento salino que se reflejó en el PSP, la raíz presentó una menor sensibilidad a la salinidad con una disminución del 45%, como consecuencia de este comportamiento, la relación RPA, aumentó en respuesta a la salinidad el 70%.

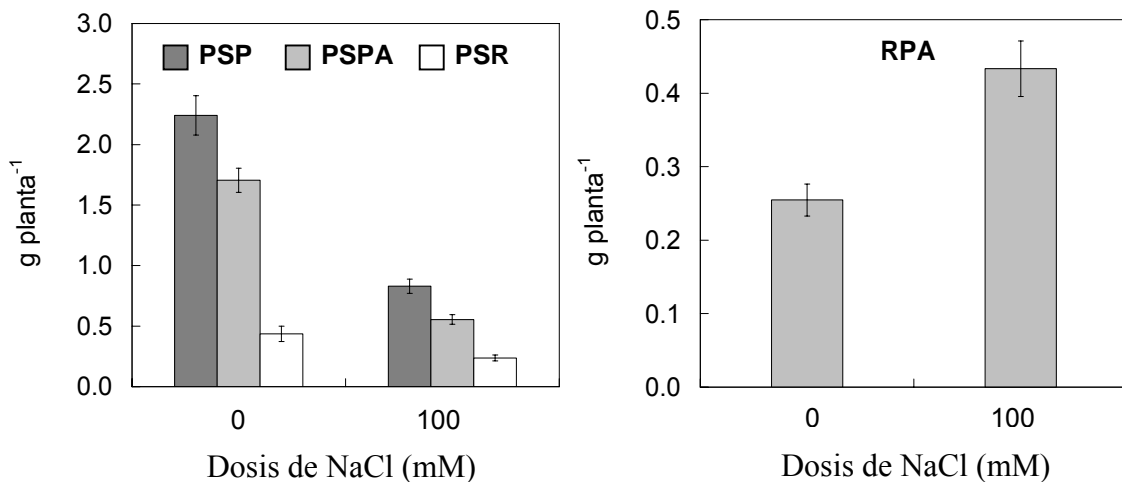


Figura 6.3. Peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de raíz (PSR), peso seco de planta (PSP) y relación raíz/parte aérea (RPA) de plantas de soja inoculadas con *B. japonicum* USDA 110 y tratadas con 0 y 100 mM NaCl a las 6 semanas de cultivo. Cada barra es la media de 6 réplicas \pm SE.

6.2.2. Fijación de nitrógeno

Relacionado con el proceso de fijación de nitrógeno, se determinó la masa nodular, así como su relación con el peso seco de parte aérea (PNN), tal como se expone en la figura 6.4. Los datos numéricos de estos parámetros y su análisis de varianza están reflejados en las tablas A 6.3 y A 6.4 del apéndice.

El peso seco de nódulos mostró una disminución del 60% con la dosis 100 mM NaCl, lo que indica una inhibición paralela al descenso del crecimiento de la planta. El peso normalizado de nódulos aumentó ligeramente con la salinidad, aunque esta variación no fue estadísticamente significativa, lo que indica que la salinidad afectó de igual manera a la biomasa de la parte aérea de la planta y a la nodular.

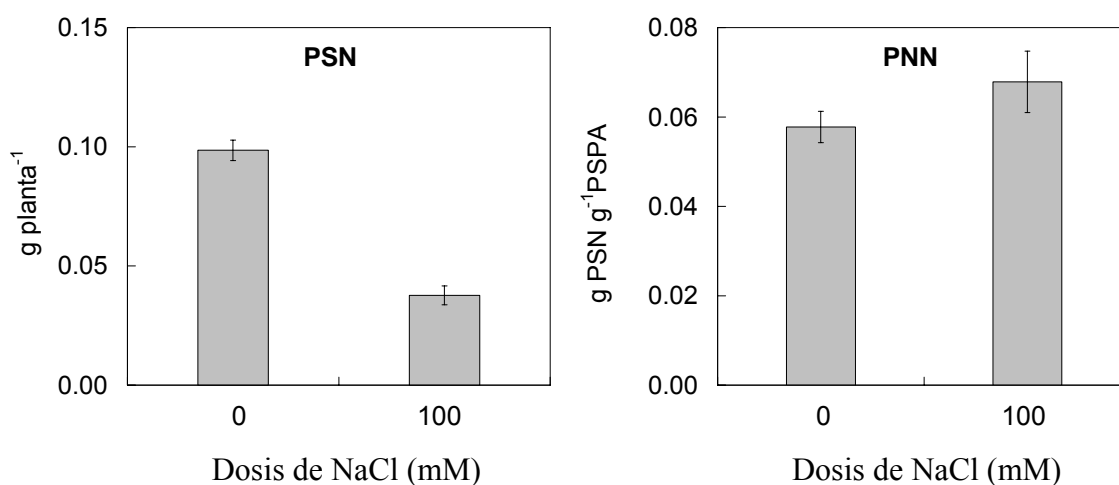


Figura 6.4. Peso seco de nódulos (PSN) y peso normalizado de nódulos (PNN) de plantas de soja inoculadas con *B. japonicum* USDA 110 y tratadas con 0 y 100 mM NaCl a las 6 semanas de cultivo. Cada barra es la media de 6 réplicas \pm SE.

6.2.3. Metabolismo de la trehalosa: bacteroide y citosol nodular

En la figura 6.5 se muestran las actividades enzimáticas implicadas en la síntesis de trehalosa, comparándose las actividades obtenidas en bacteroides aislados de nódulos de soja y en *B. japonicum* USDA 110 en vida libre, también se expone la actividad trehalasa en el citosol nodular. Los datos numéricos de estas actividades enzimáticas y el análisis de la varianza se localizan en las tablas de la A 6.5. a la A 6.8. del apéndice (ambas inclusive).

Las tres rutas de biosíntesis de trehalosa estudiadas (vía TPS, MOTS y TS) fueron activas en bacteroides al igual que en la bacteria en vida libre, siendo la ruta mayoritaria la catalizada por la actividad trehalosa sintasa,

que representó el 70% del total de la actividad biosintética de trehalosa en bacteroides. La actividad maltooligosiltrehalosa sintasa fue la segunda enzima más activa en bacteroides, ya que representó el 30% del total de la biosíntesis, mientras que en la bacteria en vida libre solo representó un 2%, lo que indica que esta actividad se induce en el proceso de nodulación. La actividad trehalosa-6 fosfato sintasa, por el contrario, se inhibió durante el proceso de nodulación, representando tan solo el 1% de la síntesis de trehalosa en el bacteroide, mientras que en la bacteria en vida libre fue la segunda más activa.

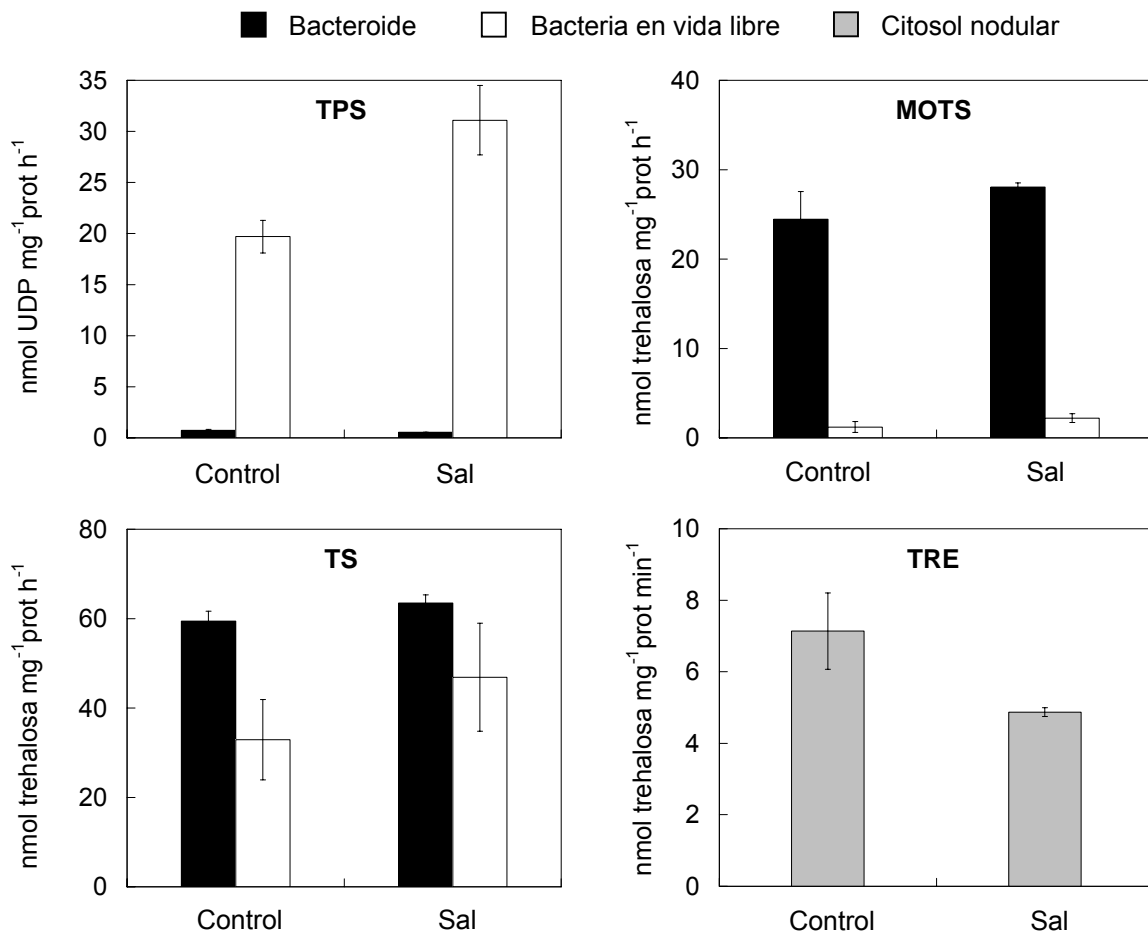


Figura 6.5. Actividad trehalosa-6 fosfato sintasa (TPS), maltooligosiltrehalosa sintasa (MOTS) y trehalosa sintasa (TS) en *B. japonicum* USDA 110 en vida libre tratadas con 0 y 40 mM NaCl, en bacteroides de nódulos de soja con 0 y 100 mM NaCl, y actividad trehalasa (TRE) en citosol nodular de soja. Cada barra es la media de 3 réplicas \pm SE.

En bacteroides el efecto de la salinidad fue menor y más desigual, en comparación con la bacteria en vida libre, incrementándose las actividades MOTS y TS un 15% y 7% respectivamente, y disminuyendo la TPS un 30%.

La actividad trehalasa del citosol nodular, experimentó una inhibición por la sal del 30%, presentando un comportamiento similar al detectado en nódulos de *L. japonicus* y *M. truncatula* (experimentos 1 y 2).

6.2.4. Contenido de azúcares del nódulo

El carbohidrato mayoritario en nódulos de soja fue la sacarosa (figura 6.6), con una proporción 5.6 y 4 veces mayor que trehalosa y maltosa, y un 62% mayor que glucosa. Estas proporciones se mantuvieron en condiciones de salinidad para la trehalosa, puesto que la diferencia entre sacarosa, y maltosa y glucosa en estas condiciones, aumentaron a 10 y 2.3 veces. Esto se debió a que en respuesta al estrés salino, el contenido de sacarosa se incrementó un 60%, mientras que la glucosa apenas aumentó con la salinidad (10%), y la maltosa decreció un 35%. La trehalosa por el contrario, experimentó un incremento con la salinidad similar al de la sacarosa (70%).

La concentración de maltosa, que decreció en condiciones de salinidad, no afectó a la actividad TS (figura 6.5), que se mantuvo constante independientemente de la concentración de sustrato.

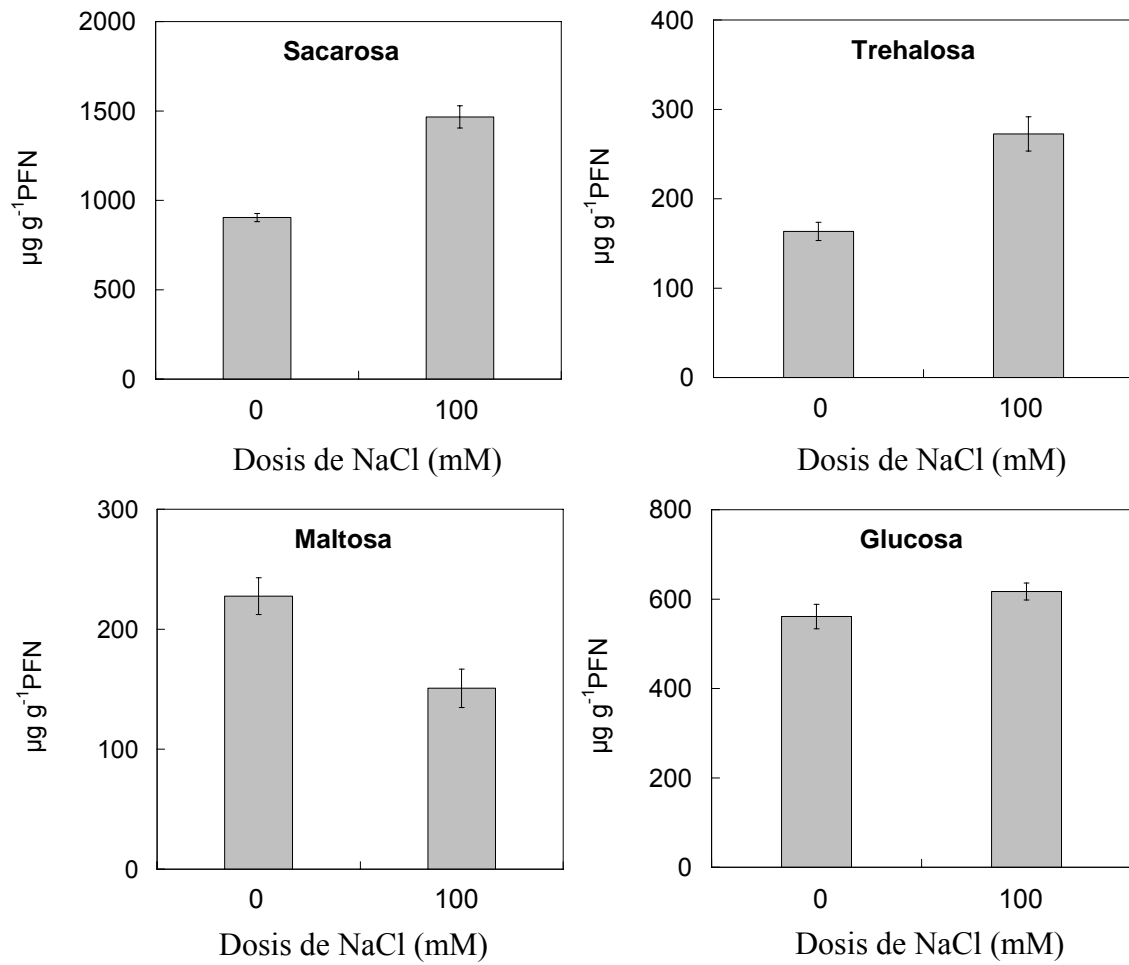


Figura 6.6. Contenido de sacarosa, trehalosa, maltosa y glucosa y en nódulos de plantas de soja inoculadas con *B. japonicum* USDA 110 y tratadas con 0 y 100 mM NaCl a las 6 semanas de cultivo. Cada barra es la media de 3 réplicas \pm SE.

V. DISCUSIÓN

1. Efecto del estrés salino en la simbiosis *M. truncatula*-*S. meliloti* y *L. japonicus*-*M. loti* desde el inicio del cultivo (*long-term*)

La salinidad provoca una disminución del crecimiento y desarrollo de las plantas, y estas desarrollan procesos y estrategias morfológicas y fisiológicas que les permiten sobrevivir en esas condiciones. La capacidad de adaptación a la salinidad puede variar considerablemente entre diferentes especies de leguminosas (Läuchli, 1984), por lo que la sensibilidad y/o tolerancia a la salinidad de *M. truncatula* y *L. japonicus* cultivadas en condiciones simbióticas es diferente.

En las dos especies estudiadas, la sal provocó una disminución significativa del peso seco de la planta (fig. 1.1), que afectó tanto al peso seco de parte aérea como de raíz. Resultados similares se han obtenido con leguminosas como haba (Zahran y Sprent 1986), soja (Grattan y Maas 1988), garbanzo (Soussi *et al.*, 1999) y guisante (Cordovilla *et al.*, 1999). En este estudio se evidencia que tanto el peso seco de parte aérea como de raíz fueron más severamente afectados en *M. truncatula* que en *L. japonicus*.

El crecimiento de la raíz respecto de la parte aérea, definido aquí como relación raíz/parte aérea (RPA), se ha considerado como un aspecto morfológico que influye en el rendimiento o eficiencia de la planta en cuanto la raíz es un sumidero de carbohidratos procedentes de la hoja. En este trabajo se observa que en *L. japonicus* la disminución del peso seco de raíz es igual a la disminución de la parte aérea, lo que explica que la relación RPA se mantenga constante en todos los tratamientos, mientras que en *M. truncatula* una mayor sensibilidad de la raíz a la salinidad provoca una disminución de la relación RPA. Este resultado contrasta con el obtenido con leguminosas de grano como *Vicia faba* (Cordovilla *et al.*, 1994), *Cicer arietinum* (Soussi *et al.*, 1998) y *Phaseolus vulgaris* (Khadri *et al.*, 2006) en las que se produjo un incremento de la relación RPA en condiciones de salinidad, lo que evidenció una mayor sensibilidad de la parte aérea a la salinidad en estas especies. Wignarajah (1990) observó que la sal inhibía más el crecimiento de la parte aérea que de la raíz, relacionando este hecho con la hipótesis del equilibrio funcional de Munns (1993) según la cual, la inhibición de la actividad fisiológica de las hojas y el incremento de los requerimientos de la raíz para buscar agua y elementos minerales, necesarios para la planta, daría lugar a un desplazamiento de los nutrientes

hacia la raíz. También Ocaña *et al.*, (1998) establecen en un estudio realizado con diez genotipos de *Vicia faba*, que una elevada relación raíz/parte aérea puede estar relacionada con un bajo suministro de nutrientes.

El peso seco de nódulos se redujo significativamente con la dosis menor de sal en *L. japonicus* mientras que en *M. truncatula* la disminución no fue significativa (fig. 1.2). Esta disminución puede ser debido al efecto adverso en el proceso de infección, en el inicio de la nodulación, en el número de nódulos formados, o en el desarrollo del nódulo (Zahran 1999). En este sentido, el déficit hídrico inducido por la salinidad, podría condicionar el mayor efecto de la salinidad observado sobre los nódulos determinados, ya que en estos, es la expansión celular más que la división celular la responsable del incremento del tamaño del nódulo (Brown and Walsh, 1994).

Cuando el peso seco de nódulos se relaciona con el crecimiento de la parte aérea de la planta, se obtiene el peso normalizado de nódulo, considerado como un índice de crecimiento adecuado para relacionar el efecto de determinadas condiciones adversas sobre el crecimiento nodular en relación con el de la planta. El PNN es mayor en la simbiosis de *L. japonicus* que en la de *M. truncatula* (fig. 1.2), lo que indica una mayor eficiencia de los nódulos determinados de *L. japonicus* respecto de los de *M. truncatula*, otro aspecto destacable, es el aumento del peso normalizado de los nódulos de *M. truncatula* con la salinidad, lo que indica una pérdida de la productividad de la nitrogenasa por efecto de la sal que se refleja en una disminución de la parte aérea, mientras que la masa nodular permanece constante.

La actividad nitrogenasa aparente, total y la tasa de fijación del nitrógeno, es superior en *L. japonicus* que en *M. truncatula*, lo que indica una mayor capacidad fijadora de nitrógeno de los nódulos determinados frente a los indeterminados. El contenido de leghemoglobina también es superior en nódulos de *L. japonicus* mientras que en los de *M. truncatula*, estos resultados están de acuerdo con la observación de que en nódulos indeterminados, solo parte del tejido contiene leghemoglobina y es fijador de nitrógeno (Sprent, 1979; Hirsch, 1992). La reducción en el contenido de leghemoglobina en condiciones de salinidad en nódulos de *M. truncatula* podría limitar la difusión de oxígeno hacia los bacteroides, afectando al

proceso de respiración tal como observaron Fernández-Pascual *et al.* (1996) en nódulos de guisante en condiciones de estrés salino. Por el contrario, en *L. japonicus* el contenido de leghemoglobina aumentó, probablemente debido a la disminución de la masa nodular por el estrés osmótico inducido por la sal.

El efecto de la salinidad sobre la actividad nitrogenasa también presenta diferencias entre ambas especies, de manera que en *M. truncatula*, esta actividad solo se vio limitada por la dosis mayor de sal y en *L. japonicus* el descenso de la actividad fue proporcional al incremento de la salinidad en el medio. Se asume con estos resultados que en *L. japonicus* la nitrogenasa es más sensible a la salinidad que el proceso de nodulación, coincidiendo con lo descrito por Rao *et al.* (2002), que atribuyeron este fenómeno a un efecto directo del NaCl sobre la nitrogenasa. En *M. truncatula*, el mantenimiento de la masa nodular pudo ser responsable de un menor efecto de la salinidad sobre la nitrogenasa, ya que parece que la planta también puede regular el crecimiento de los nódulos aumentando su tamaño en condiciones adversas.

El fotosintato es transportado a los nódulos prioritariamente como sacarosa, que puede ser hidrolizada por la sacarosa sintasa e invertasa alcalina, activas en un amplio rango de especies de leguminosas como *Trifolium repens*, *Phaseolus vulgaris*, *Lotus corniculatus* y *Lupinus albus* (Gordon 1992) entre otras. En este trabajo se ha mostrado que las dos enzimas son activas en nódulos de *L. japonicus* y *M. truncatula*, aunque la actividad sacarosa sintasa fue menor en nódulos de *L. japonicus* (fig. 1.3), lo que podría compensarse con la mayor actividad invertasa detectada en los mismos. Ambas enzimas, presentan una mayor sensibilidad a la sal en nódulos de *M. truncatula*, mientras que en los de *L. japonicus* las diferencias por efecto de la sal fueron menores. Fernández-Pascual *et al.* (1996) mostraron que la salinidad inducía una disminución de la actividad sacarosa sintasa en nódulos de guisante, confirmándose más tarde por Gordon *et al.* (1997), que la sacarosa sintasa estaba implicada en la respuesta de nódulos de soja a un amplio rango de estreses abióticos entre los que se incluyen la salinidad. En estas condiciones, se observa como el descenso de la actividad sacarosa sintasa presenta una elevada correlación con la actividad nitrogenasa en ambas especies, de acuerdo con lo observado por Gordon *et al.* (1997) en nódulos de soja y Gálvez *et al.*

(2005) en nódulos de guisante en condiciones de estrés hídrico. La disminución de estas actividades enzimáticas, provocan una acumulación de azúcares en condiciones de estrés (González *et al.*, 1995). El metabolismo de los sustratos carbonados procedentes de la hidrólisis de la sacarosa, ha sido estudiado en nódulos determinados de *G. max* (Gordon 1992), *Vicia faba* (Ocaña *et al.*, 1999) y *P. vulgaris* (Lina 2000), sin embargo este metabolismo no se conoce tanto en nódulos indeterminados, aunque existen experimentos realizados en nódulos de *Cicer arietinum* (Soussi *et al.*, 1998).

Los niveles de actividad malato deshidrogenasa en el citosol nodular de *L. japonicus* y *M. truncatula* son semejantes a diferencia de la actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa, que presenta una actividad 5 veces mayor en nódulos de *L. japonicus* (fig. 1.3), esto podría relacionarse con la mayor actividad nitrogenasa observada en estos nódulos, ya que las actividades MDH y PEPC en el citosol nodular producen malato, que es el principal sustrato energético para el bacteroide (Garnazarska y Ratajczak 1999). La inhibición de estas actividades enzimáticas en condiciones de estrés salino se puede relacionar con la disminución de la actividad nitrogenasa, debido a un menor aporte de malato a los bacteroides. No obstante, en nódulos de guisante (Delgado *et al.*, 1993) y garbanzo (Soussi *et al.*, 1998) se observaron incrementos de la actividad PEPC por la salinidad, por lo que el estímulo de la vía PEPC-MDH por el estrés salino podría depender de la especie de leguminosa. En general, la máxima actividad de las enzimas formadoras de ácidos dicarbónicos PEPC, MDH e ICDH se detecta en nódulos de *L. japonicus*, y además fueron menos sensibles a la sal que las obtenidas en los de *M. truncatula*. En ambas leguminosas muestran una elevada correlación con la actividad SS y el contenido de sacarosa en el nódulo (tablas 1.6 y 1.7), que indicaría una correlación en la disponibilidad de este sustrato con la actividad de estas enzimas.

La concentración de trehalosa y la actividad trehalasa en nódulos de *L. japonicus* muestra una correlación negativa ($r=-0.70$), mientras que la actividad trehalasa nodular tiene una mayor correlación con la actividad nitrogenasa tanto en nódulos de *L. japonicus* como de *M. truncatula*, en lugar de con la disponibilidad de sustrato, tal como observaron Müller *et al.* (1994). Además, la actividad trehalasa es mayor en nódulos de *L. japonicus* respecto de los de *M. truncatula* (fig. 1.4). Estos resultados están de acuerdo con los de Müller *et al.* (1994), que demostró una mayor actividad trehalasa

en nódulos efectivos de soja respecto de nódulos inefectivos. Nuestra hipótesis de partida es que el control de la concentración de trehalosa en los nódulos se debe principalmente a la actividad trehalasa, ya que se trata de una proteína inducida en el nódulo (Müller *et al.*, 1995), aunque nuestros resultados indican que el control de la trehalosa en el nódulo puede estar influenciado por otros factores como la fijación de nitrógeno. La actividad trehalosa-6-fosfato sintasa, responsable de la síntesis de trehalosa en el nódulo, se inhibió por efecto de la salinidad en ambas especies (fig. 1.4), por lo que la acumulación de trehalosa observada en los nódulos en condiciones de salinidad, debió estar mediada por una serie de mecanismos hasta ahora desconocidos.

La sacarosa es el carbohidrato mayoritario en los nódulos de ambas especies del mismo modo que lo fue en nódulos de lenteja (Chopra *et al.*, 2003). Su concentración disminuye con el aumento de sal en el medio (fig. 1.5), resultados opuestos a los encontrados en nódulos de otras especies de leguminosas en condiciones de estrés salino, como en *Lupinus albus* (Fernández-Pascual *et al.*, 1996), y *Medicago sativa* (Fougère *et al.*, 1991); donde este incremento refleja el efecto osmorregulador de la sacarosa en muchas especies vegetales. En nódulos de soja (Müller *et al.*, 1996) y guisante (Gálvez *et al.*, 2005) en condiciones de estrés hídrico, las concentraciones de sacarosa se multiplicaron, junto con el descenso de las actividades enzimáticas que catalizan su hidrólisis, lo que justificaría su acumulación (González *et al.*, 1995). La reducción de la acumulación de sacarosa en nódulos de *L. japonicus* y *M. truncatula*, podría relacionarse con una reducción del flujo de sacarosa desde la parte aérea hacia los nódulos, como se deduce de la disminución de la eficiencia fotosintética y del contenido de clorofila en ambas especies en condiciones de estrés salino. La maltosa presenta un comportamiento similar al de la sacarosa frente al estrés salino, mostrando una correlación significativa con las actividades MDH y PEPC (tablas 1.4 y 1.5).

La trehalosa es el único azúcar analizado en el nódulo cuya concentración aumenta en respuesta a la salinidad en ambas especies, al igual que se observó con anterioridad en nódulos de *Medicago sativa* (Fougère *et al.*, 1991) y en nódulos de soja en condiciones de estrés hídrico (Müller *et al.*, 1996). Estos resultados apoyarían el posible papel de la trehalosa como osmoprotector en condiciones de estrés (Sanpedro y Uribe,

2004), sin embargo, en todos los casos anteriormente citados, la concentración de trehalosa no supuso más de un 2.5% del total de carbohidratos del nódulo, por lo que su concentración era demasiado baja como para contribuir eficientemente a la osmorregulación en el nódulo. No obstante, la trehalosa puede contribuir a la estabilización de proteínas y membranas frente a los daños causados en condiciones de estrés como indicaron (Elbein *et al.*, 2003; Sanpedro y Uribe, 2004).

Con el estrés salino se observa una reducción del contenido de aminoácidos de los nódulos de ambas especies, aunque el efecto es más significativo en nódulos de *M. truncatula*. Este efecto es diferente al descrito por Soussi *et al.* (1998) en nódulos de garbanzo, y por Gordon *et al.* (1997) en nódulos de soja, donde el estrés produjo una acumulación de aminoácidos. Estas diferencias podrían explicarse por la especie vegetal y/o el tiempo de aplicación de la sal. Sin embargo, en *M. truncatula* el contenido de aminoácidos en hojas tiende a aumentar con la salinidad, lo que coincide con los autores citados anteriormente. La acumulación selectiva de aminoácidos intracelulares, u otros solutos orgánicos, es una respuesta fisiológica en muchos organismos al estrés osmótico (Gilbert *et al.*, 1998), puesto que participan en el ajuste osmótico de la planta (Nolte y Hanson 1997).

La prolina, se acumula en bacterias (Miller y Wood 1996) y en plantas (Delauiney y Verna 1993) en respuesta al estrés osmótico. El contenido de prolina se analizó en hojas, raíces y nódulos de las plantas observándose la mayor acumulación de prolina en respuesta a la salinidad en hojas de *M. truncatula*. Las concentraciones más altas de prolina en hojas se asocian a variedades más sensibles a la salinidad (Soussi *et al.*, 1999), pudiendo considerarse una consecuencia del daño provocado por el estrés (Lutts *et al.*, 1996), contradiciendo la función osmoprotectora clásicamente asignada a este compuesto, en este sentido se detecta una mayor acumulación de prolina en hojas y raíz de *M. truncatula*, lo que indicaría una mayor sensibilidad a la salinidad de esta especie.

El contenido de almidón en nódulos de *M. truncatula* (indeterminados) es 12 veces mayor que en los de *L. japonicus* (determinados), lo que podría relacionarse con el hecho de que en nódulos indeterminados se almacena almidón tanto en células infectadas como no infectadas, mientras que en los nódulos determinados, no se detecta almidón

en células infectadas (Gordon, 1992). El incremento del contenido de almidón en nódulos de *L. japonicus*, podría estar relacionado con la disminución de los niveles de sacarosa debido a la formación de ADP-glucosa por la actividad sacarosa sintasa (Pozueta-Romero *et al.*, 1999). Zrenner *et al.* (1995), sugirieron que en algunos tejidos la sacarosa sintasa se encuentra directamente implicada en la síntesis de almidón, lo que explicaría porqué los niveles de almidón decrecieron de forma paralela a la disminución de actividad sacarosa sintasa en *M. truncatula* ($r=0.95$), donde esta enzima presentó una mayor sensibilidad a la salinidad.

Fotosíntesis

Un descenso en el contenido de pigmentos fotosintéticos es a menudo uno de los primeros síntomas de estrés asociado con la clorosis de las hojas (Webb y Fletcher 1996). La disminución de la concentración de clorofila a y b observada en *M. truncatula* y *L. japonicus* en salinidad, puede ser atribuida a la destrucción de clorofila por un incremento en la actividad clorofilasa, degradadora de clorofila, la cual ha demostrado ser más activa en condiciones de estrés salino (Neera y Ranju 2004).

Los datos de clorofila obtenidos mediante el medidor SPAD, muestran una elevada correlación con las concentraciones de pigmentos totales ($r=0.88$ *M. truncatula*; $r=0.99$ *L. japonicus*) (tablas 1.8 y 1.9), lo que pone de manifiesto la utilidad de este sistema para detectar la disminución de los pigmentos fotosintéticos por efecto de la salinidad en *M. truncatula* y *L. japonicus*. También se observa una relación lineal entre los datos SPAD y la concentración de nitrógeno en las hojas (tablas 1.8 y 1.9), de acuerdo con observaciones realizadas en otras especies como cebada (Wienhold y Krupinsky, 1999), maíz (Schepers *et al.*, 1992), arroz (Peng *et al.*, 1993), trigo (Peltonen *et al.*, 1995) y algodón (Wood *et al.*, 1992). Estos resultados permiten concluir que el medidor de clorofila SPAD, puede ser potencialmente usado para conocer el estado nitrogenado de la planta, y por tanto la eficiencia de la fijación del nitrógeno y de la fotosíntesis en leguminosas en condiciones de estrés salino.

La emisión de fluorescencia por las clorofilas del centro de reacción del fotosistema II (FSII), es uno de los parámetros fisiológicos que presentan correlación con la tolerancia a la salinidad (Mekkaoui *et al.* 1989;

Monneveux *et al.* 1990). La relación F_v/F_m se considera proporcional a la eficiencia fotosintética del FS II (Lichtenthaler 1996), y el efecto de los diferentes factores ambientales de estrés sobre este, incluyendo la salinidad (Percival *et al.*, 2003), pueden reflejarse en una reducción de la relación F_v/F_m . La reducción del rendimiento fotosintético que se produce en diversos experimentos (figs. 1.8 y 3.6), puede ser debida a un daño en el FSII causado por la salinidad (Everard *et al.*, 1994; Lutts *et al.* 1996; El-Shintinawy, 2000), aunque Lu y Zhang (1998) describieron que el FS II era muy resistente a la salinidad. Verhoeven *et al.* (1997) demostraron que una deficiencia de N se reflejaba en una reducción del cociente F_v/F_m en hojas de espinaca, por lo que el descenso de este índice, podría estar inducido por una disminución de la disponibilidad de nitrógeno por la planta, en lugar de directamente por el efecto de la salinidad.

El rendimiento fotosintético no fotoquímico del FSII, F_0/F_m , representa la influencia de la fluorescencia de la clorofila y la disipación no radioactiva de la energía en hojas adaptadas a oscuridad, cuando todos los centros de reacción se encuentran abiertos (Roháček 2002). El índice F_0/F_m en plantas no estresadas se encuentra entre los valores $0.14 \leq F_0/F_v \leq 0.20$, Bilger *et al.* (1987) indicaron que este cociente se incrementa significativamente en plantas estresadas o dañadas tal como se observa tanto en *L. japonicus* como en *M. truncatula* (figs. 1.8 y 3.6). La causa principal de este incremento, de F_0/F_m , puede atribuirse a una disminución de la energía de excitación durante su transferencia a los centros de reacción, y a un incremento de la pérdida de energía del proceso no fotoquímico (Roháček 2002). Basándose en los datos de F_v/F_m y F_0/F_m , se puede concluir que la salinidad afecta a los centros de reacción del FSII, bien directamente (Masojidek y Hall 1992), o por una aceleración de la senescencia (Hasson y Pojakoff-Mayber, 1981; Kura-Hotta *et al.*, 1987).

Los cambios observados en la fluorescencia provocados por la salinidad están acompañados de cambios en el contenido de nitrógeno y en la biomasa de la planta (tablas 1.4, 1.5, A 1.1 y A 1.3), probablemente debido a una inhibición de la fijación del nitrógeno y a una reducción de la fotosíntesis. El efecto de la salinidad sobre estos parámetros es mayor en *M. truncatula* que en *L. japonicus*, que presenta una mayor tolerancia a la salinidad, por lo que la emisión de fluorescencia por las clorofilas es un indicador útil del estrés salino en *M. truncatula* y *L. japonicus*.

Nutrición mineral

Las condiciones de salinidad, provocan una alteración del equilibrio nutricional de las plantas (Zhu 1998), que se manifiesta con el aumento de algunos iones inorgánicos en los tejidos vegetales para mantener el potencial osmótico y el flujo de agua al interior de la planta (Wang *et al.*, 1997), y la disminución de otros debido a las interferencias que el Na^+ provoca en su absorción (Grattan y Grieve 1999).

El contenido de nitrógeno en parte aérea y raíz de *M. truncatula* no se modifica significativamente con la sal, e incluso se incrementa levemente en raíz (tabla 1.2). Este escaso efecto ha sido descrito por Bartolini *et al.* (1991) en plantas de olivo y Zidan *et al.* (1992) en maíz. En *L. japonicus* por el contrario si disminuye la concentración de nitrógeno con la sal, lo que evidencia que la eficiencia de la fijación de nitrógeno medida como nitrógeno acumulado en la planta (Herridge y Danso, 1995), disminuye con la dosis de sal, independientemente de que la actividad nitrogenasa sea mayor en esta especie.

El fósforo se acumula tanto en parte aérea como raíz de *M. truncatula* (tabla 1.2) con el aumento de la salinidad, tal como en *Lupinus* donde Treeby y Van Stevenink (1988) observaron un incremento de la absorción de este elemento en condiciones de estrés salino, por lo que le asignaron un posible papel en el ajuste osmótico. En contraste, en plantas de garbanzo y judía, la sal indujo una disminución de la concentración de fósforo tanto en parte aérea como raíz (Soussi *et al.*, 1999; Zúñiga *et al.*, 1997).

En *L. japonicus* la sal provoca una disminución de la concentración de Ca^{2+} tanto en parte aérea como en raíz, mientras que en *M. truncatula* este efecto es mucho menor. Marschner (1994) y Alam (1995) describieron una disminución del calcio en hojas jóvenes de plantas superiores en condiciones de estrés salino, así como Pardossi *et al.* (1999) en apio, siendo la deficiencia de calcio en parte aérea un síntoma común del estrés salino (Alam 1995). Liu y Zhu (1997) y Zhu *et al.* (1998) describieron la respuesta del calcio en la tolerancia de las plantas a la sal, siendo la disminución de éste en raíces estresadas mayor en variedades sensibles (Subbarao *et al.*, 1990). La salinidad reduce la absorción de calcio, provocando una alta relación $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que restringe el crecimiento de la planta (Hansen y Munns 1988). Más recientemente se ha observado que el calcio puede inducir un aumento en las concentraciones de hierro en el nódulo en

condiciones de estrés, favoreciendo así la fijación de nitrógeno e incrementando la tolerancia a la salinidad (Bolaños *et al.*, 2006).

El porcentaje de magnesio es mucho mayor en raíz respecto de parte aérea, donde su concentración aumenta en condiciones de salinidad en ambas especies, al contrario de raíz donde disminuye, al igual que los resultados obtenidos en *Cicer arietinum* (Soussi *et al.*, 1999). El magnesio se ha relacionado con el transporte de carbohidratos hacia la raíz (Cackmak *et al.*, 1994), y es el átomo central de la molécula de clorofila, con influencia en la estructura y función del cloroplasto (Marschner, 1994).

Los síntomas específicos de la toxicidad al Na^+ incluyen: alta concentración de Na^+ en los tejidos, baja relación K^+/Na^+ , inhibición de la elongación de la raíz y del crecimiento de la planta, alterando la absorción de otros iones como el potasio (Cramer 2002). Ashraf y McNeilly (2004) sugirieron que el mantenimiento de la elevada relación K^+/Na^+ es un criterio de tolerancia a la salinidad. En este trabajo se aprecia tanto en raíz como en parte aérea una importante acumulación de sodio en ambas leguminosas y una disminución del potasio, observándose una correlación negativa entre ambos parámetros (tablas 1.10 y 1.11). Este fenómeno se explicaría por una interacción competitiva entre el sodio y el potasio, que condicionaría la inhibición de la entrada de potasio por los altos niveles de sodio presentes en el medio (Tejera *et al.*, 2006; Hoire y Schroeder 2004). La tolerancia a la salinidad de forrajeras como *M. sativa*, está relacionada con la capacidad de la planta de limitar el transporte de Na^+ y Cl^- hacia la parte aérea (Hoire y Schroeder 2004). Se considera que las plantas más tolerantes a la salinidad son más eficientes limitando la acumulación de estos iones con el fin de evitar las concentraciones tóxicas que afectan los procesos metabólicos y por lo tanto, el crecimiento de la planta (Shi *et al.*, 2003). En *L. japonicus* los niveles de Na^+ en la raíz son relativamente elevados respecto de la hoja, pudiendo existir un cierto control en el transporte de sodio hacia la parte aérea.

2. Evolución ontogénica del crecimiento, fijación de nitrógeno y metabolismo carbonado nodular en las simbiosis *M. truncatula*-*S. meliloti* y *L. japonicus*-*M. loti*: efecto del NaCl (*short-term*)

a) Crecimiento y fijación de nitrógeno

Las respuestas inducidas por el estrés salino en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa son muy variadas, debido entre otras causas a que el efecto de la sal aplicada a largo plazo (*long term*), es diferente de la respuesta que se obtiene en periodos más cortos de exposición a la salinidad (*short term*) (Thiel *et al.*, 1998). Por este motivo en esta memoria se presenta un estudio del efecto del NaCl aplicado durante el periodo de crecimiento vegetativo de las plantas, cuando la simbiosis ya estaba establecida, realizándose muestreos en diferentes estados fenológicos de los cultivos. Munns (1993) indicó que una forma de entender los mecanismos de tolerancia a la salinidad, es seguir la evolución de la serie de eventos que se inician con la exposición a la sal.

Los resultados obtenidos confirman que *L. japonicus* es más tolerante a la salinidad, ya que mostró respuestas similares a *M. truncatula* incluso utilizando el doble de la dosis de sal. Cuando se adicionó sal en el crecimiento vegetativo a ambas especies, el efecto del NaCl sobre el crecimiento fue similar, observándose en las primeras semanas después del tratamiento una aceleración en el crecimiento de las plantas con sal respecto de las control, que en la semana previa a finalizar el tiempo de experimentación se inhibió condicionando que el peso seco de plantas con sal fuera inferior al de las control. La salinidad afecta tanto a parte aérea como a raíz de ambas especies, siendo la relación RPA mayor en respuesta a la salinidad en *L. japonicus* en la evolución del cultivo, lo que indica un desarrollo mayor de la raíz respecto de la parte aérea en plantas con sal. Este fenómeno fue descrito en *P. vulgaris* por Wignarajah (1990), quien lo explicó como un desplazamiento de nutrientes a la raíz en condiciones de salinidad.

La actividad nitrogenasa de nódulos es máxima en el crecimiento vegetativo, cuando los nódulos están formados, observándose una caída de la actividad coincidiendo con el inicio de floración y fructificación de las plantas, a pesar de que continuó el incremento de la masa nodular en ambas

especies. Este descenso gradual de la actividad específica puede estar relacionado con el aumento en la proporción de tejido no fijador en nódulos. Resultados similares se han obtenido en haba (Ocaña *et al.*, 1999), lenteja (Awan 1994) y guisante (Suganuma *et al.*, 1993).

. En este experimento, las plantas crecieron sin sal durante las primeras semanas, por lo que no hay un efecto negativo de la salinidad en la iniciación y formación del nódulo, de hecho hay autores que confirman que el proceso de formación del nódulo es el evento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa más sensible al estrés salino (Zharan 1999). Sin embargo, la salinidad potencia la disminución de la actividad nitrogenasa en todos los tiempos estudiados. No obstante, la salinidad inhibe más intensamente la actividad nitrogenasa que el peso seco de los nódulos, debido a una reducción de la actividad nodular (Cordovilla *et al.*, 1995) o a la diferenciación de nuevos nódulos (Hafeez *et al.*, 1988).

b) Metabolismo nodular

El estudio de las enzimas responsables de la hidrólisis de sacarosa en el nódulo, pone de manifiesto que tanto la actividad SS como IA en crecimiento vegetativo, es superior en nódulos determinados de *L. japonicus* que en indeterminados de *M. truncatula* (fig. 2.3), sin embargo, en ambas especies la actividad de estas enzimas varía con el estado fenológico de la planta, como anteriormente describió Xu *et al.*, (1989). La SS alcanza la máxima actividad en nódulos de *L. japonicus* coincidiendo con la máxima actividad nitrogenasa (crecimiento vegetativo) (fig. 2.3), al igual que los resultados de Anthon y Emerich (1990) en nódulos de soja. Una explicación a este comportamiento sería considerar que en esta etapa se inicia el aporte de fotosintato al nódulo, y la SS controlaría el metabolismo y suministro de carbono a los bacteroides. El tamaño del “pool” de metabolitos como la sacarosa entre otros apoya esta idea (Müller *et al.*, 1994). La actividad IA decrece notablemente a partir del primer muestreo, coincidiendo con el inicio de la etapa reproductiva de ambas especies. Esta observación coincide con resultados anteriores, que indicaban que la actividad IA era la principal enzima degradadora de sacarosa en nódulos jóvenes de soja (Morell y Copeland 1984), así como con el aumento de los niveles de expresión del gen *LjInv1* en nódulos de *L. japonicus* en sus etapas iniciales de desarrollo (Flemetakis *et al.*, 2006). La actividad SS permanece estable en plantas de

L. japonicus control a lo largo del tiempo de experimentación (fig. 2.3). Emerich *et al.*, (1988) sugirieron que la hidrólisis de sacarosa por la SS podría ser más ventajosa cuando la disponibilidad de carbono es limitada, ya que la conversión de la sacarosa en triosa-P requiere tres moléculas de ATP, mientras que la invertasa utiliza cuatro (Huber y Akawara 1986). Además, la sintasa deja de ser activa cuando se interrumpe el suministro de carbono al bacteroide, lo que en condiciones fisiológicas ocurre en la senescencia del nódulo.

Las actividades MDH y PEPC permanecen estables en nódulos de *L. japonicus* al pasar del crecimiento vegetativo a floración, cuando la actividad comenzó a disminuir, en *M. truncatula* la actividad solo decrece en el último muestreo cuando las plantas se encontraban en fructificación (fig. 2.3). Tanto en estudios de estrés hídrico (Irigoyen *et al.*, 1992) como salino (Delgado *et al.*, 1993), se han descrito incrementos de estas actividades, mientras que en garbanzo Soussi *et al.*, (1998) concluye que la respuesta de esta vía metabólica a la salinidad depende del tiempo de aplicación del tratamiento y de la duración de éste. Nuestros resultados indican un efecto negativo de la salinidad que aumenta con la duración del tratamiento salino.

El paso de crecimiento vegetativo a reproductor viene acompañado por una caída de distintas actividades enzimáticas del metabolismo nodular. Los procesos metabólicos que tienen lugar en la senescencia de los nódulos no son bien conocidos, aunque se trata de una fase decisiva en la evolución de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa (Sprent y Raven 1992). Clásicamente se establece que la fijación de nitrógeno decae después de la floración y se atribuye a una reducción de la disponibilidad de carbono para los nódulos (Phillips 1980). Sin embargo, con el mantenimiento de una elevada actividad MDH, se sugiere que la limitación del carbono no es la causa primaria de la senescencia.

La síntesis de trehalosa en nódulos de *M. truncatula* experimenta un notable incremento durante la floración e inicio de fructificación, cuando la actividad TPS se duplica respecto de la alcanzada en crecimiento vegetativo. En nódulos de *L. japonicus* en cambio, a penas se observan variaciones en la actividad TPS en el tiempo de experimentación, aunque la actividad es algo mayor en fructificación. Estos resultados concuerdan con el aumento del contenido de trehalosa en la senescencia del nódulo, tal como observaron

Müller *et al.* (2001). La salinidad sin embargo, no induce un aumento de la actividad TPS en nódulos, por lo que no parece estar implicada en los mecanismos de defensa frente a este tipo de estrés. La actividad trehalasa, decrece en condiciones de estrés salino en las dos especies, siendo mayor el efecto en nódulos de *L. japonicus* en los que sí se incrementa el contenido de trehalosa, lo que apoyaría la hipótesis del control de la concentración de trehalosa en el nódulo por la actividad trehalasa. En nódulos de *M. truncatula*, la máxima actividad trehalasa coincide con la de la sacarosa sintasa, en el inicio de floración, siendo la correlación entre ambas actividades enzimáticas significativa ($P \leq 0.05$) (tabla 2.2).

c) Metabolitos

La salinidad aplicada a la simbiosis ya establecida afecta al contenido de sacarosa de forma diferente a como lo hace con la aplicación de la sal al inicio del cultivo, cuando decreció. El contenido de sacarosa en nódulos de *L. japonicus* se incrementa durante el inicio de la floración en respuesta al tratamiento salino, tal como observaron Fernández-Pascual *et al.* (1996) en *L. albus* y Fougère *et al.* (1991) en *M. sativa* en respuesta a 6 días y 2 semanas de aplicación del tratamiento salino respectivamente. Este incremento de sacarosa en nódulo se produce de forma simultánea a la disminución de la actividad sacarosa sintasa ($r = -0.84$) e invertasa alcalina ($r = -0.77$) (tabla 2.8), lo que explicaría su acumulación, tal como indicó González *et al.* (1995). En *M. truncatula* por el contrario la sacarosa permanece constante en todos los estadios fenológicos en las plantas con sal, presentando al inicio de floración la máxima concentración de sacarosa en plantas control. El contenido de fructosa, glucosa y maltosa, también presentan una mayor concentración en nódulos de *L. japonicus* en condiciones de estrés salino, lo que demuestra su participación en el ajuste osmótico del nódulo. Es destacable el aumento de trehalosa en nódulos de *L. japonicus* coincidiendo con el último muestreo realizado en fructificación, este resultado equivale al detectado por Müller *et al.* (2001) en nódulos senescentes de soja, en los que la trehalosa fue el carbohidrato más abundante.

El contenido de azúcares solubles totales se incrementa con la salinidad en nódulos y hojas de *L. japonicus*, alcanzando los niveles más altos en fructificación, cuando la actividad sacarosa sintasa e invertasa

alcalina son más bajas. En nódulos de soja se ha descrito una relación negativa entre la sacarosa sintasa y los azúcares solubles en nódulos (González *et al.*, 1998), tal como se observa en *L. japonicus* ($r=-0.75$) (tabla 2.8), lo que podría ser clave para la regulación de la respuesta del metabolismo carbonado nodular al estrés salino.

En nódulos determinados (*L. japonicus*) e indeterminados (*M. truncatula*), la acumulación de aminoácidos es distinta, de tal manera que en los indeterminados, la concentración disminuye con la salinidad, tal como se observó en el experimento 1 (*long term*), mientras que en los determinados, como un efecto directo del estrés salino, aumenta el nivel de aminoácidos (fig. 2.7), tal como describieron Soussi *et al.* (1998) en nódulos de garbanzo, y Gordon *et al.* (1997) en los de soja, por lo que éstos podrían participar en los mecanismos de respuesta fisiológica al estrés osmótico (ajuste osmótico), como se ha observado en muchas otras plantas (Gilbert *et al.*, 1998). A pesar de la respuesta en aminoácidos totales en nódulos de *M. truncatula*, la prolina sí responde con un aumento de concentración en respuesta a la salinidad, incluso en todos los tejidos de la planta, siendo esta respuesta mayor en nódulo y hoja en el crecimiento reproductor. En *L. japonicus* sin embargo, la mayor respuesta a la salinidad se observa coincidiendo con la floración (fig. 2.7). La prolina en nódulos y hojas de *M. truncatula* podría ser indicador de la mayor sensibilidad a la salinidad de esta especie, tal y como indicaron (Soussi *et al.*, 1999), cuando detectaron más prolina en variedades de judía sensibles al estrés salino.

d) Fotosíntesis

En el presente estudio, la síntesis de clorofila disminuye a la vez que el contenido de prolina aumenta, sugiriéndose que ambos compuestos se forman a partir de un precursor común, el glutamato (Le Dily *et al.*, 1993), lo que concuerda con el comportamiento opuesto entre el contenido de prolina y clorofila.

El incremento de la concentración de clorofila hasta el final del cultivo de *L. japonicus* sugiere que la falta de fotosintato no es causante de la inhibición de la actividad nitrogenasa, que presentó una tendencia similar a la vía PEPC-MDH, lo que apoya la hipótesis de Delgado *et al.* (1993)

sobre la limitación del aporte de sustratos energéticos, principalmente malato, a los bacteroides.

3. Influencia de la validamicina A en la simbiosis *M. truncatula*-*S. meliloti* y *L. japonicus*-*M. loti* en condiciones de salinidad

La validamicina A, inhibidor de la actividad trehalasa, puede inducir la acumulación de trehalosa en la planta, según la hipótesis de Müller *et al.*, (1994a), que predice que la trehalasa es responsable de evitar la acumulación de trehalosa en el nódulo. Entre las funciones de la trehalosa en plantas se encuentran la regulación del metabolismo de carbohidratos (Eastmond y Gram 2003) y la protección frente al estrés (Elbein *et al.*, 2003; Bae *et al.*, 2005), también en el nódulo la trehalosa puede controlar ambos procesos (Gordon *et al.*, 1997; Müller *et al.*, 1999).

Considerando estos dos aspectos de la trehalosa, en los resultados se evidencia que la validamicina A por si sola, no induce alteraciones en el crecimiento de *M. truncatula*, mientras que en *L. japonicus* si se observa una ligera disminución de los parámetros de crecimiento, así como del metabolismo carbonado nodular. En relación con estos datos, Müller *et al.* (1995) y Tejera *et al.* (2005), no encontraron un efecto de la validamicina A sobre el crecimiento ni la actividad nitrogenasa de plantas de soja y judía respectivamente.

Cuando la validamicina A se adicionó junto con el tratamiento salino, se producen variaciones en el crecimiento de las plantas que sugieren que el aumento de la trehalosa en nódulos (fig. 3.2), así como en otros órganos de la planta, mejoran la tolerancia de éstas a la salinidad, aunque estos cambios no se reflejan en la actividad nitrogenasa ni en el metabolismo carbonado nodular.

Sin duda, el efecto más significativo de la validamicina A, es la inducción de la acumulación de trehalosa en nódulos de las dos especies estudiadas, confirmándose de esta forma la hipótesis de que la trehalasa nodular, es la principal enzima responsable del control de la concentración de trehalosa en el nódulo, donde se encuentra inducida (Müller *et al.*, 1994a), habiéndosele atribuido una función detoxificadora frente a las

posibles alteraciones del metabolismo carbonado en la planta, provocadas por la trehalosa sintetizada por el microsimbionte o proveniente del exterior (Müller *et al.*, 1995a). Sin embargo, mientras que en insectos la adición de un inhibidor de trehalasa puede suponer su muerte (Kono *et al.*, 1993), en las plantas estudiadas, no se observaron consecuencias significativas ni en su crecimiento ni en las características simbióticas estudiadas, por lo que se puede decir que la trehalosa no es siempre tóxica en plantas, como en el caso de *Cuscuta reflexa* (Veluthambi *et al.*, 1981), una planta parásita con una baja actividad trehalasa, en la que la trehalosa produce necrosis.

La interacción de la validamicina A con el NaCl en el medio provoca en nódulos de ambas especies, que la concentración de trehalosa sea menor que cuando se adiciona solo el inhibidor, a lo que no es posible dar una explicación, teniendo en cuenta que la actividad trehalasa estuvo más inhibida por la salinidad en comparación con la TPS (fig. 3.4). Otro hecho significativo es que la trehalosa prácticamente se encuentra relegada al nódulo, en comparación con el resto de órganos de la planta (fig. 3.5), tal y como postuló con anterioridad Streeter (1980), lo que permite afirmar que el origen de la trehalosa en ambas leguminosas es consecuencia de la interacción simbiótica con el rizobio, como se observó en raíces de plantas micorrizadas (Schubert *et al.*, 1992) o infectadas por microorganismos productores de trehalosa (Brodmann 2002).

La trehalosa interfiere en la distribución de carbohidratos en ambas especies, de hecho, cuando se acumula trehalosa provoca un descenso de los principales carbohidratos no estructurales, sacarosa y almidón en todos los órganos de la planta (fig. 3.5). El motivo de estos cambios es desconocido, aunque es interesante reseñar que en hojas de cebada, la trehalosa indujo la actividad sacarosa fructosil transferasa, y otras enzimas inducidas por la sacarosa (Wagner *et al.*, 1986). Se especula que la trehalosa pueda interferir con la regulación de enzimas implicadas en la distribución de carbohidratos en la planta (Kolbe *et al.*, 2005)

En nódulos de *Vigna unguiculata* y *G. max*, la adición de validamicina A aumentó la trehalosa y disminuyó la sacarosa y el almidón (Müller *et al.*, 1995a). En este trabajo, la salinidad y la validamicina A incrementan los azúcares solubles totales de nódulos, pero no los de sacarosa y glucosa (fig. 3.5). La disminución del contenido de sacarosa del nódulo, podría ser debido a una disminución del flujo de fotoasimilados de la parte aérea, ya

que hay una caída de la eficiencia fotosintética (fig. 3.6) en condiciones de salinidad, que además se refleja en una disminución del PSPA (fig. 3.1).

La trehalosa constituye aproximadamente alrededor del 6% del total de azúcares en nódulos de *L. japonicus* y del 2% en los de *M. truncatula*, además, nuestros resultados muestran un incremento del 50% en el contenido de trehalosa en nódulos de *L. japonicus* en respuesta al estrés salino (fig. 3.5), lo que apoya el papel de este disacárido como posible osmoprotector frente a este estrés en esta especie, mientras que en *M. truncatula* no se apreciaron variaciones significativas de este parámetro por la salinidad. Un incremento en la concentración de trehalosa en respuesta a la salinidad, también ha sido descrito en nódulos de *M. sativa* (Fougère *et al.*, 1991) en los de *P. vulgaris* (Farías-Rodríguez *et al.*, 1998) y en los de *G. max* (Müller *et al.*, 1996) en condiciones de sequía.

Müller *et al.* (1998) encontraron que en nódulos de soja crecidos en condiciones de esterilidad, a los que se les añadió trehalosa exógena al medio de cultivo, se produjo una fuerte inducción de la actividad SS y en menor medida de la IA. En este trabajo, los resultados muestran que la acumulación de trehalosa en el nódulo por efecto de la validamicina A, solo afecta a la actividad SS nodular de *L. japonicus* (fig. 3.3), que experimenta un descenso, mientras que la interacción de la validamicina A con la salinidad no produce ninguna variación. Por el contrario, la validamicina A sí afecta drásticamente a la actividad trehalasa nodular de ambas especies inhibiéndola, tal y como observaron Müller *et al.* (1992) en nódulos de soja. La trehalasa nodular de *P. vulgaris* presenta una respuesta similar a las anteriores, sugiriéndose además que ésta podría estar implicada en la formación y desarrollo del nódulo, y que es capaz de hidrolizar otros disacáridos como sacarosa y maltosa (Tejera *et al.*, 2005).

La acumulación de trehalosa en nódulos por efecto de la validamicina A, mejora la respuesta de *L. japonicus* y *M. truncatula* en condiciones de salinidad, incrementando el peso seco de la planta un 20% y 15% respectivamente en relación a las plantas que no fueron tratadas con validamicina A. No obstante, el papel de la trehalosa en relación con el establecimiento de la simbiosis, su relación con otros compuestos carbonados y nitrogenados, así como con las actividades enzimáticas implicadas en la asimilación del amonio, precisaría de un mayor estudio. No se descarta que otros solutos compatibles como aminoácidos y prolina, que

se incrementaron en los nódulos en condiciones de salinidad, podrían estar implicados en la protección y/o adaptación de *L. japonicus* a la salinidad. Experimentos realizados previamente por Márquez *et al.*, (2005) mostraron un incremento de hasta 12 veces de la concentración de prolina en respuesta al estrés hídrico y salino. Los resultados de este experimento permiten un mejor conocimiento de las respuestas fisiológicas de *L. japonicus* y *M. truncatula* al estrés salino en condiciones simbióticas.

4. Purificación y caracterización de la trehalasa de nódulos de *P. vulgaris* y *M. sativa*

Se han purificado trehalasas de bacterias, levaduras y otros hongos (Inagaki *et al.*, 2001; Lodesborough *et al.*, 1984; Mittenbühler y Kolzer 1988; Zimmermann *et al.*, 1990), mamíferos (Nakano y Sactor 1984; Ruf *et al.*, 1990) e invertebrados (Dmitryjuk y Zóltowska 2003; Lee *et al.*, 2001), sin embargo, existen pocos trabajos que describan la purificación de esta enzima de nódulos de leguminosas, a excepción de la de nódulos de soja (Müller *et al.*, 1992).

Las trehalasas nodulares de *P. vulgaris* y *M. sativa*, muestran diferencias tanto en peso molecular como en carga, lo que dificultó la purificación de ambas trehalasas por el mismo procedimiento. Esto se evidenció cuando al pasar el extracto de *M. sativa* por la columna de intercambio iónico, no se separó la trehalasa de otras proteínas, mientras que esto sí ocurrió con la de *P. vulgaris*. Cuando se pasó el purificado parcial por una columna de gel filtración, en el que la separación se hace en base a su tamaño molecular, la enzima de *M. sativa*, eluyó de diferente forma a como lo hizo la de *P. vulgaris*, no pudiéndose determinar su peso molecular, concluyéndose que el tamaño molecular de ambas enzimas es diferente, puesto que eluyeron en fracciones distintas.

El peso molecular de la trehalasa nativa de *P. vulgaris* estimado en condiciones no desnaturizantes es de 42 kDa, mientras que con la estimación del peso molecular de la proteína en gel de poliacrilamida SDS, el peso molecular es de 45 kDa, sugiriendo además que se trata de una proteína monomérica. Este peso molecular fue similar al estimado para organismos tan diversos como *Acidobacterium capsulatum* (57 kDa)

(Inagaki *et al.*, 2001), *Dictyoltelum discoideum* (42 kDa) (Temeswari y Cotter 1997), *Tenebrio molitor* (43-62 kDa) (Yaginuma *et al.*, 1996) y *G. max* (54 kDa) (Müller *et al.*, 1992), lo que sugiere que se trata de una proteína con un origen común y altamente conservada en los diferentes reinos.

La trehalasa de nódulos de *P. vulgaris* muestra un amplio rango de pH, manteniéndose la actividad de la enzima alta entre valores de pH 3.6 y 6.6, mientras que en *M. sativa* se detectan dos valores de pH de mayor actividad: 3.6 y 7.5. Resultados similares fueron descritos por Müller *et al.* (1992) para la trehalasa de nódulos de soja en condiciones diferentes. Investigaciones anteriores mostraron un pH óptimo entre 4.0 y 5.7 en trehalasas de *Saccharomyces* y levaduras (Kelly y Catley 1976; Lodesborough *et al.*, 1984; Panek y Souza 1964), sin embargo, también se han descrito valores de pH mayores (6.0-6.9) (Yarar *et al.*, 2000) y menores (2.5) (Inagaki *et al.*, 2001) en estos mismos organismos. Previamente se había sugerido que la elevada actividad de la trehalasa a pH ácido, carecía de relevancia fisiológica, excepto si la enzima estuviera asociada con la vacuola, como se demostró en levaduras (Salminen y Streeter, 1986), por ello es interesante señalar que se ha detectado una acidificación del espacio peribacteroideo debido a las H⁺-ATPasas localizadas en la membrana peribacteroidea (Andreev *et al.*, 1999), y a la cadena de transporte electrónico respiratoria del bacteroide que bombean protones al espacio peribacteroideo, por lo cual el pH ácido podría tener una relevancia fisiológica en la actividad trehalasa en nódulos.

En cuanto a la temperatura óptima y termoestabilidad de la trehalasa de nódulos de *P. vulgaris* y *M. sativa*, se observan comportamientos similares en otras trehalasas aisladas de diferentes organismos como: *Humicola grises*, nódulos de soja, *Lymantria dispar*, *Lobosphaera* sp. o *A. capsulatum* (Inagaki *et al.*, 2001; Müller *et al.*, 1992; Nakano *et al.*, 1994; Valaitis y Bowers 1993; Zimmermann *et al.*, 1990) donde la trehalasa presentó una elevada estabilidad a altas temperaturas.

La trehalasa de nódulos de *P. vulgaris* y *M. sativa* no muestra una especificidad absoluta de sustrato, sugiriendo que se trata de una enzima versátil capaz de hidrolizar los enlaces α -glucósido de otros azúcares, lo que le permite intervenir en el metabolismo carbonado nodular a niveles diferentes del catabolismo de la trehalosa. La especificidad de esta trehalasa

es similar a la encontrada por otros autores, de modo que Panek y Souza (1964) en la trehalasa purificada de levaduras demostraron que tiene especificidad para trehalosa y rafinosa entre otros oligosacáridos, Müller *et al.* (1992) encontraron especificidad para la trehalosa y la maltosa y Dmitryjuk y Zóltowska (2003) encontraron especificidad para sacarosa, isomaltosa y maltosa. Estas observaciones contrastan con los descubrimientos de Kelly y Catley (1976), Mittebühler y Kolzer (1988) o Inagaki *et al.* (2001), quienes en sus experimentos, utilizando la enzima purificada indicaron que la trehalasa presenta una alta especificidad por su sustrato.

La K_m determinada para otras trehalasas, mostraron una gran diversidad según los diferentes organismos, oscilando los valores entre 0.2 y 20 mM. Así en levaduras Mittenbühler y Kolzer (1988) describieron una K_m de 4.7 mM a un pH 4.5, Panek y Souza (1964) una K_m de 0.4 mM a pH 5.6, Lodesborough y Varimo (1984) una K_m de la trehalasa vacuolar de 1.4 mM a pH 5.0, 5.8 y 6.5, y Kelly y Catley (1976) una K_m 0.5 mM a pH 5.5. En nódulos de soja la K_m fue de 0.28 mM (Müller *et al.*, 1992) y en nódulos de *P. vulgaris* de 0.109 mM, lo que indicó una alta afinidad de la trehalasa por su sustrato en nódulos.

Los efectores e inhibidores de la trehalasa de nódulos de *P. vulgaris*, coinciden con los ensayados por otros autores (Dmitryjuk y Zóltowska 2003; Inagaki *et al.*, 2001; Lodesborough y Varimo 1984; Yasar *et al.*, 2000), quienes demostraron que el EDTA a una concentración 10 mM inhibe la trehalasa. Sin embargo, la trehalasa aislada de nódulos de *M. sativa* no fue inhibida por el EDTA (fig. 5.6), al igual que se observó en la trehalasa nodular de soja (Müller *et al.*, 1992), aunque la concentración de EDTA utilizada por Müller *et al.* (1992) fue 5 veces inferior a utilizada en este estudio.

De acuerdo con nuestros resultados, la trehalasa de nódulos de *P. vulgaris* es similar a la purificada de nódulos de soja (Müller *et al.*, 1992), basándonos en el peso molecular, la temperatura óptima y la K_m . No obstante, la trehalasa de *P. vulgaris* es fuertemente activada por el Na^+ , Mn^{2+} y Mg^{2+} e inactivada por el EDTA, al igual que otras trehalasas ácidas (Dmitryjuk y Zóltowska 2003; Inagaki *et al.*, 2001; Yaginuma *et al.*, 1996), características que no se describen en la de nódulos de soja (Müller *et al.*, 1992). En el reino de los hongos, se han caracterizado dos clases de

trehalasas (Lodesborough y Varimo 1984), las trehalasas ácidas (con mayor similitud con la de nódulos de *P. vulgaris*) y las neutras.

Aunque la proteína fue parcialmente purificada, la banda correspondiente a la trehalasa en los geles desnaturalizantes estaba lo suficientemente separada para su posterior uso en la inmunización de los conejos. De esta forma se obtuvo un antisuero frente a trehalasa de nódulos de *P. vulgaris* con un alto título de anticuerpos policlonales. Como muestra el “western blot” (figs. 5.8 y 5.10), en un extracto crudo de nódulos, los anticuerpos reconocieron una única proteína de 45 kD, coincidente con la trehalasa purificada. En extracto crudo de flor, se detectó un polipéptido de menor peso molecular, aunque en menor proporción que en nódulo (fig. 5.8). En los ensayos realizados con extractos crudos de hoja no se detecta ningún polipéptido de características semejantes, mientras que en raíz, se observa una banda del mismo tamaño que la del nódulo, aunque con una menor intensidad.

También se ha visto por “western blot” que la intensidad de la tinción no refleja directamente la actividad trehalasa de los distintos órganos de *P. vulgaris*, así como el efecto de la salinidad sobre ésta actividad, lo que indica que la actividad de la enzima está sujeta a regulación postraduccional.

5. Clonación y expresión de del gen de la trehalasa de *M. truncatula* en condiciones de estrés salino

El análisis de la secuencia parcial de la trehalasa de 258 aminoácidos de *M. truncatula* (MTTRE1), revela que presenta un alto grado de similitud con la de *G. max* (Aeschbacher *et al.*, 1999), siendo la identidad entre ambas del 89% a lo largo de toda la secuencia analizada, haciendose extensivo este resultado probablemente al resto de la proteína. Esta alta homología no resulta sorprendente, debido a que las trehalasas de leguminosas pueden tener un ancestro común. MTTRE1 también presenta homología con las trehalasas de diversos organismos, incluyendo bacterias, insectos y mamíferos con las que solo compartió entre un 32% y 37% de identidad en diferentes bloques conservados (tabla 5.7).

MTTRE1 se expresa de forma constitutiva pero a bajo nivel en hojas y raíces de *M. truncatula*, aunque la expresión de este gen se encuentra inducida en nódulos (fig. 5.19). Este resultado difiere del encontrado para el gen de la trehalasa de soja, donde *GMTRE1* se expresa de forma constitutiva pero a bajo nivel en varios tejidos, incluyendo raíces y nódulos. Aunque la actividad trehalasa es unas 10 veces mayor en nódulos que en raíces de soja, la inducción de la expresión de *GMTRE1* en nódulos, comparado con las raíces no se observó a nivel de ARN (Aeschbacher *et al.*, 1999). Müller *et al.* (1995b) sugirieron que debido a que la trehalasa se expresa en múltiples tejidos a bajo nivel, esto se podría relacionar con su función como protector de la planta frente a la trehalosa exógena producida por microorganismos. En este caso, *GMTRE1* parece no estar sujeta a regulación transcripcional debido a la presencia de trehalosa liberada por los bacteroides. En *M. truncatula* por el contrario si se observa una inducción a nivel transcripcional de *MTTRE1* en nódulos, comparado con los niveles de expresión en hoja y raíz, indicando una regulación a este nivel de la enzima en presencia del microsimbionte (*S. meliloti*) en los nódulos. Este resultado resulta interesante ya que muestra la existencia de diferentes formas de regulación génica en soja, formadora de nódulos determinados y con cantidades de trehalosa importantes en el nódulo (Müller *et al.*, 1992), y *M. truncatula* con nódulos indeterminados y con bajos niveles de trehalosa nodular.

El estrés salino regula la expresión de *MTTRE1* reduciendo el nivel de transcritos en nódulos de plantas con NaCl. Esta disminución es mayor en plantas tratadas con la dosis menor de sal (150 mM), donde además la reducción muestra una progresión en el tiempo. En este estudio no podemos saber si el descenso de la expresión génica se correlaciona con la actividad de la enzima en las condiciones en que se realizó la RT-PCR, ya que las diferencias en las actividades enzimáticas son difíciles de detectar dentro de intervalos de tiempo tan pequeños. Sin embargo, existen evidencias de que la salinidad no solo afectó a la expresión de *MTTRE1*, sino que la salinidad además provocó un descenso de la actividad trehalasa, así como de las enzimas responsables de la síntesis de trehalosa.

Solo un reducido número de plantas acumulan trehalosa en respuesta al estrés, acumulando en su lugar la mayoría sacarosa (Wingler 2002). Sin embargo, la trehalosa se encuentra ampliamente distribuida en el reino

vegetal, así como la correspondiente enzima responsable de su degradación (trehalasa), que ha sido identificada en diferentes tejidos (Müller *et al.*, 1995). En leguminosas, pocas trehalasas han sido caracterizadas desde un punto de vista bioquímico y molecular, a excepción de la trehalasa de nódulos de soja, que ha sido ampliamente estudiada (Müller *et al.*, 1992; Müller *et al.*, 1995; Müller *et al.*, 1998; Aeschbacher *et al.*, 1999). Trehalosa y trehalasa parecen tener un papel en el nódulo de leguminosas, donde se dan condiciones de estrés ambiental, sin embargo, este no parece ser común en todas las leguminosas debido a las diferencias encontradas en cuanto a la acumulación de trehalosa (Müller *et al.*, 1994).

En resumen, con los datos disponibles hasta ahora, se sugiere que el gen de la trehalasa de *M. truncatula* puede tener un papel en la respuesta del nódulo a condiciones de estrés salino, aunque los niveles de trehalosa detectados son bajos como para que esta pueda tener un papel importante en la respuesta de toda la planta a la salinidad.

6. Metabolismo de la trehalosa en *B.japonicum* en vida libre y en simbiosis con *G. max* en ambiente salino

El descubrimiento más importante de este experimento es que *B. japonicum* USDA 110, presenta los tres mecanismos independientes de síntesis de trehalosa. Es conocida la gran importancia de este disacárido en numerosos organismos (De Smet *et al.*, 2000; Elbein *et al.*, 2003; Wolf *et al.*, 2003) pudiéndose incluir entre estos a *Bradyrhizobium* spp. por la presencia de tres mecanismos de síntesis independientes.

Resulta de interés que ciertas enzimas de la síntesis de trehalosa estén inducidas mientras que otras reprimidas cuando *B. japonicum* establece una relación simbiótica con plantas de soja. Las causas que determinan que las actividades TS y MOTS sean dominantes en bacteroides (fig. 6.3), mientras que la actividad TPS sea mucho menor que en la bacteria en vida libre no han sido establecidas. No parece que el mayor potencial osmótico del interior del nódulo sea la razón para estas diferencias, asumiendo que las condiciones de estrés salino a las que fueron sometidas las bacterias en vida libre, pudieran simular las condiciones de estrés osmótico del interior del nódulo.

Existen evidencias de que durante las etapas tempranas de la interacción simbiótica entre el rizobio y la planta, la bacteria se encuentra en condiciones de estrés osmótico, y que por tanto el metabolismo de la trehalosa puede tener un papel significativo en la fisiología de la bacteria en el interior del nódulo, en este sentido, Jense *et al.* (2005) encontraron que en *S. meliloti* una mutación en el transporte y/o utilización de la trehalosa, impide a la bacteria colonizar las raíces de *M. sativa*, por lo que la trehalosa parece estar implicada de alguna manera en la etapa inicial de la interacción simbiótica.

El predominio de la actividad TS en el bacteroide resulta curioso, ya que las concentraciones de maltosa en el nódulo, y especialmente en los bacteroides son muy bajas (Streeter 1987), además, *B. japonicum* creció pobremente cuando se utilizó la maltosa como fuente de carbono en el medio de cultivo y el suministro de maltosa al cultivo de *B. japonicum* no incrementó los niveles de actividad TS. Los bacteroides no acumulan glucógeno, por lo que la maltosa derivada de este polisacárido no puede actuar como sustrato de la actividad TS, permaneciendo desconocido el origen de la maltosa suministrada a la actividad TS.

Aunque se ha detectado una concentración baja de trehalosa en nódulos de algunas leguminosas (Müller *et al.*, 1994a), la acumulación de cantidades sustanciales de trehalosa en los de soja sí está documentada (Streeter 1985; Streeter 1987). El comportamiento de las enzimas responsables de la síntesis de trehalosa, solo demuestra la versatilidad de este disacárido en nódulos de soja, pero no las razones por las que se acumula en éstos. La ausencia de un incremento de estas actividades enzimáticas por el estrés salino en bacteroides (fig. 6.3), sugiere que la acumulación de trehalosa en nódulos, se debe en mayor medida a la disminución de la actividad trehalasa que al incremento de su síntesis en nódulo, lo que indicaría que la trehalasa es independiente de la concentración de sustrato, y que la disminución de su actividad, favorece la acumulación de trehalosa en condiciones de estrés salino.

En *B. japonicum* la trehalosa es el principal carbohidrato, y se acumula en la fase estacionaria, aunque las concentraciones de trehalosa pueden variar ampliamente (Streeter 1985). En las curvas de crecimiento (fig. 6.1), se observa que el nivel máximo se alcanza en fase estacionaria, tal y como se ha descrito en *S. meliloti* (Talibart *et al.*, 1997). La acumulación

de trehalosa se ha asociado con el incremento de la tolerancia de los rizobios frente a varios tipos de estrés (Argüelles *et al.*, 2000), habiéndose identificado como soluto compatible que se acumula en algunos rizobios en condiciones hiperosmóticas (Ghittoni y Bueno 1996; Dardanelli *et al.*, 2000), estas observaciones coinciden con los datos obtenidos que indican una mayor acumulación de trehalosa en los cultivos en condiciones de estrés salino (fig. 6.2) debido al aumento de la actividad TPS (tabla 6.1), como observaron Dardanelli *et al.* 2000 en *Bradyrhizobium* sp. USDA 3187 y *Rhizobium* sp. TAL 1000.

VI. CONCLUSIONES

1. *M. truncatula* es más sensible a la salinidad que *L. japonicus*, lo que se refleja en el crecimiento de la planta, actividad fotosintética y en el metabolismo nodular. En ambas especies la salinidad provoca un incremento del contenido de metabolitos relacionados con el ajuste osmótico en parte aérea.

2. Desde el punto de vista fisiológico y metabólico, los nódulos determinados de *L. japonicus* respecto a los indeterminados de *M. truncatula*, son más eficientes en la fijación simbiótica del nitrógeno con mayor actividad nitrogenasa y producción de leghemoglobina. Así mismo, el metabolismo carbonado nodular, incluyendo el de la trehalosa, es más activo. Esta mayor actividad metabólica favorece que el contenido de sacarosa, fructosa, glucosa y maltosa sea en nódulos determinados (*L. japonicus*) menor que en los indeterminados (*M. truncatula*).

3. El contenido de trehalosa en el nódulo está regulado por la actividad trehalasa, debido a la relación inversa existente entre ambos parámetros, a lo largo de la ontogenia del cultivo, incluso en condiciones de salinidad. Aunque se detecta un aumento de este disacárido en nódulos de *M. truncatula* en estas condiciones, se puede asumir que la trehalosa nodular no contribuye al ajuste osmótico debido a su presencia minoritaria.

4. La validamicina A favorece el aumento de la trehalosa en el nódulo, sin embargo, éste compuesto orgánico no afecta al crecimiento de la planta, al proceso de fijación de nitrógeno, ni al metabolismo nodular de *M. truncatula*. En condiciones de salinidad, la validamicina A mejoró los efectos negativos provocados por la sal en el crecimiento, y otros procesos fisiológicos en las dos especies de leguminosas estudiadas.

5. Se ha purificado parcialmente la trehalasa de nódulos de *P. vulgaris* y de *M. sativa*, ambas son proteínas que presentan características enzimáticas diferentes en las dos especies. La trehalasa de nódulos de *P. vulgaris* es un monómero con un peso molecular de 45 kDa, un pH óptimo de 3.9 y una K_m y V_{max} de 0.109 mM y 217.8 U mg^{-1} prot min^{-1} respectivamente. Además,

ambas trehalasas presentan: **a)** baja especificidad por el sustrato, pudiendo hidrolizar disacáridos como sacarosa, maltosa, celobiosa, melobiosa y rafinosa, **b)** alta estabilidad a temperaturas elevadas con una temperatura óptima de 60°C, **c)** tanto el Na⁺ como el Mn²⁺, Mg²⁺, Li⁺, Co²⁺ y K⁺ actuaron como activadores de la enzima mientras que el Fe³⁺ y el Hg⁺ como inhibidores.

6. Se ha clonado el gen de la trehalasa de *M. truncatula*, que muestra una elevada homología con él de otras trehalasas de plantas y animales, correspondiendo la mayor identidad al de la trehalasa de nódulos de soja. La expresión de este gen se encuentra inducida en nódulo, presentando un nivel de expresión basal en raíces y hojas. La salinidad inhibió la expresión de este gen en el nódulo.

7. *B. japonicum* USDA 110 tiene tres mecanismos independientes de síntesis de trehalosa tanto en simbiosis como en vida libre, induciéndose la vía maltooligosiltrehalosa sintasa y trehalosa sintasa en el bacteroide y predominando la trehalosa 6 fosfato sintasa en la bacteria en vida libre. En condiciones de estrés salino, el aumento de trehalosa está inducido por mecanismos distintos: en el nódulo se debió a una disminución de la actividad trehalasa citosólica, mientras que en la bacteria debido a un aumento de la biosíntesis (vía TPS).

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Ábrahán E, Rigó G, Székely G, Nagy R, Koncz C, Szabados L (2003)** Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroids in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 51: 363-372
- Aeschbacher R, Müller J, Boller T, Wiemken A (1999)** Purification of the trehalase GMTRE1 from soybean nodules and cloning of its cDNA. GMTRE1 is expressed at low level in multiple tissues. *Plant Physiol* 119: 489-495
- Alam SM (1995)** Nutrient uptake by plants under stress conditions. En: Handbook of Plant and Crop Stress. M Pessarakli (Ed), pp. 227-246, Marcel Dekker, Inc, New York, USA
- Alarcón JJ, Sánchez-Blanco MJ, Bolarin MC, Torrecillas A (1994)** Growth and osmotic adjustment of two tomato cultivars during and after saline stress. *Plant Soil* 166: 75-82
- Ando O, Nakajima M, Kifune M, Fang H, Tanzawa K (1995)** Trehazolin, a slow, tight-binding inhibitor of silkworm trehalase. *Biochim Biophys Acta* 1244: 295-302
- Andreev I, Dubrovo P, Krylova V, Andreeva IN, Korenkov V, Sorokin EM, Izmailov SF (1997)** Characterization of ATP-Hydrolyzing and ATP-Driven proton-translocating activities associated with the peribacteroid membrane from root nodules of *Lupinus luteus*. *J Plant Physiol* 151: 563-569
- Andreev I, Dubrovo PN, Krylova V y Izmailov SF (1999)** Functional identification of ATP-driven Ca²⁺ pump in the peribacteroid membrane of broad bean root nodules. *FEBS Letters* 447: 49-52
- Andreev I, Krylova V, Dubrovo P y Izmailov S (2005)** Passive potassium transport by symbiosomes from broad bean root nodules. *Plant Sci* 168: 1005-1010
- Anja JH, Dijken V, Schluempmann H, Smeekens SCM (2004)** *Arabidopsis* trehalose-6-phosphate synthase 1 is essential for normal vegetative growth and transition to flowering. *Plant Physiol* 135: 969-977
- Anthon E, Emerich DW (1990)** Developmental regulation of enzymes of sucrose and hexose metabolism in effective and ineffective soybean nodules. *Plant Physiol* 92: 346-351
- Appleby CA (1984)** Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Annu Rev Plant Physiol* 35: 443-478
- Apel K, Hirt H (2004)** Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55: 373-399
- Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E (1999)** Salt tolerance conferred by over expression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science* 285: 1256-1258
- Apse MP, Blumwald E (2002)** Engineering salt tolerance in plants. *Curr Opin Biotechnol* 13: 146-150
- Argillier C, Devron JJ, Zengra M, Salsac L (1989)** Relation between nitrogenase activity and stem or xylem sap ureide content of soybean plants (*Glycine Max* L. Merr). *Plant Sci* 61: 37-42

Bibliografía

- Argüelles JC (2000)** Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Arch Microbiol* 174: 217-224
- Arnold T, Schultz J (2002)** Induced sink strength as a prerequisite for induced tannin biosynthesis in developing leaves of *Populus*. *Oecologia* 130: 585-593
- Arrese-Igor C, González EM, Gordon AJ, Minchin FR, Gálvez L, Royuela M, Cabrerizo PM, Aparicio-Tejo PM (1999)** Sucrose synthase and nodule nitrogen fixation under drought and other environmental stresses. *Symbiosis* 27: 189-212
- Asano N, Yamaguchi T, Kameda Y, Matsui K (1987)** Effect of validamycins on glycohydrolase of *Rhizoctonia solani*. *J Antibiot* 40: 526-532
- Asano N, Takeuchi M, Kameda Y, Matsui K, Kono Y (1990)** Trehalase inhibitors, validoxylamine A and related compounds as insecticides. *J. Antibiot* 43: 722-726
- Ashraf M (2002)** Salt tolerance of cotton: some new advances. *Crit Rev Plant Sci* 21: 1-30
- Ashraf M, Harris PJC (2004)** Potential indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Sci* 166: 3-16
- Ashraf M, McNeilly T (2004)** Salinity tolerance in Brassica oilseeds. *Crit Rev Plant Sci* 23: 157-174
- Ashraf M, Fooland MR (2007)** Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ Exp Bot* 59: 206-216
- Asthir B, Singh R (1997)** Purification and characterization of neutral invertase from chickpea nodules. *Ind J Biochem Biophys* 34(6): 529-34
- Atar-Zwillenberg (1998)** Untersuchungen zum kohlenhydrathaushalt in the "resurrection"-Pflanze *Myrothamnus flabellifolia* Welw. Diploma-thesis, Botanical Institute of the University of Basel
- Atkins CA, Smith PMC (2000)** Ureide synthesis in legume nodules. En: Nitrogen Fixation: A Model System for the Analysis of a Biological Process. EJ Triplett, (Ed) pp 559-587 Prokaryotic. Horizon Scientific Press, Wymondham, Norfolk, UK
- Avonce N, Leyman B, Mascorro-Gallardo JO, Van Dijk P, Thelevein JM, Iturriaga G (2004)** The *Arabidopsis* trehalose-6 P synthase AtTPS1 gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signalin. *Plant Physiol* 136: 3649-3659
- Awan MFM (1994)** Ontogenic variation of nodulation, nitrogen fixation and nitrogen assimilation in letil (*Lens culinaris* Medic.) II. Nitrogenase, nitrate reductase, and glutamine synthetase activities. *Acta Physiol Plant* 16: 255-262
- Bae H, Herman EM, Sicher JRC (2005)** Exogenous trehalose induces chemical detoxification and stress response proteins and promotes nonstructural carbohydrate accumulation in *Arabidopsis thaliana* grown in liquid culture. *Plant Sci*.168:1293-1301
- Baker NR, Rosenqvist E (2004)** Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *J Exp Bot* 55: 1607-1621

- Balibrea ME, Cuartero J, Bolarin MC, Perez-Alfocea F (2003)** Sucrolytic activities during fruit development of *Lycopersicon* genotypes differing intolerance to salinity. *Physiol Plant* 118: 38-46
- Bandeoglu E, Eyidogan F, Yücel M, Oktem HA (2004)** Antioxidant responses of shoots and roots of lentil to NaCl-salinity stress. *Plant Growth Regul* 42: 69-77
- Barnett MJ, Fisher RF, Jones T, Komp C, Abola AP, Barloy-Hubler F, Bowser L, Capela D, Galibert F, Gouzy J, Gurjal M, Hong A, Huizar L, Hyman RW, Kahn D., Kahn ML, Kalman S, Keating DH, Palm C, Peck MC, Surzycki R, Wells DH, Yeh KC, Davis RW, Federspiel NA, Long SR (2001)** Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:9883-9888
- Bartlett GR (1958)** Phosphorous assay in column chromatography. *J Biol Chem* 234: 466-468
- Bartels D, Sunkar R (2005)** Drought and salt tolerance in plants. *Crit Rev Plant Sci* 24: 23-58
- Bartolini G, Mazuelos G, Troncoso A (1991)** Influente de Na₂SO₄ and NaCl salt on survival, growth and mineral composition of young olive plants in inert and culture. *Adv Hort Sci* 5: 73-76
- Batista S, Hernández-Lucas I, Martínez-Romero E, Martínez-Drets G (1995)** Molecular genetics of C₄-dicarboxylic acid transport in *Rhizobium tropici*. En: Nitrogen Fixation: Fundamentals and Application. IA Tikhonovich, NA Provorov, VI Romanov, WE Newton (Eds.) pp. 573. Kluwer Academics Publishers Dordrecht, Netherlands.
- Baumert A, Mock HP, Schmidt J, Herbers K, Sonnewald U, Strak D (2001)** Patterns of phenylpropanoids in non-inoculated and potato virus Y-inoculated leaves of transgenic potato plants expressing yeast-derived invertase. *Phytochemistry* 56: 535-541
- Becker M, Ladha JK, Ali M (1995)** Green manure technology: potential, usage, and limitations. A case study for low land rice. *Plant Soil* 174: 181-194
- Benedito VA, Dai X, He J, Zhao PX, Udvardi MK (2006)** Functional genomics of plant transporters in legume nodules. *Func Plant Biol* 33: 731-736
- Bell W, Sun W, Hohmann S, Wera S, Reinders A, De Virgilio C, Wiemken A, Thevelein JM (1998)** Composition and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* trehalose synthase complex. *J Biol Chem* 273: 33311-33319
- Berthomieu P, Conejero G, Nublat A, Brackenbury WJ, Lambert C, Savio C, Uozumi N, Oiki S, Yamada K, Cellier F (2003)** Functional analysis of AtHKT1 in *Arabidopsis* shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *EMBO J* 22: 2004-2014
- Bestel-Corre G, Gianinazzi S, Dumas-Gaudot E (2004)** Impact of sewage sludge on *Medicago truncatula* symbiotic proteome. *Phytochemistry* 65: 1651-1659

Bianchi G, A Gamba, R Limiroli, N Pozzi, R Elster, F Salamini, D Bartels (1993) The unusual sugar composition in leaves of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia*. *Physiol Plant* 87: 223-226

Bilger W, Schreiber U, Lange OL (1987) Chlorophyll fluorescent as an indicator of heat induced limitation of photosynthesis in *Arbutus unedo* L. En: Plant response to stress. JD Tenhunen, FM Catarino, OL Lange, WC Oechel (Eds) pp. 391-399. Springer Verlag, Berlín, Heidelberg, New York, London, París, Tokio.

Blázquez MA, Lagunas R, Gancedo C, Gancedo JM (1993) Trehalose-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases. *FEBS Lett* 329: 51-54

Blázquez MA, Santos E, Flores CL, Martínez-Zapater JM, Salianas J, Gancedo C (1998) Isolation and molecular characterization of *Arabidopsis* TPS1 gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. *Plant J* 13: 685-689

Blee KA, Anderson AJ (2002) Transcripts for genes encoding soluble acid invertase and sucrose synthase accumulate in root tip and cortical cells containing mycorrhizal arbuscules. *Plant Mol Biol* 50: 197-211

Blumwald E (1987) Tonoplast vesicles for the study of ion transport in plant vacuoles. *Physiol Plant* 69: 731-734

Bohlool BB, Ladha JK, Garrity DP, George T (1992) Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: a perspective. *Plant Soil* 141: 1-11

Bolaños L, Martín M, El-Hamdaoui A, Rivilla R, Bonilla I (2006) Nitrogenase inhibition from pea plants grown under salt stress occurs at the physiological level and can be alleviated by B and Ca. *Plant Soil* 280: 135-142

Boncompagni E, Osteras M, Poggi MC, Le Rudulier D (1999) Occurrence of choline and glycine betaine uptake and metabolism in the family *Rhizobiaceae* and their roles in osmoprotection. *Appl Env Microbiol* 65: 2072-2077

Bordeleau LM, Prevost D (1994) Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant Soil* 161: 115-124

Borsani O, Valpuesta V, Botella J (2003) Developing salt tolerant plants in a new century: a molecular biology approach. *Plant Cell Tis Org Cult* 73: 101-115

Bouat A, Crouzet C (1965) Notes techniques sur un appareil semiautomatique de clorage de l'azote et de certains composés volatiles. *Ann Agric* 16: 107-118

Breedvelt MW, Dijkema C, Zevenhuizen LPTM Zehnder AJB (1993) Response of intracellular carbohydrates to a NaCl shock in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* TA-1 and *Rhizobium meliloti* SU-47. *J Gen Microbiol* 139: 3157-3163

Brewin N (2004) Plant cell wall remodelling in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Crit Rev Plant Sci* 23: 293-316

- Brito B, Baginsky C, Palacios JM, Cabrera E, Ruiz-Argüeso T, Imperial J (2005)** Biodiversity of hydrogenase systems from legume endosymbiotic bacteria. *Biochem Soc Trans* 33: 33-35
- Brodmann D, Schuller A, Müller J, Aeschbacher RA, Wiemken A, Boller T, Wingler A (2002)** Induction of trehalase in *Arabidopsis* plants infected with the trehalose-producing pathogen *Plasmodiophora brassicae*. *Mol Plant-Microbe Interact* 15: 693-700
- Broughton W, Zhang F, Perret X, Staehelin (2003)** Signal exchanged between legumes and *Rhizobium*: agricultural uses and perspectives. *Plant Soil* 252: 129-137
- Brown SM, Walsh KB (1994)** Anatomy of the legume nodule cortex with respect to nodule permeability. *Austr J Plant Phys* 21(1): 49-68
- Burg MB, Kwon ED, Kultz D (1996)** Osmotic regulation of gene expression. *FEMS J* 10: 1598-1606
- Caba JM, Lluch C, Hervás A, Ligeró F (1990)** Nitrate metabolism in roots and nodules of *Vicia faba*: in response to exogenous nitrate. *Physiol Plant* 79: 531-539
- Caba JM, Guzmán J, Ortega JL, Lluch C, Lara M, Ligeró F (1997)** Purification and partial characterization of glutamine synthetase from roots nodules of faba bean. *Ars Pharm* 38: 345-365
- Caetano-Anollés G (1997)** Molecular dissection and improvement of the nodule symbiosis in legumes. *Field Crops Res* 53: 47-68
- Cabib E, Leloir FL (1958)** The biosynthesis of trehalose-6-phosphate. *J Biol Chem* 231:259-275
- Capela D, Barloy-Hubler F, Gouzy J, Bothe G, Ampe F, Batut J, Boistard P, Becker A, Boutry M, Cadieu E, Dréano S, Gloux S, Godrie T, Goffeau A, Kahn D, Kiss E, Lelaure V, Masuy D, Pohl T, Portetelle D, Pühler A, Purnelle B, Ramsperger U, Renard C, Thébault P, Vandenbol M, Weidner S, Galibert F (2001)**. Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9877-9882
- Carlson RW, Price NPJ, Stayce G (1994)** The biosynthesis of rhizobial lipooligosaccharide nodulation signal molecules. *Mol Plant-Microbe Interact* 7: 684-695
- Capitán F, Martínez F (1954)** Sobre la determinación espectrofotométrica de fósforo con amidol. *Anal Edad Agrobiol* 13: 767-790
- Casadesus J, Olivares J (1979)** Rough and fine linkage mapping of the *Rhizobium meliloti* chromosome. *Mol Gen Genet* 174:203-209.
- Chen FL, Cullimore JV (1988)** Two isoenzymes of NADH-dependent glutamate synthase in root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol* 88: 1411-1417
- Chen THH, Murata N (2002)** Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Curr Opin Plant Biol* 5: 250-257

Bibliografía

- Chinnusamy V, Schumaker K, Zhu JK (2004)** Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signaling in plants. *J Exp Bot* 55: 225-236
- Chopra, J, Kaur, N, Gupta AK (2003)** Changes in the activities of carbon metabolizing enzymes with pod development in lentil (*Lens culinaris* L.) *Acta Physiol Plant* 25: 185-191
- Christeller JT, Laing WA, Sutton WD (1977)** Carbon dioxide fixation in soybean roots and nodules. Characterization, association with phosphoenolpyruvate carboxylase, and correlation with nitrogen fixation during nodule development. *Plant Physiol* 60: 47-50
- Colebatch G, Desbrosses G, Ott T, Krusell L, Montanari O, Kloska S, Kopka J, Udvardy MK (2004)** Global changes in transcription orchestrate metabolic differentiation during symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus*. *Plant J* 39: 487-512
- Copeland L, Turner JF (1987)** The regulation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. En: *The Biochemistry of Plants*. Vol 11. PK Stumpf, EE Conn (Eds.), pp. 107-128. Academic Press, San Diego, USA
- Copeland L, Vella J, Hong Z (1990)** Enzymes of carbohydrate metabolism in soybean nodules. *Phytochemistry* 28: 57-61
- Cordovilla MP, Ligeró F, Lluch C (1994)** The effect of salinity on N₂ fixation and assimilation in *Vicia faba*. *J Exp Bot* 45: 1483-1488
- Cordovilla MP, Ocaña A, Ligeró F, Lluch C (1995a)** Growth and macronutrient contents of faba bean plants: effects of salinity and nitrate nutrition. *J Plant Nutrition* 18: 1611-1628
- Cordovilla MP, Ocaña A, Ligeró F, Lluch C (1995b)** Salinity effects of growth analysis and nutrient composition in four grain legumes-*Rhizobium* symbiosis. *J Plant Nutrition* 18: 1595-1609
- Cordovilla MP, Ligeró F, Lluch C (1996)** Growth and nitrogen assimilation in nodules in response to nitrate levels in *Vicia faba* under salt stress. *J Exp Bot* 47: 203-210
- Cordovilla MP, Berridos SI, Ligeró F, Lluch C (1999)** *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
- 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, Epstein E, Läuchli A (1990)** Effects of sodium potassium and calcium on salt-stressed barley. *Physiol Plant* 80: 83-88
- Cramer GR (1992)** Kinetics of maize leaves elongation. 2 Responses of a Na⁺-excluding cultivar and a Na⁺-including cultivar to varying Na⁺/Ca²⁺ salinities. *J Exp Bot* 43: 857-864
- CramerGR (2002)** Sodium-calcium interactions under salinity stress. En: *Salinity: Environment-Plant-Molecules*. A Läuchli, U Lüttge (Eds), pp 205-228 Kluwer Academic Publishers, London, UK

- Cullimore JV, Bennet MJ (1988)** The molecular biology and biochemistry of plant glutamine synthase from root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. and other legumes. *Plant Physiol* 132: 387-393
- Cullimore JV, Ranjeva R, Bono JJ (2001)** Perception of lipo-chitooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends Plant Sci* 6: 24–30
- Dardanelli MS, González PS, Bueno MA, Ghittoni NE (2000)** Synthesis, accumulation and hydrolysis of trehalose during growth of peanut rhizobia in hyperosmotic media. *J Basic Microbiol* 3: 49-56
- Davis WJ, Zhang J (1991)** Root signal and the regulation of growth and development of plant in drying soils. *Plant Mol Biol* 42: 55-76
- Day DA y Copeland L (1991)** Carbon metabolism and compartmentation in nitrogen fixing legumes nodules. *Plant Physiol Biochem* 29: 185-201
- Day DA, Poole PS, Tyerman SD, Rosendahl L (2000)** Ammonia and amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen-fixing legume nodules. *Cel Mol Life Sci* 58: 61-71
- Day DA, Kaiser B, Thomson R, Udvardy MK, Moreau S, Puppo A (2001)** Nutrient transport across symbiotic membranes from legume nodules. *Aust J Plant Physiol* 28: 667-674
- Delauney A, Verna DPS (1993)** Proline biosynthesis and osmorregulation in plants. *Plant J* 4: 215-223
- Delgado MJ, Garrido JM, Ligeró F, Lluch C (1993)** Nitrogen fixation and carbon metabolism by nodules and bacteroids of pea plants under sodium chloride. *Physiol Plant* 89: 824-829
- Delgado MJ, Ligeró F, Lluch C (1994)** Effects of salt stress on growth and nitrogen fixation by pea, faba-bean, common bean and soybean plants. *Soil Biol Biochem* 26(3): 371-376
- Derroche ME, Carrayol E (1988)** Nodule phosphoenolpyruvate carboxylase: a review. *Physiol Plant* 74: 775-782
- Desbrosses G, Kopka C, Ott T, Udvardi MK (2004)** *Lotus japonicus* LjKUP is induced late during nodule development and encodes a potassium transporter of the plasma membrane. *Mol Plant– Microbe Interact* 17: 789–797
- De Smet KAL, Weston A, Brown IN, Young DB, Robertson BD (2000)** Three pathways for trehalose biosynthesis in mycobacteria. *Microbiology* 146:199-208.
- Dionisio-Sese ML, Tobita S (2000)** Effects of salinity on sodium content and photosynthetic responses of rice seedlings differing in salt tolerance. *J Plant Physiol* 157: 54-58
- Djordjevic MA, Chen HC, Natera S, Van Noorden G, Mezel C, Taylor S, Renard C, Geiger O, the *Sinorhizobium* DNA Sequencing Consortium, Weiller GF (2003)** A

Bibliografía

global analysis of protein expression profiles in *Sinorhizobium meliloti*: discovery of new genes for nodule occupancy and stress adaptation. *Mol Plant-Microbe Interact* 16: 508-524

Dmitryjuk M, Żóltowska K (2003) Purification and characterization of acid trehalase from muscles of *Ascaris suum* (Nematoda). *Com Biochem Physiol* 131: 61-69

Dominguez-Ferreras A, Pérez-Arnedo R, Becker A, Olivares J, Soto MJ, Sanjuán J (2006) Transcriptome profiling reveals the importance of plasmid pSym B for osmoadaptation of *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol.* 188: 7617-7625

Dos Santos PC, Dean DR, Hu YL y Ribbe MW (2004) Formation and insertion of the nitrogenase iron-molybdenum cofactor. *Chem Rev* 104: 1159-1173

Downie JA, Walker SA (1999) Plant responses to nodulation factors. *Curr Opin Plant Biol* 2: 483-489

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 A Bothe, HA Puhler (Eds) pp 307-312. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, Germany

Doyle JJ, Luckow MA (2003) The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol* 131: 900-910

Dumas-Gaudot E, Aminour N, Weidman S, Bestel-Corre G, Valot S, Lenogue S, Gianninazzi-Pearson V, Gianninazzi S (2004) A technical trick for studying proteomics in parallel to transcriptomics in symbiotic root fungus interactions. *Proteomics* 4: 451-453

Eastmond PJ, Van Dijken AJH, Spielman M, Kerr K, Tissier AF, Dickinson HG, Jones JDG, Smeekens SC, Graham IA (2002) Trehalose-6-phosphate synthase 1 which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential in *Arabidopsis* embryo maturation. *Plant J* 29:225-235

Eastmond PJ, Graham IA (2003) Trehalose metabolism: a regulatory role for trehalose-6-phosphate?. *Curr Opin Plant Biol* 6: 231-235

El-Hamdaoui A, Redondo-Nieto M, Rivilla R, Bonilla I, Bolaños L (2003) Effects of boron and calcium nutrition on the establishment of the *Rhizobium leguminosarum*-pea (*Pisum sativum*) symbiosis and nodule development under salt stress. *Plant Cell Environ* 26: 1003-1012

El-Shintinawy F (2000) Photosynthesis in two wheat cultivars differing in salt susceptibility. *Photosynthetica* 38: 615-620

Elbein AD (1974) The metabolism of α,α -trehalose. *Adv Carb Chem Biochem* 30: 227-256

Elbein AD, Pan YT, Pastuszak I, Carroll D (2003) New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 13: 17R-27R

El Yahyaoui F, Küster H, Ben Amor B, Hohnjec N, Pühler A, Becker A, Gouzy J, Vernié T, Gough C, Niebel A (2004) Expression profiling in *Medicago truncatula*

identifies more than 750 genes differentially expressed during nodulation, including many potential regulators of the symbiotic program. *Plant Physiol* 136: 3159–3176

Emerich DW, Anthon GE, Hayes RR, Karr DB, Liang R, Preston GG, Ssmith MT, Waters JK (1988) Metabolism of Rhizobium-leguminous plant nodules with an emphasis on bacteroid carbon metabolism. En: Nitrogen Fixation: Hundred Years After. H Bothe, FJ De Bruijn, WE Newton (Eds.) pp. 531-546, Gustav Fischer, Stuttgart, Germany

Endre G, Kereszt A, Kevei Z, Mihacea S, Kalo P, Kiss GB (2002) A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 417: 962

Everard JD, Gucci R, Kann SC, Flore JA, Loeschner WH (1994) Gas exchange and carbon partitioning in the leaves of celery (*Apium graveolens* L.) at various levels of root zone salinity. *Plant Physiol* 106: 281-292

Fariás-Rodríguez R, Mellor R, Arias C, Peña-Cabrales JJ (1998) The accumulation of trehalose in nodules of several cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris*) and its correlation with resistance to drought stress. *Physiol Plant* 102: 353-359

Fedorova M, Van de Mortel J, Matsumoto PA, Cho J, Town CD, VadenBosch KA, Gantt JS, Vance CP (2002) Genome-wide identification of nodule-specific transcripts in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* 130: 519-537

Fernández-Pascual M, De Lorenzo C, De Felipe MR, Rajalakshmi S, Gordon AJ, Thomas BJ, Minchin FR (1996) Possible reason for relative salt stress tolerance in nodules of white lupin cv. Multolupa. *J Exp Bot* 47: 1709-1716

Ferri A, Lluch C, Ocaña A (2000) Effect of salt stress on carbon metabolism and bacteroid respiration in root nodules of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Biol* 2: 396-402

Finan TM, Oresnik I, Bottacin A (1988) Mutants of *R. meliloti* defective in succinate metabolism. *J Bacteriol* 170: 3396-3404

Finan TM, Weidner S, Chain P, Buhrmester J, Wong K, Vorhölter FJ (2001) The complete sequence of the 1,683 kilobase pSym B megaplasmid from the N₂-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9889-9894

Flemetakis E, Dimou M, Cotzur D, Efroze RC, Aivalakis G, Colebatch G, Udvardi M, Katinakis P (2003) A sucrose transporter, LjSUT4, is up-regulated during *Lotus japonicus* nodule development. *J Exp Bot* 54: 1789-1791

Flemetakis E, Efroze RC, Ott T, Stedel C, Aivalakis G, Udvardi M, Katinakis P (2006) Spacial and temporal organization of sucrose metabolism in *Lotus japonicus* nitrogen-fixing nodules suggests a role for the elusive alkaline/neutral invertase. *Plant Mol Biol* 62: 53-69

Flowers TJ, Troke PF, Yeo AR (1977) The mechanism of tolerance in halophytes. *Annu Rev Plant Physiol* 28: 89-121

Bibliografía

Fougère F, Rudulier D, Streeter JG (1991) Effects of salt stress on amino acid, organic acid, and carbohydrate composition of roots, bacteroids, and cytosol of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol* 96: 1228-1236

Franco JA, Esteban C, Rodríguez C (1993) Effects of salinity on various growth stages of muskmelon cv. Revigal. *J Hor Sci* 68: 899-904

Fritzius T, Aeschbacher R, Wiemken A, Winkler A (2001) Induction of ApL3 expression by trehalose complements the starch-deficient *Arabidopsis* mutant *adg2-1* lacking ApL1, the large subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiol* 126:883-889

Fukuda A, Nakamura A, Tagiri A, Tanaka H, Miyao A, Hirochika H, Tanaka Y (2004) Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter from rice. *Plant Cell Physiol* 45: 146-159

Fukushima E, Arata Y, Endo T, Sonnewald U, Sato F (2001) Improved salt tolerance of transgenic tobacco expressing apoplastic yeast-derived invertase. *Plant Cell Physiol* 42: 245-249

Fuller F, Verna DPS (1984) Appearance and accumulation of nodulin mRNAs and their relationships to the effectiveness of root nodules. *Plant Mol Biol* 3: 21-28

Galibert F, Finan TM, Long SR, Pühler A, Abola P, Ampe F, Barloy-Hubler F, Barnett MJ, Becker A, Boistard P, Bothe G, Boutry M, Bowser L, Buhrmester J, Cadieu E, Capela D, Chain P, Cowie A, Davis RW, Dréano S, Federspiel NA, Fisher RF, Gloux S, Godrie T, Goffeau A, Golding B, Gouzy J, Gurjal M, Hernandez-Lucas I, Hong A, Huizar L, Hyman RW, Jones T, Kahn D, Kahn ML, Kalman S, Keating DH, Kiss E, Komp C, Lelaure V, Masuy D, Palm C, Peck MC, Pohl TM, Portetelle D, Purnelle B, Ramsperger U, Surzycki R, Thébault P, Vandenbol M, Vorhölter FJ, Weidner S, Wells DH, Wong K, Yeh KC, Batut J (2001). The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* 293 5530: 668-672

Galinski EA (1995) Osmoadaptation in bacteria. *Adv Microbiol Physiol* 37: 273-328

Gallardo F, Gálvez S, Gadal P, Cánovas FM (1995) Changes in NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase during tomato fruit ripening: characterization of the predominant cytosolic enzyme from green and ripe pericarp. *Planta* 196: 148-154

Gallardo KC, Le Signor, Vadekerckhove RD, Thonson, Burstin J (2003) Proteomics of *Medicago truncatula* seed development established the time frame of diverse metabolic processes related to diverse accumulation. *Plant Physiol* 134: 1598-1613

Gálvez L, Lancien M, Hodges M (1999) Are isocitrate dehydrogenases and oxoglutarate involved in the regulation of glutamate synthesis. *Trend Plant Sci* 4: 484-490

Gálvez L, González EM, Arrese-Igor C (2005) Evidence of carbon flux shortage and carbon/nitrogen interactions in pea nodules in conditions of water stress. *J Exp Bot* 56: 2551-2560

Garg AK, Kim JK, Owens TJ, Ranwala AP, Choi YD, Kochian LV, Wu RJ (2002) Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 15898-15903

- Garczarska M, Ratajczak L (1999)** Changes in the activity and isoenzyme patterns of malate dehydrogenase in root nodules of yellow lupine. *Acta Physiol Plant* 21: 149-153
- Garrity GM, Bell JA, Lilburn T (2005)** The revised road map to the manual. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., Vol II The Proteobacteria-Part A: Introductory Essays. DJ Brenner, NR Krieg, JT Staley (Eds.) pp.159-206 Springer Verlag, New York USA
- Gelvin SB (2006)** Agrobacterium transformation of *Arabidopsis thaliana* roots: a quantitative assay. *Meth Mol Biol* 343:105-13
- Georgiev GI, Atkias CA (1993)** Effects of salinity on N₂ fixation, nitrogen metabolism and export and diffusive conductance of cowpea root nodules. *Symbiosis* 15:239-255
- Gepts P, Beavis WD, Brummer EC, Shoemaker RC, Stalker HT, Weeden NF, Young ND (2005)** Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference. *Plant Physiol* 137: 1228-1235
- Geurts R, Fodorova E, Bisseling T (2005)** Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. *Curr Opin Plant Biol* 8: 346-3521
- Ghittoni NE, MA Bueno (1996)** Changes in the cellular content of trehalose in four peanut rhizobia strains cultured under hypersalinity. *Symbiosis* 20:117-127
- Gilbert GA, Gadush MV, Wilson C, Madore MA (1998)** Amino acid accumulation in sink and source tissues fo *Coleus blumei* Bnth during salinity stress. *J Exp Bot* 49: 107-114
- Glenn AR, MJ Dilworth (1981)** The uptake and hydrolysis of disaccharides by fast- and slow growing species of *Rhizobium*. *Arch Microbiol* 129:233-239
- Glenn EP, JJ Brown, Blumwald E (1999)** Salt tolerance and crop potential of halophytes. *Crit Rev Plant Sci* 18:227-255
- Goddijn OJM, Smeekens S (1998)** Sensing trehalose biosynthesis in plants. *Plant J* 14:143-146
- Goddijn OJM, Van Dun K (1999)** Trehalose metabolism in plants. *Trends Plant Sci* 4:315-319
- Goddijn OJM, Verwoerd TC, Voogd E, Krutwagen PWHH, de Graaf PTHM, Poels J, Van Dun K, Ponstein AS, Damm B, Pen J (1997)** Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant Physiol* 113:181-190
- Gómez-Cárdenas A, Arbona V, Jacas J, Primo-Millo E, Tallon M (2003)** Abscisic acid reduced leaf abscission and increases salt tolerance in citrus plant. *J Plant Growth Regul* 21: 234-240
- González EM, 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 EM, Aparicio-Tejo PM, Gordon AJ, Minchin FR, Royuela M, Arrese-Igor C (1998)** Water-deficit effects on carbon and nitrogen metabolism of pea nodules. *J Exp Bot* 49: 1705-1714

- Gordon AJ, Mitchel DF, Ryle GJA, Powell CE (1987)** Diurnal production and utilization of photosynthate in nodulated white clover. *J Exp Bot* 38: 84-98
- Gordon AJ (1991)** Enzyme distribution between the cortex and the infected region of soybean nodules. *J Exp Bot* 42: 961-967
- Gordon AJ (1992)** Carbon metabolism in the legume nodule. En: Carbon partitioning within and between organisms. CJ Pollok, JF Farver, AJ Gordon (Eds) pp. 133-162. Oxford Bios
- Gordon AJ (1995)** Sucrose metabolism to support N₂ fixation in legume root nodules. En: Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications. IA Tikhonovich, NA Provorov, VI Romanov, WE Newton, (Eds) pp. 533-538 Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands
- Gordon AJ, Minchin FR, Skøt L, James CL (1997)** Stress-induced declines in soybean N₂ fixation are related to nodule sucrose synthase activity. *Plant Physiol* 114: 937-946
- Gordon AJ, Minchin FR, James LC, Komina O (1999)** Sucrose synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation. *Plant Physiol* 120: 867-878
- Gorgocena Y, Iturbe-Ormaitxe I, Escudero PR, Becana M (1995)** Antioxidant defenses against activated oxygen in pea nodules subjected to water stress. *Plant Physiol* 108: 753-759
- Göttfert M, Rödiger S, Hennicke H (2000)** Analysis of the symbiotic gene region of *Bradyrhizobium japonicum*. En: Nitrogen Fixation: from Molecules to Crop Productivity. FO Pedrosa, M Hungria, MG Yates, WE Newton (Eds) pp. 281-282. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands
- Gouffi K, Pica N, Pichereau V, Blanco C (1999)** Disaccharides as a new class of nonaccumulating osmoprotectants for *Sinorhizobium meliloti*. *App Environ Microbiol* 65:1491-1500
- Govindjee (1995)** Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll a fluorescence. *Aust J Plant Physiol* 22: 131-160
- Graham PH, Vance CP (2003)** Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol* 131: 872-877
- Grattan SR, Maas EV (1988)** Effect of salinity on phosphate accumulation and injury in soybean: I Influence of CaCl₂/NaCl ratios. *Plant Soil* 105: 25-32
- Grattan SR, Grieve CM (1999)** Mineral nutrient acquisition and response by plants grown in saline environments. En: Handbook of Plant and Crop Stress. M Pessarakli (Ed) pp. 203-229. Marcel Dekker, New York, USA
- Guenther JF, Roberts DM (2000)** Water-selective and multifunctional aquaporins from *Lotus japonicus* nodules. *Planta* 210: 741-748

- Hafeez FY, Asland 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
- Handberg K, Stougaard J (1992)** *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *Plant J* 2: 487-496
- Hanning I, Heldt HW (1993)** On the function of mitochondrial metabolism during photosynthesis in spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. Partitioning between respiration and export of redox equivalents and precursors for nitrate assimilation products. *Plant Physiol* 103: 1147-1154
- Hansen EH, Munns DN (1988)** Effect of CaSO₄ and NaCl on growth and nitrogen fixation of *Leucaena leucocephala*. *Plant Soil* 107: 95-99
- Hasson E, Poljakoff-Mayber A (1981)** Does salinity induce early aging of pea tissue?. *Oecologia* 50: 94-97.
- Hasegawa PM, Bressan R, Zhu JK, Bohnert HJ (2000)** Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51: 463-499
- Hattori Y, Omori H, Hanyu M, Kaseda N, Mishima E, Kaneko T, Tabata, S Saeki K (2002)** Ordered cosmid library of the *Mesorhizobium loti* MAFF303099 genome for systematic gene disruption and complementation analysis. *Plant Cell Physiol* 43: 1542-1557
- Heckman AB, Lombardo F, Hiroki M, Perry JA, Bunnewell S, Parniske M, Wang TL, Downie JA (2006)** *Lotus japonicus* nodulation requires two GRAS domain regulators, one of which is functionally conserved in a non-legume. *Plant Physiol* 142: 1739-1750
- Herridge DF, Dasno SKA (1995)** Enhancing crop legume N₂ fixation through selection and breeding. *Plant Soil* 174: 51-82
- Hirsch AM (1992)** Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol* 122: 211-237
- Hirsch AM (2004)** Plant-microbe symbioses: a continuum from commensalism to parasitism. *Symbiosis* 37: 345-363
- Hodges M, Flesch V, Gálvez L (2003)** Higher plant NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenases, ammonium assimilation and NADPH production. *Plant Physiol Biochem* 41: 577-585
- Hoelzle I, Streeter JG (1990)** Increased accumulation of trehalose in rhizobia cultured under 1% oxygen. *Appl Environ Microbiol* 56:3213-3215
- Hoire T, Schroeder JI (2004)** Sodium transporters in plants. Diverse genes and physiological functions. *Plant Physiol* 136: 2457-2462
- Hong Z, Lakkineni K, Zhang Z, Verma DPS (2000)** Removal of feedback inhibition of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiol* 122: 1129-1136

Bibliografía

- Hounsa CG, Brandt EV, Thevelein J, Hohmann S, Prior BA (1998)** Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology* 144: 671-680
- Howieson G, Nutt B, Evans P (2000)** Estimation of host-strain compatibility for symbiotic N-fixation between *Rhizobium meliloti*, several annual species of *Medicago truncatula* and *Medicago sativa*. *Plant Soil* 219: 49-55
- Hu Y, Schmidhalter U (2005)** Drought and salinity: a comparison of their effects on mineral nutrition of plants. *J Plant Nutr Soil Sci* 168: 541-549
- Hu Y, Fricke W, Schmidhalter U (2005)** Salinity and the growth of non-halophytic grass leaves: the role of mineral nutrient distribution. *Func Plant Biol* 32: 973-985
- Igarashi RY, Seefeldt LC (2003)** Nitrogen fixation: The mechanism of the Mo-dependent nitrogenase. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 38: 35-384
- Inagaki K, Ueno N, Tamura T, Tanaka H (2001)** Purification and characterization of an acid trehalase from *Acidobacterium capsulatum*. *J Biosci. Bioeng* 91 141-146
- 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
- Israel DW, Jackson WA (1982)** Ion balance, uptake and transport processes in N₂-fixing and nitrate and urea-dependent soybean plants. *Plant Physiol* 69: 171-178
- Ito M, Miyamoto J, Mori Y, Fujimoto S, Uchiumi T, Abe M, Suzuki A, Tabata S, Fukui K (2000)** Genome and chromosome dimensions of *Lotus japonicus*. *J Plant Res* 113: 435-442
- Ivanova I, Fodouli A, Koshuchowa S, Kozhukhova S (1991)** Effects of salt stress on guard cells and their abolition by phytohormones and polyamines. *Fiziol Rast* 17: 24-27
- Iwahashi M, Tachibana Y, Ohta Y (1982)** Accumulation of calcium, magnesium, potassium and sodium with growth of individual leaves, petioles and stems of cucumber plants. *Soil Sci Plant Nutr* 28: 441-449
- Jakobson, I (1985)** The role of phosphorus in nitrogen fixation by young pea plants. *Physiol Plant* 64: 190-196
- James EK, Sprent JI, Hay GT, Minchin FR (1993)** The effect of irradiance on the recovery of soybean nodules from sodium chloride induced senescence. *J Exp Bot* 44: 997-1005
- Jang IC, Oh SJ, Seo JS, Choi WB, Song SI, Kim CH, Kim YS, Seo HS, Choi YD, Nahm BH, Kim JK (2003)** Expression of a bifunctional fusion of the *E. coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. *Plant Physiol* 131: 516-524
- Janes EK, Iannetta PPM, Deeks L, Sprent JI, Minchin FR (2000)** Detopping causes production of intercellular space occlusions in both the cortex and infected region of soybean nodules. *Plant Cell Environ* 23: 377-386

- Jenkinson DA (2001)** The impact of humans on the nitrogen cycle with focus on temperate arable agriculture. *Plant Soil* 228: 3-15
- Jensen JB, Peters KN, Bhuvaneshwari TV (2002)** Redundancy in periplasmic binding protein-dependent transport systems for trehalose, sucrose, and maltose in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 184: 2978-2986
- Jensen SE, Hauggaard-Nielsen H (2003)** How can increased use of biological N₂ fixation in agriculture benefit the environment?. *Plant Soil* 252: 177-186
- Jeong J, Suh S, Guan C, Tsay Y-F, Moran N, Oh CJ, An CS, Demchenko KN, Pawlowski K, Lee Y (2004)** A nodule-specific dicarboxylate transporter from alder is a member of the peptide transporter family. *Plant Physiol* 134: 969-978
- Jorrín JV, Rubiales D, Dumas-Gaudot E, Recorbet G, Maldonado A, Castillejo MA, Curto M (2006)** Proteomics: a promising approach to study biotic interaction in legumes. *Euphytica* 147: 37-47
- Kaasen I, McDougall J, Strom AR (1994)** Analysis of the *otsA/B* operon for osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli* and homology of the OtsA and OtsB proteins to yeast trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex. *Gene* 145: 9-15
- Kahn ML, McDermott TM, Udvardi MK (1998)** Carbon and Nitrogen Metabolism in Rhizobia. En: "The rhizobiaceae" HP Spaink, A Kondorosi, PJJ Hooykaas (Eds.). pp.461-485 Kluwer Academic Publishers Dordrecht, Netherland
- Kaise WN, Heber U (1981)** Photosynthesis under osmotic stress. Effect of high solute concentration on the permeability of the chloroplast envelope and on the activity of the stroma enzymes. *Planta* 153: 423-429
- Kaiser BN, Finnegan PM, Tyerman SD, Whitehead LF, Bergensen FJ, Day DA, Udvardy MK (1998)** Characterization of an ammonium transport protein from the peribacteroid membrane of soybean nodules. *Science* 281: 1202-1206
- Kaiser BN, Moreau S, Castelli J, Thomson R, Lambert A, Bogliolo S, Puppo A, Day DA (2003)** The soybean NRAMP homologue, GmDMT1, is a symbiotic divalent metal transporter capable of ferrous iron transport. *Plant J* 35: 295-304
- Kakkar RR, Rai VR (1997)** Polyamines under salt stress, En: Strategies for Improving Salt Tolerance in Higher Plants PK Jaiwal, RP Singh, A Gulati (Eds) pp. 191-203 Oxford and IBH Publishing Company New Delhi, India
- Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Asamizu E, Kato T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K, Ishikawa A, Kawashima K, Kimura T, Kishida Y, Kiyokawa C, Kohara M, Matsumoto M, Matsuno A, Mochizuki Y, Nakayama S, Nakazaki N, Shimpo S, Sugimoto M, Takeuchi C, Yamada M, Tabata S (2000)** Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *J DNA Research* 7: 331-338
- Kefu A, Munns R, King RW (1991)** Abscisic acid levels in NaCl treated barley, cotton and saltbush. *Aust J Plant Physiol* 18: 17-24

Bibliografía

- Keller F, Schellenberg M, Wiemken A (1982)** Localization of trehalase in vacuoles and of trehalose in cytosol of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Arch Microbiol* 131: 198-201
- Kelly PJ, Catley BJ (1976)** A purification of trehalase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Anal Biochem* 72 353-358
- Kendall E, Adams R, Kartha K (1990)** Trehalase activity in plant tissue cultures. *Phytochemistry* 29: 2525-2528
- Khadri M, Pliego L, Soussi M, Ocaña A (2001)** Ammonium assimilation and ureide metabolism in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. *Agronomie* 21: 635-643
- Khadri M, Tejera NA, Lluch C (2006)** Alleviation of salt stress in common bean (*Phaseolus vulgaris*) by exogenous abscisic acid supply. *J Plant Growth Regul* 25: 110-119
- Khadri M, Tejera NA, Lluch C (2007)** Sodium chloride-ABA interaction in two common bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars differing in salinity tolerance. *Environ Exp Bot* (accepted)
- Kim YH, Kwon TK, Park S, Seo HS, Cheong JJ, Kim CH, Kim JK, Lee JS, Choi YD (2000)** Trehalose synthesis by sequential reactions of recombinant maltotriose-6-phosphatase and maltotriose-6-phosphatase trehalohydrolase from *Brevibacterium helvolum*. *Appl Environ Microbiol* 66:620-4624
- Kiniry JR (1993)** Non structural carbohydrate utilization by wheat shaded during grain growth. *Agron J* 85: 844-849
- Kinnback A, D Werner (1991)** Glucosidases (alpha, beta) and trehalase (alpha) in the peribacteroid space and the bacteroid periplasm of *Glycine-max* root-nodules. *Plant Sci* 77: 47-55
- Kleczkowski LA (1996)** Back to the drawing board: redefining starch synthesis in cereals. *Trends Plant Sci* 1: 363-402
- Knight H, Trewavas AJ, Knight MR (1997)** Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J* 12: 1067-1078
- Koch K (2004)** Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr Opin Plant Biol* 7: 235-246
- Kolbe A, Tiessen A, Schluempmann H, Paul M, Ulrich S, Geigenberger P(2005)** Trehalose-6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:1118-11123
- Kono Y, S Takeda, Y Kameda, M Takahashi, K Matsushita, M Nishina, E Hori (1993)** Lethal activity of a trehalase inhibitor, validoxylamine A, and its influence on the blood sugar level in *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Appl Entomol Zool* 28: 379-386
- Kouchi H, Fukai K, Katagiri H, Minamisawa K, Tajima S (1988)** Isolation and enzymological characterisation of infected and uninfected cell protoplast from root nodules of *Glycine max*. *Physiol Plant* 73: 327-334

Kouchi H, Shimomura K, Hata S, Hirota A, Wu G-J, Kumagai H, Tajima S, Sukanuma N, Suzuki A, Aoki T, Hayashi M, Yokoyama T, Ohyama T, Asamizu E, Kuwata C, Shibata D, Tabata S (2004) Large-scale analysis of gene expression profiles during early stages of root nodule formation in a model legume, *Lotus japonicus*. *DNA Res* 11(4):263-274

Kura-Hotta M, Satoh K, Katoh S (1987) Relationship between photosynthesis and chlorophyll content during leaf senescence of rice seedling. *Plant Cell Physiol.* 28: 1321-1329

Krusell L, Krause K, Ott T, Desbrosses G, Krämer U, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, James EK, Sandal N, Stougaard J, Kawaguchi M, Miyamoto A, Sukanuma N, Udvardi M (2005) The sulfate transporter SST1 is crucial for symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus* root nodules. *Plant Cell* 17: 1625-1636

Küster H, Vieweg MF, Manthey K, Baier MC, Hohnjec N, Perlick AM (2007) Identification and expression regulation of symbiotically activated legume genes. *Phytochemistry* 68: 8-18

Kuykendall LD, Hashem FM, Wang ET, Young JM (2005) Genus *Sinorhizobium*. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., Vol II The Proteobacteria-Part C: The alpha-, beta-, delta- and epsilon- Proteobacteria. DJ Brenner, NR Krieg, JT Staley (Eds), pp.358-361. Springer Verlag, New York, USA

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

La Rue, Child (1978) Sensitive fluorometric assay for leghemoglobin. *Annal Biochem* 92: 11-15

Lachica M, Aguilar A, Yañez J (1973) Análisis foliar. Métodos utilizados en la Estación Experimental de Zaidín C.S.I.C. *Anal Edad Agrobiol* 32: 1033-1047

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227: 680-685

Läuchli A (1984) Salt exclusion: an adaptation of legume for crops and pastures under saline conditions. En: Salinity Tolerance in Plants. Strategies for Crop Improvement RC Staples, GH Toenniessen (Eds) pp. 171-187, John Wiley and Sons, New York, USA

Leary JK, Singleton PW, Scowcroft PG, Brthakur D (2006) Symbiotic diversity in the cosmopolitan genus *Acacia*. *Symbiosis* 41: 107-117

Lederberg EM, Cohen SN (1974) Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol.* 119: 1072-1074

Ledley TS, Sundquist ET, Schwartz SE, Hall DK, Fellows JD, Killeen TL (1999) Climate change and greenhouse gases vol. 80, n°39 American Geophysical Union, Washington, DC, USA

Bibliografía

Lee J, Tsui M, Nakamura M, Nishimoto M, Okuyama M, Mori H (2001) Purification and identification of the essential ionisable groups of honeybee *Apis mellifera* L., trehalase. *Biosci Biotechnol Biochem* 65 2657–2665

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

Leslie SB, Israeli E, Lighthart B, Crowe JH, Crowe LM (1995) Trehalose and sucrose protect both membranes and protein in intact bacteria during drying. *Appl Environ Microbiol* 61: 3592-3597

Levi C, Preiss AS (1978) Amylopectin degradation in pea chloroplast extracts. *Plant Physiol* 61: 218-220

Lévy J, Bres C, Geurts R, Chalhoub B, Kulikova O, Duc G, Journet E, Ané JM, Lauber E, Bisseling T, Dénarié J, Rosenberg C, Debelle F (2004) A putative Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science* 303: 1361-1364

Lhuissier FGP, De Ruijter NCA, Sieberer BJ, Esseling JJ, Emons AMC (2001) Time course of cell biological events evoked in legume root hairs by *Rhizobium* Nod factors: state of the art. *Ann Botany* 87: 289–302

Lichtenthaler HK (1996) The Stress Concept in Plants: An Introduction. En: Stress of Life: from Molecules to Man. P Csermely (Ed) Academy of Sciences New York, USA

Liu J, Zhu JK (1997) An *Arabidopsis* mutant that requires increased calcium for potassium nutrition and salt tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 14960-14964

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct method. *Methods* 25: 402-408

Lodwig E, Poole P (2003) Metabolism of *rhizobium* bacteroids. *Crit Rev Plant Sci* 22:37-78

Lodwing E, Hosie AHF, Bourdes A, Findlay K, Allaway D, Karunakaran R, Downie JA, Poole P (2003) Amino-acid cycling nitrogen fixation in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Nature* 422: 722-726

López-Millán AF, Danielle RE, Michael AG (2004) Identification and characterization of several new members of the ZIP family of metal ion transporters in *Medicago truncatula*. *Plant Mol Biol* 54: 583-596

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

Londesborough J, Varimo K (1984) Characterization of two trehalases in baker's yeast. *Biochem J* 219 511–518

- Lu C, Zhang (1998)** Thermostability of photosystem II is increased in salt-stressed sorghum. *Aust J Plant Physiol* 25: 317-324
- Lum MR, Hirsch AM (2003)** Root and their symbiotic microbes: strategies to obtain nitrogen and phosphorous in a nutrient-limiting environment. *J Plant Grow Regul* 21: 368-382
- Lunn JE, Feil R, Hendricks JHM, Gibon Y, Morcuende R, Osuna D, Scheible WR, Carrillo P, Hajiresaei MR, Stitt M (2006)** Sugar-induced increases in trehalose-6-phosphate are correlated with redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J* 397: 139-148
- Lutts S, Kinet JM, Bouharmont J (1996)** Effects of salt stress on growth, mineral nutrition and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity tolerance. *J Plant Grow Regul* 19: 207-218
- Lynch J, Läuchli A (1985)** Salts stress disturbs the calcium nutrition of barley (*Hordeum vulgare* L.) *New Phytol* 99: 345-354
- Madsen EB, Madsen LH, Radutoiu S, Olbryt M, Rakwalska M, Szczyglowski K, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Sandal N, Stougaard J (2003)** A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* 425: 637-640
- Maggiao A, Miyazaki S, Veronese P, Fujita T, Ibeas JI, Damsz B, Narasimham ML, Hasegawa PM, Joly RJ, Bressan RA (2002)** Does proline accumulation play an active role in stress induced growth reduction? *Plant J* 31: 699-712
- Mäkelä PM, Munns R, Colmer TD, Peltonen-Sainio P (2003)** Growth of tomato and an ABA-deficient mutant under salinity conditions. *Physiol Plant* 117: 58-63
- Mansour MMF (1998)** Protection of plasma membrane of onion epidermal cells by glycinebetaine and proline against NaCl stress. *Plant Physiol Biochem* 36: 767-772
- Mansour MMF (2000)** Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. *Biol Plant* 43: 491-500
- Marino D, González EM, Frendo P, Puppo A, Arrese-Igor C (2007)** NADPH recycling systems in oxidative stressed pea nodules: a key role for the NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase. *Planta* 225: 413-421
- Markwell MAK, Hass SM, Bieber LL, Tolberg NE (1978)** A modification of the Lowry procedure to simply protein determination. *Anal Biochem* 87: 206-210
- Marschner H (1994)** Mineral Nutrition in Higher Plants. Academic Press, London UK
- Maruta K, Hattori K, Nakada T, Kubota M, Sugimoto T, Kurimoto M (1996a)** Cloning and sequencing of trehalose biosynthesis genes from *Arthrobacter* sp. Q36. *Biochim Biophys Acta* 1289: 10-13
- Maruta K, Hattori K, Nakada T, Kubota M, Sugimoto T, Kurimoto M (1996b)** Cloning and sequencing of trehalose biosynthesis from *Rhizobium* sp. M-11. *Biosci Biotech Biochem* 60: 717-720

Bibliografía

Masojidek J, Hall DO (1992) Salinity and drought stress are amplified by high irradiance in sorghum. *Photosynthetica* 27: 159-171.

Matamoros MA, Clemente MR, Sato S, Asamizu E, Tabata S, Ramos J, Moran JF, Stiller J, Gresshoff PM, Becana M (2003a) Molecular analysis of the pathway for the synthesis of thiol tripeptides in the model legume *Lotus japonicus*. *Mol Plant Microbe Interact* 16: 1039-1046

Matamoros MA, Dalton DA, Ramos J, Clemente MR, Rubio MC, Becana M (2003b) Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis. *Plant Physiol* 133: 499

Maury P, Suc S, Berger M, Planchon C (1993) Response of photochemical processes of photosynthesis to dinitrogen fixation in soybean. *Plant Physiol* 101: 493-497

Mekkaoui ME, Monneveux P, Damania AB (1989) Chlorophyll fluorescence as a predictive test for salt tolerance in cereals: preliminary results on durum wheat. *Rachis* 8: 16-19

Mellor RB (1988) Distribution of trehalase in soybean root nodule cells: Implications for trehalose metabolism. *J Plant Physiol* 133:173-177

Mellor RB (1992) Is trehalose a symbiotic determinant in symbiosis between higher plants and microorganisms?. *Symbiosis* 12:113-129

Miklashevichs E, Röhrig H, Schell J, Schmidt J (2001) Perception and signal transduction of rhizobial Nod factors. *Crit Rev Plant Sci* 20: 373-394

Miller JH (1972) Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, CHS, New York

Miller SS, Boylan KLM, Vance CP (1987) Alfalfa root nodule CO₂ fixation III. Immunological studies of nodule phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol* 84: 501-508

Miller KJ, Wood JM (1996) Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Microbiol* 50: 101-136

Miller SS, Driscoll BT, Gregerson RG, JS, Vance CP (1998) Alfalfa malate dehydrogenase (MDH): molecular cloning and characterization of five different forms reveals an unique nodule-enhanced MDH. *Plant J* 15: 173-184

Minchin FR (1997) Regulation of oxygen diffusion in legume nodules. *Soil Biol Biochem* 29: 881-888

Mingorance MD (2002) Focused microwave-assisted digestion of vegetal materials for the determination of essential mineral nutrients. *Anal Bioanal Chem* 373: 153-158

Mittenbühler K, Kolzer H (1988) Purification and characterization of acid trehalase from the yeast *suc2* mutant. *J Biol Chem* 263 8537-8543

- Mohanty A, Kathuria H, Ferjani A, Sakamoto A, Mohanty P, Murata N, Tyagi AK (2002)** Transgenics of an elite *indica* rice variety *Pusa basmati 1* harbouring the *codA* gene are highly tolerant to salt stress. *Theor App Gen* 106: 51–57
- Monahan-Giovanelli H, Arango Pinedo C, Gage DJ (2006)** Architecture of infection thread networks in developing root nodules induced by the symbiotic bacterium *Sinorhizobium meliloti* on *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* 140:661-670
- Monneveux P, Mekkaoui ME, Xu X (1990)** Physiological basis of salt tolerance in wheat. Chlorophyll fluorescence as a new tool for screening tolerant genotypes. En: Wheat Breeding. Prospects and Future Approaches. pp 1-33 Varna., Poland
- Moreau S, Thomson RM, Kaiser BN, Trevaskis B, Guerinot ML, Udvardi M, Puppo A, Day D (2002)** *GmZIP1* encodes a symbiosis-specific zinc transporter in soybean. *J Biol Chem* 15: 4738-4746
- Mosier A (2001)** Exchange of gaseous nitrogen compounds between agricultural systems and the atmosphere. *Plant Soil* 228: 17-27
- Mulder L, Hogg B, Bersoult A, Cullimore JV (2005)** Integration of signaling pathways in the establishment of the legume-rhizobia symbiosis. *Physiol Plant* 123: 207-218
- Morell M, Copeland L (1984)** Enzymes of sucrose breakdown in soybean nodules: alkaline invertase. *Plant Physiol* 74: 1030-1034
- Morell M, Copeland L (1985)** Sucrose synthase of soybean nodules. *Plant Physiol* 78: 149-154
- Mouritzen P, Rosedahl L (1997)** Identification of transport mechanism for ammonium in the symbiosome membrane of pea root nodules. *Plant Physiol* 115: 519-526
- Mukhopadhyay A, Vij S, Tyagi AK (2004)** Overexpression of a zinc-finger protein gene from rice confers tolerance to cold, dehydration, and salt stress in transgenic tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 6309-6314
- Mulder L, Hogg B, Bersoult A, Cullimore JV (2005)** Integration of signalling pathways in the establishment of the legume-rhizobia symbiosis. *Physiol Plant* 123: 207-218
- Munns R (1993)** Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant Cell Environ* 16: 15-24
- Munns R (2002)** Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ* 25: 239-250
- Müller J, Aeschbacher RA, Sprenger N, Boller T, Wiemken A (2000)** Disaccharide-mediated regulation of sucrose: fructan-6- fructosyltransferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley leaves. *Plant Physiol* 123: 265-273
- Müller J, Staehelin C, Mellor RB, Boller T, Wiemken A (1992)** Partial purification and characterization of trehalase from soybean nodules. *J Plant Physiol* 140:8-13

- Müller J, Xie ZP, Staehelin C, Mellor RB, Boller T, Wiemken A (1994a)** Trehalose and trehalase in root nodules from various legumes. *Physiol Plant* 90: 86-92
- Müller J, Xie ZP, Staehelin C, Boller T, Wiemken A (1994b)** Effects of nitrate on accumulation of trehalose and other carbohydrates and on trehalase activity in soybean root nodules. *J Plant Physiol* 143:153-160
- Müller J, Boller T, Wiemken A (1995a)** Effect of validamycin A, a potent trehalase inhibitor, and phytohormones on trehalase metabolism in root and root nodules of soybean and cowpea. *Planta* 197: 362-368
- Müller J, Boller T, Wiemken A (1995b)** Trehalose and trehalase in plants: recent developments. *Plant Sci* 112: 1-9
- Müller J, Boller T, Wiemken A (1996)** Pools of non-structural carbohydrates in soybean root nodules during water stress. *Physiol Plant* 98: 723-730
- Müller J, Boller T, Wiemken A (1998)** Trehalose affects sucrose synthase and invertase activities in soybean (*Glicine max* [L.] Merr.) roots. *J Plant Physiol* 153: 255-257
- Müller J, Wiemken A, Aeschbacher RA (1999)** Trehalose metabolism in sugar sensing and plant development. *Plant Sci* 147: 37-47
- Müller J, Boller T, A Wiemken (2001a)** Trehalose becomes the most abundant non-structural carbohydrate during senescence of soybean nodules. *J Exp Bot* 52:943-947
- Müller J, Aeschbacher RA, Wingler A, Boller T, Wiemken A (2001b)** Trehalose and trehalase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 125:1086-1093
- Nakano M, Sactor B (1984)** Renal trehalase: two subsites at the substrate-binding site. *Biochem Biophys Acta* 791: 45-49
- Nacano H, Moriwaki M, Washino T, Kino T, Yoshizumi H, Kitahata S (1994)** Purification and some properties of a trehalase from a green alga, *Lobosphaera* sp. *Biosci Biotechnol Biochem* 58: 1430-1434
- Nakada T, Ikegami S, Chaen H, Kubota M, Fukuda S, Sugimoto T, Kurimoto M, Tsujisaka Y (1995a)** Purification and characterization of thermostable maltooligosyl trehalose synthase from the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biosci Biotech Biochem* 60:263-266
- Nakada T, Ikegami S, Chaen H, Kubota M, Fukuda S, Sugimoto T, Kurimoto M, Tsujisaka Y (1995b)** Purification and characterization of thermostable maltooligosyl trehalose trehalohydrolase from the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biosci Biotech Biochem* 60:267-270
- Neera G, Ranju S (2004)** Growth, photosynthesis, nodule nitrogen and carbon fixation in the chickpea cultivars under salinity stress. *Braz J Plant Physiol* 16: 50-74
- Netondo GW, Onyango JC, Beck E (2004)** Sorghum and salinity: gas exchange and chlorophyll fluorescence of sorghum under salt stress. *Crop Sci* 44: 806-811

- Nishimoto T, M Nakano, Ikegami S, Chaen H, Fukuda S, Sugimoto T, Kurimoto M, Tsujisaka Y (1995)** Existence of a novel enzyme converting maltose into trehalose. *Biosc Biotec Biochem* 59:2189-2190
- Niu X, Bressan RA, Hasegawa PM, Pardo JM (1995)** Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiol* 109: 735-742
- Noble CL, Rogers ME (1992)** Argument for use of physiological criteria for improving the salt tolerance of crops. *Plant Soil* 146: 99-107
- Nogales J, Campos R, BenAbdelhalek H, Olivares J, Lluch C, Sanjuán J (2002)** *Rhizobium tropici* genes involved in free living salt tolerance are required for the establishment of efficient nitrogen-fixing symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Mol Plant-Microbe Interact* 15: 225-232
- Nolte KD, Hanson AD (1997)** Proline accumulation and methylation to proline-betaine in citrus: implications for genetics engineering and stress resistance. *Amer Soc Hor Sci* 122: 8-13
- Nomura M, Mai HT, Fujii M, Hata S, Izui K, Tajima S (2006)** Phosphoenolpyruvate carboxylase plays a crucial role in limiting nitrogen fixation in *Lotus japonicus* nodules. *Plant Cell Physiol* 47: 613-621
- Obermeyer G, Tyerman S (2005)** NH_4^+ currents across the peribacteroid membrane of soybean. Macroscopic and microscopic properties, inhibition by Mg^{2+} , and temperature dependence indicate a subpico Siemens channel finely regulated by divalent cations. *Plant Physiol* 139: 1015-1029
- Ocaña A, Cordovilla MP, Ligerof, Lluch C (1996)** Phosphoenolpyruvate carboxylase in root nodules of *Vicia faba*: partial purification and properties. *Physiol Plant* 97: 724-730
- Ocaña A, Caba JM, Ligerof, Lluch C (1998)** Nitrogen fixation in *Vicia faba* root nodules over ontogeny. *Isr J Plant Sci* 47: 35-41
- Ocaña A, Caba JM, Ligerof, Lluch C (1999)** Effect of plant genotype on nitrogen fixation and carbon metabolism in *Vicia faba* root nodules. *Agr Med* 128: 241-249
- Ortiz-López A, Ort DR, Boyer JS (1991)** Photophosphorylation in attached leaves of *Helianthus annuus* at low water potentials. *Plant Physiol* 96: 1018-1025
- Pagny S, Denmat-Ouisse LA, Gomord V, Faye L (2003)** Fusion with HDEL protects cell wall invertase from early degradation when N-glycosylation is inhibited. *Plant Cell Physiol* 44: 173-182
- Palacios JM, Manyani H, Martinez M, Ureta AC, Brito B, Bascones E, Rey L, Imperial J, Ruiz-Argüeso T (2005)** Genetics and biotechnology of the H_2 -uptake (NiFe) hydrogenase from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, a legume endosymbiotic bacterium. *Biochem Soc Trans* 33: 94-96
- Panek A, Souza N (1964)** Purification and properties of bakers' yeast trehalase. *J Biol Chem* 239 1671-3

Bibliografía

- Panek AD (1991)** Storage carbohydrates. En: The Yeast Rose A, J Harrison (Ed.) Vol. 4: 655–678. Academic Press, New York, USA
- Papageorgiou GC, Govindjee (2005)** Chlorophyll a fluorescence, a signature of photosynthesis. Springer Verlag, Berlin, Germany
- Pardo JM, Cubero B, Leidi EO, Quintero FJ (2006)** Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *J Exp Bot* 57: 1181-1199
- Parida AK, Das AB (2004)** Effects of NaCl stress on nitrogen and phosphorous metabolism in a true mangrove *Bruguiera parviflora* grown under hydroponic culture. *J Plant Physiol* 161: 921-8
- Paul M, Pelly T, Goddijn O (2001)** Enhancing photosynthesis with sugar signals. *Trends Plant Sci* 6: 197-200
- Peach K, Tracey MV (1956)** Modern method of plant analysis. Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, Germany
- Peltonen JA, Virtanen E, Haggren E (1995)** Using a chlorophyll meter to optimize nitrogen fertilizer application for intensively-managed small-grain cereals. *J Agro Crop Sci* 174: 309-318
- Peng Z, Lu Q, Verma DP (1996)** Reciprocal regulation of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylase synthetase and proline deshydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants. *Mol Gen Genet* 253: 334-341
- Peng S, García FV, Laza RC, KG Cassman (1993)** Adjustment for specific leaf weight improves chlorophyll meter's estimate of rice leaf nitrogen concentration. *Agro J* 85: 987-990
- Penna S (2003)** Building stress tolerance through over-producing trehalose in transgenic plants. *Trends Plant Sci* 8: 355-357
- Percival GC, Fraser GA, Oxenham G (2003)** Foliar salt tolerance of Acer genotypes using chlorophyll fluorescence. *J Arboriculture* 29: 61-65
- Petrusa LM, Winicov I (1997)** Proline status in salt tolerant and salt sensitive alfalfa cell lines and plants in response to NaCl. *Plant Physiol Biochem* 35: 303-310
- Phillip JW, Broadley MR (2001)** Chloride in soils and its uptake and movement within the plant: a review. *Ann Bot* 88: 967-988
- Phillips DV, Wilson DO, Dougherty DE (1984)** Soluble carbohydrates in legumes and nodulated nonlegumes. *J Agri and Food Chem* 32:1289-1291
- Phillips JR, Oliver MJ, Bartes D (2002)** Molecular genetics of desiccation and tolerant systems. En: Desiccation and Survival in plants: Drying without dying. M Black, H Pritchard (Eds) pp 319-341 CAB International, Wallingford, USA
- Phillips DA (1980)** Efficiency of symbiotic nitrogen fixation in legume. *Ann Rev Plant Physiol* 31: 29-39

Phillips DA, Streit WR (1997) Applying plant-microbe signaling concepts to alfalfa: roles for secondary metabolites. En: *Biotechnology and the Improvement of Forage Legumes*. BD McKersie, DCW Brown (Eds.) pp. 319–342 CAB International, Wallingford, USA

Phillips DA (2000) Biosynthesis and release of rhizobial nodulation gene inducers by legumes. En: *Prokaryotic Nitrogen Fixation: a Model System for the Analysis of a Biological Process*. EP Triplett (Ed) pp. 349-364 Horizon Scientific Press, Wymodham, USA

Pilon-Smits EA, Terry N, Sears T, Kim H, Zayed A, Hwang S, Van Dun K, Voogd E, Verwoerd TC, Krutwagen RW, Goddijn OJ (1998) Trehalose-producing transgenic plants show improved growth performance under drought stress. *J Plant Physiol* 152: 525-532

Pliogo L, Ocaña A, Lluch C (2001) Carbon metabolism in nodule cytosol and bacteroid in the symbiosis *Rhizobium tropici-Phaseolus vulgaris* var. Africa under salinity conditions. *Terra* 21:203-212

Postgate JR (1982) The fundamentals of nitrogen fixation. Cambridge University Press, New York, USA

Postgate JR (1987) Nitrogen fixation J Postgate (Ed.). Edward Arnold, London, UK

Pozueta-Romero J, Perata P, Akazawa T (1999) Sucrose-starch conversion in heterotrophic tissues of plants. *Cri Rev Plant Sci* 18: 179-187

Puppo A, Groten K, Bastian F, Carzaniga R, Sousso M, Lucas MM, de Felipe MR, Harrison J, Vanacker H, Foyer CH (2005) Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signaling in the orchestration of the natural aging process. *New Phytol* 165: 683

Purcell LC, Sinclair TR (1994) Osmotic hypothesis for regulation of oxygen permeability in soybean nodules. *Plant Cell Environ* 17: 837-843

Rae AL, Bonfante-Fasolo P, Brewing NJ (1992) Structure and growth of infection threads in the legume symbiosis with *Rhizobium leguminosarum*. *Plant J* 2: 385-395

Rainbird MR, Hitz WD, Hardy WF (1984) Experimental determination of the respiration associated with soybean/*Rhizobium* nitrogenase function, nodule maintenance, and total nodule nitrogen fixation. *Plant Physiol* 75: 49-53

Ramos J, Bisseling T (2003) A method for the isolation of root hairs from the model legume *Medicago truncatula*. *J Exp Bot* 54: 2245–2250

Ranjbarfordoei A, Samson R, Van Damme P (2006) Chlorophyll fluorescence performance of sweet almond (*Prunus dulcis*) in response to salinity stress induced by NaCl. *Photosynthetica* 44: 513-522

Rao DNL, Giller KE, Yeo AR, Flowers TJ (2002) The effect of salinity and sodicity upon nodulation and nitrogen fixation in chickpea (*Cicer arietinum*). *Annals Bot* 89: 563-570

Bibliografía

Rhodes D, Hanson AD (1993) Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 44: 357-384

Rhodes D, Nadolska-Orczyk A, Rich PJ (2002) Salinity, osmolytes and compatible solutes. En: *Salinity: Environment Plant Molecules*. A Läuchli, U Lüttge (Eds.) pp. 181-204 Kluwer Academic Publishers, Netherlands

Riely BK, Lougnon G, Ané J-M, Cook DR (2007) The symbiotic ion channel homolog DMI1 is localized in the nuclear membrane of *Medicago truncatula* roots. *Plant J* 49: 208-216

Rigaud J, Puppo A (1975) Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids. *J Gen Microbiol* 88: 223-228

Rivers RL, Dean RM, Chandy G, Hall JE, Roberts DM, Zeidel LM (1997) Functional analysis of nodulin 26, an aquaporin in soybean root nodule symbiosomes. *J Biol Chem* 272: 16256-16261

Rodríguez RL Tait RC (1983) Recombinant DNA techniques. Addison-Wesley Publishing. London, UK

Roháček K (2002) Chlorophyll fluorescence parameters: their definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. *Photosynthetica* 40: 13-29

Roitsch T, Balibrea ME, Hofmann M, Proels R, Sinha AK (2003) Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *J Exp Bot* 54: 513-524

Romero C, Bellés JM, Vayá JL, Serrano R, Culiáñez-Maciá A (1997) Expression of the yeast trehalose-6-phosphate synthase gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypes include drought tolerance. *Planta* 201: 293-297

Romero C, Cutanda MC, Cortina C, Primo J, Culiáñez-Maciá A (2002) Plant environmental stress response by trehalose biosynthesis. *Curr Topics Plant Biol* 3: 73-88

Rontein D, Basset G, Hanson AD (2002) Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants. *Metabolic Engineering* 4: 49-56

Roosens N, Hal Bitar F, Loenders K, Angenon G, Jacobs M (2002) Overexpression of ornithine- δ -aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants. *Mol Breed* 9: 73-80

Rosendahl L, Vance CP, Pedersen B (1990) Products of dark CO₂ fixation in pea root nodules support bacteroid metabolism. *Plant Physiol* 93: 12-19

Rosendahl L, Dilworth MJ, Glenn AR (1992) Exchange of metabolites across the peribacteroid membrane in pea root nodules. *J Plant Physiol* 139: 635-638

Rosignol M, Peltier JB, Mock HP, Matros A, Maldonado AM, Jorriin JV (2006) Plant proteome analysis. *Proteomics* 6: 5529-48

Roth LE, Jeon K, Stacey G (1988) Homology in endosymbiotic systems: the term symbiosome. En: *Molecular Genetics of Plant-Microbe Interaction*. R Palacios, DPS Verna (Eds) pp 220-225. The American Phytopathological Society Press. St. Paul, USA

- Rudbeck A, Mouritzen P, Rosendahl L (1999)** Characterization of aspartate transport across the symbiosome membrane in pea root nodules. *J Plant Physiol* 155: 576-583
- Rüberg S, Tian Z-X, Krol E, Linke B, Meyer F, Wang Y, Pühler A, Weidner S, Becker A (2003)** Construction and validation of a *Sinorhizobium meliloti* whole genome DNA microarray: genome wide profiling of osmoadaptive gene expression. *J Biotechnol* 106: 255-268
- Ruf J, Wacker H, Jamws P, Maffia M, Seiler P, Galand G, Von Kieckebusch A, Semenza G, Mantei N (1990)** Rabbit small intestinal trehalase. *J Biol Chem* 265 15034–15039
- Rus A, Yokoi S, Sharkhuu A, Reddy M, Lee B, Matsumoto TK, Koiwa H, Zhu J-K, Bressan RA, Hasegawa PM (2001)** AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na⁺ entry into plant roots. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 14150–14155
- Sahi C, Singh A, Blumwald E, Grover A (2006)** Beyond osmolytes and transporters: novel plant salt-stress tolerance-related genes from transcriptional profiling data. *Physiol Plant* 127: 1-9
- Salminen SO, Streeter JG (1986)** Enzymes of trehalose metabolism in soybean nodules. *Plant Physiol* 81:538-541
- Salminen SO, Streeter JG (1987)** Uptake and metabolism of carbohydrates by *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. *Plant Physiol* 83 (3):535-540
- Sameshima-Saito R, Chiba K, Hirayama J, Itakura M, Mitsui H, Eda S, Minamisawa K (2006)** Symbiotic *Bradyrhizobium japonicum* reduces N₂O surrounding the soybean root system via nitrous oxide reductase. *App Environ Microbiol* Apr 2006: 2526-2532
- Sampedro JG, Uribe S (2004)** Trehalose-enzyme interactions result in structure stabilization and activity inhibition. The role of viscosity. *Mol Cell Biochem* Dec: 319-127
- San Francisco MJD, Jacobson GR (1985)** Uptake of succinate and malate in cultured cells and bacteroides of two slow growing species of *Rhizobium*. *J Gen Microbiol* 131: 765-773
- Sanders D, Boeownlee C, Harper JF (1999)** Communicating with calcium. *Plant Cell* 11: 691-706
- Sato S, Kaneko T, Nakamura Y, Asamizu E, Kato T, Tabata S (2001)** Structural analysis of a *Lotus japonicus* genome. I. Sequence features and mapping of fifty-six TAC clones which cover the 5.4 Mb regions of the genome. *DNA Research* 8: 311-318
- Schiraldi C, Di Lernia I, De Rosa M (2002)** Trehalose production: exploiting novel approaches. *Trends Biotech* 20: 420-425
- Schubert KR (1986)** Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport and metabolism. *Ann Rev Plant Physiol* 37: 539-574

Bibliografía

- Schubert A, Wyss P, Wiemken A (1992)** Occurrence of trehalose in arbuscular mycorrhizal fungi and in mycorrhizal roots. *J Plant Physiol* 140: 41-45
- Schulze J, Shi L, Blumenthal J, Samac DA, Gantt JS, Vance CP (1998)** Inhibition of alfalfa root nodule phosphoenolpyruvate carboxylase through an antisense strategy impacts nitrogen fixation and plant growth. *Phytochemistry* 49(2): 341-346
- Serraj R, Roy G, Devron JJ (1994)** Salt stress induces a decrease in the oxygen uptake of soybean nodules and their permeability to oxygen diffusion. *Physiol Plant* 91: 161-168
- Serraj R, Devron JJ (1998)** Effect of salinity and nitrogen source on growth and nitrogen fixation in alfalfa. *J Plant Nutr* 21: 1805-1818
- Serraj R (2002)** Response of symbiotic nitrogen fixation to drought and salinity stress. *Physiol Mol Biol Plant* 8(1): 77-86
- Serraj R, Sinclair TR (2002)** Osmolyte accumulation: Can it really help increase in crop yield under drought conditions? *Plant Cell Environ* 25: 333-341
- Shaw SL, Long SR (2003a)** Nod factor elicits two separable calcium responses in root hairs of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* 131: 495-506
- Shaw SL, Long SR (2003b)** Nod factor inhibition of reactive oxygen efflux in a host legume. *Plant Physiol* 132: 2196-2204
- Schepers JS, Francis DD, Vigil M, Below FE (1992)** Comparison of corn leaf nitrogen concentration and chlorophyll meter readings. *Com Soil Sci Plant Anal* 23: 2173-2187
- Shi H, Lee BH, Wu SJ, Zhu JK (2003)** Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotechnol* 21: 81-85
- Singh AK, Dubey RS (1995)** Changes in chlorophyll a and b contents and activities of photosystems I and II in rice seedlings induced by NaCl. *Photosynthetica* 31: 489-499
- Sixto H, Aranda I, Grau JM (2006)** Assessment of salt tolerance in *Populus alba* clones using chlorophyll fluorescence. *Photosynthetica* 44: 169-173
- Sleator RD, Hill C (2001)** Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol Rev* 26: 49-71
- Smeekens S (2000)** Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51: 49-81
- Smethurst CF, Shabala S (2003)** Screening methods for waterlogging tolerance in lucerne: comparative analysis of waterlogging effects on chlorophyll fluorescence, photosynthesis, biomass and chlorophyll content. *Func Plant Biol* 30:335-343
- Sottosanto JB, Gelli A, Blumwald E (2004)** DNA array analyses of *Arabidopsis thaliana* lacking a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter: impact of AtNHX1 on gene expression. *Plant J.* 40: 752-711
- Smith BE (2002)** Nitrogenase reveals its inner secrets. *Science* 297: 1654-1655

- 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, Lluch C, Ocaña A (1999)** Comparative study of nitrogen fixation and carbon metabolism in two chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars under salt stress. *J Exp Bot* 50: 1701-1708
- Soussi M, Khadri M, Lluch C, Ocaña A (2001)** Carbon metabolism and bacteroid respiration in nodules of chick-pea (*Cicer arietinum* L.) plants grown under saline conditions. *Plant Biosystems* 135: 157-164
- Sprent J (1979)** The biology of Nitrogen-Fixing Organisms. McGraw-Hill Ed. Maidenhead, UK.
- Sprent JI, Sutherland JM, Faria SM (1989)** Structure and function of root nodules from woody legumes. En: *Advances in Legume Biology*, Vol 29 CH Stirton, JL Zarucchi (Eds) pp.559-578 Monograph Systematic Botany, Missouri Botanical Garden, Missouri, USA
- Sprent JI (2001)** Nodulation in legumes. Royal Botanical Gardens, Kew, London
- Steuer R, Morgenthal K, Weckwerth W, Selbig J (2007)** A gentle guide to the analysis of metabolomic data. *Methods Mol Biol* 358:105-26
- Stougaard J (2001)** Genetics and genomics of root symbiosis. *Curr Opin Plant Biol* 4: 328-335
- Stracke S, Kistner C, Yoshida S, Mulder L, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Sandal N, Stougaard J, Szczyglowski K, Parniske M (2002)** A plant receptor like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* 417: 959-962
- Streeter JG (1980)** Carbohydrates in soybean nodules. Distribution of compounds in seedling during the onset of nitrogen fixation. *Plant Physiol* 66: 471-476
- Streeter JG (1982)** Enzymes of sucrose, maltose, and α α -trehalose catabolism in soybean root nodules. *Planta* 155: 112-115
- Streeter JG (1985)** Accumulation of α α -trehalose by *Rhizobium* bacteria and bacteroids. *J Bacteriol* 164 78-84
- Streeter JG (1987)** Carbohydrate, organic acid, and amino acid composition of bacteroids and cytosol from soybean nodules. *Plant Physiol* 85: 768-773
- Streeter JG (1995)** Effect of elevated calcium concentration in infected cells of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) nodules on nitrogenase activity and N input to the plant. *J Exp Bot* 49: 997-1003
- Streeter JG, Strimbu CE (1998)** Simultaneous extraction and derivatization of carbohydrates from green plant tissues for analysis by gas-liquid chromatography. *Anal Biochem* 259: 253-257

Bibliografía

Streeter JG, Bhagwat A (1999) Biosynthesis of trehalose from maltooligosaccharides in *Rhizobia*. *Can J Microbiol* 45:716-721

Streeter JG, Lohnes DG, Fioritto RJ (2001) Pattern of pinitol accumulation in soybean plants and relationships to drought tolerance. *Plant Cell Environ* 24: 429-438

Sturm A, Tang GQ (1999) The sucrose cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends Plant Sci* 4: 401-407

Subbarao GV, Johansen C, Jana MK, Kumar Rao JVDK (1990) Effects of the sodium/calcium ratio is modifying salinity response of pigeonpea (*Cajanus cajan*). *J Plant Physiol* 136: 439-443

Subbarao GV, Johansen C (1991) Potential for genetic improvement in salinity tolerance in legumes: pigeon pea. En: Hand Book of Plant and Crop Stress, M Pessarakli (Ed.) Macel Dekker Inc. New York, USA

Suganuma N, Yamamoto Y (1987) Carbon metabolism related to nitrogen fixation in soybean root nodules. *Soil Sci Plant Nutr* 33: 79-91

Suganuma N, Tamaoki M, Takaki M (1993) Comparison of the protein composition and enzymatic activities during developmental between effective and plant-determined ineffective nodules in pea. *Plant Cell Physiol* 34: 781-788

Suhayda CG, Giannini JL, Briskin DP, Shannon MC (1990) Electrostatic changes in *Lycopersicon sculetum* root plasma membrane resulting from salt stress. *Plant Physiol* 93: 471-478

Sullivan JT, Patrick HN, Lowther WL, Scott DB, Ronson CW (1995) Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8985-8989.

Sun J, Cardoza V, Mitchell DM, Bright L, Oldroyd G, Harris JM (2006) Crosstalk between jasmonic acid, ethylene and Nod factor signaling allows integration of diverse inputs for regulation of nodulation. *Plant J* 46: 961-970

Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2002) Important roles of drought and cold inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 29: 417-426

Taji T, Seki M, Satou M, Sakurai T, Kobayashi M, Ishiyama K, Narusaka Y, Narusaka M, Zhu JK, Shinozaki K (2004) Comparative genomics in salt tolerance between *Arabidopsis* and *Arabidopsis*-related halophyte salt cress using *Arabidopsis* microarray. *Plant Physiol* 135: 1697-1709

Talibart R, Jebbar M, Gouffi K, Pichereau V, Gouesbet G, Blanco C, Bernard T, Pocard JA (1997) Transient accumulation of glycine betaine and dynamics of endogenous osmolytes in salt-stressed cultures of *Sinorhizobium meliloti*. *App Env Microbiol* 63: 4657-4663

Teakle NL, Real D, Colmer TD (2006) Growth and ion relations in response to combined salinity and waterlogging in the perennial forage legumes *Lotus corniculatus* and *Lotus tenuis*. *Plant Soil* 289: 369-383

Tejera NA, Campos R, Sanjuán J, Lluch C (2004) Nitrogenase and antioxidant enzyme activities in *Phaseolus vulgaris* nodules formed by *Rhizobium tropici* isogenic strains with varying tolerance to salt stress. *J Plant Physiol* 161: 329-338

Tejera NA, Iribarne C, López M, Herrera-Cervera JA, Lluch C (2005) Physiological implications of trehalase from *Phaseolus vulgaris* root nodules: partial purification and characterization. *Plant Physiol Biochem* 43: 355-361

Tejera NA, Ortega E, Herrera-Cervera JA, Pieckenstain F, Lluch C (2006) Endófitos diazotrofos: *Gluconacetobacter diazotrophicus* como bacteria modelo. EJ Bedmar, J González, C Lluch, B Rodelas. (Eds) pp. 124-136 Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno, Granada, España

Tejera NA, Soussi M, Lluch C (2006) Physiological and nutritional indicators of tolerance to salinity in chickpea plants growing under symbiotic conditions. *Environ Exp Bot*. 58: 17-24

Temesvari LA, Cotter DA (1997) Trehalase of *Dictyostelium discoideum*: Inhibition kinetics and affinity purification with amino-containing analogs of trehalosa. *Biochimie* 79 229-239

Tesfaye M, Samac DA, Vance CP (2006) Insights into symbiotic nitrogen fixation in *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact* 19: 330-341

Thevelein JM (1984) Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiol Rev* 48: 42-59

Thiel G, Lych J, Läuchli A (1998) Short-term effects of salinity stress on the turgor and elongation of growing barley leaves. *J Plant Physiol* 132: 38-44

Thummler F, Verna DPS (1987) Nodulin 100 of soybean is the subunit of sucrose synthase regulated by the availability of free haemoglobine in nodules. *J Biol Chem* 262: 14730

Timmers ACJ, Soupene E, Auriac MC, de Billy F, Vasse J, Boistard P, Truchet G (2000) Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. *Mol Plant-Microbe Interact* 13: 1204-1213

Torres-Netto A, Capmpostrini E, Goncalves J, Kiyoshi Yamanishi O (2002) Portable chlorophyll meter for the quantification of photosynthetic pigments, nitrogen and the possible use for assesment of the photochemical process in *Carica papaya* L. *Braz J Plant Physiol* 14: 203-210

Town CD (2006) Annotating the genome of *Medicago truncatula*. *Cur Opin Plant Physiol* 9: 122-127

Bibliografía

- Trainer MA, Charles TC (2006)** The role of PHB metabolism in the symbiosis of rhizobia with legumes. *Appl Microbiol Biotechnol* 71: 377-386
- Tully R, Hanson A, Nelsen C (1979)** Proline accumulation in water stressed barley leaves in relation to translocation and the nitrogen budget. *Plant Physiol* 63: 518-523
- Tyerman SD, Whitehead LF, Day DA (1995)** A channel-like transporter for NH_4^+ on the symbiotic interface of N_2 -fixing plants. *Nature* 378: 629-632
- Udvardi MK, Day DA (1997)** Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annu Rev Plant Mol Biol* 48: 423-523
- Udvardi MK (2001)** Legume models strut their stuff. *Mol Plant-Microbe Interact* 14: 6-9
- Ullrich WR (2002)** Salinity and nitrogen nutrition. En: Salinity: Environment-Plants-Molecules. A Läuchli, U Lüttge (Eds) pp 229-248. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands
- Ulrike SR, Wood C, Udvardi M (2003)** Molecular and cellular characterisation of LjAMT2;1, an ammonium transporter from the model legume *Lotus japonicus*. *Plant Mol Biol* 51: 99-108
- Uozumi N, Kim EJ, Rubio F, Yamaguchi T, Muto S, Tsuboi A, Bakker EP, Nakamura T, Schroeder JI (2000)** The *Arabidopsis HKT1* gene homolog mediates inward Na^+ currents in *Xenopus laevis* oocytes and Na^+ uptake in *Saccaromyces cervisiae*. *Plant Physiol* 122: 1249-1259
- Valaitis AP, Bowers DF (1993)** Purification and properties of the soluble midgut trehalase from the gypsy moth *Lymantria dispar* insect. *Biochem Mol Biol* 23 599-606
- Van Dijck P, Mascorro-Gallardo JO, De Bus M, Royackers K, Iturriaga G, Theverlein JM (2002)** Truncation of *Arabidopsis thaliana* and *Selaginella lepidophylla* trehalose-6-phosphate synthase unlocks high catalytic activity and supports high trehalose levels on expression in yeast. *Biochem J* 366: 63-71
- 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, Gregerson RG, Robinson DL, Miller SS, Gantt JS (1994)** Primary assimilation of nitrogen in alfalfa nodules: molecular features of the enzymes involved. *Plant Sci* 101: 51-64
- Vance CP, Graham PH (1995)** Nitrogen fixation in agriculture: application and perspective, En: Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications IA Tkhonovich, NA Provorov, VI Romanov, WE Newton (Eds) pp 77-86, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands
- Vance CP (1997)** The molecular biology of N metabolism. En: Plant Metabolism DT Dennis, DH Turpin, DD Lefebvre, DB Layzell, (Eds) pp 449-477, Longman Scientific, London, UK

- Vance CP (1998)** Legumes Symbiotic Nitrogen Fixation: Agronomic Aspects. En *The rhizobiaceae* HP Spaink, A Kondorosi, PJJ Hooykaas (Eds.) pp. 509-530 Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands
- VandenBosch KA, Stacey G (2003)** Summaries of legume genomics projects from around the globe. Community resources for crops and models. *Plant Physiol* 131: 840-865
- Van Ghelue M, Ribeiro A, Solheim B, Akkermans ADL, Bisseling T, Paulowski K (1996)** Sucrose synthase and enolase expression in actinorhizal nodules of *Alnus glutinosa*: comparison with legume nodules. *Mol Gen Genet* 250: 437-446
- Van Rhijn P, Fujishige NA, Ok Lim P, Hirsch AM (2001)** Sugar-binding activity of pea lectin enhances heterologous infection of transgenic alfalfa plants by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Plant Physiol* 126: 133-144
- Vasse J, de Billy F, Camut S, Truchet G (1990)** Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroides and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J Bacteriol* 172: 4295-4306
- Veluthambi K, Mahadevan S, Maheshwari R (1981)** Trehalose toxicity in *Cuscuta reflexa*: correlation with low trehalase activity. *Plant Physiol* 68: 1369-1374
- Verbruggen N, Hua XJ, May M, VanMontagu M (1996)** Environmental and developmental signals modulate proline homeostasis: evidence for a negative transcriptional regulator. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8787-8791
- Verhoeven AS, Demmig-Adams B, Adams WW (1997)** Enhanced employment of the xanthophyll cycle and thermal energy dissipation in spinach exposed to high light and N stress. *Plant Physiol* 113: 3817-3824
- Vogel G, Aeschbacher RA, Müller J, Boller T, Wiemken A (1998)** Trehalose-6-phosphate phosphatases from *Arabidopsis thaliana*: identification by functional complementation of the yeast *tps2* mutant. *Plant J* 13: 673-683
- Vinocur B, Altman A (2005)** Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Curr Opin Biotechnol* 16: 123-132
- Wang YJ, Hao YJ, Zhang ZG, Chen T, Zhang JS, Chen SY (2005)** Isolation of trehalose-6-phosphate phosphatase gene from tobacco and its functional analysis in yeast cells. *J Plant Physiol* 162: 215-23
- Wagner W, Wiemken A, Matile P (1986)** Regulation of fructan metabolism in leaves of barley (*Hordeum vulgare* L. cv Gerbel). *Plant Physiol* 81: 444-447
- Waters JK, Hughes BL, Purcell LC, Gerhart KO, Mawhinney TP, Emerich DW (1998)** Alanine not ammonia, is excreted from N₂-fixing soybean nodule bacteroids. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 12038-12042
- Webb JA, Fletcher RA (1996)** Paclobutrazol protects wheat seedlings from injury due to waterlogging. *Plant Growth Regul* 18: 201-206

Bibliografía

- Wei W, Jiang J, Li W, Wang L, Yang SS (2004)** Isolation of salt-sensitive mutants from *Sinorhizobium meliloti* and characterization of genes involved in salt tolerance. *Lett Appl Microbiol* 39: 278-283
- Wei H, Layzell DB (2006)** Adenylate-coupled ion movement. A mechanism for the control of nodule permeability to O₂ diffusion. *Plant Physiol* 141: 280-287
- Whitehead LF, Day DA, Tyerman SD (1998)** Divalent cation gated an ammonium permeable channel in the symbiotic membrane from soybean nodules. *Plant J* 16: 313-324
- Wienhold BJ, JM Krupinsky (1999)** Chlorophyll meter as nitrogen management tool in malting barley. *Com Soil Sci Plant Anal* 30: 2551-2562
- Wignarajah K (1990)** Growth response of *Phaseolus vulgaris* to varying salinity regimes. *Environ Exp Bot* 30: 141-147
- Willems A (2006)** The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant Soil* 287: 3-14
- Willis LB, Walker GC (1999)** A novel *Sinorhizobium meliloti* operon encodes an alpha-glucosidase and periplasmic-binding-protein-dependent transport system for alphasugarcosides. *J Bacteriol* 181:4176-4184
- Wingler A (2002)** The function of trehalose biosynthesis in plants. *Phytochemistry* 60: 437-440
- Witty JF, Minchin FR (1998)** Methods for the continuous measurement of O₂ consumption and H₂ production by nodulated legume root systems. *J Exp Bot* 49: 1041-1047
- Wolfenden J, Robinson DC, Cape JN, Paterson IS, Francis BJ, Mehlhorn H, Wellburn AR (1988)** Use of carotenoid ratios, ethylene emissions and buffer capacities for the early diagnosis of forest decline. *New Phytol* 109: 85-95
- Wood CW, Tracy PW, Reeves DW, Edmisten KL (1992)** Determination of cotton nitrogen status with a hand-held chlorophyll meter. *J Plant Nutr* 15: 1435-1448
- Xie ZP, Staehelin C, Broughton WJ, Wiemken A, Boller T, Müller J (2003)** Accumulation of soluble carbohydrates, trehalase and sucrose synthase in effective (Fix+) and ineffective (Fix-) nodules of soybean cultivars that differentially nodulate with *Bradyrhizobium japonicum*. *Func Plant Biol* 30: 965-971
- Xu W, Sato SJ, Clemente ET, Chollet R (2007)** The PEP-carboxylase kinase gene family in *Glycine max* (GmPpcK1-4): an in-depth molecular analysis with nodulated, non-transgenic and transgenic plants. *Plant J* 49: 910-923
- Yaginuma T, Mizuno C, Ikeda M, Wada T, Hattori K, Yamashita O, Haap GM (1996)** Trehalase in the spermatophore from the bean-shaped accessory gland of the male mealworm beetle, *Tenebrio molitor*: purification, kinetic properties and localization of the enzyme. *J Comparative Physiol B* 166 1-10
- Yamada T, Takatsu Y, Manabe T, Kasumi M, Marubashi W (2003)** Suppressive effect of trehalose on apoptotic cell death leading to petal senescence in ethylene-insensitive flowers of gladiolus. *Plant Sci* 164: 213-221

- Yamaguchi T, Blumwald E (2005)** Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. *Trends Plant Sci* 12: 615-620
- Yang J, Yeng HE (2002)** Early salt stress effects on the changes in chemical composition of leaves of ice plant and *Arabidopsis*. A fourier transform infrared spectroscopy study. *Plant Physiol* 130: 1032-1042
- Yancey PH, Clark ME, Hand RD, Bowlus RD, Somero GN (1982)** Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217: 1214-1222
- Yarar S, Hamamci H, Bakir U (2000)** Partial purification of neutral trehalase from commercial baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Food Biochem* 24 43-98
- Yemm EW, Cocking EC (1955)** The determination of aminoacids with nihydriin. *Analytic* 80: 209-213
- Yeo A (1998)** Predicting the interaction between the effects of salinity and climate change on crop plants. *Sci Hort* 78: 159-174
- Young ND, Cannon SB, Sato S, Kim D, Cook DR, Town CD, Roe BA, Tabata S (2005)** Sequencing the genespaces of *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* 137: 1174-1181
- Zahran HH, JI Sprent (1986)** Effects of sodium chloride and polyethylene glycol on root hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plants by *Rhizobium leguminosarum*. *Planta* 167: 303-309
- Zahran HH (1992)** Characterization of root-nodule bacteria indigenous in the salt-affected soils of Egypt by lipopolysaccharide, protein and plasmid profiles. *J Basic Microbiol* 32:279-287
- Zahran HH (1997)** Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. *Biol Fertil Soils* 25:211-223
- Zahran HH (1999)** *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 968-989
- Zhang X-Q, Chollet R (1997)** Seryl-phosphorylation of soybean nodule sucrose synthase (nodulin-100) by a Ca²⁺-dependent protein kinase. *FEBS Lett* 420: 126-130
- Zhou W, Sun QJ, Zhang CF, Yuan YZ, Zhang J, Lu BB (2004)** Effect of salt stress on ammonium assimilation enzymes of the roots of the rice (*Oryza sativa*) cultivars differing in salinity tolerance. *Acta Bot Sinica* 46: 921-927
- Zhu JK, Liu L, Xiong L (1998)** Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*: evidence for critical role of potassium nutrition. *Plant Cell* 10: 1181-1191
- Zhu JK (2002)** Salt and drought stress signal transduction in plants. *Ann Rev Plant Biol* 53: 247-273

Bibliografía

Zhu JK (2003) Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr Opin Plant Biol* 6: 441-445

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: 1407-419

Zimmermann AL, Terenzi HF, Jorge JA (1990) Purification and properties of an extracellular conidial trehalase from *Hemicola grisea* var. *thermoidea*. *Biochim Biophys Acta* 1036 41-46

Zrenner R, Salanoubat M, Willmitzer L, Sonnewald U (1995) Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J* 7(1): 97-107

Zúñiga D (1997) Contribución relative de los simbiosntes en la fijación de nitrógeno por *Phaseolus vulgaris* en condiciones de estrés salino. Tesos doctoral. Universidad de Granada. pp 302

VIII. APÉNDICE

Tabla A 1.1 Peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de raíz (PSR), peso seco de planta (PSP) en mg planta⁻¹ y relación raíz/parte aérea (RPA), en plantas de *M. truncatula*

NaCl (mM)	PSPA	PSR	PSP	RPA
0	491 ^a	157 ^a	659 ^a	0.317 ^a
25	298 ^b	83 ^b	391 ^b	0.282 ^a
50	256 ^b	57 ^b	323 ^b	0.225 ^b
MDS (P ≤ 0.05)	60	27	79	0.049

Tabla A 1.2 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) PSPA					
NaCl	125282	2	62641	43.89	0.0000
Error	12846	9	1427		
Total	138128	11			
b) PSR					
NaCl	21476	2	10738	37.13	0.0000
Error	2603	9	289		
Total	24079	11			
c) PSP					
NaCl	252084	2	126042	51.65	0.0000
Error	21964	9	2440		
Total	274048	11			
d) RPA					
NaCl	0.0218	2	0.0109	10.64	0.0022
Error	0.0124	12	0.0010		
Total	0.0342	14			

Apéndice

Tabla A 1.3 Peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de raíz (PSR), peso seco de planta (PSP) en mg planta⁻¹ y relación raíz/parte aérea (RPA), en plantas de *L. japonicus*

NaCl (mM)	PSPA	PSR	PSP	RPA
0	161 ^a	52 ^a	222 ^a	0.328 ^a
25	102 ^b	34 ^b	141 ^b	0.338 ^a
50	94 ^b	30 ^b	131 ^b	0.327 ^a
MDS (P ≤ 0.05)	23	8	29	0.064

Tabla A 1.4 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) PSPA					
NaCl	10528	2	5264	24.37	0.0002
Error	1944	9	216		
Total	12472	11			
b) PSR					
NaCl	1099	2	549	23.28	0.0003
Error	212	9	23		
Total	1311	11			
c) PSP					
NaCl	19934	2	9967	29.53	0.0001
Error	3037	9	337		
Total	22972	11			
d) RPA					
NaCl	0.000306	2	0.00015	0.094	0.9109
Error	0.014614	9	0.00162		
Total	0.014920	11			

Tabla A 1.5 Actividad nitrogenasa aparente (ANA) y nitrogenasa total (ANT) expresadas en $\mu\text{mol H}_2 \text{g}^{-1} \text{PSN h}^{-1}$, tasa de fijación de nitrógeno (TFN) expresada en $\mu\text{mol N}_2 \text{g}^{-1} \text{PSN h}^{-1}$, contenido de leghemoglobina (Lb) en $\text{mg g}^{-1} \text{PFN}$, peso seco de nódulo (PSN) en mg planta^{-1} y peso normalizado de nódulo (PNN) en $\text{mg PSN mg}^{-1} \text{PSPA}$ en *M. truncatula*

NaCl (mM)	ANA	ANT	TFN	Lb	PSN	PNN
0	58.60 ^a	263.44 ^a	67.44 ^a	6.94 ^a	11.40 ^a	0.023 ^b
25	44.68 ^b	246.45 ^a	65.60 ^a	3.98 ^b	10.13 ^a	0.035 ^{ab}
50	42.60 ^b	150.31 ^b	35.75 ^b	1.21 ^c	10.13 ^a	0.040 ^a
MDS ($P \leq 0.05$)	13.08	47.16	14.74	1.32	3.82	0.012

Tabla A 1.6 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) ANA					
NaCl	908	2	454	4.02	0.0401
Error	1695	15	113		
Total	2603	17			
b) ANT					
NaCl	44666	2	22333	15.2	0.0002
Error	22034	15	1469		
Total	66699	17			
c) TFN					
NaCl	4419	2	2210	15.41	0.0002
Error	2151	15	143		
Total	6570	17			
d) Lb					
NaCl	6.56	2	3.282	48.031	0.0000
Error	0.61	9	0.068		
Total	7.18	11			
e) PSN					
NaCl	4.335	2	2.168	0.384	0.6947
Error	51.415	9	5.713		
Total	55.750	11			
f) PNN					
NaCl	0.000587	2	0.0002937	4.863	0.0371
Error	0.000544	9	0.0000604		
Total	0.001131	11			

Apéndice

Tabla A 1.7 Actividad nitrogenasa aparente (ANA) y nitrogenasa total (ANT) expresadas en $\mu\text{mol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ PSN h}^{-1}$, tasa de fijación de nitrógeno (TFN) expresada en $\mu\text{mol N}_2 \text{ g}^{-1} \text{ PSN h}^{-1}$, contenido de leghemoglobina (Lb) en $\text{mg g}^{-1} \text{ PFN}$, peso seco de nódulo (PSN) en mg planta^{-1} y peso normalizado de nódulo (PNN) en $\text{mg PSN mg}^{-1} \text{ PSPA}$ en *L. japonicus*

NaCl (mM)	ANA	ANT	TFN	Lb	PSN	PNN
0	233.34 ^a	856.67 ^a	207.45 ^a	11.44 ^c	9.40 ^a	0.059 ^b
25	212.03 ^a	586.77 ^b	125.58 ^b	14.64 ^a	5.68 ^b	0.057 ^b
50	81.09 ^b	297.94 ^c	71.95 ^b	12.28 ^b	6.30 ^b	0.067 ^a
MDS (P ≤ 0.05)	70.34	116.75	59.65	1.04	1.95	0.016

Tabla A 1.8 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) ANA					
NaCl	54373	2	27186	14.20	0.0016
Error	17236	9	1915		
Total	71609	11			
b) ANT					
NaCl	624602	2	312301	28.90	0.0001
Error	97245	9	10805		
Total	721847	11			
c) TFN					
NaCl	37327	2	18663	13.76	0.0018
Error	12205	9	1356		
Total	49532	11			
d) Lb					
NaCl	22.085	2	11.043	47.59	0.0000
Error	2.088	9	0.232		
Total	24.174	11			
e) PSN					
NaCl	31.835	2	15.918	10.67	0.0042
Error	13.428	9	1.492		
Total	45.263	11			
f) PNN					
NaCl	0.00022	2	0.00011	1.03	0.3955
Error	0.00095	9	0.00011		
Total	0.00117	11			

Tabla A 1.9 Actividad sacarosa sintasa (SS) expresada en $\mu\text{mol NAD mg}^{-1} \text{prot h}^{-1}$, invertasa alcalina (IA) en $\text{nmol glucosa mg}^{-1} \text{prot h}^{-1}$, hexoquinasa (HK) en $\mu\text{mol NADP mg}^{-1} \text{prot h}^{-1}$, fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y malato deshidrogenasa (MDH) en $\mu\text{mol NADH mg}^{-1} \text{prot h}^{-1}$ e isocitrato deshidrogenasa (ICDH) en $\mu\text{mol NADP mg}^{-1} \text{prot h}^{-1}$ en nódulos de *M. truncatula*

NaCl (mM)	SS	IA	HK	PEPC	MDH	ICDH
0	0.121 ^a	1.835 ^a	0.671 ^b	0.304 ^a	54.63 ^a	2.016 ^a
25	0.061 ^b	1.427 ^b	0.760 ^a	0.161 ^b	38.91 ^b	1.227 ^b
50	0.033 ^c	0.863 ^c	0.607 ^b	0.062 ^c	22.40 ^c	0.484 ^c
MDS (P ≤ 0.05)	0.009	0.119	0.067	0.060	3.95	0.114

Tabla A 1.10 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) SS					
NaCl	0.1940	2	0.0970	53.52	0.0000
Error	0.0026	10	0.0002		
Total	0.1966	12			
b) IA					
NaCl	1.903	2	0.952	169.86	0.0000
Error	0.050	9	0.006		
Total	1.954	11			
c) HK					
NaCl	0.0474	2	0.0237	13.58	0.0019
Error	0.0157	9	0.0017		
Total	0.0632	11			
e) PEPC					
NaCl	0.119	2	0.059	41.58	0.0000
Error	0.013	9	0.001		
Total	0.132	11			
f) MDH					
NaCl	2078	2	1039.020	170.35	0.0000
Error	55	9	6.099		
Total	2133	11			
g) ICDH					
NaCl	4.692	2	2.346	456.45	0.0000
Error	0.046	9	0.005		
Total	4.738	11			

Apéndice

Tabla A 1.11 Actividad sacarosa sintasa (SS) expresada en $\mu\text{mol NAD mg}^{-1} \text{prot h}^{-1}$, invertasa alcalina (IA) en $\text{nmol glucosa mg}^{-1} \text{prot h}^{-1}$, hexoquinasa (HK) en $\mu\text{mol NADP mg}^{-1} \text{prot h}^{-1}$, fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y malato deshidrogenasa (MDH) en $\mu\text{mol NADH mg}^{-1} \text{prot h}^{-1}$ e isocitrato deshidrogenasa (ICDH) en $\mu\text{mol NADP mg}^{-1} \text{prot h}^{-1}$ en nódulos de *L. japonicus*

NaCl (mM)	SS	IA	HK	PEPC	MDH	ICDH
0	0.142 ^b	2.322 ^a	0.232 ^c	1.519 ^a	61.65 ^a	1.292 ^a
25	0.158 ^a	2.092 ^b	0.324 ^b	1.283 ^b	58.32 ^{ab}	1.325 ^a
50	0.096 ^c	2.202 ^{ab}	0.388 ^a	1.087 ^c	55.18 ^b	1.238 ^a
MDS (P ≤ 0.05)	0.013	0.167	0.026	0.193	5.38	0.055

Tabla A 1.12 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) SS					
NaCl	0.01024	2	0.0051214	69.904	0.0000
Error	0.00065	9	0.0000733		
Total	0.01090	11			
b) IA					
NaCl	0.106	2	0.0529	4.855	0.0370
Error	0.098	9	0.0109		
Total	0.204	11			
c) HK					
NaCl	0.0490	2	0.0245	89.722	0.0000
Error	0.0025	9	0.0002		
Total	0.0515	11			
e) PEPC					
NaCl	0.374	2	0.187	12.810	0.0023
Error	0.131	9	0.015		
Total	0.505	11			
f) MDH					
NaCl	83.685	2	41.843	3.700	0.0670
Error	101.649	9	11.294		
Total	185.334	11			
g) ICDH					
NaCl	0.015	2	0.0077	6.580	0.0173
Error	0.011	9	0.0012		
Total	0.026	11			

Tabla A 1.13 Actividad trehalosa-6 fosfato sintasa (TPS) expresada en nmol UDP mg⁻¹prot min⁻¹, trehalosa-6 fosfato fosfatasa (TPP) en nmol P_i mg⁻¹ prot min⁻¹ y trehalasa (TRE) en nmol glucosa mg⁻¹ prot h⁻¹ en nódulos de *M. truncatula*

NaCl (mM)	TPS	TPP	TRE
0	1.334 ^a	1.281 ^a	1.480 ^a
25	0.682 ^b	0.600 ^b	1.421 ^a
50	0.593 ^c	0.200 ^c	0.832 ^b
MDS (P ≤ 0.05)	0.038	0.096	0.171

Tabla A 1.14 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) TPS					
NaCl	1.309	2	0.654	1155.452	0.0000
Error	0.005	9	0.001		
Total	1.314	11			
b) TPP					
NaCl	8.972	2	4.486	78.390	0.0000
Error	0.069	6	0.011		
Total	9.041	8			
c) TRE					
NaCl	1.025	2	0.513	45.05	0.0000
Error	0.102	9	0.011		
Total	1.128	11			

Tabla A 1.15 Actividad trehalosa-6 fosfato sintasa (TPS) expresada en nmol UDP mg⁻¹prot min⁻¹, trehalosa-6 fosfato fosfatasa (TPP) en nmol P_i mg⁻¹ prot min⁻¹ y trehalasa (TRE) en nmol glucosa mg⁻¹ prot h⁻¹ en nódulos de *L. japonicus*

NaCl (mM)	TPS	TPP	TRE
0	0.966 ^a	4.233 ^b	2.109 ^a
25	0.436 ^b	7.139 ^a	1.913 ^b
50	0.481 ^b	6.737 ^a	1.544 ^c
MDS (P ≤ 0.05)	0.284	0.679	0.164

Apéndice

Tabla A 1.16 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) TPS					
NaCl	0.528	2	0.259	12.78	0.0069
Error	0.122	6	0.020		
Total	0.639	8			
b) TPP					
NaCl	74.37	2	37.18	12.86	0.0001
Error	3.47	6	1.73		
Total	77.84	8			
d) TRE					
NaCl	0.659	2	0.329	31.33	0.0001
Error	0.095	9	0.011		
Total	0.753	11			

Tabla A 1.17 Contenido de sacarosa, maltosa, fructosa y trehalosa en $\mu\text{g g}^{-1}$ PFN en nódulos de *M. truncatula*

NaCl (mM)	Sacarosa	Maltosa	Fructosa	Trehalosa
0	2993.45 ^a	59.74 ^a	344.69 ^a	10.86 ^c
25	1867.24 ^b	37.71 ^b	253.54 ^b	25.86 ^a
50	930.37 ^c	18.55 ^c	256.14 ^b	21.12 ^b
MDS (P ≤ 0.05)	897.53	10.47	53.53	4.23

Tabla A 1.18 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Sacarosa					
NaCl	6.40E+06	2	3.20E+06	15.88	0.0040
Error	1.21E+06	6	201529		
Total	7.61E+06	8			
b) Maltosa					
NaCl	2425	2	1213	45.53	0.0002
Error	160	6	27		
Total	2585	8			
c) Fructosa					
NaCl	15984	2	7992	11.22	0.0094
Error	4272	6	712		
Total	20256	8			
d) Trehalosa					
NaCl	356.975	2	178.488	44.43	0.0003
Error	24.102	6	4.017		
Total	381.077	8			

Tabla A 1.19 Contenido de sacarosa, maltosa, fructosa, glucosa y trehalosa en $\mu\text{g g}^{-1}$ PFN en nódulos de *L. japonicus*

NaCl (mM)	Sacarosa	Maltosa	Fructosa	Glucosa	Trehalosa
0	1675.64 ^a	26.77 ^a	169.11 ^a	74.58 ^b	25.45 ^b
25	943.61 ^b	13.79 ^b	156.27 ^a	82.71 ^b	29.15 ^a
50	994.81 ^b	17.15 ^b	184.59 ^a	105.42 ^a	25.33 ^b
MDS (P ≤ 0.05)	217.32	8.56	29.75	17.04	3.24

Tabla A 1.20 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Sacarosa					
NaCl	1.00E+06	2	501006	42.35	0.0003
Error	70977.4	6	11830		
Total	1.07E+06	8			
b) Maltosa					
NaCl	272	2	136	8.89	0.0161
Error	92	6	15		
Total	364	8			
c) Fructosa					
NaCl	1207	2	603	2.75	0.1421
Error	1317	6	219		
Total	2523	8			
d) Glucosa					
NaCl	1522	2	761	10.05	0.0122
Error	454	6	76		
Total	1976	8			
e) Trehalosa					
NaCl	28.20	2	14.101	4.53	0.0632
Error	18.66	6	3.111		
Total	46.87	8			

Apéndice

Tabla A 1.21 Contenido de azúcares solubles totales (Ast) y almidón (Alm) expresado en mg glucosa g⁻¹ PF en nódulo (n), raíz (r) y hoja (h) de *M. truncatula*

NaCl (mM)	Ast(n)	Ast(r)	Ast(h)	Alm(n)	Alm(h)
0	19.89 ^a	4.48 ^b	8.69 ^c	7.86 ^a	18.22 ^a
25	14.47 ^b	5.50 ^a	13.08 ^b	1.94 ^b	10.17 ^b
50	10.33 ^c	4.14 ^b	15.86 ^a	1.90 ^b	5.85 ^c
MDS (P ≤ 0.05)	1.55	0.93	0.45	0.56	1.47

Tabla A 1.22 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Ast(n)					
NaCl	183	2	91.934	98.908	0.0000
Error	8	9	0.929		
Total	192	11			
b) Ast(r)					
NaCl	3.984	2	1.992	6.544	0.0176
Error	2.739	9	0.304		
Total	6.723	11			
c) Ast(h)					
NaCl	104.427	2	52.214	823.566	0.0000
Error	0.571	9	0.063		
Total	104.998	11			
d) Alm(n)					
NaCl	94.161	2	47.080	498.583	0.0000
Error	0.850	9	0.094		
Total	95.011	11			
e) Alm(h)					
NaCl	315.054	2	157.527	194.326	0.0000
Error	7.296	9	0.811		
Total	322.350	11			

Tabla A 1.23 Contenido de azúcares solubles totales (Ast) y almidón (Alm) expresado en mg glucosa g⁻¹ PF en nódulo (n), raíz (r) y hoja (h) de *L. japonicus*

NaCl (mM)	Ast(n)	Ast(r)	Ast(h)	Alm(n)	Alm(h)
0	6.92 ^b	3.63 ^c	9.18 ^b	0.63 ^b	5.90 ^b
25	8.18 ^a	7.40 ^b	11.40 ^a	0.94 ^b	9.26 ^b
50	7.06 ^b	9.23 ^a	10.99 ^b	1.76 ^a	21.45 ^a
MDS (P ≤ 0.05)	0.93	0.44	0.51	0.16	1.37

Tabla A 1.24 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Ast (n)					
NaCl	3.862	2	1.931	6.445	0.0183
Error	2.697	9	0.300		
Total	6.559	11			
b) Ast (r)					
NaCl	65.057	2	32.529	495.665	0.0000
Error	0.591	9	0.066		
Total	65.648	11			
c) Ast (h)					
NaCl	11.117	2	5.559	66.449	0.0000
Error	0.753	9	0.084		
Total	11.870	11			
d) Alm (n)					
NaCl	2.755	2	1.378	133.25	0.0000
Error	0.093	9	0.010		
Total	2.848	11			
e) Alm (h)					
NaCl	535	2	267.765	361.836	0.0000
Error	6	9	0.740		
Total	542	11			

Apéndice

Tabla A 1.25 Contenido de aminoácidos totales (Aa) expresado en mg g⁻¹ PF y prolina (Pro) en µg g⁻¹ PF y en hoja (h), raíz (r) y nódulo (n) de *M. truncatula*

NaCl (mM)	Aa(n)	Aa(r)	Aa(h)	Pro(n)	Pro(r)	Pro(h)
0	6.69 ^a	3.38 ^b	1.44 ^c	80.45 ^a	17.70 ^a	17.75 ^c
25	5.41 ^b	3.37 ^b	1.74 ^b	37.12 ^c	35.73 ^a	169.68 ^b
50	1.55 ^c	3.89 ^a	1.99 ^a	55.80 ^b	25.17 ^a	389.85 ^a
MDS (P ≤ 0.05)	0.13	0.26	0.15	15.45	20.86	23.24

Tabla A 1.26 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Aa(n)					
NaCl	57.372	2	28.686	4137	0.0000
Error	0.062	9	0.007		
Total	57.434	11			
b) Aa(r)					
NaCl	0.714	2	0.357	13.571	0.0019
Error	0.237	9	0.026		
Total	0.951	11			
c) Aa (h)					
NaCl	0.604	2	0.302	34.772	0.0001
Error	0.078	9	0.009		
Total	0.682	11			
d) Pro(n)					
NaCl	3777	2	1888	21.336	0.0004
Error	796	9	88		
Total	4574	11			
e) Pro(r)					
NaCl	648	2	324	1.933	0.2002
Error	1509	9	167		
Total	2158	11			
f) Pro(h)					
NaCl	280022	2	140011	696	0.0000
Error	1809	9	201		
Total	281831	11			

Tabla A 1.27 Contenido de aminoácidos totales (Aa) expresado en mg g⁻¹ PF y prolina (Pro) en µg g⁻¹ PF y en hoja (h), raíz (r) y nódulo (n) de *L. japonicus*

NaCl (mM)	Aa (n)	Aa (r)	Aa (h)	Pro (n)	Pro (r)	Pro (h)
0	11.66 ^a	5.38 ^b	2.49 ^a	63.27 ^a	0.00 ^c	102.79 ^a
25	12.50 ^a	5.98 ^a	2.13 ^b	62.52 ^a	13.22 ^b	40.72 ^c
50	9.39 ^b	4.23 ^c	2.46 ^a	47.58 ^b	95.37 ^a	86.32 ^b
MDS (P ≤ 0.05)	0.84	0.27	0.23	7.13	4.65	3.23

Tabla A 1.28 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Aa (n)					
NaCl	20.731	2	10.365	37.272	0.0000
Error	2.503	9	0.278		
Total	23.234	11			
b) Aa (r)					
NaCl	6.331	2	3.166	109	0.0000
Error	0.261	9	0.029		
Total	6.593	11			
c) Aa (h)					
NaCl	0.312	2	0.156	7.303	0.0130
Error	0.192	9	0.021		
Total	0.504	11			
f) Pro (n)					
NaCl	626	2	313	16.840	0.0009
Error	167	9	18		
Total	793	11			
e) Pro (r)					
NaCl	21366	2	10683	1795	0.0000
Error	53	9	6		
Total	21420	11			
d) Pro (h)					
NaCl	8271	2	4135	1014	0.0000
Error	36	9	4		
Total	8308	11			

Apéndice

Tabla A 1.29 Fluorescencia inicial (F_0), relación fluorescencia inicial fluorescencia máxima (F_0/F_m), fluorescencia máxima (F_m), relación fluorescencia variable fluorescencia máxima (F_v/F_m) y clorofila en unidades SPAD, en plantas de *M. truncatula*

NaCl (mM)	F_0	F_0/F_m	F_m	F_v/F_m	SPAD
0	168 ^a	0.175 ^b	968 ^a	0.826 ^a	40.1 ^a
25	177 ^a	0.182 ^b	948 ^a	0.812 ^b	32.2 ^b
50	170 ^a	0.196 ^a	843 ^b	0.796 ^c	28.2 ^c
MDS ($P \leq 0.05$)	12	0.012	75	0.012	1.6

Tabla A 1.30 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) F_0					
NaCl	254	2	127.40	1.613	0.2396
Error	947	12	78.96		
Total	1202	14			
b) F_0/F_m					
NaCl	0.00221	2	0.001104	14.68	0.0006
Error	0.00090	12	0.000075		
Total	0.00311	14			
c) F_m					
NaCl	44.680	2	22.340	7.454	0.0079
Error	35.964	12	2.997		
Total	80.645	14			
d) F_v/F_m					
NaCl	0.00219	2	0.0010958	14.808	0.0006
Error	0.00088	12	0.0000740		
Total	0.00308	14			
e) SPAD					
NaCl	368	2	184.412	131.006	0.0000
Error	16	12	1.407		
Total	385	14			

Tabla A 1.31 Fluorescencia inicial (F_0), relación fluorescencia inicial fluorescencia máxima (F_0/F_m), fluorescencia máxima (F_m), relación fluorescencia variable fluorescencia máxima (F_v/F_m) y clorofila en unidades SPAD, en plantas de *L. japonicus*

NaCl (mM)	F_0	F_0/F_m	F_m	F_v/F_m	SPAD
0	117 ^a	0.174 ^b	670 ^a	0.825 ^a	62.1 ^a
25	123 ^a	0.187 ^{ab}	678 ^a	0.818 ^{ab}	58.8 ^b
50	112 ^a	0.202 ^a	575 ^b	0.803 ^b	54.9 ^c
MDS ($P \leq 0.05$)	11	0.019	35	0.017	1.2

Tabla A 1.32 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) F_0					
NaCl	304	2	152.187	2.357	0.1369
Error	774	12	64.562		
Total	1079	14			
b) F_0/F_m					
NaCl	0.00114	2	0.000570	3.39	0.0681
Error	0.00202	12	0.000168		
Total	0.00316	14			
c) F_m					
NaCl	33	2	16.580	25.442	0.0000
Error	8	12	651		
Total	41	14			
d) F_v/F_m					
NaCl	0.00118	2	5.89E-04	3.522	0.0626
Error	0.00201	12	1.67E-04		
Total	0.00319	14			
e) SPAD					
NaCl	129	2	64.540	83.661	0.0000
Error	9	12	0.771		
Total	138	14			

Tabla A 1.33 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla 1.1. **Pigmentos fotosintéticos *M. truncatula***

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Ca					
NaCl	94013	2	47007	19.05	0.0006
Error	22213	9	2468		
Total	116227	11			
b) Cb					
NaCl	17844	2	8922	82.22	0.0000
Error	977	9	109		
Total	18821	11			
c) Ca/b					
NaCl	4.217	2	2.109	35.55	0.0001
Error	0.534	9	0.059		
Total	4.751	11			
d) X+C					
NaCl	1225	2	613	2.45	0.1414
Error	2250	9	250		
Total	3476	11			
e) PT					
NaCl	225140	2	112570	20.50	0.0004
Error	49422	9	5491		
Total	274562	11			

Tabla A 1.34 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla 1.1. **Pigmentos fotosintéticos *L. japonicus***

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Ca					
NaCl	82203	2	41102	251.12	0.0000
Error	982	6	164		
Total	83185	8			
b) Cb					
NaCl	6205	2	3103	39.990	0.0003
Error	466	6	78		
Total	6671	8			
c) Ca/b					
NaCl	0.468	2	0.234	3.810	0.0856
Error	0.369	6	0.061		
Total	0.837	8			
d) X+C					
NaCl	2976	2	1488	41.850	0.0003
Error	213	6	36		
Total	3189	8			
e) PT					
NaCl	201288	2	100644	97.450	0.0000
Error	6196	6	1033		
Total	207485	8			

Tabla A 1.35 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla 1.2 **Nutrientes parte aérea *M. truncatula* (%)**

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) N					
NaCl	0.144	2	0.0723	6.256	0.0198
Error	0.104	9	0.0115		
Total	0.248	11			
b) P					
NaCl	0.607	2	0.30358	1193	0.0000
Error	0.002	9	0.00025		
Total	0.609	11			
c) K					
NaCl	8.993	2	4.496	381	0.0000
Error	0.106	9	0.012		
Total	9.099	11			
d) Ca					
NaCl	0.0207	2	0.0103	50	0.0000
Error	0.0018	9	0.0002		
Total	0.0226	11			
e) Mg					
NaCl	0.0667	2	0.0333	41	0.0000
Error	0.0073	9	0.0008		
Total	0.0740	11			
f) Na					
NaCl	31.44	2	15.721	8450	0.0000
Error	0.02	9	0.002		
Total	31.46	11			
g) Cl					
NaCl	22.844	2	11.422	9877	0.0000
Error	0.010	9	0.001		
Total	22.855	11			

Tabla A 1.36 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla 1.2 **Nutrientes raíz *M. truncatula* (%)**

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) N					
NaCl	0.268	2	0.134	20.986	0.0004
Error	0.057	9	0.006		
Total	0.326	11			
b) P					
NaCl	0.441	2	0.221	97.811	0.0000
Error	0.020	9	0.002		
Total	0.462	11			
c) K					
NaCl	4.555	2	2.277	109	0.0000
Error	0.188	9	0.021		
Total	4.743	11			
d) Ca					
NaCl	0.0107	2	0.0054	12.133	0.0028
Error	0.0040	9	0.0004		
Total	0.0147	11			
e) Mg					
NaCl	3.572	2	1.786	12.100	0.0028
Error	1.328	9	0.147		
Total	4.901	11			
f) Na					
NaCl	12.913	2	6.456	4.887	0.0000
Error	0.012	9	0.001		
Total	12.925	11			

Tabla A 1.37 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla 1.3 **Nutrientes parte aérea *L. japonicus* (%)**

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) N					
NaCl	1.5801	2	0.79006	36.56	0.0004
Error	0.1297	6	0.02161		
Total	1.7098	8			
b) P					
NaCl	0.0368	2	0.01838	8.770	0.0165
Error	0.0126	6	0.00209		
Total	0.0493	8			
c) K					
NaCl	0.2625	2	0.1313	8.89	0.0160
Error	0.0885	6	0.0148		
Total	0.3511	8			
d) Ca					
NaCl	0.0544	2	0.0272	131	0.0000
Error	0.0012	6	0.0002		
Total	0.0556	8			
e) Mg					
NaCl	0.0284	2	0.01420	344	0.0000
Error	0.0002	6	0.00004		
Total	0.0286	8			
f) Na					
NaCl	0.7457	2	0.37287	518	0.0000
Error	0.0043	6	0.00072		
Total	0.7501	8			

Tabla A 1.38 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla 1.3 **Nutrientes raíz *L. japonicus* (%)**

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) N					
NaCl	0.2108	2	0.10542	2.290	0.1825
Error	0.2763	6	0.04605		
Total	0.4872	8			
b) P					
NaCl	0.1213	2	0.06064	7.990	0.0203
Error	0.0455	6	0.00759		
Total	0.1668	8			
c) K					
NaCl	1.6973	2	0.84866	23.30	0.0015
Error	0.2185	6	0.03642		
Total	1.9159	8			
d) Ca					
NaCl	0.0397	2	0.01987	13.54	0.0060
Error	0.0088	6	0.00147		
Total	0.0485	8			
e) Mg					
NaCl	3.0175	2	1.50873	43.25	0.0003
Error	0.2093	6	0.03488		
Total	3.2267	8			
f) Na					
NaCl	0.9046	2	0.45232	128	0.0000
Error	0.0212	6	0.00354		
Total	0.9259	8			

Tabla A 1.39 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla 1.4 **Nutrientes parte aérea *M. truncatula* (mg planta⁻¹)**

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) N					
NaCl	1.529800	2	0.76490	44.430	0.0000
Error	0.154942	9	0.01722		
Total	1.684742	11			
b) P					
NaCl	0.225659	2	0.11283	17.245	0.0008
Error	0.058886	9	0.00654		
Total	0.284545	11			
c) K					
NaCl	8.609928	2	4.30496	72.009	0.0000
Error	0.538051	9	0.05978		
Total	9.147980	11			
d) Ca					
NaCl	0.358006	2	0.17900	33.278	0.0001
Error	0.048411	9	0.00538		
Total	0.406417	11			
e) Mg					
NaCl	0.071977	2	0.03599	17.403	0.0008
Error	0.018611	9	0.00207		
Total	0.090588	11			
f) Na					
NaCl	2.015358	2	1.00768	63.498	0.0000
Error	0.142826	9	0.01587		
Total	2.158184	11			
g) Cl					
NaCl	0.795747	2	0.39787	11.392	0.0034
Error	0.314327	9	0.03493		
Total	1.110074	11			

Tabla A 1.40. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla 1.4 Nutrientes raíz *M. truncatula* (mg planta⁻¹)

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) N					
NaCl	0.0334588	2	0.0167294	48.861	0.0000
Error	0.0030815	9	0.0003424		
Total	0.0365403	11			
b) P					
NaCl	0.0035474	2	0.0017737	12.181	0.0028
Error	0.0013105	9	0.0001456		
Total	0.0048579	11			
c) K					
NaCl	0.3953430	2	0.1976715	63.026	0.0000
Error	0.0282273	9	0.0031364		
Total	0.4235702	11			
d) Ca					
NaCl	0.0117476	2	0.0058738	60.411	0.0000
Error	0.0008751	9	0.0000972		
Total	0.0126227	11			
e) Mg					
NaCl	0.6318895	2	0.3159447	45.580	0.0000
Error	0.0623851	9	0.0069317		
Total	0.6942746	11			
f) Na					
NaCl	0.1947356	2	0.0973678	165.128	0.0000
Error	0.0053068	9	0.0005896		
Total	0.2000424	11			
g) Cl					
NaCl	0.0255110	2	0.0127555	627.844	0.0000
Error	0.0001828	9	0.0000203		
Total	0.0256939	11			

Tabla A 1.41 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla 1.5 **Nutrientes parte aérea *L. japonicus* (mg planta⁻¹)**

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) N					
NaCl	0.27692	2	0.1385	929.640	0.0000
Error	0.00134	9	0.0001		
Total	0.27826	11			
b) P					
NaCl	0.00101	2	0.0005	33.807	0.0001
Error	0.00013	9	0.0000		
Total	0.00115	11			
c) K					
NaCl	0.10754	2	0.0538	434.447	0.0000
Error	0.00111	9	0.0001		
Total	0.10865	11			
d) Ca					
NaCl	0.00101	2	0.0005	33.807	0.0001
Error	0.00013	9	0.0000		
Total	0.00115	11			
e) Mg					
NaCl	0.00200	2	0.0010	3433.078	0.0000
Error	0.00000	9	0.0000		
Total	0.00201	11			
f) Na					
NaCl	0.00740	2	0.0037	740.144	0.0000
Error	0.00005	9	0.0000		
Total	0.00745	11			

Tabla A 1.42 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla 1.5 Nutrientes raíz *L. japonicus* (mg planta⁻¹)

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) N					
NaCl	0.0118	2	0.00588	70.634	0.0000
Error	0.0007	9	0.00008		
Total	0.0125	11			
b) P					
NaCl	0.0014	2	0.00069	97.285	0.0000
Error	0.0001	9	0.00001		
Total	0.0014	11			
c) K					
NaCl	0.0219	2	0.01097	209.620	0.0000
Error	0.0005	9	0.00005		
Total	0.0224	11			
d) Ca					
NaCl	0.0005	2	0.00023	160.713	0.0000
Error	0.0000	9	0.00000		
Total	0.0005	11			
e) Mg					
NaCl	0.0220	2	0.01099	181.075	0.0000
Error	0.0005	9	0.00006		
Total	0.0225	11			
f) Na					
NaCl	0.0003	2	0.00017	55.331	0.0000
Error	0.0000	9	0.00000		
Total	0.0004	11			

Tabla A 1.43 Actividad sacarosa sintasa (SS) expresada en $\mu\text{mol NAD g}^{-1} \text{PFN h}^{-1}$, invertasa alcalina (IA) en $\text{nmol glucosa g}^{-1} \text{PFN h}^{-1}$, hexoquinasa (HK) en $\mu\text{mol NADP g}^{-1} \text{PFN h}^{-1}$, fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y malato deshidrogenasa (MDH) en $\mu\text{mol NADH g}^{-1} \text{PFN h}^{-1}$ e isocitrato deshidrogenasa (ICDH) en $\mu\text{mol NADP g}^{-1} \text{PFN h}^{-1}$ en nódulos de *M. truncatula*

NaCl (mM)	SS	IA	HK	PEPC	MDH	ICDH
0	11.576 ^a	1.078 ^a	15.862 ^a	27.974 ^a	5025.72 ^a	185.450 ^a
25	5.155 ^b	0.360 ^b	16.730 ^a	12.058 ^b	2913.18 ^b	91.881 ^b
50	1.990 ^c	0.258 ^c	11.359 ^b	6.697 ^c	2430.87 ^c	52.572 ^c
MDS (P ≤ 0.05)	0.790	0.079	1.045	2.135	190.21	10.452

Tabla A 1.44 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) SS					
NaCl	190.85	2	95.425	392.774	0.0000
Error	2.19	9	0.243		
Total	193.04	11			
b) IA					
NaCl	1.8401	2	0.9201	328.540	0.0000
Error	0.0280	10	0.0028		
Total	1.8681	12			
c) HK					
NaCl	66.520	2	33.2620	38.920	0.0000
Error	7.690	9	0.8550		
Total	74.210	11			
d) PEPC					
NaCl	15018.1	2	7509.05	551.782	0.0000
Error	122.5	9	13.61		
Total	15140.6	11			
e) MDH					
NaCl	2.93E+08	2	1.47E+08	103.188	0.0000
Error	1.28E+07	9	1.42E+06		
Total	3.06E+08	11			
f) ICDH					
NaCl	37276	2	18638	462	0.0000
Error	363	9	40		
Total	37639	11			

Tabla A 1.45 Actividad sacarosa sintasa (SS) expresada en $\mu\text{mol NAD g}^{-1} \text{PFN h}^{-1}$, invertasa alcalina (IA) en $\text{nmol glucosa g}^{-1} \text{PFN h}^{-1}$, hexoquinasa (HK) en $\mu\text{mol NADP g}^{-1} \text{PFN h}^{-1}$, fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y malato deshidrogenasa (MDH) en $\mu\text{mol NADH g}^{-1} \text{PFN h}^{-1}$ e isocitrato deshidrogenasa (ICDH) en $\mu\text{mol NADP g}^{-1} \text{PFN h}^{-1}$ en nódulos de *L. japonicus*

NaCl (mM)	SS	IA	HK	PEPC	MDH	ICDH
0	1.863 ^c	2.308 ^a	33.027 ^c	3.288 ^a	133.44 ^a	2.797 ^a
25	3.147 ^a	1.939 ^c	43.047 ^b	2.379 ^b	108.12 ^b	2.456 ^b
50	2.225 ^b	2.036 ^b	44.584 ^a	2.114 ^b	107.32 ^b	2.408 ^b
MDS ($P \leq 0.05$)	0.239	0.228	0.867	0.388	10.78	0.108

Tabla A 1.46 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) SS					
NaCl	3.508	2	1.754	78.331	0.0000
Error	0.202	9	0.022		
Total	3.709	11			
b) IA					
NaCl	0.294	2	0.147	7.247	0.0133
Error	0.182	9	0.020		
Total	0.476	11			
c) HK					
NaCl	315.121	2	157.561	535.686	0.0000
Error	2.647	9	0.294		
Total	317.769	11			
d) PEPC					
NaCl	3.031	2	1.515	25.690	0.0002
Error	0.531	9	0.059		
Total	3.561	11			
e) MDH					
NaCl	1765.820	2	882.909	21.130	0.0004
Error	376.082	9	41.787		
Total	2141.900	11			
f) ICDH					
NaCl	0.361	2	0.1807	39.450	0.0000
Error	0.041	9	0.0046		
Total	0.403	11			

Tabla A 1.47 Actividad trehalosa-6 fosfato sintasa (TPS) expresada en nmol UDP g⁻¹ PFN min⁻¹, trehalosa-6 fosfato fosfatasa (TPP) en nmol P_i g⁻¹ PFN min⁻¹ y trehalasa (TRE) en nmol glucosa g⁻¹ PFN h⁻¹ en nódulos de *M. truncatula*

NaCl (mM)	TPS	TPP	TRE
0	28.202 ^a	71.429 ^a	0.802 ^a
25	14.084 ^b	36.310 ^c	0.711 ^b
50	9.462 ^c	51.786 ^b	0.316 ^c
MDS (P ≤ 0.05)	1.761	5.099	0.059

Tabla A 1.48 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) TPS					
NaCl	150.001	2	75.001	550.617	0.0000
Error	1.226	9	0.136		
Total	151.227	11			
b) TPP					
NaCl	61057	2	30528	288	0.0000
Error	951	9	105		
Total	62009	11			
d) TRE					
NaCl	0.628	2	0.314	6.069	0.0214
Error	0.466	9	0.052		
Total	1.094	11			

Tabla A 1.49 Actividad trehalosa-6 fosfato sintasa (TPS) expresada en nmol UDP g⁻¹ PFN min⁻¹, trehalosa-6 fosfato fosfatasa (TPP) en nmol P_i g⁻¹ PFN min⁻¹ y trehalasa (TRE) en nmol glucosa g⁻¹ PFN h⁻¹ en nódulos de *L. japonicus*

NaCl (mM)	TPS	TPP	TRE
0	12.033 ^a	257.679 ^b	1.925 ^a
25	3.634 ^c	196.190 ^c	1.785 ^a
50	6.004 ^b	368.571 ^a	1.385 ^b
MDS (P ≤ 0.05)	0.590	16.234	0.364

Apéndice

Tabla A 1.50 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) TPS					
NaCl	150.001	2	75.001	550	0.0000
Error	1.226	9	0.136		
Total	151.227	11			
b) TPP					
NaCl	61057	2	30528	288	0.0000
Error	951	9	105		
Total	62009	11			
d) TRE					
NaCl	0.628	2	0.314	6.069	0.0214
Error	0.466	9	0.052		
Total	1.094	11			

Tabla A 2.1. Peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de raíz (PSR), peso seco de planta (PSP) en mg planta⁻¹; y relación raíz parte aérea (RPA) en plantas de *M. truncatula*

Tiempo(D)	NaCl(mM)	PSPA	PSR	PSP	RPA
0	0	121 ^e	27 ^g	152 ^f	0.220 ^c
14	0	141 ^e	45 ^f	192 ^e	0.320 ^b
	50	245 ^d	59 ^e	310 ^d	0.243 ^{bc}
21	0	279 ^c	78 ^d	364 ^c	0.279 ^{bc}
	50	443 ^b	134 ^b	589 ^b	0.302 ^b
28	0	490 ^a	194 ^a	696 ^a	0.395 ^a
	50	443 ^b	118 ^c	572 ^b	0.265 ^{bc}
MDS (P ≤ 0.05)		23	13	33	0.063

Tabla A 2.2. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) PSPA					
Tiempo(D)	886238	3	295413	182.44	0.0000
NaCl (S)	36307	1	36307	22.42	0.0000
D× S	82877	3	27626	17.06	0.0000
Error	64769	40	1619		
Total	1070190	47			
b) PSR					
Tiempo(D)	119678	3	39893	84.46	0.0000
NaCl (S)	25	1	25	0.05	0.8176
D× S	27543	3	9181	19.44	0.0000
Error	18894	40	472		
Total	166140	47			
c) PSP					
Tiempo(D)	1.7E+06	3	569717	171.32	0.0000
NaCl (S)	3.6E+04	1	36084	10.85	0.0021
D× S	2.0E+05	3	67843	20.40	0.0000
Error	1.3E+05	40	3326		
Total	2.1E+06	47			
d) R/PA					
Tiempo(D)	74208	3	24736	8.31	0.0002
NaCl (S)	25283	1	25283	8.49	0.0058
D× S	44259	3	14753	4.96	0.0051
Error	119062	40	2977		
Total	262812	47			

Apéndice

Tabla A 2.1. Peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de raíz (PSR), peso seco de planta (PSP) en mg planta⁻¹; y relación raíz parte aérea (RPA) en plantas de *L. japonicus*

Tiempo(D)	NaCl(mM)	PSPA	PSR	PSP	RPA
0	0	77 ^e	31 ^c	113 ^d	0.404 ^{ab}
14	0	139 ^d	35 ^c	182 ^c	0.250 ^c
	100	159 ^c	70 ^b	239 ^b	0.443 ^a
21	0	165 ^c	37 ^c	194 ^b	0.225 ^{cd}
	100	272 ^a	110 ^a	421 ^a	0.400 ^b
28	0	246 ^b	69 ^b	442 ^a	0.185 ^d
	100	133 ^d	36 ^c	203 ^c	0.253 ^c
MDS (P ≤ 0.05)		21	10	29	0.040

Tabla A 2.4. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) PSPA					
Tiempo(D)	134372	3	44791	33.620	0.0000
NaCl (S)	150	1	150	0.110	0.7393
D× S	73222	3	24408	18.320	0.0000
Error	53294	40	1332		
Total	261039	47			
b) PSR					
Tiempo(D)	11044	3	3681	13.600	0.0000
NaCl (S)	4150	1	4150	15.340	0.0003
D× S	18616	3	6205	22.930	0.0000
Error	10826	40	271		
Total	44635	47			
c) PSP					
Tiempo(D)	341475	3	113825	45.270	0.0000
NaCl (S)	1507	1	1507	0.600	0.4434
D× S	334805	3	111602	44.380	0.0000
Error	100580	40	2515		
Total	778367	47			
d) R/PA					
Tiempo(D)	0.216	3	0.0720	15.220	0.0000
NaCl (S)	0.142	1	0.1425	30.130	0.0000
D× S	0.075	3	0.0251	5.300	0.0036
Error	0.189	40	0.0047		
Total	0.623	47			

Tabla A 2.5. Actividad nitrogenasa aparente (ANA) y actividad nitrogenasa total (ANT) expresadas en $\mu\text{mol de H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ PSN h}^{-1}$; tasa de fijación de nitrógeno (TFN) expresada en $\mu\text{mol de N}_2 \text{ g}^{-1} \text{ PSN h}^{-1}$, contenido de leghemoglobina (Lb) en mg g^{-1} PFN, peso seco de nódulos (PSN) en mg planta^{-1} y peso normalizado de nódulos (PNN) en mg PSN mg^{-1} PSPA en *M. truncatula*

Tiempo(D)	NaCl	ANA	ANT	TFN	Lb	PSN	PNN
0	0	61.82 ^a	185.14 ^a	41.11 ^a	5.44 ^c	4.44 ^d	0.036 ^a
14	0	45.14 ^b	130.34 ^b	28.40 ^b	6.58 ^b	5.28 ^d	0.038 ^a
	50	37.87 ^c	96.46 ^c	19.53 ^c	7.31 ^a	6.08 ^{cd}	0.024 ^b
21	0	40.20 ^c	93.17 ^{cd}	17.66 ^c	4.11 ^e	7.33 ^b	0.026 ^b
	50	35.26 ^d	83.15 ^{de}	16.04 ^d	1.63 ^g	12.08 ^a	0.027 ^b
28	0	39.85 ^c	85.37 ^{cde}	15.00 ^d	4.57 ^d	12.15 ^a	0.025 ^b
	50	32.91 ^d	79.98 ^e	15.69 ^d	2.73 ^f	11.75 ^a	0.027 ^b
MDS (P ≤ 0.05)		4.83	13.12	3.27	0.16	1.21	0.003

Tabla A 2.6. Análisis de varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) ANA					
Tiempo(D)	5888	3	1963	24.32	0.0000
NaCl (S)	321	1	321	3.98	0.0518
D × S	118	3	39	0.49	0.6921
Error	3874	48	81		
Total	10201	55			
b) ANT					
Tiempo(D)	93488	3	31163	53.12	0.0000
NaCl (S)	2062	1	2062	3.52	0.0669
D × S	2373	3	791	1.35	0.2699
Error	28158	48	587		
Total	126081	55			
c) TFN					
Tiempo(D)	5858	3	1953	52.59	0.0000
NaCl (S)	84	1	84	2.26	0.1391
D × S	202	3	67	1.81	0.1574
Error	1782	48	37		
Total	7925	55			
d) Lb					
	80.61	3	26.869	539.89	0.0000
NaCl (S)	6.46	1	6.460	129.80	0.0000
D × S	13.65	3	4.551	91.45	0.0000
Error	1.19	24	0.050		
Total	101.92	31			
e) PSN					
Tiempo(D)	439	3	146.26	30.02	0.0000
NaCl (S)	20	1	19.89	4.08	0.0500
D × S	50	3	16.73	3.43	0.0258
Error	195	40	4.87		
Total	704	47			

Apéndice

f) PNN

Tiempo(D)	0.001003	3	0.000334	9.01	0.0001
NaCl (S)	0.000097	1	0.000097	2.61	0.1125
D× S	0.000532	3	0.000177	4.78	0.0054
Error	0.001780	48	0.000037		
Total	0.003412	55			

Tabla A 2.7. Actividad nitrogenasa aparente (ANA) y actividad nitrogenasa total (ANT) expresadas en $\mu\text{mol de H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ PSN h}^{-1}$; tasa de fijación de nitrógeno (TFN) expresada en $\mu\text{mol de N}_2 \text{ g}^{-1} \text{ PSN h}^{-1}$, contenido de leghemoglobina (Lb) en mg g^{-1} PFI, peso seco de nódulos (PSN) en mg planta^{-1} y peso normalizado de nódulos (PNN) en mg PSN mg^{-1} PSPA en *L. japonicus*

Tiempo(D)	NaCl	ANA	ANT	TFN	Lb	PSN	PNN
0	0	76.85 ^a	299.15 ^a	74.10 ^a	13.11 ^a	4.75 ^e	0.059 ^c
14	0	32.55 ^c	211.91 ^c	59.09 ^b	11.15 ^b	8.47 ^{cd}	0.060 ^c
	100	37.28 ^c	185.91 ^c	50.57 ^b	13.05 ^a	10.38 ^c	0.062 ^c
21	0	52.87 ^b	253.51 ^b	66.88 ^a	10.58 ^{bc}	7.28 ^d	0.042 ^d
	100	25.11 ^d	122.06 ^d	32.32 ^c	10.09 ^{bc}	17.33 ^b	0.062 ^c
28	0	9.59 ^e	93.28 ^d	24.60 ^c	9.21 ^c	26.85 ^a	0.080 ^b
	100	5.10 ^e	46.58 ^e	13.49 ^d	11.34 ^b	16.92 ^b	0.131 ^a
MDS (P ≤ 0.05)		6.55	34.03	10.19	1.39	2.28	0.011

Tabla A 2.8. Análisis de varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) ANA					
Tiempo(D)	29406	3	9802	77.76	0.0000
NaCl (S)	568	1	568	4.50	0.0401
D× S	1871	3	624	4.95	0.0052
Error	5042	40	126		
Total	36887	47			
b) ANT					
Tiempo(D)	318344	3	106115	31.56	0.0000
NaCl (S)	31566	1	31566	9.39	0.0039
D× S	29127	3	9709	2.89	0.0473
Error	134484	40	3362		
Total	513521	47			
c) TFN					
Tiempo(D)	18729	3	6243	20.44	0.0000
NaCl (S)	2202	1	2202	7.21	0.0105
D× S	1970	3	657	2.15	0.1091
Error	12217	40	305		
Total	35118	47			

d) Lb					
Tiempo(D)	46.336	3	15.445	4.240	0.0155
NaCl (S)	6.287	1	6.287	1.720	0.2016
D× S	10.508	3	3.503	0.960	0.4274
Error	87.522	24	3.647		
Total	150.652	31			
e) PSN					
Tiempo(D)	1883	3	628	41.240	0.0000
NaCl (S)	3	1	3	0.200	0.6542
D× S	607	3	202	13.290	0.0000
Error	609	40	15		
Total	3102	47			
f) PNN					
Tiempo(D)	0.0289	3	0.00964	19.47	0.0000
NaCl (S)	0.0054	1	0.00544	10.99	0.0016
D× S	0.0068	3	0.00227	4.59	0.0061
Error	0.0277	56	0.00049		
Total	0.0689	63			

Tabla A 2.9. Actividad sacarosa sintasa (SS) expresada en $\mu\text{mol NAD mg}^{-1} \text{prot h}^{-1}$, invertasa alcalina (IA) en $\text{nmol glucosa mg}^{-1} \text{prot h}^{-1}$, hexoquinasa (HK) en $\mu\text{mol NADP mg}^{-1} \text{prot h}^{-1}$, fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y malato deshidrogenasa (MDH) y en $\mu\text{mol NADH mg}^{-1} \text{prot h}^{-1}$ e isocitrato deshidrogenasa (ICDH) en $\mu\text{mol NADP mg}^{-1} \text{prot h}^{-1}$, en nódulos de *M. truncatula*

Tiempo(D)	NaCl	SS	IA	HK	PEPC	MDH	ICDH
0	0	0.099 ^{ab}	0.995 ^a	0.803 ^b	1.260 ^a	109.12 ^a	2.637 ^b
14	0	0.114 ^a	0.745 ^c	0.758 ^b	1.040 ^b	100.97 ^c	2.763 ^a
	50	0.080 ^b	0.646 ^d	0.672 ^c	0.881 ^d	95.51 ^d	2.680 ^b
21	0	0.097 ^{ab}	0.647 ^d	0.581 ^d	1.227 ^a	104.70 ^b	1.734 ^d
	50	0.077 ^b	0.701 ^c	0.708 ^c	0.981 ^c	102.88 ^b	2.560 ^c
28	0	0.084 ^b	0.575 ^e	0.677 ^c	0.629 ^e	92.93 ^d	2.725 ^a
	50	0.041 ^c	0.798 ^b	0.951 ^a	0.279 ^f	67.21 ^e	1.754 ^d
MDS (P ≤ 0.05)		0.017	0.049	0.060	0.034	3.12	0.057

Tabla A 2.10. Análisis de varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) SS					
Tiempo(D)	0.007	3	0.0023	16.931	0.0000
NaCl (S)	0.005	1	0.0047	34.384	0.0000
D× S	0.002	3	0.0007	5.164	0.0068
Error	0.003	24	0.0001		

Apéndice

Total	0.017	31			
b) IA					
Tiempo(D)	0.5772	3	0.1924	41.42	0.0000
NaCl (S)	0.0157	1	0.0157	3.38	0.0783
D× S	0.1084	3	0.0361	7.78	0.0008
Error	0.1115	24	0.0046		
Total	0.8128	31			
c) HK					
Tiempo(D)	0.153	3	0.0510	29.774	0.0000
NaCl (S)	0.050	1	0.0495	28.876	0.0000
D× S	0.148	3	0.0494	28.833	0.0000
Error	0.041	24	0.0017		
Total	0.392	31			
d) PEPC					
Tiempo(D)	2.9300	3	0.9767	441.15	0.0000
NaCl (S)	0.2850	1	0.2850	128.73	0.0000
D× S	0.1317	3	0.0439	19.82	0.0000
Error	0.0531	24	0.0022		
Total	3.3998	31			
e) MDH					
Tiempo(D)	5166.35	3	1722.120	45.970	0.0000
NaCl (S)	12.59	1	12.588	0.340	0.5675
D× S	2739.02	3	913.007	24.370	0.0000
Error	899.07	24	37.461		
Total	8817.03	31			
f) IDH					
Tiempo(D)	1.951	3	0.650	49.240	0.0000
NaCl (S)	0.026	1	0.026	1.980	0.1720
D× S	3.239	3	1.080	81.730	0.0000
Error	0.317	24	0.013		
Total	5.533	31			

Tabla A 2.11. Actividad sacarosa sintasa (SS) expresada en $\mu\text{mol NAD mg}^{-1} \text{prot h}^{-1}$, invertasa alcalina (IA) en $\text{nmol glucosa mg}^{-1} \text{prot h}^{-1}$, hexoquinasa (HK) en $\mu\text{mol NADP mg}^{-1} \text{prot h}^{-1}$, fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y malato deshidrogenasa (MDH) y en $\mu\text{mol NADH mg}^{-1} \text{prot h}^{-1}$ e isocitrato deshidrogenasa (ICDH) en $\mu\text{mol NADP mg}^{-1} \text{prot h}^{-1}$, en nódulos de *L. japonicus*

Tiempo(D)	NaCl	SS	IA	HK	PEPC	MDH	ICDH
0	0	0.141 ^a	1.661 ^a	0.446 ^b	3.588 ^b	150.19 ^a	2.976 ^c
14	0	0.118 ^{bc}	1.207 ^b	0.471 ^a	3.781 ^a	155.23 ^a	3.628 ^a
	100	0.089 ^d	1.035 ^c	0.305 ^d	3.115 ^c	141.71 ^b	3.107 ^b
21	0	0.122 ^b	1.025 ^c	0.347 ^c	2.077 ^d	133.03 ^c	2.983 ^c
	100	0.047 ^e	0.863 ^d	0.237 ^e	2.152 ^d	107.04 ^d	2.884 ^d
28	0	0.112 ^c	0.838 ^d	0.314 ^d	2.090 ^d	111.60 ^d	2.544 ^e
	100	0.048 ^e	0.750 ^e	0.205 ^f	2.170 ^d	100.71 ^e	2.920 ^{cd}

MDS ($P \leq 0.05$) 0.006 0.068 0.020 0.150 5.21 0.077

Tabla A 2.12. Análisis de varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) SS					
Tiempo(D)	0.0185	3	0.00615	78.45	0.0000
NaCl (S)	0.0138	1	0.01382	176.25	0.0000
D× S	0.0069	3	0.00232	29.52	0.0000
Error	0.0019	24	0.00008		
Total	0.0411	31			
b) IA					
Tiempo(D)	3.4343	3	1.1448	132.65	0.0000
NaCl (S)	0.0890	1	0.0890	10.31	0.0037
D× S	0.0381	3	0.0127	1.47	0.2474
Error	0.2071	24	0.0086		
Total	3.7685	31			
c) HK					
Tiempo(D)	0.4441	3	0.14803	199.53	0.0000
NaCl (S)	0.0036	1	0.00364	4.91	0.0364
D× S	0.1469	3	0.04895	65.99	0.0000
Error	0.0178	24	0.00074		
Total	0.6124	31			
d) PEPC					
Tiempo(D)	15.6700	3	5.2233	123.5	0.0000
NaCl (S)	0.1303	1	0.1303	3.08	0.0919
D× S	0.7808	3	0.2603	6.15	0.0030
Error	1.0150	24	0.0423		
Total	17.5961	31			
e) MDH					
Tiempo(D)	11287	3	3762	72.20	0.0000
NaCl (S)	1271	1	1271	24.38	0.0000
D× S	684	3	228	4.37	0.0136
Error	1251	24	52		
Total	14492	31			
f) ICDH					
Tiempo(D)	1.6959	3	0.5653	49.36	0.0000
NaCl (S)	0.0298	1	0.0298	2.61	0.1195
D× S	0.8152	3	0.2717	23.73	0.0000
Error	0.2749	24	0.0115		
Total	2.8158	31			

Tabla A 2.13. Actividad trehalosa-6 fosfato sintasa (TPS) expresada en mmol UDP mg⁻¹ prot min⁻¹, trehalosa-6 fosfato fosfatasa (TPP) en nmol P_i mg⁻¹ prot min⁻¹ y trehalasa (TRE) en nmol glucosa mg⁻¹prot h⁻¹, en nódulos de *M.truncatula*

Tiempo(D)	NaCl	TPS	TPP	TRE
0	0	0.482 ^e	0.256 ^c	0.766 ^c
14	0	0.679 ^c	0.482 ^a	1.128 ^a
	50	0.662 ^c	0.382 ^b	1.035 ^a
21	0	1.046 ^a	0.543 ^a	0.950 ^b
	50	0.357 ^f	0.358 ^b	0.815 ^c
28	0	0.732 ^b	0.357 ^b	0.596 ^d
	50	0.596 ^d	0.209 ^c	0.409 ^e
MDS (P ≤ 0.05)		0.039	0.065	0.128

Tabla 2.14 Análisis de varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) TPS					
Tiempo(D)	0.240	3	0.080	27.490	0.0000
NaCl (S)	0.355	1	0.355	122.030	0.0000
D× S	0.632	3	0.211	72.500	0.0000
Error	0.070	24	0.003		
Total	1.296	31			
b) TPP					
Tiempo(D)	0.1794	3	0.0598	10.40	0.0005
NaCl (S)	0.0706	1	0.0706	12.27	0.0029
D× S	0.0289	3	0.0096	1.68	0.2118
Error	0.0921	16	0.0058		
Total	0.3711	23			
c) TRE					
Tiempo(D)	1.0537	3	0.3512	15.93	0.0000
NaCl (S)	0.0646	1	0.0646	2.93	0.1062
D× S	0.0281	3	0.0094	0.42	0.7382
Error	0.3527	16	0.0220		
Total	1.4990	23			

Tabla A 2.15 Actividad trehalosa-6 fosfato sintasa (TPS) expresada en mmol UDP mg⁻¹ prot min⁻¹, trehalosa-6 fosfato fosfatasa (TPP) en nmol P_i mg⁻¹ prot min⁻¹ y trehalasa (TRE) en nmol glucosa mg⁻¹ prot h⁻¹, en nódulos de *L. japonicus*

Tiempo(D)	NaCl	TPS	TPP	TRE
0	0	0.132 ^c	1.505 ^d	1.509 ^a
14	0	0.158 ^b	1.772 ^a	1.307 ^c
	100	0.134 ^c	1.587 ^c	1.266 ^d
21	0	0.176 ^a	1.707 ^b	1.434 ^b
	100	0.121 ^d	1.575 ^c	0.761 ^g
28	0	0.156 ^b	1.830 ^a	0.982 ^e
	100	0.123 ^d	1.382 ^e	0.785 ^f
MDS (P ≤ 0.05)		0.007	0.058	0.15

Tabla A 2.16 Análisis de varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
b) TPS					
Tiempo(D)	0.00130	3	0.00043	5.03	0.0076
NaCl (S)	0.00612	1	0.00612	70.75	0.0000
D× S	0.00302	3	0.00101	11.65	0.0001
Error	0.00208	24	0.00009		
Total	0.01252	31			
c) TPP					
Tiempo(D)	0.134	3	0.0447	6.84	0.0017
NaCl (S)	0.292	1	0.2921	44.76	0.0000
D× S	0.212	3	0.0708	10.85	0.0001
Error	0.157	24	0.0065		
Total	0.795	31			
a) TRE					
Tiempo(D)	1.7098	3	0.5699	13.46	0.0000
NaCl (S)	0.4146	1	0.4146	9.79	0.0046
D× S	0.5723	3	0.1908	4.50	0.0121
Error	1.0165	24	0.0424		
Total	3.7133	31			

Tabla A 2.17 Contenido de sacarosa, maltosa, fructosa, glucosa y trehalosa expresado en $\mu\text{g g}^{-1}$ PFN en nódulos de *M. truncatula*

Tiempo(D)	NaCl	Sacarosa	Maltosa	Fructosa	Glucosa	Trehalosa
0	0	2542.97 ^c	76.79 ^a	387.96 ^{bc}	1148.31 ^a	36.06 ^c
14	0	2214.72 ^d	32.92 ^e	295.98 ^d	1053.48 ^{ab}	35.00 ^c
	50	2345.87 ^{cd}	54.48 ^d	360.98 ^c	727.29 ^d	41.93 ^{bc}
21	0	3649.14 ^a	54.48 ^d	479.57 ^a	1045.32 ^b	53.43 ^a
	50	2400.71 ^{cd}	52.28 ^d	302.89 ^d	716.42 ^d	43.26 ^b
28	0	2868.54 ^b	68.09 ^b	415.66 ^b	1054.72 ^{ab}	42.44 ^{bc}
	50	2339.48 ^{cd}	58.87 ^c	286.87 ^d	925.93 ^c	13.49 ^d
MDS (P ≤ 0.05)		287.24	8.22	35.04	97.16	6.72

Tabla A 2.18 Análisis de la varianza correspondiente a los datos de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Sacarosa					
Tiempo(D)	1.71E+06	3	570717	5.19	0.0108
NaCl (S)	1.02E+06	1	1.02E+06	9.24	0.0078
D× S	1.77E+06	3	589036	5.36	0.0096
Error	1.76E+06	16	109991		
Total	6.26E+06	23			
b) Maltosa					
Tiempo(D)	3610	3	1203	13.46	0.0001
NaCl (S)	39	1	39	0.43	0.5209
.31D× S	794	3	265	2.96	0.0638
Error	1431	16	89		
Total	5873	23			
c) Fructosa					
Tiempo(D)	16432	3	5477	3.30	0.0476
NaCl (S)	21699	1	21699	13.06	0.0023
D× S	56371	3	18790	11.31	0.0003
Error	26593	16	1662		
Total	121094	23			
d) Glucosa					
Tiempo(D)	246529	3	82176	6.59	0.0041
NaCl (S)	15225	1	15225	1.22	0.2855
D× S	270364	3	90121	7.23	0.0028
Error	199496	16	12469		
Total	731613	23			
e) Trehalosa					
Tiempo(D)	1314	3	438	7.31	0.0026
NaCl (S)	219	1	219	3.66	0.0737
D× S	1548	3	516	8.61	0.0012
Error	959	16	60		

Total 4041 23

Tabla A 2.19 Contenido de sacarosa, maltosa, fructosa, glucosa y trehalosa expresado en $\mu\text{g g}^{-1}$ PFN en nódulos de *L. japonicus*

Tiempo(D)	NaCl	Sacarosa	Maltosa	Fructosa	Glucosa	Trehalosa
0	0	553.48 ^f	13.50 ^c	174.44 ^e	113.83 ^d	120.00 ^c
14	0	780.09 ^f	24.49 ^b	172.01 ^e	140.18 ^d	58.50 ^d
	50	4719.40 ^b	51.57 ^a	396.33 ^a	288.86 ^a	134.81 ^{bc}
21	0	1638.18 ^e	20.83 ^b	201.87 ^{de}	157.60 ^d	129.91 ^{bc}
	50	5484.12 ^a	57.73 ^a	304.10 ^b	317.06 ^a	204.99 ^a
28	0	3807.23 ^d	30.45 ^b	209.94 ^d	225.44 ^c	145.00 ^b
	50	4259.04 ^c	54.90 ^a	258.04 ^c	272.12 ^b	203.00 ^a
MDS (P ≤ 0.05)		438.24	10.50	30.43	43.99	16.36

Tabla A 2.20 Análisis de la varianza correspondiente a los datos de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Sacarosa	4.28E+07	3	1.43E+07	55.73	0.0000
Tiempo(D)	2.54E+07	1	2.54E+07	99.49	0.0000
NaCl (S)	2.03E+07	3	6.78E+06	26.49	0.0000
D × S	4.09E+06	16	255742		
Error	9.26E+07	23			
Total					
b) Maltosa					
Tiempo(D)	3530	3	1177	8.00	0.0018
NaCl (S)	2431	1	2431	16.52	0.0009
.31D × S	825	3	275	1.87	0.1753
Error	2354	16	147		
Total	9140	23			
c) Fructosa					
Tiempo(D)	38409	3	12803	10.89	0.0004
NaCl (S)	52639	1	52639	44.78	0.0000
D × S	41993	3	13998	11.91	0.0002
Error	18807	16	1175		
Total	151848	23			
d) Glucosa					
Tiempo(D)	68131	3	22710	8.79	0.0011
NaCl (S)	47226	1	47226	18.28	0.0006
D × S	27366	3	9122	3.53	0.0390
Error	41336	16	2583		
Total	184059	23			
e) Trehalosa					
Tiempo(D)	30405	3	10135	28.34	0.0000
NaCl (S)	19552	1	19552	54.66	0.0000
D × S	7561	3	2520	7.05	0.0031
Error	5723	16	358		

Apéndice

Total 63242 23

Tabla A 2.21 Contenido de azúcares solubles totales (Ast) y almidón (Alm) expresado en mg glucosa g⁻¹ PF en nódulo (n) y hoja (h) de *M truncatula*

Tiempo(D)	NaCl	Ast(n)	Ast(h)	Alm(n)	Alm(h)
0	0	15.06 ^b	3.90 ^e	5.07 ^a	1.42 ^e
14	0	11.80 ^d	3.94 ^e	2.78 ^d	1.68 ^e
	100	12.96 ^c	7.08 ^d	2.09 ^e	4.61 ^d
21	0	15.71 ^b	7.62 ^c	4.01 ^b	7.25 ^b
	100	12.87 ^c	13.09 ^a	3.00 ^{cd}	6.69 ^c
28	0	16.96 ^a	8.58 ^b	4.32 ^b	7.03 ^c
	100	9.29 ^e	12.91 ^a	3.35 ^c	16.10 ^a
MDS (P ≤ 0.05)		0.94	0.34	0.45	0.54

Tabla A 2.22 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Ast (n)					
Tiempo(D)	25.57	3	8.526	7.209	0.0028
NaCl (S)	32.82	1	32.825	27.752	0.0001
D× S	69.36	3	23.122	19.549	0.0000
Error	18.92	16	1.183		
Total	146.69	23			
b) Ast (h)					
Días (D)	213	3	71.263	464.491	0.0000
NaCl (S)	62	1	62.683	408.566	0.0000
D× S	24	3	8.147	53.103	0.0000
Error	2	16	0.153		
Total	303	23			
d) Alm (n)					
Tiempo(D)	365	3	121.772	308.164	0.0000
NaCl (S)	49	1	49.108	124.276	0.0000
D× S	87	3	29.215	73.933	0.0000
Error	6	16	0.395		
Total	508	23			
c) Alm (h)					
Tiempo(D)	21.13	3	7.044	25.838	0.0000
NaCl (S)	2.66	1	2.661	9.763	0.0065
D× S	0.98	3	0.328	1.202	0.3408
Error	4.36	16	0.273		
Total	29.13	23			

Tabla A 2.23 Contenido de azúcares solubles totales (Ast) y almidón (Alm) expresado en mg glucosa g⁻¹ PF en nódulo (n) y hoja (h) de *L. japonicus*

Tiempo(D)	NaCl	Ast(n)	Ast(h)	Alm(n)	Alm(h)
0	0	2.76 ^d	6.77 ^d	0.79 ^e	13.08 ^c
14	0	3.62 ^c	7.03 ^d	5.97 ^c	8.25 ^d
	100	11.83 ^a	8.35 ^c	9.27 ^a	24.79 ^a
21	0	3.71 ^c	8.48 ^c	1.48 ^d	7.91 ^d
	100	10.92 ^b	11.83 ^a	7.74 ^b	23.96 ^a
28	0	10.63 ^b	10.73 ^b	0.79 ^e	11.74 ^c
	100	10.38 ^b	10.01 ^b	1.77 ^d	22.70 ^b
MDS (P ≤ 0.05)		0.81	0.89	0.34	1.04

Tabla A 2.24 Análisis de varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Ast(n)					
Tiempo(D)	184.95	3	61.648	69.58	0.0000
NaCl (S)	86.23	1	86.228	97.33	0.0000
D × S	92.76	3	30.921	34.90	0.0000
Error	14.18	16	0.886		
Total	378.11	23			
b) Ast(h)					
Tiempo(D)	57.9	3	19.287	18.26	0.0000
NaCl (S)	5.8	1	5.818	5.51	0.0321
D × S	14.4	3	4.797	4.54	0.0174
Error	16.9	16	1.056		
Total	95.0	23			
c) Alm(n)					
Tiempo(D)	182.6	3	60.881	402.23	0.0000
NaCl (S)	41.8	1	41.756	275.88	0.0000
D × S	34.9	3	11.633	76.86	0.0000
Error	2.4	16	0.151		
Total	261.7	23			
d) Alm(h)					
Tiempo(D)	59	3	19.75	13.65	0.0001
NaCl (S)	711	1	711.45	491.88	0.0000
D × S	266	3	88.59	61.25	0.0000
Error	23	16	1.45		
Total	1060	23			

Apéndice

Tabla A 2.25 Contenido de aminoácidos totales (Aa) expresado en mg g⁻¹PF y prolina (Pro) en µg g⁻¹PF en nódulo (n) y hoja (h) de *M. truncatula*

Tiempo(D)	NaCl	Aa(n)	Aa(h)	Pro(n)	Pro(h)
0	0	10.44 ^{ab}	1.80 ^c	61.03 ^d	18.59 ^f
14	0	10.04 ^b	2.22 ^b	81.94 ^d	29.34 ^f
	100	7.05 ^c	2.19 ^b	79.70 ^d	46.54 ^e
21	0	9.87 ^b	2.25 ^b	136.47 ^c	111.36 ^d
	100	7.47 ^c	2.50 ^a	190.25 ^b	508.84 ^a
28	0	11.82 ^a	2.44 ^a	133.67 ^c	196.40 ^c
	100	7.36 ^c	1.93 ^c	456.36 ^a	378.42 ^b
MDS (P ≤ 0.05)		1.41	0.14	28.62	12.42

Tabla A 2.26 Análisis de varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Aa(n)					
Tiempo(D)	14.090	3	4.697	1.776	0.1923
NaCl (S)	36.366	1	36.366	13.748	0.0019
D× S	15.488	3	5.163	1.952	0.1620
Error	42.322	16	2.645		
Total	108.266	23			
b) Aa(h)					
Tiempo(D)	1.071	3	0.357	12.751	0.0002
NaCl (S)	0.033	1	0.033	1.168	0.2959
D× S	0.464	3	0.155	5.523	0.0085
Error	0.448	16	0.028		
Total	2.015	23			
c) Pro(n)					
Tiempo(D)	271275	3	90425	58.78	0.0000
NaCl (S)	70023	1	70023	45.52	0.0000
D× S	144027	3	48009	31.21	0.0000
Error	36919	24	1538		
Total	522246	31			
d) Pro(h)					
Tiempo(D)	588877	3	196292	677	0.0000
NaCl (S)	178022	1	178022	614	0.0000
D× S	204808	3	68269	235	0.0000
Error	6955	24	289		
Total	978663	31			

Tabla A 2.27 Contenido de aminoácidos totales (Aa) expresado en mg g⁻¹PF y prolina (Pro) en µg g⁻¹PF y en nódulo (n) y hoja (h) de *L. japonicus*

Tiempo(D)	NaCl	Aa(n)	Aa(h)	Pro(n)	Pro(h)
0	0	6.17 ^f	2.12 ^c	6.50 ^g	12.55 ^e
14	0	8.58 ^e	2.25 ^b	30.40 ^f	14.07 ^e
	100	11.51 ^b	2.01 ^c	195.85 ^a	317.47 ^a
21	0	10.08 ^d	2.78 ^a	52.81 ^e	32.05 ^d
	100	10.74 ^c	1.68 ^d	87.92 ^d	64.49 ^c
28	0	10.48 ^{cd}	2.81 ^a	129.75 ^b	71.38 ^c
	100	13.30 ^a	2.01 ^c	99.50 ^c	115.92 ^b
MDS (P ≤ 0.05)		0.57	0.23	4.03	7.96

Tabla A 2.28 Análisis de varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Aa(n)					
Tiempo(D)	107.382	3	35.794	81.93	0.0000
NaCl (S)	15.421	1	15.421	35.30	0.0000
D × S	10.060	3	3.353	7.68	0.0021
Error	6.990	16	0.437		
Total	139.854	23			
b) Aa(h)					
Tiempo(D)	0.856	3	0.285	3.78	0.0317
NaCl (S)	1.701	1	1.701	22.55	0.0002
D × S	0.612	3	0.204	2.71	0.0800
Error	1.207	16	0.075		
Total	4.375	23			
c) Pro(n)					
Tiempo(D)	46394	3	15465	714.11	0.0000
NaCl (S)	10877	1	10877	502.26	0.0000
D × S	33407	3	11136	514.21	0.0000
Error	346	16	22		
Total	91024	23			
d) Pro(h)					
Tiempo(D)	68965	3	22988	271.64	0.0000
NaCl (S)	60404	1	60404	713.77	0.0000
D × S	92321	3	30774	363.64	0.0000
Error	1354	16	85		
Total	223044	23			

Tabla A 2.29 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla 2.1.
Pigmentos fotosintéticos *M. truncatula*

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Ca					
Días (D)	126903	3	42301	58.040	0.0000
NaCl (S)	14179	1	14179	19.450	0.0002
D × S	25691	3	8564	11.750	0.0001
Error	17493	24	729		
Total	184266	31			
b) Cb					
Días (D)	14080	3	4693	48.170	0.0000
NaCl (S)	2053	1	2053	21.080	0.0001
D × S	2932	3	977	10.030	0.0002
Error	2338	24	97		
Total	21404	31			
c) Ca/b					
Días (D)	0.161	3	0.0538	9.070	0.0003
NaCl (S)	0.020	1	0.0199	3.350	0.0797
D × S	0.036	3	0.0121	2.050	0.1338
Error	0.142	24	0.0059		
Total	0.360	31			
d) X+C					
Días (D)	7093	3	2364	78.260	0.0000
NaCl (S)	174	1	174	5.770	0.0244
D × S	340	3	113	3.750	0.0242
Error	725	24	30		
Total	8333	31			
e) PT					
Días (D)	304584	3	101528	64.790	0.0000
NaCl (S)	31538	1	31538	20.130	0.0002
D × S	53702	3	17901	11.420	0.0001
Error	37609	24	1567		
Total	427433	31			

Tabla A 2.30 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla 2.2. **Pigmentos fotosintéticos *L. japonicus***

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Ca					
Días (D)	45102	3	15034	97.93	0.0000
NaCl (S)	873	1	873	5.69	0.0298
D × S	107282	3	35761	232.95	0.0000
Error	2456	16	154		
Total	155714	23			
b) Cb					
Días (D)	2226	3	742	8.18	0.0016
NaCl (S)	127	1	127	1.40	0.2539
D × S	8161	3	2720	29.98	0.0000
Error	1452	16	91		
Total	11966	23			
c) Ca/b					
Días (D)	0.9354	3	0.3118	3.76	0.0324
NaCl (S)	0.0068	1	0.0068	0.08	0.7785
D × S	0.3072	3	0.1024	1.23	0.3301
Error	1.3281	16	0.0830		
Total	2.5775	23			
d) X+C					
Días (D)	8541	3	2847	20.24	0.0000
NaCl (S)	889	1	889	6.32	0.0230
D × S	8505	3	2835	20.15	0.0000
Error	2251	16	141		
Total	20186	23			
e) PT					
Días (D)	102199	3	34066	49.13	0.0000
NaCl (S)	4165	1	4165	6.01	0.0261
D × S	230283	3	76761	110.70	0.0000
Error	11095	16	693		
Total	347742	23			

Apéndice

Tabla A 2.31 Actividad sacarosa sintasa (SS) expresada en $\mu\text{mol NAD g}^{-1}\text{PFN h}^{-1}$, invertasa alcalina (IA) en $\text{nmol glucosa g}^{-1}\text{PFN h}^{-1}$, hexoquinasa (HK) en $\mu\text{mol NADP g}^{-1}\text{PFN h}^{-1}$, fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y malato deshidrogenasa (MDH) y en $\mu\text{mol NADH g}^{-1}\text{PFN min}^{-1}$ e isocitrato deshidrogenasa (ICDH) en $\mu\text{mol NADP g}^{-1}\text{PFN min}^{-1}$, en nódulos de *M. truncatula*

Tiempo(D)	NaCl	SS	IA	HK	PEPC	MDH	ICDH
0	0	10.539 ^d	0.760 ^a	34.691 ^f	3.276 ^b	302.89 ^a	6.855 ^a
14	0	11.937 ^c	0.584 ^b	46.350 ^c	2.420 ^c	234.89 ^b	6.427 ^b
	50	10.273 ^d	0.466 ^d	49.558 ^b	2.050 ^d	222.19 ^c	6.234 ^c
21	0	17.707 ^a	0.555 ^c	40.912 ^d	3.826 ^a	239.23 ^b	5.408 ^d
	50	13.240 ^b	0.466 ^d	38.850 ^e	2.119 ^d	222.19 ^c	5.529 ^d
28	0	8.374 ^e	0.438 ^e	52.090 ^a	1.103 ^e	163.02 ^d	4.781 ^e
	50	7.271 ^f	0.378 ^f	48.617 ^b	0.434 ^f	104.66 ^e	2.731 ^e
MDS (P ≤ 0.05)		0.750	0.021	1.258	0.079	7.08	0.129

Tabla A 2.32 Análisis de varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) SS					
Tiempo(D)	240.877	3	80.292	182.274	0.0000
NaCl (S)	26.171	1	26.171	59.411	0.0000
D × S	21.718	3	7.239	16.434	0.0000
Error	10.572	24	0.441		
Total	299.337	31			
b) IA					
Tiempo(D)	0.5326	3	0.1775	212.73	0.0000
NaCl (S)	0.0358	1	0.0358	42.94	0.0000
D × S	0.0153	3	0.0051	6.12	0.0030
Error	0.0200	24	0.0008		
Total	0.6038	31			
c) HK					
Tiempo(D)	1257.602	3	419.201	95.784	0.0000
NaCl (S)	2.708	1	2.708	0.619	0.4475
D × S	50.489	3	16.830	3.845	0.0222
Error	105.037	24	4.377		
Total	1415.835	31			
d) PEPC					
Tiempo(D)	30.0252	3	10.0084	840.15	0.0000
NaCl (S)	3.7708	1	3.7708	316.54	0.0000
D × S	3.2274	3	1.0758	90.31	0.0000
Error	0.2859	24	0.0119		
Total	37.3093	31			

e) ICDH					
Tiempo(D)	44.207	3	14.736	218.700	0.0000
NaCl (S)	2.252	1	2.252	33.420	0.0000
D× S	6.255	3	2.085	30.950	0.0000
Error	1.617	24	0.067		
Total	54.331	31			
f) MDH					
Tiempo(D)	115346.00	3	38448.500	215.430	0.0000
NaCl (S)	3881.06	1	3881.060	21.750	0.0001
D× S	3834.22	3	1278.070	7.160	0.0013
Error	4283.45	24	178.477		
Total	127344.00	31			

Tabla A 2.33 Actividad sacarosa sintasa (SS) expresada en $\mu\text{mol NAD g}^{-1}\text{PFN h}^{-1}$, invertasa alcalina (IA) en $\text{nmol glucosa g}^{-1}\text{PFN h}^{-1}$, hexoquinasa (HK) en $\mu\text{mol NADP g}^{-1}\text{PFN h}^{-1}$, fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y malato deshidrogenasa (MDH) y en $\mu\text{mol NADH g}^{-1}\text{PFN min}^{-1}$ e isocitrato deshidrogenasa (ICDH) en $\mu\text{mol NADP g}^{-1}\text{PFN min}^{-1}$, en nódulos de *L. japonicus*

Tiempo(D)	NaCl	SS	IA	HK	PEPC	MDH	ICDH
0	0	5.064 ^b	1.323 ^{cd}	16.061 ^b	2.948 ^c	114.55 ^d	2.445 ^f
14	0	4.684 ^c	1.637 ^a	18.738 ^a	3.798 ^a	152.23 ^b	3.644 ^a
	100	4.070 ^d	1.379 ^c	13.891 ^c	3.545 ^b	161.27 ^a	3.536 ^b
21	0	5.697 ^a	1.537 ^b	16.305 ^b	2.026 ^{de}	134.44 ^c	3.128 ^c
	100	2.315 ^f	1.296 ^{cd}	11.684 ^d	2.098 ^{de}	110.33 ^e	2.972 ^d
28	0	5.144 ^b	1.349 ^{cd}	14.325 ^c	1.917 ^e	113.34 ^e	2.583 ^e
	100	2.858 ^e	1.279 ^d	12.118 ^d	2.189 ^d	101.59 ^f	2.945 ^d
MDS (P ≤ 0.05)		0.242	0.089	0.842	0.206	5.17	0.080

Tabla A 2.34 Análisis de varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) SS					
Tiempo(D)	6.005	3	2.002	17.63	0.0000
NaCl (S)	19.738	1	19.738	173.81	0.0000
D× S	14.347	3	4.782	42.11	0.0000
Error	2.725	24	0.114		
Total	42.816	31			
b) IA					
Tiempo(D)	0.1999	3	0.0666	4.42	0.0131
NaCl (S)	0.1610	1	0.1610	10.68	0.0033
D× S	0.0967	3	0.0322	2.14	0.1218
Error	0.3617	24	0.0151		
Total	0.8193	31			

Apéndice

c) HK					
Tiempo(D)	55.88	3	18.628	13.59	0.0000
NaCl (S)	68.15	1	68.1531	49.71	0.0000
D× S	31.29	3	10.4291	7.61	0.0010
Error	32.91	24	1.37113		
Total	188.23	31			
d) PEPC					
Tiempo(D)	14.6443	3	4.8814	61.45	0.0000
NaCl (S)	0.0041	1	0.0041	0.05	0.8224
D× S	0.2818	3	0.0939	1.18	0.3372
Error	1.9065	24	0.0794		
Total	16.8367	31			
e) IDH					
Tiempo(D)	5.6730	3	1.8910	154.51	0.0000
NaCl (S)	0.0047	1	0.0047	0.39	0.5401
D× S	0.3292	3	0.1097	8.97	0.0004
Error	0.2937	24	0.0122		
Total	6.3007	31			
f) MDH					
Tiempo(D)	11171	3	3724	73.09	0.0000
NaCl (S)	508	1	508	9.97	0.0043
D× S	1238	3	413	8.10	0.0007
Error	1223	24	51		
Total	14140	31			

Tabla A 2.35 Actividad trehalosa-6 fosfato sintasa (TPS) expresada en nmol UDP g⁻¹ PFN min⁻¹, trehalosa-6 fosfato fosfatasa (TPP) en nmol P_i g⁻¹ PFN min⁻¹ y trehalasa (TRE) en nmol glucosa g⁻¹ PFN h⁻¹ en nódulos de *M. truncatula*

Tiempo(D)	NaCl	TPS	TPP	TRE
0	0	20.666 ^e	10.999 ^d	0.586 ^b
14	0	27.658 ^c	19.643 ^b	0.885 ^a
	50	24.317 ^d	17.835 ^b	0.815 ^a
21	0	44.932 ^a	23.314 ^a	0.815 ^a
	50	20.532 ^e	20.536 ^{ab}	0.570 ^b
28	0	40.282 ^b	16.071 ^c	0.454 ^c
	50	27.114 ^c	11.607 ^d	0.194 ^d
MDS (P ≤ 0.05)		1.274	2.997	0.098

Tabla A 2.36 Análisis de varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) TPS					
Tiempo(D)	899	3	299	46	0.0000
NaCl (S)	836	1	836	128	0.0000
D× S	723	3	241	37	0.0000
Error	155	24	6		
Total	2615	31			
b) TPP					
Tiempo(D)	430	3	143	11.96	0.0002
NaCl (S)	30	1	30	2.56	0.1292
D× S	15	3	5	0.44	0.7309
Error	191	16	12		
Total	668	23			
c) TRE					
Tiempo(D)	0.879	3	0.293	22.94	0.0000
NaCl (S)	0.123	1	0.123	9.67	0.0067
D× S	0.074	3	0.024	1.95	0.1629
Error	0.204	16	0.012		
Total	1.282	23			

Tabla A 2.37 Actividad trehalosa-6 fosfato sintasa (TPS) expresada en nmol UDP g⁻¹ PFN min⁻¹, trehalosa-6 fosfato fosfatasa (TPP) en nmol P_i g⁻¹ PFN min⁻¹ y trehalasa (TRE) en nmol glucosa g⁻¹ PFN h⁻¹ en nódulos de *L. japonicus*

Tiempo(D)	NaCl (mM)	TPS	TPP	TRE
0	0	5.675 ^d	64.571 ^d	1.202 ^e
14	0	6.450 ^c	72.143 ^c	1.772 ^b
	100	6.275 ^c	74.143 ^b	1.687 ^b
21	0	7.550 ^a	73.286 ^c	2.150 ^a
	100	6.975 ^b	90.476 ^a	1.144 ^e
28	0	7.625 ^a	89.714 ^a	1.580 ^c
	100	6.850 ^b	76.714 ^b	1.338 ^d
MDS (P ≤ 0.05)		0.305	2.912	0.141

Tabla A 2.38 Análisis de varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) TPS					
Tiempo(D)	14.021	3	4.674	26.79	0.0000
NaCl (S)	1.163	1	1.163	6.66	0.0164
D× S	0.761	3	0.254	1.45	0.2521
Error	4.188	24	0.174		
Total	20.132	31			

Apéndice

b) TPP

Tiempo(D)	1800	3	600	37.20	0.0000
NaCl (S)	19	1	19	1.19	0.2866
D× S	918	3	306	18.97	0.0000
Error	387	24	16		
Total	3125	31			

c) TRE

Tiempo(D)	1.316	3	0.439	11.70	0.0001
NaCl (S)	0.889	1	0.889	23.72	0.0001
D× S	1.267	3	0.422	11.27	0.0001
Error	0.899	24	0.037		
Total	4.372	31			

Tabla A 3.1 Peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de raíz (PSR), peso seco de planta (PSP) en mg planta⁻¹; y relación raíz parte aérea (RPA) en *M. truncatula*

NaCl(mM)	Val A(μM)	PSPA	PSR	PSP	RPA
0	0	235 ^a	87 ^b	328 ^a	0.369 ^b
	30	222 ^a	114 ^a	344 ^a	0.513 ^a
50	0	100 ^c	24 ^d	128 ^c	0.246 ^c
	30	123 ^b	45 ^c	174 ^b	0.372 ^b
MDS (P ≤ 0.05)		14	8	22	0.038

Tabla A 3.2 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) PSPA					
NaCl (S)	82204	1	82204	140.20	0.0000
Val A (V)	203	1	203	0.35	0.5629
S × V	1969	1	1969	3.36	0.0818
Error	11727	20	586		
Total	96104	23			
b) PSR					
NaCl (S)	26248	1	26248	132.46	0.0000
Val A (V)	3521	1	3521	17.77	0.0004
S × V	54	1	54	0.27	0.6064
Error	3963	20	198		
Total	33787	23			
d) PSP					
NaCl (S)	205073	1	205073	155.61	0.0000
Val A (V)	5530	1	5530	4.20	0.0539
S × V	1388	1	1388	1.05	0.3171
Error	26357	20	1318		
Total	238347	23			
e) R/PA					
NaCl (S)	0.104	1	0.104	25.81	0.0001
Val A (V)	0.109	1	0.109	27.00	0.0000
S × V	0.000	1	0.000	0.12	0.7348
Error	0.081	20	0.004		
Total	0.295	23			

Apéndice

Tabla A 3.3 Peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de raíz (PSR), peso seco de planta (PSP) en mg planta⁻¹; y relación raíz parte aérea (RPA) en *L. japonicus*

NaCl(mM)	Val A(μM)	PSPA	PSR	PSP	RPA
0	0	283 ^a	86 ^a	393 ^a	0.360 ^a
	30	251 ^b	70 ^b	334 ^b	0.281 ^{ab}
50	0	181 ^d	69 ^b	241 ^d	0.296 ^{ab}
	30	203 ^c	62 ^c	284 ^c	0.253 ^b
MDS (P ≤ 0.05)		6	2	11	0.078

Tabla A 3.4 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) PSPA					
NaCl (S)	27919	1	27919	297.77	0.0000
Val A (V)	124	1	124	1.32	0.2675
S × V	3544	1	3544	37.80	0.0000
Error	1500	16	94		
Total	33088	19			
b) PSR					
NaCl (S)	745	1	745	104.43	0.0000
Val A (V)	635	1	635	89.05	0.0000
S × V	118	1	118	16.53	0.0009
Error	114	16	7		
Total	1613	19			
d) PSP					
NaCl (S)	50874	1	50874	202.58	0.0000
Val A (V)	263	1	263	1.05	0.3215
S × V	12929	1	12929	51.48	0.0000
Error	4018	16	251		
Total	68083	19			
e) R/PA					
NaCl (S)	1.275E-	1	1.275E-	3.063	0.0954
Val A (V)	2.226E-	1	2.226E-	5.349	0.0315
S × V	1.888E-	1	1.888E-	0.454	0.5155
Error	8.324E-	20	4.162E-		
Total	1.201E-	23			

Tabla A 3.5 Actividad nitrogenasa aparente (ANA) y nitrogenasa total (ANT) expresadas en $\mu\text{mol H}_2 \text{g}^{-1} \text{PSN h}^{-1}$, tasa de fijación de nitrógeno (TFN) expresada en $\mu\text{mol N}_2 \text{g}^{-1} \text{PSN h}^{-1}$, contenido de leghemoglobina (Lb) en $\text{mg g}^{-1} \text{PFN}$, peso seco de nódulo (PSN) en mg planta^{-1} y peso normalizado de nódulo (PNN) en $\text{mg PSN mg}^{-1} \text{PSPA}$ en *M. truncatula*

NaCl(mM)	Val A(μM)	ANA	ANT	TFN	Lb	PSN	PNN
0	0	38.47 ^a	100.44 ^a	25.29 ^b	14.34 ^a	6.68 ^a	0.028 ^c
	30	35.54 ^a	113.95 ^a	28.71 ^a	13.06 ^b	6.90 ^a	0.031 ^c
50	0	17.02 ^c	101.36 ^a	29.99 ^a	3.71 ^c	4.90 ^b	0.049 ^a
	30	25.63 ^b	82.82 ^b	22.01 ^b	2.38 ^d	5.32 ^b	0.043 ^b
MDS (P ≤ 0.05)		5.15	16.35	3.53	0.50	0.76	0.003

Tabla A 3.6 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) ANA					
NaCl (S)	1475	1	1475	23.93	0.0001
Val A (V)	48	1	48	0.78	0.3862
S × V	200	1	200	3.24	0.0870
Error	1233	20	62		
Total	2956	23			
b) ANT					
NaCl (S)	1369	1	1369	1.95	0.1778
Val A (V)	38	1	38	0.05	0.8183
S × V	1541	1	1541	2.20	0.1540
Error	14037	20	702		
Total	16985	23			
c) TFN					
NaCl (S)	6	1	5.94	0.22	0.6432
Val A (V)	31	1	31.12	1.16	0.2944
S × V	195	1	195.12	7.27	0.0139
Error	537	2	26.85		
Total	769	2			
d) Lb					
NaCl (S)	10.22	1	10.22	3.02	0.1207
Val A (V)	4.28	1	4.28	1.26	0.2937
S × V	0.06	1	0.06	0.02	0.8967
Error	27.10	8	3.39		
Total	41.66	1			
e) PSN					
NaCl (S)	17.002	1	17.002	10.58	0.0040
Val A (V)	0.602	1	0.602	0.37	0.5475
S × V	0.060	1	0.060	0.04	0.8487
Error	32.137	2	1.607		
Total	49.800	2			

Apéndice

f) PNN					
NaCl (S)	0.00154	1	0.00154	52.13	0.0000
Val A (V)	0.00002	1	0.00002	0.77	0.3907
S × V	0.00013	1	0.00013	4.46	0.0475
Error	0.00059	2	0.00003		
Total	0.00229	2			

Tabla A 3.7 Actividad nitrogenasa aparente (ANA) y nitrogenasa total (ANT) expresadas en $\mu\text{mol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ PSN h}^{-1}$, tasa de fijación de nitrógeno (TFN) expresada en $\mu\text{mol N}_2 \text{ g}^{-1} \text{ PSN h}^{-1}$, contenido de leghemoglobina (Lb) en $\text{mg g}^{-1} \text{ PFN}$, peso seco de nódulo (PSN) en mg planta^{-1} y peso normalizado de nódulo (PNN) en $\text{mg PSN mg}^{-1} \text{ PSPA}$ en *L. japonicus*

NaCl(mM)	Val A(μM)	ANA	ANT	TFN	Lb	PSN	PNN
0	0	26.10 ^a	254.55 ^a	86.82 ^a	19.34 ^b	16.50 ^a	0.057 ^c
	30	25.81 ^a	229.99 ^b	69.54 ^b	20.39 ^{ab}	15.57 ^b	0.065 ^b
50	0	13.51 ^b	219.91 ^b	62.27 ^{bc}	21.04 ^{ab}	12.80 ^c	0.075 ^a
	30	14.61 ^b	193.73 ^c	59.69 ^c	22.38 ^a	15.13 ^b	0.077 ^a
MDS (P ≤ 0.05)		3.25	24.45	7.12	2.01	0.52	0.005

Tabla A 3.8 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) ANA					
NaCl (S)	845	1	844.57	43.55	0.0000
Val A (V)	1	1	1.12	0.06	0.8124
S × V	3	1	3.12	0.16	0.6926
Error	388	20	19.39		
Total	1237	23			
b) ANT					
NaCl (S)	7539	1	7539	4.82	0.0401
Val A (V)	3861	1	3861	2.47	0.1319
S × V	4	1	4	0.00	0.9605
Error	31296	20	1565		
Total	42700	23			
c) TFN					
NaCl (S)	1306	1	1306	8.57	0.0083
Val A (V)	919	1	919	6.03	0.0233
S × V	144	1	144	0.95	0.3422
Error	3047	20	152		
Total	5415	23			
d) Lb					
NaCl (S)	340.557	1	340.557	1062.64	0.0000
Val A (V)	5.115	1	5.115	15.96	0.0040
S × V	0.002	1	0.002	0.01	0.9426
Error	2.564	8	0.320		
Total	348.237	11			

e) PSN					
NaCl (S)	15.164	1	15.16	24.11	0.0002
Val A (V)	7.039	1	7.04	11.19	0.0041
S × V	3.030	1	3.03	4.82	0.0433
Error	10.062	16	0.63		
Total	35.295	19			
f) PNN					
NaCl (S)	0.00130	1	0.00130	19.43	0.0003
Val A (V)	0.00015	1	0.00015	2.25	0.1494
S × V	0.00004	1	0.00004	0.65	0.4307
Error	0.00134	20	0.00007		
Total	0.00283	23			

Tabla A 3.9 Actividad sacarosa sintasa (SS) en $\mu\text{mol NAD mg}^{-1}\text{prot h}^{-1}$, invertasa alcalina (IA) en $\text{nmol glucosa mg}^{-1}\text{prot h}^{-1}$, hexoquinasa (HK) en $\mu\text{mol NADP mg}^{-1}\text{prot h}^{-1}$, fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y malato deshidrogenasa (MDH) y en $\mu\text{mol NADH mg}^{-1}\text{prot h}^{-1}$ e isocitrato deshidrogenasa (ICDH) en $\mu\text{mol NADP mg}^{-1}\text{prot h}^{-1}$, en nódulos de *M. truncatula*

NaCl(mM)	Val A(μM)	SS	IA	HK	PEPC	MDH	ICDH
0	0	0.043 ^a	0.965 ^a	0.526 ^b	6.001 ^a	172.78 ^a	2.764 ^a
	30	0.041 ^a	0.921 ^b	0.494 ^c	4.507 ^b	140.58 ^c	2.570 ^b
50	0	0.017 ^b	0.462 ^c	0.490 ^c	2.331 ^c	147.57 ^b	2.479 ^c
	30	0.010 ^c	0.439 ^c	0.568 ^a	1.270 ^d	78.38 ^d	1.740 ^d
MDS (P ≤ 0.05)		0.002	0.038	0.022	0.739	3.65	0.078

Tabla A 3.10 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) SS					
NaCl (S)	0.003355	1	0.003355	348.68	0.0000
Val A (V)	0.000076	1	0.000076	7.87	0.0159
S × V	0.000024	1	0.000024	2.54	0.1369
Error	0.000115	12	0.000010		
Total	0.003571	15			
b) IA					
NaCl (S)	0.97083	1	0.9708	396.65	0.0000
Val A (V)	0.00442	1	0.0044	1.81	0.2038
S × V	0.00042	1	0.0004	0.17	0.6844
Error	0.02937	12	0.0024		
Total	1.00504	15			
c) HK					
SAL (S)	0.00153	1	0.0015	1.84	0.1999
Val A (V)	0.00206	1	0.0021	2.48	0.1414
S × V	0.01194	1	0.0119	14.38	0.0026
Error	0.00996	12	0.0008		
Total	0.02549	15			

Apéndice

d) PEPC					
NaCl (S)	47.707	1	47.707	51.78	0.0000
Val A (V)	0.188	1	0.188	0.20	0.6593
S × V	6.527	1	6.527	7.08	0.0207
Error	11.057	12	0.921		
Total	65.479	15			
e) MDH					
NaCl (S)	7641	1	7641	40.52	0.0000
Val A (V)	10280	1	10280	54.51	0.0000
S × V	1368	1	1368	7.25	0.0195
Error	2263	12	189		
Total	21553	15			
f) ICDH					
NaCl (S)	2.484	1	2.484	121.45	0.0000
Val A (V)	1.742	1	1.742	85.17	0.0000
S × V	0.592	1	0.592	28.94	0.0002
Error	0.246	12	0.021		
Total	5.064	15			

Tabla A 3.11 Actividad sacarosa sintasa (SS) en $\mu\text{mol NAD mg}^{-1}\text{prot h}^{-1}$, invertasa alcalina (IA) en $\text{nmol glucosa mg}^{-1}\text{prot h}^{-1}$, hexoquinasa (HK) en $\mu\text{mol NADP mg}^{-1}\text{prot h}^{-1}$, fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y malato deshidrogenasa (MDH) y en $\mu\text{mol NADH mg}^{-1}\text{prot h}^{-1}$ e isocitrato deshidrogenasa (ICDH) en $\mu\text{mol NADP mg}^{-1}\text{prot h}^{-1}$, en nódulos de *L. japonicus*

NaCl(mM)	Val A(μM)	SS	IA	HK	PEPC	MDH	ICDH
0	0	0.179 ^a	1.565 ^a	0.886 ^a	5.180 ^a	222.10 ^a	3.160 ^b
	30	0.128 ^b	1.426 ^b	0.623 ^c	4.410 ^b	214.61 ^a	3.626 ^a
50	0	0.100 ^c	0.507 ^c	0.787 ^b	3.904 ^c	197.27 ^a	2.796 ^d
	30	0.107 ^c	0.555 ^c	0.803 ^b	3.839 ^c	163.82 ^b	2.988 ^c
MDS ($P \leq 0.05$)		0.014	0.060	0.023	0.382	31.43	0.081

Tabla A 3.12 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) SS					
NaCl (S)	0.01020	1	0.01020	161.19	0.0000
Val A (V)	0.00194	1	0.00194	30.60	0.0001
S × V	0.00330	1	0.00330	52.20	0.0000
Error	0.00076	12	0.00006		
Total	0.01619	15			
b) IA					
NaCl (S)	2.7924	1	2.7924	1406.47	0.0000
Val A (V)	0.0061	1	0.0061	3.07	0.1179
S × V	0.0264	1	0.0264	13.30	0.0065
Error	0.0159	8	0.0020		
Total	2.8407	11			

c) HK					
NaCl (S)	0.0066	1	0.0066	6.84	0.0225
Val A (V)	0.0610	1	0.0610	63.06	0.0000
S × V	0.0781	1	0.0781	80.77	0.0000
Error	0.0116	12	0.0010		
Total	0.1572	15			
d) PEPC					
NaCl (S)	3.413	1	3.413	13.81	0.0029
Val A (V)	0.698	1	0.698	2.82	0.1187
S × V	0.497	1	0.497	2.01	0.1818
Error	2.966	12	0.247		
Total	7.573	15			
e) MDH					
NaCl (S)	5717	1	5717	3.44	0.0885
Val A (V)	1677	1	1677	1.01	0.3353
S × V	674	1	674	0.41	0.5365
Error	19967	12	1664		
Total	28035	15			
f) ICDH					
NaCl (S)	1.0040	1	1.0040	90.48	0.0000
Val A (V)	0.4326	1	0.4326	38.99	0.0000
S × V	0.0754	1	0.0754	6.79	0.0230
Error	0.1332	12	0.0111		
Total	1.6452	15			

Tabla A 3.13 Actividad trehalosa-6 fosfato sintasa (TPS) expresada en nmol UDP mg⁻¹ prot min⁻¹, trehalosa-6 fosfato fosfatasa (TPP) en nmol P_i mg⁻¹ prot min⁻¹ y trehalasa (TRE) en nmol glucosa mg⁻¹ prot h⁻¹ en nódulos de *M. truncatula*

NaCl(mM)	Val A(μM)	TPS	TPP	TRE
0	0	1.251 ^a	4.252 ^a	0.376 ^a
	30	1.162 ^b	2.162 ^c	0.100 ^c
50	0	0.638 ^d	3.506 ^b	0.272 ^b
	30	0.723 ^c	1.756 ^d	0.070 ^d
MDS (P ≤ 0.05)		0.085	0.101	0.014

Tabla A 3.14 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) TPS					
NaCl (S)	0.82942	1	0.82942	100.35	0.0000
Val A (V)	0.00001	1	0.00001	0.00	0.9767
S × V	0.02265	1	0.02265	2.74	0.1364
Error	0.06612	8	0.00826		
Total	0.91820	11			

Apéndice

b) TPP					
NaCl (S)	1.328	1	1.328	176.33	0.0000
Val A (V)	14.750	1	14.750	1958.49	0.0000
S × V	0.116	1	0.116	15.34	0.0020
Error	0.090	12	0.008		
Total	16.284	15			
c) TRE					
NaCl (S)	0.0180	1	0.01805	51.71	0.0000
Val A (V)	0.2289	1	0.22894	655.84	0.0000
S × V	0.0055	1	0.00546	15.64	0.0019
Error	0.0042	12	0.00035		
Total	0.2566	15			

Tabla A 3.15 Actividad trehalosa-6 fosfato sintasa (TPS) expresada en nmol UDP mg⁻¹ prot min⁻¹, trehalosa-6 fosfato fosfatasa (TPP) en nmol P_i mg⁻¹ prot min⁻¹ y trehalasa (TRE) en nmol glucosa mg⁻¹ prot h⁻¹ en nódulos de *L. japonicus*

NaCl(mM)	Val A(μM)	TPS	TPP	TRE
	0	0.381 ^{ab}	7.167 ^a	2.963 ^a
0	30	0.413 ^a	7.135 ^a	1.127 ^c
	0	0.305 ^{ab}	4.848 ^b	2.644 ^b
50	30	0.301 ^b	3.926 ^b	0.851 ^d
MDS (P ≤ 0.05)		0.085	1.732	0.021

Tabla A 3.16 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) TPS					
NaCl (S)	0.02625	1	0.02625	9.13	0.0165
Val A (V)	0.00060	1	0.00060	0.21	0.6603
S × V	0.00097	1	0.00097	0.34	0.5774
Error	0.02300	8	0.00288		
Total	0.05082	11			
b) TPP					
NaCl (S)	30.555	1	30.555	6.17	0.0287
Val A (V)	0.909	1	0.909	0.18	0.6757
S × V	0.790	1	0.790	0.16	0.6965
Error	59.388	12	4.949		
Total	91.642	15			
c) TRE					
NaCl (S)	0.2654	1	0.26540	534	0.0000
Val A (V)	9.8787	1	9.87873	19888	0.0000
S × V	0.0014	1	0.00138	2.79	0.1336
Error	0.0040	8	0.00050		
Total	10.1495	11			

Tabla A 3.17 Contenido de sacarosa, fructosa, glucosa, y trehalosa expresado en $\mu\text{g g}^{-1}$ PFN y de azúcares solubles totales (Ast) y almidón (Alm) en mg glucosa g^{-1} PF en hoja de *M. truncatula*

NaCl(mM)	Val A(μM)	Sacarosa	Fructosa	Glucosa	Trehalosa	Ast	Alm
0	0	308.15 ^c	551.67 ^c	242.06 ^d	3.47 ^c	7.81 ^d	1.60 ^d
	30	142.85 ^d	546.28 ^c	317.17 ^c	3.85 ^{ab}	8.91 ^c	3.22 ^c
50	0	540.03 ^b	653.98 ^b	386.89 ^b	3.70 ^b	13.26 ^a	10.53 ^a
	30	780.04 ^a	1206.26 ^a	762.82 ^a	4.07 ^a	11.40 ^b	6.76 ^b
MDS ($P \leq 0.05$)		86.32	61.04	31.75	0.30	1.56	0.33

Tabla A 3.18 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Sacarosa					
NaCl (S)	5.66E+05	1	5.66E+05	67.01	0.0000
Val A (V)	4.19E+03	1	4.19E+03	0.50	0.5015
S \times V	1.23E+05	1	1.23E+05	14.58	0.0051
Error	6.76E+04	8	8.45E+03		
Total	7.61E+05	11			
b) Fructosa					
NaCl (S)	4.36E+05	1	4.36E+05	102.01	0.0000
Val A (V)	2.24E+05	1	2.24E+05	52.51	0.0001
S \times V	2.33E+05	1	2.33E+05	54.60	0.0001
Error	3.42E+04	8	4.27E+03		
Total	9.28E+05	11			
c) Glucosa					
NaCl (S)	2.62E+05	1	2.62E+05	245.53	0.0000
Val A (V)	1.53E+05	1	1.53E+05	143.26	0.0000
S \times V	6.79E+04	1	6.79E+04	63.72	0.0000
Error	8.52E+03	8	1.07E+03		
Total	4.90E+05	11			
d) Trehalosa					
NaCl (S)	0.159	1	0.1589	1.56	0.2475
Val A (V)	0.424	1	0.4238	4.15	0.0760
S \times V	0.000	1	0.0000	0.00	0.9932
Error	0.817	8	0.1021		
Total	1.399	11			
e) Ast					
NaCl (S)	47.351	1	47.351	17.19	0.0032
Val A (V)	0.432	1	0.432	0.16	0.7023
S \times V	6.553	1	6.553	2.38	0.1616
Error	22.042	8	2.755		
Total	76.379	11			

Apéndice

f) Alm					
NaCl (S)	116.580	1	116.580	931	0.0000
Val A (V)	3.487	1	3.487	28	0.0007
S × V	21.861	1	21.861	175	0.0000
Error	1.001	8	0.125		
Total	142.930	11			

Tabla A 3.19 Contenido de sacarosa, fructosa, glucosa, y trehalosa expresado en $\mu\text{g g}^{-1}$ PFN y de azúcares solubles totales (Ast) y almidón (Alm) en mg glucosa g^{-1} PF en raíz de *M. truncatula*

NaCl(mM)	Val A(μM)	Sacarosa	Fructosa	Glucosa	Trehalosa	Ast	Alm
0	0	681.10 ^b	483.52 ^b	398.45 ^a	3.15 ^b	9.16 ^c	0.657 ^b
	30	367.24 ^d	756.96 ^a	304.54 ^b	3.27 ^b	18.38 ^a	2.286 ^a
50	0	1057.14 ^a	390.87 ^c	230.62 ^b	3.41 ^b	4.69 ^d	0.405 ^b
	30	473.69 ^c	376.41 ^c	255.55 ^b	4.08 ^a	13.66 ^b	0.259 ^b
MDS ($P \leq 0.05$)		83.25	55.14	78.75	0.41	2.19	0.407

Tabla A 3.20 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Sacarosa					
NaCl (S)	1.75E+05	1	1.75E+05	22.60	0.0014
Val A (V)	6.04E+05	1	6.04E+05	78.18	0.0000
S × V	5.45E+04	1	5.45E+04	7.06	0.0290
Error	6.18E+04	8	7.72E+03		
Total	8.95E+05	11			
b) Fructosa					
NaCl (S)	1.68E+05	1	1.68E+05	48.37	0.0001
Val A (V)	5.03E+04	1	5.03E+04	14.49	0.0052
S × V	6.22E+04	1	6.22E+04	17.90	0.0029
Error	2.78E+04	8	3.47E+03		
Total	3.08E+05	11			
c) Glucosa					
NaCl (S)	3.53E+04	1	3.53E+04	5.18	0.0524
Val A (V)	3.57E+03	1	3.57E+03	0.52	0.4897
S × V	1.06E+04	1	1.06E+04	1.56	0.2475
Error	5.45E+04	8	6.81E+03		
Total	1.04E+05	11			
d) Trehalosa					
NaCl (S)	0.847	1	0.8475	4.49	0.0669
Val A (V)	0.458	1	0.4581	2.43	0.1578
S × V	0.225	1	0.2252	1.19	0.3064
Error	1.510	8	0.1887		
Total	3.040	11			

e) Ast					
NaCl (S)	63.449	1	63.449	11.67	0.0091
Val A (V)	248.214	1	248.214	45.66	0.0001
S × V	0.046	1	0.046	0.01	0.9287
Error	43.485	8	5.436		
Total	355.194	11			
f) Alm					
NaCl (S)	3.892	1	3.892	20.76	0.0019
Val A (V)	1.651	1	1.651	8.81	0.0179
S × V	2.364	1	2.364	12.61	0.0075
Error	1.499	8	0.187		
Total	9.405	11			

Tabla A 3.21 Contenido de sacarosa, fructosa, glucosa, y trehalosa expresado en $\mu\text{g g}^{-1}$ PFN y de azúcares solubles totales (Ast) y almidón (Alm) en mg glucosa g^{-1} PF en **nódulo de *M. truncatula***

NaCl(mM)	Val A(μM)	Sacarosa	Fructosa	Glucosa	Trehalosa	Ast	Alm
0	0	2401.63 ^a	332.35 ^a	789.80 ^a	29.13 ^c	15.53 ^a	8.49 ^b
	30	1545.60 ^b	297.77 ^a	778.17 ^a	108.37 ^a	10.13 ^b	1.89 ^c
50	0	1166.08 ^d	185.19 ^b	452.25 ^b	28.16 ^c	12.14 ^b	10.76 ^a
	30	1495.90 ^c	181.76 ^b	442.29 ^b	73.15 ^b	13.88 ^a	1.26 ^c
MDS ($P \leq 0.05$)		90.64	37.67	76.54	5.32	2.15	0.71

Tabla A 3.22 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Sacarosa					
NaCl (S)	161994	1	161994	34.65	0.0004
Val A (V)	198722	1	198722	42.51	0.0002
S × V	13226	1	13226	2.83	0.1311
Error	37401	8	4675		
Total	411343	11			
b) Fructosa					
NaCl (S)	52321	1	52321	34.23	0.0004
Val A (V)	1030	1	1030	0.67	0.4354
S × V	684	1	684	0.45	0.5224
Error	12230	8	1529		
Total	66265	11			
c) Glucosa					
NaCl (S)	340017	1	340017	51.86	0.0001
Val A (V)	353	1	353	0.05	0.8224
S × V	2	1	2	0.00	0.9853
Error	52456	8	6557		
Total	392828	11			

Apéndice

d) Trehalosa

NaCl (S)	981	1	981	33.12	0.0004
Val A (V)	11571	1	11571	390.66	0.0000
S × V	878	1	878	29.66	0.0006
Error	237	8	30		
Total	13667	11			

e) Ast

NaCl (S)	0.098	1	0.098	0.02	0.8944
Val A (V)	10.052	1	10.052	1.92	0.2029
S × V	38.248	1	38.248	7.32	0.0269
Error	41.815	8	5.227		
Total	90.213	11			

f) Alm

NaCl (S)	2.011	1	2.011	3.49	0.0989
Val A (V)	194.389	1	194.389	336.88	0.0000
S × V	6.317	1	6.317	10.95	0.0107
Error	4.616	8	0.577		
Total	207.332	11			

Tabla A 3.23 Contenido de sacarosa, fructosa, glucosa, y trehalosa expresado en $\mu\text{g g}^{-1}$ PFN y de azúcares solubles totales (Ast) y almidón (Alm) en mg glucosa g^{-1} PF en hoja de *L. japonicus*

NaCl(mM)	Val A(μM)	Sacarosa	Fructosa	Glucosa	Trehalosa	Ast	Alm
0	0	784.05 ^a	783.03 ^a	1770.62 ^b	10.10 ^a	18.61 ^a	22.29 ^b
	30	239.25 ^c	706.67 ^b	2155.10 ^a	9.18 ^a	13.22 ^c	17.75 ^c
50	0	746.08 ^a	446.64 ^c	1318.41 ^c	9.76 ^a	15.93 ^b	34.06 ^a
	30	552.92 ^b	703.64 ^b	2155.50 ^a	10.55 ^a	13.91 ^c	12.88 ^d
MDS (P ≤ 0.05)		107.69	66.85	99.35	2.21	1.92	1.62

Tabla A 3.24 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Sacarosa					
NaCl (S)	57006	1	57006	4.40	0.0692
Val A (V)	408440	1	408440	31.53	0.0005
S × V	92736	1	92736	7.16	0.0281
Error	103633	8	12954		
Total	661814	11			
b) Fructosa					
NaCl (S)	86403	1	86403	17.57	0.0030
Val A (V)	24473	1	24473	4.98	0.0562
S × V	83343	1	83343	16.94	0.0034
Error	39348	8	4919		
Total	233566	11			

c) Glucosa					
NaCl (S)	153094	1	153094	13.74	0.0060
Val A (V)	1119160	1	1119160	100.42	0.0000
S × V	153644	1	153644	13.79	0.0059
Error	89158	8	11145		
Total	1515060	11			
d) Trehalosa					
NaCl (S)	0.786	1	0.7863	0.14	0.7149
Val A (V)	0.010	1	0.0105	0.00	0.9662
S × V	2.191	1	2.1907	0.40	0.5452
Error	43.915	8	5.4894		
Total	46.903	11			
e) Ast					
NaCl (S)	2.859	1	2.859	0.69	0.4312
Val A (V)	40.807	1	40.807	9.80	0.0140
S × V	8.896	1	8.896	2.14	0.1819
Error	33.299	8	4.162		
Total	85.862	11			
f) Alm					
NaCl (S)	35.776	1	35.776	12.080	0.0084
Val A (V)	495.883	1	495.883	167.400	0.0000
S × V	207.523	1	207.523	70.060	0.0000
Error	23.698	8	2.962		
Total	762.880	11			

Tabla A 3.25 Contenido de sacarosa, fructosa, glucosa, y trehalosa expresado en $\mu\text{g g}^{-1}$ PFN y de azúcares solubles totales (Ast) y almidón (Alm) en mg glucosa g^{-1} PF en raíz de *L. japonicus*

NaCl(mM)	Val A(μM)	Sacarosa	Fructosa	Glucosa	Trehalosa	Ast	Alm
0	0	584.11 ^c	600.62 ^a	413.20 ^{ab}	2.09 ^b	5.66 ^c	1.99 ^c
	30	432.09 ^d	554.57 ^{ab}	394.29 ^b	3.51 ^{ab}	2.72 ^d	1.07 ^d
50	0	1273.02 ^a	544.17 ^{ab}	451.40 ^a	3.85 ^a	7.96 ^a	9.50 ^a
	30	813.75 ^b	503.32 ^b	431.10 ^{ab}	3.57 ^{ab}	6.56 ^b	6.87 ^b
MDS ($P \leq 0.05$)		186.27	66.26	54.05	1.70	0.61	0.18

Tabla A 3.26 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Sacarosa					
NaCl (S)	859577	1	859577	21.91	0.0016
Val A (V)	280252	1	280252	7.14	0.0282
S × V	70806	1	70806	1.81	0.2160
Error	313811	8	39226		
Total	1524450	11			

Apéndice

b) Fructosa					
NaCl (S)	8699	1	8699	1.78	0.2188
Val A (V)	5663	1	5663	1.16	0.3130
S × V	20	1	20	0.00	0.9502
Error	39086	8	4886		
Total	53468	11			
c) Glucosa					
NaCl (S)	4220	1	4220	1.30	0.2877
Val A (V)	1153	1	1153	0.35	0.5680
S × V	1.43	1	1.43	0.00	0.9838
Error	26029	8	3254		
Total	31404	11			
d) Trehalosa					
NaCl (S)	2.511	1	2.5108	4.06	0.0787
Val A (V)	0.986	1	0.9856	1.59	0.2424
S × V	2.166	1	2.1658	3.50	0.0982
Error	4.948	8	0.6185		
Total	10.610	11			
e) Ast					
NaCl (S)	28.338	1	28.338	67.01	0.0000
Val A (V)	14.120	1	14.120	33.39	0.0004
S × V	1.771	1	1.771	4.19	0.0749
Error	3.383	8	0.423		
Total	47.612	11			
f) Alm					
NaCl (S)	132.880	1	132.880	3529.010	0.0000
Val A (V)	9.455	1	9.455	251.100	0.0000
S × V	2.173	1	2.173	57.720	0.0001
Error	0.301	8	0.038		
Total	144.809	11			

Tabla A 3.27 Contenido de sacarosa, fructosa, glucosa, y trehalosa expresado en $\mu\text{g g}^{-1}$ PFN y de azúcares solubles totales (Ast) y almidón (Alm) en mg glucosa g^{-1} PF en **nódulo** de *L. japonicus*

NaCl(mM)	Val A(μM)	Sacarosa	Fructosa	Glucosa	Trehalosa	Ast	Alm
0	0	392.68 ^b	202.30 ^b	80.31 ^b	85.37 ^c	6.30 ^d	3.19 ^a
	30	201.70 ^c	147.08 ^c	148.83 ^a	1078.88 ^a	17.7 ^a	1.96 ^b
50	0	691.45 ^a	276.37 ^a	46.50 ^d	132.47 ^c	9.86 ^c	1.59 ^c
	30	397.68 ^b	224.94 ^b	60.17 ^c	589.02 ^b	12.7 ^b	0.77 ^d
MDS ($P \leq 0.05$)		64.92	24.06	5.87	85.42	0.46	0.12

Tabla A 3.28. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Sacarosa					
NaCl (S)	1.510E+06	1	1509520	164.53	0.0000
Val A (V)	2.635E+05	1	263541	28.73	0.0007
S × V	1.055E+06	1	1054510	114.94	0.0000
Error	7.340E+04	8	9175		
Total	2.90096E6	11			
b) Fructosa					
NaCl (S)	8535	1	8535	12.65	0.0074
Val A (V)	17305	1	17305	25.64	0.0010
S × V	11	1	10.58	0.02	0.9035
Error	5400	8	675		
Total	31251	11			
c) Glucosa					
NaCl (S)	11250	1	11250.10	433.95	0.0000
Val A (V)	5065	1	5065.37	195.38	0.0000
S × V	1741	1	1741.10	67.16	0.0000
Error	207	8	25.93		
Total	18264	11			
d) Trehalosa					
NaCl (S)	147032	1	147032	17.82	0.0029
Val A (V)	1577020	1	1577020	191.13	0.0000
S × V	216250	1	216250	26.21	0.0009
Error	66007	8	8251		
Total	2006310	11			
e) Ast					
NaCl (S)	2.833	1	2.833	0.98	0.3513
Val A (V)	122.707	1	122.707	42.42	0.0002
S × V	27.102	1	27.102	9.37	0.0156
Error	23.141	8	2.893		
Total	175.782	11			
f) Alm					
NaCl (S)	5.878	1	5.878	370.57	0.0000
Val A (V)	3.163	1	3.163	199.43	0.0000
S × V	0.124	1	0.124	7.83	0.0232
Error	0.127	8	0.016		
Total	9.292	11			

Apéndice

Tabla A 3.29 Fluorescencia inicial (F_0), relación fluorescencia inicial fluorescencia máxima (F_0/F_m), fluorescencia máxima (F_m) y relación fluorescencia variable fluorescencia máxima (F_v/F_m) en hojas de *M truncatula*

NaCl	Val A(μ M)	F_0	F_0/F_m	F_m	F_v/F_m
	0	109 ^c	0.148 ^c	736 ^c	0.851 ^a
0	30	122 ^b	0.154 ^c	789 ^a	0.846 ^a
	0	128 ^a	0.163 ^b	784 ^a	0.836 ^b
50	30	129 ^a	0.170 ^a	757 ^b	0.830 ^b
MDS ($P \leq 0.05$)		3	0.006	20	0.006

Tabla A 3.30 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) F_0					
NaCl (S)	975	1	975	44.69	0.0000
Val A (V)	273	1	273	12.53	0.0021
S \times V	198	1	198	9.09	0.0068
Error	437	20	22		
Total	1884	23			
b) F_0/F_m					
NaCl (S)	0.001445	1	0.001445	15.70	0.0008
Val A (V)	0.000240	1	0.000240	2.61	0.1217
S \times V	0.000001	1	0.000001	0.02	0.9004
Error	0.001841	20	0.000092		
Total	0.003528	23			
c) F_m					
NaCl (S)	1053	1	1053	0.91	0.3514
Val A (V)	392	1	392	0.34	0.5670
S \times V	9401	1	9401	8.12	0.0099
Error	23145	20	1157		
Total	33991	23			
d) F_v/F_m					
NaCl (S)	0.001426	1	0.001426	15.46	0.0008
Val A (V)	0.000234	1	0.000234	2.54	0.1266
S \times V	0.000002	1	0.000002	0.02	0.8832
Error	0.001845	20	0.000092		
Total	0.003508	23			

Tabla A 3.31 Fluorescencia inicial (F_0), relación fluorescencia inicial fluorescencia máxima (F_0/F_m), fluorescencia máxima (F_m) y relación fluorescencia variable fluorescencia máxima (F_v/F_m) en hojas de *L. japonicus*

NaCl	Val A(μ M)	F_0	F_0/F_m	F_m	F_v/F_m
0	0	130 ^a	0.153 ^c	845 ^a	0.846 ^a
	30	134 ^a	0.162 ^b	826 ^a	0.838 ^b
50	0	100 ^c	0.169 ^a	595 ^c	0.830 ^c
	30	118 ^b	0.163 ^b	720 ^b	0.837 ^b
MDS ($P \leq 0.05$)		10	0.004	53	0.004

Tabla A 3.32 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) F_0					
NaCl (S)	4163	1	4163	11.56	0.0020
Val A (V)	926	1	926	2.57	0.1200
S \times V	326	1	326	0.91	0.3495
Error	10083	28	360		
Total	15499	31			
b) F_0/F_m					
NaCl (S)	0.000560	1	0.000560	9.14	0.0053
Val A (V)	0.000014	1	0.000014	0.23	0.6347
S \times V	0.000434	1	0.000434	7.08	0.0128
Error	0.001715	28	0.000061		
Total	0.002723	31			
c) F_m					
NaCl (S)	255664	1	255664	23.45	0.0000
Val A (V)	22548	1	22548	2.07	0.1615
S \times V	41369	1	41369	3.79	0.0615
Error	305303	28	10904		
Total	624883	31			
d) F_v/F_m					
NaCl (S)	0.000584	1	0.000584	9.47	0.0046
Val A (V)	0.000010	1	0.000010	0.16	0.6907
S \times V	0.000455	1	0.000455	7.39	0.0111
Error	0.001726	28	0.000062		
Total	0.002776	31			

Tabla A 3.33 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla 3.1 **Pigmentos fotosintéticos *M. truncatula***

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Ca					
NaCl (S)	152558	1	152558	6696	0.0000
Val A (V)	6031	1	6031	265	0.0000
S × V	56946	1	56946	2499	0.0000
Error	182	8	23		
Total	215716	11			
b) Cb					
NaCl (S)	15967	1	15967.10	5743	0.0000
Val A (V)	706	1	705.72	254	0.0000
S × V	5979	1	5978.59	2150	0.0000
Error	22	8	2.78		
Total	22674	11			
c) Ca/b					
NaCl (S)	0.1048	1	0.1048	80.43	0.0000
Val A (V)	0.0134	1	0.0134	10.30	0.0124
S × V	0.0471	1	0.0471	36.16	0.0003
Error	0.0104	8	0.0013		
Total	0.1758	11			
d) X+C					
NaCl (S)	6731	1	6731.13	733	0.0000
Val A (V)	455	1	455.08	50	0.0001
S × V	3466	1	3466.49	378	0.0000
Error	73	8	9.18		
Total	10726	11			
e) PT					
NaCl (S)	358790	1	358790	6457	0.0000
Val A (V)	15764	1	15764	284	0.0000
S × V	140499	1	140499	2529	0.0000
Error	444	8	56		
Total	515497	11			

Tabla A 3.34 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla 3.2 **Pigmentos fotosintéticos *L. japonicus***

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Ca					
NaCl (S)	368672	1	368672	717.31	0.0000
Val A (V)	2699	1	2699	5.25	0.0511
S × V	52616	1	52616	102.37	0.0000
Error	4112	8	514		
Total	428099	11			
b) Cb					
NaCl (S)	19680	1	19680	71.16	0.0000
Val A (V)	668	1	668	2.42	0.1588
S × V	5237	1	5237	18.94	0.0024
Error	2212	8	277		
Total	27797	11			
c) Ca/b					
NaCl (S)	0.2715	1	0.2715	8.37	0.0201
Val A (V)	0.1487	1	0.1487	4.59	0.0646
S × V	0.0042	1	0.0042	0.13	0.7272
Error	0.2593	8	0.0324		
Total	0.6838	11			
d) X+C					
NaCl (S)	26495	1	26495	153.95	0.0000
Val A (V)	5	1	5	0.03	0.8657
S × V	319	1	319	1.85	0.2107
Error	1377	8	172		
Total	28196	11			
e) PT					
NaCl (S)	828536	1	828536	1269.16	0.0000
Val A (V)	807	1	807	1.24	0.2986
S × V	102146	1	102146	156.47	0.0000
Error	5223	8	653		
Total	936712	11			

Tabla A 3.35 Actividad sacarosa sintasa (SS) expresada en $\mu\text{mol NAD g}^{-1} \text{PFN h}^{-1}$, invertasa alcalina (IA) en $\text{nmol glucosa g}^{-1} \text{PFN h}^{-1}$, hexoquinasa (HK) en $\mu\text{mol NADP g}^{-1} \text{PFN h}^{-1}$, fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y malato deshidrogenasa (MDH) en $\mu\text{mol NADH g}^{-1} \text{PFN min}^{-1}$ e isocitrato deshidrogenasa (ICDH) en $\mu\text{mol NADP g}^{-1} \text{PFN min}^{-1}$, en nódulos de *M. truncatula*

NaCl(mM)	Val A(μM)	SS	IA	HK	PEPC	MDH	ICDH
0	0	3.907 ^a	1.266 ^a	47.351 ^a	8.410 ^a	322.43 ^a	10.316 ^a
	30	3.219 ^b	1.131 ^b	38.308 ^b	9.646 ^a	225.96 ^b	8.260 ^b
50	0	0.977 ^c	0.437 ^c	28.396 ^c	2.803 ^b	177.49 ^c	5.963 ^c
	30	0.458 ^d	0.364 ^d	25.900 ^d	1.990 ^b	122.75 ^d	5.450 ^d
MDS ($P \leq 0.05$)		0.203	0.046	1.307	1.263	13.75	0.250

Tabla A 3.36 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) SS					
NaCl (S)	32.39	1	32.391	468.03	0.0000
Val A (V)	1.45	1	1.454	21.01	0.0006
S × V	0.03	1	0.028	0.41	0.5331
Error	0.83	12	0.069		
Total	34.70	15			
b) IA					
NaCl (S)	2.545	1	2.5454	708.39	0.0000
Val A (V)	0.043	1	0.0430	11.96	0.0047
S × V	0.004	1	0.0040	1.11	0.3118
Error	0.043	12	0.0036		
Total	2.636	15			
c) HK					
NaCl (S)	983	1	983	341	0.0000
Val A (V)	133	1	133	46	0.0000
S × V	42	1	42	15	0.0023
Error	34	12	3		
Total	1194	15			
d) PEPC					
NaCl (S)	175.925	1	175.93	65.45	0.0000
Val A (V)	0.178	1	0.18	0.07	0.8012
S × V	4.202	1	4.20	1.56	0.2350
Error	32.255	12	2.69		
Total	212.560	15			
e) MDH					
NaCl (S)	61579	1	61579	205.08	0.0000
Val A (V)	22863	1	22863	76.14	0.0000
S × V	1741	1	1741	5.8	0.0331
Error	3603	12	300		
Total	89786	15			

f) ICDH					
NaCl (S)	51.300	1	51.30	487.23	0.0000
Val A (V)	6.596	1	6.60	62.65	0.0000
S × V	2.382	1	2.38	22.62	0.0005
Error	1.263	12	0.11		
Total	61.542	15			

Tabla A 3.37 Actividad sacarosa sintasa (SS) expresada en $\mu\text{mol NAD g}^{-1} \text{PFN h}^{-1}$, invertasa alcalina (IA) en $\text{nmol glucosa g}^{-1} \text{PFN h}^{-1}$, hexoquinasa (HK) en $\mu\text{mol NADP g}^{-1} \text{PFN h}^{-1}$, fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y malato deshidrogenasa (MDH) en $\mu\text{mol NADH g}^{-1} \text{PFN min}^{-1}$ e isocitrato deshidrogenasa (ICDH) en $\mu\text{mol NADP g}^{-1} \text{PFN min}^{-1}$, en nódulos de *L. japonicus*

NaCl(mM)	Val A(μM)	SS	IA	HK	PEPC	MDH	ICDH
0	0	8.079 ^a	1.193 ^a	43.842 ^a	3.215 ^c	137.86 ^c	2.488 ^d
	30	6.566 ^b	1.257 ^a	41.491 ^a	4.204 ^a	240.35 ^a	3.457 ^a
50	0	3.907 ^c	0.428 ^b	12.733 ^c	3.794 ^b	191.72 ^b	3.183 ^b
	30	4.938 ^c	0.501 ^b	36.825 ^b	3.625 ^b	127.41 ^c	2.822 ^c
MDS (P ≤ 0.05)		1.375	0.121	2.652	0.36	20.06	0.081

Tabla A 3.38 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) SS					
NaCl (S)	33.638	1	33.6381	42.231	0.0000
Val A (V)	0.233	1	0.2326	0.292	0.6045
S × V	6.473	1	6.4730	8.126	0.0146
Error	9.558	12	0.7965		
Total	49.902	15			
b) IA					
NaCl (S)	2.316	1	2.31636	377.021	0.0000
Val A (V)	0.019	1	0.01871	3.045	0.1065
S × V	0.000	1	0.00008	0.012	0.9143
Error	0.074	12	0.00614		
Total	2.409	15			
c) HK					
NaCl (S)	1279	1	1279	432	0.0000
Val A (V)	472	1	472	159	0.0000
S × V	699	1	699	236	0.0000
Error	35	12	3		
Total	2487	15			
d) PEPC					
NaCl (S)	0.000	1	0.000	0.00	1.0000
Val A (V)	0.672	1	0.672	3.04	0.1067
S × V	1.340	1	1.340	6.06	0.0299
Error	2.652	12	0.221		
Total	4.665	15			

Apéndice

e) MDH

NaCl (S)	3491	1	3491	5.07	0.0439
Val A (V)	1458	1	1458	2.12	0.1714
S × V	27823	1	27823	40.37	0.0000
Error	8269	12	689		
Total	41041	15			

f) ICDH

NaCl (S)	0.0036	1	0.0036	0.34	0.5727
Val A (V)	0.3683	1	0.3683	34.08	0.0001
S × V	1.7699	1	1.7699	163.77	0.0000
Error	0.1297	12	0.0108		
Total	2.2716	15			

Tabla A 3.39 Actividad trehalosa-6 fosfato sintasa (TPS) expresada en nmol UDP g⁻¹ PF min⁻¹, trehalosa-6 fosfato fosfatasa (TPP) en nmol P_i g⁻¹ PF min⁻¹ y trehalasa (TRE) en nmol glucosa g⁻¹ PF h⁻¹ en nódulos de *M. truncatula*

NaCl	Val A (μM)	TPS	TPP	TRE
	0	1.125 ^a	20.000 ^a	29.202 ^a
0	30	1.239 ^a	19.048 ^a	6.417 ^c
	0	0.784 ^b	14.881 ^a	20.821 ^b
50	30	0.616 ^c	7.381 ^b	4.452 ^d
MDS (P ≤ 0.05)		0.122	4.781	1.024

Tabla A 3.40 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) TPS					
NaCl (S)	0.6979	1	0.6979	41.22	0.0002
Val A (V)	0.0022	1	0.0022	0.13	0.7305
S × V	0.0594	1	0.0594	3.51	0.0980
Error	0.1354	8	0.0169		
Total	0.8948	11			
b) TPP					
NaCl (S)	282	1	281.760	7.31	0.0192
Val A (V)	71	1	71.443	1.85	0.1984
S × V	43	1	42.871	1.11	0.3124
Error	463	12	38.544		
Total	859	15			
c) TRE					
NaCl (S)	107	1	107.024	57.61	0.0000
Val A (V)	1533	1	1533.100	825.24	0.0000
S × V	41	1	41.174	22.16	0.0005
Error	22	12	1.858		
Total	1704	15			

Tabla A 3.41 Actividad trehalosa 6-fosfato sintasa (TPS) expresada en $\text{nmol UDP g}^{-1}\text{PF min}^{-1}$, trehalosa-6 fosfato fosfatasa (TPP) en $\text{nmol P}_i \text{g}^{-1} \text{PF min}^{-1}$ y trehalasa (TRE) en $\text{nmol glucosa g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ en nódulos de *L. japonicus*

NaCl	Val A (μM)	TPS	TPP	TRE
0	0	1.811 ^a	130.423 ^a	2.177 ^b
	30	1.317 ^b	63.638 ^c	1.021 ^c
50	0	1.290 ^b	107.672 ^b	2.404 ^a
	30	0.929 ^c	52.776 ^d	0.698 ^d
MDS ($P \leq 0.05$)		0.328	3.042	0.178

Tabla A 3.42 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) TPS					
NaCl (S)	0.731	1	0.731	4.040	0.0675
Val A (V)	0.826	1	0.826	4.560	0.0539
S \times V	0.018	1	0.018	0.100	0.7593
Error	2.171	12	0.181		
Total	3.745	15			
b) TPP					
NaCl (S)	1128	1	1128	70.350	0.0000
Val A (V)	14808	1	14808	923.260	0.0000
S \times V	141	1	141	8.810	0.0118
Error	192	12	16		
Total	16271	15			
c) TRE					
NaCl (S)	0.009	1	0.00922	0.694	0.4297
Val A (V)	8.183	1	8.18293	616.059	0.0000
S \times V	0.303	1	0.30250	22.774	0.0005
Error	0.159	12	0.01328		
Total	8.654	15			

Apéndice

Tabla A 4.1 Peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de raíz (PSR), peso seco de planta (PSP) en mg planta⁻¹, y relación raíz/parte aérea (RPA), en plantas de *M. sativa*

Cepa	NaCl	PSPA	PSR	PSP	RPA
Parental	0	332 ^a	207 ^a	547 ^a	0.633 ^{ab}
	40	294 ^b	147 ^c	449 ^b	0.501 ^c
Ots-	0	234 ^c	155 ^c	399 ^c	0.704 ^a
	40	116 ^e	40 ^e	160 ^e	0.341 ^d
Mots-	0	236 ^c	180 ^b	421 ^{bc}	0.776 ^a
	40	161 ^d	52 ^e	219 ^d	0.316 ^d
Ots-	0	252 ^c	150 ^c	409 ^{bc}	0.598 ^b
	40	147 ^d	76 ^d	228 ^d	0.519 ^c
MDS (P ≤ 0.05)		26	20	42	0.076

Tabla A 4.2 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) PSPA					
NaCl (S)	183933	3	61311	22.86	0.0000
Cepa (C)	112016	1	112016	41.77	0.0000
SxC	15386	3	5129	1.91	0.1380
Error	150162	56	2681		
Total	461496	63			
b) PSR					
NaCl (S)	59246	3	19749	12.17	0.0000
Cepa (C)	143019	1	143019	88.14	0.0000
SxC	12499	3	4166	2.57	0.0635
Error	90864	56	1623		
Total	305628	63			
c) PSP					
NaCl (S)	0.461	3	0.1537	21.58	0.0000
Cepa (C)	0.517	1	0.5175	72.62	0.0000
SxC	0.043	3	0.0143	2.01	0.1226
Error	0.399	56	0.0071		
Total	1.421	63			
d) RPA					
NaCl (S)	0.018	3	0.0060	0.26	0.8562
Cepa (C)	1.067	1	1.0672	45.45	0.0000
SxC	0.396	3	0.1320	5.62	0.0019
Error	1.315	56	0.0235		
Total	2.796	63			

Tabla A 4.3 Actividad nitrogenasa aparente (ANA) y nitrogenasa total (ANT) expresadas en $\mu\text{mol H}_2 \text{g}^{-1}\text{PSN h}^{-1}$, tasa de fijación del nitrógeno (TFN) expresada en $\mu\text{mol N}_2 \text{g}^{-1}\text{PSN h}^{-1}$, peso seco de nódulo en mg planta^{-1} (PSN) y peso normalizado de nódulo (PNN) en mg PSN mg^{-1} PSPA en *M. sativa*

Cepa	NaCl	ANA	ANT	TFN	PSN	PNN
Parental	0	20.97 ^{cd}	116.54 ^c	31.85 ^b	8.35 ^a	0.026 ^d
	40	13.63 ^d	36.79 ^d	7.72 ^c	8.36 ^a	0.028 ^{cd}
Ots-	0	55.35 ^a	155.08 ^b	33.24 ^b	7.03 ^b	0.030 ^c
	40	21.60 ^c	43.61 ^d	7.34 ^c	4.08 ^e	0.035 ^b
Mots-	0	40.74 ^b	219.76 ^a	59.67 ^a	6.18 ^c	0.026 ^d
	40	28.88 ^c	122.17 ^c	31.06 ^b	5.19 ^d	0.032 ^{bc}
Mots Ots	0	50.31 ^a	153.21 ^b	29.30 ^b	6.36 ^c	0.027 ^{cd}
	40	11.39 ^d	25.99 ^d	4.87 ^c	5.86 ^c	0.040 ^a
MDS (P ≤ 0.05)		7.64	23.32	8.15	1.05	0.004

Tabla A 4.4 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) ANA					
NaCl (S)	1925	3	642	6.66	0.0020
Cepa (C)	4301	1	4301	44.63	0.0000
SxC	1150	3	383	3.98	0.0196
Error	2313	24	96		
Total	9690	31			
b) ANT					
NaCl (S)	45196	3	15065	14.53	0.0000
Cepa (C)	83222	1	83222	80.27	0.0000
SxC	2399	3	800	0.77	0.5215
Error	24884	24	1037		
Total	155700	31			
c) TFN					
NaCl (S)	4336	3	1445	11.56	0.0001
Cepa (C)	5520	1	5520	44.16	0.0000
SxC	34	3	11	0.09	0.9651
Error	3000	24	125		
Total	12890	31			
d) PSN					
NaCl (S)	82	3	27.430	6.25	0.0010
Cepa (C)	20	1	19.612	4.47	0.0390
SxC	20	3	6.728	1.53	0.2162
Error	246	56	4.391		
Total	368	63			

Apéndice

e) PNN					
NaCl (S)	0.000433	3	0.000144	2.53	0.0664
Cepa (C)	0.000650	1	0.000650	11.39	0.0014
SxC	0.000255	3	0.000085	1.49	0.2280
Error	0.003138	55	0.000057		
Total	0.004493	62			

Tabla A 4.5 Actividad sacarosa sintasa (SS) expresada en $\mu\text{mol NAD mg}^{-1}\text{prot h}^{-1}$, invertasa alcalina (IA) en $\text{nmol glucosa mg}^{-1}\text{prot h}^{-1}$, hexoquinasa (HK) en $\mu\text{mol NADP mg}^{-1}\text{prot h}^{-1}$, fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y malato deshidrogenasa (MDH) y en $\mu\text{mol NADH mg}^{-1}\text{prot h}^{-1}$ e isocitrato deshidrogenasa (ICDH) en $\mu\text{mol NADP mg}^{-1}\text{prot h}^{-1}$, en nódulos de *M. sativa*

Cepa	NaCl	SS	IA	HK	PEPC	MDH	ICDH
Parental	0	0.032 ^b	0.715 ^a	0.521 ^b	1.315 ^b	277.00 ^a	5.452 ^b
	40	0.034 ^b	0.587 ^b	0.538 ^a	1.389 ^a	192.87 ^d	6.014 ^a
Ots-	0	0.020 ^c	0.681 ^a	0.405 ^e	1.082 ^d	202.92 ^c	4.689 ^e
	40	0.011 ^d	0.431 ^d	0.423 ^d	1.241 ^c	156.98 ^e	4.710 ^e
Mots-	0	0.060 ^a	0.592 ^b	0.331 ^g	0.985 ^e	240.55 ^b	5.276 ^c
	40	0.012 ^d	0.359 ^e	0.459 ^c	0.843 ^g	120.54 ^f	3.304 ^g
Mots Ots	0	0.020 ^c	0.523 ^c	0.373 ^f	1.284 ^b	270.79 ^a	4.871 ^d
	40	0.010 ^d	0.128 ^f	0.383 ^f	0.912 ^f	120.08 ^f	3.534 ^f
MDS (P ≤ 0.05)		0.003	0.057	0.016	0.062	11.09	0.131

Tabla A 4.6 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) SS					
NaCl (S)	0.00310	3	0.001032	74.33	0.0000
Cepa (C)	0.00216	1	0.002158	155.42	0.0000
SxC	0.00298	3	0.000992	71.45	0.0000
Error	0.00033	24	0.000014		
Total	0.00856	31			
b) IA					
NaCl (S)	0.456	3	0.1520	24.52	0.0000
Cepa (C)	0.504	1	0.5042	81.33	0.0000
SxC	0.072	3	0.0241	3.88	0.0214
Error	0.149	24	0.0062		
Total	1.181	31			
c) HK					
NaCl (S)	0.113	3	0.037527	76.85	0.0000
Cepa (C)	0.015	1	0.015030	30.78	0.0000
SxC	0.019	3	0.006489	13.29	0.0000
Error	0.012	24	0.000488		
Total	0.159	31			

d) PEPC					
NaCl (S)	0.783	3	0.2609	35.74	0.0000
Cepa (C)	0.039	1	0.0395	5.41	0.0288
SxC	0.338	3	0.1127	15.44	0.0000
Error	0.175	24	0.0073		
Total	1.335	31			
e) MDH					
NaCl (S)	16011	3	5337	24.7	0.0000
Cepa (C)	80233	1	80233	371.28	0.0000
SxC	12255	3	4085	18.9	0.0000
Error	5186	24	216		
Total	113686	31			
f) ICDH					
NaCl (S)	10.507	3	3.502	117.71	0.0000
Cepa (C)	4.192	1	4.192	140.89	0.0000
SxC	7.468	3	2.489	83.66	0.0000
Error	0.714	24	0.030		
Total	22.882	31			

Tabla A 4.7 Actividad trehalosa-6 fosfato sintasa (TPS) expresada en $\text{mmol UDP mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$, trehalosa-6 fosfato fosfatasa (TPP) en $\text{nmol P}_i \text{ mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$ y trehalasa (TRE) en $\text{nmol glucosa mg}^{-1} \text{ prot h}^{-1}$, en nódulos de *M.sativa*

Cepa	NaCl	TPS	TPP	TRE
Parental	0	1.199 ^d	1.095 ^d	0.698 ^c
	40	2.973 ^a	0.861 ^e	0.665 ^c
Ots-	0	1.013 ^e	0.259 ^h	0.993 ^a
	40	0.000 ^f	0.644 ^f	0.458 ^d
Mots-	0	1.629 ^c	1.514 ^c	0.678 ^c
	40	2.918 ^a	3.930 ^a	0.230 ^f
Mots Ots	0	1.524 ^c	0.537 ^g	0.788 ^b
	40	1.851 ^b	3.314 ^b	0.312 ^e
MDS ($P \leq 0.05$)		0.150	0.086	0.046

Tabla A 4.8 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) TPS					
NaCl (S)	15.102	3	5.034	118.88	0.0000
Cepa (C)	2.825	1	2.825	66.71	0.0000
SxC	9.056	3	3.019	71.29	0.0000
Error	1.016	24	0.042		
Total	27.999	31			

Apéndice

b) TPP					
NaCl (S)	24.36	3	8.120	576	0.0000
Cepa (C)	14.28	1	14.281	1013	0.0000
SxC	13.23	3	4.409	313	0.0000
Error	0.34	24	0.014		
Total	52.21	31			
c) TRE					
NaCl (S)	0.370	3	0.1235	30.27	0.0000
Cepa (C)	1.113	1	1.1135	272.99	0.0000
SxC	0.315	3	0.1049	25.71	0.0000
Error	0.098	24	0.0041		
Total	1.896	31			

Tabla A 4.9 Contenido de fructosa, glucosa, sacarosa, maltosa, y trehalosa en $\mu\text{g g}^{-1}$ PFN en nódulos de *M. sativa*

Cepa	NaCl	Sacarosa	Maltosa	Fructosa	Glucosa	Trehalosa
Parental	0	1438.59 ^b	43.50 ^b	235.54 ^b	682.00 ^b	34.38 ^b
	40	959.63 ^c	32.15 ^c	147.49 ^c	621.53 ^b	23.31 ^d
Ots-	0	2708.27 ^a	57.79 ^a	322.37 ^a	822.03 ^a	27.08 ^c
	40	1268.60 ^b	42.92 ^b	242.33 ^b	459.13 ^c	24.50 ^c
Mots-	0	1372.38 ^b	34.84 ^c	245.89 ^b	497.14 ^c	24.82 ^c
	40	816.04 ^c	31.33 ^c	244.27 ^b	232.13 ^d	28.34 ^c
Mots	0	1388.39 ^b	34.79 ^c	242.73 ^b	271.24 ^d	41.81 ^a
	40	391.71 ^d	13.02 ^d	124.84 ^d	213.31 ^d	16.68 ^e
MDS (P ≤ 0.05)		189.01	4.56	20.14	94.32	4.24

Tabla A 4.10 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Sacarosa					
NaCl (S)	4.17E+06	3	1.39E+06	29.11	0.0000
Cepa (C)	4.52E+06	1	4.52E+06	94.77	0.0000
SxC	886736	3	295579	6.19	0.0054
Error	763408	16	47713		
Total	1.03E+07	23			
b) Maltosa					
NaCl (S)	2184	3	728	31.39	0.0000
Cepa (C)	995	1	995	42.90	0.0000
SxC	260	3	87	3.73	0.0331
Error	371	16	23		
Total	3809	23			

c) Fructosa					
NaCl (S)	39102	3	13034	23.95	0.0000
Cepa (C)	31062	1	31062	57.07	0.0000
SxC	11081	3	3694	6.79	0.0037
Error	8708	16	544		
Total	89954	23			
d) Glucosa					
NaCl (S)	749818	3	249939	21.24	0.0000
Cepa (C)	208712	1	208712	17.74	0.0007
SxC	104474	3	34825	2.96	0.0638
Error	188253	16	11766		
Total	1251260	23			
e) Trehalosa					
NaCl (S)	51	3	17	0.88	0.4727
Cepa (C)	466	1	466	23.91	0.0002
SxC	693	3	231	11.85	0.0002
Error	312	16	20		
Total	1523	23			

Tabla A 4.11 Actividad sacarosa sintasa (SS) expresada en $\mu\text{mol NAD mg}^{-1}\text{prot h}^{-1}$, invertasa alcalina (IA) en $\text{nmol glucosa mg}^{-1}\text{ prot h}^{-1}$, hexoquinasa (HK) en $\mu\text{mol NADP mg}^{-1}\text{ prot h}^{-1}$, fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y malato deshidrogenasa (MDH) y en $\mu\text{mol NADH mg}^{-1}\text{ prot h}^{-1}$ e isocitrato deshidrogenasa (ICDH) en $\mu\text{mol NADP mg}^{-1}\text{ prot h}^{-1}$, en nódulos de *M. sativa*

Cepa	NaCl	SS	IA	HK	PEPC	MDH	ICDH
Parental	0	1.543 ^b	0.565 ^a	25.141 ^a	1.435 ^a	302.25 ^a	5.949 ^b
	40	1.320 ^c	0.433 ^b	20.764 ^b	1.479 ^a	205.83 ^e	6.163 ^a
Ots-	0	0.916 ^d	0.458 ^b	18.991 ^c	1.194 ^c	224.87 ^d	5.173 ^d
	40	0.434 ^f	0.231 ^d	17.182 ^d	1.166 ^c	148.51 ^f	4.425 ^e
Mots-	0	2.195 ^a	0.441 ^b	12.046 ^f	1.065 ^d	260.05 ^c	5.703 ^c
	40	0.448 ^f	0.201 ^d	16.604 ^d	0.740 ^e	106.71 ^g	2.898 ^g
Mots	0	0.723 ^e	0.304 ^c	13.565 ^e	1.375 ^b	289.79 ^b	5.217 ^d
	40	0.271 ^g	0.060 ^e	10.852 ^g	0.800 ^e	105.30 ^g	3.099 ^f
MDS (P ≤ 0.05)		0.105	0.051	1.004	0.065	11.21	0.131

Tabla A 4.12 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) SS					
NaCl (S)	5.171	3	1.72351	84	0.0000
Cepa (C)	4.218	1	4.21789	205	0.0000
SxC	2.859	3	0.953006	46	0.0000
Error	0.494	24	0.0205923		
Total	12.742	31			

Apéndice

b) IA					
NaCl (S)	303428	3	101143	29.34	0.0000
Cepa (C)	267029	1	267029	77.46	0.0000
SxC	12461	3	4154	1.20	0.3398
Error	55155	16	3447		
Total	638073	23			
c) HK					
NaCl (S)	533	3	177.81	216	0.0000
Cepa (C)	9	1	9.42	11	0.0024
SxC	92	3	30.57	37	0.0000
Error	20	24	0.82		
Total	654	31			
d) PEPC					
NaCl (S)	1.282	3	0.427	54	0.0000
Cepa (C)	0.391	1	0.391	49	0.0000
SxC	0.487	3	0.162	20	0.0000
Error	0.192	24	0.008		
Total	2.352	31			
e) MDH					
NaCl (S)	26408	3	8803	36	0.0000
Cepa (C)	131102	1	131102	532	0.0000
SxC	15040	3	5013	20	0.0000
Error	5913	24	246		
Total	178462	31			
f) ICDH					
NaCl (S)	17.882	3	5.961	194	0.0000
Cepa (C)	14.889	1	14.889	484	0.0000
SxC	11.036	3	3.679	120	0.0000
Error	0.739	24	0.031		
Total	44.545	31			

Tabla A 4.13 Actividad trehalosa-6 fosfato sintasa (TPS) expresada en $\text{mmol UDP g}^{-1} \text{PF min}^{-1}$, trehalosa-6 fosfato fosfatasa (TPP) en $\text{nmol P}_i \text{g}^{-1} \text{PF min}^{-1}$ y trehalasa (TRE) expresada en $\text{nmol glucosa g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, en nódulos de *M. sativa*

Cepa	NaCl	TPS	TPP	TRE
Parental	0	1.049 ^e	28.570 ^c	0.553 ^b
	40	2.433 ^a	34.131 ^a	0.514 ^b
Ots-	0	0.918 ^f	6.673 ^g	0.668 ^a
	40	0.000 ^g	17.862 ^f	0.308 ^e
Mots-	0	1.306 ^d	25.005 ^d	0.505 ^c
	40	2.233 ^b	31.155 ^b	0.171 ^f
Mots Ots	0	1.608 ^c	23.172 ^e	0.458 ^d
	40	1.474 ^c	31.751 ^b	0.146 ^f
MDS ($P \leq 0.05$)		0.121	1.261	0.047

Tabla A 4.14 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) TPS					
NaCl (S)	9.250	3	3.083	112	0.0000
Cepa (C)	0.791	1	0.791	29	0.0000
SxC	6.474	3	2.158	79	0.0000
Error	0.659	24	0.027		
Total	17.174	31			
b) TPP					
NaCl (S)	1743	3	581	195	0.0000
Cepa (C)	495	1	495	166	0.0000
SxC	40	3	13	4	0.0129
Error	72	24	3		
Total	2350	31			
c) TRE					
NaCl (S)	228051	3	76017	25	0.0000
Cepa (C)	409644	1	409644	137	0.0000
SxC	100897	3	33632	11	0.0003
Error	47999	16	3000		
Total	786591	23			

Apéndice

Tabla A 6.1 Peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de raíz (PSR), peso seco de planta (PSP) en g planta⁻¹ y relación raíz/parte aérea (RPA), en plantas de *G. max*

NaCl (mM)	PSPA	PSR	PSP	RPA
0	1.706 ^a	0.437 ^a	2.241 ^a	0.255 ^b
100	0.555 ^b	0.237 ^b	0.830 ^b	0.433 ^a
MDS (P ≤ 0.05)	0.263	0.166	0.423	0.107

Tabla A 6.2 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) PSPA					
NaCl	2.648	1	2.648	114.55	0.0000
Error	0.139	6	0.023		
Total	2.787	7			
b) PSR					
NaCl	0.0798	1	0.0798	8.66	0.0259
Error	0.0553	6	0.0092		
Total	0.1351	7			
c) PSP					
NaCl	3.983	1	3.983	66.58	0.0002
Error	0.359	6	0.060		
Total	4.342	7			
d) RPA					
NaCl	0.0638	1	0.0638	16.67	0.0065
Error	0.0230	6	0.0038		
Total	0.0868	7			

Tabla A 6.3 Peso seco de nódulos (PSN) en g⁻¹ planta y peso normalizado de nódulos (PNN) en mg PSN mg⁻¹ PSPA en *G. max*

NaCl (mM)	PSN	PNN
0	0.099 ^a	0.058 ^a
100	0.038 ^b	0.068 ^a
MDS (P ≤ 0.05)	0.014	0.019

Tabla A 6.4 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) PSN					
NaCl	0.00740	1	0.0074014	109.59	0.0000
Error	0.00041	6	0.0000675		
Total	0.00781	7			
b) PNN					
NaCl	0.000196	1	0.000196	1.64	0.2482
Error	0.000718	6	0.000120		
Total	0.000913	7			

Tabla A 6.5 Actividad trehalosa-6 fosfato sintasa (TPS) expresada en nmol UDP mg⁻¹prot h⁻¹, maltooligosiltrehalosa sintasa (MOTS) y trehalosa sintasa (TS) expresadas en nmol trehalosa mg⁻¹ prot h⁻¹ en **bacteroides** de nódulos de **G. max**, y actividad trehalasa (TRE) expresada en nmol trehalosa mg⁻¹prot min⁻¹ en **citosol nodular** de **G. max**

NaCl (mM)	TPS	MOTS	TS	TRE
0	0.745 ^a	24.463 ^a	59.426 ^a	7.198 ^a
100	0.544 ^b	28.052 ^a	63.577 ^a	4.870 ^b
MDS (P ≤ 0.05)	0.190	5.004	4.643	0.824

Tabla A 6.6 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) TSP					
NaCl	0.0604	1	0.0604	8.56	0.0430
Error	0.0282	4	0.0071		
Total	0.0886	5			
b) MOTS					
NaCl	19.323	1	19.323	3.94	0.1181
Error	19.616	4	4.904		
Total	38.938	5			
c) TS					
NaCl	24.610	1	24.610	6.00	0.0706
Error	16.420	4	4.105		
Total	41.030	5			
d) TRE					
NaCl	8.128	1	8.128	61.49	0.0014
Error	0.528	4	0.132		
Total	8.657	5			

Tabla A 6.7 Actividad trehalosa-6 fosfato sintasa (TPS) expresada en nmol UDP mg⁻¹prot h⁻¹, maltooligosiltrehalosa sintasa (MOTS) y trehalosa sintasa (TS) expresadas en nmol trehalosa mg⁻¹ prot h⁻¹ en **B. japonicum** USDA 110

NaCl (mM)	TPS	MOTS	TS
0	19.714 ^b	1.232 ^b	39.221 ^a
40	31.156 ^a	2.200 ^a	46.941 ^a
MDS (P ≤ 0.05)	6.023	0.934	11.559

Apéndice

Tabla A 6.8 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) TSP					
NaCl	194.94	1	194.94	27.61	0.0063
Error	28.24	4	7.06		
Total	223.18	5			
b) MOTS					
NaCl	1.45	1	1.50	8.27	0.0452
Error	0.68	4	0.17		
Total	2.08	5			
c) TS					
NaCl	89.40	1	89.40	3.44	0.1373
Error	104.00	4	26.00		
Total	193.40	5			

Tabla A 6.9 Contenido de sacarosa, trehalosa maltosa y glucosa expresado en $\mu\text{g g}^{-1}$ PFN en nódulos de *G. max*

NaCl (mM)	Sacarosa	Trehalosa	Maltosa	Glucosa
0	914.92 ^b	163.44 ^b	224.63 ^a	563.24 ^a
100	1473.02 ^a	261.58 ^a	153.77 ^a	630.00 ^a
MDS (P ≤ 0.05)	259.08	85.23	87.18	131.55

Tabla A 6.10 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Sacarosa					
NaCl	468163	1	468163	35.70	0.0039
Error	52451	4	13113		
Total	520613	5			
b) Trehalosa					
NaCl	14504	1	14504	10.19	0.0332
Error	5695	4	1424		
Total	20199	5			
c) Maltosa					
NaCl	7562	1	7562	5.13	0.0861
Error	5892	4	1473		
Total	13454	5			
d) Glucosa					
NaCl	6868	1	6868	2.05	0.2252
Error	13383	4	3346		
Total	20252	5			



FACULTAD DE CIENCIAS

Grupo de Fijación de Nitrógeno

Departamento de Fisiología Vegetal

UNIVERSIDAD DE GRANADA