

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL



**Respuestas inducidas por ácido abscísico y ácido salicílico en
las simbiosis de judía y alfalfa en estrés salino**

Francisco José Palma Martín

TESIS DOCTORAL

Granada, 2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Francisco José Palma Martín
D.L.: GR. 3512-2009
ISBN: 978-84-692-6396-9

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL

Memoria para aspirar al Grado de Doctor
por el licenciado en Ciencias Biológicas
D. Francisco José Palma Martín

Directores:

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

Fdo: Noel Amaury Tejera García
Profesor Contratado Doctor
Facultad de Farmacia
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 de Unidad Asociada formada entre la Universidad de Granada y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas investigación del Ministerio de Ciencia e Innovación (convocatoria BOE 03/09/2004), asociada al proyecto titulado Fijación de nitrógeno en leguminosas de interés agrícola: mecanismos de respuesta a la salinidad (AGL2006-01279/AGR) y por el PAI de la Junta de Andalucía (Grupo AGR-139). Parte de los resultados presentados en esta Tesis Doctoral se han publicado en revistas internacionales (ISI), forman parte de capítulos de libro, y se han presentado en congresos y reuniones científicas.

***Publicaciones científicas:**

Tejera NA., Iribarne C., **Palma FJ.**, Lluch C.

Inhibition of the catalase activity from *Phaseolus vulgaris* and *Medicago sativa* by sodium chloride.

Plant Physiology and Biochemistry (2007) 45(8): 535-541.

Palma FJ., Lluch C., Iribarne C., García-Garrido JM., Tejera NA.

Combined effect of salicylic acid and salinity on some antioxidant activities, oxidative stress and metabolite accumulation in *Phaseolus vulgaris*.

Plant Growth Regulation (2009) 58: 307-316.

Palma FJ., Lluch C., Iribarne C., Tejera NA.

Different composition of polyamines in leaf, root and nodule of *Phaseolus vulgaris*: effect of salicylic acid and saline stress.

Journal Plant Growth Regulation (enviado).

***Capítulos de libro:**

Tejera NA., **Palma FJ.**, López M., Herrera-Cervera JA. y Lluch C.

Respuesta en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa a factores abióticos y nutricionales.

Nutrición mineral. Aspectos fisiológicos, agronómicos y ambientales. ISBN: 84-9769-165-2.

Palma FJ., Pieckenstein F., Iribarne C., Lluch C. y Tejera NA.

Respuesta en plántulas de *P. vulgaris* tratadas con NaCl y ácido salicílico.

Nutrición mineral. Aspectos fisiológicos, agronómicos y ambientales. ISBN: 84-9769-165-2.

Lluch C., Iribarne C., **Palma FJ.**, López M., y Tejera NA.
Integración de las hormonas vegetales en el establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. Pendiente de publicación.

Palma FJ., Iribarne C., López M., Tejera NA y Lluch C.
Estudio de la simbiosis *Sinorhizobium meliloti-Medicago sativa*: Fijación de nitrógeno y metabolismo carbonado en nódulos.
Presente y futuro de la nutrición mineral de las plantas. ISBN: 978-84-89780-10-7.

***Congresos y reuniones científicas:**

Palma FJ., Pieckenstein F., Iribarne C., Lluch C. y Tejera NA.
Adaptación al estrés salino en plántulas de *Phaseolus vulgaris*: Efecto del ácido salicílico.
XI Simposio Ibérico de nutrición mineral de las plantas.
Pamplona (España), 18-21 Julio de 2006.

Lluch C., **Palma FJ.**, Iribarne C. y Tejera NA.
Estrés salino en la simbiosis *Rhizobium*-Leguminosa: Respuestas inducidas por ácido abscísico y ácido salicílico.
XXIII Reunión Latinoamericana de Rizobiología (RELAR).
Córdoba (Argentina), 25-29 Marzo de 2007.

Palma FJ., Iribarne C., Tejera NA y Lluch C.
Respuesta antioxidante en nódulos de *M. sativa* inducida por ácido salicílico y salinidad.
XVII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal. X Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal.
Alcalá de Henares. Madrid (España), 18-21 Septiembre de 2007.

Tejera NA., **Palma FJ.**, Iribarne C., y Lluch C.
Estudio comparativo de la actividad catalasa en *Phaseolus vulgaris* y *Medicago sativa* en respuesta al NaCl.
XVII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal. X Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal.
Alcalá de Henares. Madrid (España), 18-21 Septiembre de 2007.

Palma FJ., Tejera NA., Iribarne C., y Lluch C.
Mejora de la respuesta a salinidad en la simbiosis *Medicago sativa-Sinorhizobium meliloti* por la aplicación exógena de ABA.
I Congreso Luso-Español de Fijación de Nitrógeno y XII Reunión Nacional de la Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN).
Estoril (Portugal), 1-4 Junio de 2008.

Tejera NA., **Palma FJ.**, López M., y Lluch C.

Respuestas antioxidantes inducidas por ácido salicílico y NaCl en la simbiosis *Phaseolus vulgaris-Rhizobium tropici*.

I Congreso Luso-Español de Fijación de Nitrógeno y XII Reunión Nacional de la Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN).

Estoril (Portugal), 1-4 Junio de 2008.

Palma FJ., Iribarne C., Tejera NA., y Lluch C.

Efecto del estrés salino en el crecimiento, fijación de nitrógeno y metabolismo carbonado en nódulos de alfalfa.

XII Simposio Ibérico sobre Nutrición Mineral de las plantas

Granada (España), 22-24 Octubre de 2008.

Palma FJ., López M., Iribarne C., Lluch C., y Tejera NA.

Mejora de la simbiosis de *Medicago sativa* en estrés salino por aplicación exógena de ácido salicílico.

XXIV Reunión Latinoamericana de Rhizobiología (RELAR).

La Habana (Cuba), 4-8 Mayo de 2009.

Palma FJ., Iribarne C., López M., Lluch C., y Tejera NA.

Implicación del ABA en el contenido de poliaminas y ácido salicílico en alfalfa en condiciones de estrés salino.

XVIII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal. XI Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal.

Zaragoza (España), 8-11 Noviembre de 2009.

Agradecimientos:

Parece que hace dos días que llegue al Departamento de Fisiología Vegetal, pero ya han transcurrido unos cuantos años, en los que han sido muchas las personas que de una manera u otra han aportado su “granito de arena” a la elaboración de esta Tesis Doctoral. Aunque es una tarea bastante complicada tener que expresar en pocas palabras mi más sincero agradecimiento, lo intentaré procurando no olvidarme de nadie:

*En primer lugar a la **Dra. Carmen Lluch** como directora de esta Tesis, por su absoluta confianza y apoyo depositado en mi, permitiéndome iniciarme en la investigación y realizar este trabajo doctoral, por sus sugerencias e ideas, su generosidad mostrada en mi formación, por todo el tiempo que me ha destinado y por ser un ejemplo de dedicación y trabajo. Por todo ello le estaré siempre agradecido.*

*Al **Dr. Noel Tejera**, director de esta Tesis, quisiera agradecerle francamente todo lo que me ha enseñado y del que tanto provecho he sacado, así como el esfuerzo que me ha dedicado, y sus continuos consejos en el transcurso de la tesis doctoral, además de su inestimable amistad.*

*Al **Dr. Antonio Ocaña** por sus comentarios y ayuda prestada cuando la he necesitado, y al **Dr. José Antonio Herrera** por ofrecerme sus consejos, apoyo y amistad. A la familia del laboratorio, comenzando por **Carmen Iribarne** que ha sido un pilar fundamental en mi formación, gracias por permitirme trabajar de forma conjunta a tu lado y enriquecer esta Tesis Doctoral, además por aconsejarme y ayudarme en momentos difíciles; se que me llevo una gran amiga. A **Miguel** agradecerle aquellos momentos de convivencia y su actual apoyo desde el extranjero, a **José Román** por compartir muchos pensamientos y ser mi amigo, a **Mónica** por intentar hacerme ver las cosas desde el lado positivo, y a **Emilio** (para mí “El Pove”) por los buenos y divertidos momentos que pasamos juntos durante la elaboración de su DEA. **Amaranta** y mi amigo **Pacheco**, últimas incorporaciones al grupo, agradecerles el soplo de aire fresco que han dado al laboratorio. Finalmente, y no por eso menos importante dentro de esta familia incluyo a **Fernando Pieckenstein**, al que agradezco su amabilidad durante mi estancia en tierras Argentinas, además para mí fue un placer poder aprender algunas técnicas a su lado. Muchas gracias a todos, porque hemos compartido mucho tiempo juntos, y he aprendido algo de cada uno de vosotros.*

*También quiero manifestar mi agradecimiento al resto de profesores y compañeros del **Departamento de Fisiología Vegetal**, por el tiempo compartido, su interés y ayuda en diferentes momentos de estos años, y en general por todas y cada una de las amistades que he conseguido.*

Al Dr. Juan Antonio Ocampo y Dr. José M. García de la Estación Experimental del Zaidín, por prestarme su ayuda e instalaciones para la determinación del ácido salicílico. En general, agradecerle a toda la gente de su grupo por haberme acogido como uno más, durante lo que casi se convirtió en una estancia breve. Al Dr. Juan Manuel Ruiz Lozano, también de la Estación Experimental del Zaidín, por su colaboración con la utilización del programa "Quantity One".

Al Dr. José Antonio Lupiáñez del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Granada, y a los miembros de su grupo Fernando y mi prima Eva por permitirme utilizar el lector de placas ELISA en la determinación de ácido abscísico.

Todo esto nunca hubiera sido posible sin el amparo incondicional de toda mi familia que me ha animado en los momentos difíciles: a mi MADRE por ser como es, y haberme dado todo a cambio de nada pensando siempre en mi felicidad, a mi hermana por estar donde la necesitan, a mi BEGO por su amor e inestimable comprensión, confiando en mi y apoyando mis decisiones, a mis abuelos, titos y primos porque siempre han estado dispuestos a ayudarme cuando los he necesitado, y a Damián por tener un corazón tan grande. A Pepe y M^a Carmen gracias por vuestro cariño y apoyo, ya que realmente sabéis lo importante que era para mi este proyecto, a Roberto porque se que esta ahí, y como no al pequeño Richard por su alegría y simpatía que anima a cualquiera. A todos vosotros también debo este trabajo.

Por último, a mi PADRE agradecerle todo lo que me enseñó en la vida, aunque ni él mismo se diera cuenta. A pesar de que nunca llegaste a entender muy bien mi trabajo, se que desde algún lugar no muy lejano, estarás muy orgulloso de mí, por ello este trabajo va dedicado a ti.

ABREVIATURAS

Aa	Aminoácidos totales
AAO	Aldehido oxidasa
AAT	Aspartato aminotransferasa
ABA	Ácido abscísico
ABA-G	Ácido abscísico conjugado
ABAlD	Ácido abscísico aldehido
ADC	Arginina descarboxilasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIH	Agmatina iminohidrolasa
ANA	Actividad nitrogenasa aparente
ANT	Actividad nitrogenasa total
APX	Ascorbato peroxidasa
AOX	Oxidasa alternativa
ARDRA	Análisis de restricción ADN ribosómico amplificado
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
AS	Ácido salicílico
AsA	Ascorbato reducido
Ast	Azúcares solubles totales
ATP	Adenosín trifosfato
BA2H	Ácido benzoico 2-hidrolasa
BCH	β -caroteno hidrolasa
Cad	Cadaverina
CAT	Catalasa
DAO	Diamino oxidasa
Dap	Diaminopropano
DCPIP	Diclorofenolindofenol
DGGE	Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante
DHA	Dehidroascorbato
DHAR	Dehidroascorbato reductasa
dSAM	S-adenosilmetionina descarboxilada
DTS	días después del tratamiento salino
DTT	Dithiothreitol
DXP	1-desoxi-D-xiloglucosa 5-fosfato
ECA	Etanol-cloroformo-agua
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EROs	Especies reactivas del oxígeno
FAD	Flavín adenín dinucleótido
F ₀	Fluorescencia inicial
F _m	Fluorescencia máxima
F _v	Fluorescencia variable
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GOGAT	Glutamato sintasa
GPX	Guaiacol peroxidasa
GR	Glutation reductasa
GS	Glutamina sintetasa
GSH	Glutation reducido
GSSG	Glutation oxidado
HEPES	Ácido hidroxietilpiperacina-etanosulfónico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HTD	Diamino-heptano
IA	Invertasa alcalina
ICDH	Isocitrato deshidrogenasa

ICS	Isocorismato sintasa
IDP	Isopentenil pirofosfato
IMAC	Cromatografía de afinidad por ión inmovilizado
IMT	Mio-inositol O-metil transferasa
Lb	Leghemoglobina
LOX	Lipoxigenasa
MDA	Malondialdehido
MDH	Malato deshidrogenasa
MDHA	Monodehidroascorbato
MDHAR	Monodehidroascorbato reductasa
MEP	2-C-metil-D-eritriol 4-fosfato
MTT	3-(4.5-dimetiltiazol-2il)-2.5difetil-tetrazolio
MVA	Ácido mevalónico
NAD	Nicotinamida adenina
NADH	Nicotinamida adenina reducido
NADP	Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato reducido
NBT	Azul de nitrotetrazolio
NCED	9-cis-epoxicarotenoide isomerasa
NCP	N-carbamoilputrescina
NCPasa	N--carbamoilputrescina amidohidrolasa
NO	Oxido nítrico
OAA	Oxalacetato
ODC	Ornitina descarboxilasa
OEP	Ononitol epimerasa
PA	Ácido faseico
PAL	Fenil amonio liasa
PAO	Poliamino oxidasa
PAs	Poliaminas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPC	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
PL	Isocorismato piruvato liasa
PFP	Peso fresco planta
PFPA	Peso fresco parte aérea
PFN	Peso fresco nódulo
PFR	Peso fresco raíz
PMSF	Fenimetilsulfonilfluoruro
PNN	Peso normalizado de nódulo
POX	Peroxidasa
Pro	Prolina
PSP	Peso seco nódulo
PSPA	Peso seco parte aérea
PSN	Peso seco nódulo
PSR	Peso seco raíz
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
Put	Putrescina
RPA	Relación raíz/parte aérea
SAG	2-O-β-D-glucosilsalicílico
SAGT	AS-glucosiltransferasa
SAM	S-adenosilmetionina
SAMDC	S-adenosilmetionina descarboxilasa
SAMsin	S-adenosilmetionina sintasa
SDR	Deshidrogenasa reductasa de cadena corta

SOD	Superoxido dismutasa
Spd	Espermidina
SPDS	Espermidina sintasa
Spm	Espermina
SPMS	Espermina sintasa
SDS	Dodecilo sulfato sódico
SS	Sacarosa sintasa
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Especies reactivas del ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TFN	Tasa de fijación de nitrógeno
TGGE	Electroforesis en gel con gradiente de temperatura
TNB	5-thio-2-ácido nitrobenzoico
T-RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción terminal
UDP	Uridina difosfato
VDE	Violaxantina depoxidasa
ZEP	Zeaxantina epoxidasa

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Leguminosas en la agricultura sostenible	3
1.1. <i>Phaseolus vulgaris</i>	4
1.2. <i>Medicago sativa</i>	5
2. Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas	5
2.1. <i>Rhizobium</i>	6
2.2. Nodulación	9
2.3. Tipos de nódulos	11
2.4. Bacteroide y nitrogenasa	13
3. Estrés abiótico: salinidad	16
3.1. Efectos del estrés salino en las plantas	16
3.1.1. Osmótico	16
3.1.2. Iónico	17
3.1.3. Oxidativo	17
3.2. Efectos del estrés salino en la simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa	18
3.2.1. Infección y desarrollo del nódulo	18
3.2.2. Actividad nitrogenasa y respiración nodular	18
3.2.3. Metabolismo del carbono.....	18
3.2.4. Metabolismo de asimilación de amonio	19
3.2.5. Producción de especies reactivas del oxígeno	19
3.3. Mecanismos fisiológicos de tolerancia a la salinidad en la planta	20
3.3.1. Inclusión y exclusión de iones	20
3.3.2. Síntesis de osmolitos.....	21
3.3.3. Respuesta antioxidante	23
3.3.4. Proteínas de estrés.....	26
3.4. Mecanismos fisiológicos de tolerancia a la salinidad en la simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa	27
3.4.1. Síntesis de osmolitos.....	27
3.4.2. Respuesta antioxidante	27
4. Hormonas vegetales en la interacción planta-estrés abiótico	29
4.1. Ácido abscísico.....	29
4.1.1. Biosíntesis y catabolismo.....	30
4.1.2. Aspectos fisiológicos y moleculares	32
4.1.3. Interacción planta-microorganismo	34
4.1.4. Interacción ABA-salinidad: efecto en la simbiosis.....	35
4.2. Ácido salicílico.....	36
4.2.1. Biosíntesis y catabolismo.....	37
4.2.2. Procesos fisiológicos	38
4.2.3. Interacción planta-microorganismo: patógenos y simbiosis.....	39
4.2.4. Ácido salicílico y salinidad: efecto en la simbiosis	40
4.3. Otros reguladores de crecimiento: poliaminas	41
4.3.1. Biosíntesis y catabolismo.....	42
4.3.2. Efectos fisiológicos	44
4.3.3. Interacción planta-microorganismo: simbiosis	44
4.3.4. Poliaminas y salinidad	45

II. OBJETO	47
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	53
1. Material biológico	55
1.1. Microorganismos.....	55
1.2. Material vegetal y solución nutritiva.....	55
2. Cultivo de plantas	56
2.1. Preparación del inóculo	56
2.2. Siembra e inoculación	56
2.3. Condiciones de la cámara de cultivo.....	57
3. Experimentos realizados	57
3.1. Estudio ontogénico de la simbiosis <i>Medicago sativa- Sinorhizobium meliloti</i> en condiciones de salinidad.....	57
3.2. Respuesta de plántulas de <i>Phaseolus vulgaris</i> a la aplicación de ácido salicílico y NaCl.....	58
3.3. Efecto del ácido salicílico en la simbiosis <i>Phaseolus vulgaris-Rhizobium</i> <i>tropici</i> y <i>Medicago sativa-Sinorhizobium meliloti</i> en estrés salino.....	59
3.4. Efecto del ácido abscísico en la simbiosis <i>Phaseolus vulgaris-Rhizobium</i> <i>tropici</i> y <i>Medicago sativa-Sinorhizobium meliloti</i> en estrés salino	60
3.5. Caracterización de la catalasa de <i>Phaseolus vulgaris</i> y <i>Medicago sativa</i>	60
4. Metodología empleada.....	61
4.1. Recolección de las plantas.....	61
4.2. Actividad fotosintética	62
4.3. Fijación de nitrógeno.....	63
4.3.1. Desarrollo nodular	63
4.3.2. Actividad nitrogenasa	63
4.4. Actividades enzimáticas	63
4.4.1. Metabolismo carbonado.....	63
4.4.1.1. Extracción.....	63
4.4.1.2. Sacarosa sintasa	64
4.4.1.3. Fosfoenolpiruvato carboxilasa.....	64
4.4.1.4. Malato deshidrogenasa	65
4.4.1.5. Isocitrato deshidrogenasa.....	65
4.4.2. Metabolismo de asimilación de amonio	65
4.4.2.1. Extracción.....	65
4.4.2.2. Glutamina sintetasa.....	66
4.4.2.3. Glutamato sintasa.....	66
4.4.2.4. Glutamato deshidrogenasa.....	67
4.4.2.5. Aspartato aminotransferasa	67
4.4.3. Metabolismo oxidativo	68
4.4.3.1. Superóxido dismutasa.....	68
4.4.3.2. Catalasa.....	68
4.4.3.3. Guaiacol peroxidasa.....	69
4.4.3.4. Ciclo ascorbato glutation	69
4.4.4. Lipoxigenasa.....	71
4.4.5. Aldehído oxidasa	72

4.5. Determinaciones analíticas.....	73
4.5.1. Azúcares solubles totales	73
4.5.2. Polioles, glucosa y trehalosa	74
4.5.3. Malato y glutamato	74
4.5.3.1. Extracción	75
4.5.3.2. Cuantificación.....	75
4.5.4. Aminoácidos libres	75
4.5.5. Prolina.....	76
4.5.6. Proteína soluble.....	76
4.5.7. Ascorbato	76
4.5.8. Glutation	77
4.5.9. Peróxido de hidrógeno	78
4.5.10. Peroxidación de lípidos.....	79
4.6. Reguladores del crecimiento	79
4.6.1. Ácido abscísico	79
4.6.2. Ácido salicílico	80
4.6.3. Poliaminas.....	81
4.7. Purificación y caracterización de la enzima catalasa.....	81
4.7.1. Preparación del extracto.....	81
4.7.2. Cromatografía de exclusión molecular	81
4.7.3. Cromatografía de afinidad	82
4.7.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida	82
4.7.5. Efecto de inhibidores	83
5. Presentación y estudio estadístico de resultados	83
IV. RESULTADOS	85
1. Estudio ontogénico de la simbiosis <i>Medicago sativa</i>-<i>Sinorhizobium meliloti</i> en condiciones de salinidad	87
1.1. Crecimiento y fotosíntesis	87
1.2. Fijación de nitrógeno.....	90
1.3. Metabolismo carbonado	92
1.4. Metabolismo de asimilación de amonio	93
1.5. Malato y glutamato.....	95
1.6. Metabolitos nitrogenados	97
1.7. Polioles y carbohidratos	99
2. Respuesta de plántulas de <i>Phaseolus vulgaris</i> a la aplicación de ácido salicílico y NaCl.....	109
2.1. Análisis del crecimiento	109
2.2. Actividades enzimáticas antioxidantes.....	110
2.3. Ascorbato y glutation	112
2.4. Otros metabolitos	117
2.5. Peróxido de hidrógeno y peroxidación de lípidos	119
2.6. Ácido salicílico endógeno	120

3. Efecto del ácido salicílico en las simbiosis <i>Phaseolus vulgaris-Rhizobium tropici</i> y <i>Medicago sativa-Sinorhobium meliloti</i> en estrés salino	125
3.1. Experimentos con <i>Phaseolus vulgaris</i>	125
3.1.1. Análisis del crecimiento.....	125
3.1.2. Fijación de nitrógeno	126
3.1.3. Actividad aldehído oxidasa.....	128
3.1.4. Actividad enzimáticas antioxidantes.....	129
3.1.5. Actividad lipoxigenasa	132
3.1.6. Metabolitos antioxidantes	132
3.1.7. Otros metabolitos.....	135
3.1.8. Peroxidación de lípidos y peróxido de hidrógeno.....	137
3.1.9. Ácido salicílico y ácido abscísico endógeno	139
3.1.10. Poliaminas endógenas.....	140
3.2. Experimentos con <i>Medicago sativa</i>	144
3.2.1. Análisis del crecimiento.....	144
3.2.2. Fijación de nitrógeno	145
3.2.3. Actividad aldehído oxidasa.....	146
3.2.4. Actividad enzimáticas antioxidantes.....	147
3.2.5. Actividad lipoxigenasa	150
3.2.6. Metabolitos antioxidantes	151
3.2.7. Otros metabolitos.....	154
3.2.8. Peroxidación de lípidos y peróxido de hidrógeno.....	156
3.2.9. Ácido salicílico y ácido abscísico endógeno	157
3.2.10. Poliaminas endógenas.....	159
4. Efecto del ácido abscísico en las simbiosis <i>Phaseolus vulgaris-Rhizobium tropici</i> y <i>Medicago sativa-Sinorhobium meliloti</i> en estrés salino	169
4.1. Experimentos con <i>Phaseolus vulgaris</i>	169
4.1.1. Análisis del crecimiento.....	169
4.1.2. Fijación de nitrógeno	170
4.1.3. Actividad aldehído oxidasa.....	172
4.1.4. Actividad enzimáticas antioxidantes.....	173
4.1.5. Actividad lipoxigenasa	176
4.1.6. Metabolitos antioxidantes	177
4.1.7. Otros metabolitos.....	180
4.1.8. Peroxidación de lípidos y peróxido de hidrógeno.....	181
4.1.9. Ácido salicílico y ácido abscísico endógeno	183
4.1.10. Poliaminas endógenas.....	185
4.2. Experimentos con <i>Medicago sativa</i>	188
4.2.1. Análisis del crecimiento.....	188
4.2.2. Fijación de nitrógeno	189
4.2.3. Actividad aldehído oxidasa.....	191
4.2.4. Actividad enzimáticas antioxidantes.....	192
4.2.5. Actividad lipoxigenasa	195
4.2.6. Metabolitos antioxidantes	196
4.2.7. Otros metabolitos.....	198
4.2.8. Peroxidación de lípidos y peróxido de hidrógeno.....	200
4.2.9. Ácido salicílico y ácido abscísico endógeno	202

4.2.10. Poliaminas endógenas.....	203
5. Caracterización de la catalasa de <i>Phaseolus vulgaris</i> y <i>Medicago sativa</i>.....	211
5.1. Actividad catalasa durante el desarrollo ontogénico	211
5.2. Efecto de la salinidad en la actividad enzimática	212
5.3. Purificación parcial de la enzima	213
5.4. Efecto de la sal y otros inhibidores en la catalasa purificada	215
V. DISCUSIÓN	221
VI. CONCLUSIONES	241
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	245
VIII. APÉNDICE	277

INTRODUCCIÓN

1. Leguminosas en la agricultura sostenible

En los seres vivos el nitrógeno es el cuarto elemento más abundante después del carbono, hidrógeno y oxígeno, representa del 8-16% de la materia viva, y forma parte de biomoléculas esenciales como aminoácidos, nucleótidos, proteínas, ácidos nucleicos, porfirinas y alcaloides. En las plantas, este elemento se distribuye en tres grupos: más del 50% se haya en compuestos de elevado peso molecular, como proteínas y ácidos nucleicos, y el resto en forma de N-orgánico soluble (aminoácidos, aminas, amidas...) y de N-inorgánico, principalmente iones nitrato y en menor medida amonio (Cresser *et al.*, 2008).

Para lograr satisfacer las demandas nutricionales y energéticas de la población mundial, que ha crecido de forma exponencial en los últimos 50 años y continua en constante aumento, se debe incrementar la producción de fertilizante nitrogenado sintético mediante el procedimiento Haber Bosch (Ahmad, 2001). Sin embargo su utilización conlleva un costo elevado de producción, al ser dependiente de los combustibles fósiles, además de provocar un deterioro del medio ambiente, debido tanto a la contaminación atmosférica producida durante su fabricación, como al incremento de nitratos en aguas superficiales y acuíferos debido a la facilidad de lixiviación de los nitratos no utilizados por la planta (Vance, 1998). Por lo tanto, en el contexto de **agricultura sostenible**, cualquier acción encaminada a disminuir el uso de fertilizante nitrogenado cobra una gran importancia.

La familia de las leguminosas con unos 750 géneros y 20000 especies, es la tercera familia más numerosa, después de Compuestas y Orquidiáceas y la segunda en importancia agronómica después de las gramíneas (Gepts *et al.*, 2005). Las leguminosas cultivadas se pueden clasificar en dos grupos atendiendo a su uso: forrajeras y de grano, las forrajeras son las que se aprovechan sus hojas y tallos mediante corte o pastoreo, mientras que las grano su principal utilidad económica reside en las semillas. Entre las especies más utilizadas para el consumo humano y animal se pueden citar, entre otras, guisante (*Pisum sativum*), garbanzo (*Cicer arietinum*), judía (*Phaseolus vulgaris*), haba (*Vicia faba*), soja (*Glycine max*), lenteja (*Lens culinaris*), alfalfa (*Medicago sativa*) y trébol (*Trifolium repens*).

La importancia de las leguminosas se basa en aspectos como: **a)** la potencialidad en la producción de proteínas vegetales para el consumo humano y fabricación de piensos para animales (Graham y Vance, 2003); **b)** su utilización como pasto y forraje para el consumo animal (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, evitando la erosión, participando

en la recuperación de suelos marginales y mejorando la fertilidad del suelo al incorporar el nitrógeno fijado a la materia orgánica (Vance, 1998).

Estas características de los cultivos de leguminosas hacen que la investigación sobre aspectos básicos y tecnológicos de su biología cobre relevancia mundial, sobre todo la búsqueda de variedades mejor adaptadas a condiciones climáticas especiales de sequía, altas temperaturas, irradiación solar, salinidad, etc, así como bacterias con máxima capacidad fijadora de nitrógeno, en estas condiciones.

1.1. *Phaseolus vulgaris*

La judía es una especie originada y domesticada en América Latina, puesto de manifiesto por diversos hallazgos arqueológicos y evidencias botánicas e históricas, así los indicios más antiguos de cultivo datan del año 5000 a.C. La introducción en España y posteriormente su difusión al resto de Europa tiene lugar en las expediciones de comienzos del siglo XVI (Gepts, 1998).

Pertenece a la familia *Fabaceae*, subespecie *Papilionaceae* y su nombre científico es *Phaseolus vulgaris* L. Es una planta anual con un ciclo de vida relativamente corto, a lo largo del cuál, se producen numerosos cambios morfológicos dividiéndose así, en dos etapas conocidas como fase vegetativa y reproductora. El sistema radicular es muy ligero y poco profundo y está constituido por una raíz principal y gran número de raíces secundarias con elevado grado de ramificación, este sistema puede ser modificado por distintos factores ambientales (Costa *et al.*, 2002). Posee un tallo principal herbáceo que en variedades enanas presenta un porte erguido y una altura aproximada de 30 a 40 centímetros, mientras que en las judías de enrame alcanza una altura de 2 a 3 metros, siendo voluble y dextrógiro (se enrolla alrededor de un soporte o tutor en sentido contrario a las agujas del reloj). La hoja es sencilla, lanceolada y acuminada, de tamaño variable según la variedad y la flor puede presentar diversos colores, únicos para cada variedad, aunque en las variedades más importantes la flor es blanca. Las flores se presentan en racimos en número de 4 a 8, cuyos pedúnculos nacen en las axilas de las hojas o en las terminales de algunos tallos. El fruto es una legumbre de color, forma y dimensiones variables, en cuyo interior se disponen de 4 a 6 semillas. Existen frutos de color verde, amarillo jaspeado o rojo sobre verde, etc., aunque los más demandados por el consumidor son los verdes y amarillos con forma tanto cilíndrica como acintada (Reinoso *et al.*, 2007). La judía es una leguminosa con grandes posibilidades para la alimentación humana, por su doble aprovechamiento de grano y de vaina. Sus granos son ricos en proteínas (20-25%), fibras y vitaminas, pero como en muchas leguminosas, sus proteínas son deficientes en aminoácidos azufrados (Fageria *et al.*, 1997). La judía crece como monocultivo

alternándola con cereales en técnicas de rotación de cultivos o bien en cultivos conjuntos (Fageria y Santos, 2008).

1.2. *Medicago sativa*

La alfalfa tiene su área de origen en Asia Menor y sur del Caúcaso, abarcando países como Turquía, Irak, Irán, Siria, Afganistán y Pakistán. Los persas introdujeron la alfalfa en Grecia y de ahí pasó a Italia en el siglo IV a. C. La gran difusión de su cultivo fue llevada a cabo por los árabes a través del norte de África, llegando a España donde se extendió a toda Europa (Müller *et al.*, 2003).

La alfalfa es una planta perenne, vivaz y de porte erecto perteneciente a la familia de las leguminosas y cuyo nombre botánico es *Medicago sativa*. La raíz principal es pivotante, robusta y muy desarrollada (hasta 5 metros de longitud) con numerosas raíces secundarias y posee una corona que sale del terreno, de la cual emergen brotes que dan lugar a los tallos. Estos son delgados, erectos y muy consistentes para soportar el peso de las hojas y de las inflorescencias, por tanto es una planta muy adecuada para la siega. Las hojas son trifoliadas, aunque las primeras verdaderas son unifoliadas, los márgenes son lisos y con los bordes superiores ligeramente dentados, la flor característica de esta familia es la de la subfamilia Papilionoidea, que son de color azul o púrpura, con inflorescencias en racimos que nacen en las axilas de las hojas. El fruto es una legumbre indehisciente sin espinas que contiene entre 2 y 6 semillas amarillentas, arriñonadas y de 1.5 a 2.5 mm de longitud (Benito *et al.*, 2000).

La alfalfa, por su adaptación a un amplio rango de condiciones agroclimáticas y por su capacidad de producir elevada cantidad de pasto y forraje de alta calidad, es una especie utilizada en las distintas regiones ganaderas templadas del mundo, además es una leguminosa con cierta tolerancia a la sequía, por lo que se usa para rehabilitación de espacios degradados y también contribuye a reducir ciertas plagas y enfermedades (Prosperi *et al.*, 2006).

2. Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas

La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa es la más importante desde un punto de vista agronómico, se establece entre bacterias englobadas bajo el término rizobios y las raíces de las leguminosas y como resultado de la simbiosis se forman los nódulos, en cuyo interior las bacterias se diferencian en bacteroides, donde tiene lugar la fijación en simbiosis de nitrógeno atmosférico.

Entre los fijadores en simbiosis, además de los rizobios, se incluye al actinomiceto *Frankia* que establece una relación simbiótica con plantas actinorrícicas, que suelen ser arbustos o árboles que habitan en suelos pobres en

nitrógeno o en climas adversos y desarrollan nódulos fijadores de nitrógeno en sus raíces al ser infectadas por *Frankia* (Sellstedt *et al.*, 2007).

2.1. *Rhizobium*

Los rizobios son bacterias aerobias gram-negativas, pertenecen a los subgrupos α y β de las Proteobacterias, tienen morfología normalmente bacilar y son móviles por la presencia de un flagelo polar o subpolar que presenta a su vez, de dos a seis flagelos peritricos. La taxonomía de los rizobios está siendo revisada continuamente y la clasificación actual está basada en criterios moleculares específicos para ARNr16S y ARNr23S (T-RFLP, DGGE, TGGE, ARDRA), para elementos repetitivos (PCR-fingerprinting) o bien para genes concretos relacionados con la nodulación (*nod* y *nfeA*) o fijación de nitrógeno (*nifH*), permitiendo así, dividir a los rizobios en varios géneros.

Los géneros y las especies microorganismos formadores de nódulos en raíces de leguminosas actualmente reconocidos se muestran en la tabla 1, aunque nuevas adiciones a esta lista ocurren frecuentemente.

Tabla 1. Taxonomía del *Rhizobium*

Género/especie	Planta hospedadora	Referencia bibliográfica
<u>Allorhizobium</u>		
<i>A. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i> , <i>Acacia</i> , <i>Faidherbia</i> , <i>Lotus</i>	(De Lajudie <i>et al.</i> , 1998); considerada dentro de <i>Rhizobium</i> por (Sawada <i>et al.</i> , 2003)
<u>Azorhizobium</u>		
<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	(Dreyfus <i>et al.</i> , 1988)
<i>A. doebereineriae</i>	<i>Sesbania virgata</i>	(Moreira <i>et al.</i> , 2006)
<u>Blastobacter</u>		
<i>B. denitrificans</i>	<i>Aeschynomene indica</i>	(van Berkum y Eardly, 2002); considerada dentro de <i>Bradyrhizobium</i> por (Van Berkum <i>et al.</i> , 2006)
<u>Bradyrhizobium</u>		
<i>B. betae</i>		(Rivas <i>et al.</i> , 2004)
<i>B. canariense</i>	<i>Chamaecytisus</i> , <i>Lupinus</i> <i>spp.</i>	(Stepkowski <i>et al.</i> , 2005; Vinuesa <i>et al.</i> , 2005)
<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine max</i>	(Kuykendall <i>et al.</i> , 1992)
<i>B. iriomotense</i>	<i>Entada koshunensis</i>	(Islam <i>et al.</i> , 2008)
<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max</i>	(Jordan, 1982)

Tabla 1. Taxonomía del *Rhizobium* (continuación)

Género/especie	Planta hospedadora	Referencia bibliográfica
<i>B. liaoningense</i>	<i>Glycine max</i>	(Xu <i>et al.</i> , 1995)
<i>B. yuanmingense</i>	<i>Lespedeza spp.</i>	(Yao <i>et al.</i> , 2002)
<u>Burkholderia</u>		
<i>B. caribensis</i>	<i>Mimosa diplotricha</i> , <i>Mimosa pudica</i>	(Achouak <i>et al.</i> , 1999; Vandamme <i>et al.</i> , 2002)
<i>B. cepacia</i>	<i>Alysicarpus glumaceus</i>	(Vandamme <i>et al.</i> , 2002)
<i>B. nodosa</i>	<i>Mimosa bimucronata</i> , <i>Mimosa scabrella</i>	(Chen <i>et al.</i> , 2007b)
<i>B. phymatum</i>	<i>Machaerium lunatum</i> , <i>Mimosa spp</i>	(Vandamme <i>et al.</i> , 2002; Elliott <i>et al.</i> , 2007)
<i>B. sabiae</i>	<i>Mimosa caesalpinifolia</i>	(Chen <i>et al.</i> , 2008)
<i>B. tuberum</i>	<i>Aspalathus spp.</i>	(Vandamme <i>et al.</i> , 2002)
<u>Devosia</u>		
<i>D. neptuniae</i>	<i>Neptunia natans</i>	(Rivas <i>et al.</i> , 2003)
<u>Mesorhizobium</u>		
<i>M. albiziae</i>	<i>Albizia kalkora</i>	(Wang <i>et al.</i> , 2007a)
<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>	(Wang <i>et al.</i> , 1999;2002a)
<i>M. caraganae</i>	<i>Caragana spp.</i>	(Guan <i>et al.</i> , 2008)
<i>M. chacoense</i>	<i>Prosopis alba</i>	(Velázquez <i>et al.</i> , 2001)
<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>	(Nour <i>et al.</i> , 1994)
<i>M. gobiense</i>	Leguminosas silvestres	(Han <i>et al.</i> , 2008a)
<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i> , <i>Acacia</i> <i>spp.</i>	(Chen <i>et al.</i> , 1991; Jarvis <i>et al.</i> , 1997)
<i>M. loti</i>	<i>Lotus corniculatus</i>	(Jarvis <i>et al.</i> , 1982; 1997)
<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i>	(Nour <i>et al.</i> , 1995; Jarvis <i>et al.</i> , 1997)
<i>M. metallidurans</i>	<i>Anthyllis vulneraria</i>	(Vidal <i>et al.</i> , 2009)
<i>M. plurifarium</i>	<i>Acacia senegal</i> , <i>Prosopis</i> <i>juriflora</i> , <i>Leucaena</i>	(De Lajudie <i>et al.</i> , 1998)
<i>M. septentrionale</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>	(Gao <i>et al.</i> , 2004)
<i>M. tarimense</i>	Leguminosas silvestres	(Han <i>et al.</i> , 2008a)
<i>M. temperatum</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>	(Gao <i>et al.</i> , 2004)
<i>M. tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i> , <i>Glycine</i> , <i>Caragana</i> , <i>Sophora</i>	(Chen <i>et al.</i> , 1995; Tan <i>et</i> <i>al.</i> , 1997; 2001)
<u>Ralstonia</u>		
<i>R. taiwanensis</i>	<i>Mimosa spp.</i>	(Chen <i>et al.</i> , 2001b)
<u>Rhizobium</u>		
<i>R. alamii</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Berge <i>et al.</i> , 2009)
<i>R. cellulosilyticum</i>	<i>Populus alba</i>	(García-Fraile <i>et al.</i> , 2007)
<i>R. daejeonense</i>	<i>Medicago sativa</i>	(Quan <i>et al.</i> , 2005)

Tabla 1. Taxonomía del *Rhizobium* (continuación)

Género/especie	Planta hospedadora	Referencia bibliográfica
<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Mimosa affinis</i>	(Segovia <i>et al.</i> , 1993; Wang <i>et al.</i> , 1999)
<i>R. galegae</i>	<i>Galega orientalis</i> <i>Galega officinalis</i>	(Lindstrom, 1989)
<i>R. gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Leucaena</i> , <i>Macroptilium</i> , <i>Onobrychis</i>	(Amarger <i>et al.</i> , 1997)
<i>R. giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Leucaena</i> , <i>Macroptilium</i> , <i>Desmanthus</i>	(Amarger <i>et al.</i> , 1997; Beyhaut <i>et al.</i> , 2006)
<i>R. hainanense</i>	<i>Desmodium sinuatum</i> , <i>Stylosanthes</i> , <i>Vigna</i> , <i>Arachis</i> , <i>Centrosema</i>	(Chen <i>et al.</i> , 1997a)
<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>	(Wang <i>et al.</i> , 1998)
<i>R. indigoferae</i>	<i>Indigofera spp.</i>	(Wei <i>et al.</i> , 2002)
<i>R. leguminosarum</i>		
bv <i>trifolii</i>	<i>Trifolium</i>	(Dangeard, 1926)
bv <i>viciae</i>	<i>Lathyrus</i> , <i>Lens</i> , <i>Pisum</i> , <i>Vicia</i>	(Dangeard, 1926)
bv <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	(Dangeard, 1926)
<i>R. loessense</i>	<i>Astragalus</i> , <i>Lespedeza</i> <i>spp.</i>	(Wei <i>et al.</i> , 2003)
<i>R. lusitanum</i>		
<i>R. miluonense</i>	<i>Lespedeza spp.</i>	(Robledo <i>et al.</i> , 2008)
<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i>	(van Berkum <i>et al.</i> , 1998)
<i>R. multihospitium</i>	Distintas <i>spp.</i> leguminosas	(Han <i>et al.</i> , 2008b)
<i>R. oryzae</i>	<i>Oryza alta</i>	(Peng <i>et al.</i> , 2008)
<i>R. selenireducens</i>	Bioreactor	(Hunter <i>et al.</i> , 2007)
<i>R. sullae</i>	<i>Hedysarum coronarium</i>	(Squartini <i>et al.</i> , 2002)
<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Dalea</i> , <i>Leucaena</i> , <i>Macroptilium</i> , <i>Onobrychis</i>	(Martínez-Romero <i>et al.</i> , 1991)
<i>R. yanglingense</i>	<i>Amphicarpaea</i> , <i>Coronilla</i> ,	(Tan <i>et al.</i> , 2001)
<u>Ensifer</u>		
<i>E. abri</i>	<i>Abrus precatorius</i>	(Ogasawara <i>et al.</i> , 2003)
<i>E. americanus</i>	<i>Acacia spp</i>	(Toledo <i>et al.</i> , 2003)
<i>E. arboris</i>	<i>Acacia senegal</i> , <i>Prosopis</i> <i>chilensis</i>	(Nick <i>et al.</i> , 1999)
<i>E. chiapanecum</i>	<i>Acaciella angustissima</i>	(Rincon-Rosales <i>et al.</i> , 2009)

Tabla 1. Taxonomía del *Rhizobium* (continuación)

Género/especie	Planta hospedadora	Referencia bibliográfica
<i>E. fredii</i>	<i>Glycine max</i>	(Scholla y Elkan, 1984; Chen <i>et al.</i> , 1988)
<i>E. indiaense</i>	<i>Sebastiania rostrata</i>	(Ogasawara <i>et al.</i> , 2003)
<i>E. kostiense</i>	<i>Acacia senegal</i> , <i>Prosopis chilensis</i>	(Nick <i>et al.</i> , 1999)
<i>E. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulacea</i>	(Wei <i>et al.</i> , 2002)
<i>E. medicae</i>	<i>Medicago truncatula</i> ,	(Rome <i>et al.</i> , 1996)
<i>E. meliloti</i>	<i>Medicago</i> , <i>Melilotus</i> , <i>Trigonella</i>	(Dangeard, 1926; De Lajudie <i>et al.</i> , 1994)
<i>E. mexicanus</i>	<i>Acacia angustissima</i>	(Lloret <i>et al.</i> , 2007)
<i>S. morelense</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>	(Wang <i>et al.</i> , 2002b)
<i>E. saheli</i>	<i>Acacia</i> , <i>Sesbania spp.</i>	(De Lajudie <i>et al.</i> , 1994; Boivin <i>et al.</i> , 1997)
<i>E. terangae</i>	<i>Acacia</i> , <i>Sesbania spp.</i>	(De Lajudie <i>et al.</i> , 1994; Lortet <i>et al.</i> , 1996)
<i>E. xinjiangense</i>	<i>Glycine max</i>	(Peng <i>et al.</i> , 2002)

2.2. Nodulación

El establecimiento de la simbiosis fijadora de nitrógeno es el resultado de tres eventos: **a)** la infección intracelular de las células hospedadoras por el microsimbionte; **b)** el desarrollo y organogénesis del nódulo; y **c)** el proceso de fijación de nitrógeno. El primer y segundo evento ocurren simultáneamente, mientras que la fijación ocurre después de que la organogénesis está completada y sólo si la infección bacteriana es la adecuada.

Un diálogo molecular entre el microsimbionte y la planta inicia la simbiosis, similar al que ocurre entre la planta y otros microorganismos patógenos (Samac y Graham, 2007). Los exudados radicales liberan determinados compuestos fenólicos derivados del metabolismo secundario de las plantas identificados como **flavonoides**, que son esenciales para el establecimiento de la simbiosis (Subramanian *et al.*, 2006). Estos flavonoides son percibidos por los rizobios compatibles que hay en la rizosfera, que induciendo la expresión del operon de nodulación (genes *nod*, *nol* o *noe*), implicado en la síntesis de los llamados **factores Nod**. Estos factores Nod de naturaleza lipooligosacáridica (LCO) varían su estructura básica y especificidad molecular dependiendo de la especie de *Rhizobium*, por tanto los factores Nod son considerados elementos claves para la especificidad de la simbiosis (Supanjani *et al.*, 2006). Los factores Nod desencadenan en la planta numerosas respuestas, todas ellas esenciales en el proceso de invasión y organogénesis del nódulo que se expresan simultáneamente

en las células epidérmicas de la raíz y en las células de la corteza donde se inicia el primordio nodular.

El estudio de mutantes no-nodulantes en algunas leguminosas hospedadoras ha permitido la clarificación e identificación de potenciales **receptores de los factores NOD**, así como la cascada de señales que se desencadena. Los primeros detectados fueron *M_sNORK* (**NO**dules **R**eceptor **K**inase) (Endre *et al.*, 2002), y *LjSYM_{RK}* (**SYM**biotic **R**eceptor **K**inase) (Stracke *et al.*, 2002) los cuales se identificaron con un receptor quinasa con dominios de lisina repetidos (LRR-LK). Su activación desencadenaría la fosforilación de proteínas, provocando la entrada de calcio extracelular y/o liberación desde reservorios intracelulares hacia el citoplasma, induciendo oscilaciones rítmicas de calcio que podrían ser captadas por una proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina, que a su vez activaría la expresión de genes **ENOD** (**E**arly **NO**dulation genes) por factores transcripcionales de fosforilación NSP1 y NSP2 (**N**odulation **S**ignaling **P**athway). La expresión de los genes **ENOD**, requeridos en el proceso de infección y formación del nódulo, junto con la reorganización de los filamentos de actina y el incremento de las corrientes citoplasmáticas, preceden al contacto de la bacteria con los pelos radicales que se curvan y permiten atrapar a la bacteria donde establece el sitio de infección (Oldroyd y Downie, 2008).

Otro componente con capacidad de integrar las respuestas epidérmicas y corticales es **NIN** (**N**odule **I**Nception), identificado con una proteína integral de membrana con un dominio citoplasmático que conecta con el núcleo y actúa como un factor de transcripción. Esta proteína (NIN) funciona independiente de los factores NOD, pero actúa como regulador positivo en la nodulación con una función dual, puesto que permite tanto la infección de las células epidérmicas (pelos radicales) por los rizobios, como las respuestas inducidas en las células de la corteza radical para la formación del primordio nodular. Claramente, NIN desempeña un papel esencial durante la nodulación, pero su función exacta sigue siendo ambigua, sin embargo su actuación en ambas respuestas (corticales y epidérmicas) la convierte en candidata para coordinar el desarrollo de la planta durante la formación del nódulo (Borisov *et al.*, 2003; Marsh *et al.*, 2007).

La entrada de la bacteria a la planta se inicia con la hidrólisis de la pared celular del pelo radical mediante enzimas hidrolíticas de la bacteria, a continuación se produce una invaginación de la membrana citoplasmática dando lugar a una estructura tubular conocida como **cordón de infección**, a través del cual los rizobios penetran en el interior del pelo radical (Fig. 1). Este cordón de infección contiene una matriz de origen bacteriano y glicoproteína de origen vegetal (Brewin, 2004).

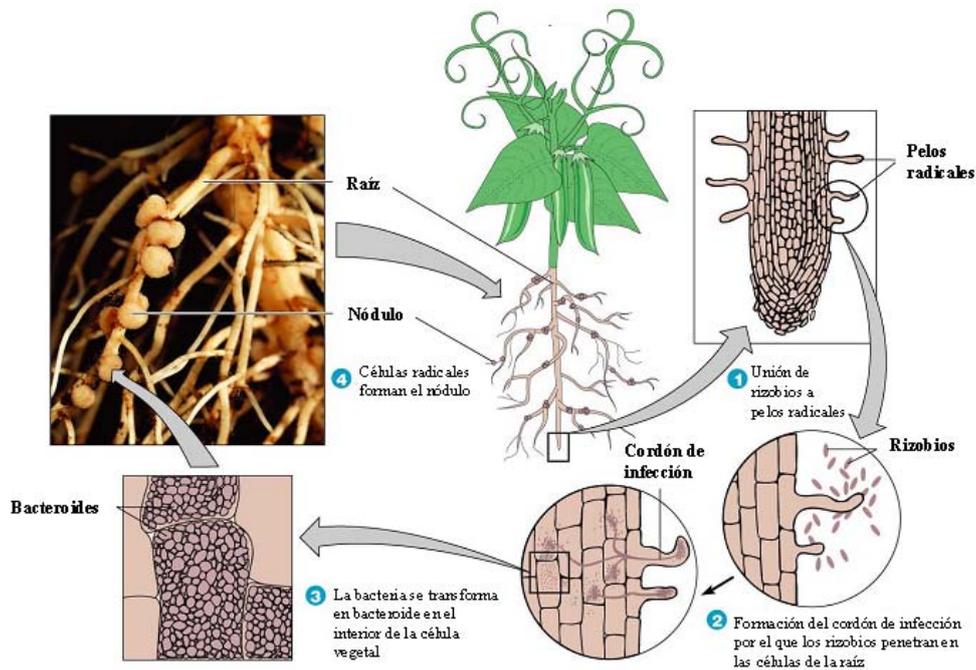


Figura 1. Proceso de formación del nódulo

Conjuntamente con el inicio del cordón de infección se produce la activación de la división de un conjunto de células del córtex de la corteza radical que formarán el primordio nodular. Los cordones de infección con las bacterias en su interior progresan ramificándose y atravesando las distintas capas de células de la raíz, dirigiéndose hacia el primordio nodular. Cuando el canal de infección alcanza las células del primordio nodular, las bacterias son liberadas al citoplasma de estas células vegetales, en un proceso similar al de la endocitosis y en el que la bacteria queda rodeada por una porción de membrana de la célula vegetal que recibe el nombre de **membrana peribacteroidal**. En su interior, las células bacterianas son capaces de dividirse, antes de sufrir un proceso de diferenciación que les convertirá en **bacteroides** fijadores de nitrógeno. Al conjunto constituido por uno o varios bacteroides rodeados por una membrana peribacteroidal se les conoce con el nombre de **simbiosoma**. Simultáneamente con la aparición del simbiosoma, el primordio nodular se convierte en nódulo maduro (Maunoury *et al.*, 2008).

2.3. Tipos de nódulos

Los nódulos bacterianos pueden ser de dos tipos: nódulos determinados, formados en leguminosas de origen tropical como soja o judía, y nódulos

indeterminados formados en leguminosas de origen subtropical y templado como guisante o alfalfa. Las diferencias radican en la presencia o no de meristemo apical, en la forma, en la organización histológica y anatómica, en la vía de asimilación del amonio y en el tipo de metabolitos nitrogenados que exportan (Sprent y James, 2007).

Los **nódulos determinados** (Fig. 2) tienen forma esférica y la zona infectada está formada por células que se encuentran en un estadio similar de desarrollo, las divisiones en la zona central concluyen 12-18 días después de la inoculación y a partir de ese momento el aumento del tamaño del nódulo se produce sólo por crecimiento celular. Algunas células de la zona central permanecen sin infectar y constituyen las llamadas células intersticiales, que son de menor tamaño y con gran cantidad de vacuolas, y son esenciales en el metabolismo del nódulo. Estos nódulos se desarrollan en el cortex externo de la raíz y exportan el nitrógeno en forma de ureidos (Maunoury *et al.*, 2008).

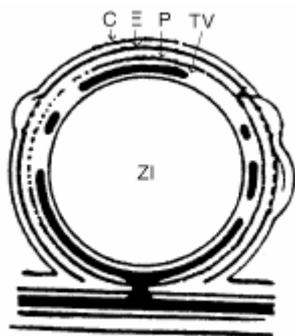


Figura 2. Nódulo determinado: cortex (C), endodermis (E), parénquima (P), tejido vascular (TV) y zona infectada (ZI) que incluye la zona fijadora de nitrógeno

Los **nódulos indeterminados** (Fig. 3) tienen forma cilíndrica y diferentes regiones en la zona central, con células que se encuentran en etapas distintas de desarrollo, debido a que poseen un meristemo persistente en el ápice. El meristemo determina que nuevas capas de células se estén añadiendo continuamente en el extremo del nódulo. Estos nódulos se desarrollan en el córtex interno de la raíz y exportan el nitrógeno en forma de amidas (Maunoury *et al.*, 2008).

En este nódulo se pueden diferenciar distintas zonas: **Zona I** o meristemática: en el ápice del nódulo, corresponde a la zona de células en proliferación, **Zona II** o de invasión: inmediatamente por debajo de la zona meristemática, es la región en la que se produce la invasión bacteriana a través de los canales de infección, las células de esta región son más grandes y vacuoladas que las meristemáticas. **Interzona II y III**: en esta franja, las células vegetales

finalizan su proceso de diferenciación, las células de esta región presentan numerosos amiloplastos así como transcritos de leghemoglobina, proteína encargada de regular la presencia del oxígeno en el nódulo. **Zona III** o de fijación: región totalmente diferenciada en la que se realiza la fijación de nitrógeno propiamente dicha, se subdivide en dos regiones: la zona de fijación y la zona ineficiente. **Zona IV** o de senescencia: región en la base del nódulo, donde las células vegetales y los bacteroides degeneran (Kahn *et al.*, 1998).

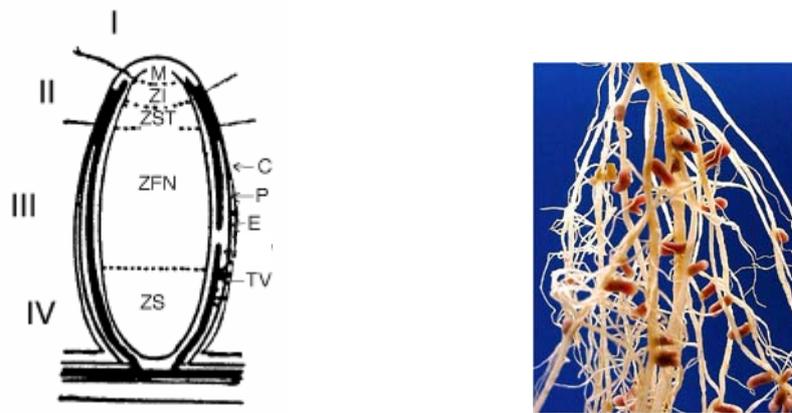


Figura 3. Nódulo indeterminado: meristemo (M), zona de invasión (ZI), zona de simbiosis temprana (ZST), zona de fijación de nitrógeno (ZFN), zona de senescencia (ZS), cortex (C), parénquima (P), endodermis (E) y tejido vascular

2.4. Bacteroide y nitrogenasa

Antes de ser fijadores de nitrógeno, se distinguen 5 formas (tipos) de bacteroides durante el proceso de diferenciación. En la zona de infección (zona II) la bacteria, que se libera del cordón de infección y se rodea de la membrana peribacteroidea, se denomina **bacteroide tipo 1**, este puede dividirse y se parece a la bacteria en vida libre en su tamaño y en su contenido citoplasmático. El **bacteroide tipo 2** abunda en la zona II proximal, se caracteriza por elongarse y detener la división celular. Los **bacteroides tipo 3** abundan en la interzona II-III, que consta de 4-5 capas de células ricas en amiloplastos. En éstas, ya se ha detenido la elongación, y se muestran casi 7 veces más largos que en vida libre, se inicia la transcripción de los genes *nif* (nitrogenasa) y *fix* (fijación). En la zona III se encuentran los **bacteroides tipo 4** que están totalmente diferenciados, son activos fijadores de nitrógeno y su adaptación en su nicho simbiótico requiere la activación de determinadas vías metabólicas y la represión de otras. La diferenciación culmina con el **bacteroide tipo 5**, que se localiza en los tejidos

senescentes del nódulo y es un bacteroide que se degrada y su número disminuye gradualmente (Kahn *et al.*, 1998).

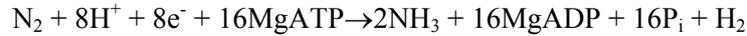
Las principales diferencias metabólicas entre bacteroides y bacterias en vida libre son: **a)** la pared celular de las bacterias en vida libre tiene lipopolisacáridos (LPS) y proteínas, mientras que los bacteroides, tienen menos cantidad de LPS, desarrollan nuevos epítomos en la membrana externa y sufren una pérdida de estructura; **b)** el metabolismo del carbono en vida libre viene realizado por vía Entner-Doudoroff y el ciclo de los ácidos tricarbónicos, mientras que en el bacteroide se recurre en cambio a la degradación de los ácidos C₄-dicarbónicos, vías fermentativas y algunas enzimas del Entner-Doudoroff; **c)** en lo referente al metabolismo del nitrógeno, la bacteria en vida libre no tiene nitrogenasa y posee el ciclo de la glutamina sintasa (GS/GOGAT), por lo que es capaz de asimilar el amonio, mientras que el bacteroide tiene una nitrogenasa activa y no tiene actividad GS/GOGAT excretando el amonio al exterior de forma pasiva; **d)** en la bacteria existen tres sistemas transportadores activos de membrana (de glucosa, de amonio y de ácidos dicarbónicos), mientras que los bacteroides carecen de los dos primeros y sólo poseen el transportador de dicarboxilatos muy activo; **e)** la respiración de las bacterias en vida libre se realiza por la vía citocrómica y los bacteroides tienen además citocromos específicos (c₅₅₀, c₅₅₂, c_{bb3}), acoplados a la fijación de nitrógeno (Cermola *et al.*, 2000).

La reducción del nitrógeno atmosférico a amonio es catalizada por el complejo enzimático **nitrogenasa** en los bacteroides. La estructura de la enzima molibdeno-nitrogenasa está muy conservada entre los distintos organismos fijadores de nitrógeno (Smith, 2002), consta de dos componentes proteicos: el **componente I** o dinitrogenasa codificado por los genes *nifD* y *NifK*, proteína heterotetramérica de tipo $\alpha_2\beta_2$ con una masa molecular de 220 kDa, que tiene un cofactor de hierro-molibdeno (FeMo-Co) con el sitio activo en cada subunidad α y un centro P entre ambas subunidades α y β . FeMo-Co está localizado 10 Å por debajo de la superficie de la proteína, y el **componente II** o dinitrogenasa reductasa codificado por los genes *NifH*, es una proteína formada por un homodímero con doble simetría (estructura α_2), cuya masa molecular es de 62 kDa y contiene un centro [4Fe-4S] entre las dos subunidades α (Rubio y Ludden, 2008).

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

- a) La reducción del componente II por una ferredoxina.
- b) La transferencia sucesiva de electrones desde el componente II al componente I, en un proceso dependiente de MgATP, con una estequiometría mínima de 2 MgATP hidrolizados por electrón transferido.

- c) La transferencia de electrones al nitrógeno, que se encuentra unido al centro activo del componente I.



El complejo nitrogenasa, simultáneamente a la reducción del N_2 , cataliza la reducción de protones a hidrógeno, lo cual le supone una limitación importante; para contrarrestar esta pérdida de eficiencia, el bacteroide es capaz de reciclar el H_2 a protones por la hidrogenasa, excepto en cepas de rizobios *hup*⁻, carentes de esta actividad. La **hidrogenasa** de *Rhizobium* es una enzima dimérica ($\alpha\beta$) que está unida a la membrana y contiene NiFe, tanto su estructura primaria como sus propiedades y sistemas auxiliares se encuentran muy conservados en bacterias muy diversas (Imperial *et al.*, 2006).

La energía necesaria para llevar a cabo el proceso de fijación de nitrógeno proviene de la fotosíntesis, desde la parte aérea, vía floema, se transporta sacarosa hasta los nódulos, donde se hidroliza a monosacáridos y se transforma en fosfoenolpiruvato. La fosfoenolpiruvato carboxilasa cataliza la conversión de fosfoenolpiruvato en oxalacetato, que se reduce rápidamente a malato, principal fuente de energía para el bacteroide y la mitocondria. La planta también suministra aminoácidos al bacteroide para suprimir la asimilación de amonio del microsimbionte y facilitar que este se transfiera al vegetal (Ramos y Bisseling, 2003).

El amonio, tóxico para la planta, es incorporado inmediatamente a esqueletos carbonados, principalmente a través del ciclo GS/GOGAT. La glutamina puede donar su grupo amida al aspartato formando asparagina, principal amida transportada por el xilema a la parte aérea en algunas leguminosas. El amonio, una vez asimilado, puede ser exportado en forma de amidas o ureidos, las **leguminosas de climas templados** como *Medicago*, *Pisum*, *Trifolium* y *Lupinus* (nódulos indeterminados) exportan nitrógeno fijado en los nódulos en forma de amidas: glutamina, asparagina y 4-metilenglutamina y las **leguminosas de clima tropical y subtropical** *Glycine*, *Phaseolus* y *Vigna* (nódulos determinados) el nitrógeno fijado es inicialmente incorporado en asparagina, aspartato, glutamina y glutamato, pero después son metabolizados en los nódulos en forma de ureidos: alantoína, ácido alantoico y citrulina, los cuales se incorporan a la corriente xilemática (Vance, 2008).

3. Estrés abiótico: salinidad

La producción de alimentos a nivel mundial necesitaría incrementarse en un 38% antes de 2025 y un 57% antes de 2050 (Wild, 2003); sin embargo, la mayor parte de la tierra cultivable está ya en uso y la implementación de nuevas áreas de cultivo para aumentar la producción es difícil. Apuntes de la FAO (2008) estiman que cerca del 15% del área de tierra total del mundo está afectada por la erosión del suelo, la degradación física y química y la **salinización**, que implica a más de 800 millones de hectáreas en el mundo. El valor umbral relativo de los efectos negativos provocados por la salinidad puede variar dependiendo de varios factores como el tipo de planta, régimen de riego y la textura y calidad del suelo (Kutuk *et al.*, 2004). El problema de la salinidad en los suelos agrícolas se conoce desde tiempos remotos, en la actualidad incluye más de 100 países y se ve agravada cada día más por el uso de aguas de riego con alto contenido salino (Munns y Tester, 2008).

El principal origen de la salinidad en el suelo está relacionado con la acumulación de sales durante largos periodos en zonas áridas y semiáridas, sin embargo otras causas naturales como la erosión de la roca que libera sales, principalmente cloruros de sodio, calcio y magnesio y en menor medida sulfatos y carbonatos, también contribuyen a elevar la salinidad en el suelo (Odeh y Onus, 2008). A parte de estos procesos naturales, la salinidad también puede ser provocada por la excesiva fertilización y la utilización de agua de riego de mala calidad, las sales introducidas por el agua de riego se acumulan en las raíces especialmente cuando la lixiviación es escasa (Rengasamy, 2006).

3.1. Efectos del estrés salino en las plantas

El principal efecto fisiológico de la salinidad sobre las plantas es la reducción del crecimiento debido a: un **efecto osmótico** inducido por la disminución del potencial osmótico del medio; una **toxicidad específica**, normalmente asociada con la absorción excesiva de iones Na^+ y de Cl^- ; un desequilibrio nutricional debido a la interferencia de los iones salinos con los nutrientes esenciales; y la combinación de los efectos antes indicados. Como consecuencia de estos efectos primarios también se produce un **daño oxidativo** (Zhu, 2001).

3.1.1. Osmótico

El daño osmótico comienza inmediatamente después de que la concentración de NaCl en la rizosfera aumenta por encima del nivel de tolerancia de la planta, este efecto reduce el agua disponible para las raíces al disminuir el potencial hídrico del suelo, como consecuencia se inhibe el crecimiento, se reduce

la división y la elongación celular y disminuye el área foliar y la tasa fotosintética (Manchanda y Garg, 2008). Sin embargo, en estas condiciones la planta produce un mayor número de raíces secundarias para la búsqueda de agua, y como resultado la relación raíz/parte aérea aumenta (Hasegawa *et al.*, 2000; Tejera *et al.*, 2005). Los procesos celulares y metabólicos implicados en esta respuesta a la salinidad son comunes en plantas afectadas por la sequía.

3.1.2. Iónico

Además del daño osmótico se incrementa en la planta la concentración de sales que provoca la acumulación de iones tóxicos como Cl^- y Na^+ en el apoplasto deshidratando la célula, en el citoplasma inhibiendo las enzimas esenciales del metabolismo, y en el cloroplasto ejerciendo un efecto tóxico directo sobre el proceso fotosintético (Geissler *et al.*, 2008). Por otra parte se produce también un desbalance nutricional provocado por el impacto negativo que ejerce la presencia de Na^+ celular o extracelular (apoplasto) en la homeostasis de nutrientes esenciales como K^+ y Ca^+ (Tejera *et al.*, 2006).

3.1.3. Oxidativo

Un aspecto secundario de la salinidad en plantas es el estrés inducido por la producción de especies activas/reactivas de oxígeno (EROs) en las que se incluyen el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical superóxido (O_2^-), radical hidroxilo (OH^\cdot), oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), ozono (O_3), alcoxilo (RO^\cdot), peroxilo (RO_2^\cdot) e hidroperoxilo (HO_2^\cdot).

Este daño oxidativo inducido por el estrés salino se manifiesta por la alteración de biomoléculas fundamentales como azúcares, lípidos, proteínas, DNA y vitaminas (Foyer y Noctor, 2005). Las EROs actúan a nivel de las cadenas laterales de los residuos aminoácidos fragmentando la **proteína** o formando uniones entre ellas (Therond *et al.*, 2000). Los **ácidos grasos**, que no sólo actúan como reserva metabólica sino que además forman parte de los fosfolípidos de membrana y regulan la fluidez de ésta, son particularmente susceptibles al ataque por EROs generando peróxidos de lípidos (Koca *et al.*, 2007). La peroxidación conlleva cambios importantes en la estructura y función de las membranas, alterando la compartimentación de iones y pérdida del potencial eléctrico, inhibiendo el transporte de metabolitos, modificando los receptores de hormonas, y la producción de mensajeros químicos (Nandwal *et al.*, 2007). El estrés oxidativo ocasiona también la alteración y ruptura en la cadenas de **ADN** que reaccionan con OH^\cdot , no con O_2^- ni H_2O_2 , pudiéndose originar mutaciones (Moller *et al.*, 2007).

3.2. Efectos del estrés salino en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa

3.2.1. Infección y desarrollo del nódulo

El estrés salino puede afectar a la simbiosis de leguminosas con rizobios indirectamente, reduciendo el crecimiento de la planta hospedadora y afectando a determinados procesos fisiológicos de la planta, o directamente inhibiendo el proceso de infección de los pelos radicales por rizobio y desarrollo del nódulo (Zahran, 1999). En plantas de guisante se ha observado que la salinidad inhibe los puntos de infección, y el tamaño y el número de nódulos es menor (Borucki y Sujkowska, 2008), y en *Vicia faba* el cordón de infección (Zahran y Sprent, 1986). Sin embargo, una estimulación del crecimiento del nódulo ha sido observada en algunas leguminosas en condiciones de estrés salino como cultivares tolerantes de garbanzo (Soussi *et al.*, 1999) o algunas líneas de *Medicago truncatula* (Aydi *et al.*, 2004). Las etapas iniciales de la nodulación son más sensibles al estrés salino que las posteriores (Cordovilla *et al.*, 1999b).

3.2.2. Actividad nitrogenasa y respiración nodular

La actividad nitrogenasa se inhibe con la salinidad (Aydi *et al.*, 2008) y por ello, el contenido de nitrógeno total en la planta disminuye (Salehi *et al.*, 2008). La reducción de la actividad fijadora de N₂ por el estrés salino, está habitualmente atribuida a la reducción de la respiración del nódulo, como consecuencia de una limitación de O₂, del sustrato (Soussi *et al.*, 2001; Serrat, 2002) o a un descenso en la producción de proteína citosólica, especialmente la leghemoglobina por los nódulos (Delgado *et al.*, 1994; López *et al.*, 2008a).

3.2.3. Metabolismo del carbono

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, y procede de la fotosíntesis vía floema (Gordon *et al.*, 1987). La sacarosa no puede ser directamente utilizada por los bacteroides, siendo hidrolizada en el citoplasma de la célula vegetal por dos catálisis enzimáticas, la invertasa alcalina (IA) y/o sacarosa sintasa (SS), siendo esta última la prioritaria (Kahn *et al.*, 1998). Durante el estrés salino se produce un descenso tanto en la actividad SS como en la IA, que está correlacionado con una caída en la tasa de fijación de nitrógeno (López y Lluch, 2008). Este efecto en la actividad SS de nódulo es probable que esté regulado por el estado redox de la célula tanto a nivel transcripcional como post-transduccional (Marino *et al.*, 2008).

La salinidad produce en nódulos de *M. truncatula* una inhibición de las actividades enzimáticas fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y malato deshidrogenasa (MDH) responsables de proporcionar a los bacteroides la fuente de

carbono a partir de las hexosas-6P (López *et al.*, 2008a). En nódulos de guisante, estas actividades enzimáticas tienen el mismo comportamiento en condiciones de estrés hídrico (Gálvez *et al.*, 2005), sin embargo la actividad isocitrato deshidrogenasa (ICDH) incrementa para compensar el déficit de carbono y mantener así la relación carbono/nitrógeno, además de proporcionar niveles altos de NADPH (González *et al.*, 2001b). 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-glutacion (Marino *et al.*, 2007).

3.2.4. Metabolismo de asimilación de amonio

Las enzimas implicadas en este proceso como la glutamina sintetasa (GS) y la NADPH-glutamato sintasa (GOGAT) disminuyeron su actividad en nódulos de *Vigna radiata* en estrés salino, detectándose una mayor inhibición en la segunda (Chakrabarti y Mukherji, 2003). Khadri *et al.* (2001), observó el mismo efecto en nódulos de *P. vulgaris*, donde además también se produjo una caída de la actividad xantina deshidrogenasa y uricasa, con la consiguiente reducción del contenido de ureidos e incremento del contenido de aminoácidos. Por el contrario, en nódulos de soja en condiciones de estrés hídrico se incrementan los ureidos, pero no en parte aérea, pudiendo estar relacionado con la inhibición de la fijación de nitrógeno en estas condiciones (Ladrera *et al.*, 2007). En nódulos indeterminados el principal aminoácido transportado a la planta procedente de la fijación es la asparagina, sintetizado por la asparagina sintetasa, aunque en nódulos determinados también está presente, y tiene una elevada actividad en las primeras etapas del desarrollo nodular cuando todavía no hay fijación efectiva, indicando que esta actividad estaría implicada en los procesos de crecimiento (Gálvez-Valdivieso *et al.*, 2005), además se mantiene la actividad en presencia de nitrato en el medio, un inhibidor de la fijación de nitrógeno (Antunes *et al.*, 2008).

3.2.5. Producción de especies reactivas del oxígeno

La invasión de *Rhizobium* induce un burst oxidativo que eleva la producción de EROs en los nódulos de leguminosas, ya que poseen: **a)** alta tasa de respiración debido a la gran demanda de energía necesaria para la fijación de N_2 , como en otros tejidos, las mitocondrias de los nódulos generan O_2^- y H_2O_2 ; **b)** la ferredoxina, el reductor fisiológico de la nitrogenasa, puede generar radical O_2^- ; **c)** la mayoría de los rizobios contienen hidrogenasa (cepas hup^+), una enzima asociada a membrana que cataliza la oxidación de H_2 a H_2O , su actividad catalítica da lugar también a la producción de O_2^- ; **d)** los nódulos determinados contienen en general grandes cantidades de uricasa, enzima localizada en los peroxisomas y que

participa en la biosíntesis de ureidos, pudiendo dar lugar a la formación de cantidades importantes de H_2O_2 (Becana *et al.*, 2000).

Esta producción de EROs se potencia por el efecto oxidativo que se induce por el estrés salino, lo que va a influir en el suministro de O_2 a la zona central o infectada del nódulo, que está controlada por una barrera variable a la difusión de O_2 localizada en el córtex interno (Rubio *et al.*, 2008). La estructura y el mecanismo bioquímico de la barrera a la difusión de oxígeno no se conocen con exactitud, pero se acepta de modo general que esta barrera es esencial para regular la difusión de O_2 en respuesta a los cambios ambientales, y para evitar el daño oxidativo en la zona central del nódulo manteniendo una fijación de N_2 óptima (Wei y Layzell, 2006). Por otra parte, la leghemoglobina (Lb) está presente en todos los nódulos efectivos y está constituida por una proteína de 16 kDa y un grupo protohemo IX que se une reversiblemente al O_2 . La Lb mantiene en la zona infectada del nódulo una concentración de O_2 de 10-50 nM, lo cual evita la inhibición de la nitrogenasa a la vez que asegura el aporte del O_2 necesario para la respiración de los bacteroides, evidenciándose un papel crucial en la fijación de nitrógeno (Ott *et al.*, 2005). Sin embargo, debido a sus reacciones con el O_2 , la Lb constituye una de las principales fuentes de EROs en el interior de los nódulos (Gunther *et al.*, 2007).

3.3. Mecanismos fisiológicos de tolerancia a la salinidad en la planta

3.3.1. Inclusión y exclusión de iones

Los daños producidos por el exceso de iones tóxicos en la planta son mitigados mediante dos estrategias: evitando la entrada de sal en el vegetal y contrarrestando la concentración de iones tóxicos en el citosol de las células (Munns y Tester, 2008). Para la mayoría de las especies vegetales incluidas las leguminosas, el Na^+ alcanza concentraciones superiores y es más tóxico que el Cl^- , ya que su entrada en las células radicales se realiza mediante transporte pasivo a través de canales no selectivos de cationes que transportan Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y NH_4^+ , formados por proteínas de membrana que permiten el movimiento de iones a favor del gradiente electroquímico (Demidchik *et al.*, 2002). En condiciones de elevada salinidad, este ión también se incorpora a través de canales de K^+ de alta afinidad pertenecientes a la familia HKT (Tester y Davenport, 2003). La mayor parte del Na^+ que entra en las células radicales, es exportado al medio externo mediante antiportadores Na^+/H^+ presentes en la membrana plasmática, y este transporte está acoplado por una H^+ -ATPasa de membrana. Los genes que codifican para estos antiportadores Na^+/H^+ han sido identificados en *Arabidopsis thaliana* y pertenecen a la familia SOS (Qiu *et al.*, 2003). La sobreexpresión de *AtSOS1* mejoró la tolerancia a la salinidad en *A. thaliana*, disminuyendo la acumulación de Na^+ en las células de la planta (Shi *et al.*, 2003). El Na^+ que aun queda en las células de la raíz

puede ser secuestrado en el interior de la vacuola o bien exportado a la parte aérea. La compartimentación en vacuola se realiza mediante otros antiportadores Na^+/H^+ que hay en su membrana y que pertenecen a la familia *NHX* en *A. thaliana* (Pardo *et al.*, 2006).

Las acuaporinas son proteínas de membrana, que tienen un papel importante en la ingesta y movimiento de agua, moléculas de bajo peso molecular y gases en la planta (Katsuhara y Hanba, 2008). Las acuaporinas se dividen en cuatro grupos basados en semejanzas en su secuencia de aminoácidos: proteínas intrínsecas de la membrana plasmática (PIPs), proteínas intrínsecas del tonoplasto (TIPs), nodulina (NIPs) y proteínas intrínsecas pequeñas básicas (SIPs) (Luu y Maurel, 2005). Sin embargo, en estrés hídrico su función es compleja, porque la expresión de diferentes genes de acuaporinas puede ser estimulada, reducida o permanecer sin cambios (Maurel y Chrispeels, 2001). En plantas transgénicas de *A. thaliana* y tabaco que sobreexpresan acuaporinas de membrana plasmática se produce una rápida pérdida de agua en condiciones de estrés hídrico y salino, que provoca una reducción del crecimiento (Jang *et al.*, 2007), sin embargo en judía el incremento de la expresión del gen *PIP1* y de la proteína PIP1 en hojas en sequía, esta correlacionado con una disminución de la tasa de transpiración (Aroca *et al.*, 2006). En la membrana peribacteroidal también existe una proteína de membrana denominada Nodulina 26, que es una acuaporina importante para el transporte de agua y algunos solutos en el nódulo (Kaldenhoff y Fischer, 2006).

3.3.2. Síntesis de osmolitos

Las concentraciones vacuolares de Na^+ y Cl^- requieren una disminución coordinada del potencial osmótico en otros compartimientos subcelulares, incluido el citosol, que deben mantener su volumen, lo cual se consigue con el incremento en la concentración de K^+ y de solutos orgánicos (Munns y Tester, 2008). Estos últimos, conocidos con el término **soluto compatible** (Wyn Jones *et al.*, 1977), se refieren a moléculas no tóxicas compatibles con la actividad metabólica incluso a altas concentraciones e incluyen azúcares (sacarosa, glucosa, trehalosa), polioles (pinitol, mioinositol, ononitol, sorbitol, manitol), aminoácidos, prolina, glicina-betaína (Hasegawa *et al.*, 2000). Su síntesis, a pesar de conllevar un coste energético para la planta y realizarse a expensas del crecimiento vegetal, permite la supervivencia y/o adaptación al estrés.

En condiciones de salinidad estos solutos son importantes para: mantener ajuste osmótico y el turgor celular, evitar la deshidratación celular, estabilizar y proteger la estructura terciaria de proteínas y de membranas, y destruir EROs (Rhodes *et al.*, 2002). Los estudios sobre genes que controlan la síntesis o el metabolismo de estos solutos indican su papel esencial en la tolerancia a estreses abióticos (Chen *et al.*, 2002).

Varios estudios fisiológicos han demostrado que en estrés salino, carbohidratos no estructurales como la sacarosa, hexosas o polioles, se acumulan en diferente grado según la especie vegetal (Ashraf y Harris, 2004). 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 además de actuar para el equilibrio osmótico, también funcionan como moléculas protectoras asociadas a la transducción de señales (Bartels y Sunkar, 2005).

Los **polioles** o hidratos de carbono con grupos alcohol cíclicos, se relaciona con la tolerancia al estrés osmótico en un elevado número de plantas, ya que son uno de los metabolitos que se acumulan en este tipo de estrés (Murakeozy *et al.*, 2002). El D-pinitol es el principal polirol en las familias *Pinaceae*, *Leguminosae* y *Caryophyllaceae*, asociado con el estrés hídrico (Streeter *et al.*, 2001), con el desarrollo del embrión (Gosslova *et al.*, 2001) y la nodulación de leguminosas (Streeter, 1980). La biosíntesis del pinitol ocurre en dos etapas a partir de su precursor, el mioinositol, en la primera el grupo metilo de la S-adenosil-metionina, es transferido al mioinositol por la mio-inositol O-metil transferasa (IMT) formando ononitol, que mediante la ononitol epimerasa (OEP1) formará el pinitol (Chiera *et al.*, 2006). En plantas transgénicas de soja que sobreexpresan la enzima IMT, se ha observado que el mioinositol puede limitar los niveles de ononitol, y por lo tanto la producción de pinitol (Chiera *et al.*, 2006). La elevada acumulación de pinitol en la halófito *Mesembryanthemum crystallinum* (Paul y Cockburn, 1989), permite estudiar con detalle la expresión génica de la IMT, observándose que el gen que codifica la enzima en la planta se induce transcripcionalmente en respuesta al estrés, como respuesta adaptativa de la planta (Sengupta *et al.*, 2008). En general, los polioles alcanzan concentraciones elevadas en especies de plantas tolerantes a la sal y a la sequía, y sus propiedades químicas y su naturaleza inerte, los convierte en moléculas ideales para actuar como solutos compatibles o moléculas protectoras en tejidos (McManus *et al.*, 2000).

La prolina se acumula en distintos organismos como plantas, eubacterias, invertebrados marinos, protozoos y algas, cuando están expuestos a condiciones de estrés como sequía, salinidad, altas temperaturas, congelación, radiación ultravioleta y metales pesados (Demir y Ozturk, 2003). La importancia de este aminoácido en la osmotolerancia en plantas ha sido ampliamente discutido (Serraj y Sinclair, 2002), puesto que en situación de estrés, aunque puede actuar como mediador del ajuste osmótico (Yamchi *et al.*, 2007), sin embargo, la concentración de prolina en algunas plantas no es lo suficientemente alta, por lo que podría tener otras funciones, como estabilizar estructuras celulares (Holmstrom *et al.*, 2000), eliminar radicales libres (Hoque *et al.*, 2007), detoxificar metales pesados (Rai,

2002) o activar respuestas específicas del estrés actuando como molécula señal (Maggio *et al.*, 2003).

3.3.3. Respuesta antioxidante

La acumulación de EROs durante el estrés salino provoca efectos adversos en la planta, por lo que ésta ha desarrollado mecanismos de defensa mediante la producción de un complejo sistema antioxidante formado por moléculas no enzimáticas y enzimáticas que controlan el nivel de EROs, y mitigan y reparan el daño oxidativo celular causado por ellas (Miller *et al.*, 2008). Recientemente se ha avanzado en la implicación de las EROs en las plantas como moléculas asociadas a la de transducción señales que se desencadena ante las situaciones de estrés (Foyer y Noctor, 2009).

A) Antioxidantes no enzimáticos

Entre los componentes no enzimáticos destacan los carotenoides, tocoferoles, flavonoides, ascorbato y glutatión, que funcionan directamente como sistema de defensa antioxidante, o indirectamente como cofactores de distintas actividades enzimáticas (Shao *et al.*, 2008).

1) El α -tocoferol (vitamina E) es soluble asociado a las membranas celulares, especialmente a la del cloroplasto (Fey *et al.*, 2005), y elimina productos derivados de la oxidación lipídica (peróxidos lipídicos), de esta forma protege a los lípidos y otros componentes de la membrana cloroplastidial y mantiene la estructura y funcionamiento del fotosistema II (Krieger-Liszkay y Trebst, 2006). La unión del α -tocoferol con los peróxidos de lípidos producen un radical oxidado del tocoferol (tocoferoxil) que puede transformarse en α -tocoferol reaccionando con el ascorbato u otros antioxidantes (Igamberdiev y Hill, 2004). Shao *et al.* (2007) han destacado que el déficit hídrico provoca un aumento de la concentración de α -tocoferol en tejidos vegetales.

2) El ascorbato o vitamina C, en su forma reducida (AsA) juega un papel importante en el crecimiento, desarrollo y en la respuesta al estrés en la planta (Debolt *et al.*, 2007). Es un compuesto reductor hidrosoluble abundante en plantas, identificado en distintos tipos de células, orgánulos y en el apoplasto. El último paso en la ruta de síntesis del ascorbato a partir de la D-glucosa, está catalizado por L-galactano- γ -lactona deshidrogenasa y ocurre en la membrana mitocondrial (Ishikawa y Shigeoka, 2008). El ascorbato reducido actúa como cofactor de enzimas antioxidantes que destruyen diferentes EROs (ciclo ascorbato-glutatión), o directamente sobre éstas. El mecanismo de acción implica la capacidad del anión ascorbato (forma desprotonada predominante en condiciones fisiológicas) para donar un electrón a las EROs y formar el monodeshidroascorbato (MDHA). La oxidación posterior del MDHA, por cesión de un segundo electrón, da lugar al

dehidroascorbato (DHA), que reacciona no sólo con H_2O_2 , sino también con O_2^- , OH^- e hidroperóxidos de lípidos (Shao *et al.*, 2006). El AsA influye en diferentes actividades enzimáticas, y reduce el daño oxidativo en una función sinérgica con otros antioxidantes (Foyer y Noctor, 2005).

3) El **glutation** es un tiol tripéptido (ácido glutámico-glicina-cisteína), detectado en citosol, cloroplastos, retículo endoplásmico, vacuolas y mitocondrias (Millar *et al.*, 2003). Su síntesis implica dos etapas dependientes de ATP, la primera catalizada por la enzima γ -glutamylcisteina sintetasa, y la segunda por la glutathione sintetasa (Herrera *et al.*, 2007). El glutathione reducido (GSH) actúa destruyendo EROs directamente, o a través del ciclo ascorbato-glutation. Su función como antioxidante reside en el grupo sulfidrilo de la cisteína, el cual tras oxidarse establece un puente disulfuro con el grupo tiol de una segunda molécula de GSH para formar glutathione oxidado (GSSG, de esta forma elimina por reacción directa el $\cdot OH$, el O_2^- y radicales orgánicos, además participa en la reducción del DHA a AsA, mediante la reacción catalizada por la dehidroascorbato reductasa. La función del GSH se hace más evidente en condiciones de estrés (Foyer *et al.*, 2001).

También posee otras funciones como: **a)** el transporte y almacenamiento de azufre; **b)** control del estado redox de la célula; **c)** protección de los grupos tiol de las proteínas; **d)** participación en el ciclo celular; **e)** inducción de expresión de genes de defensa ante patógenos; **e)** percepción y respuesta ante el estrés abiótico actuando como sensor celular; **f)** producción de fitoquelatinas; **g)** desintoxicación de metales pesados y xenobióticos (Foyer y Noctor, 2005).

B) Antioxidantes enzimáticos

Están constituidos por un conjunto de enzimas, localizadas en diferentes compartimentos celulares, superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasas (POX) y las enzimas del ciclo Halliwell-Asada o ascorbato-glutation: ascorbato peroxidasa (APX), dehidroascorbato reductasa (DHAR), monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) y glutathione reductasa (GR) (Foyer, 2002).

1) La **superóxido dismutasa** es una metaloenzima que lleva a cabo la eliminación del O_2^- mediante una reacción de dismutación (Rubio *et al.*, 2007). Existen tres tipos de SODs dependiendo del metal que utilizan como cofactor: cobre y zinc (CuZnSOD), manganeso (MnSOD) o hierro (FeSOD), los tres tipos de enzimas son codificados por genes nucleares y sintetizadas en el citoplasma. En general, las CuZnSODs se localiza en cloroplastos, peroxisomas y citosol, las MnSODs en mitocondrias y peroxisomas, y las FeSODs en cloroplastos (Alscher *et al.*, 2002).

2) La **catalasa** es una hemoproteína tetramérica ampliamente distribuida en las plantas, elimina el H_2O_2 sin requerir el aporte de poder reductor, al contrario que en las reacciones catalizadas por las peroxididasas, pero esta aparente ventaja está compensada por la baja afinidad (K_m 1M) de la enzima por el H_2O_2 , lo que determina que sea poco eficiente en la eliminación de concentraciones bajas de H_2O_2 . En plantas la mayoría de la CAT está localizada en los peroxisomas donde la concentración de H_2O_2 es muy alta, sin embargo está ausente en citosol y cloroplastos, donde la eliminación del H_2O_2 es llevada a cabo por la APX y por otras POX (Feierabend, 2005).

3) Las **peroxididasas** pertenecen a una gran familia de enzimas que se encuentran en hongos, plantas, y vertebrados. En plantas, el número de isoenzimas puede ser extremadamente alto, hasta 40 genes codifican para las POX en una planta, y varias modificaciones postranscripcionales y postransduccionales pueden generar otras isoformas (Balen *et al.*, 2003), además el patrón de expresión es específico del tejido (Hiraga *et al.*, 2000). Catalizan la destrucción del H_2O_2 pero estas enzimas necesitan un donador de electrones que es desconocido *in vivo*, por lo se denominan “no específicas”. Las peroxididasas que oxidan guaiacol *in vitro*, se llaman de forma genérica guaiacol peroxididasas (GPX) y se localizan en citosol, vacuola, pared celular y apoplasto (Ghamsari *et al.*, 2007). A parte de su función como antioxidantes, las peroxididasas pueden participar en diferentes procesos fisiológicos, como, alargamiento de la célula, biosíntesis y degradación de lignina, catabolismo de auxina y respuesta de defensa en heridas (Yoshida *et al.*, 2003).

4) El ciclo **ascorbato-glutation** o de Halliwell-Asada (Fig. 4) es uno de los principales sistemas antioxidantes en plantas, ubicado en diferentes orgánulos celulares como cloroplasto, plastidios, mitocondrias y peroxisomas (Mittova *et al.*, 2004). La función es eliminar el H_2O_2 , utilizando el poder reductor del NAD(P)H. En la reacción inicial, catalizada por la APX; el H_2O_2 es reducido a agua utilizando AsA, el producto inicial es el MDHA (o radical ascorbato), que puede oxidarse espontáneamente a DHA. El AsA puede ser regenerado, bien a partir del MDHA por la MDHAR con oxidación de NADH, o a partir del DHA por la DHAR utilizando GSH como poder reductor; a su vez, el GSH consumido puede regenerarse a partir de la forma oxidada (GSSG) por la acción de la GR (Foyer y Noctor, 2009).

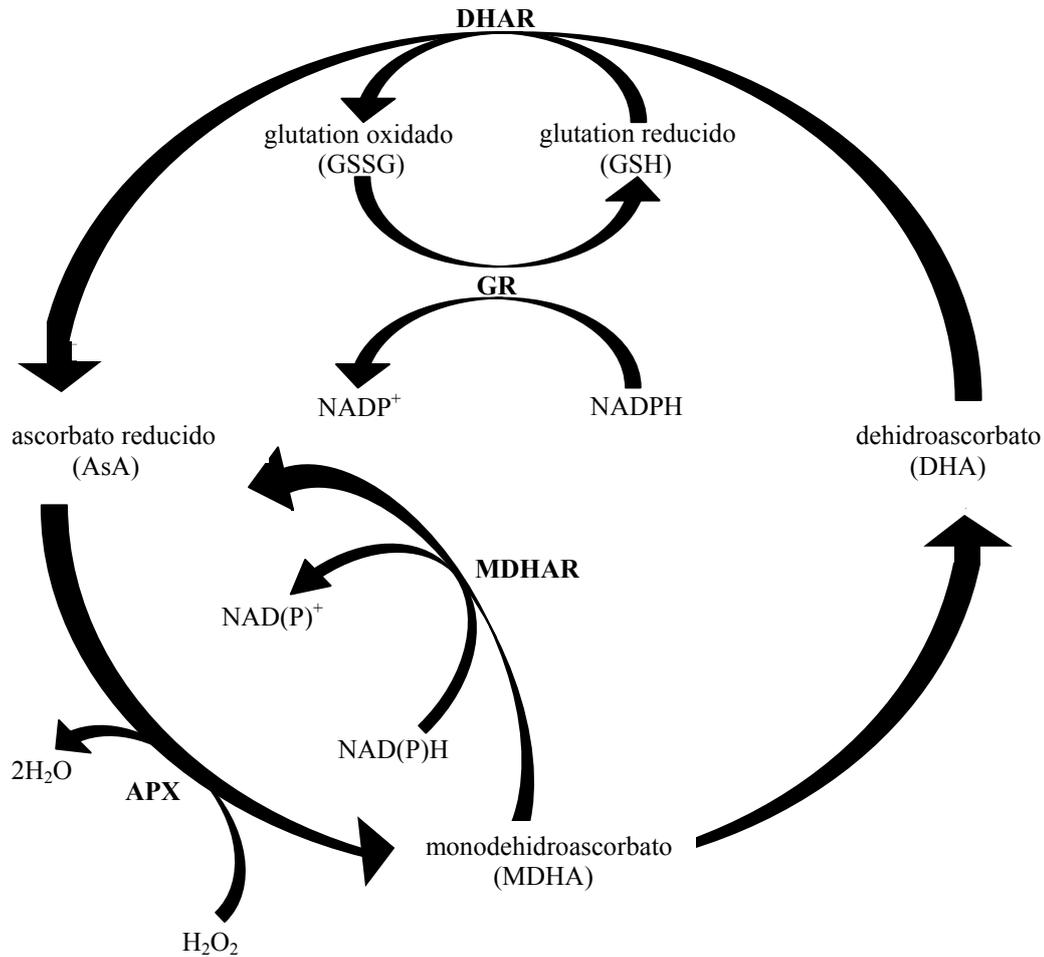


Figura 4. Ciclo ascorbato-glutation. Las abreviaturas de los productos se refieren a: nicotinamina adenin dinucleótido (NAD), nicotinamida adenin dinucleótido reducido (NADH), nicotinamina adenin dinucleótido fosfato (NADP), nicotinamida adenin dinucleótido fosfato reducido (NADPH). Las abreviaturas de las enzimas se refieren a: ascorbato peroxidasa (APX), monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) glutatión reductasa (GR) y dehidroascorbato reductasa (DHAR)

3.3.4. Proteínas de estrés

Un elevado número de genes participan en la respuesta de las plantas al estrés osmótico, entre ellos, los que codifican para las proteínas abundantes en la embriogénesis tardía o proteínas **LEA** (**L**ate **E**mbriogenesis **A**bundant) (Garay-Arroyo *et al.*, 2000). Estas proteínas se acumulan en la fase tardía de la embriogénesis, cuando la semilla pierde la mayor parte de su contenido de agua y también son inducidas en los tejidos vegetativos en respuesta al estrés hídrico, salino y bajas temperaturas (Verdoy *et al.*, 2006). Las proteínas LEA protegen la

planta frente al estrés salino disminuyendo el potencial hídrico de la célula, estabilizando la estructura de la membrana y destruyendo EROs (Alsheikh *et al.*, 2003). Sin embargo la sobreexpresión de uno o dos genes *LEA* no es suficiente para incrementar la tolerancia al estrés de las plantas transgénicas, sino que es necesario la sobreexpresión de un grupo de genes que codifiquen para proteínas protectoras (Cong *et al.*, 2008). Además de las proteínas *LEA*, existen otras como las proteínas de respuesta a la desecación **RD** (**R**esponse **D**esiccation), **ERD** (**Ea**Rly **D**ehydration-inducible), **DRE** (**D**rought **R**esponsive **E**lement), **ABRE** (**AB**scisic acid **R**esponse **E**lement), **MAPK** (**M**itogen **A**ctivated **P**rotein **K**inase), dehidrinas y **HSP** (**H**eat **S**hock **P**rotein) (Qureshi *et al.*, 2007).

3.4. Mecanismos fisiológicos de tolerancia a la salinidad en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa

3.4.1. Síntesis de osmolitos

La concentración de azúcares solubles aumenta en nódulos de leguminosas en respuesta al estrés salino favoreciendo la adaptación, entre ellos se encuentra el disacárido trehalosa que abunda en nódulos de *Lotus japonicus* (López *et al.*, 2006). En nódulos de *M. truncatula* en estas condiciones se produce una inhibición de la expresión del gen que codifica para la trehalasa, enzima que degrada la trehalosa (López *et al.*, 2008b). Además la salinidad, provoca un incremento en el contenido de aminoácidos en nódulos de judía, que puede estar relacionado con el ajuste osmótico o con la degradación de proteínas (Tejera *et al.*, 2005), y en transgénicas de *M. truncatula* provoca la acumulación de prolina, que mejora el crecimiento y la fijación de nitrógeno (Verdoy *et al.*, 2006).

3.4.2. Respuesta antioxidante

En los nódulos de leguminosas también existe el complejo sistema antioxidante mencionado anteriormente, que controlan el contenido de EROs, y protege la estructura nodular y el proceso de fijación de nitrógeno en condiciones de estrés (Rubio *et al.*, 2008).

A) Antioxidantes no enzimáticos

El **ascorbato** y el **glutation** se relacionan con la **senescencia** del nódulo, observándose durante el desarrollo nodular una relación directa entre el proceso de fijación de nitrógeno y el contenido de ambos metabolitos (Groten *et al.*, 2005), así como en respuesta al **estrés** (Nandwal *et al.*, 2007).

En la síntesis de glutatión y homoglutatión en *Lotus japonicus* están implicados tres genes que codifican para las enzimas γ -glutamilcisteína sintetasa, homoglutatión sintetasa y glutatión sintetasa, los niveles de transcritos, actividades

enzimáticas y contenido de glutatión en nódulos, raíz y hoja revelan que los dos primeros genes se expresan en los tres órganos, sin embargo el gen que codifica para la glutatión sintetasa es significativamente funcional sólo en nódulo (Matamoros *et al.*, 2003a). Los bacteroides poseen altas concentraciones de glutatión reducido (Moran *et al.*, 2000), que puede ser consumido internamente en reacciones metabólicas o exportado a la planta para mantener el estado redox (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2001). Mutantes de *Rhizobium tropici* deficientes en la síntesis de glutatión reducido, son sensibles al estrés osmótico y oxidativo, y la adición exógena de éste restaura la respuesta al estrés (Ricciolo *et al.*, 2000).

B) Antioxidantes enzimáticos

En los nódulos de *L. japonicus* se producen cambios en la expresión y en la actividad de las distintas **SODs**, apreciándose que en nódulos maduros y senescentes la actividad CuZnSOD citosólica disminuye, sin embargo se produce una inducción de la actividad FeSOD citosólica, manteniéndose el nivel de actividad SOD alto en las distintas etapas del desarrollo nodular (Rubio *et al.*, 2007). En nódulos de *P. vulgaris* expuestas a salinidad se observa un incremento de la actividad SOD (Tejera *et al.*, 2004), y en transgénicas de *M. sativa* que sobreexpresan *SOD* se ha detectado un incremento de tolerancia al estrés hídrico (Rubio *et al.*, 2002).

En nódulos de *M. sativa* y de *P. vulgaris* la **CAT** se inhibe con el tratamiento salino (Tejera *et al.*, 2007), esta disminución es proporcional a la de la fijación de nitrógeno, confirmando la relación entre la actividad y el funcionamiento de la simbiosis (Mhadhbi *et al.*, 2004).

La actividad **POX** es inducida por el estrés salino en plantas de garbanzo inoculadas con diferentes cepas de *Rhizobium*, y se ha observado que la simbiosis más tolerante es la que tiene mayor actividad POX nodular (Mhadhbi *et al.*, 2004). Jebara *et al.* (2005) encontraron diferentes isoformas de POX en nódulos de *P. vulgaris*, sin embargo en el microsimbionte (*R. tropici* CIAT899) en vida libre no detectaron ninguna.

Los nódulos radicales durante su ontogenia así como en situaciones de estrés presentan elevadas actividades de las enzimas del ciclo **ascorbato-glutatión**, eliminando el H₂O₂ generado (Foyer *et al.*, 2001). Sin embargo, en nódulos de *P. vulgaris* la salinidad produce una inhibición de las enzimas del ciclo, excepto de la actividad DHAR encargada de regenerar el ascorbato, este descenso está correlacionado con la inhibición de la actividad nitrogenasa (Tejera *et al.*, 2004).

4. Hormonas vegetales en la simbiosis: respuestas ante el estrés salino

Las hormonas vegetales regulan el crecimiento y desarrollo del vegetal, y están involucradas en la red de señales que se establecen en la planta (incluso en simbiosis) en respuesta a un amplio rango de estreses bióticos y abióticos. Las plantas producen una gran variedad de hormonas entre las que se incluyen las auxinas, giberelinas, ácido abscísico, citoquininas, ácido salicílico, etileno, ácido jasmónico, brasinoesteroides y péptidos-hormonas. Recientemente las estringolactonas se han identificado como una nueva clase de hormonas (López-Raez *et al.*, 2008; Umehara *et al.*, 2008) y también se postulan como nuevas moléculas hormonales el óxido nitroso (NO) y la glucosa (McSteen y Zhao, 2008).

La identificación y caracterización de mutantes afectadas en la biosíntesis, en la percepción, y/o en la **transducción de señales** de estas moléculas es un instrumento valioso para lograr entender el papel individual de cada hormona en la respuesta que conducen a la defensa y/o adaptación al estrés. Ahora que la mayoría de los receptores de las hormonas vegetales señaladas han sido identificados se ha evidenciado que hay estrategias comunes utilizadas para transmitir determinadas respuestas hormonales, aunque cada hormona tenga su propia y específica vía de regular el efecto que induce (McSteen y Zhao, 2008). Actualmente se conocen algunos aspectos, de forma individual y específica, de la percepción, transducción de señales, homeostasis o influencia en la expresión de genes, sin embargo el mecanismo por el cual la planta integra los cambios inducidos por el estrés a nivel hormonal, así como el inicio de las respuestas adaptativas es poco conocido (Bari y Jones, 2009).

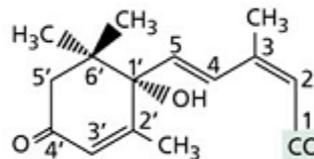
Hay tres hormonas el **ácido salicílico**, el **ácido jasmónico** y el **etileno** que están implicadas en la regulación de las respuestas de defensa frente a patógenos y estreses abióticos, además también el **ácido abscísico** está fuertemente involucrada en el estrés hídrico y osmótico (salino), y se considera un regulador en la defensa de la planta frente a patógenos (Yasuda *et al.*, 2008). Las vías de señalización de las distintas hormonas no son aisladas, más bien están interconectadas mediante una compleja red que involucra a varias respuestas de defensa y procesos del desarrollo.

4.1 Ácido abscísico

El ácido abscísico fue descubierto independientemente por diversos grupos a principios de los años sesenta. Originalmente se le involucró con la abscisión del fruto (abscisina II) y con la dormición de las yemas (dormina), y se le asignó por consenso el nombre de ácido abscísico (Addicott *et al.*, 1968), no obstante en la actualidad se asume que el proceso de abscisión está regulado por el etileno y las auxinas, y el efecto del ABA en la inducción de la dormición en yemas es

ambiguo. El ABA tradicionalmente se describe como un inhibidor del crecimiento, puesto que la aplicación exógena en semillas inhibe la germinación y el crecimiento de plántulas, ambos procesos han sido usados como bioensayos. Sin embargo, promueve la acumulación de proteínas de reserva en semillas, induce el cierre del estoma e interviene en las respuestas de adaptación y tolerancia al estrés. Para entender como los niveles celulares de ABA son regulados es importante dilucidar la vía de síntesis (sustratos, intermediarios y enzimas), esto ha sido posible merced a la disponibilidad de mutantes en la mayoría de las etapas de la biosíntesis (Jiang y Hartung, 2008).

4.1.1. Biosíntesis y catabolismo La estructura del ABA (Fig. 5) sugiere que deriva de los isoprenoides, también llamados terpenos, que derivan de un precursor de 5 átomos de carbono denominado isopentenil pirofosfato (IDP). El ABA se considera un sesquiterpeno (C₁₅) que presenta dos isomerías: una óptica debido al C_{1'} quiral, y otra geométrica debido a la orientación del grupo carboxilo en C₂ de su estructura, lo que determina la existencia de isómeros trans y cis, siendo la forma (S)-cis-ABA activa en las respuestas a corto plazo y actuando en conjunto con (R)-cis-ABA en las respuestas a largo plazo, por otro lado el isómero trans es inactivo (Taiz y Zeiger, 2007).



Como molécula giberelinas, α -carotenoides, mún para citoquininas, para las estrigolactonas, se consideró que procedía del ácido mevalónico (MVA) cuya síntesis tenía lugar en el citoplasma. Sin embargo, la síntesis química de la ABA se originó a partir de una vía independiente del MVA denominada vía del **2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP)** que se identificó primero en procariotas (Rodríguez-Concepción y Boronat, 2002) y después en plantas (Eisenreich *et al.*, 2004). El IDP es el precursor de la síntesis de β -carotenos formados por ocho restos de isopreno activo (C₄₀H₅₆).

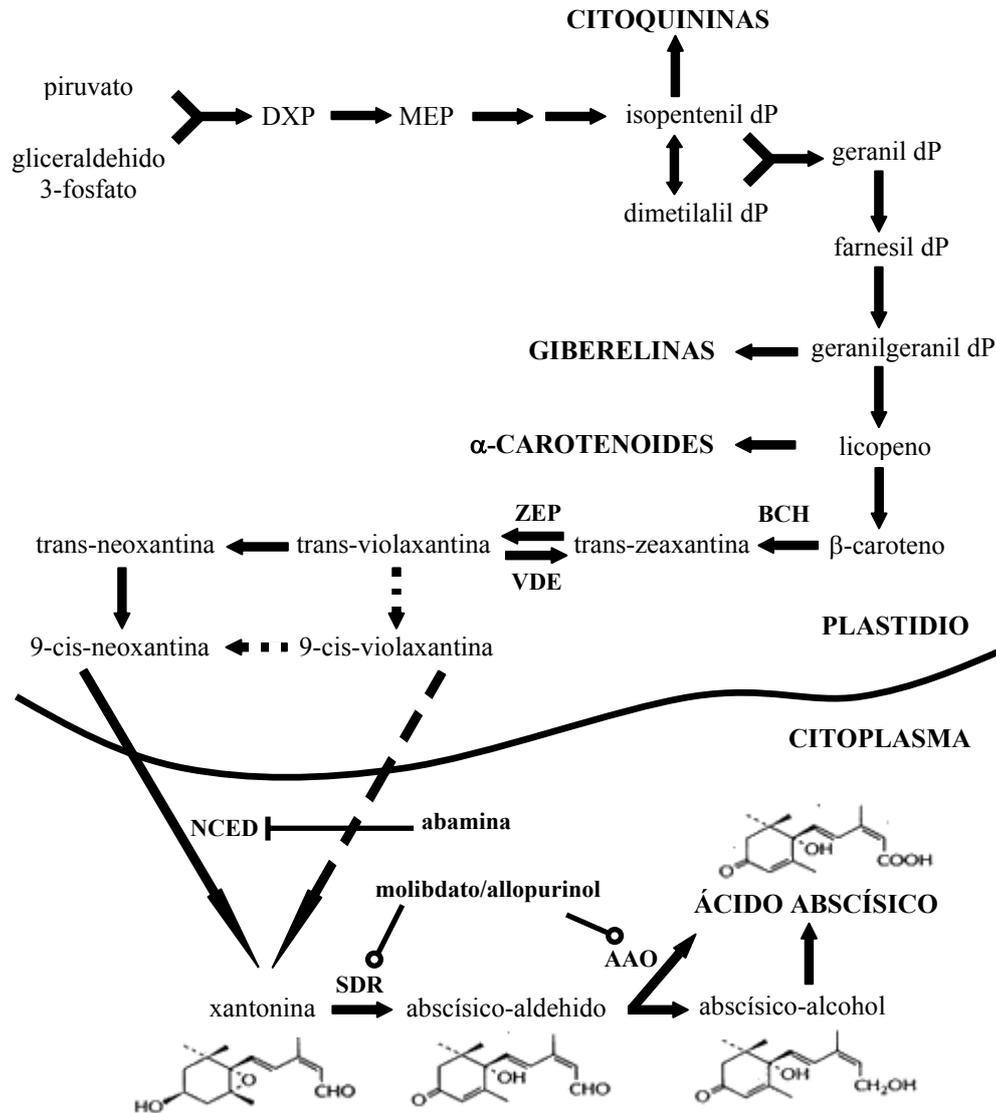


Figura 6. Biosíntesis del ácido abscísico en plantas. Las flechas discontinuas se refieren a etapas hipotéticas de la biosíntesis. La abamina es un compuesto sintético que inhibe a la enzima NCED. El molibdato y el allopurinol son compuestos que activan a las enzimas SDR y AAO respectivamente. Las abreviaturas de los productos se refieren a: difosfato (DP), 1-desoxi-D-xiloglucosa 5-fosfato (DXP), 2-C-Metil-D-eritriol 4-fosfato (MEP). Las abreviaturas de las enzimas se refieren a: β-caroteno hidrolasa (BCH), zeaxantina epoxidasa (ZEP), violaxantina depoxidasa (VDE), 9-cis-epoxicarotenoide isomerasa (NCED), deshidrogenasa reductasa de cadenas cortas (SDR) y ABA aldehído oxidasa (AAO)

El ABA es sintetizado en cloroplasto o plastidio a partir del β -caroteno por rotura oxidativa de la 9-cis-neoxantina mediante la enzima **9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED)** que produce xantoxina, producto con 15 carbonos que se transporta al citoplasma por un mecanismo desconocido (Qin *et al.*, 2008). La xantoxina es convertida a ABA en el citosol mediante tres posibles vías (Fig. 6), la del ácido xantóxico, la del alcohol-abscísico y la del ABA-aldehído (ABAld). Esta última es la más importante, en la que la xantoxina es oxidada en el citoplasma a ABAld mediante una enzima simple SRD1 (Deshidrogenasa Reductasa de Cadenas Cortas), codificada por el gen *ABA2*, que actúa como xantonina oxidasa y transforman la xantonina en ABAld (Cheng *et al.*, 2002). Finalmente, el ABAld es convertido a ABA por la enzima ABA-aldehído oxidasa (AAO) (Nambara y Marion-Poll, 2005).

Se ha observado que entre las cuatro AAO de *A. thaliana*, la enzima AAO3, codificada por el gen *AAO3*, es la que cataliza la reacción de formación de ABA, además la posterior identificación de alelos *aao3* nulos muestran fenotipos deficientes en ABA, indicado que *AAO3* es probablemente el único gen *AAO* implicado en la síntesis del ABA (Seo *et al.*, 2004).

La biosíntesis no es el único factor que regula las concentraciones de esta hormona en los tejidos, la concentración de ABA libre en el citosol es también regulada por el **catabolismo**, compartimentación y transporte. El ABA puede transformarse en una forma inactiva mediante dos procesos diferentes: **a)** hidroxilación, por el que se convierte en ácido faseico (PA) y finalmente a ácido dihidrofaseico (DPA); **b)** conjugación covalente del ABA con monosacáridos, por ejemplo con glucosa para dar ABA-glucosil éster (ABA-G). La conjugación no solo lleva a la inactivación de la hormona, también altera su distribución celular, mientras que el ABA libre se encuentra en el citosol, el ABA-G se acumula en vacuolas, y por tanto sirve como forma de almacenamiento, además en esta forma conjugada se utiliza para el transporte a larga distancia (Nambara y Marion-Poll, 2005).

4.1.2. Aspectos fisiológicos y moleculares

El ABA retrasa la germinación de semillas, durante la embriogenesis los niveles de ABA incrementan y bloquea el crecimiento del embrión por un efecto antagónico al de las giberelinas, estableciéndose un balance hormonal entre ABA-giberelinas en los procesos de dormición y germinación (Toh *et al.*, 2008).

Utilizando un inhibidor de la síntesis de ABA (fluridona) se ha observado que no se producen cambios en la relación raíz/parte aérea en situaciones de déficit de nutrientes, sugiriéndose que el ABA promueve el crecimiento radical e inhibe el de la parte aérea (Vysotskaya *et al.*, 2008). Además tiene un papel antagónico a la

auxina en el crecimiento de la raíz, actuando como regulador negativo de la respuesta gravitrópica (Han *et al.*, 2009). A nivel radical, el ABA favorece el transporte de agua al aumentar la conductancia hidráulica, pero en algunos casos ocurre el efecto contrario, o incluso no se produce ningún efecto, por lo que puede ser debido al uso de distintas especies vegetales y tiempos de exposición (Aroca, 2006).

Las células de guardia pueden procesar múltiples señales complejas del ambiente, y responder abriendo y cerrando los estomas para adaptarse al medio ambiente. Las EROs y principalmente el H₂O₂ actúan como moléculas señal en el mecanismo de cierre estomático inducido por el ABA (Wang y Song, 2008), de esta forma en plantas de *A. thaliana* se ha observado que las aplicaciones exógenas de ABA y H₂O₂ inducen respuestas transcriptómicas con un alto grado de solapamiento (Wang *et al.*, 2006).

La identificación de **receptores** para ABA es necesaria para comprender los mecanismos de señalización. Tres moléculas han sido identificadas como receptores: **a)** el **FCA (Flowering Control Arabidopsis)** es una proteína de unión al ARN que controla el tiempo de floración, mediante silenciamiento génico del represor floral **FLC (Flowering Locus C)**, así como la alteración de expresión de otros genes, y por lo tanto promueve la floración (Baurle *et al.*, 2007), además también se ha señalado como un receptor para el ABA cuya unión retarda la floración (Razem *et al.*, 2006). **b)** El **GPCR (G-Protein Coupled Receptors)** es un receptor de la membrana plasmática que tiene acoplada una proteína G habiéndose encontrado en *A. thaliana*, al GPCR con siete dominios transmembrana se le denominó GCR2, que tiene acoplada una proteína G con dos dominios (α y β), que son disociados al unirse el ABA al GCR2, iniciando los efectos del ABA (Liu *et al.*, 2007). **c)** El **CHLH (Mg-chelatase H)** corresponde a la subunidad H de la enzima magnesio quelatasa, que está implicada en la biosíntesis de clorofila y en mecanismos de señalización entre plastidios y núcleo, y al que se puede unir el ABA (Shen *et al.*, 2006).

A pesar del reconocimiento de tres receptores de alta afinidad a la unión con el ABA no se han aislado mutantes insensibles al ABA lo que permitiría clonar el gen del receptor. Realmente dos de los receptores están codificados por genes relacionados con el tiempo de inicio de floración y con la biosíntesis de clorofila, procesos que tradicionalmente no son considerados respuestas del ABA, y el tercer receptor está cuestionado por su identificación molecular (Risk *et al.*, 2008). No obstante, se requiere obtener niveles elevados de proteínas de unión al ABA para clarificar y definir la responsabilidad de estos genes en la percepción del ABA (McCourt y Creelman, 2008).

4.1.3. Interacción planta-microorganismo

En los últimos años se ha demostrado que el ABA participa en la regulación del desarrollo de microorganismos dentro de la planta, en el caso de patógenos, el nivel de ABA es determinante para la susceptibilidad de la planta (Asselbergh *et al.*, 2008). En general, se asume que actúa como regulador en la resistencia a patógeno, pudiendo interferir con otras rutas de los mecanismos de defensa inducidos por otras hormonas como el ácido salicílico, el jasmónico o el etileno (Mohr y Cahill, 2007; Flors *et al.*, 2008).

En la simbiosis ***Rhizobium-leguminosa***, el ABA actúa como regulador negativo inhibiendo la infección bacteriana y la expresión de los genes *ENOD*, incluso en mutantes supernodulantes, de forma similar al efecto ejercido por el ácido jasmónico y el etileno (Ding *et al.*, 2008). Utilizando un inhibidor (abamina) específico de una enzima NCED (síntesis de ABA), el número de nódulos incrementa drásticamente (Suzuki *et al.*, 2004), asociándose bien al efecto inhibidor del ABA de la división celular en el primordio nodular (Ding *et al.*, 2008), o bien a la relación ABA/citoquininas de la raíz, ya que las citoquininas dirigen el ciclo celular, y al inicio de la infección por *Rhizobium* se produce una caída de esta relación en la raíz, esta señal se transmite a la parte aérea, donde se induce la síntesis de ABA, provocando un incremento en la relación ABA/citoquininas que sería transmitida vía floema hasta la raíz inhibiendo la formación de los nódulos (Bano *et al.*, 2002).

Los niveles de ABA en nódulos de guisante mostraron variaciones que encajan con las tres etapas en las que participaría el ABA: primero, se detectó un incremento en los niveles de ABA a las dos semanas de desarrollo de los nódulos, el cual se podría relacionar con la regulación y control de estos; seguidamente se observó una estabilización en los niveles de ABA, que corresponde con el periodo de fijación de nitrógeno; y finalmente se produjo un segundo incremento en los niveles de ABA que podría relacionarse con la senescencia de los nódulos (Charbonneau y Newcomb, 1985). En esta actuación del ABA en la nodulación encajaría la actividad lipoxigenasa (LOX), localizada en el ápice nodular y en nódulos en desarrollo, cuya actividad se incrementa con la aplicación exógena de ABA (Hayashi *et al.*, 2008).

En el caso de **hongos micorrícicos**, el ABA está implicado en la susceptibilidad a la infección, y en el desarrollo y funcionalidad de los arbusculos (Herrera-Medina *et al.*, 2007). Utilizando plantas mutantes de tomate deficientes en ABA, junto con la aplicación exógena de ABA, se ha demostrado que uno de los mecanismos por el cual el ABA determina la susceptibilidad a esta infección, es debido a una regulación negativa en la biosíntesis del etileno (Herrera-Medina *et al.*, 2007).

4.1.4. Interacción ABA-salinidad: efecto en la simbiosis

El ABA está involucrado en la regulación de la respuesta adaptativa de la planta a diferentes estreses ambientales, actuando en diversos procesos fisiológicos del vegetal (Lu *et al.*, 2009). El ABA incrementa en condiciones adversas como alta temperatura (Kurepin *et al.*, 2008), frío (Meng *et al.*, 2008), acumulación de metales pesados (Sivaci *et al.*, 2008), sequía y salinidad (Veselov *et al.*, 2008). En estrés salino el aumento del ABA endógeno es debido a que el NaCl induce la biosíntesis de ABA, activando dos enzimas claves como la NCED y la AAO (Barrero *et al.*, 2006), y además también se estimula la actividad β -glucosidasa que libera el ABA-G (conjugado con glucosa) que es inactivo (Lee *et al.*, 2006).

Durante el estrés osmótico se produce una deshidratación celular, y las plantas responden exhibiendo una amplia variedad de respuestas en las que está involucrado el ABA, que van desde cambios fisiológicos rápidos, como puede ser el cierre estomático para evitar la pérdida de agua de la planta, cambios a nivel del patrón desarrollo, como puede ser el incremento de la relación raíz/parte aérea, o cambios a nivel celular, donde el ABA puede regular un amplio grupo de genes para promover la tolerancia (Ren *et al.*, 2007). El ABA induce la expresión de genes que codifican para proteínas reguladoras y proteínas de respuesta: **a)** las proteínas reguladoras están involucrados en la transducción de la señal de estrés, y en la regulación de la expresión de genes de respuesta, entre ellas se encuentran proteínas quinasas (histidín quinasas, MAP quinasas, Ca^{2+} -quinasas), fosfolipasa C y proteínas 14-3-3 (Himmelbach *et al.*, 2003); **b)** entre las proteínas de respuesta destacan las proteínas enzimáticas requeridas para la biosíntesis de sustancias osmoprotectoras (azúcares, prolina, glicina-betaína, polioles) (Abrahám *et al.*, 2003; Urano *et al.*, 2008), las proteínas que protegen macromoléculas y membranas (proteínas LEA, chaperonas, desaturasas de ácidos grasos), y las proteínas del canal de agua (acuaporinas) (Aroca *et al.*, 2006).

El ABA puede incrementar la generación de EROs como el O_2^- y H_2O_2 provocando un estrés oxidativo (Hu *et al.*, 2006). Este incremento de EROs induce, procesos de senescencia en los que está implicado el ABA (Puppo *et al.*, 2005), así como un mecanismo de señalización en la planta, en la que principalmente el H_2O_2 difunde a través de la membrana, actuando como molécula de transducción de señales (Neill *et al.*, 2002), activando tanto los sistemas antioxidantes enzimáticos (SOD, CAT, APX, GR) (Yildiz-Aktas *et al.*, 2007) como los no enzimáticos (AsA, GSH, α -tocoferol) (Ghassemian *et al.*, 2008), y preparando así a la planta ante a una situación de estrés. El H_2O_2 y el óxido nítrico (NO) han sido identificado como un componente de señalización del ABA en las células estomáticas (Desikan *et al.*, 2004).

Cuando las leguminosas en simbiosis crecen en un medio salino, el contenido de ácido abscísico aumenta en varios tejidos, incluyendo los nódulos (Ireki y Drevon, 2003). Ding *et al.* (2008) relaciona el ABA como un regulador de la nodulación de forma semejante al ácido jasmónico y al etileno, a nivel de la transducción de señales de los factores NOD. El ABA reduce la fijación de nitrógeno en nódulos, debido a una reducción de la respiración nodular y del contenido de leghemoglobina, mientras que la actividad SS nodular, correlacionada con la fijación de nitrógeno, no se ve afectada (González *et al.*, 2001a). Sin embargo se ha descrito la eficiencia de los pretratamientos con ABA en la restauración de las alteraciones metabólicas que se establecen en algunas leguminosas por efecto del NaCl tales como *Vicia faba* (Bano y Hillman, 1986), *Vigna radiata* (Chakrabarti y Mukherji, 2003) y *Phaseolus vulgaris* (Khadri *et al.*, 2006), mitigando el deterioro del proceso de fijación de nitrógeno y el desequilibrio iónico inducido por la sal, además de activar los procesos de asimilación de amonio y síntesis de ureidos.

La investigación de las respuestas fisiológicas y metabólicas de adaptación del nódulo a la salinidad en plantas tratadas con ABA exógeno y NaCl, condiciona la posibilidad de conocer la regulación hormonal de la fijación de nitrógeno en condiciones de estrés salino (Khadri *et al.*, 2007). Así mismo, la aplicación exógena de ABA estimula la acumulación de poliaminas (PAs), pudiendo sugerir que el ABA actúa como molécula señal en la inducción de la biosíntesis de PAs a nivel transcripcional en condiciones de salinidad (Jiménez-Bremont *et al.*, 2007), esto se ha observado tanto en la simbiosis liquénica como en la de *Rhizobium-leguminosa* (Unal *et al.*, 2008). El contenido de solutos compatibles (aminoácidos y prolina) se incrementa en nódulos de leguminosas en respuesta al ABA exógeno, de esta forma los nódulos de plantas de *P. vulgaris* y *P. sativum* tratadas con ABA acumulan un mayor contenido de estos metabolitos favoreciendo la adaptación de la simbiosis al estrés (Fedina *et al.*, 1994; Khadri *et al.*, 2007).

4.2. Ácido salicílico

El uso de extractos de corteza de sauce como analgésico y antipirético se remonta a varios siglos antes de la era cristiana en Europa, sin embargo no fue hasta la primera mitad del siglo XIX cuando el químico alemán Johann Buchner, estudiando la corteza del sauce aisló por primera vez lo que llamó salicilina. El término ácido salicílico (AS) fue acuñado por Raffaele Piria (1838) inspirado en el término latino *Salix* utilizado para designar al sauce, y patentado más tarde y metilado por la compañía Bayer. Actualmente está considerado como una hormona vegetal debido a su implicación en la regulación de la planta.

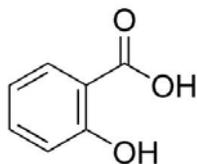


Figura 7. Estructura química del ácido salicílico

4.2.1. Biosíntesis y catabolismo

Una gran parte de los compuestos carbonados de la planta derivan de la vía de síntesis del ácido siquímico, que genera una gran variedad de aminoácidos aromáticos precursores de la lignina, considerada un constituyente estable y abundante de la madera. La vía del ácido siquímico, en sus inicios forma ácido corísmico que es un intermediario común para la síntesis del triptofano, fenilalanina, tirosina y muchos otros compuestos aromáticos como el **ácido salicílico o 2-hidroxibenzoico** (Fig. 7). Para el AS se han propuesto en plantas dos vías de síntesis tal como se refleja en la figura 8. En la primera se forma fenilalanina que mediante una desaminación se convierte en ácido trans-cinámico por la fenilalanina amonio-liasa (PAL), que tras un proceso de β -oxidación se acorta su cadena lateral para dar ácido benzoico, que finalmente se hidroxila en posición 2 del anillo aromático para dar AS mediante la enzima ácido benzoico 2-hidroxilasa (BA2H) (Metraux, 2002). La otra vía, similar a la descrita en bacterias, también se ha identificado en *A. thaliana*, se inicia con el ácido corísmico, que se isomeriza hasta isocorismato y finalmente, se escinde en piruvato y AS (Wildermuth *et al.*, 2001).

Ambas vías biosintéticas difieren en su localización subcelular, mientras que en la primera intervienen cloroplastos y peroxisomas, la segunda sería esencialmente cloroplástica (Raskin, 1992).

El AS libre puede soportar fenómenos de conjugación con aminoácidos y glucosa. La glucosilación se lleva a cabo mediante la enzima AS-glucosiltransferasa (SAGT) que forma 2-*O*- β -D-glucosilsalicílico (SAG). Estos fenómenos de inactivación provocan que el AS sea almacenado en el interior de la vacuola donde mediante hidroxilación puede ser liberado como AS (Defraia *et al.*, 2008). Las vías de degradación oxidativa del AS son tres: **a)** una dependiente de la salicilato hidrolasa, enzima codificada por el gen *Nah G*, que cataliza la producción de catecol, detectándose sólo en plantas transgénicas; **b)** otra dependiente del radical hidroxilo, puesto que el AS es un potente captador de OH^\cdot generado por el oxígeno singlete (O_2^\cdot) y el H_2O_2 ; **c)** por último la peroxidasa puede inducir la degradación del AS generando EROs.

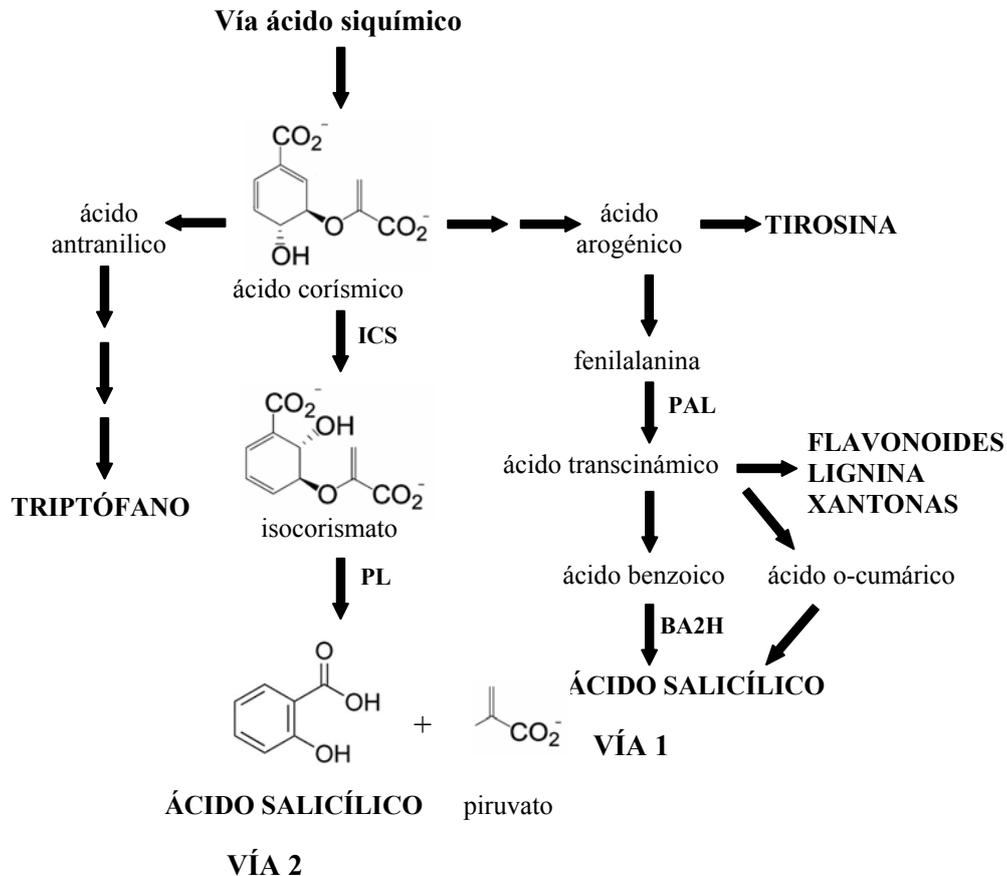


Figura 8. Biosíntesis del ácido salicílico en plantas. Las abreviaturas de las enzimas se refieren a: isocorismato sintasa (ICS), isocorismato piruvato liasa (PL), fenil amonio liasa (PAL) y ácido benzoico 2hidrolasa (BA2H)

4.2.2. Procesos fisiológicos

La primera evidencia clara que ligaba al AS endógeno con un papel regulador en plantas fue obtenida en estudios de **termogénesis** durante la antesis de la flor del lirio vudú (*Sauromatum guttatum*) (Raskin *et al.*, 1989). En la inducción floral, el flujo de electrones de la respiración es desacoplado de la cadena de transporte electrónico mitocondrial y desviado hacia una vía alternativa resistente al cianuro en la que interviene una oxidasa alternativa (AOX). La AOX es un homodímero presente en la membrana mitocondrial interna de la planta, que cede los electrones al oxígeno para formar agua, perdiendo la posibilidad y la capacidad de bombear protones y generar ATP, es decir es una ruta no fosforilativa que libera una gran parte de energía en forma de calor (termogénesis). El AS induce esta vía alternativa, incrementando los niveles tanto de proteína como de transcritos de la AOX (Lei *et al.*, 2008).

La exposición de las plantas a una alta intensidad de luz conlleva la alteración del metabolismo y de la fisiología de las **células fotosintéticas**, afectando el nivel de EROs y de antioxidantes, debiéndose activar genes dirigidos a la aclimatación a las nuevas condiciones de luz. El AS es esencial en este proceso (Mateo *et al.*, 2006), regulando la homeostasis redox óptima para la fotosíntesis y acumulando glutatión que evita la formación de lesiones (Kusumi *et al.*, 2006).

El pretratamiento con AS controla determinados procesos del desarrollo: **a)** en trigo activa la germinación de semillas, el crecimiento de plántulas y la actividad mitótica en los ápices radicales (Shakirova *et al.*, 2003); **b)** favorece el aumento del número de hojas en trigo (Hayat *et al.*, 2005), mientras que en cebada Pancheva *et al.* (1996) observó un retraso en la emergencia de las mismas; **c)** estimula la producción y diferenciación de raíces en esquejes de plantas ornamentales (Singh, 1993).

El AS interfiere en la biosíntesis del etileno y reprime las respuestas de los genes de defensa inducidos por éste y por el ácido jasmónico (Mur *et al.*, 2008). La interacción o cambio del balance hormonal inducido por el AS son de interés en el logro de respuestas fisiológicas y de defensa en la planta y en la simbiosis.

4.2.3. Interacción planta-microorganismo: patógenos y simbiosis

En la infección de la planta por microorganismos patógenos se produce una **respuesta de hipersensibilidad** (HR) a nivel local, caracterizada por la muerte celular en los lugares de infección, y una **resistencia sistémica adquirida** (SAR). La SAR es un mecanismo inducido en una planta por un patógeno, provocando la activación de genes *R*, que codifican para una familia de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR). El AS es una molécula crucial en los mecanismos de señalización de la planta, en la respuesta de defensa al ataque de patógenos (Loake y Grant, 2007), aunque no se considera una señal que se transporta desde el sitio de infección, su acumulación en tejidos alejados a la infección es fundamental para inducir la respuesta SAR.

La acumulación de AS como respuesta en la planta a la patogénesis está relacionado con el control de la homeostasis redox, manteniendo el balance entre producción de EROs y sistemas antioxidantes. El discurso establecido entre si el AS induce la producción de EROs, o si son las EROs las que promueven la biosíntesis de AS, conlleva a adjudicar al AS un aparente efecto dual (pro y antioxidante) que podría explicar efectos bifásicos (oxidativo y reductor) en el potencial redox celular (Yang *et al.*, 2004). No obstante se asume que ambos procesos inicialmente opuestos están conectados con los sistemas de respuestas de defensa local y sistémica, actuando el AS como molécula que desencadena la cascada de señales que conduce a la expresión de genes de defensa (Vasyukova y

Ozeretskoykaya, 2007; Tsuda *et al.*, 2008). El AS favorece la inducción de la respuesta SAR en plantas (Potlakayala *et al.*, 2007), comprobándose que en la interacción planta-microorganismo se induce la enzima PAL, que es clave en la biosíntesis de AS (Ballester *et al.*, 2006).

La revisión realizada por (Djordjevic *et al.*, 1987) con el título “*Rhizobium*: the refined parasite of legume”, inicia el discurso que desencadenó una serie de publicaciones en las que se evidencian semejanzas entre el proceso de infección *Rhizobium*-leguminosa y la interacción planta-patógeno. En las interacciones simbióticas mutualistas la participación del AS y su modo de acción no están claros, aunque en la interacción con micorrizas el AS parece estar relacionado con la inducción transitoria de la respuesta de defensa de la planta durante la etapa de penetración del hongo en la raíz (Herrera *et al.*, 2003). Una actuación parecida ocurre en las simbiosis con rizobacterias del género *Rhizobium*, donde durante la etapa de infección con rizobios compatibles no se han encontrado incrementos en los niveles de AS, pero si con especies de *Rhizobium* incompatibles o deficientes en la síntesis de factores Nod (Martínez-Abarca *et al.*, 1998), además el AS regula la propagación de la bacteria en la raíz, el número de nódulos formados y el nitrógeno fijado (Lian *et al.*, 2000; van Spronsen *et al.*, 2003). El uso de plantas transgénicas que sobreexpresan el gen *nahG* de *Pseudomonas putida*, ha puesto de manifiesto un papel regulador negativo del AS en la formación de nódulos, tanto de tipo indeterminado como de tipo determinado (Stacey *et al.*, 2006).

4.2.4. Ácido salicílico y salinidad: efecto en la simbiosis

Los resultados obtenidos en los últimos años señalan que el AS podría ser un compuesto prometedor en la reducción de la sensibilidad de los cultivos al estrés abiótico, puesto que en determinadas condiciones mitiga los efectos adversos producidos por distintos factores ambientales estresantes, como la luz ultravioleta (Mahdavian *et al.*, 2008), metales pesados (Guo *et al.*, 2009), frío (Jing-Hua *et al.*, 2008), alta temperatura (Chakraborty y Tongden, 2005), sequía (Hussain *et al.*, 2008) y salinidad (Yildirim *et al.*, 2008).

El estrés salino estimula la actividad ácido benzoico 2-hidrolasa, provocando un incremento en el nivel endógeno de AS en la planta (Sawada *et al.*, 2006), esto apoya la hipótesis de su implicación en la cascada de señales que la planta activa en respuesta a la salinidad (Molina *et al.*, 2002). El efecto de la aplicación exógena de AS a veces puede resultar contradictoria, generalmente la deficiencia de AS o un nivel alto, incrementa la susceptibilidad de la planta al estrés, sin embargo aplicaciones exógenas entre 0.1 mM y 0.5 mM son concentraciones óptimas que suelen mejorar la tolerancia, de todas formas se debe comprobar el tipo de planta (mono- o dicotiledónea) y el estadio de crecimiento del cultivo (germinación, plántula, etc) (Yuan y Lin, 2008).

El efecto dual anteriormente mencionado para el AS provoca un estrés oxidativo transitorio en plantas e incrementa la capacidad antioxidante de éstas (Borsani *et al.*, 2001). Este estrés es debido principalmente al incremento del H₂O₂ (Harfouche *et al.*, 2008), favorecido por la inhibición de las enzimas que lo detoxifican (CAT y APX) (Palma *et al.*, 2009), y por la activación de la SOD (Shim *et al.*, 2003; Azevedo *et al.*, 2004). En experimentos *in vitro* con *A. thaliana* y maíz en condiciones de estrés, el AS tiene capacidad para unirse directamente a la catalasa y provocar su inhibición (Horvath *et al.*, 2002), sin embargo esta unión no es específica, ya que el AS también se une a otras proteínas que contienen hierro, y en algunas plantas no se han detectado niveles significativos de inhibición (Sanchez-Casas y Klessig, 1994). Estas diferencias en la inhibición de la CAT entre especies e incluso órganos dentro de una especie, es debida a la expresión tisular específica de las distintas isoenzimas de la CAT, ya que el AS sólo inhibe alguna de ellas (Chen *et al.*, 1997b).

La relación GSH/GSSG disminuye en salinidad debido a los procesos de oxidación, pero en plantas transgénicas que sobreexpresan el gen *nahG* esta reducción es menor (Borsani *et al.*, 2001). Debido a todos estos efectos, mediante la aplicación exógena de AS, se induce una respuesta pre-adaptativa de la planta al estrés salino, que se refleja en un mejor crecimiento de la planta (El-Tayeb, 2005).

Los pretratamientos con AS en plantas de *Vigna mungo* reducen el número de nódulos y la fijación de nitrógeno (Ramanujam *et al.*, 1998), sin embargo incrementan la tolerancia de las leguminosas en simbiosis a la salinidad debido a que: **a)** promueve la acumulación de moléculas osmoprotectoras como azúcares, polioles o prolina (Tari *et al.*, 2004; Szpesi *et al.*, 2005); **b)** induce la síntesis de sustancias reguladoras y estabilizadoras como las poliaminas (Nemeth *et al.*, 2002); **c)** provoca una menor acumulación de iones tóxicos Na⁺ y Cl⁻ en las células vegetales (Gunes *et al.*, 2007); **d)** disminuye la actividad LOX (Nagabhushana *et al.*, 2002b); **e)** incrementa el contenido de óxido nítrico (Zottini *et al.*, 2007) y de ABA (Bandurska y Stroinski, 2005).

4.3. Otros reguladores de crecimiento: poliaminas

Las poliaminas (PAs) son compuestos nitrogenados de naturaleza alifática y de bajo peso molecular que se presentan en las células de los seres vivos (Kumar *et al.*, 1997). Por su carácter policatiónico (cargadas positivamente) pueden unirse y formar complejos con moléculas polianiónicas, tales como proteínas, fosfolípidos de membrana, pectinas y ácidos nucleicos participando en diferentes procesos fundamentales de la célula (Kuznetsov *et al.*, 2006). Se consideran **moléculas reguladoras del crecimiento vegetal** incluso mensajeros secundarios, aunque aún no verdaderas hormonas vegetales.

Las principales PAs en las células vegetales son putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm) (Fig. 9). Se pueden encontrar en tres estados (Duan *et al.*, 2008): **libres** en el cual son activas electrostáticamente, es decir tienen la posibilidad de asociarse con moléculas cargadas negativamente; **ligadas solubles** en el citoplasma de la célula formando complejos de bajo peso molecular, están protegidas frente a la degradación y durante el transporte a través de la planta; **ligadas insolubles** cuando están unidas a macromoléculas, como la celulosa de la pared celular, o a sitios aniónicos de las membranas, el alto peso molecular de estos complejos favorece que no se localicen en el citoplasma celular.

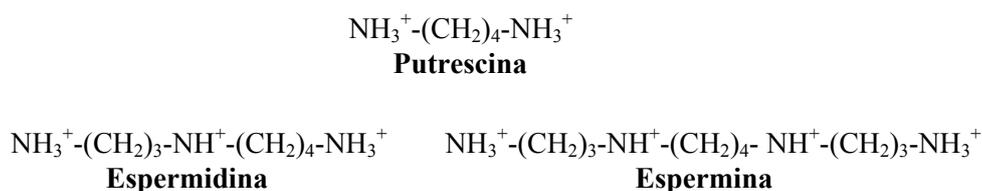


Figura 9. Estructura química de las principales poliaminas en plantas

4.3.1. Biosíntesis y catabolismo

La **putrescina** (Put) puede ser sintetizada por dos vías, una vía directa tras la descarboxilación de la ornitina, mediante la ornitina descarboxilasa (ODC), y una vía indirecta, común en plantas, sintetizada tras la descarboxilación de la arginina por medio de la arginina descarboxilasa (ADC), seguida de la formación de agmatina y N-carbamoylputrescina (NCP) como pasos intermedios, mediante la intervención de una iminohidrolasa y una aminodohidrolasa, lo que permite un mayor control sobre la síntesis (Fig. 10). El funcionamiento de una vía u otra dependen del tejido y del estado de desarrollo vegetal (Hao *et al.*, 2005b). Se han llevado a cabo estudios con los sustratos de la ODC y ADC marcados radiactivamente y sus respectivos inhibidores DL-a-diflourometilornitina (ODC) y DL-a-diflourometilarginina (ADC), con el fin de evaluar la actividad enzimática en diferentes procesos vegetales, observándose que ambas actividades son inducidas en condiciones de estrés por bajas temperaturas, estrés osmótico, déficit de nutrientes y pH ácido (Hao *et al.*, 2005a), y también en infecciones provocadas por microorganismos (Yoo *et al.*, 2004). No obstante, el nivel de expresión de estas proteínas depende del órgano, así en plantas de tomate hay una elevada expresión del gen *ODC* en raíces y flores, mientras que en hojas el nivel de transcritos es bajo, sin embargo se detecta que la expresión del gen *ADC* es baja en raíces y elevada en hojas (Kwak y Lee, 2001).

La putrescina es transformada en **espermidina** (Spd) por la adición de un grupo amilopropilo procedente de la metionina, que primero es convertida en

S-adenosilmetionina (SAM), y posteriormente se descarboxila para formar la S-adenosilmetionina descarboxilada (dSAM), en reacciones catalizadas por SAM sintasa y SAM descarboxilasa respectivamente. La espermidina sintasa catalizan la transferencia del amilopropilo procedente del dSAM a la putrecina para formar la espermidina. Otro aminopropilo, también procedente del dSAM, es necesario para convertir la espermidina en espermina, en una reacción catalizada por espermina sintasa (Bagni y Tassoni, 2001).

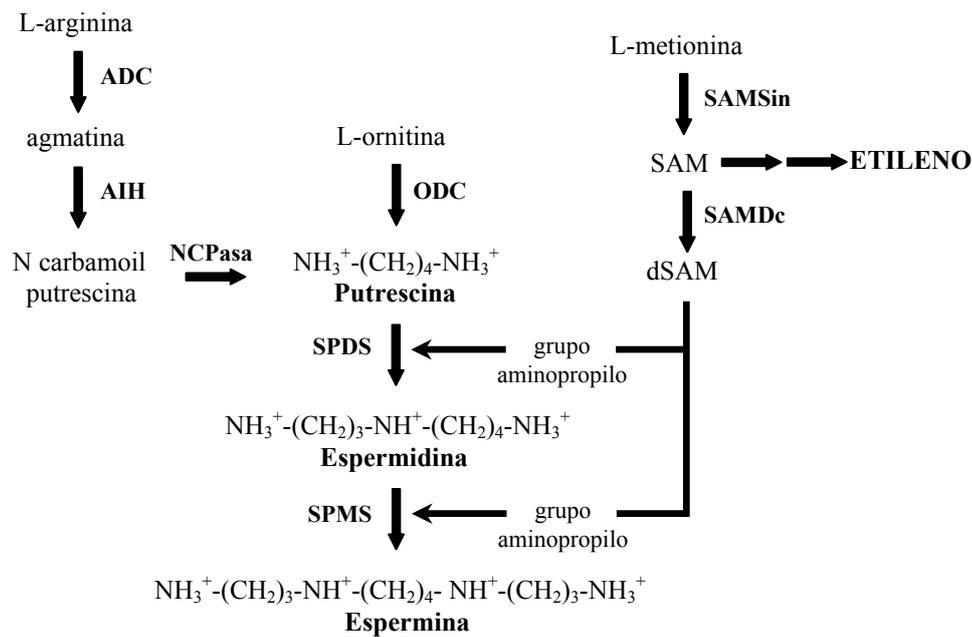


Figura 10. Biosíntesis de putrescina, espermidina y espermina. Las abreviaturas de los productos se refieren a: S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilmetionina descarboxilada (dSAM). Las abreviaturas de las enzimas se refieren a: arginina descarboxilasa (ADC), agmatina iminohidrolasa (AIH), N-carbamoilputrescina amidohidrolasa (NCPasa), ornitina descarboxilasa (ODC), S-adenosilmetionina sintasa (SAMSin), S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDc), espermidina sintasa (SPDS) y espermina sintasa (SPMS)

Las Put, Spd y Spm son **catabolizadas** principalmente por diamino oxidasas (DAO) y poliamino oxidasas (PAO). La DAO es un homodímero, cada subunidad contiene un átomo de cobre y el 2,4,5-trihidroximetilfenilalanina quinona como cofactor, y cataliza la oxidación de la putrescina en el grupo amino primario derivando a pirrolina, peróxido de hidrógeno y amonio, mientras que PAO, contiene una molécula de FAD como cofactor, y cataliza la oxidación del grupo amino secundario de la espermidina y espermina así como sus derivados acetilados produciendo aminoaldehído, peróxido de hidrógeno y amonio (Cona *et*

al., 2006). Además estas oxidasas están involucradas en la producción de PAs poco comunes (noespermidina, noespermina, homoespermidina) y metabolitos secundarios (Takao *et al.*, 2007). Estas PAs se presentan en ciertos microorganismos como *Vibrio cholerae* (Karatan *et al.*, 2005) y en organismos que habitan en condiciones extremas de temperatura y pH (Hamana *et al.*, 2003).

4.3.2. Efectos fisiológicos

Las PAs están presentes en todos los compartimentos celulares, incluido el núcleo por lo que pueden controlar procesos de transcripción, transducción, replicación de ADN, regulando la actividad genómica, la división y expansión celular, y el crecimiento y desarrollo de la planta (Paschalidis y Roubelakis-Angelakis, 2005). Se han relacionado las PAs con órganos y tejidos en crecimiento activo y en procesos de diferenciación y morfogénesis, como la embriogénesis, germinación de semillas (Bais y Ravishankar, 2002), la formación de nódulos en raíces de leguminosas (Efrose *et al.*, 2008) y el desarrollo de flores y frutos (De Dios *et al.*, 2006).

La disminución del contenido de PAs conlleva al inicio de la senescencia, produciéndose una reducción de la actividad ADC, y la aplicación exógena PAs puede evitar la aparición de síntomas de senescencia (Pang *et al.*, 2006). Estos síntomas están relacionados con el etileno, puesto que las vías de síntesis de las PAs y del etileno están interconectadas al poseer un precursor común (SAM), aunque los procesos fisiológicos que controlan son distintos y ocasionalmente antagónicos, como la senescencia de la hoja y flor, y la maduración del fruto (Mattoo *et al.*, 2007). Las PAs actúan como reguladores anti-senescencia y anti-maduración, al inhibir la biosíntesis de etileno en frutas y tejidos vegetales, e inversamente, el etileno inhibe la biosíntesis de PAs (Lester, 2000).

4.3.3. Interacción planta-microorganismo: simbiosis

Las PAs están implicadas en la formación del nódulo radical en leguminosas, la producción de PAs en este órgano es entre 5-10 veces mayor que en raíz y tallo (Fujihara *et al.*, 1994). El perfil analítico de las PAs en nódulos de varias leguminosas es bastante similar, sólo se ha demostrado diferente composición de PAs en nódulos de mutantes de soja hipernodulantes (Akao y Kouchi, 1992). La función fisiológica de las PAs en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa se asocia con: **a)** al inicio del desarrollo del nódulo se acumula putrescina puesto que se induce la expresión de los genes que codifican para ornitina descarboxilasa y arginina descarboxilasa. La expresión de ambos genes es máxima en los primeros eventos de la nodulación y disminuye al final del desarrollo nodular, principalmente la expresión del gen que codifica para la ADC (Flemetakis *et al.*, 2004). Ocurre lo mismo con la expresión de los genes que

codifican para la SPDS y SPMS, responsables de la síntesis de espermidina y espermina respectivamente (Efrose *et al.*, 2008); **b**) se asocia con la capacidad de regular el transporte de nutrientes a través de la membrana peribacteroidea (Whitehead *et al.*, 2001); **c**) con la senescencia del nódulo (Lahiri *et al.*, 2004); **d**) con el proceso de autorregulación de la nodulación al interactuar con el efecto que regulan otras hormonas como los brasinoesteroides (Ferguson y Mathesius, 2003).

La poliamino oxidasa se relaciona con la producción extracelular de H₂O₂ durante las respuestas de defensa frente a patógenos, mientras que la diamino oxidasa está implicada en la interacción simbiótica entre *Rhizobium*-leguminosa, puesto que el H₂O₂ producido insolubiliza una glucoproteína semejante a una extensina en el lumen del cordón de infección y en la matriz intercelular (Wisniewski *et al.*, 2000).

Las PAs intervienen en el establecimiento y mantenimiento de la simbiosis micorrízica, de hecho el suministro exógeno con PAs específicas aumenta la formación de micorrizas arbusculares y ectomicorrizas (Niemi *et al.*, 2002). Además las plantas micorrizadas presentan contenidos de PAs libres en raíz más elevados que las no micorrizadas (Sannazzaro *et al.*, 2007).

4.3.4. Poliaminas y salinidad

La acumulación de PAs se relaciona con la resistencia de la planta a estreses abióticos, estando implicadas en respuestas de defensa frente a bajas temperaturas (Hao *et al.*, 2005a), luz UV (Mapelli *et al.*, 2008), estrés hídrico (Yang *et al.*, 2007; Bae *et al.*, 2008) y estrés salino (Kuznetsov *et al.*, 2007; Duan *et al.*, 2008). El metabolismo y función de las PAs, va a depender de la especie de planta y de la duración del estrés salino (Simon-Sarkadi *et al.*, 2002). Un alto contenido de Na⁺ en los tejidos vegetales se considera a menudo como factor crítico responsable de toxicidad de la sal, por lo que la reducción en el contenido de Na⁺ inducido por las PAs es una estrategia eficaz para combatir la salinidad (Zhu *et al.*, 2006). Además, se ha demostrado que las PAs exógenas aumentan los niveles de K⁺ en ambientes salinos, debido a que evitan su eflujo, y de esta forma se incrementa la relación K⁺/Na⁺ (Ndayiragije y Lutts, 2007; Shabala *et al.*, 2007), sin embargo, los mecanismos de las PAs siguen siendo confusos, parece que las PAs se unen a proteínas que forman canales de membrana, que regulan el paso de los iones (Zhao *et al.*, 2007), actúan como estabilizadores de membrana regulando su permeabilidad y fluidez (Todorova *et al.*, 2007), o influyen en el mantenimiento de estructuras fotosintéticas (Demetriou *et al.*, 2007).

El metabolismo de las PAs influye en la concentración de prolina, ya que los productos de la degradación de las PAs por DAO y PAO contribuye a su

biosíntesis (Mutlu y Bozcuk, 2007). Recientemente usando un inhibidor específico para la DAO, se ha confirmado que de un 15-20% de la prolina acumulada en hojas de soja expuestas a salinidad proviene de la degradación de las PAs (putrescina) (Su y Bai, 2008).

Las PAs libres intervendrían ante el daño oxidativo de forma directa como destructoras de EROs, o bien a través de enzimas antioxidantes, de hecho niveles endógenos elevados de PAs, particularmente Spd y Spm, están correlacionados positivamente con el aumento en estas actividades en respuesta a salinidad (Tang y Newton, 2005; Duan *et al.*, 2008). Además en transgénicas de tabaco, que sobreexpresan genes responsables de la biosíntesis de PAs, se ha observado que se induce la expresión de genes de enzimas antioxidantes, obteniendo como resultado plantas más tolerantes al estrés (Wi *et al.*, 2006). Martin-Tanguy (2001) menciona que las PAs en forma conjugada pueden ser sustratos utilizados por aminas oxidasas y peroxidasas de células vegetales para destruir distintas EROs, o ser una fuente de PAs libres en condiciones donde se exige su presencia en forma activa (Roussos y Pontikis, 2007).

Existe una relación entre las PAs y ABA, Alcazar *et al.* (2006) describieron que en condiciones de estrés hídrico, se produce una acumulación de ABA, y éste regula el metabolismo de las PAs a nivel transcripcional, aunque no existen datos relevantes para establecer una conexión directa entre el ABA y los genes de la biosíntesis de las PAs (Jiménez-Bremont *et al.*, 2007).

OBJETO

Las leguminosas representan un conjunto de cultivos de extraordinaria importancia, tanto desde la perspectiva de la calidad del producto de explotación (grano o forraje), debido a su elevado contenido en proteínas de origen vegetal, como al efecto mejorador del suelo, constituyendo un factor clave de la sostenibilidad de la producción agraria. El interés económico de las leguminosas está relacionado con su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico, cuando forman simbiosis con los rizobios específicos del suelo en sus nódulos radiculares, favoreciendo la reducción del coste de fertilizantes, evitando la contaminación ambiental y contribuyendo a la sostenibilidad agrícola. La fijación biológica de nitrógeno está presente en numerosos ecosistemas, siendo evidente que el medio ambiente ejerce una influencia sobre este proceso, por lo que las fluctuaciones en la productividad se deben en gran parte a la baja tolerancia a factores abióticos adversos.

La salinidad es uno de los principales factores limitantes en la productividad de leguminosas en regiones áridas y semiáridas afectadas por la acumulación de sales inorgánicas en el agua de riego o en el suelo, particularmente cuando la planta depende de la fijación simbiótica para sus requerimientos de nitrógeno. La sensibilidad de este proceso a la salinidad, requiere la adaptación de ambos simbioses, siendo en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa la planta hospedadora más sensible a la sal y al estrés osmótico que el rizobio, aunque el exceso de sales en el suelo afecta tanto al proceso de infección y desarrollo del nódulo como al funcionamiento y eficacia de la fijación.

La adaptación de las plantas a la salinidad es un proceso complejo que involucra cambios a nivel fisiológico, bioquímico y molecular. Entre los mecanismos de respuesta al estrés osmótico, está la acumulación de solutos compatibles intracelulares, que incluso a altas concentraciones no interfieren con los procesos celulares vitales y contribuyen al ajuste osmótico y al mantenimiento del equilibrio iónico, también se desencadena la activación de mecanismos moleculares y enzimáticos, y cambios en el balance hormonal para prevenir o limitar la toxicidad de las especies reactivas del oxígeno que incrementan con el estrés salino. Estos procesos están regulados por moléculas hormonales que desencadenan y conducen los sistemas de defensa y protección al estrés.

El **ácido abscísico (ABA)** es una hormona vegetal involucrada en diversos procesos fisiológicos incluyendo las respuestas de adaptación a diferentes condiciones ambientales adversas, salinidad, sequía y estrés térmico. El ABA favorece la osmoregulación e induce procesos de defensa mediante la activación a nivel molecular y genético de proteínas y otras moléculas que contrarrestan los efectos negativos inducidos. Se establece su implicación en neutralizar los efectos producidos por el estrés oxidativo que se genera en la mayoría de los estreses abióticos.

El **ácido salicílico (AS)** es una hormona vegetal involucrada en el desencadenamiento de una cascada de respuestas de protección frente a estreses bióticos (ataque de patógenos) habiéndose discutido en los últimos años el papel que realiza en la interacción simbiótica de leguminosas y *Rhizobium*, evidenciando que interviene tanto en el proceso de formación de nódulos como en la regulación de las respuestas de protección de la planta infectada con *Rhizobium*. También está involucrado en el desencadenamiento de una cascada de respuestas frente a estreses abióticos, asignándole un papel modulador como agente protector.

La aplicación exógena de ácido salicílico y ácido abscísico como agentes que favorecen la tolerancia a estreses abióticos en general, y salino en particular, pueden ayudar a conocer el papel regulador de estas moléculas en los mecanismos de adaptación al estrés salino en el nódulo y en la planta. Los resultados obtenidos potencialmente podrán ser transferidos y utilizados por mejoradores, biotecnólogos o manipuladores de plantas de cultivos agrícolas en estas condiciones.

Este trabajo se ha llevado a cabo en dos simbiosis: la establecida entre una leguminosa grano *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium tropici*, en la que se forman nódulos determinados, y la formada entre una leguminosa forrajera *Medicago sativa* y *Sinorhizobium meliloti* en la que se forman nódulos indeterminados. Ambos tipos de nódulos muestran diferencias en su génesis, en su anatomía final, y en el metabolismo nitrogenado.

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es determinar los **mecanismos y/o estrategias que adoptan las leguminosas en simbiosis en condiciones de salinidad** conectando estos mecanismos de respuesta con el proceso de fijación de nitrógeno. La hipótesis de partida se centra en abordar posibles sistemas de adaptación o supresión del daño originado por el estrés salino como son la formación de **osmolitos**, cambios metabólicos en **enzimas** claves en el funcionamiento del nódulo radical, alteraciones en los **sistemas de defensa antioxidantes** en respuesta al estrés y cambios en el **estatus hormonal** inducido por la salinidad, centrándonos en el **ácido salicílico y ácido abscísico** como hormonas claves implicadas.

Los objetivos concretos fueron:

1. **Estudiar las alteraciones inducidas por la salinidad a nivel fisiológico, bioquímico y molecular en la simbiosis *Medicago sativa*–*Sinorhizobium meliloti*** a lo largo de la ontogenia analizando la evolución del crecimiento, del proceso fotosintético, de la fijación de nitrógeno, y del metabolismo carbonado y de asimilación de amonio en nódulos, así como en el contenido de moléculas osmoprotectoras.

2. **Implicaciones del pretratamiento con ácido salicílico** en la adaptación al estrés salino de plántulas de judía.
3. **Efecto de la aplicación exógena de ácido salicílico** en las simbiosis *Phaseolus vulgaris-Rhizobium tropici* y *Medicago sativa-Sinorhobium* **en salinidad**: respuestas de los sistemas antioxidantes y reguladores del crecimiento.
4. **Efecto de la aplicación exógena de ácido abscísico** en las simbiosis *Phaseolus vulgaris-Rhizobium tropici* y *Medicago sativa-Sinorhobium* **en salinidad**: respuestas de los sistemas antioxidantes y reguladores del crecimiento.
5. **Purificación y caracterización de la catalasa** de hoja y nódulo de plantas de *Phaseolus vulgaris* y *Medicago sativa* en simbiosis: efecto de la salinidad y otros inhibidores.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material biológico

1.1. Microorganismos

Las cepas de *Sinorhizobium meliloti* GR4 (Casadesus y Olivares, 1979) proceden del Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental de Zaidín (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), mientras que *Rhizobium tropici* CIAT899, originaria del CIAT (Colombia), fue seleccionada según trabajos previos de Zúñiga (1997). El medio de cultivo empleado en el crecimiento, preparación de los inóculos y conservación de ambas cepas fue TY descrito por Beringer (1974), y cuya composición se expone a continuación:

*Triptona	5 g
*Extracto de levadura	3 g
*CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.9 g
*Agar (medio sólido)	15 g
*Agua destilada	1000 ml

El pH del medio se ajustó a 7 con NaOH y la esterilización se llevó a cabo en autoclave, a 117°C durante 20 min. En la conservación de las bacterias para uso rutinario se utilizaron placas de petri mantenidas a 4°C y resembradas 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).

1.2. Material vegetal y solución nutritiva

Las especies vegetales utilizadas en los distintos experimentos fueron *Medicago sativa* var. Aragón y *Phaseolus vulgaris* var. F15, suministradas por Semillas Bolivar (Granada). La solución nutritiva utilizada para el cultivo de las plantas fue la descrita por Rigaud y Puppo (1975), con la siguiente composición:

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	

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

2. Cultivo de plantas

2.1. Preparación del inóculo

Los inóculos de *S. meliloti* GR4 y *R. tropici* CIAT 899, se obtuvieron a partir de cultivos frescos crecidos en medio sólido durante 72 h a 28°C. Las bacterias, fueron posteriormente crecidas en medio líquido a 28°C hasta alcanzar una densidad óptica equivalente a una suspensión bacteriana de aproximadamente 10^9 células viables ml^{-1} .

2.2. Siembra e inoculación

Las semillas de *M. sativa* y *P. vulgaris* fueron desinfectadas superficialmente con hipoclorito de sodio al 5 % (v/v) durante 3 min, a continuación se lavaron varias veces con abundante agua estéril. Tras este proceso se dejaron en imbibición durante 2 h y posteriormente, las semillas de *M. sativa* se pasaron a placas de agar-agua y las de *P. vulgaris* se trasladaron a semilleros de vermiculita estéril convenientemente humedecida. Los semilleros cubiertos con bolsas de polietileno a fin de evitar la pérdida de humedad, y las placas se mantuvieron en oscuridad durante 48 h a 28°C en estufa de germinación.

El sistema de cultivo para *M. sativa* consiste en semilleros con 48 pocillos de 300 ml de capacidad, utilizando una mezcla de vermiculita/perlita (2/1) como sustrato inerte, que permite un adecuado desarrollo radical gracias a su porosidad. Los semilleros se colocan sobre bandejas que contenían la solución nutritiva que ascendía por capilaridad. El sustrato se esterilizó en autoclave a 117°C durante 1 h y los semilleros y bandejas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5 %. Las semillas germinadas, una por posillo, se inocularon con 1 ml de *S. meliloti* y se cubrieron con la mezcla vermiculita/perlita. Sobre toda la superficie se colocó una capa de perlita estéril para disminuir el riesgo de contaminación y las pérdidas de agua por evaporación. Se realizaron reinoculaciones durante las 3 semanas sucesivas al inicio del cultivo.

Para los experimentos con *P. vulgaris* se utilizaron dos sistemas de cultivo, jarras Leonard modificadas (Leonard, 1943) y macetas, ambos conteniendo como sustrato vermiculita. Las jarras (1.5 l) 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 germinadas e inoculadas con 1 ml *R. tropici* y se cubrieron con vermiculita y una capa de perlita estéril. A la semana siguiente del inicio del cultivo, se realizó la reinoculación.

El sistema de cultivo en macetas (2.5 l) se colocó sobre platos con solución nutritiva que ascendía por capilaridad. El sustrato se esterilizó en autoclave a 117°C durante 1 h y las macetas y platos se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5 %. En cada maceta se sembraron 10 semillas germinadas y se cubrieron con la vermiculita, sobre toda la superficie se colocó una capa de perlita estéril para disminuir el riesgo de contaminación y las pérdidas de agua por evaporación.

2.3. Condiciones de la cámara de cultivo

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

*Fotoperiodo: 16 h luz/ 8 h oscuridad.

*Temperatura: 24°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 o tres días, mientras que en las jarras ésta se renovó cada tres días.

3. Experimentos realizados

3.1. Estudio ontogénico de la simbiosis *Medicago sativa*-*Sinorhizobium meliloti* en condiciones de salinidad

Las semillas de alfalfa desinfectadas y germinadas se transfirieron a bandejas de cultivo con solución nutritiva de Rigaud y Puppo (1975), y se inocularon con *S. meliloti*. En estas condiciones crecieron hasta el día 28, cuando el nódulo está formado y por tanto el proceso simbiótico establecido, en ese momento se aplicó el tratamiento salino de NaCl (0, 100 y 150 mM) y se mantuvo hasta el final del tiempo de experimentación. El estudio ontogénico se realizó estudiando la evolución de distintos parámetros relacionados con crecimiento, fotosíntesis, fijación de nitrógeno, metabolismo carbonado y del amonio en nódulo y moléculas protectoras frente al estrés salino (osmolitos) en cuatro estados fisiológicos del desarrollo de la planta: crecimiento vegetativo (42 días), inicio de floración (56 días), floración (70 días) y fructificación (84 días). El diseño experimental consta de 12 tratamientos (3 dosis de NaCl x 4 recolectas) con 6 repeticiones por tratamiento. El experimento se realizó dos veces, determinándose en cada estado fenológico los siguientes parámetros:

- Análisis del crecimiento: peso seco de parte aérea, raíz y total por planta, y relación raíz/parte aérea.
- Actividad fotosintética: fluorescencia inicial (F_o), fluorescencia máxima (F_m), relación F_o/F_m y rendimiento fotosintético (F_v/F_m).
- Fijación de nitrógeno y nodulación: actividad nitrogenasa aparente y total, tasa de fijación de nitrógeno, peso seco de nódulo y peso normalizado de nódulos (PNN).
- Actividades enzimáticas del metabolismo carbonado en nódulo: sacarosa sintasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa, malato deshidrogenasa e isocitrato deshidrogenasa.
- Actividades enzimáticas del metabolismo de asimilación de amonio en nódulo: glutamina sintetasa, glutamato sintasa, glutamato deshidrogenasa y aspartato aminotransferasa.
- Contenido de aminoácidos totales, prolina, azúcares solubles totales, mioinositol, ononitol, pinitol, trehalosa y glucosa en hoja, raíz y nódulo, y de malato y glutamato en hoja y nódulo.

3.2. Respuesta de plántulas de *Phaseolus vulgaris* a la aplicación de ácido salicílico y NaCl

Las semillas de judía se pusieron en imbibición durante 24 h con diferentes concentraciones de AS (0, 0.1 y 0.5 mM) y se mantuvo este tratamiento durante la germinación en semilleros (48 h). Las semillas germinadas se transfirieron a macetas con vermiculita como soporte y solución nutritiva de Rigaud y Puppo (1975) adicionada con KNO_3 (4 mM). En ese momento se añadió a la solución nutritiva el tratamiento salino (0, 100 y 150 mM) y el de AS (0, 0.1 y 0.5 mM) creciendo las plántulas en esas condiciones durante 8 días, momento el que se procedió a la cosecha. El diseño experimental consta de 9 tratamientos (3 dosis de AS x 3 de NaCl) con 6 repeticiones por tratamiento. El experimento se realizó dos veces, determinándose los siguientes parámetros:

- Análisis del crecimiento mediante los parámetros indicados en el apartado 3.1.
- Actividades enzimáticas antioxidantes: catalasa, guaiacol peroxidasa, ascorbato peroxidasa, monodehidroascorbato reductasa, dehidroascorbato reductasa y glutatión reductasa en hoja.
- Contenido de metabolitos antioxidantes: ascorbato y glutatión en sus formas oxidada, reducida y total en hoja y raíz.
- Peroxidación de lípidos en hoja y raíz.

- Contenido de aminoácidos totales, prolina y azúcares solubles totales en hoja y raíz.
- Contenido de AS libre endógeno en hoja y raíz.

3.3. Efecto del ácido salicílico en las simbiosis *Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium tropici* y *Medicago sativa*-*Sinorhizobium meliloti* en estrés salino

Las semillas de judía desinfectadas y germinadas, se transfirieron a jarras Leonard, con solución nutritiva de Rigaud y Puppo (1975), donde se procedió a su inoculación con *R. tropici*. En estas condiciones crecieron las plantas hasta el día 23 de cultivo (crecimiento vegetativo), momento en el que se adiciona al medio el tratamiento de AS (0, 0.1 y 0.5 mM), 2 días después es retirado para aplicar el salino (0 y 100 mM de NaCl). Se realizaron dos cosechas, a los 3 y 6 días de la adición del NaCl, coincidiendo con inicio de floración y floración respectivamente.

Las semillas de alfalfa desinfectadas y germinadas, se transfirieron a bandejas de cultivo donde se procedió a la inoculación con *S. meliloti*. Las plantas crecieron con solución nutritiva de Rigaud y Puppo (1975) hasta el día 49 de cultivo (crecimiento vegetativo), momento en el que se adiciona al medio el tratamiento de AS (0, 0.1 y 0.5 mM), 2 días después es retirado para aplicar el salino (0 y 200 mM de NaCl). Se realizaron dos cosechas, a los 6 y 12 días de la adición del NaCl, coincidiendo con inicio de floración y floración respectivamente.

El diseño experimental para cada especie vegetal consta de 12 tratamientos (3 dosis de AS x 2 de NaCl x 2 recolectas) con 6 repeticiones por tratamiento, el experimento se realizó dos veces, determinándose en ambas leguminosas los siguientes parámetros:

- Análisis del crecimiento y fijación de nitrógeno mediante los parámetros indicados en el apartado 3.1.
- Actividades enzimáticas antioxidantes: superóxido dismutasa, catalasa, guaiacol peroxidasa, ascorbato peroxidasa, monodehidroascorbato reductasa, dehidroascorbato reductasa y glutathion reductasa en nódulo.
- Actividad lipoxigenasa en nódulo y aldehído oxidasa en hoja y nódulo.
- Contenido de metabolitos antioxidantes: ascorbato y glutathion en sus formas oxidada, reducida y total en nódulo.
- Contenido de H₂O₂ y peroxidación de lípidos en hoja y nódulo.
- Contenido de aminoácidos totales, prolina y azúcares solubles totales en hoja, raíz y nódulo.

- Contenido de AS endógeno libre en hoja y raíz.
- Contenido de ABA endógeno libre en hoja y raíz.
- Contenido de poliaminas libres en hoja, raíz y nódulo.

3.4. Efecto del ácido abscísico en las simbiosis *Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium tropici* y *Medicago sativa*-*Sinorhizobium meliloti* en estrés salino

Las plantas de judía inoculadas con *R. tropici* crecieron en jarras Leonard con solución nutritiva hasta el día 23 de cultivo (crecimiento vegetativo), momento en el cual se adicionó al medio el tratamiento de ABA (0, 1 y 10 μM), y 2 días después el salino (0 y 100 mM de NaCl), manteniéndose ambos tratamientos hasta el final del tiempo de experimentación. Se realizaron dos cosechas, a los 3 y 6 días de la adicción de NaCl, coincidiendo con inicio de floración y floración respectivamente.

Las plantas de alfalfa inoculadas con *S. meliloti* crecieron en bandejas de cultivo con solución nutritiva hasta el día 49 de cultivo (crecimiento vegetativo), momento en el cual se adicionó al medio el tratamiento de ABA (0, 1 y 10 μM), y 2 días después el salino (0 y 200 mM de NaCl), manteniéndose ambos tratamientos hasta el final del tiempo de experimentación. Se realizaron dos cosechas, a los 6 y 12 días de tratamiento de NaCl, coincidiendo con inicio de floración y floración respectivamente.

El diseño experimental para cada especie de planta consta de 12 tratamientos (3 dosis de ABA x 2 de NaCl x 2 recolectas) con 6 réplicas por tratamiento, el experimento se realizó dos veces, determinándose los siguientes parámetros:

- Análisis del crecimiento y fijación de nitrógeno mediante los parámetros indicados en el apartado 3.1.
- Determinaciones enzimáticas y analíticas citadas en el apartado 3.3.

3.5. Caracterización de la actividad catalasa de *Phaseolus vulgaris* y *Medicago sativa*

La enzima catalasa nodular de *P. vulgaris* y *M. sativa* fue parcialmente purificada y caracterizada, para ello plantas de judía y alfalfa inoculadas con sus correspondientes microsimbiontes, crecieron en solución nutritiva hasta el día 28 y 70 respectivamente, momento en que se procedió a la recolección de la masa nodular. La purificación y determinación del peso molecular se llevó a cabo mediante los siguientes pasos: **1)** cromatografía de exclusión molecular, **2)** cromatografía de afinidad y **3)** separación por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS.

Este estudio de caracterización se inició determinando: **a)** la evolución de la actividad catalasa foliar y nodular de plantas control de judía y alfalfa a lo largo del tiempo de experimentación, que finalizó en floración. **b)** El efecto de la salinidad en esta actividad enzimática de hoja y nódulo.

Este estudio se realizó con ambas leguminosas en simbiosis que fueron cultivadas con solución nutritiva Rigaud y Puppo (1975) conteniendo NaCl (0, 25 y 50 mM) para *P. vulgaris* y (0, 100 y 200) para *M. sativa*. Se planificaron 4 muestreos de cada cultivo, los tres primeros correspondieron a crecimiento vegetativo y el último a floración. Las plantas de judía se cosecharon a los 7, 12, 17 y 28 días de cultivo y las de alfalfa a los 21, 35, 49 y 70.

El material recolectado (hoja y nódulo) de las dos especies de leguminosas fue utilizado para realizar estudios *in vivo* e *in vitro*. Los estudios *in vivo* se abordaron con dos aproximaciones diferentes:

- a. Determinar la evolución de la actividad catalasa foliar y nodular de plantas control a lo largo del tiempo de experimentación.
- b. Evaluar la actividad catalasa de hoja y nódulo en la última cosecha, con las distintas dosis de NaCl.

Los estudios *in vitro* se centraron en examinar la inhibición de la actividad catalasa por la salinidad e inhibidores específicos. Para ello se usaron fracciones de la enzima obtenida por cromatografía de gel filtración procedente del material recolectado (hoja y nódulo) de plantas de judía y alfalfa control. Se estudió tanto el efecto del NaCl como de diferentes compuestos/moléculas que potencialmente pueden actuar como inhibidores de la CAT (superóxido, oxígeno, citrato, DTT, ditionito, β -mercaptoetanol y cianida).

4. Metodología empleada

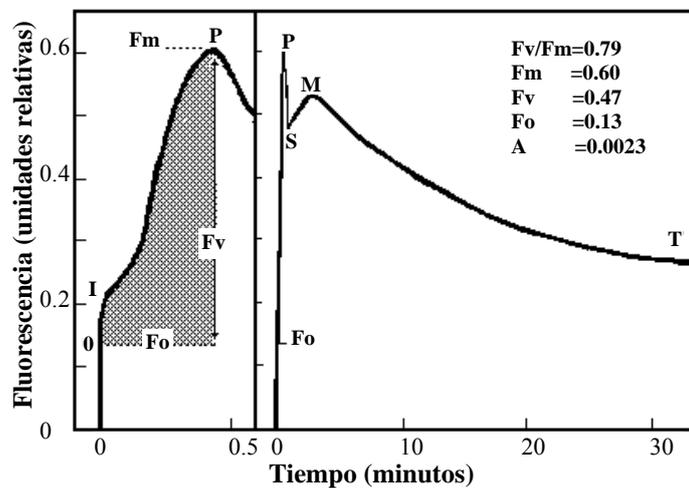
4.1. Recolección de las plantas

Se seleccionaron de forma aleatoria plantas de *P. vulgaris* y *M. sativa*, en las que se determinaron los parámetros relacionados con el crecimiento y la actividad nitrogenasa. Para ello, se recogieron 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 48 h, pasado este tiempo, se determinó el peso seco de cada órgano. El resto de plantas se extrajeron del medio de cultivo y se lavaron las raíces con agua para eliminar los restos de vermiculita y perlita. Las plantas de cada tratamiento se separaron en tres grupos para realizar repeticiones, separándose parte aérea, raíz y nódulos. El material vegetal se conservó a -80°C hasta su posterior utilización en las determinaciones metabólicas y analíticas.

4.2. Actividad 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 min, 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 obtiene 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.

4.3. Fijación de nitrógeno

4.3.1. Desarrollo nodular

Se determinó el peso seco de nódulo (PSN) y se calculó el peso normalizado de nódulos (PNN), que consiste en dividir el peso seco de nódulos por el peso seco de la parte aérea. Los resultados se expresan en mg PSN mg⁻¹ PSPA.

$$\text{PNN} = (\text{PSN}/\text{PSPA})$$

4.3.2. 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 a través de los nódulos una corriente de Ar/O₂ en una proporción 80/20 %. En este caso todos los electrones son utilizados para la producción de H₂. Para determinar la tasa de fijación de N₂ se utiliza la siguiente ecuación:

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

Se coloca 3 en el denominador porque para reducir N₂ a NH₃ se requieren tres pares de electrones, mientras que la reducción de H⁺ a H₂ requiere solo de un par de electrones.

4.4. Actividades enzimáticas

4.4.1. Metabolismo carbonado

4.4.1.1. Extracción

La extracción de las enzimas fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), malato deshidrogenasa (MDH) e isocitrato deshidrogenasa (ICDH) se realizó homogeneizando 0.2 g de material vegetal en 4 ml de tampón maleico-KOH 100 mM pH 6.8, que contiene sacarosa 100 mM, β-mercaptoetanol al 2 % (v/v) y etilenglicol al 20 % (v/v). Para extraer la enzima sacarosa sintasa (SS) se utilizó 1.5 ml de tampón fosfato potásico 50 mM pH 8, adicionado con EDTA 1 mM y etilenglicol al 20 % (v/v). En todos los extractos se añadió polivinilpolipirrolidona

(PVPP) 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 a 4°C. El sobrenadante obtenido, se utilizó para determinar las actividades enzimáticas.

4.4.1.2. Sacarosa sintasa

La actividad SS (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 mM
*Sacarosa	100 mM
*UDP	2 mM
*UDPGlucosa deshidrogenasa	0.025 U/ml
*NAD ⁺	1.5 mM

La reacción se inició con la adición de 100 µl de extracto para completar un volumen final de 1 ml, a una temperatura de 30°C. La actividad sacarosa sintasa se expresó en µmol NAD⁺ mg⁻¹ prot min⁻¹.

4.4.1.3. Fosfoenolpiruvato carboxilasa

La actividad PEPC (EC 4.1.1.31), que cataliza la transformación de fosfoenolpiruvato en oxalacetato, 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 Soussi *et al.* (1998) se realizó a 30°C con la siguiente mezcla de reacción:

*Tampón bicina-KOH pH 8.5	100 mM
*NaHCO ₃	10 mM
*MgCl ₂	5 mM
*Fosfoenolpiruvato (PEP)	2 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 PEPC se expresó como µmol NADH mg⁻¹ prot min⁻¹.

4.4.1.4. Malato deshidrogenasa

La actividad MDH (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 (Soussi *et al.*, 1998) los extractos fueron diluidos 50 veces. La mezcla de reacción fue la siguiente:

*Tampón bicina-KOH pH 8.5	100 mM
*Oxalacetato (OAA)	1 mM
*MgCl ₂	5 mM
*NADH	0.2 mM

La reacción se inició con la adición de 25 μ l del extracto diluido para completar un volumen final de 1 ml. La cuantificación se realizó a 30°C, siguiendo el cambio de absorbancia a 340 nm. La actividad MDH se expresó en μ mol NADH mg^{-1} prot min^{-1} .

4.4.1.5. Isocitrato deshidrogenasa

La actividad ICDH (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 mM
*Isocitrato	1 mM
*MgCl ₂	5 mM
*NADP ⁺	0.5 mM

La determinación de la actividad ICDH se optimizó a partir de la metodología descrita por Chen y Cullimore (1988). La reacción se inicia con la adición de 10 μ l de extracto para completar un volumen final de 1 ml. La lectura de las muestras se realizó a una longitud de onda de 340 nm a 30°C. La actividad ICDH se expresó en μ mol NADP⁺ mg^{-1} prot min^{-1} .

4.4.2. Metabolismo de asimilación de amonio

4.4.2.1. Extracción

La preparación de extractos citosólicos de las enzimas glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa GOGAT), glutamato deshidrogenasa (GDH) y aspartato amino transferasa (AAT) se realizó en tampón maleico-KOH 100 mM pH 6.8, adicionado de sacarosa 100 mM, β -mercaptoetanol 2 % (v/v) y etilenglicol 20 % (v/v). El tejido fresco (0.2 g) se homogeneizó en mortero con tampón de extracción (4 ml) y PVPP insoluble, en una cantidad equivalente al 33 % del peso fresco de la muestra. El homogeneizado se filtró a través de gasa, y a continuación se clarificó

por centrifugación a 30000 g durante 20 min a 4°C. La solución transparente obtenida, que contenía las proteínas solubles del citosol, se utilizó como extracto para determinar las actividades enzimáticas.

4.4.2.2. Glutamina sintetasa

La actividad GS (EC 6.3.1.2) transforma el glutamato en glutamina con un gasto de ATP. Su actividad se valoró mediante un ensayo, en el que uno de sus productos de reacción (γ -glutamil hidroxamato), puede valorarse mediante una reacción colorimétrica. La cuantificación del γ -glutamil hidroxamato (γ -GH) formado se hace a partir de una recta de calibrado obtenida con concentraciones conocidas de hidroxamato. El ensayo ha sido adaptado a partir de la metodología propuesta por Kaiser y Lewis (1984). La mezcla de reacción contiene en 1 ml de volumen total:

*Tampón imidazol-HCl pH 7.8	150 mM
*Na ₂ -EDTA	4 mM
*L-glutamato sódico	150 mM
*MgSO ₄	45 mM
*Hidroxilamina	30 mM
*ATP	10 mM

Se adiciona 0.1 ml de extracto, que inicia la reacción. Esta se desarrolla a 30°C durante 45 min y posteriormente se detiene por la adición de 0.5 ml de reactivo de cloruro férrico (mezcla 1:1:1 de: 10 % (p/v) FeCl₃·6H₂O en HCl, 24 % (p/v) ácido tricloroacético en agua destilada y 50 % (v/v) HCl en agua destilada). De cada extracto se prepararon las repeticiones, un blanco (omitiendo el glutámico y la hidroxilamida) y el control a tiempo cero (añadiendo el cloruro férrico para detener la reacción, inmediatamente antes de la incubación). Las mezclas se centrifugaron a 3500 g durante 5 min y se registro la absorbancia del sobrenadante a 540 nm. La actividad se expresó en $\mu\text{mol } \gamma\text{-GH mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$.

4.4.2.3. Glutamato sintasa

La actividad GOGAT (EC 1.4.1.14) cataliza la aminación reductiva del 2-oxoglutarato, utilizando glutamina y piridín nucleótidos reducidos como donadores de electrones, para producir dos equivalentes de glutamato. Esta actividad se determinó según el procedimiento descrito por Singh y Srivastava (1986). La mezcla de reacción contenía en un volumen total de 1 ml:

*Tampón fosfato potásico pH 7.5	50 mM
*Na ₂ -EDTA	1 mM
* β -mercaptoetanol	0.1 % (v/v)

*2-oxoglutarato	2.5 mM
*Aminooxiacetato	1 mM
*NADH	0.15 mM
*L-glutamina	10 mM

La reacción se inicia con la adición de 0.1 ml de extracto, y la lectura de las muestras se realizó a una longitud de onda de 340 nm a 30°C, dejando un tiempo de espera de 3 min. La actividad GOGAT se expresó en $\mu\text{mol NADH mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$.

4.4.2.4. Glutamato deshidrogenasa

La actividad GDH (EC 1.4.1.2.) se determinó según el procedimiento de Singh y Srivastava (1986). Esta enzima cataliza la aminación reductiva del 2-oxoglutarato utilizando el amonio y piridín nucleótidos reducidos como donadores de electrones, para producir una molécula de glutamato. La mezcla de reacción contiene, en 1 ml de volumen total:

*Tampón fosfato potásico pH 7.5	50 mM
* $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	100 mM
*NADH	0.15 mM
*2-oxoglutarato	2.5 mM

La reacción se inicia con la adición de 0.05 ml de extracto, y la lectura de las muestras se realizó a una longitud de onda de 340 nm a 30°C, dejando un tiempo de espera de 3 min. La actividad GDH se expresó en $\mu\text{mol NADH mg}^{-1} \text{ prot h}^{-1}$.

4.4.2.5. Aspartato aminotransferasa

La actividad AAT (EC 26.1.1) cataliza la reacción reversible en la que el glutamato y oxalacetato se transforman en aspartato y 2-oxoglutarato. Su actividad se determinó siguiendo el método descrito por González *et al.* (1995). La mezcla de reacción contiene, en 1 ml de volumen total:

*Tampón Tris-HCl pH 8	50 mM
* MgCl_2	4 mM
*Ácido aspártico	10 mM
*NADH	0.2 mM
*2-oxoglutarato	1 mM
*NADH	1 mM

La reacción se inicia con la adición de 0.05 ml de extracto, y la lectura de las muestras se realizó a una absorbancia de 340 nm a 30°C, dejando un tiempo de espera de 3 min. La actividad AAT se expresó en $\mu\text{mol NADH mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$.

4.4.3. Metabolismo oxidativo

4.4.3.1. Superóxido dismutasa

La actividad SOD (EC 1.15.1.1) cataliza la dismutación de superóxido a oxígeno y peróxido de hidrógeno. La extracción y posterior cuantificación de la enzima SOD se realizó mediante la técnica de inhibición de la reducción fotoquímica del azul de nitrotetrazolio (NBT) propuesta por Beyer y Fridovich (1987) con algunas modificaciones y optimizada para nuestras condiciones. La extracción se realizó macerando 0.4 g de material vegetal en 3 ml de tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.8, que contiene EDTA 0.1 mM y β -mercaptoetanol 10 mM. Además se añadió PVPP insoluble en una cantidad equivalente al 40 % del peso fresco de la muestra. El homogeneizado se filtró a través de doble capa de gasa y a continuación se centrifugó a 15000 g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se utilizó para determinar la actividad enzimática, para lo cual se prepararon tres tandas de tubos (control, blanco, muestra) que contenían:

	<u>Control (μl)</u>	<u>Blanco (μl)</u>	<u>Muestra (μl)</u>
*Tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.8 y EDTA 0.1 mM	1800	1750	1750
*Metionina 13 mM	100	100	100
*Riboflavina 2 μM	50	50	50
*NBT 75 μM	50	50	50
*Extracto enzimático	--	50	50

A continuación se agitaron los tubos, se pusieron en oscuridad y se procedió a su lectura a una longitud de onda de 560 nm ($t = 0$ min). Una vez terminada la lectura los tubos del blanco continuaron en oscuridad, y los controles y las muestras fueron iluminadas con tubos fluorescentes durante 10 min con una intensidad lumínica media de $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, a una temperatura de 25°C. Transcurrido este tiempo, se trasladaron todos los tubos a oscuridad, y se volvieron a medir en el mismo orden y a la misma longitud de onda ($t = 10$ min). La actividad SOD se expresó como $\text{U mg}^{-1} \text{ prot}$.

4.4.3.2. Catalasa

La actividad CAT (EC 1.11.1.6) cataliza la destrucción del peróxido de hidrógeno formando agua y oxígeno. La extracción y posterior cuantificación de la enzima CAT se determinó según el método propuesto por Aebi (1984) basado en la

disminución de absorbancia, debida a la desaparición del H₂O₂, que se produce a 240 nm y 30°C. El extracto se obtiene homogeneizando 0.4 g de material vegetal en 5 ml de tampón fosfato potásico 100 mM pH 7, que contiene EDTA 100 mM y tritón X-100 al 0.1 %. Además se añade PVPP insoluble en una cantidad equivalente al 20 % del peso fresco de la muestra. El homogeneizado se filtró a través de doble capa de gasa y a continuación se centrifugó a 27000 g durante 20 min a 4°C. El sobrenadante obtenido, se utilizó para determinar la actividad enzimática según la siguiente mezcla de reacción:

*Tampón fosfato potásico pH 7	50 mM
*Tritón X-100	0.1 %(v/v)
*H ₂ O ₂	10.6 mM

La reacción se inició al añadir 50 µl de extracto hasta completar un volumen final de 1 ml. La actividad CAT se expresó como µmol H₂O₂ mg⁻¹ prot min⁻¹.

4.4.3.3. Guaiacol peroxidasa

La actividad GPX (EC 1.11.1.7) elimina el peróxido de hidrógeno utilizando guaiacol como donador de electrones, que es transformado en tetraguaiacol. En la determinación se utilizó el método descrito por Kato y Shimizu (1987), con algunas modificaciones para optimizarlo a nuestras condiciones. La extracción se realizó homogeneizando 0.2 g de material vegetal en 5 ml de tampón fosfato potásico 50 mM pH 7, que contiene EDTA 100 mM y β-mercaptoetanol 10 mM. Además se añadió PVPP insoluble en una cantidad equivalente al 25 % del peso fresco de la muestra. El homogeneizado se filtró a través de doble capa de gasa y a continuación se centrifugó a 15000 g durante 20 min a 4°C. El sobrenadante obtenido, se utilizó para determinar la actividad enzimática según la reacción siguiente:

*Tampón fosfato sódico pH 5.8	200 mM
*Guaiacol	7.2 mM
*H ₂ O ₂	11.8 mM

La reacción se inicia con la adición de 25 µl del extracto diluido 50 veces para completar un volumen final de 1 ml. La lectura de las muestras se realizó a una absorbancia de 470 nm a 25°C. La actividad GPX se expresó en µmol H₂O₂ mg⁻¹ prot min⁻¹.

4.4.3.4. Ciclo ascorbato-glutation

En el ciclo ascorbato-glutation intervienen cuatro enzimas: ascorbato peroxidasa, monodehidroascorbato reductasa, dehidroascorbato reductasa y glutatión reductasa. El extracto se realiza homogeneizando 0.4 g de material

vegetal en 3.5 ml de tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.8, que contiene EDTA 0.1 mM y β -mercaptoetanol 10 mM. Además se añade polivinilpolipirrolidona (PVPP) insoluble en una cantidad equivalente al 25 % 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 15000 g durante 20 min a 4°C. El sobrenadante obtenido, se utilizó para determinar las actividades enzimáticas.

Ascorbato peroxidasa

La actividad de esta enzima (APX, EC 1.11.1.1) elimina el peróxido de hidrógeno, utilizando ascorbato, que se transformará en monodehidroascorbato. La actividad se determinó según el método de Hossain y Asada (1984), y debido a la elevada actividad de esta enzima, para la determinación de la misma, los extractos fueron diluidos 10 veces. La mezcla de reacción fue la siguiente:

*Tampón Tris-HCl pH 7.8	50 mM
*L-Ascorbato sódico	0.4 mM
*H ₂ O ₂	0.3 mM

La reacción se inicia con la adición de 50 μ l del extracto diluido para completar un volumen final de 1 ml. La lectura de las muestras se realizó a una absorbancia de 290 nm a 25°C. La actividad APX se expresó en μ mol ascorbato mg^{-1} prot min^{-1} .

Monodehidroascorbato reductasa

Esta enzima (MDHAR, EC 1.6.5.4) transforma el monodehidroascorbato en ascorbato con la oxidación del NADH. La actividad se cuantificó por el método de Hossain *et al.* (1984) siguiendo la oxidación del NADH, según la siguiente mezcla de reacción:

*Tampón Tris-HCl pH 7.8	50 mM
*NADH	0.2 mM
*L-Ascorbato sódico	1 mM
*Ascorbato oxidasa	0.5 U/ml

La reacción se inicia con la adición de 100 μ l del extracto para completar un volumen final de 1 ml. La lectura de las muestras se realizó a una absorbancia de 340 nm a 25°C. La actividad MDHAR se expresó en μ mol NADH mg^{-1} prot min^{-1} .

Dehidroascorbato reductasa

La actividad de esta enzima (DHAR, EC 1.8.5.1) cataliza el paso de dehidroascorbato a ascorbato utilizando glutatión reducido como poder reductor.

La determinación se optimizó a partir de la metodología descrita por Dalton *et al.* (1993) cuya mezcla contiene:

*Tampón fosfato potásico pH 6.5	50 mM
*EDTA	0.1 mM
*Glutation Reducido	0.5 mM
*Dehidroascorbato	0.5 mM

La reacción se inicia con la adición de 50 μ l de extracto para completar un volumen final de 1 ml. La lectura de las muestras se realizó a una absorbancia de 265 nm a 25°C. La actividad ICDH se expresó en μ mol ascorbato mg^{-1} prot min^{-1} .

Glutation reductasa

Esta actividad (GR, EC 1.8.5.1) regenera el glutacion reducido a partir de su forma oxidada, utilizando el NADPH como poder reductor, pudiéndose medir la disminución de absorbancia a 340 nm. La mezcla de reacción, optimizada a partir de la descrita por Edwards *et al.* (1990), fue la siguiente:

*Tampón Hepes-NaOH pH 7.8	100 mM
*EDTA	1 mM
*MgCl ₂	3 mM
*Glutation oxidado	0.25 mM
*NADPH	0.2 mM

La reacción se inició con la adición de 100 μ l de extracto para completar un volumen final de 1 ml, a una temperatura de 25°C. La actividad GR se expresó en μ mol NADPH mg^{-1} prot min^{-1} .

4.4.4. Lipoxigenasa

La extracción de la enzima (LOX, EC 1.13.11.12) y posterior cuantificación de la actividad se realizó según Axelrod *et al.* (1981), con algunas modificaciones para optimizar nuestras condiciones. Para la preparación de extractos se utilizó el tampón de extracción fosfato potásico 50 mM pH 6.5, adicionado de tritón X-100 0.5 % (v/v) y tween-20 1 % (v/v). El tejido fresco (0.2 g) se homogeneizó en mortero con tampón de extracción (4 ml) y PVPP insoluble, en una cantidad equivalente al 40 % del peso fresco de la muestra. El homogeneizado se filtró a través de gasa, y a continuación se clarificó por centrifugación a 15000 g durante 15 min a 4°C. Previo a la reacción se prepara el reactivo ácido linoléico como se detalla a continuación:

*Ácido linoléico	31 μ l
------------------	------------

*Tween-20	52 μ l
*Agua destilada	1000 μ l
*NaOH (1 M)	120 μ l
*Agua destilada	3797 μ l

Volumen final 5 ml

Este reactivo, se congela en nitrógeno líquido en alícuotas de 1 ml, y se conserva a -80°C . La mezcla de reacción contiene en 1 ml de volumen final tampón fosfato sódico pH 6 (100 mM), ácido linoléico descongelado y convenientemente diluido (0.2 mM) y 0.05 ml de extracto que inicia la reacción. La lectura se realizó a una longitud de onda de 234 nm a 25°C , dejando un tiempo de espera de 3 min. La actividad LOX se expresó en $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{prot min}^{-1}$.

4.4.5. Aldehído Oxidasa

La determinación de la enzima aldehído oxidasa se realizó con muestras de nódulos y hojas (1 g), que fueron macerados con 2 ml de tampón de tampón Tris 250 mM pH 8.3, EDTA 10 mM, dithiothreitol 20 mM, glutation reducido 10 mM y 1 μ l/ml de cóctel inhibidor de proteasas (St. Louis, Sigma). El homogeneizado fue centrifugado a 27,000 g a 4°C durante 15 min y el sobrenadante fue usado para la identificación en gel.

A) Preparación del gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes

Para la detección de la enzima se prepararon geles de poliacrilamida en condiciones nativas de 1.5 mm de espesor. Los geles constaron de dos partes: **a)** un gel concentrador de aproximadamente 2 cm de longitud, que contenía los pocillos para cargar las muestras, formado por un tampón Tris-HCl 123mM (pH 6.8), acrilamida-bisacrilamida al 4%, y como catalizadores para la polimerización TEMED al 0,1% y persulfato de amónico al 0,1%; **b)** un gel separador de aproximadamente 6 cm formado por un tampón Tris-HCl 390 mM (pH 8.8), acrilamida-bisacrilamida al 7.5 %, TEMED al 0,06% y persulfato amónico al 0,1%.

La preparación del gel definitivo se realizó primero depositando el gel separador en el interior de los cristales, a continuación se cubrió la superficie del gel con isopropanol para prevenir el contacto del oxígeno con el gel, ya que inhibe la reacción de polimerización, transcurridos 30 minutos se eliminó el solvente añadido y tras lavar bien con agua destilada se añadió la mezcla formadora del gel concentrador e inmediatamente se insertó el peine en la solución.

B) Desarrollo de electroforesis en condiciones no desnaturalizantes

Una vez polimerizada la acrilamida, el gel se montó sobre una cubeta Mini Protean II (Bio-Rad) que contenía el tampón de electroforesis (glicina 192 mM y

Tris-HCl 250 mM) y se procedió a la carga de las muestras en los pocillos formados. Se cargaron aproximadamente 100 µg de proteína de cada enzima y para ello se utilizó como solución de carga un tampón Tris-HCl 125 mM pH 6.8, que contenía glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0.1 %.

La electroforesis se llevó a cabo a 100 voltios hasta que las muestras entraron en el gel separador, momento en el que se aumentó la velocidad a 150 voltios, aproximadamente durante 3 horas. Una vez finalizada la electroforesis se rescató el gel donde habían quedado atrapadas las proteínas a determinar, para proceder a su identificación mediante las tinciones adecuadas.

C) Tinción por actividad

El gel fue inmerso durante 1 hora en 25 ml de tampon Tris HCl 0.1 M (pH 7.5), 1 mM MTT, 0.1 mM phenacine y se utilizó como sustrato el ácido indol-3 acético 1 mM, hasta el desarrollo de las bandas. La reacción se paró adicionando 25 mM de ácido acético 10% (Fedorova *et al.*, 2005). La densidad de las bandas del gel fueron cuantificadas usando el programa “Quantity One” (Bio-Rad Hemel Hempstead, UK).

4.5. Determinaciones analíticas

4.5.1. 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 el etanol al 96 %, con la relación peso fresco de muestra/volumen de medio de 1/12 para los dos órganos mencionados. Tras la maceración se centrifugó a 3500 g durante 10 min. En **hojas**, el disolvente utilizado como medio de extracción fue la mezcla etanol-cloroformo-agua (ECA) en la proporción 12:5:1 de acuerdo con Tully *et al.* (1979), con la relación peso fresco de muestra/volumen de medio de 1/20. Tras la maceración se centrifugó a 3500 g durante 10 min. Al sobrenadante obtenido se le añadió 15 ml de agua destilada y 1 ml de cloroformo, 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 analítica.

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. De igual modo se procedió para preparar una curva patrón de concentraciones conocidas de glucosa (0-2.5 mM). La

absorbancia debida al color verde desarrollado se midió a 625 nm y los resultados se expresaron en mg de glucosa g⁻¹ PF.

4.5.2. Polioles, glucosa y trehalosa

La extracción de polioles, glucosa y trehalosa se realizó por cromatografía iónica (Dionex) según la metodología descrita por Monson *et al.* (2006). Las muestras vegetales (0.4 g) se maceraron con nitrógeno líquido y 3 ml de etanol al 80 %. El homogeneizado se calienta a 75°C durante 10 min, y luego se centrifuga a 10000 g durante 15 min. El precipitado obtenido es reextraído con 0.5 ml de etanol al 80 % y ambos sobrenadantes son unidos y secados al vacío a 40°C en speed-vac (SPD11V Thermo).

Las muestras se resuspendieron en agua mili Q a 80°C, y se centrifugaron a 10000 g durante 15 min. El sobrenadante se cargó en un vial de 0.5 ml y se colocó en un inyector programado para introducir en la columna 0.025 ml de muestra. Los distintos polioles, glucosa y trehalosa se separaron usando un dionex (DX500, Sunnydale CA), ubicado en el laboratorio de Fijación de Nitrógeno de la Universidad de Granada, mediante gradiente de NaOH (0-600 mM) a flujo constante de 0.4 ml min⁻¹, con una columna CarboPacTMMA1 (4 x 250 mm) específica para polioles, monosacáridos y disacáridos. Los polioles se cuantificaron mediante un detector electroquímico ED-40 (Dionex Sunnydale CA), y usando como patrón mioinositol, ononitol, pinitol, glucosa y trehalosa.

4.5.3. Malato y glutamato

La extracción y posterior determinación de malato (Delhaize *et al.*, 1993) y glutamato (Pye *et al.*, 1978) se basaron en un mismo fundamento, es decir acopladas a reacciones enzimáticas con malato deshidrogenasa (MDH) y glutamato deshidrogenasa (GDH), respectivamente.

La MDH cataliza la oxidación de L-malato en presencia de NAD⁺, formando oxalacetato, NADH y H⁺.



La GDH cataliza la oxidación de L-glutamato en presencia de NAD⁺, formando oxoglutarato, NADH y H⁺.



El equilibrio de ambas reacciones está normalmente desplazado hacia la izquierda, es decir, a la formación de malato y glutamato respectivamente; pero, se pueden desplazar a favor de la formación de NADH, eliminando los productos finales de la reacción (oxalacetato u oxoglutarato, e hidrogeniones). Este método utiliza un tampón alcalino con objeto de amortiguar la concentración de

hidrogeniones producidos y además el oxalacetato u oxoglutarato son retirados por formación de derivados de hidrazona. De esta forma se puede realizar una medida cuantitativa de malato y glutamato por el incremento de absorbancia a 340 nm, debido a la formación de NADH.

4.5.3.1. Extracción

El material vegetal (0.4 g) se maceró con 3 ml de ácido perclórico 1 M para desproteínizar. El precipitado formado, se retiró por centrifugación a 3000 g durante 5 min a 4°C, y después el sobrenadante se neutralizó con KOH 5 M (0.2 ml KOH/ ml sobrenadante) al objeto de que la posterior actividad enzimática no se viese alterada. La neutralización se realizó en frío y añadiendo bajo agitación poco a poco el KOH. Una vez neutralizado, se dejó reposar en frío hasta que se observó la formación de dos fases, se tomó la fase superior y se centrifugó a 3000 g durante 5 min a 4°C. Finalmente el sobrenadante se utilizó para la determinación.

4.5.3.2. Cuantificación

La reacción se realiza en tampón hidracina/glicina pH 9 que contiene 5.82 ml de hidracina monohidratada 0.4 M y $d=1.032 \text{ g/l}$, y 11.26 g de glicina 0.5 M, en un volumen final de 300 ml. La mezcla de las reacciones es la que se detalla a continuación:

	<u>Malato</u>	<u>Glutamato</u>
*Tampón hidracina/glicina pH 9		
*NAD ⁺	4 mM	10 mM
*MDH	5 U/ml	--
*ADP	--	2 mM
*GDH	--	4 U/ml

Ambas reacciones, en un volumen final de 1 ml, se inician con la adición del sobrenadante (0.05 ml para malato y 0.1 para glutamato). Para visualizar el cambio de absorbancia a 340 nm, se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu UV-1604, termostatzado a 30°C. La concentración de malato y glutamato se calcularon comparando con curvas patrones de DL-ácido málico (0-6 mM) y L-ácido glutámico (0-1.5 mM) respectivamente, preparadas en una solución de ácido perclórico. Los resultados son expresados en $\text{mg g}^{-1} \text{ PF}$.

4.5.4. Aminoácidos libres

La determinación de aminoácidos se realizó siguiendo el método de Yemm y Cocking (1955). Se utilizaron los extractos preparados para determinar azúcares solubles totales (4.5.1.). Alícuotas de 0.5 ml de muestra, se le 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 absorbancia a 570 nm. Como referencia se preparó una curva patrón a partir de asparagina (0-7.5 mM). El contenido en aminoácidos se expresó en mg asparagina g⁻¹ PF.

4.5.5. Prolina

A 0.5 ml de extracto, preparados como se describe para valorar azúcares solubles totales (4.5.1.), se les adicionó 1.5 ml de ácido acético glacial, 1.5 ml de ninhidrina [preparada al 2.5 % (p/v) en una solución formada por ácido acético glacial al 60 % (v/v) y ácido fosfórico al 40 % (v/v)], y 1.5 ml de agua destilada. 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 absorbancia a 520 nm. Para el cálculo de la concentración de prolina se preparó una curva patrón con prolina (0-0.35 mM). El contenido de prolina se expresó como µg prolina g⁻¹ PF.

4.5.6. 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 100 µl de muestra se adicionaron 400 µl de agua destilada y 1.5 ml de reactivo A. Se agitaron los tubos e incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. A continuación, se adicionó 0.15 ml de reactivo de Folin-Cicolteau (reactivo de fenol) diluido 1:1 en agua destilada y se incubó a temperatura ambiente 30 min en oscuridad, midiéndose la absorbancia 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 0 y 80 µg ml⁻¹.

El reactivo A presentó 100 partes de reactivo B y una de reactivo C. El reactivo B está formado por: Na₂CO₃ 2 % (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 CuSO₄·5H₂O 4 % (p/v).

4.5.7. Ascorbato

La extracción se realizó siguiendo el método descrito por Law *et al.* (1992). El tejido vegetal (0.5 g), homogeneizado con 5 ml de ácido metafosfórico al 5 % (p/v), se centrifugó a 20000 g durante 15 min a 4°C y el sobrenadante obtenido se utilizó para las posteriores determinaciones.

El ensayo se basó en la reducción de Fe^{3+} por ascorbato reducido (AsA), seguido de la formación de un complejo entre Fe^{2+} y bipyridil, el cual absorbe a 525 nm (Law *et al.*, 1992). El ascorbato total se determinó después de la reducción del dehidroascorbato (DHA) a AsA por dithiothreitol (DTT). El contenido de AsA se valoró directamente utilizando el extracto sin añadir DTT. La diferencia de ambos ensayos (total-AsA) permitió deducir el contenido de DHA. La mezcla de reacción para la determinación de ascorbato total contenía:

*Sobrenadante		0.2 ml
*Tampón fosfato sódico pH 7.5	150 mM	0.5 ml
*DTT	10 mM	0.1 ml

A continuación, los tubos se agitaron e incubaron a temperatura ambiente y en oscuridad durante 10 min. Después a la mezcla de reacción se le añadieron los siguientes reactivos:

*N-etilmaleimida	0.5 %(p/v)	0.1 ml
*Ácido trifluoroacético	10 %(v/v)	0.4 ml
*Ácido ortofosfórico	44 %(v/v)	0.4 ml
*2-2'-bipyridil	4 %(p/v)	0.4 ml
* $FeCl_3$	3 %(p/v)	0.2 ml

Los tubos de ensayo se agitaron e incubaron a 40°C y en oscuridad durante 40 min. Pasado este tiempo se paró la reacción en hielo y se procedió a la lectura de absorbancia frente a una curva patrón de ascorbato (0-500 μ M). Las concentraciones de AsA, DHA y ascorbato total fueron expresadas en μ mol g^{-1} PF.

4.5.8. Glutation

La determinación se realizó siguiendo el método de Law *et al.* (1992) y utilizando los extractos preparados como se describe para ascorbato (4.5.7.). El glutatation reducido (GSH) reacciona con 5,5-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico) (DTNB) formando 5-thio-2-ácido nitrobenzoico (TNB) que absorbe a a 412 nm. La determinación de la forma oxidada de glutatation (GSSG) se basó en la especificidad de la enzima glutatation reductasa (GR) por GSSG que es reducido a GSH. El contenido total de glutatation (GSSG + GSH), se estimó por el incremento de absorbancia debido a la formación de TNB según la siguiente reacción:

*Sobrenadante		0.2 ml
*Tampón Hepes-HCl pH 7.5 (contiene betaína 330 mM)	50 mM	1 ml
*Ácido sulfosalicílico	10 % (p/v)	0.6 ml

A continuación se agitaron los tubos, y se preparó la siguiente mezcla de reacción:

*Mezcla reacción anterior		0.15 ml
*NADPH	0.3 mM	0.7 ml
*DTNB	6 mM	0.1 ml

La nueva mezcla se agitó suavemente y se incubó durante 4 min a una temperatura de 30°C. Posteriormente se agregó 0.05 ml de la enzima GR (10 U/ml) y una vez agitados los tubos, se procedió a visualizar el cambio de absorbancia, utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-1604, termostatzado a 30°C. Para determinar la concentración se comparó con una curva patrón de GSH (0-160 µM), preparada en una solución de ácido metafosfórico al 5 %.

El contenido de GSSG se determinó en un procedimiento similar, pero con adición de 2-vinilpiridina que bloquea el GSH de la muestra en presencia de trietanolamina, evitando así que reaccione con el DTNB.

*Sobrenadante		0.6 ml
*Ácido sulfosalicílico	10 %(p/v)	0.6 ml

A continuación se agitaron los tubos, y se preparó la siguiente mezcla de reacción:

*Mezcla reacción anterior		0.9 ml
*2-vinilpiridina	97 %(v/v)	0.06 ml
*Trietanolamina	50 %(v/v)	0.1 ml

La nueva mezcla se agitó vigorosamente durante 30 segundos aproximadamente y se incubó durante 30 min en oscuridad y a una temperatura ambiente. A partir de este momento se procedió de igual manera que para glutatión total adicionando NADPH, DTNB y GR. Para determinar la concentración se comparó con una curva patrón de GSSG (0-80 µM), preparada en una solución de ácido metafosfórico al 5 %. El contenido de GSH, fue deducido de la diferencia entre la concentración de glutatión total y GSSG. Las concentraciones de GSH, GSSG y glutatión total fueron expresadas en µmol g⁻¹ PF.

4.5.9. Peróxido de hidrógeno

La determinación se realizó siguiendo el método propuesto por Alexieva *et al.* (2001), en el cual el H₂O₂ reacciona con el yoduro en un medio ácido, liberando yodo que dará un color amarillo. El material vegetal (0.5 g) se homogeneizó con 6 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 0.1 % (p/v) y se centrifugó a 12000 g durante 15 min a 4°C. Para la reacción se usó 0.5 ml del sobrenadante obtenido y se le añadió 0.5 ml de tampón fosfato 100 mM pH 7 y 1 ml de yoduro de potasio 1 M. A continuación los tubos se agitaron e incubaron durante 60 min en oscuridad, y

pasado este tiempo, se midió la absorbancia a 390 nm. La curva patrón se preparó del mismo modo a partir de concentraciones conocidas de H₂O₂ (0-100 μM) y un blanco con TCA. El contenido de H₂O₂ se expresó en μmol H₂O₂ g⁻¹ PF.

4.5.10. Peroxidación de lípidos

La determinación del daño oxidativo a lípidos (lipoperoxidación) se realizó mediante el método descrito por Ohkawa *et al.* (1979), midiendo las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS). Este método está basado en la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) con el grupo aldehído del malonaldehído (MDA), que es un producto final de la lipoperoxidación. La reacción del TBA con el MDA forma un producto (TBA-MDA) cromóforo rosado con un máximo de absorción a 532 nm. El material vegetal (0.5 g) se extrajo con 5 ml de TCA al 20 % (p/v) y 1 ml de butilhidroxitolueno al 4 % (p/v). El homogeneizado se centrifugó a 10000 g durante 15 min a 4°C.

Para la reacción, alícuotas de 0.5 ml de extracto se les añadió 1.5 ml de reactivo de TBA al 0.5 % (p/v), preparado con TCA al 20 %. A continuación los tubos se agitaron vigorosamente y se llevaron a un baño regulado a 94°C durante 30 min en oscuridad. Pasado este tiempo, se paró la reacción enfriando los tubos en hielo durante 10 min, y después se centrifugaron a 10000 g durante 15 min a 4°C. La absorbancia leída se le restó la obtenida a 600 nm (absorbancia inespecífica). La curva patrón se preparó del mismo modo a partir de concentraciones conocidas de MDA (0-20 μM) y un blanco con TCA. La peroxidación de lípidos se expresó en nmol MDA g⁻¹ PF.

4.6. Reguladores de crecimiento

4.6.1. Ácido abscísico

La extracción y cuantificación se realizó según el método de Khadri *et al.* (2006). El material vegetal 0.5 g se maceró con 5 ml de solvente de extracción (metanol 80 % y 10 mg/l de butilhidroxitolueno) y se incubó en oscuridad a 4°C durante 1 h. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 10000 g durante 30 min, se tomó el sobrenadante y se realizaron sucesivamente 2 reextracciones del precipitado con 1 ml de solvente de extracción. Los 3 sobrenadantes se unieron y se pasaron a través de una columna C-18 (Sigma) para eliminar los pigmentos vegetales y otros compuestos no polares que podrían interferir en el inmunoensayo. El eluido de la columna se secó al vacío con un speed-vac (SPD11V Thermo), y el sólido obtenido se resuspendió en 0.5 ml de tampón Tris-HCl 25 mM pH 7.5, que contiene NaCl 100 mM y cloruro de magnesio 1 mM.

La detección de ácido abscísico (ABA) se realizó mediante inmunoensayo (ELISA), utilizando el kit de detección PGR-1 específico para esta hormona

(Sigma). Alícuotas de 0.1 ml de muestra y 0.1 ml de solución trazadora se añaden a cada pocillo y se incuban a 4°C durante 3 h. En este tiempo el ABA de la muestra vegetal compite con la molécula trazadora, que lleva enlazada la enzima fosfatasa alcalina, por unirse a los anticuerpos monoclonales específicos para ABA fijados a la placa ELISA. Transcurrido este tiempo se realizan dos lavados con 0.2 ml de solución de lavado, se añade 0.2 ml de solución sustrato (paranitrofenil fosfato), y las placas se incuban a 37°C durante 60 min, para que se produzca la reacción enzimática. Finalmente se agrega a cada pocillo una gota de NaOH 1M para detener la reacción, se espera 5 min y se realiza la lectura de absorbancia a 405 nm con un lector de placas de ELISA. La cuantificación se realizó en base a una curva patrón de ABA (0-1000 pmol ml⁻¹).

4.6.2. Ácido salicílico

La metodología utilizada para la extracción y cuantificación del ácido salicílico (AS) libre se basó en la descrita por Malamy *et al.* (1992). El material vegetal fresco (0.2 g) se homogeneizó en mortero con N₂ líquido y 1.5 ml de metanol 100 % hasta conseguir una textura de polvo fino. A continuación, el homogeneizado se separa por centrifugación a 9000 g 15 min, el sólido se reextrae una vez más con 0.5 ml de metanol 100 % y ambos sobrenadantes se unen y se secan al vacío a 40°C en speed-vac (SPD11V Thermo). El precipitado se resuspende en 0.35 ml de agua milliQ (precalentada a 80°C para facilitar la resuspensión), y se realiza un proceso de partición de fenoles que consiste en: acidificar el extracto hasta pH cercano a 1 con 50 µl de HCl concentrado/ml extracto y realizar dos extracciones consecutivas con 0.5 ml de la mezcla acetato de etilo:ciclopentano:isopropanol (50:50:1/ v:v:v). En cada extracción la muestra se agitó vigorosamente y se dejó reposar hasta alcanzar la separación de 2 fases acuosa y orgánica, recogiendo esta última (superior). La fase orgánica de ambas extracciones se juntan y se secan al vacío a 40°C, y a continuación el precipitado, se resuspende en 30 µl de metanol.

La separación de fenoles y posterior cuantificación de AS se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Varian), ubicado en la Estación Experimental del Zaidín (EEZ). Se utilizó una columna C18 de fase reversa que se mantuvo a 40°C, y un detector de fluorescencia (Varian) programado a una longitud de onda de excitación de 310 nm, y una de emisión de 405 nm. La velocidad de flujo de la fase móvil, compuesta por ácido acético, metanol y agua, se mantuvo constante a 1 ml min⁻¹. El cálculo de la concentración de AS se realizó por interpolación con una curva patrón preparada con AS (0-13 ng).

4.6.3. Poliaminas

Los extractos para la determinación de poliaminas (PAs) libres se realizaron macerando 0.2 g de tejido vegetal en 600 µl de ácido perclórico al 5 %, e incubando en oscuridad durante 24 h a 4°C. Pasado este tiempo los extractos se centrifugaron durante 5 min a 3000 g. Una vez recogido el sobrenadante se siguió el siguiente protocolo: a 200 µl de sobrenadante se le añadió 6 µl del estándar interno diamino-heptano (HTD, 1 mM) y 200 µl de Na₂CO₃ sobresaturado para alcalinizar el extracto y obtener así el pH necesario para la dansilación. Seguidamente se agregó 400 µl de cloruro de dansilo y se incubó toda la noche en oscuridad a temperatura ambiente. Para detener la reacción se añadió 100 µl de prolina y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y oscuridad, para que reaccione con el cloruro de dansilo remanente. Los dansil derivados obtenidos se extraen con 500 µl de tolueno y 400 µl de la fase orgánica (superior) se recogen después de centrifugar a 3000 g 5 min. El solvente se evapora al vacío en oscuridad a 40°C con un speed-vac (SPD11V Thermo), recogiendo luego el precipitado en 50 µl de acetonitrilo (Flores y Galston, 1982).

La separación y cuantificación de PAs se realizó mediante HPLC (Waters), ubicado en el Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada, con una columna C18 de fase reversa y un detector de fluorescencia (Waters) programado a una longitud de onda de excitación de 415 nm, y una de emisión de 510 nm (Tassoni *et al.*, 2000). La velocidad de flujo de la fase móvil, compuesta por acetonitrilo y agua, fue de 1.5 ml min⁻¹. Para la cuantificación se utilizó una curva patrón preparada para cada una de las PAs a determinar, teniendo en cuenta el valor del estándar interno.

4.7. Purificación y caracterización de la enzima catalasa

4.7.1. Preparación del extracto

El material vegetal (hoja y nódulo) de *P. vulgaris* y *M. sativa* se homogeneizó en un mortero sobre hielo (1 g/10 ml tampón) con tampón de extracción fosfato potásico 50 mM pH 7 que contenía PVPP al 10 % (p/p). El homogenizado se filtró a través de doble capa de gasa y se centrifugó a 27000 g durante 20 min a 4°C.

4.7.2. Cromatografía de exclusión molecular

El sobrenadante obtenido por centrifugación se separó por cromatografía de exclusión molecular con el doble propósito de purificar la enzima y determinar su peso molecular nativo. Se utilizó una columna de vidrio (Bio-Rad) de 2 × 60 cm rellena con la resina Sephacrill S-300 “fast flow”, montada y preparada de acuerdo con las indicaciones del proveedor de la resina (Pharmacia, Fine Chemicals). La

muestra se cargó en la columna equilibrada con tampón fosfato potásico 50 mM pH 7 y eluida con el mismo tampón a un flujo de 72 ml h⁻¹. Con ayuda de un colector de fracciones (Redifrac 100, Pharmacia), se recogieron fracciones de 1 ml. Las fracciones con actividad catalasa se reunieron y se concentraron mediante ultrafiltración sobre una membrana YM-10 (Amicon), cuyo rango de exclusión es de 10 kDa. Los sucesivos pasos de purificación de la enzima, incluido la determinación de su peso molecular, se realizó en nódulos.

La estimación del peso molecular se realizó con ayuda de una curva de calibración obtenida con un kit de proteínas patrón formado por: anhidrasa carbónica (29 kDa), albúmina bovina (66 kDa), alcohol deshidrogenasa (150 kDa), β-amilasa (200 kDa), apoferritina (443 kDa) y tiroglobulina (669 kDa) (MW-GF-1000, Sigma). Cada proteína fue diluida 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 y determinando el pico de elución de la proteína midiendo la absorbancia 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 ≈ 2 10³ kDa).

4.7.3. Cromatografía de afinidad

Para evitar la posible inactivación de la catalasa por exposición prolongada a concentraciones salinas, los pasos clásicos de purificación por precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico no se realizaron. En su lugar se usó la cromatografía de afinidad con ión inmovilizado, un método altamente eficiente para purificar catalasas (Yang y DePierre, 1998). Para ello se utilizó una columna HP Chelating HiTrap (Amersham Bioscience) cargada con Ni(NO₃)₂, siguiendo las instrucciones del fabricante. La columna se equilibró con tampón fosfato sódico 50 mM pH 7, que contenía 1 M de NaCl, y a continuación se cargó el extracto concentrado por ultrafiltración. El material no adherido fue eliminado lavando primero con el tampón de equilibrado, y después siguiendo este orden, con otros similares que contenían 0.5 M de NaCl (pH 6), 1 M de NH₄Cl (pH 7) y 0.2 M de imidazol (pH 7). Las fracciones que contenían la enzima, eluidas con este último tampón, se unieron y desalaron por ultrafiltración.

4.7.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida

El extracto enzimático parcialmente purificado se separó en gel de poliacrilamida con SDS (igual que en el punto 4.5.) , siguiendo en sistema discontinuo de Laemmli (Laemmli, 1970).

4.7.5. Efecto de inhibidores

Para los experimentos de inhibición de la catalasa, se usaron las fracciones de la enzima obtenida por cromatografía de gel filtración (Sephacril S-300). La sensibilidad de la enzima a las condiciones salinas se evaluó incubando extractos de hoja y nódulos en un baño de agua a 30°C durante 1 h con las siguientes dosis de NaCl de 0, 25, 50, 100, 150, 250 y 500 mM. Los sucesivos ensayos de inhibición se realizaron con la enzima parcialmente purificada de nódulos.

La inactivación por superóxido se basó en el método descrito por Kono y Fridovich (1982). En un volumen total de 1 ml de tampón fosfato potásico 50 mM pH 7, que contenía 0.1 mM de EDTA, se agregaron 0.5 μ kat de actividad catalasa, 30 μ M de acetaldehído y 1 unidad de xantina oxidasa. La incubación se realizó en oscuridad a 4°C durante 1 y 4 h, transcurrido este tiempo se midió la actividad CAT. El inhibición por oxígeno se evaluó incubando 0.5 μ kat de actividad catalasa en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7, previamente saturado en aire durante 2 h. Posteriormente, la mezcla se mantuvo a 4°C, bajo condiciones saturantes de oxígeno, y la actividad enzimática se determinó a 1 y 4 h. Para evaluar el efecto de otros posibles inhibidores, la enzima se incubó durante 1 y 4 h en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7 con citrato (10 mM), DTT (30 mM), ditionito (3 mM), β -mercaptoetanol (20 mM) y cianuro (5 mM). En todos los casos los resultados se expresaron como porcentaje relativo de actividad respecto a la actividad del control (reacción incubada: sin sal, sin xantina oxidasa, en tampón no saturado en oxígeno o en ausencia del inhibidor correspondiente).

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 con el error estándar (ES) de la muestra, que se incluyen en el apartado de resultados. Las tablas de medias así como el análisis de varianzas se recopilan en el apéndice de esta memoria.

RESULTADOS

1. Estudio ontogénico de la simbiosis *Medicago sativa*-*Sinorhizobium meliloti* en condiciones de salinidad

En este experimento se estudia el efecto de la salinidad en el crecimiento, fijación de nitrógeno, y metabolismo carbonado y asimilación de amonio en nódulo, en diferentes estados fenológicos del desarrollo. El tratamiento salino (0, 100 y 150 mM) se adicionó el día 28 de cultivo, cuando la simbiosis está establecida (nódulos formados). La recolecta de plantas se realizó coincidiendo con crecimiento vegetativo (día 42), inicio de floración (día 56), floración (día 70) y fructificación (día 84).

1.1. Crecimiento y fotosíntesis

El crecimiento expresado como peso seco de planta, parte aérea, raíz y relación raíz/parte aérea a lo largo de la ontogenia del cultivo se expone en la figura 1.1. Los datos numéricos se encuentran en la tabla A 1.1 del apéndice.

El **peso seco** de plantas control se multiplicó por 13 en el tiempo transcurrido entre el primer y último muestreo, mientras que en las tratadas con 100 y 150 mM de NaCl se multiplicó por 11 y 9 respectivamente. En estado vegetativo no se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos salinos en ninguno de los parámetros de crecimiento, sin embargo en los siguientes estados fenológicos la salinidad provocó una disminución del crecimiento vegetal proporcional a la dosis de sal. En inicio de floración la dosis más elevada de sal provocó una disminución del PSP del 40% respecto al control, a lo que contribuyó principalmente el PSPA, ya que el PSR incrementa 1.5 veces. En el siguiente estado fenológico (floración) la disminución del PSP por la sal es también debida al descenso en el PSPA.

La **relación raíz/parte aérea**, considerada como un índice de equilibrio entre raíz y parte aérea, reflejó los cambios inducidos por la salinidad en el crecimiento de estos dos órganos. La contribución de la raíz al peso seco de la planta completa en condiciones de estrés salino se reflejó en un aumento de la RPA, sin embargo el valor de este parámetro en fructificación fue superior a 1, pudiendo indicar esto que el sistema de cultivo podría limitar el crecimiento de la planta.

El análisis de varianza realizado a los parámetros de crecimiento, se representa en la tabla A 1.2 del apéndice, y muestra que la mayor fuente de variación de los distintos parámetros estudiados se debió a la edad del cultivo, así en el PSP el tiempo de muestreo determina el 85% de las diferencias observadas, y el otro 15% restante se debió en la misma proporción al NaCl y a la interacción tiempo-sal.

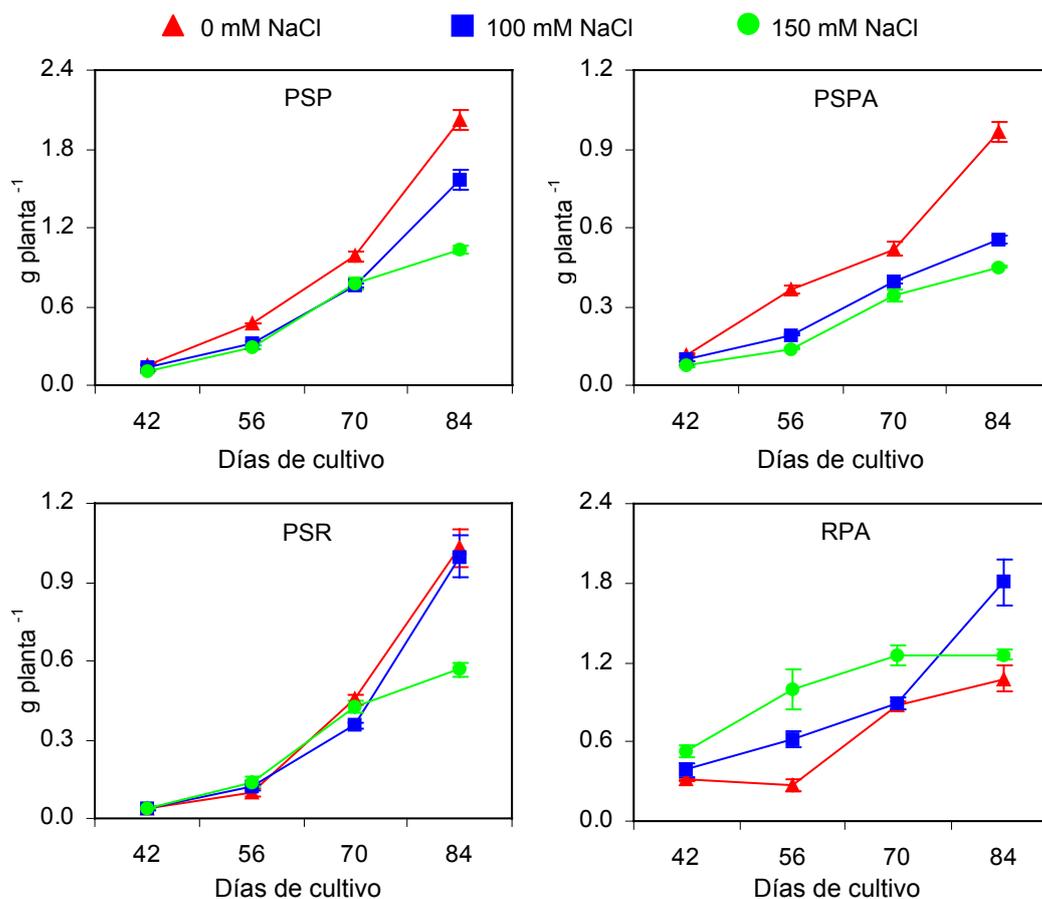


Figura 1.1. Peso seco de planta (PSP), peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de raíz (PSR) y relación raíz/parte aérea (RPA) en *Medicago sativa* crecida con diferentes dosis de NaCl (0, 100 y 150 mM) desde el día 28 de cultivo. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=10) con el error estándar.

La **eficiencia fotosintética** ha sido evaluada mediante parámetros de fluorescencia que se muestran en la figura 1.2 y los datos experimentales obtenidos se exponen en la tabla A 1.3 del apéndice.

El comportamiento de la fluorescencia inicial y la fluorescencia máxima a lo largo de la ontogenia dependió de la dosis de NaCl aplicada al cultivo. En plantas control y tratadas con 100 mM de NaCl ambos parámetros disminuyeron con el tiempo de experimentación, sin embargo en las plantas tratadas con la dosis más elevada de sal (150 mM de NaCl) la F_0 incrementó con la edad del cultivo, duplicando su valor en fructificación respecto al observado en etapa vegetativa, y la F_m emitida por los centros de reacción del fotosistema II, tras un pulso de luz saturante, con esta misma dosis salina presentó valores altos y estables en los distintos estados fenológicos del cultivo estudiadas.

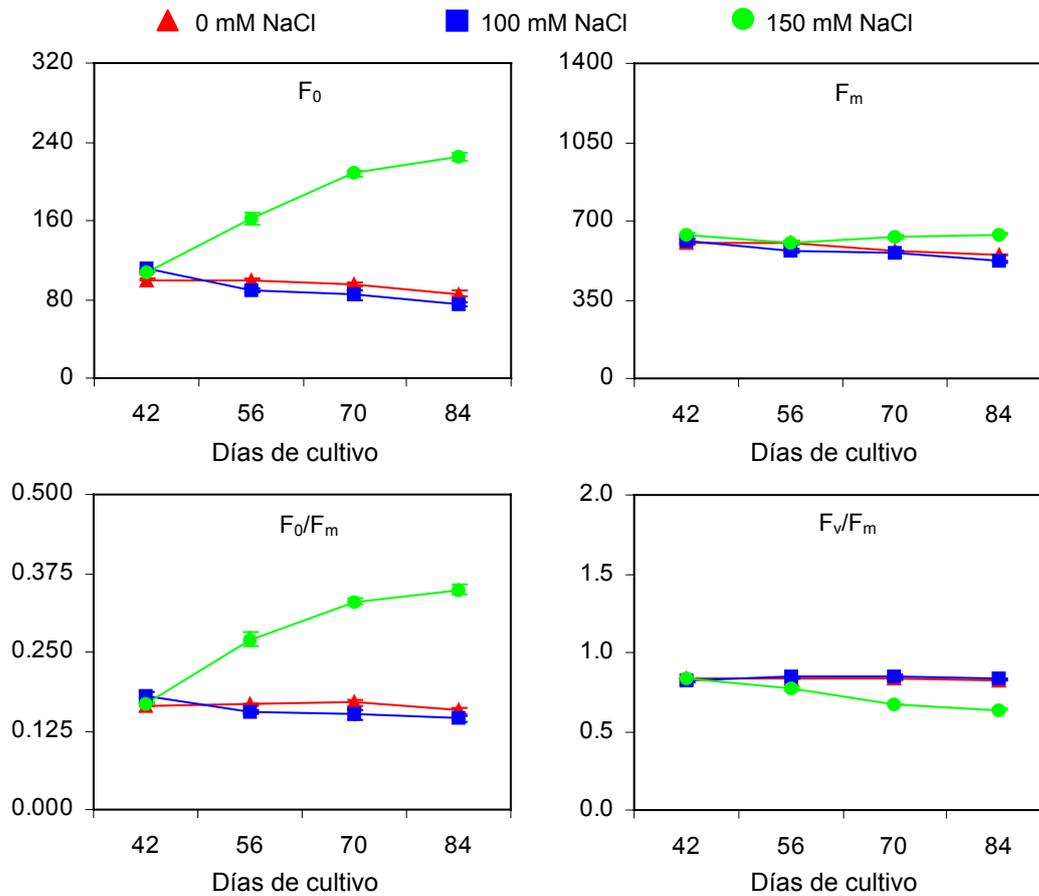


Figura 1.2. Fluorescencia inicial (F_0), fluorescencia máxima (F_m), relación F_0/F_m y relación F_v/F_m en *Medicago sativa* crecida con diferentes dosis de NaCl (0, 100 y 150 mM) desde el día 28 de cultivo. Los datos representan el valor medio de la muestra ($n=10$) con el error estándar.

También se determinó el coeficiente F_0/F_m , indicador del rendimiento no fotoquímico del fotosistema II, que relaciona 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 incrementó cuando las plantas se expusieron a la concentración más elevada de sal, llegando a duplicarse en la última cosecha, mientras que entre las plantas control y las tratadas con 100 mM de NaCl no se observaron diferencias significativas (Fig. 1.2). La eficiencia fotoquímica del fotosistema II, expresada por el coeficiente F_v/F_m , decreció con 150 mM de NaCl en todas las cosechas excepto en estado vegetativo, detectándose que al inicio de floración la disminución fue de un 7% respecto al control, mientras que en floración y fructificación el descenso alcanzado fue aproximadamente de un 20%.

El análisis de varianza realizado a los parámetros de fluorescencia, representado en la tabla A 1.4 del apéndice, indica que la variabilidad mayor de estos parámetros se debió principalmente al tratamiento salino, así por ejemplo en F_v/F_m el 55% de las diferencias registradas se debió a dicho tratamiento, un 15% a la edad del cultivo, y un 30% a la interacción tiempo-NaCl.

1.2. Fijación de nitrógeno

En la figura 1.3 se muestran los parámetros relacionados con el proceso de fijación de nitrógeno: actividad nitrogenasa aparente, actividad nitrogenasa total, tasa de fijación de nitrógeno, peso seco de nódulos y peso normalizado de nódulos. Los datos numéricos correspondientes a esta figura y su correspondiente estudio de varianza están recogidos en las tablas A 1.5 y A 1.6 del apéndice, respectivamente.

En crecimiento vegetativo la **actividad nitrogenasa aparente** incrementa con la salinidad, siendo 2.3 y 1.2 veces mayor que la obtenida en nódulos de plantas control con los tratamientos 100 y 150 mM de NaCl respectivamente, sin embargo en el resto de muestreos la ANA siempre es mayor en los nódulos de plantas control que en los de las salinizadas. Este hecho se debe a que la disminución de este parámetro con el estrés salino se acentúa al incrementar el tiempo de exposición a la sal, así en fructificación con ambas dosis de sal se produce una disminución en torno a un 65% con respecto al control. La **actividad nitrogenasa total** presentó un comportamiento similar al de la ANA, no obstante en la recolecta realizada en crecimiento vegetativo la ANT si disminuyen con la salinidad en torno al 50% con ambas dosis de NaCl.

Los datos obtenidos en la **tasa de fijación de nitrógeno** muestran una tendencia similar a la descrita para la ANT, observándose en la figura 1.3 que se alcanza su valor más alto en la cosecha del día 56, coincidiendo con la etapa de inicio de floración, tanto en plantas control como en las salinizadas (100 y 150 mM), aunque en los nódulos de plantas tratadas con sal la TFN es un 35% más baja respecto a la de los nódulos control en esta etapa ontogénica.

El **peso seco de nódulo** a lo largo de los 84 días en los que se realizaron las recolectas aumentó en todos los tratamientos, siendo este incremento más acentuado en las plantas control, donde el PSN obtenido se multiplicó por 17, mientras que en las plantas tratadas con ambas dosis de NaCl sólo por 8. El PNN de plantas control (Tabla A 1.5 del apéndice) no experimentó variaciones significativas a lo largo de la ontogenia, excepto en fructificación (84 días) que se logró duplicar el valor de este parámetro, sin embargo en estrés salino el valor máximo se logró en inicio de floración. Se puede establecer que el incremento del PSN (Fig. 1.3) es mayor que el PSPA (Fig. 1.1).

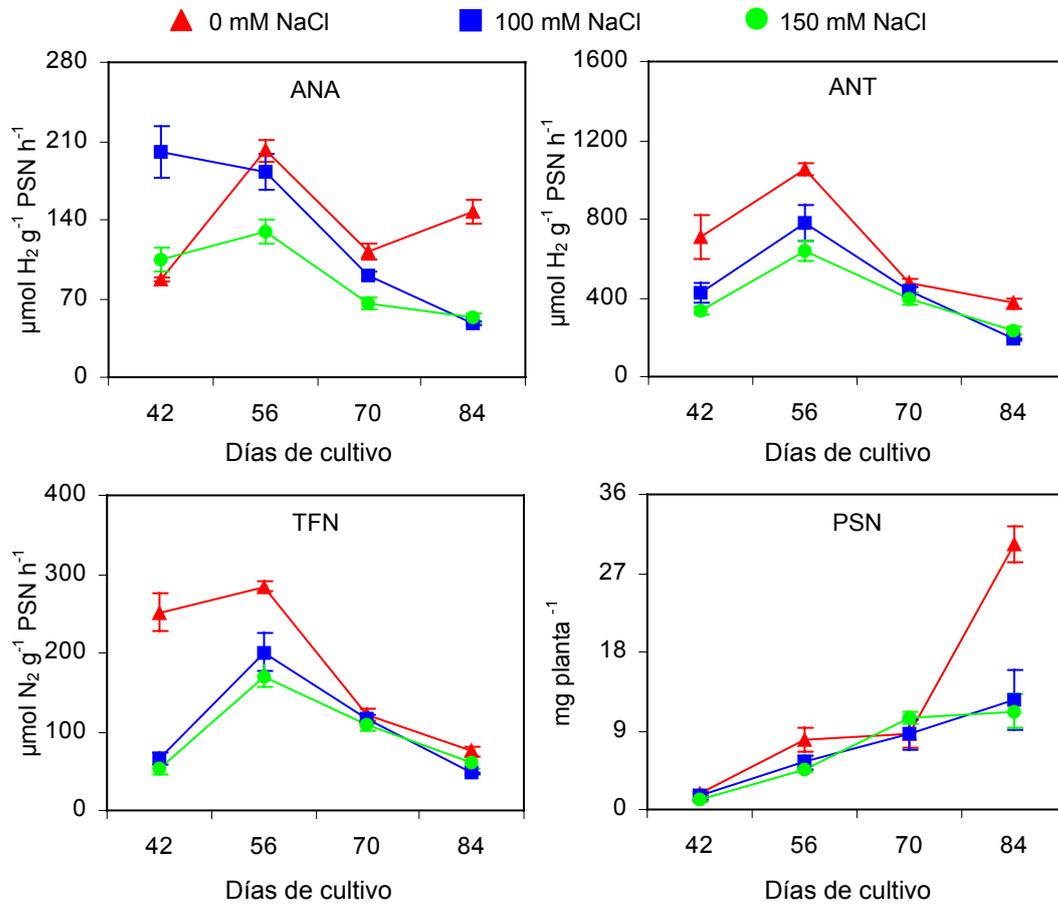


Figura 1.3. Actividad nitrogenasa aparente (ANA), actividad nitrogenasa total (ANT), tasa de fijación de nitrógeno (TFN) y peso seco de nódulo (PSN) en *Medicago sativa* crecida con diferentes dosis de NaCl (0, 100 y 150 mM) desde el día 28 de cultivo. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=10) con el error estándar.

El análisis de la varianza de los datos numéricos relacionados con el proceso de fijación de nitrógeno se encuentran en la tabla A 1.6 del apéndice, indica que la principal fuente de variación la constituyó la edad del cultivo. El PSN se correlaciona positivamente y de forma significativa ($P \leq 0.001$) con los parámetros de crecimiento (PSP, PSPA y PSR), mientras que la ANA, ANT y TFN se correlacionan negativamente y de forma significativa ($P \leq 0.05$) con la relación RPA (Tabla 1.5).

1.3. Metabolismo carbonado

Se determinaron diversas actividades enzimáticas del metabolismo carbonado nodular: sacarosa sintasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa, malato deshidrogenasa e isocitrato deshidrogenasa, cuyos resultados expresados por $\text{mg}^{-1} \text{prot h}^{-1}$ se exponen en la figura 1.4, y en la tabla A 1.7 del apéndice. En ese mismo apartado se recogen los datos numéricos de actividad expresados en $\text{g}^{-1} \text{PF}$ (Tabla A 1.9).

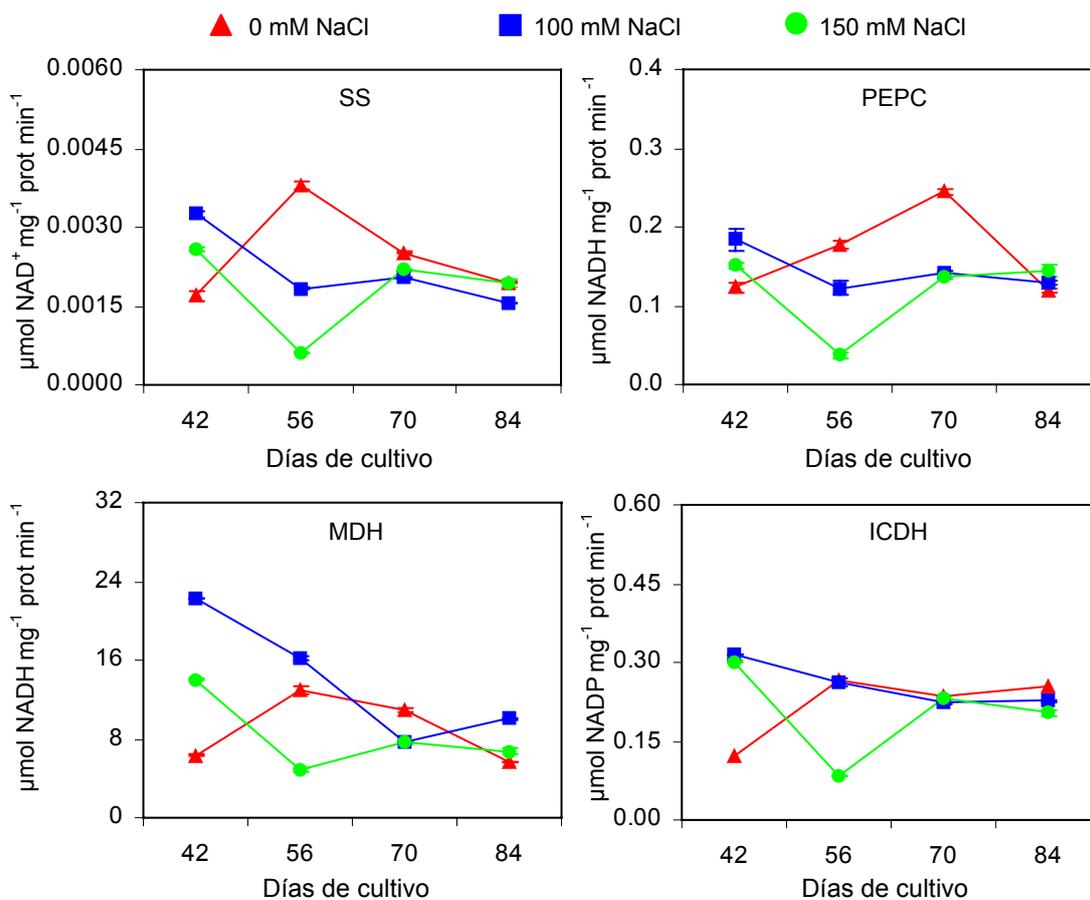


Figura 1.4. Actividad sacarosa sintasa (SS), fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), malato deshidrogenasa (MDH) e isocitrato deshidrogenasa (ICDH) en nódulos de *Medicago sativa* crecida con diferentes dosis de NaCl (0, 100 y 150 mM) desde el día 28 de cultivo. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

La actividad **sacarosa sintasa** nodular de plantas control mostró un pico máximo de actividad en la etapa de inicio de floración, mientras que en floración (35%) y fructificación (50%) se produce un descenso significativo respecto a la

observada al inicio de floración. En estrés salino la enzima fue más activa en el crecimiento vegetativo, respecto a la obtenida en nódulos de plantas control, y su actividad fue disminuyendo con la edad del cultivo y con la dosis de NaCl aplicada, así en la última cosecha (fructificación) con 100 mM y 150 mM de NaCl disminuye alrededor de un 50% y un 30% respectivamente comparándola con la alcanzada en el vegetativo. La inhibición más pronunciada por la sal se observó en inicio de floración, donde se produjo una disminución del 53% y 85% con 100 y 150 mM de NaCl respectivamente en relación a los valores de actividad en nódulos de plantas control.

La actividad **fosfoenolpiruvato carboxilasa** en nódulos de plantas control incrementó a lo largo de la ontogenia del cultivo hasta floración donde se alcanzó la máxima actividad, en la última cosecha (fructificación) desciende un 52% respecto al estado fenológico anterior. En los nódulos de plantas tratadas con NaCl la mayor actividad enzimática coincide con el periodo vegetativo, en este estado fisiológico en las plantas expuestas a 100 mM de NaCl la actividad enzimática se multiplica por 1.5 respecto al control, y a 150 mM de NaCl el incremento es de 1.2 veces, sin embargo en el resto de cosechas siempre los nódulos control tienen mayor actividad PEPC que los salinizados.

Las actividades **malato deshidrogenasa** e **isocitrato deshidrogenasa**, en nódulo de plantas control mostraron una tendencia similar a SS en el tiempo de experimentación, en ambas se duplica la actividad en inicio floración en relación a la obtenida en los nódulos de las plantas en estado vegetativo. En condiciones salinas las actividades MDH e ICDH también se comportan como la sintasa, detectándose la máxima actividad en el crecimiento vegetativo, y disminuyendo con la edad del cultivo y el tiempo de exposición a la sal. En fructificación la caída detectada en la MDH con 150 mM de NaCl fue del 60% y del 35% en la ICDH respecto al máximo valor logrado (vegetativo). En general en todas las actividades del metabolismo carbonado nodular ensayadas se presentó el mismo comportamiento respecto al tratamiento salino.

El análisis de varianza (Tabla A 1.8 del apéndice) indica que el factor que mayoritariamente establece la variabilidad detectada en las enzimas estudiadas es la interacción entre el tiempo de cultivo y la salinidad. En la tabla 1.5 se puede apreciar que la actividad SS tiene una correlación positiva con el resto de actividades enzimáticas del metabolismo carbonado estudiadas, PEPC, MDH e ICDH ($r=0.76^{**}$, $r=0.65^*$ y $r=0.75^{**}$ respectivamente).

1.4. Metabolismo de asimilación de amonio

En la figura 1.5 se representan las actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo de asimilación del amonio en nódulo: glutamina sintetasa (GS),

glutamato sintasa (GOGAT), glutamato deshidrogenasa (GDH) y aspartato aminotransferasa (AAT). Los datos numéricos y el correspondiente análisis de la varianza se encuentran en las tablas A 1.11 y A 1.12 del apéndice respectivamente, así mismo en este apartado también se presentan los resultados de actividad expresados por g^{-1} PF (Tabla A 1.13 y A 1.14).

A lo largo de la ontogenia la actividad **glutamina sintetasa** nodular de plantas control experimentó una disminución, alcanzando el valor más bajo en el último muestreo (fructificación), donde se reduce a la mitad los valores registrados en el crecimiento vegetativo. Con 100 mM de NaCl se observó que la actividad GS nodular muestra un comportamiento similar al descrito para nódulos control, aun cuando las diferencias existentes son significativas. Sin embargo, 150 mM de NaCl induce cambios sorprendentes en esta actividad detectándose un máximo en el primer muestreo (vegetativo), y posteriormente una caída drástica (inicio de floración y floración).

La actividad **glutamato sintasa** en nódulos de plantas control a lo largo de la ontogenia del cultivo muestra su mayor actividad en la etapa de inicio de floración, observándose posteriormente un descenso en la actividad conforme avanza el periodo de cultivo, de esta forma en floración la actividad de esta enzima decrece un 16% y en fructificación un 40% respecto a la detectada en inicio de floración. En los nódulos de plantas tratadas con sal la actividad enzimática mayor se percibe en el crecimiento vegetativo, en los siguientes muestreos se produjo un descenso progresivo de esta actividad con el tiempo de aplicación del NaCl. La actividad GOGAT fue mayor en los tratamientos salinos, superando en 1.5 veces los valores detectados en plantas control en el primer muestreo, sin embargo en los siguientes la mayor fue menor que la obtenida en nódulos de plantas no salinizadas. Una ruta alternativa a la GS/GOGAT en los mecanismos de asimilación de amonio es a través de la actividad **glutamato deshidrogenasa**. Esta actividad enzimática en nódulos de plantas control disminuyó al inicio de floración, coincidiendo con el incremento de la actividad GOGAT, y su mayor actividad se observó el día 70 de cultivo (floración). El estrés salino provocó de forma general un descenso de esta actividad a lo largo de la ontogenia del cultivo.

La actividad **aspartato aminotransferasa** de nódulos control presentó un comportamiento similar al de la GS a lo largo de la ontogenia del cultivo, disminuyendo conforme avanzó la edad de las plantas, llegando a sufrir en el último muestreo (fructificación) una disminución del 20% respecto al crecimiento vegetativo. En condiciones de estrés salino durante el crecimiento vegetativo y floración la actividad AAT incrementó con la dosis de NaCl, mientras que en inicio de floración y fructificación solamente con la dosis 100 mM de NaCl la actividad superó la del control multiplicándose por 1.3 y 1.1 respectivamente.

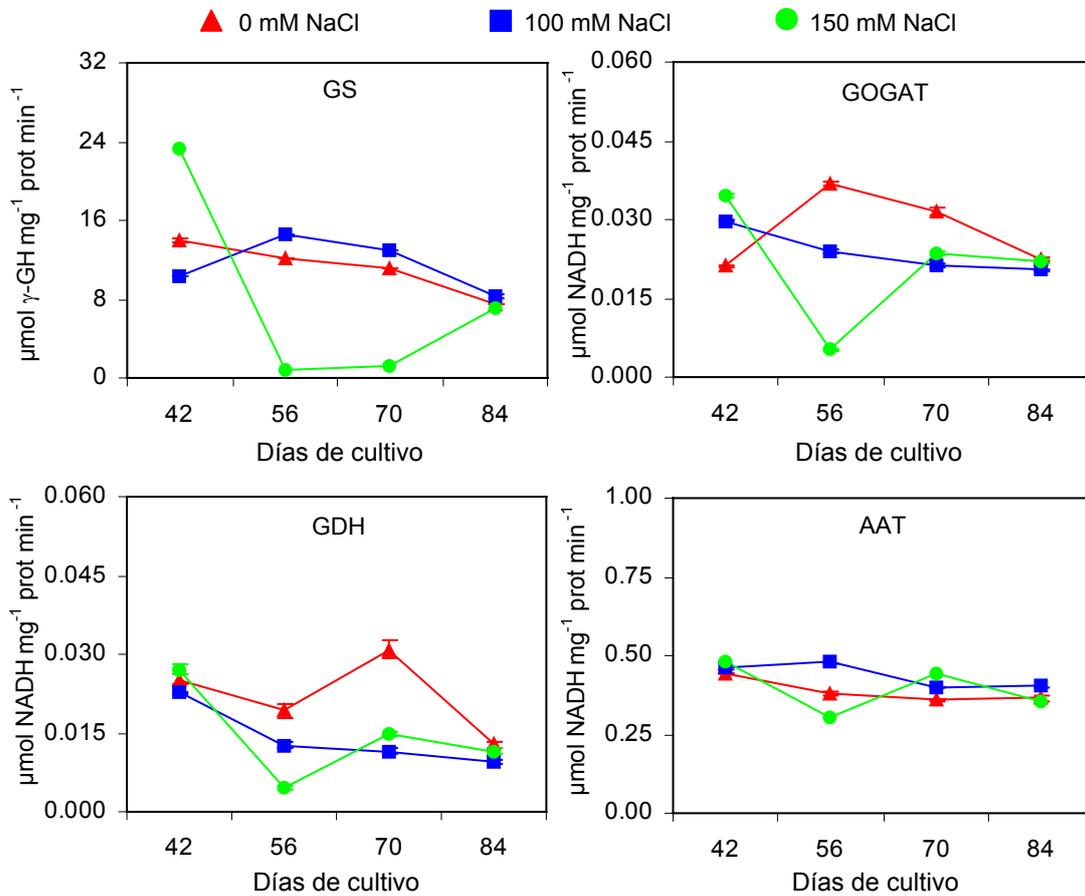


Figura 1.5. Actividad glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT), glutamato deshidrogenasa (GDH) y aspartato aminotransferasa (AAT) en nódulos de *Medicago sativa* crecida con diferentes dosis de NaCl (0, 100 y 150 mM) desde el día 28 de cultivo. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

En la tabla 1.5 de esta memoria se presentan las correlaciones entre las distintas actividades del metabolismo del amonio estudiadas, así como también de éstas con otros parámetros determinados en el experimento, del estudio de esta tabla de correlaciones se deduce que: **a)** la actividad GS presenta una correlación positiva y significativa ($P \leq 0.05$) con GOGAT ($r = 0.63^*$), GDH ($r = 0.59^*$) y AAT ($r = 0.59^*$). **b)** Las actividades GOGAT y GDH se correlacionan de forma positiva entre sí, pero no con AAT. **c)** La actividad GOGAT se correlaciona positivamente con las actividades del metabolismo del carbono SS ($r = 0.92^{***}$), PEPC ($r = 0.82^{***}$), MDH ($r = 0.61^*$) e ICDH ($r = 0.80^{**}$)

1.5. Malato y glutamato

Se evaluó el contenido de malato y glutamato en hoja y nódulo en los distintos muestreos realizados (Fig. 1.6). Los datos numéricos así como el correspondiente análisis de varianza se presentan en las tablas del apéndice A 1.15 y A 1.16 respectivamente.

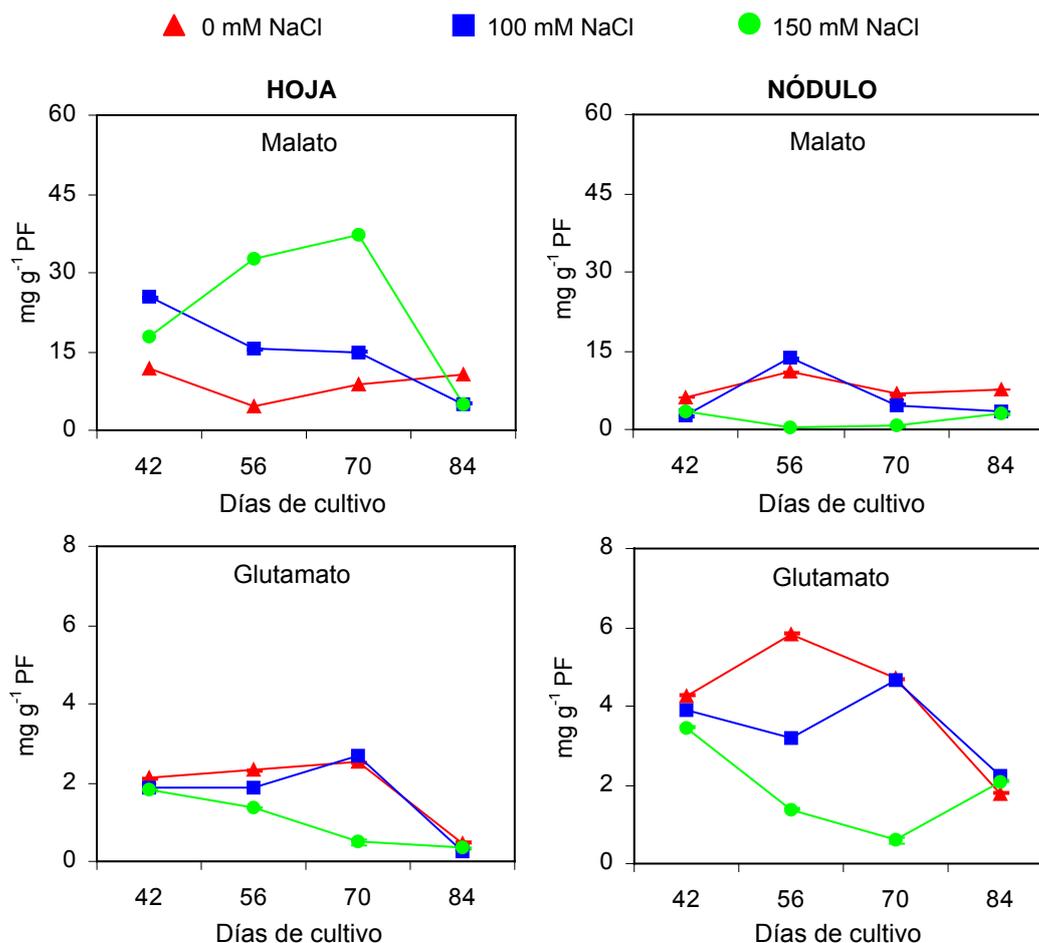


Figura 1.6. Contenido de malato y glutamato en hoja y nódulo de *Medicago sativa* crecida con diferentes dosis de NaCl (0, 100 y 150 mM) desde el día 28 de cultivo. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

El contenido de **malato en hoja** de plantas control se mantuvo prácticamente estable a lo largo del tiempo de experimentación, observándose que las hojas de plantas expuestas al estrés salino muestran un contenido superior al detectado en plantas control durante las tres primeras cosechas, de hecho en floración se produjo un incremento respecto al control de 1.7 con 100 mM de NaCl

y de 4.3 con 150 mM de NaCl, sin embargo en la última cosecha (fructificación) la salinidad produjo un descenso en el contenido de malato en hoja. El **malato en nódulos** control muestra su máximo contenido al inicio de floración, mientras que con 100 mM de NaCl se multiplicó por 1.3 en esta etapa, pero con la dosis más elevada de sal se produce una disminución drástica. En las posteriores cosechas (floración y fructificación) el contenido de malato en los nódulos control fue superior al de los nódulos de plantas salinizadas.

El contenido de **glutamato en hoja** de plantas control aumentó ligeramente durante la ontogenia del cultivo llegando a obtenerse el mayor valor en la etapa de floración, mientras en fructificación se produce un potente descenso (82%) respecto a la etapa anterior. La respuesta manifestada en plantas salinizadas con la edad del cultivo dependió de la dosis empleada, así con 100 mM de NaCl la tendencia observada fue similar a él control, en cambio con 150 mM de NaCl se produce un descenso del glutamato en todos los muestreos. A lo largo del tiempo de experimentación el **glutamato en nódulo** de plantas control aumentó hasta la etapa de inicio de floración, donde alcanzó el máximo, y posteriormente disminuyó con el tiempo de cultivo, llegando a ser en fructificación un 70% menor que en inicio de floración. En esa última cosecha (fructificación) es el único momento en que los nódulos de plantas tratadas con NaCl alcanzan un contenido de glutamato superior al de nódulos control, alrededor de 1.2 veces.

En la gráfica 1.6 se percibe que en general, el malato se acumula prioritariamente en hoja, mientras que el glutamato lo hace en nódulo. El análisis de la varianza de estos metabolitos indicó que las diferencias observadas se debieron principalmente al NaCl y su interacción con el tiempo de experimentación, excepto el contenido de glutamato en hoja que se vio afectado por la edad del cultivo (Tabla A 1.16). Por otra parte, el contenido de malato en nódulo se correlaciona significativamente y de forma positiva con la actividad MDH ($r= 0.58^*$), además también tiene correlación positiva con los parámetros de fijación de nitrógeno determinados (ANA y ANT). En la tabla 1.5 se evidencia que el glutamato en nódulo presenta una correlación positiva con las actividades de asimilación de amonio (GS, GOGAT y GDH) y con las principales actividades del metabolismo del carbono (SS y PEPC).

1.6. Metabolitos nitrogenados

El contenido de aminoácidos libres totales y prolina en hoja, raíz (Tabla 1.1) y nódulo (Fig. 1.7) en los estados fisiológicos estudiados y el análisis de varianza correspondiente se presenta en las tablas del apéndice A 1.17-1.20.

En la figura 1.7 donde se representa el contenido de aminoácidos y prolina en nódulo se observa que durante la ontogenia del cultivo el contenido de

aminoácidos en nódulo de plantas control incrementó progresivamente, llegando a duplicarse valor en fructificación respecto a la etapa vegetativa. En plantas expuestas a estrés salino también aumentó el contenido de Aa con el tiempo de experimentación, salvo en fructificación que se produjo un descenso del 70% con ambas dosis de sal (100 y 150 mM de NaCl) comparando esas mismas dosis en la etapa fenológica anterior. El efecto del estrés salino provocó una acumulación de Aa en nódulo durante el crecimiento vegetativo, el inicio de floración y floración, mientras que en fructificación los nódulos de plantas expuestas acumularon un 40% y un 60% menos que los de las control con 100 y 150 mM de NaCl respectivamente.

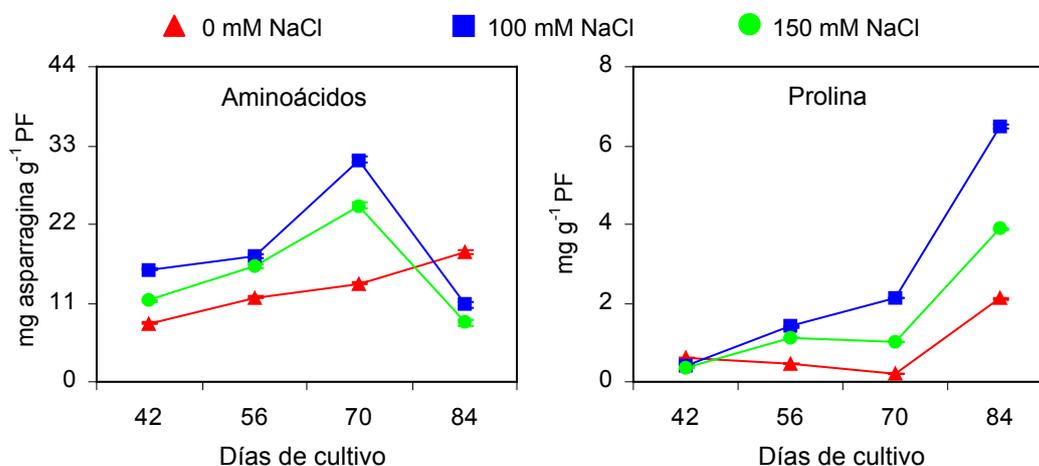


Figura 1.7. Contenido de aminoácidos totales y prolina en **nódulo** de *Medicago sativa* crecida con diferentes dosis de NaCl (0, 100 y 150 mM) desde el día 28 de cultivo. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

El contenido de **aminoácidos en hoja** en crecimiento vegetativo disminuyó con la dosis de sal, siendo menor un 12% y un 30% con 100 y 150 mM de NaCl respecto al control (Tabla 1.1). En las posteriores cosechas las plantas que fueron tratadas con 100 mM de sal, acumularon mayor concentración de Aa. En cambio en **raíz** en crecimiento vegetativo e inicio de floración las plantas control alcanzaron mayor concentración de este metabolito, no obstante cuando el tiempo de estrés salino fue más prolongado (día 70 y 84 de cultivo) se observó en las raíces de plantas salinizadas una acumulación mayor de Aa (Tabla 1.1). De los distintos órganos estudiados los nódulos son los que principalmente acumulan este metabolito.

A lo largo de la ontogenia en los nódulos de plantas control el contenido de **prolina en nódulo** disminuyó progresivamente hasta floración (Fig. 1.7), a partir de este momento se produce un incremento significativo en la fructificación

alcanzándose contenidos de prolina que superan en 10 veces los registrados en la etapa fenológica anterior (floración). La prolina en nódulo respondió a la salinidad con incrementos significativos, al contrario de lo que ocurre en nódulos control aumentó a lo largo del tiempo de cultivo, obteniéndose los valores más elevados en la última cosecha (fructificación). En esta etapa del cultivo, el contenido en prolina en nódulo se multiplicó por 3 con la dosis 100 mM de NaCl y por 2 con la de 150 mM con respecto al control. El contenido de **prolina en hoja y raíz** se comportó de forma similar al observado en nódulo, tanto en plantas control como en las cultivadas en estrés salino (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Contenido de aminoácidos libres totales (Aa) expresados en mg asparragina g⁻¹ PF y prolina (Pro) expresados en mg prolina g⁻¹ PF en hoja (h) y raíz (r) de *M. sativa*

Tiempo (D)	NaCl (mM)	Aa(h)	Aa(r)	Pro(h)	Pro(r)
	0	5.80 ^a	5.71 ^b	0.388 ^f	0.235 ⁱ
42	100	5.10 ^c	3.96 ^d	0.545 ^d	0.676 ^f
	150	4.17 ^d	3.39 ^d	0.482 ^e	0.918 ^e
56	0	2.81 ^f	3.73 ^d	0.127 ⁱ	0.189 ^j
	100	5.50 ^b	0.72 ^f	0.384 ^f	0.450 ^g
	150	1.50 ⁱ	2.70 ^e	0.213 ^h	1.979 ^d
70	0	3.58 ^e	5.06 ^c	0.352 ^g	0.186 ^j
	100	4.14 ^d	6.81 ^a	0.816 ^c	2.002 ^d
	150	1.54 ⁱ	5.56 ^{bc}	0.548 ^d	2.128 ^c
84	0	1.86 ^h	5.21 ^{bc}	0.132 ⁱ	0.306 ^h
	100	2.95 ^f	5.41 ^{bc}	2.250 ^a	5.418 ^a
	150	2.53 ^g	5.33 ^{bc}	1.928 ^b	4.912 ^b
MDS (P ≤ 0.05)		0.28	0.64	0.024	0.045

1.7. Polioles y carbohidratos

Se determinó el contenido de **polioles** (mioinositol, ononitol y pinitol), azúcares solubles totales, glucosa y trehalosa en hoja, raíz y nódulo en cuatro etapas de la ontogenia del cultivo. Los datos numéricos y de análisis de varianza se

recogen en las tablas del apéndice A 1.21-A 1.32. Además el comportamiento de estos metabolitos en nódulo se muestran en las figuras 1.8 y 1.9.

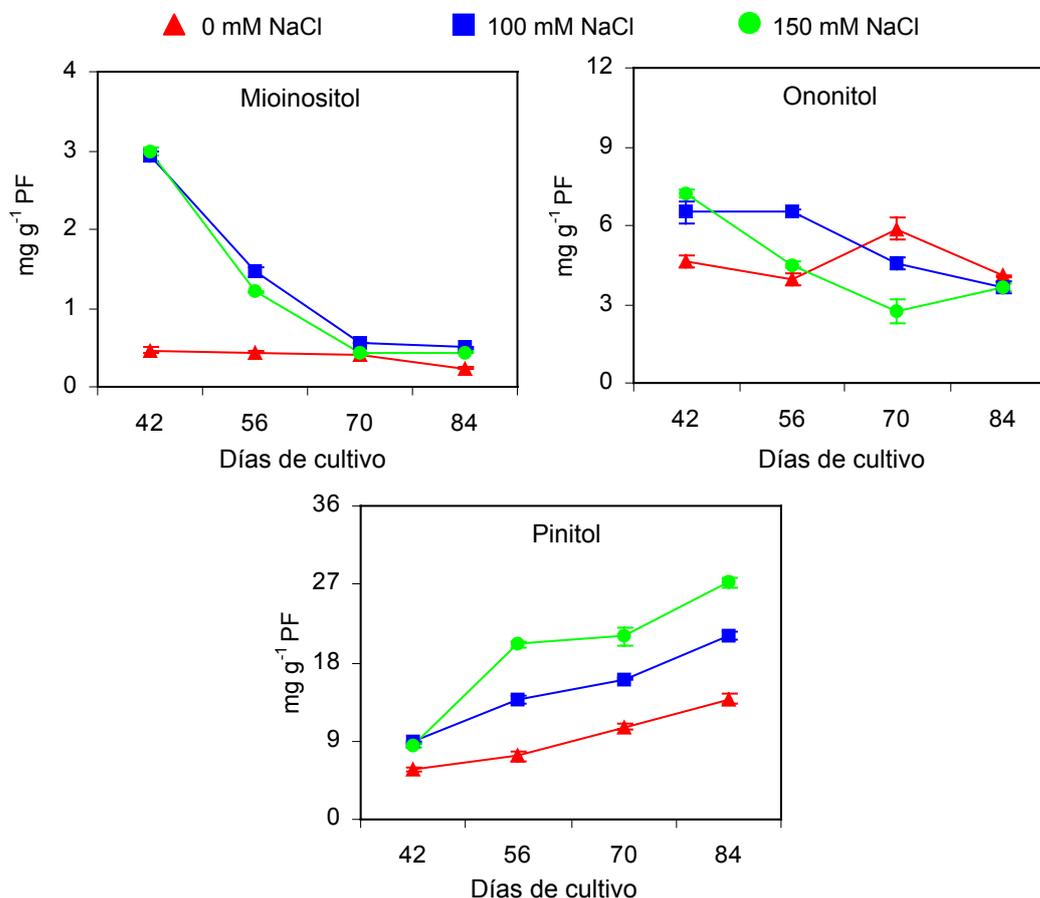


Figura 1.8. Contenido de mioinositol, ononitol y pinitol en **nódulo** de *Medicago sativa* crecida con diferentes dosis de NaCl (0, 100 y 150 mM) desde el día 28 de cultivo. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

El contenido de **mioinositol en nódulo** (Fig. 1.8) de plantas control no mostró diferencias significativas en los distintos muestreos realizados, excepto en la última cosecha (fructificación) en la que sólo se alcanza la mitad del registrado en etapas anteriores. El estrés salino estimuló la acumulación de mioinositol, obteniéndose concentraciones superiores respecto al control en todas las etapas ontogénicas, siendo más acusada esta diferencia en la primera cosecha (crecimiento vegetativo), en la que con ambas dosis salinas se multiplicó por 7 veces. En dichos tratamientos y a lo largo de la ontogenia el contenido de este azúcar alcohol disminuye al aumentar el tiempo de exposición al NaCl, de esta forma entre la etapa de crecimiento vegetativo y fructificación en nódulos de plantas salinizadas

se produce un descenso aproximado del 85%. El **mioinositol en hoja**, como se observa en la tabla 1.2, aumenta con la salinidad en la etapa de crecimiento vegetativo, sin embargo a diferencia de lo que ocurre en nódulo en los siguientes muestreos las hojas de plantas control acumulan mayor contenido de mioinositol que las plantas en estrés salino.

El contenido de **ononitol en nódulo** en las distintas cosechas presenta un comportamiento diferente dependiendo de la concentración de NaCl, mientras que en nódulos de plantas control (0 mM de NaCl) no se observan diferencias significativas entre el primer y el último muestreo, con 100 y 150 mM tiende a disminuir al incrementarse el tiempo de exposición a la salinidad. El nivel de ononitol en nódulo es mayor en las plantas tratadas con sal que en las control durante las dos primeras cosechas (crecimiento vegetativo e inicio de floración), detectándose en el crecimiento vegetativo que ambas dosis (100 y 150 mM NaCl) provocan un incremento del contenido de alrededor el 1.5 respecto el control. El comportamiento del **ononitol en hoja y raíz** es similar al del nódulo, al inicio de los muestreos el nivel de ononitol en hoja y raíz es mayor en plantas salinizadas, mientras que al final (floración y fructificación) es mayor en las plantas control (Tabla 1.2).

El contenido de **pinitol en nódulo** como se observa en la figura 1.8 a diferencia del mioinositol y ononitol incrementa a lo largo de la ontogenia del cultivo, tanto en plantas control como en las tratadas con sal, obteniéndose los valores más altos en la última cosecha (fructificación). Comparando el tratamiento de NaCl (0, 100 y 150 mM) entre crecimiento vegetativo y fructificación se observó un incremento de 2.4 para control y 100 mM, y de 3.2 para 150 mM de NaCl. Además es interesante resaltar que en cada muestreo realizado, el contenido de pinitol incrementa a medida que aumenta la concentración de sal aplicada, lo cual sugiere que la acumulación de pinitol en nódulo es inducida tanto por el tiempo de cultivo como por la concentración de sal utilizada. El mismo comportamiento se produce en hoja y raíz (Tabla 1.2).

Un aspecto destacable es la correlación positiva y significativa existente entre el contenido de ononitol en nódulo y las actividades del metabolismo de asimilación de amonio GS ($r= 0.71^{**}$), GOGAT ($r= 0.68^*$) y AAT ($r= 0.64^*$), y del metabolismo del carbono SS ($r= 0.69^*$), MDH ($r= 0.59^*$) e ICDH ($r= 0.66^*$) (Tabla 1.5).

Resultados

Tabla 1.2. Contenido de mioinositol (Mio), ononitol (Ono) y pinitol (Pin) expresados en mg g⁻¹ PF en hoja (h) y raíz (r) de *M. sativa*

Tiempo (D)	NaCl (mM)	Mio(h)	Mio(r)	Ono(h)	Ono(r)	Pin(h)	Pin(r)
42	0	3.61 ^b	0.174 ^{cd}	3.978 ^b	0.339 ^{ef}	10.12 ^e	2.07 ^f
	100	4.45 ^a	0.218 ^{ab}	4.390 ^a	0.447 ^{de}	13.36 ^d	3.14 ^{ef}
	150	3.78 ^b	0.258 ^a	4.130 ^b	0.843 ^b	12.51 ^d	3.32 ^e
56	0	2.47 ^d	0.149 ^d	2.218 ^d	0.930 ^{ab}	9.63 ^e	2.11 ^f
	100	2.11 ^e	0.147 ^d	2.118 ^d	1.014 ^a	15.07 ^c	3.23 ^e
	150	1.73 ^f	0.099 ^e	3.195 ^c	0.654 ^c	12.40 ^d	7.50 ^c
70	0	3.19 ^c	0.241 ^a	3.040 ^c	0.555 ^{cd}	14.76 ^c	3.25 ^e
	100	1.56 ^f	0.199 ^{bc}	1.452 ^{ef}	0.469 ^d	20.00 ^a	5.67 ^d
	150	1.19 ^g	0.070 ^{ef}	1.502 ^{ef}	0.263 ^f	19.59 ^a	6.02 ^d
84	0	3.48 ^{bc}	0.075 ^{ef}	2.063 ^d	0.309 ^f	15.63 ^c	7.23 ^c
	100	2.15 ^c	0.093 ^e	1.578 ^e	0.034 ^g	19.03 ^{ab}	14.70 ^b
	150	2.67 ^d	0.048 ^f	1.286 ^f	0.027 ^g	18.09 ^b	25.59 ^a
MDS (P ≤ 0.05)		0.31	0.040	0.251	0.127	1.18	1.08

Como se observa en la figura 1.9 el contenido de **azúcares solubles totales en nódulo** incrementó a lo largo del tiempo de experimentación tanto en las plantas control como en las plantas salinizadas. El efecto del estrés salino provocó un incremento en el contenido Ast en todos los muestreos realizados, así en crecimiento vegetativo y fructificación se observó que con las dosis 100 mM de NaCl se duplica el contenido respecto al control. El comportamiento en **hoja** como se observa en la tabla 1.3 es similar al de nódulo con un incremento en el contenido de Ast a medida que aumenta la edad del cultivo y el tiempo de exposición a la salinidad. En el caso de **raíz** el NaCl también induce la acumulación de Ast en todas los muestreos, sin embargo no se produce un incremento a lo largo de la ontogenia del cultivo. El análisis de varianza realizado, muestra que la variabilidad mayor en el contenido de Ast en nódulo y hoja se debió principalmente al tiempo

de cultivo con un 65%, mientras que en raíz la fuente de variación es debido principalmente a la salinidad con un 70%.

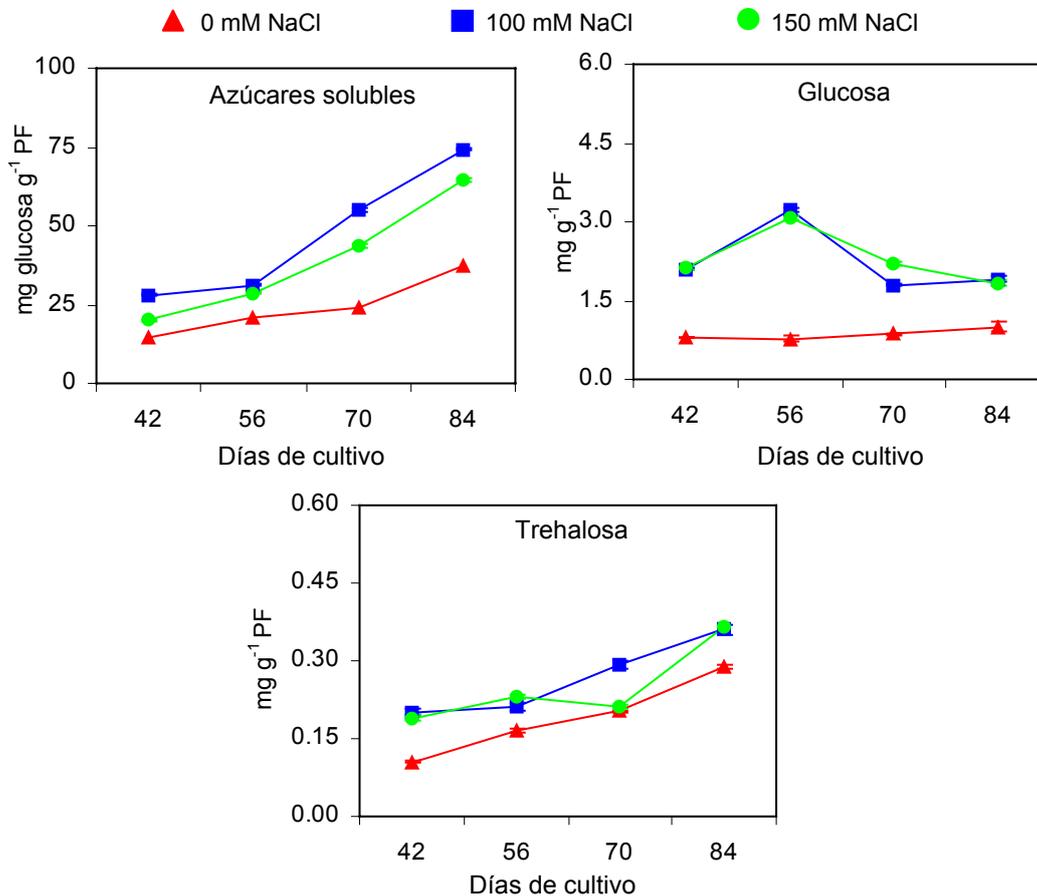


Figura 1.9. Contenido de azúcares solubles totales, glucosa y trehalosa en **nódulo** de *Medicago sativa* crecida con diferentes dosis de NaCl (0, 100 y 150 mM) desde el día 28 de cultivo. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

El contenido de **glucosa en nódulo** de plantas control no muestra cambios significativos a lo largo de la ontogenia del cultivo como se observa en la figura 1.9. El estrés salino induce, en todos los muestreos, la acumulación de glucosa, provocando que en ambas dosis salinas se supere al detectado en nódulos de plantas control, además se alcanza el máximo al inicio de floración, multiplicándose por 4 veces respecto al control. En los siguientes muestreos realizados en floración y fructificación, mientras que en los nódulos de plantas control el contenido de glucosa se mantiene, el NaCl produce una reducción en torno al 40% respecto al inicio de floración. A pesar del descenso producido, los nódulos de plantas salinizadas acumulan mayor contenido en glucosa que los de las

Resultados

control. Por el contrario el contenido de **glucosa en hoja** tiene un comportamiento diferente al observado en nódulo, ya que en todos los muestreos las hojas de plantas control acumulan mayor contenido en glucosa que las expuestas a la sal, en **raíz** la tendencia es similar a la hoja, excepto en el último muestreo donde las raíces de plantas salinizadas acumulan mayor contenido de glucosa (Tabla 1.3)..

Tabla 1.3. Contenido de azúcares solubles totales (Ast) y glucosa (Glu) expresados en mg glucosa g⁻¹ PF, y trehalosa (Treh) expresado en mg trehalosa g⁻¹ PF en hoja (h) y raíz (r) de *M. sativa*

Tiempo (D)	NaCl (mM)	Ast(h)	Ast(r)	Glu(h)	Glu(r)	Treh(h)	Treh(r)
	0	9.84 ⁱ	16.10 ^f	1.654 ^{ab}	0.899 ⁱ	1.933 ^a	0.090 ^e
42	100	11.49 ^g	18.84 ^e	1.194 ^c	0.843 ⁱ	1.847 ^a	0.064 ^{fg}
	150	10.71 ^h	19.42 ^e	1.089 ^c	1.077 ^h	1.353 ^b	0.100 ^{de}
56	0	12.40 ^f	10.84 ^g	1.582 ^b	1.937 ^{bc}	1.285 ^{bc}	0.126 ^{bc}
	100	13.91 ^e	16.91 ^f	1.191 ^c	1.303 ^g	1.018 ^{de}	0.100 ^{de}
	150	16.66 ^c	34.00 ^a	0.733 ^d	1.792 ^{cde}	0.855 ^{ef}	0.139 ^b
70	0	15.37 ^d	11.69 ^g	1.772 ^a	2.189 ^a	0.569 ^g	0.115 ^{cd}
	100	19.10 ^b	24.23 ^c	0.762 ^d	1.669 ^{ef}	0.687 ^{fg}	0.133 ^{bc}
	150	16.25 ^c	24.27 ^c	0.284 ^e	1.768 ^{de}	0.823 ^f	0.084 ^{ef}
84	0	15.42 ^d	11.11 ^g	0.857 ^d	1.555 ^f	0.683 ^{fg}	0.049 ^g
	100	24.91 ^a	21.05 ^d	0.806 ^d	1.904 ^{bcd}	1.158 ^{cd}	0.116 ^{cd}
	150	19.37 ^b	29.66 ^b	0.752 ^d	2.006 ^b	1.051 ^d	0.167 ^a
MDS (P ≤ 0.05)		0.61	1.33	0.145	0.156	0.180	0.020

Como se observa en la figura 1.9 el contenido de **trehalosa nodular** aumenta con el tiempo de experimentación, tanto en plantas control como en plantas tratadas con sal, por lo tanto se detecta el máximo valor en la etapa de fructificación, alcanzándose un incremento entre un 50-60% respecto a crecimiento vegetativo. El estrés salino provocó una acumulación de trehalosa en nódulo en todos los muestreos, así en crecimiento vegetativo el incremento es del 50%, en inicio de floración del 25%, y en floración y fructificación del 20% respecto al

control. Como se observa en la tabla 1.3 el contenido de **trehalosa en hoja** disminuyó a lo largo de la ontogenia hasta floración tanto en plantas control como tratadas con NaCl, además hay que destacar que en crecimiento vegetativo e inicio de floración las hojas de plantas control acumulan mayor cantidad de trehalosa que las salinizadas, sin embargo cuando el tiempo de exposición al NaCl es mayor (floración y fructificación) se detecta lo contrario, de hecho en fructificación el contenido de trehalosa en hoja de plantas tratadas con sal supera en un 40% al manifestado en el control. La **trehalosa en raíz** aumentó con la salinidad, detectándose el valor más elevado en fructificación con la dosis más elevada de NaCl (Tabla 1.3).

En el análisis de correlaciones de la tabla 1.4 se puede observar que el contenido de trehalosa nodular tiene una correlación significativa y positiva con los parámetros de crecimiento PSP ($r= 0.63^*$) y PSR ($r= 0.68^*$), y con la relación RPA ($r=0.73^{**}$).

Tabla 1.4. Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con el crecimiento peso seco planta (PSP), peso seco raíz (PSR), fluorescencia inicial (F_0), relación F_0/F_m , fluorescencia máxima (F_m), relación F_v/F_m , actividad nitrogenasa total (ANT), peso seco nódulo (PSN), malato (Mal), glutamato (Glu), aminoácidos (Aa), prolina (Pro), mioinositol (Mio), ononitol (Ono), pinitol (Pin), azúcares (Ast) y trehalosa (Treh) en plantas de *M.sativa*. Los símbolos seguidos de "h", "r" y "n" indican hoja, raíz y nódulo respectivamente

	PSP	PSR	F_0	F_0/F_m	F_m	F_v/F_m	ANT	PSN	Mal (h)	Glu (h)	Aa (h)	Pro (h)	Mio (h)	Ono (h)	Pin (h)	Ast (h)	Treh (h)	Aa (r)	Pro (r)	Mio (r)	Ono (r)	Pin (r)	Ast (r)	Treh (r)		
PSP	1.00																									
PSR	0.98	1.00																								
F_0	-0.09	-0.05	1.00																							
F_0/F_m	-0.03	0.01	1.00	1.00																						
F_m	-0.61	-0.60	0.70	0.63	1.00																					
F_v/F_m	-0.10	-0.14	-0.97	-0.98	-0.58	1.00																				
ANT	-0.49	-0.60	-0.23	-0.24	0.06	0.34	1.00																			
PSN	0.93	0.86	-0.06	-0.01	-0.49	-0.09	-0.30	1.00																		
Mal(h)	-0.40	-0.35	0.42	0.43	0.38	-0.30	-0.03	-0.28	1.00																	
Glu(h)	-0.59	-0.68	-0.48	-0.51	0.01	0.61	0.58	-0.55	-0.07	1.00																
Aa(h)	-0.54	-0.53	-0.51	-0.56	-0.01	0.54	0.23	-0.57	-0.21	0.60	1.00															
Pro(h)	0.38	0.51	0.21	0.23	-0.15	-0.36	-0.64	0.08	-0.37	-0.54	-0.10	1.00														
Mio(h)	-0.14	-0.17	-0.32	-0.37	0.16	0.33	-0.09	-0.10	-0.26	0.18	0.47	-0.18	1.00													
Ono(h)	-0.63	-0.62	-0.25	-0.30	0.32	0.39	0.18	-0.57	0.24	0.45	0.50	-0.47	0.74	1.00												
Pin(h)	0.56	0.62	0.25	0.29	-0.28	-0.39	-0.69	0.40	0.07	-0.47	-0.31	0.60	-0.53	-0.73	1.00											
Ast(h)	0.65	0.74	0.12	0.19	-0.51	-0.27	-0.54	0.41	-0.20	-0.53	-0.48	0.77	-0.58	-0.74	0.78	1.00										
Treh(h)	-0.56	-0.51	-0.12	-0.18	0.36	0.17	0.20	-0.56	-0.03	0.15	0.61	0.02	0.59	0.64	-0.56	-0.53	1.00									
Aa(r)	0.46	0.46	0.08	0.09	-0.13	-0.18	-0.47	0.33	-0.20	-0.13	-0.19	0.35	-0.05	-0.29	0.45	0.36	-0.11	1.00								
Pro(r)	0.38	0.52	0.41	0.44	-0.07	-0.52	-0.62	0.13	-0.15	-0.66	-0.37	0.94	-0.40	-0.55	0.64	0.84	-0.14	0.31	1.00							
Mio(r)	-0.53	-0.56	-0.53	-0.59	0.07	0.63	0.16	-0.57	-0.04	0.82	0.66	-0.37	0.50	0.67	-0.39	-0.54	0.28	-0.10	-0.56	1.00						
Ono(r)	-0.58	-0.66	-0.34	-0.38	0.12	0.49	0.72	-0.40	0.11	0.66	0.31	-0.69	0.03	0.35	-0.58	-0.59	0.02	-0.74	-0.68	0.52	1.00					
Pin(r)	0.47	0.55	0.55	0.57	0.07	-0.66	-0.58	0.31	-0.30	-0.70	-0.42	0.82	-0.21	-0.55	0.53	0.69	-0.19	0.27	0.87	-0.65	-0.68	1.00				
Ast(r)	-0.18	-0.07	0.66	0.68	0.35	-0.61	-0.35	-0.25	0.48	-0.34	-0.34	0.40	-0.48	-0.19	0.37	0.43	-0.12	0.02	0.63	-0.39	-0.30	0.54	1.00			
Treh(r)	-0.11	-0.08	0.37	0.38	0.17	-0.35	0.03	-0.26	-0.27	0.07	-0.20	0.45	-0.47	-0.38	0.15	0.44	-0.24	0.04	0.54	-0.16	-0.04	0.55	0.55	1.00		

Valor crítico
 $P \leq$ 0.05 0.01 0.001
0.57 0.70 0.82

Tabla 1.5. Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con el crecimiento peso seco planta (PSP), peso seco parte aérea (PSPA), peso seco raíz (PSR), relación raíz/parte aérea (RPA), actividad nitrogenasa aparente (ANA), actividad nitrogenasa total (ANT), tasa fijación nitrógeno (TFN), peso seco nódulo (PSN), actividades enzimáticas sacarosa sintasa (SS), fosfoenopiruvato carboxilasa (PEPC), malato deshidrogenasa (MDH), isocitrato deshidrogenasa (ICDH), glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT), glutamato deshidrogenasa (GDH), aspartato aminotransferasa (AAT), malato (Mal), glutamato (Glut), aminoácidos (Aa), prolina (Pro), mioinositol (Mio), ononitol (Ono), pinitol (Pin), azúcares (Ast) y trehalosa (Treh) en plantas de *M.satíva*. Los símbolos seguidos de "h", "r" y "n" indican hoja, raíz y nódulo respectivamente

	PSP	PSPA	PSR	RPA	ANA	ANT	TFN	PSN	SS (n)	PEPC (n)	MDH (n)	ICDH (n)	GS (n)	GOGAT (n)	GDH (n)	AAT (n)	Mal (n)	Glut (n)	Aa (n)	Pro (n)	Mio (n)	Ono (n)	Pin (n)	Ast (n)	Treh (n)
PSP	1.00																								
PSPA	0.97	1.00																							
PSR	0.98	0.90	1.00																						
RPA	0.72	0.54	0.82	1.00																					
ANA	-0.34	-0.17	-0.45	-0.69	1.00																				
ANT	-0.49	-0.32	-0.60	-0.70	0.66	1.00																			
TFN	-0.44	-0.30	-0.53	-0.59	0.42	0.95	1.00																		
PSN	0.93	0.96	0.86	0.51	-0.11	-0.30	-0.29	1.00																	
SS(n)	-0.19	-0.06	-0.28	-0.53	0.50	0.27	0.11	-0.14	1.00																
PEPC(n)	0.04	0.13	-0.03	-0.25	0.14	-0.04	-0.11	-0.08	0.76	1.00															
MDH(n)	-0.44	-0.42	-0.43	-0.47	0.62	0.14	-0.07	-0.45	0.65	0.49	1.00														
ICDH(n)	0.07	0.12	0.03	-0.18	0.39	-0.15	-0.36	0.09	0.75	0.62	0.74	1.00													
GS(n)	-0.36	-0.31	-0.38	-0.55	0.19	0.13	0.06	-0.37	0.41	0.38	0.46	0.47	1.00												
GOGAT(n)	-0.15	-0.04	-0.22	-0.48	0.34	0.16	0.03	-0.14	0.92	0.82	0.61	0.80	0.63	1.00											
GDH(n)	-0.34	-0.24	-0.39	-0.59	0.19	0.13	0.09	-0.36	0.59	0.75	0.43	0.38	0.59	0.73	1.00										
AAT(n)	-0.43	-0.47	-0.39	-0.38	0.15	0.02	-0.03	-0.41	0.35	0.21	0.61	0.55	0.59	0.49	0.41	1.00									
Mal(n)	-0.12	0.03	-0.22	-0.57	0.76	0.59	0.45	0.01	0.49	0.37	0.58	0.47	0.45	0.49	0.28	0.34	1.00								
Glut(n)	-0.35	-0.20	-0.45	-0.68	0.43	0.52	0.47	-0.37	0.62	0.60	0.41	0.27	0.64	0.60	0.57	0.15	0.59	1.00							
Aa(n)	0.09	0.13	0.06	0.13	0.03	-0.05	-0.10	0.18	-0.08	-0.11	-0.10	0.11	-0.23	-0.19	-0.32	0.06	-0.09	-0.12	1.00						
Pro(n)	0.63	0.45	0.73	0.81	-0.56	-0.55	-0.45	0.39	-0.39	-0.24	-0.28	-0.10	-0.26	-0.36	-0.61	-0.23	-0.27	-0.38	-0.13	1.00					
Mio(n)	-0.48	-0.52	-0.44	-0.34	0.16	-0.28	-0.43	-0.48	0.42	0.24	0.63	0.56	0.46	0.42	0.39	0.61	-0.08	0.13	0.16	-0.32	1.00				
Ono(n)	-0.44	-0.37	-0.48	-0.59	0.33	0.10	-0.04	-0.37	0.69	0.40	0.59	0.66	0.71	0.68	0.47	0.64	0.29	0.56	0.22	-0.41	0.79	1.00			
Pin(n)	0.40	0.25	0.49	0.84	-0.57	-0.49	-0.40	0.31	-0.52	-0.41	-0.45	-0.26	-0.73	-0.55	-0.71	-0.29	-0.63	-0.80	0.37	0.55	-0.24	-0.52	1.00		
Ast(n)	0.61	0.45	0.70	0.85	-0.60	-0.65	-0.56	0.40	-0.31	-0.14	-0.28	-0.01	-0.37	-0.33	-0.64	-0.23	-0.38	-0.42	0.19	0.90	-0.20	-0.30	0.73	1.00	
Treh(n)	0.63	0.51	0.68	0.73	-0.37	-0.58	-0.59	0.49	-0.25	-0.21	-0.22	0.09	-0.23	-0.27	-0.67	-0.36	-0.26	-0.36	0.06	0.85	-0.15	-0.23	0.55	0.89	1.00

Valor crítico
P ≤ 0.05 0.01 0.001
0.57 0.70 0.82

2. Respuesta de plántulas de *Phaseolus vulgaris* a la aplicación de ácido salicílico y NaCl

Se aborda el efecto que ejerce el pretratamiento de ácido salicílico a semillas de judía en el crecimiento y metabolismo oxidativo en las plántulas en salinidad. Para ello, las semillas de judía fueron puestas en imbibición con AS (0, 0.1 y 0.5 mM) durante 24 h, germinadas con este mismo tratamiento durante 48 h y transferidas a macetas con el AS. En este momento, se aplicó el NaCl (0, 100 y 150 mM) hasta el día 8 de cultivo, cuando se llevó a cabo la cosecha.

2.1. Análisis de crecimiento

Los parámetros estudiados relacionados con el crecimiento del cultivo se detallan en la figura 2.1, en la que se expone el peso seco total de la planta, el peso seco de la parte aérea y raíz y la relación raíz/parte aérea. Los datos numéricos y análisis de la varianza se localizan en las tablas del apéndice A 2.1 y A 2.2.

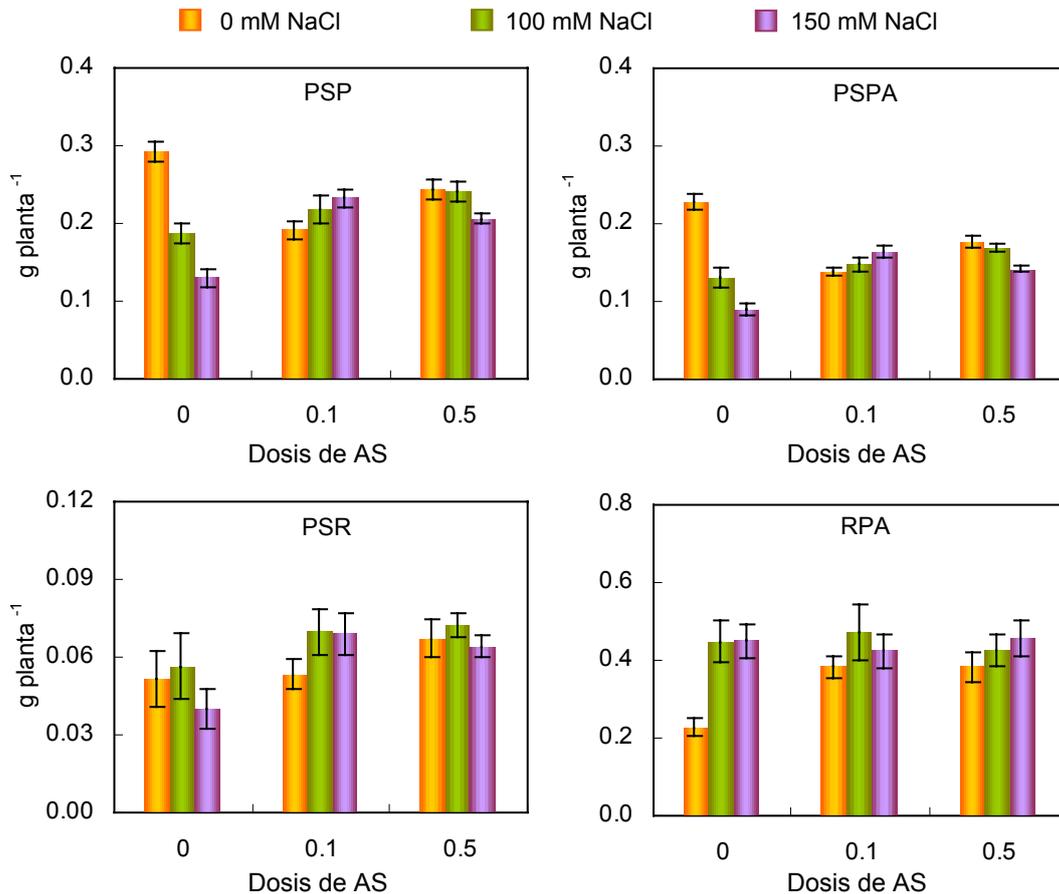


Fig. 2.1. Peso seco de planta (PSP), peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de raíz (PSR) y relación raíz/parte aérea (RPA) en plántulas de *P. vulgaris* crecidas con diferentes dosis de AS y NaCl. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=10) con el error estándar.

La salinidad causó un descenso en el **peso seco de planta** proporcional a la concentración de NaCl, y el pretratamiento de AS también provocó una disminución en el PSP del 30% con 0.1 mM, y del 10% con la dosis más elevada (0.5 mM). No obstante, el descenso del PSP que ocasiona la salinidad fue menor cuando estaba presente el AS, este hecho se refleja en el diagrama de barras de la figura 2.1, donde las plántulas pretratadas con AS (0.1 y 0.5 mM) y expuestas posteriormente al NaCl muestran una reducción entre el 10-20% respecto al control, mientras que en las sólo salinizadas se observa una disminución del 30% (100 mM NaCl) y 50% (150 mM de NaCl).

El **peso seco de parte aérea** experimentó un comportamiento similar al del PSP, presentando porcentajes de disminución del 40% con 100 mM de NaCl, y del 60% con 150 mM, y entre el 30-40% con el pretratamiento de AS. Por el contrario, el **crecimiento radical** incrementó con 100 mM de NaCl, también se estimuló con el pretratamiento de AS, por lo que en el tratamiento combinado de AS (0.5 mM) y de NaCl (100 mM) se observa el valor más elevado. Los cambios producidos por la salinidad en el crecimiento de las plántulas se reflejan en la **relación raíz/parte aérea**, que se incrementa con AS y se duplica con ambas dosis de NaCl.

En general se evidencia que la salinidad afecta negativamente al crecimiento de las plántulas, aunque el efecto es menor en las pretratadas con AS.

2.2. Actividades enzimáticas antioxidantes

En la figura 2.2 se muestran las actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo oxidativo determinadas en hoja: catalasa, guaiacol peroxidasa, ascorbato peroxidasa, monodehidroascorbato reductasa, dehidroascorbato reductasa y glutatión reductasa. En el apéndice se recogen los datos numéricos y el correspondiente análisis de la varianza (desde la tabla A 2.3 hasta la A 2.6).

El estrés salino no provocó diferencias significativas en la **actividad catalasa**, sin embargo la **actividad peroxidasa** se multiplicó por 3 con la dosis 100 mM de NaCl y por 10 con la dosis 150 mM. El pretratamiento con 0.1 mM de AS no induce cambios significativos respecto al control en ambas actividades enzimáticas (CAT y POX), aunque con la mayor dosis de AS (0.5 mM) se detecta una disminución del 50% en la CAT y del 30% en la POX. En las plántulas pretratadas con AS, el estrés salino favoreció el aumento de la actividad POX, pero no tan elevado con el descrito anteriormente para plantas sólo salinizadas, de hecho en la figura 2.2 se visualiza que con 150 mM de NaCl la presencia de AS produce una actividad un 60% menor.

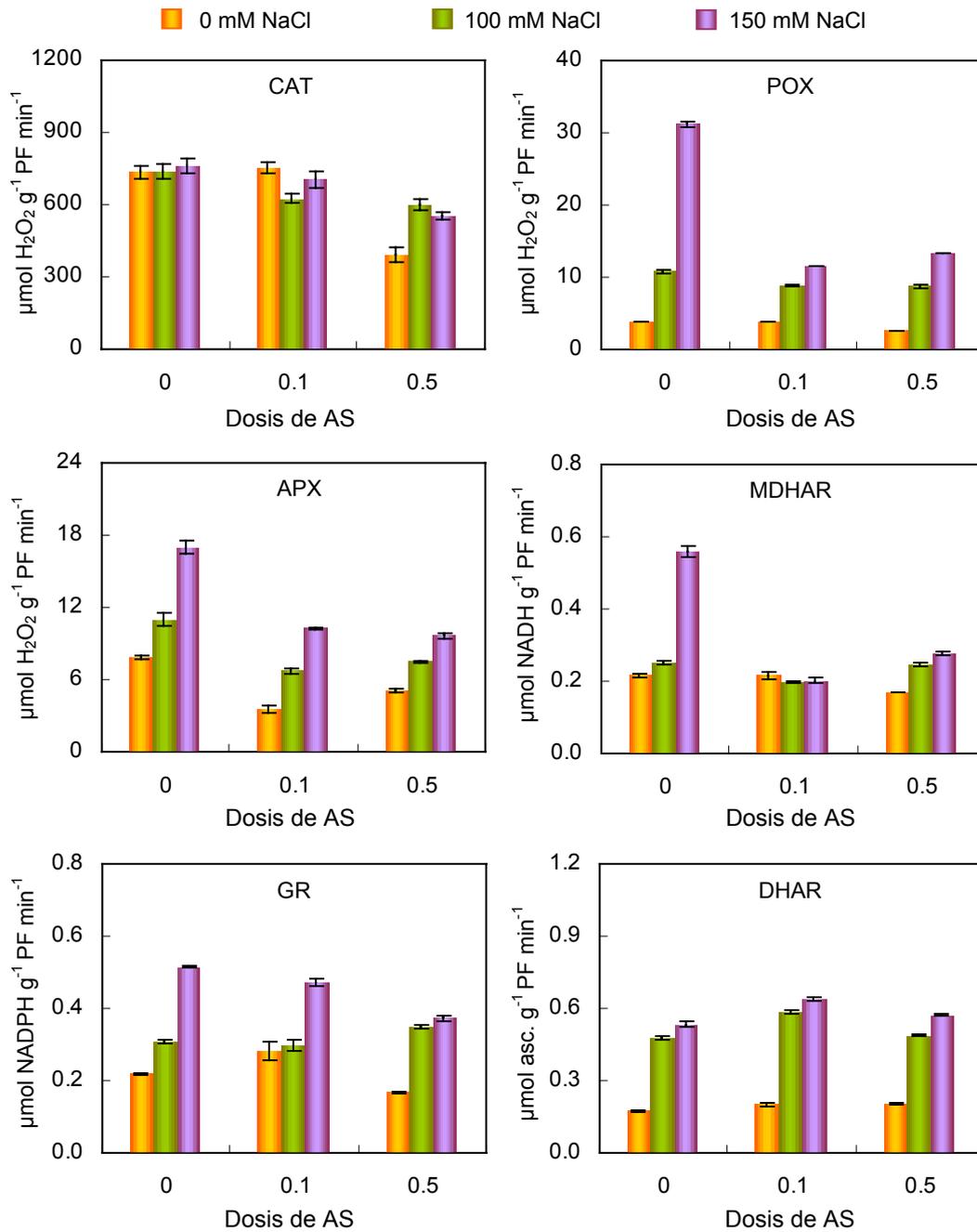


Fig. 2.2. Actividades enzimáticas catalasa (CAT), guaiacol peroxidasa (POX), ascorbato peroxidasa (APX), monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), glutatión reductasa (GR) y dehidroascorbato reductasa (DHAR) en hoja de plántulas de *P. vulgaris* crecidas con diferentes dosis de AS y NaCl. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

El NaCl estimuló las cuatro enzimas del **ciclo ascorbato-glutation** (Fig. 2.2), detectándose incrementos del 40% en APX y MDHAR, y del 70% en GR con 100 mM de NaCl, mientras que con 150 mM estas actividades duplicaron su valor, y la DHAR casi se triplicó con ambas dosis de NaCl. El pretratamiento de AS no afecta significativamente a las actividades antioxidantes estudiadas, señalar que 0.5 mM de AS inhibe a la APX y GR. El uso de tratamientos combinados (AS+NaCl) favoreció que el incremento de las enzimas estudiadas con la salinidad no fuese tan espectacular, observándose con 0.5 mM AS y 150 mM NaCl un aumento del 20% para APX y MDHAR, y del 40% para GR, por el 60-70% para estas enzimas en las plantas sólo salinizadas (150 mM).

El análisis de varianza de los datos obtenidos para las distintas actividades enzimáticas (Tabla A 2.4 y A 2.6), muestra que la variabilidad observada se debió principalmente al efecto de la sal para todas las enzimas, excepto para la actividad CAT, en la que se debió en un 70% al AS. Se ha demostrado que la actividad POX, MDHAR y GR foliar exhiben una correlación negativa y significativa estadísticamente con los parámetros de crecimiento (Tabla 2.1), mientras que la DHAR muestra una correlación positiva con la relación RPA ($P \leq 0.01$). Destacar que la GR se correlaciona significativamente de forma positiva ($P \leq 0.01$) con todas las actividades antioxidantes estudiadas excepto con la CAT.

2.3. Ascorbato y glutatión

El contenido de las distintas formas de **ascorbato en hoja** se expone en la figura 2.3, en la cual se observa que el estrés salino estimula la acumulación de en ambas formas (reducido y oxidado), y por lo tanto también aumenta el contenido de ascorbato total. Los valores del reducido incrementaron 4 veces con 150 mM de NaCl, mientras que el total se multiplicó por 2.5 veces respecto al control, por el contrario la relación oxidado/reducido con esta dosis de sal disminuye un 70%. El pretratamiento con AS induce un efecto distinto al NaCl, sólo se detecta una ligera menor acumulación de ascorbato total y reducido de hoja (Fig. 2.3), sin embargo la relación DHA/AsA aumenta en un 50% y un 70% con 0.1 y 0.5 mM de AS. El efecto del NaCl en plántulas pretratadas con AS se asemeja al descrito, ya que con 150 mM las pretratadas acumulan un 40% y un 70% menos de ascorbato total y AsA respectivamente con ambas dosis de AS (0.1 y 0.5 mM), que las únicamente expuestas al tratamiento salino, por el contrario el DHA se incrementó en un 7% y un 20% con estos tratamientos.

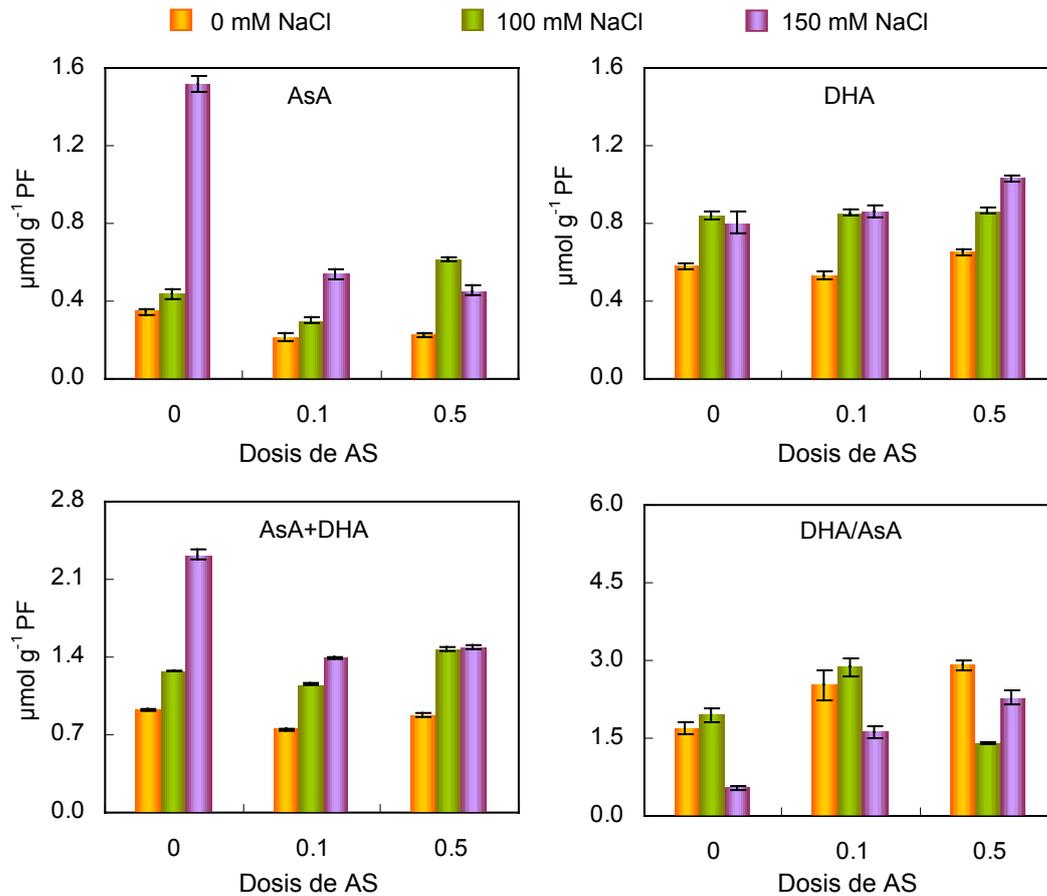


Fig. 2.3. Contenido de ascorbato reducido (AsA), oxidado (DHA), total (AsA+DHA) y relación oxidado/reducido (DHA/AsA) en hoja de plántulas de *P. vulgaris* crecidas con diferentes dosis de AS y NaCl. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

La figura 2.4 refleja el contenido de las distintas formas de **ascorbato en raíz**, en la que se detecta de forma generalizada que excepto en el control la acumulación de este antioxidante no enzimático en sus distintas formas es menor en raíz que en hoja. El NaCl provoca el mismo comportamiento que en hoja, aumentando el AsA un 40% con la dosis de sal más elevada (150 mM), por el contrario el contenido de ascorbato total y el DHA disminuye con el estrés salino. El pretratamiento con 0.5 mM de AS favorece el aumento del AsA en un 50% que contribuye a la caída de la relación DHA/AsA. Las plántulas expuestas a los tratamientos combinados (AS+NaCl), son las que acumulan mayor contenido de AsA en raíz, así con el tratamiento combinado compuesto por 0.5 mM de AS y 150 mM de NaCl, se acumula un 60% más de AsA que en la raíz de plántulas control.

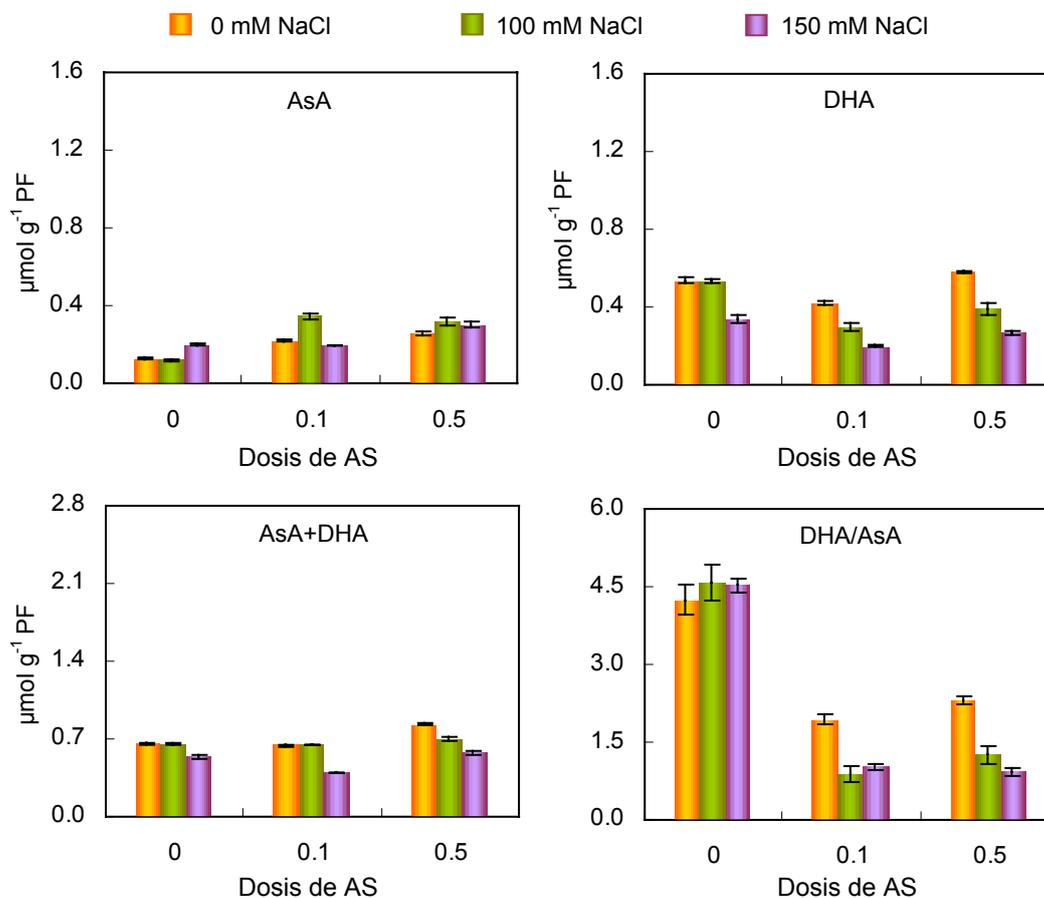


Fig. 2.4. Contenido de ascorbato reducido (AsA), oxidado (DHA), total (AsA+DHA) y relación oxidado/reducido (DHA/AsA) en raíz de plántulas de *P. vulgaris* crecidas con diferentes dosis de AS y NaCl. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

En la figura 2.5 se visualiza el contenido de las distintas formas de **glutation en hoja** (reducido y oxidado), el total y la relación oxidado/reducido. Se refleja que el estrés salino produjo un aumento en ambas formas (oxidado y reducido), con la dosis 150 mM el reducido incrementó un 60% y el oxidado un 85% respecto al control, esto provocó que tanto el glutacion total, como la relación GSSG/GSH fuese más elevada. Por otra parte las hojas de plántulas pretratadas con AS acumularon menor cantidad de reducido y oxidado, así con 0.1 mM de AS el GSH disminuyó un 70% y el GSSG un 25%, y con 0.5 mM de AS un 75% y un 50% respectivamente. En la relación GSSG/GSH se detectó un aumento superior al doble con el tratamiento de AS. Igual que lo descrito para el contenido de las distintas formas de ascorbato de hoja, el aumento observado en las distintas formas de glutacion con los tratamientos combinados (AS+NaCl) fue menor que en las plántulas crecidas únicamente con sal.

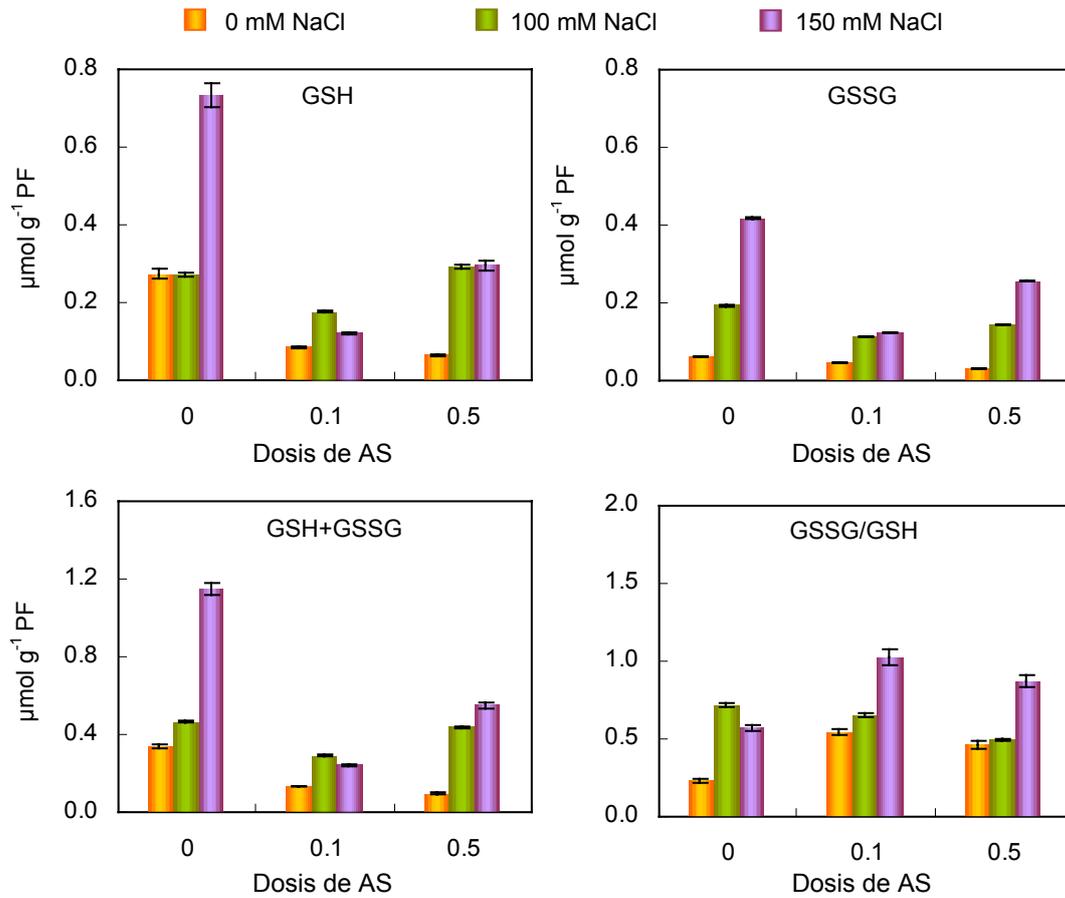


Fig. 2.5. Contenido de glutatión reducido (GSH), oxidado (GSSG), total (GSH+GSSG) y relación oxidado/reducido (GSSG/GSH) en hoja de plántulas de *P. vulgaris* crecidas con diferentes dosis de AS y NaCl. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

En la figura 2.6 se muestra el contenido de las distintas formas de **glutatión en raíz**, y se evidencia que el contenido del reducido disminuyó al aumentar la concentración salina, mientras que el oxidado presentó un comportamiento contrario. El pretratamiento con AS reflejó el mismo efecto que la salinidad, observándose una disminución del 40% en el GSH, mientras que el GSSG aumentó un 40% con la dosis más elevada de AS (0.5 mM). La relación GSSG/GSH aumentó conforme se incrementó la dosis de NaCl y AS, detectándose los valores más elevados en las raíces de plántulas expuestas a los tratamientos combinados (AS+NaCl).

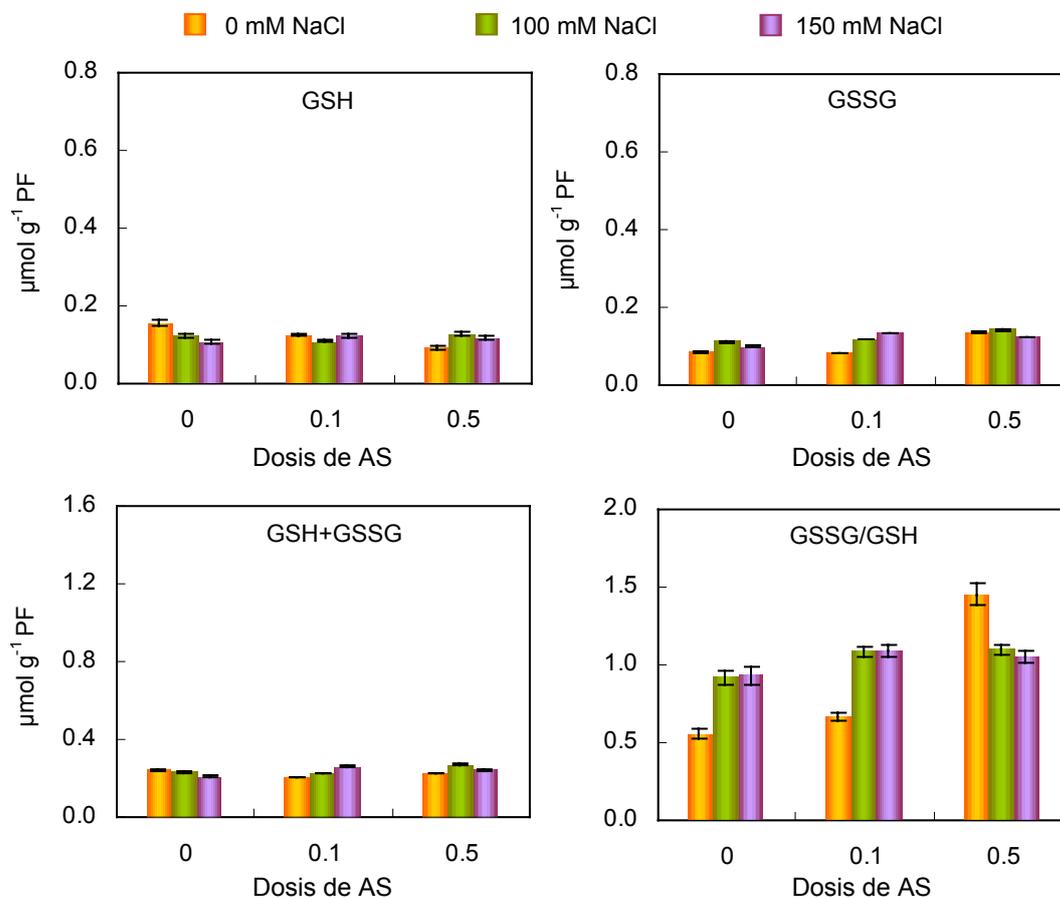


Fig. 2.6. Contenido de glutatión reducido (GSH), oxidado (GSSG), total (GSH+GSSG) y relación oxidado/reducido (GSSG/GSH) en raíz de plántulas de *P. vulgaris* crecidas con diferentes dosis de AS y NaCl. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

La relación DHA/AsA es mayor en raíz que en hoja, mientras que esta tendencia cambia en plántulas pretratadas con AS. Sin embargo la relación GSSG/GSH en todos los tratamientos ensayados es mayor en raíz de plántulas de judía que en hoja. Al estudiar la tabla 2.2 se aprecia que la mayoría de los parámetros relacionados con moléculas antioxidantes evaluados en hoja se correlacionan de forma positiva con las actividades enzimáticas antioxidantes foliares, destacando el alto nivel de significación ($P \leq 0.001$). En la tabla 2.2 se puede apreciar que el ascorbato reducido de hoja tiene una correlación positiva con el glutatión reducido ($r = 0.93^{***}$).

2.4. Otros metabolitos

Se determinó el contenido de aminoácidos libres, prolina y azúcares solubles totales en hoja y raíz de plántulas de *P. vulgaris*, expuestos en la figura 2.7. Los datos numéricos relacionados con estos parámetros, junto con el análisis de la varianza de los mismos se recogen en las tablas de la A 2.15 a la A 2.18 del apéndice.

Al estudiar el contenido de **aminoácidos libres** en hoja y raíz (Fig. 2.7), se observa que la salinidad no induce cambios significativos en los niveles de Aa de hoja, sin embargo en raíz el estrés salino promovió una menor acumulación, con 150 mM de NaCl se evidencia una caída del 40% respecto al control. El pretratamiento con AS disminuye la cantidad de Aa en ambos órganos, en hoja fue del 30% con la dosis 0.1 mM y del 50% con 0.5 mM, mientras que en raíz del 50% y del 70% respectivamente.

La acumulación de prolina en hoja y raíz es bastante semejante, sin embargo en la figura 2.7 se detecta que el contenido de **prolina** en hoja se multiplicó por 2 y por 7 con 100 y 150 mM de NaCl respectivamente, y en raíz el estrés salino también provocó un aumento, pero únicamente con la dosis más elevada. El pretratamiento con AS tiene un efecto contrario al salino en ambos órganos, induciendo una menor acumulación de prolina, este efecto se intensifica claramente en plántulas pretratadas con AS en condiciones de estrés salino (150 mM), puesto que la aplicación previa de AS disminuye drásticamente el nivel de prolina en hoja, llegando a ser un 70% menor en este tratamiento combinado.

El contenido de **azúcares solubles totales** fue 5 veces mayor en hoja que en raíz. Con 150 mM de sal este contenido se duplicó en hoja y se redujo un 30% en raíz respecto al control. Al contrario de lo observado en el contenido de Aa y prolina, el pretratamiento con AS estimuló la acumulación de Ast en ambos órganos. En los tratamientos combinados (AS+NaCl) el contenido de Ast en hoja es menor que el observado en plántulas sólo salinizadas, manifestándose la misma respuesta descrita para el contenido de prolina.

Se establece que la acumulación de aminoácidos libres y azúcares solubles totales es mayor en hoja que en raíz, mientras que la acumulación de prolina es similar con la excepción de los tratamientos con 150 mM de NaCl (sólo o combinado con AS). La variabilidad detectada de los datos relacionados con el contenido de Ast en hoja y raíz se debe en un 80-85% a la interacción AsxNaCl, mientras que en los relacionados con el contenido de Aa se debe en un 65-80% al tratamiento con AS. La prolina y azúcares solubles totales de hoja se correlacionan negativamente con el crecimiento de la plántula, y de forma positiva y significativamente con el contenido de moléculas antioxidantes que se generan en

Resultados

las hojas (ascorbato y glutation), así como con las actividades enzimáticas determinadas en este trabajo a excepción de la catalasa foliar (Tabla 2.1).

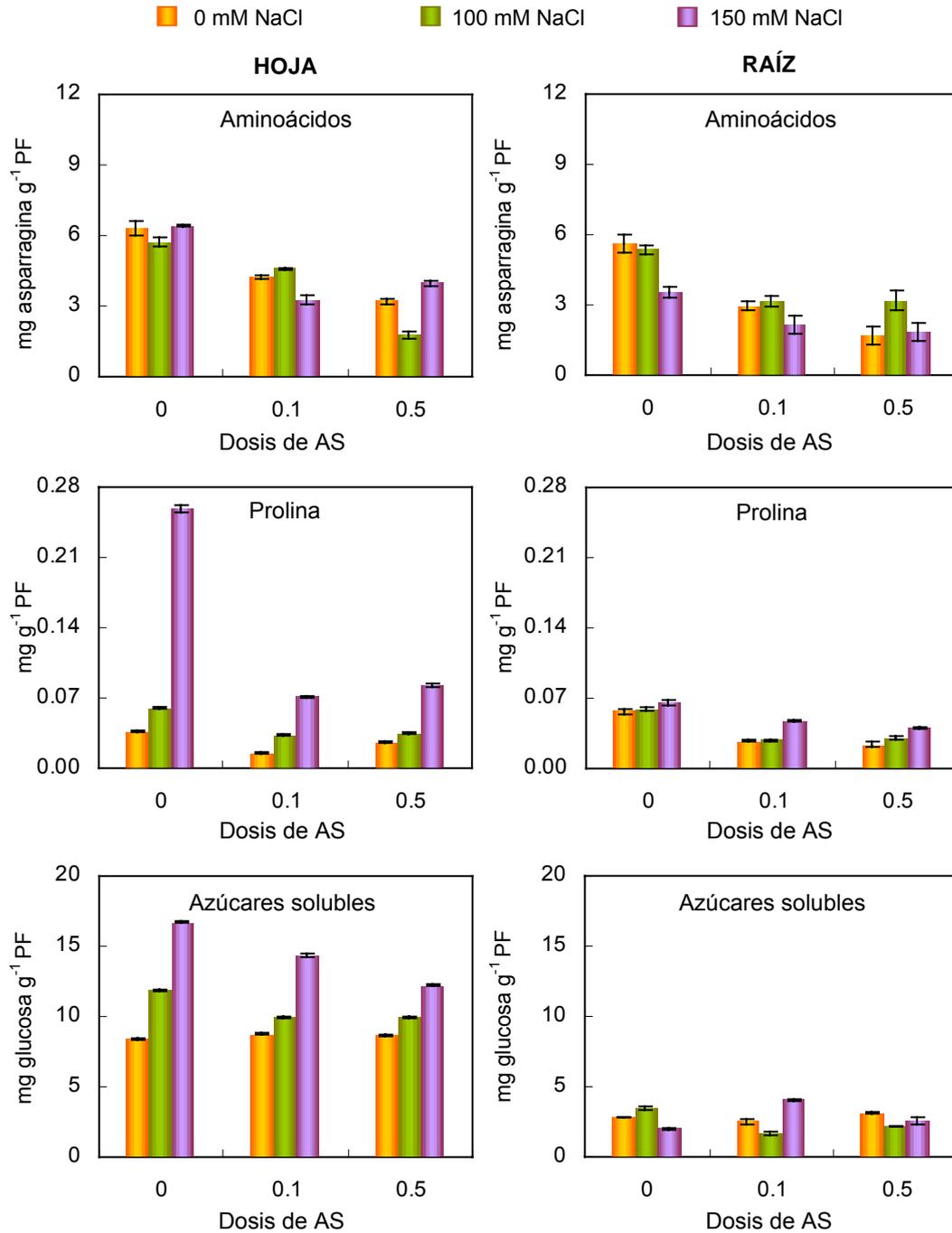


Fig. 2.7. Contenido de aminoácidos, prolina y azúcares solubles totales en hoja y raíz de plántulas de *P. vulgaris* crecidas con diferentes dosis de AS y NaCl. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

2.5. Peróxido de hidrógeno y peroxidación de lípidos

En la figura 2.8 se muestran los resultados correspondientes al contenido de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y la peroxidación de lípidos (TBARS) en hoja y raíz de plántulas de *P. vulgaris*. Los datos numéricos correspondientes y el análisis de la varianza se encuentran en las tablas A 2.19 y A 2.20 del apéndice.

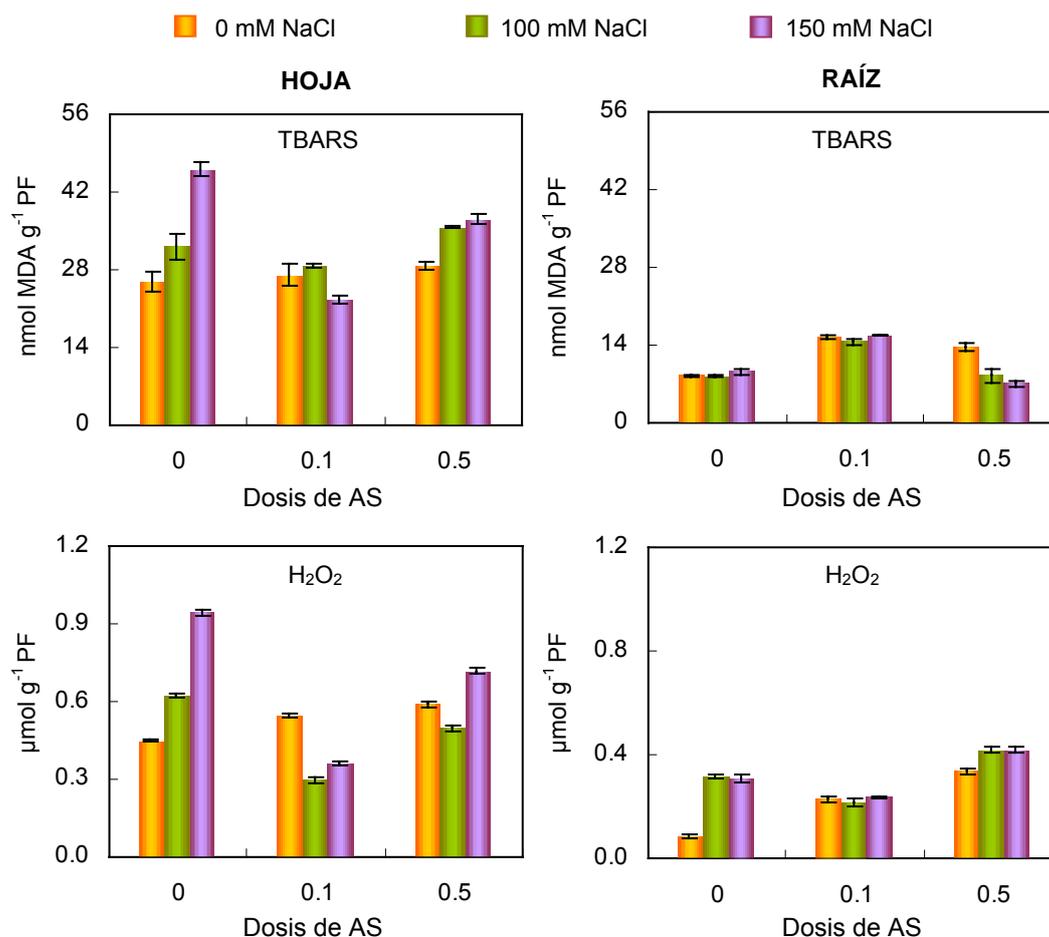


Fig. 2.8. Contenido de especies reactivas del ácido tibobarbitúrico (TBARS) y de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en hoja y raíz de plántulas de *P. vulgaris* crecidas con diferentes dosis de AS y NaCl. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

La **peroxidación de lípidos** determinada como concentración de malonaldehído (MDA) es más intensa en las hojas de plántulas de judía que en la raíz, detectándose que es casi 4 veces más potente. El estrés salino (150 mM) incrementó este parámetro en un 45% en hoja, en cambio no sufrió cambios significativos con el pretratamiento de AS, mientras que en raíz el AS provocó un

incremento en el contenido de MDA del 40-45%. La aplicación previa del AS (0.1 mM) a las condiciones de estrés salino favorece la caída significativa de la peroxidación lipídica en hoja, sin embargo en raíz se detecta un incremento del contenido de MDA, así en el tratamiento combinado (0.1 mM de AS y 150 mM de NaCl) se multiplicó por 1.7 veces respecto al tratamiento salino.

La producción de **peróxido de hidrógeno** en hoja y raíz presenta una tendencia similar a la descrita en la peroxidación lipídica. El estrés salino provocó la acumulación de peróxido de hidrógeno (Fig. 2.8), duplicándolo en hoja, y multiplicándolo por 4 en raíz con 150 mM respecto al control. El pretratamiento con AS también aumentó este contenido en ambos órganos, observándose con 0.5 mM un incremento del 25% en hoja y del 75% en raíz. En raíz, los valores más elevados se manifiestan con los tratamientos combinados (AS+NaCl), observándose que con 0.5 mM de AS y 150 mM de NaCl el nivel de peróxido se multiplicó por 5 respecto al control.

La variabilidad observada en los datos relativos al peróxido en hoja y raíz está íntimamente relacionada con el pretratamiento de AS en casi un 70% (Tabla A 2.10 del apéndice). En la tabla 2.1 de correlaciones se deduce que la peroxidación lipídica y el peróxido de hidrógeno en hoja presentan una correlación negativa y significativa ($P \leq 0.05$) con el crecimiento de la planta ($r = -0.70^*$ y $r = -0.72^*$ respectivamente), además estos parámetros tienen correlación positiva y significativa con el ascorbato reducido ($r = 0.79^{**}$ y $r = 0.69^*$), con el glutatión reducido ($r = 0.87^{**}$ y $r = 0.74^*$) y con la prolina ($r = 0.78^*$ y $r = 0.76^*$) en hoja.

2.6. Ácido salicílico

Se determinó el contenido ácido salicílico libre endógeno en hoja y raíz de plántulas de *P. vulgaris* (datos expuestos en la figura 2.9). Los datos numéricos, junto con el análisis de la varianza de estos resultados se recogen en las tablas A 2.21 y A 2.22 del apéndice.

El pretratamiento con AS favorece que se aumente el **ácido salicílico libre endógeno** en la planta tanto en hoja como en raíz, provocando un incremento en hoja del 28% con 0.1 mM y multiplicándose por 7 con 0.5 mM de AS, mientras que en raíz se multiplica por 6 y por 50 con 0.1 y 0.5 mM respectivamente. Se aprecia que la producción de AS es mayor en hoja que en raíz, incluso en medio salino al menos con la dosis considerada fisiológicamente más normal (0.1 mM), mientras que el pretratamiento con 0.5 mM induce en raíz un incremento espectacular del AS endógeno. Por el contrario el estrés salino causó un descenso en el contenido de AS en ambos órganos, el cuál fue más acentuado en los tratamientos combinados, donde se esperaba encontrar valores más elevados.

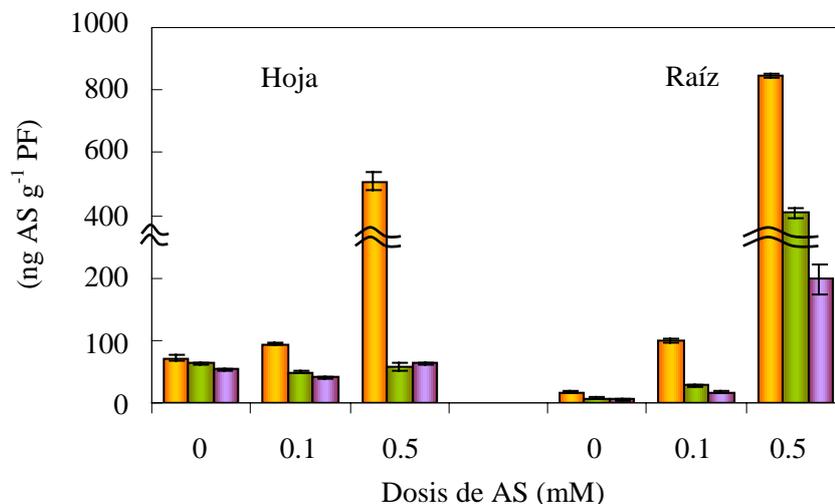


Figura 2.9. Contenido de ácido salicílico libre endógeno (AS) en hoja y raíz de plántulas de *P. vulgaris* crecidas con diferentes dosis de AS y NaCl. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

El análisis de varianza realizado al AS endógeno en hoja y raíz se representa en la tabla A 2.22 del apéndice, y muestra que la mayor fuente de variación para el contenido endógeno de AS en hoja es la interacción AS-NaCl (43%), mientras que para raíz es el tratamiento con AS (70%). El AS endógeno de hoja y raíz se correlaciona negativamente y de forma significativa con la actividad CAT foliar ($r = -0.78^*$ y $r = -0.90^{***}$ respectivamente) (Tabla 2.2).

Tabla 2.1. Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con el crecimiento peso seco planta (PSP), peso seco parte aerea (PSPA), peso seco raiz (PSR), actividades enzimáticas catalasa (CAT), peroxidasa (POX), ascorbato peroxidasa (APX), monodehidroascorbato reductasa (MDR), dehidroascorbato reductasa (DHR), glutatión reductasa (GR), ascorbato total (Asctot), ascorbato reducido (AsA), glutatión total (Glutot), glutatión reducido (GSH), aminoácidos (Aa), prolina (Pro), azúcares (Ast), peroxidación de lípidos (TBAR), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y ácido salicílico (AS) en plántulas de *P. vulgaris*. Los símbolos seguidos de "h", "r" y "n" indican hoja, raíz y nódulo respectivamente

	PSP	PSPA	PSR	CAT (h)	POX (h)	APX (h)	MDR (h)	DHR (h)	GR (h)	Asc tot(h)	AsA (h)	Glu tot(h)	GSH (h)	Asc tot(r)	AsA (r)	Glu tot(r)	GSH (r)	Aa (h)	Pro (h)	Ast (h)	Aa (r)	Pro (r)	Ast (r)	TBAR (h)	H ₂ O ₂ (h)	AS (h)	AS (r)	
PSP	1.00																											
PSPA	0.97	1.00																										
PSR	0.57	0.36	1.00																									
CAT(h)	-0.37	-0.24	-0.63	1.00																								
POX(h)	-0.79	-0.75	-0.53	0.36	1.00																							
APX(h)	-0.62	-0.55	-0.52	0.41	0.93	1.00																						
MDR(h)	-0.79	-0.69	-0.72	0.40	0.94	0.85	1.00																					
DHR(h)	-0.37	-0.50	0.28	0.11	0.58	0.57	0.30	1.00																				
GR(h)	-0.61	-0.63	-0.23	0.45	0.84	0.78	0.69	0.77	1.00																			
Asctot(h)	-0.66	-0.65	-0.35	0.25	0.96	0.92	0.88	0.66	0.85	1.00																		
AsA(h)	-0.68	-0.61	-0.56	0.36	0.95	0.89	0.96	0.42	0.78	0.95	1.00																	
Glutot(h)	-0.70	-0.62	-0.61	0.36	0.95	0.91	0.96	0.43	0.69	0.93	0.93	1.00																
GSH(h)	-0.63	-0.53	-0.66	0.39	0.90	0.87	0.96	0.32	0.62	0.89	0.93	0.99	1.00															
Asctot(r)	0.32	0.32	0.16	-0.58	-0.53	-0.55	-0.33	-0.65	-0.83	-0.49	-0.42	-0.35	-0.27	1.00														
AsA(r)	0.05	-0.11	0.62	-0.57	-0.05	-0.31	-0.15	0.34	0.01	0.05	-0.12	-0.11	-0.15	0.18	1.00													
Glutot(r)	0.61	0.50	0.66	-0.20	-0.23	-0.05	-0.36	0.34	0.09	0.02	-0.16	-0.18	-0.19	-0.12	0.18	1.00												
GSH(r)	0.45	0.56	-0.19	0.57	-0.23	-0.04	-0.14	-0.22	-0.06	-0.19	-0.13	-0.06	0.02	-0.21	-0.44	0.40	1.00											
Aa(h)	-0.38	-0.19	-0.83	0.59	0.39	0.48	0.48	-0.15	0.06	0.20	0.33	0.48	0.52	-0.16	-0.63	-0.58	0.24	1.00										
Pro(h)	-0.75	-0.67	-0.64	0.34	0.97	0.92	0.96	0.41	0.75	0.91	0.96	0.93	0.91	-0.46	-0.17	-0.32	-0.22	0.47	1.00									
Ast(h)	-0.69	-0.69	-0.36	0.36	0.91	0.91	0.76	0.71	0.93	0.89	0.83	0.77	0.69	-0.74	-0.15	-0.06	-0.23	0.25	0.87	1.00								
Aa(r)	0.04	0.19	-0.50	0.64	0.01	0.22	0.14	-0.23	-0.15	-0.03	0.08	0.21	0.30	0.07	-0.66	-0.04	0.65	0.68	0.04	-0.10	1.00							
Pro(r)	-0.36	-0.22	-0.68	0.64	0.64	0.84	0.64	0.23	0.50	0.59	0.64	0.70	0.71	-0.49	-0.71	-0.04	0.37	0.73	0.68	0.64	0.62	1.00						
Ast(r)	0.28	0.28	0.15	0.01	-0.26	-0.01	-0.37	-0.05	-0.01	-0.25	-0.27	-0.37	-0.41	-0.27	-0.59	0.30	0.13	-0.11	-0.21	0.10	-0.01	0.21	1.00					
TBAR(h)	-0.70	-0.67	-0.44	0.04	0.80	0.68	0.86	0.32	0.49	0.82	0.79	0.89	0.87	-0.01	0.17	-0.21	-0.28	0.22	0.78	0.56	0.00	0.38	-0.53	1.00				
H ₂ O ₂ (h)	-0.72	-0.63	-0.66	0.07	0.70	0.63	0.82	0.02	0.37	0.64	0.69	0.77	0.74	-0.01	-0.20	-0.43	-0.28	0.36	0.76	0.54	-0.01	0.47	-0.17	0.85	1.00			
AS(h)	0.26	0.23	0.21	-0.78	-0.39	-0.40	-0.30	-0.53	-0.60	-0.38	-0.31	-0.40	-0.37	0.68	0.08	-0.19	-0.57	-0.28	-0.25	-0.39	-0.41	-0.46	0.19	-0.15	0.08	1.00		
AS(r)	0.33	0.25	0.45	-0.90	-0.38	-0.44	-0.32	-0.37	-0.50	-0.27	-0.28	-0.35	-0.34	0.70	0.38	0.13	-0.50	-0.61	-0.31	-0.41	-0.55	-0.61	0.05	0.00	0.07	0.88	1.00	

Valor crítico
P ≤ 0.05 0.01 0.001
0.66 0.79 0.89

Tabla 2.2. Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con el crecimiento peso seco planta (PSP), peso seco parte aérea (PSPA), peso seco raíz (PSR), relación raíz/parte aérea (RPA), actividades enzimáticas catalasa (CAT), peroxidasa (POX), ascorbato peroxidasa (APX), monodehidroascorbato reductasa (MDR), dehidroascorbato reductasa (DHR), glutatión reductasa (GR), ascorbato total (Asctot), ascorbato reducido (AsA), dehidroascorbato (DHA), relación ascorbato oxidado/reducido (Aox/rd), glutatión total (Glu), glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG), relación glutatión oxidado/reducido (Gox/rd), peroxidación de lípidos (TBAR), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y ácido salicílico (AS) en plántulas de *P. vulgaris*. Los símbolos seguidos de "h", "r" y "n" indican hoja, raíz y nódulo respectivamente

	PSP	PSPA	PSR	RPA	CAT	POX	APX	MDR	DHR	GR	Asc	AsA	DHA	Aox/rd	Asc	AsA	DHA	Aox/rd	Glu	GSH	GSSG	Gox/rd	Glu	Gox/rd	TBAR	H ₂ O ₂	AS	AS
					(h)	(h)	(h)	(h)	(h)	(h)	tot(h)	(h)	(h)	(h)	tot(r)	(r)	(r)	(r)	tot(h)	(h)	(h)	(h)	tot(r)	(r)	(h)	(h)	(h)	(r)
PSP	1.00																											
PSPA	0.97	1.00																										
PSR	0.57	0.36	1.00																									
RPA	-0.63	-0.79	0.26	1.00																								
CAT(h)	-0.37	-0.24	-0.63	-0.14	1.00																							
POX(h)	-0.79	-0.75	-0.53	0.48	0.36	1.00																						
APX(h)	-0.62	-0.55	-0.52	0.32	0.41	0.93	1.00																					
MDR(h)	-0.79	-0.69	-0.72	0.28	0.40	0.94	0.85	1.00																				
DHR(h)	-0.37	-0.50	0.28	0.77	0.11	0.58	0.57	0.30	1.00																			
GR(h)	-0.61	-0.63	-0.23	0.53	0.45	0.84	0.78	0.69	0.77	1.00																		
Asctot(h)	-0.66	-0.65	-0.35	0.50	0.25	0.96	0.92	0.88	0.66	0.85	1.00																	
AsA(h)	-0.68	-0.61	-0.56	0.30	0.36	0.95	0.89	0.96	0.42	0.78	0.95	1.00																
DHA(h)	-0.24	-0.38	0.38	0.72	-0.18	0.45	0.47	0.21	0.89	0.55	0.58	0.28	1.00															
Aox/rd(h)	0.37	0.27	0.52	0.01	-0.55	-0.74	-0.81	-0.77	-0.31	-0.72	-0.79	-0.86	-0.17	1.00														
Asctot(r)	0.32	0.32	0.16	-0.25	-0.58	-0.53	-0.55	-0.33	-0.65	-0.83	-0.49	-0.42	-0.39	0.48	1.00													
AsA(r)	0.05	-0.11	0.62	0.51	-0.57	-0.05	-0.31	-0.15	0.34	0.01	0.05	-0.12	0.43	0.37	0.18	1.00												
DHA(r)	0.26	0.36	-0.23	-0.54	-0.18	-0.45	-0.32	-0.21	-0.80	-0.76	-0.47	-0.31	-0.62	0.21	0.80	-0.45	1.00											
Aox/rd(r)	0.16	0.30	-0.44	-0.56	0.31	-0.23	0.03	-0.08	-0.53	-0.45	-0.29	-0.16	-0.46	-0.07	0.33	-0.82	0.80	1.00										
Glu(h)	-0.70	-0.62	-0.61	0.31	0.36	0.95	0.91	0.96	0.43	0.69	0.93	0.93	0.40	-0.78	-0.35	-0.11	-0.25	-0.05	1.00									
GSH(h)	-0.63	-0.53	-0.66	0.18	0.39	0.90	0.87	0.96	0.32	0.62	0.89	0.93	0.28	-0.81	-0.27	-0.15	-0.15	0.02	0.99	1.00								
GSSG(h)	-0.77	-0.74	-0.50	0.50	0.30	0.96	0.91	0.92	0.59	0.78	0.95	0.89	0.57	-0.69	-0.45	-0.03	-0.39	-0.17	0.96	0.91	1.00							
Gox/rd(h)	-0.31	-0.44	0.33	0.69	0.02	0.29	0.29	0.00	0.78	0.61	0.30	0.07	0.70	0.01	-0.70	0.17	-0.74	-0.48	0.05	-0.10	0.30	1.00						
Glu(r)	0.61	0.50	0.66	-0.06	-0.20	-0.23	-0.05	-0.36	0.34	0.09	0.02	-0.16	0.45	-0.17	-0.12	0.18	-0.22	-0.13	-0.18	-0.19	-0.16	0.20	1.00					
Gox/rd(r)	0.04	-0.13	0.62	0.53	-0.83	0.00	-0.06	-0.16	0.31	-0.03	0.11	-0.04	0.42	0.30	0.26	0.54	-0.09	-0.45	-0.13	-0.20	-0.01	0.32	0.21	1.00				
TBAR(h)	-0.70	-0.67	-0.44	0.44	0.04	0.80	0.68	0.86	0.32	0.49	0.82	0.79	0.42	-0.56	-0.01	0.17	-0.11	-0.16	0.89	0.87	0.88	-0.03	-0.21	0.09	1.00			
H ₂ O ₂ (h)	-0.72	-0.63	-0.66	0.21	0.07	0.70	0.63	0.82	0.02	0.37	0.64	0.69	0.14	-0.49	-0.01	-0.20	0.11	0.08	0.77	0.74	0.76	-0.04	-0.43	0.00	0.85	1.00		
AS(h)	0.26	0.23	0.21	-0.17	-0.78	-0.39	-0.40	-0.30	-0.53	-0.60	-0.38	-0.31	-0.36	0.48	0.68	0.08	0.57	0.09	-0.40	-0.37	-0.41	-0.30	-0.19	0.62	-0.15	0.08	1.00	
AS(r)	0.33	0.25	0.45	-0.03	-0.90	-0.38	-0.44	-0.32	-0.37	-0.50	-0.27	-0.28	-0.10	0.40	0.70	0.38	0.40	-0.15	-0.35	-0.34	-0.35	-0.24	0.13	0.72	0.00	0.07	0.88	1.00

Valor crítico
P ≤ 0.05 0.01 0.001
0.66 0.79 0.89

3. Efecto del ácido salicílico en las simbiosis *Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium tropici* y *Medicago sativa*-*Sinorhizobium meliloti* en estrés salino

Se estudia el efecto de la aplicación de ácido salicílico exógeno en el crecimiento, fijación de nitrógeno, metabolismo oxidativo nodular, y contenido endógeno de ácido salicílico, ácido abscísico y poliaminas en condiciones de estrés salino, en dos simbiosis: *P. vulgaris*-*R. tropici* (nódulos determinados) y *M. sativa*-*S. meliloti* (nódulos indeterminados).

Las plantas de judía inoculadas con *R. tropici* se trataron con AS (0, 0.1 y 0.5 mM) a los 23 días de cultivo (crecimiento vegetativo), 2 días después se retira y se aplica el NaCl (0 y 100 mM) que se mantiene hasta la primera cosecha (inicio de floración día 28) y la segunda (plena floración día 31).

Las plantas de alfalfa inoculadas con *S. meliloti* se trataron con AS (0, 0.1 y 0.5 mM) a los 49 días de cultivo (crecimiento vegetativo), 2 días después se retira y se aplica el NaCl (0 y 200 mM) que se mantiene hasta la primera cosecha (inicio de floración día 56) y la segunda (plena floración día 62).

3.1. Experimento con *Phaseolus vulgaris*

3.1.1. Análisis del crecimiento

Los parámetros relacionados con el crecimiento de plantas de judía se detallan en la figura 3.1: peso seco de planta, peso seco de parte aérea, peso seco de raíz y relación raíz/parte aérea. Los datos numéricos y el análisis de la varianza se muestran en las tablas del apéndice A 3.1 y A 3.2.

La aplicación exógena de AS reduce el **peso seco de planta** en un 20% con ambas dosis de AS al inicio de floración, y del 30% en plena floración. El estrés salino también afecta drásticamente al crecimiento con reducciones del 30-40%. Sin embargo, en las plantas tratadas con 0.1 mM de AS y 100 mM de NaCl la disminución del PSP es del 22%.

En general, la respuesta del **peso seco de parte aérea y raíz** es similar al del PSP, aunque el PSR de plantas con AS en la segunda recolecta muestran un crecimiento menor que el de raíces de plantas con NaCl, y como consecuencia la **relación raíz/parte aérea** disminuye con el AS, así con la dosis 0.5 mM en la primera cosecha la reducción es del 60% y en la segunda del 25%.

El análisis de la varianza de los parámetros relacionados con el crecimiento (Tabla A 3.2), indica que la fuente de variación para el PSP y el PSPA es la salinidad (65%), mientras que PSR y la RPA es el tratamiento con AS (60%).

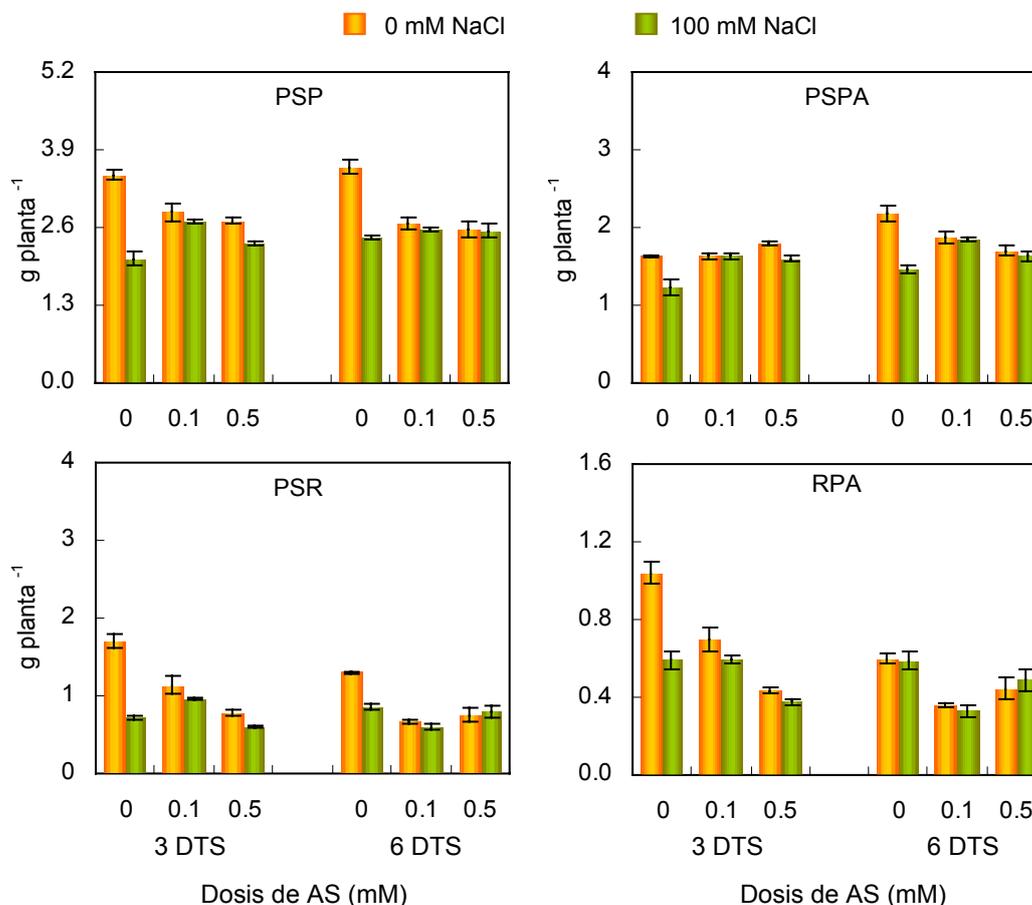


Figura 3.1. Peso seco de planta (PSP), peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de raíz (PSR) y relación raíz/parte aérea (RPA) de plantas de *P. vulgaris* tratadas con diferentes dosis de AS (0, 0.1, 0.5 mM) y NaCl (0, 100 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=10) con el error estándar.

3.1.2. Fijación de nitrógeno

Se han evaluado distintos parámetros de fijación de nitrógeno: actividad nitrogenasa aparente, actividad nitrogenasa total, tasa de fijación de nitrógeno y peso seco de nódulos (Fig. 3.2). Los datos numéricos y estudio de la varianza se recogen en las tablas de A 3.3 y A 3.4 del apéndice.

La **actividad nitrogenasa aparente** al inicio de floración se reduce entre un 55-65% tanto con el AS como con el NaCl, sin embargo se alcanza la máxima actividad (90%) en los nódulos de las plantas tratadas con 0.5 mM de AS y NaCl. En general en plena floración se detecta una disminución acentuada de la ANA respecto a la cosecha anterior, que en nódulos control es del 70%.

El tratamiento con AS induce cambios significativos en la **actividad nitrogenasa total y en la tasa de fijación de nitrógeno** con 0.5 mM se produce una disminución del 52% en la ANT y del 44% en la TFN a los 3 DTS y del 25-35% en ambos parámetros a los 6 DTS (Fig. 3.2). La ANT y TFN de nódulos de plantas tratadas con NaCl también se ha detectado un inhibición del 40% (ANT) y del 30% (TFN) a los 3 DTS, sin embargo cuando las plantas fueron previamente tratadas con 0.1 mM de AS en sus nódulos la reducción causada en ambos parámetros por la salinidad sólo alcanza el 35% y el 15% respectivamente. Se evidencia que los nódulos procedentes de plantas con 0.5 mM de AS y NaCl, muestran una fijación de nitrógeno reducida, por lo que la dosis de AS mayor podría provocar una deficiencia de nitrógeno en la planta. La actividad nitrogenasa aparente y total así como la tasa de fijación de nitrógeno se correlacionan significativamente de forma positiva ($P \leq 0.05$) con los parámetros de crecimiento (tabla 3.1).

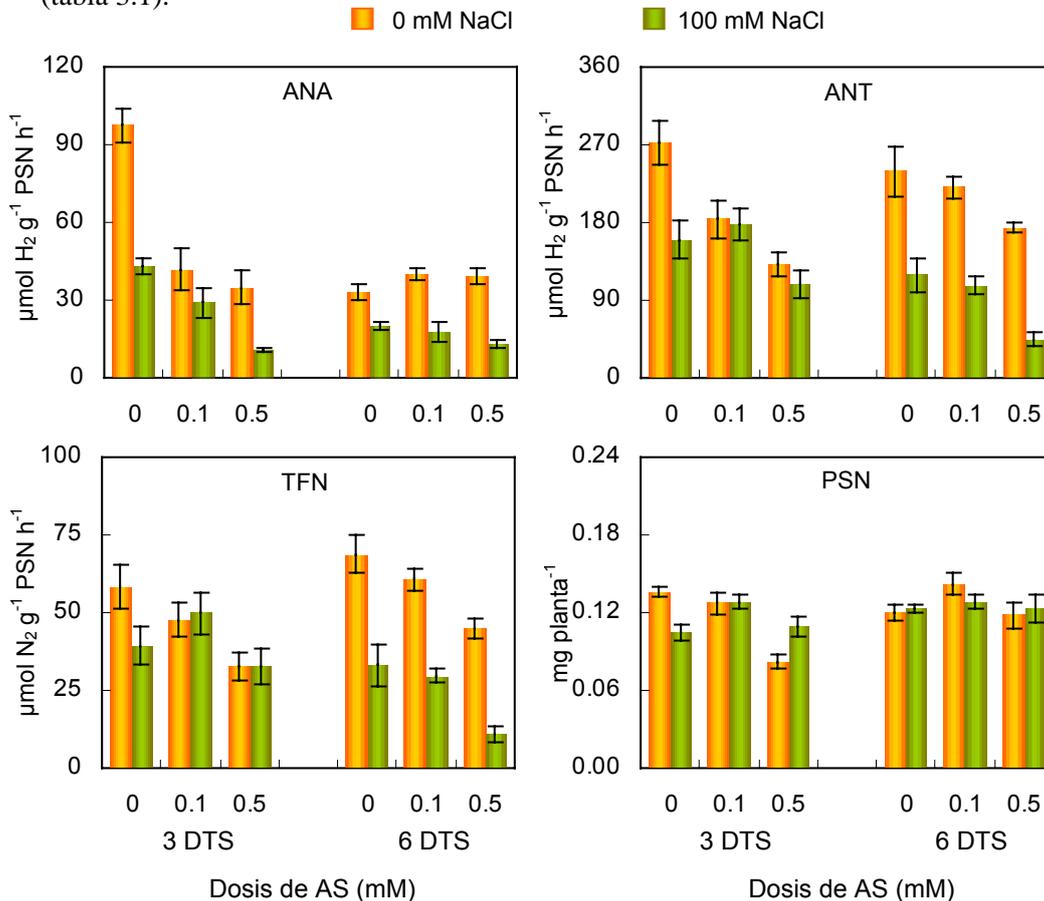


Figura 3.2. Actividad nitrogenasa aparente (ANA), actividad nitrogenasa total (ANT), tasa de fijación de nitrógeno (TFN) y peso seco de nódulo (PSN) de plantas de *P. vulgaris* tratadas con diferentes dosis de AS (0, 0.1, 0.5 mM) y NaCl (0, 100 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=10) con el error estándar.

El **peso seco de nódulo** disminuye con la sal un 22% a los 3 DTS, mientras que en las plantas tratadas con AS (0.1 mM) y NaCl no se observan cambios significativos. En el segundo muestreo sólo se observa un aumento del PSN en las plantas tratadas con 0.1 mM de AS. El **peso normalizado normalizado** en la primera cosecha se reduce con el AS, pero en la segunda incrementa, mientras que con el estrés salino incrementa en los dos muestreos (Tabla A 3.3 del apéndice).

3.1.3. Actividad aldehído oxidasa

En la figura 3.3 se observa la actividad de la enzima **aldehído oxidasa** por tinción en geles de poliacrilamida, y se aprecia que en **hoja** presenta tres isoformas, siendo más activa la AAO3, sin embargo en **nódulo** sólo se detecta una. La actividad AAO foliar incrementa con el tiempo de experimentación, mientras que la nodular disminuye. En hoja, tanto el AS como el NaCl estimulan la actividad de la proteína AAO en el primer muestreo, y la inhiben (15%) en el segundo. La AAO del nódulo disminuye con el AS (29%) y el estrés salino (41%) a los 3 DTS.

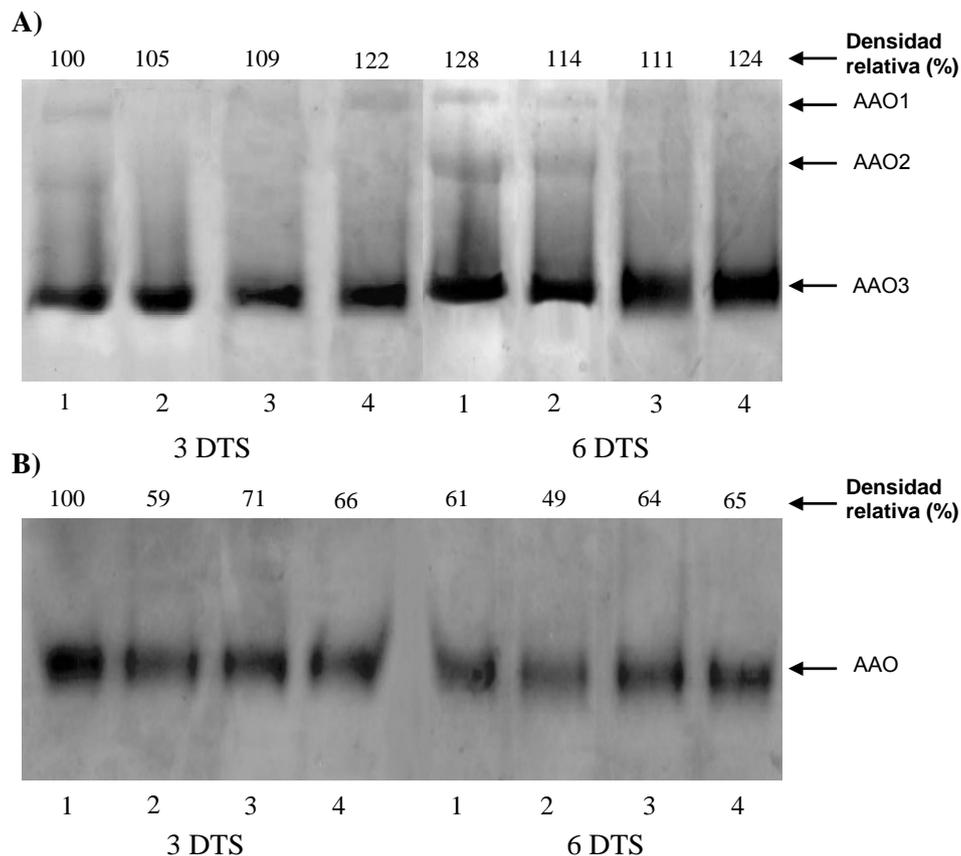


Figura 3.3. Patrón de bandas de actividad aldehído oxidasa en hoja (**A**) y nódulo (**B**) de *P. vulgaris* en gel nativo, detectada con el sustrato indol-3-aldehído. 1 (control), 2 (100 mM NaCl), 3 (0.5 mM AS) y 4 (0.5 mM AS + 100 mM NaCl). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. El zimograma representa una de las tres repeticiones que mostraron resultados similares.

3.1.4. Actividades enzimáticas antioxidantes

En las figuras 3.4 y 3.5 se muestran las actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo oxidativo nodular: superóxido dismutasa, catalasa, guaiacol peroxidasa, ascorbato peroxidasa, monodehidroascorbato reductasa, glutatión reductasa y dehidroascorbato reductasa. En el apéndice se recogen los datos numéricos y el análisis de la varianza de estas determinaciones, así como los datos numéricos y estadísticos expresados por peso fresco (Tablas de la A 3.5 a la A 3.12 del apéndice).

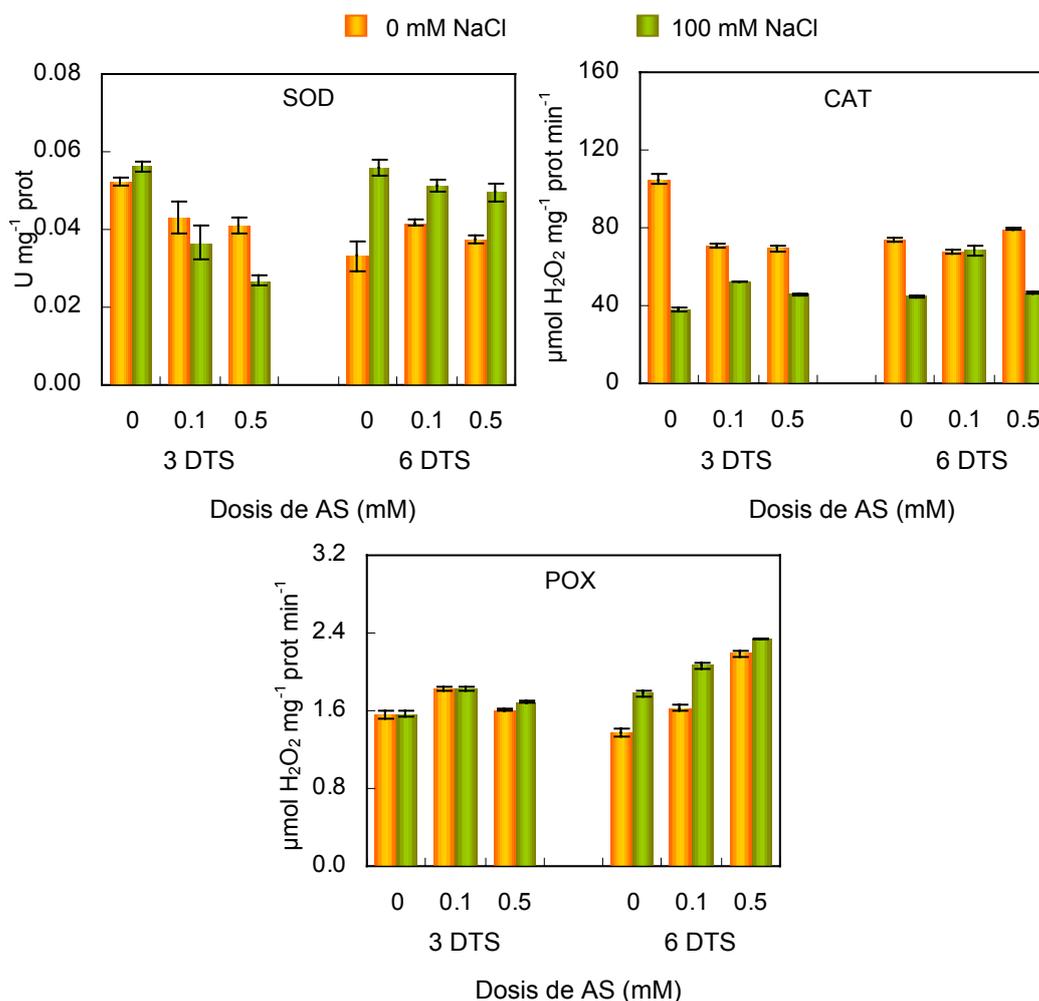


Figura 3.4. Actividades enzimáticas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y guaiacol peroxidasa (POX) en nódulo de plantas de *P. vulgaris* tratadas con diferentes dosis de AS (0, 0.1, 0.5 mM) y NaCl (0, 100 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

En la actividad **superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa** se observa que el tratamiento de AS en la primera recolecta provoca una inhibición de SOD y CAT proporcional a la concentración de AS aplicada: con 0.5 mM de AS la reducción es del 20% en la actividad SOD y del 40% en la CAT, mientras que la POX se estimula (Fig. 3.4). En plena floración los nódulos de plantas tratadas con AS muestran: un incremento de la actividad SOD y de la POX y no cambia significativamente la CAT.

En NaCl favoreció el aumento de la actividad nodular SOD y POX en ambos muestreos, encontrándose las mayores diferencias a los 6 DTS, puesto que la SOD aumentó un 40% y la POX un 25%. La actividad CAT se reduce un 60% (3 DTS) y un 40% (6 DTS). El tratamiento combinado de AS y NaCl condicionó en los nódulos una actividad SOD menor y una mayor CAT y POX que la detectada en nódulos de plantas con sal, alcanzándose un incremento del 40% en la actividad POX en la segunda recolecta con 0.5 mM de AS y 100 mM de NaCl. Destacar que es que entre las dos cosechas disminuyen las tres actividades SOD (37%), CAT (30%) y POX (12%).

En el diagrama de barras de la figura 3.5 se representan las actividades enzimáticas del **ciclo ascorbato-glutation** en nódulo. Se observa que la **ascorbato peroxidasa** disminuye con el AS, en la primera recolecta es del 12% con 0.1 mM de AS, y del 50% con 0.5 mM, además también se inhibe con el estrés salino en un 30% en la primera recolecta y un 18% en la segunda. Debido a esta respuesta de la APX, los nódulos de plantas tratadas con 0.5 mM de AS y NaCl son los que menor actividad enzimática presentan en ambos muestreos. a respuesta de la actividad **monodehidroascorbato reductasa** nodular ante el AS es distinta según la dosis, con 0.1 mM se reduce un 24% y con 0.5 mM aumentó un 15% a los 3 DTS, mientras que el NaCl favorece una caída del 20% a los 3 DTS y a los 6 DTS la actividad se ha recuperado, detectándose similar a la de nódulos control.

Las enzimas **glutation reductasa y dehidroascorbato reductasa**, encargadas de regenerar el ascorbato reducido, se estimulan en presencia de AS y NaCl. La GR incrementó al inicio de floración proporcional a la dosis de AS, sin embargo la actividad máxima se detecta en nódulos de plantas tratadas con AS y NaCl, superando en un 30% al control. La actividad nodular DHAR de plantas con AS incrementa entre el 10-20% al inicio de floración, y con NaCl en más del doble. En los nódulos de plantas tratadas con AS y NaCl se detecta menos actividad DHAR que en los procedentes de plantas con NaCl en la primera recolecta, sin embargo en la segunda con 0.1 mM de AS y 100 mM de NaCl se registra un aumento del 64%. Cuando se observa la actividad APX, MDHAR, GR y DHAR de nódulos de plantas control, se evidencia una disminución entre inicio de floración (3 DTS) y plena floración (6 DTS).

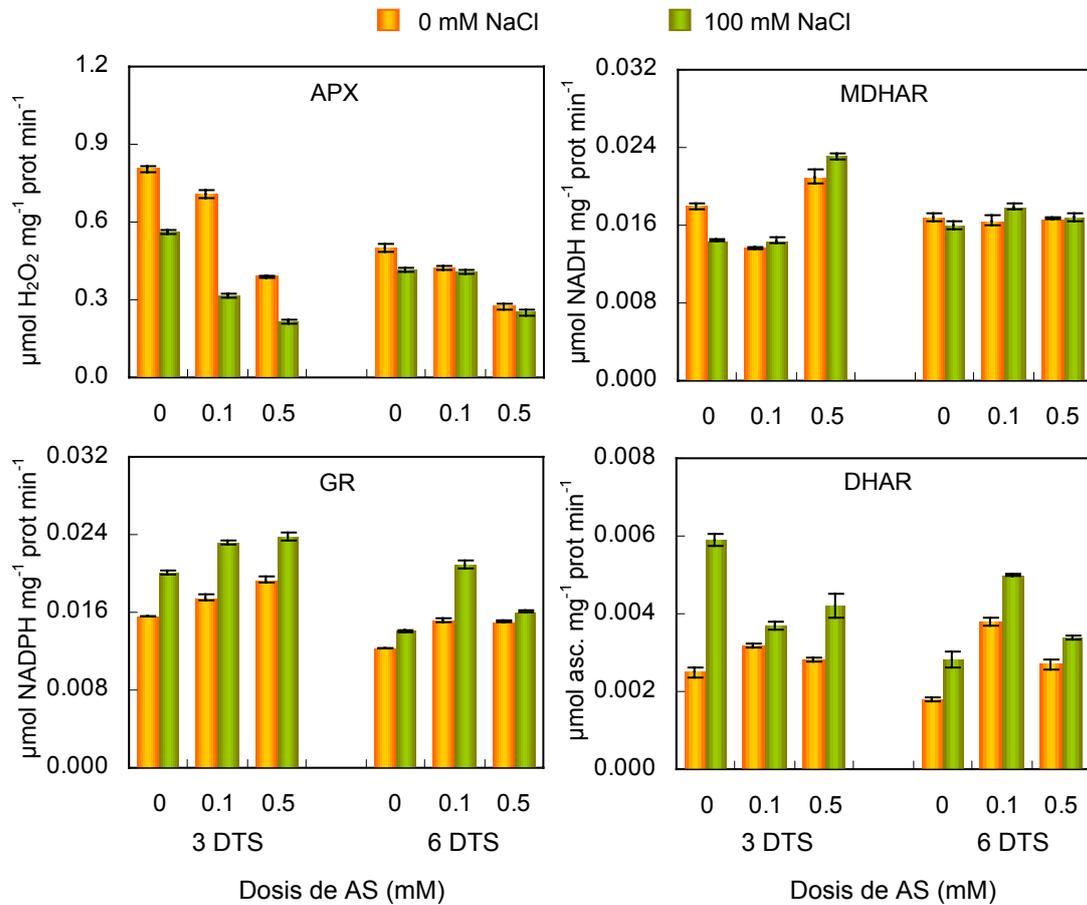


Figura 3.5. Actividades enzimáticas ascorbato peroxidasa (APX), monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), glutation reductasa (GR) y dehidroascorbato reductasa (DHAR) en nódulo de plantas de *P. vulgaris* tratadas con diferentes dosis de AS (0, 0.1, 0.5 mM) y NaCl (0, 100 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

El análisis de varianza señala que el 75% de la variabilidad detectada en la actividad GR se debe al tiempo de experimentación, y en la APX a los tratamientos individualizados de AS y NaCl (tabla A 3.12). La actividad CAT y APX se correlacionan positiva y significativamente con el crecimiento de la planta y el proceso de fijación de nitrógeno, mientras que DHAR muestra una correlación negativa con el PSP ($r = -0.78$) (tabla 3.1).

3.1.5. Actividad lipoxigenasa

En la figura 3.6 se muestra la actividad lipoxigenasa, responsable de la oxidación de ácidos grasos insaturados y formación de hidroperóxidos, en nódulos procedentes de la simbiosis estudiada. El análisis de la varianza junto con los datos numéricos se presentan en las tablas A 3.5 y A 3.6 del apéndice.

El tratamiento con AS provoca una disminución de la actividad **lipoxigenasa** en inicio y plena floración, con 0.5 mM de AS hay una reducción del 25% en ambas cosechas. La salinidad induce un incremento del 15% en la primera recolecta y del 35% en la segunda. El 50% de la variabilidad observada se debe al efecto de la sal, y el 20% al tratamiento con AS según el análisis de varianza expuesto en la tabla A 3.8 del apéndice.

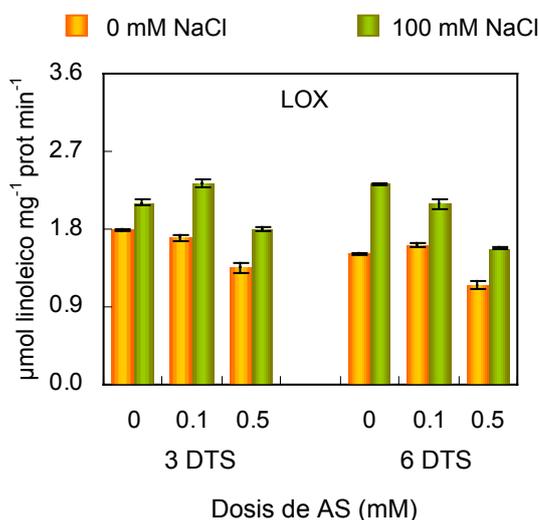


Figura 3.6. Actividad enzimática lipoxigenasa (LOX) en nódulo de plantas de *P. vulgaris* tratadas con diferentes dosis de AS (0, 0.1, 0.5 mM) y NaCl (0, 100 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

3.1.6. Metabolitos antioxidantes

En las figuras 3.7 y 3.8 se expone el contenido de las distintas formas de ascorbato y glutatión (reducido y oxidado), total y la relación entre oxidado y reducido en nódulo de *P. vulgaris*. Los datos numéricos correspondientes a las determinaciones junto con el análisis de varianza se recogen en las tablas del apéndice de la A 3.13 a la 3.16.

El contenido de **ascorbato reducido** en general disminuye con el AS, aunque en la primera recolecta con 0.1 mM de AS aumenta un 15%. La salinidad también reduce este parámetro en un 10% en los dos muestreos realizados.

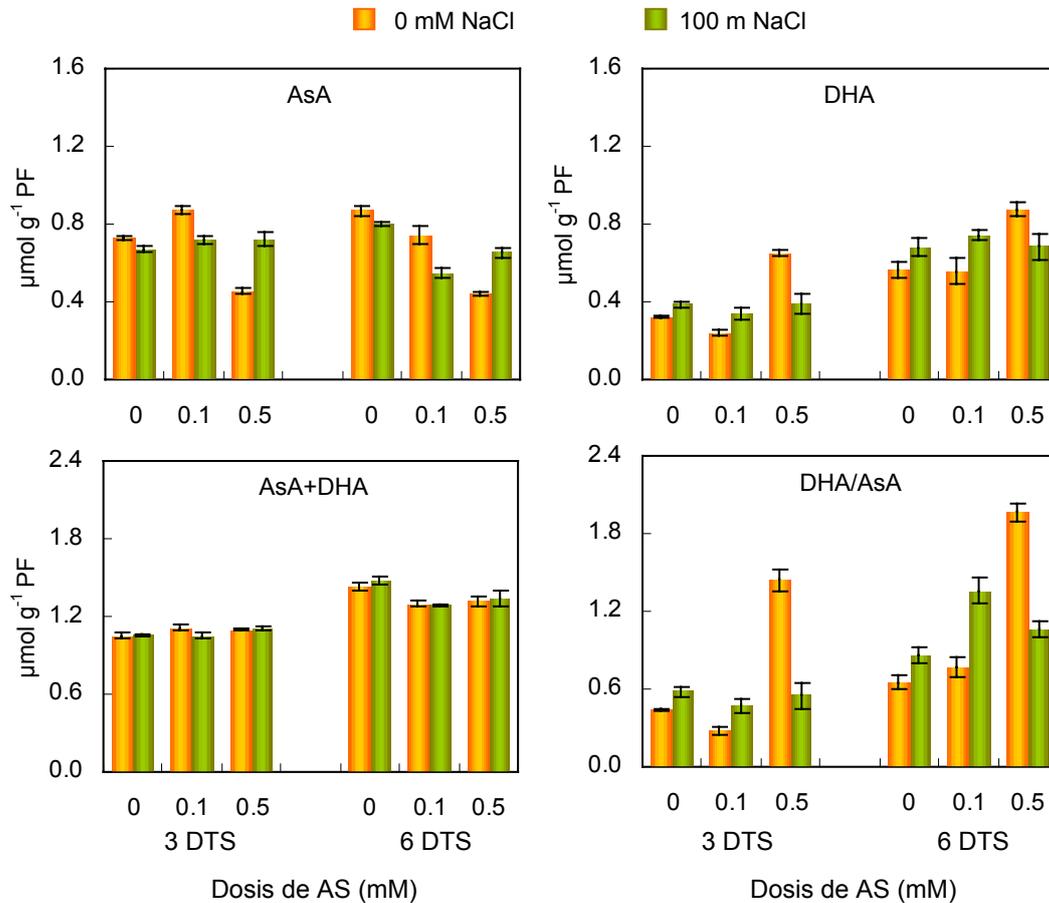


Figura 3.7. Contenido de ascorbato reducido (AsA), oxidado (DHA), total (AsA+DHA) y relación oxidado/reducido (DHA/AsA) en nódulo de plantas de *P. vulgaris* tratadas con diferentes dosis de AS (0, 0.1, 0.5 mM) y NaCl (0, 100 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

El contenido de **ascorbato oxidado** aumenta con el estrés salino en nódulos de plantas con y sin AS, aunque el valor más elevado se obtienen en los nódulos con 0.5 mM de AS y sin NaCl, cuyo valor se duplica a los 3 DTS y aumenta un 35% a los 6 DTS. Indicar que los nódulos acumulan más ascorbato reducido que oxidado tanto en condiciones control como en estrés salino, sin embargo con AS 0.5 mM esta tendencia se revierte acumulándose más de la forma oxidada.

El **ascorbato total** aumentó en todos los tratamientos en plena floración (Fig. 3.7), no obstante en esta recolecta las plantas con AS acumulan menos ascorbato total. La relación entre ascorbato **oxidado/reducido** incrementa drásticamente con 0.5 mM de AS, multiplicándose por 3 en ambas recolectas

Resultados

respecto al control, la salinidad también produce un aumento, pero no tan acentuado como el anterior.

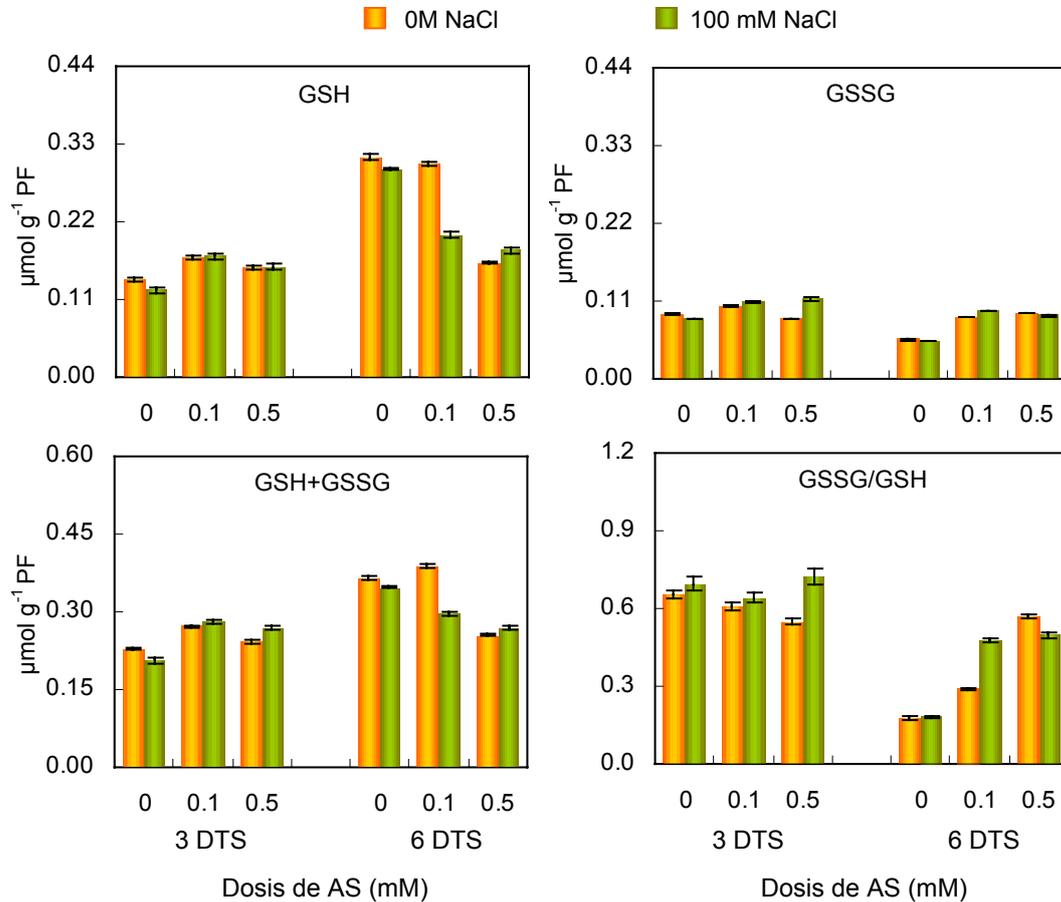


Figura 3.8. Contenido de glutatión reducido (GSH), oxidado (GSSG), total (GSH+GSSG) y relación oxidado/reducido (GSSG/GSH) en nódulo de plantas de *P. vulgaris* tratadas con diferentes dosis de AS (0, 0.1, 0.5 mM) y NaCl (0, 100 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

En la figura 3.8 se observa que el **glutatión reducido** aumenta en nódulos de plantas con AS en la primera recolecta, y en la segunda hay una reducción del 50% con 0.5 mM, mientras que con NaCl es del 10% en ambas cosechas. Es destacable el incremento del GSH entre inicio y plena floración, duplicándose en los nódulos de plantas control y salinizadas a los 6 DTS, mientras que en los de plantas con 0.5 mM de AS sólo aumenta un 10%. El tratamiento con AS, en general estimula la acumulación de **glutatión oxidado**, en plena floración el GSSG aumentó un 37% y un 40% con 0.1 y 0.5 mM de AS respectivamente. Además los

nódulos de plantas tratadas con AS y NaCl son los que mayor contenido de GSSG muestran, puesto que en ausencia de AS la salinidad reduce el GSSG.

El **glutation total** con el AS incrementa entre un 5-20% en el primer muestreo, y en el segundo un 5% con 0.1 mM, mientras que con 0.5 se reduce un 30%, la salinidad también disminuye este parámetro en un 10% en un ambos muestreos (Fig. 3.8). Los cambios que se producen en la **relación oxidado/reducido** dependen del tiempo de experimentación, mientras que a los 3 DTS disminuye con el AS, a los 6 DTS incrementa un 40% con 0.1 mM, y un 70% con 0.5 mM.

Al comparar el contenido de la forma reducida y oxidada del glutatión, se observa la misma respuesta que para las mismas formas del ascorbato, es decir se acumula en mayor cuantía en el nódulo las formas reducidas, por lo que se evidencia que este órgano prioritariamente acumula dichas formas de ambas moléculas antioxidantes. El análisis de varianza de la tabla A 3.16 del apéndice indica que el 60% de la variabilidad detectada en la relación GSSG/GSH se debe al tiempo de experimentación. El contenido nodular de ascorbato total muestra una correlación positiva significativamente ($P \leq 0.01$) con el glutatión total y reducido de nódulo, y negativa con el glutatión oxidado ($r = -0.69$) y relación oxidado/reducido ($r = -0.88$) de nódulo (tabla 3.2).

3.1.7. Otros metabolitos

En la figura 3.9 se muestra el contenido en hoja y nódulo de aminoácidos libres, prolina y azúcares solubles totales. Los datos numéricos y el correspondiente análisis de la varianza para éstas determinaciones se recogen en las tablas de la A 3.17 a la A 3.20 del apéndice.

El contenido de **aminoácidos en hoja** aumenta un 7% con 0.5 mM de AS en el primer muestreo y en el segundo disminuye un 7% respecto al control. Lo mismo se detecta en hojas de plantas con NaCl que incrementan (17%) en la primera y disminuyen (32%) en la segunda. Curiosamente la acumulación de Aa mayor en hoja se obtiene en plena floración en plantas con 0.1 mM de AS y NaCl del 27%. El contenido de **aminoácidos en nódulo** aumenta con 0.5 mM de AS un 22% en inicio de floración y se reduce un 30% en floración. El estrés salino provoca el decremento en los Aa en nódulo en ambas cosechas. Se puede establecer que los Aa se acumulan más en plena floración que al inicio en ambos órganos, y preferentemente es en nódulo, puesto que duplican o triplican los valores de hoja. El análisis de varianza determina que la variabilidad detectada en los datos del parámetro estudiado, se debe un 76% al tiempo de experimentación (tabla a 3.20). El contenido de Aa en nódulo se correlaciona negativamente ($P \leq 0.05$) con la actividad GR, DHAR y con la relación glutatión oxidado/reducido

Resultados

nodular, y positivamente con el contenido de ascorbato total de nódulo ($r= 0.91$) y el glutatión total y reducido ($r= 0.86$) (tabla 3.3).

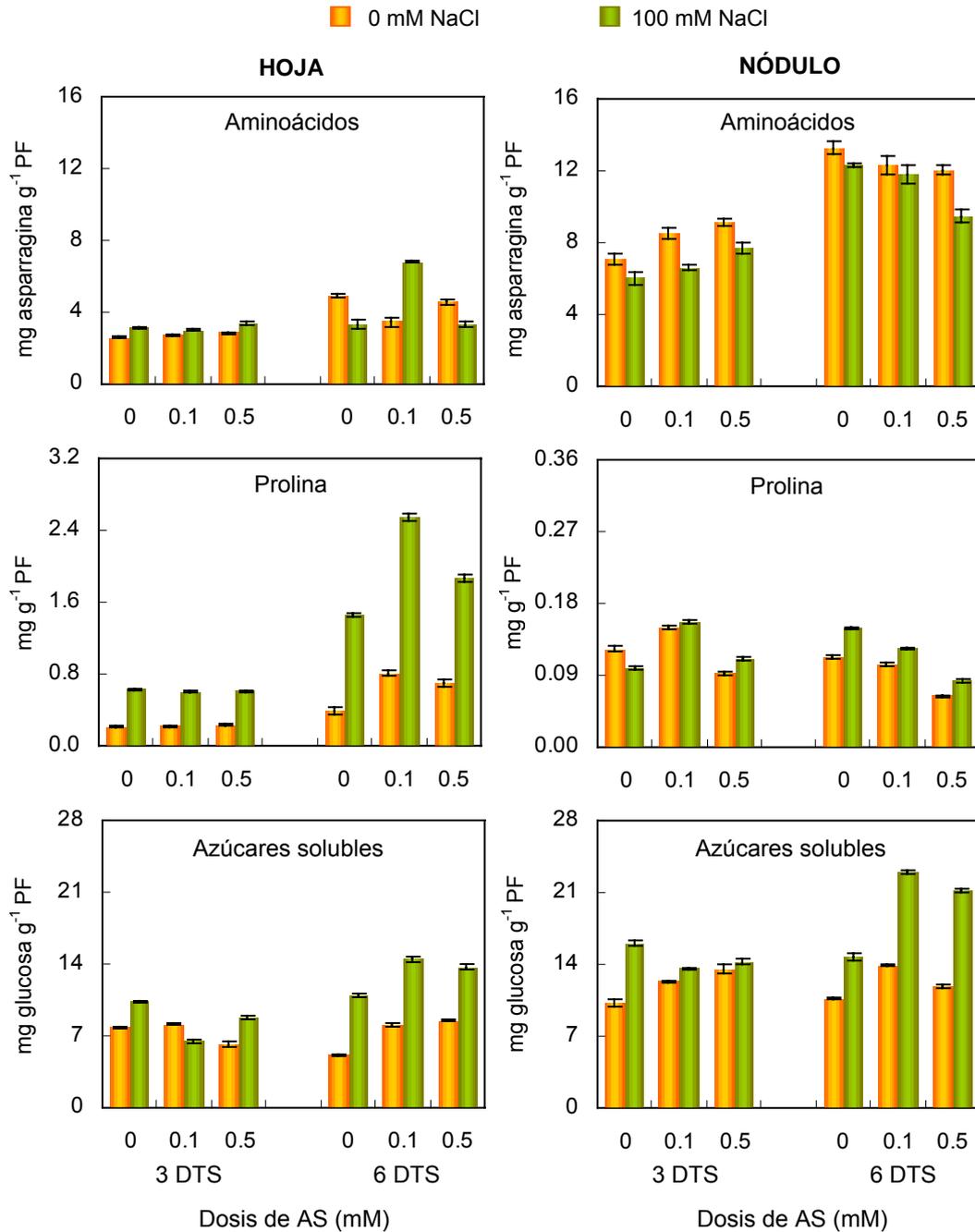


Figura 3.9. Contenido de aminoácidos, prolina y azúcares solubles totales en hoja y nódulo de plantas de *P. vulgaris* tratadas con diferentes dosis de AS (0, 0.1, 0.5 mM) y NaCl (0, 100 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

En el diagrama de barras de la figura 3.9 correspondiente al contenido de **prolina en hoja**, se observa que el AS estimula la acumulación de este aminoácido en plena floración, con un aumento del 50%. El estrés salino provoca un incremento drástico de la prolina foliar (70%) en el primer muestreo, y superior en el segundo. La cantidad de prolina en hoja con AS y NaCl alcanza valores elevados que oscilan entre el 80-85% del detectado en plantas control. El contenido de **prolina en nódulos** de plantas con AS es menor, aunque con 0.1 mM en la primera recolecta incrementa respecto al control. La salinidad favorece la reducción del 20% de la prolina nodular a los 3 días de aplicar el NaCl, sin embargo a los 6 DTS incrementa un 25%. El contenido de prolina nodular se correlaciona negativamente con la actividad POX ($r = -0.79$) y positivamente con el contenido de ascorbato reducido de nódulo ($r = 0.71$) (tabla 3.3).

La respuesta del **contenido de azúcares solubles totales en hoja y nódulo** al AS y al NaCl es similar. El AS estimuló la acumulación de Ast en hoja y nódulo, con 0.5 mM en plena floración el incremento fue del 40% en hoja, y del 10% en nódulo. El estrés salino también aumenta los Ast en ambos órganos, en la segunda cosecha se duplica en hoja, y en nódulo aumenta un 30%. El contenido de Ast mayor en ambos órganos se percibe en la segunda recolecta en plantas tratadas con AS y NaCl, con incrementos del 60-65% en hoja, y del 50-55% en nódulo. Señalar que de los tres osmolitos estudiados en respuesta al estrés salino, la prolina se acumula preferentemente en hoja, mientras que los aminoácidos y los azúcares lo hacen en nódulo. Se establece una correlación negativa con los parámetros de fijación de nitrógeno (ANT y TFN) y el contenido de azúcares solubles totales de nódulo ($r = -0.83$) (tabla 3.1) y hoja ($r = -0.70$) (tabla 3.2), también el contenido foliar de azúcares totales muestra una correlación negativa con la actividad CAT nodular ($r = -0.76$) (tabla 3.2).

3.1.8. Peroxidación de lípidos y peróxido de hidrógeno

La peroxidación de lípidos y el contenido de peróxido de hidrógeno en hoja y nódulo de plantas de *P. vulgaris* se muestran en la figura 3.10. Los datos numéricos correspondientes a estas determinaciones y el análisis de la varianza se recogen en las tablas A 3.21 y 3.22 del apéndice.

En el diagrama de barras correspondiente a la **peroxidación lipídica de hoja** se detecta que el AS, disminuye este proceso en hoja, mientras que la salinidad induce el aumento del 25-35% en las dos recolectas, siendo más acentuado en la segunda. En estrés salino el incremento del contenido de TBARS en hoja, sin embargo con la aplicación previa de AS este efecto del NaCl es menos acentuado, así en la primera recolecta con el tratamiento 0.5 mM de AS y NaCl la peroxidación lipídica disminuye un 70% respecto a la de hojas de plantas con sal. La **peroxidación lipídica de nódulo** con la salinidad es similar a la descrita en

Resultados

hoja, sin embargo con el AS aumenta drásticamente en ambos muestreos, así en el segundo con 0.1 mM de AS es del 22%, y con 0.5 mM del 50%. La peroxidación lipídica es más intensa en nódulo que en hoja, alcanzando en la primera recolecta los valores más altos. La peroxidación lipídica foliar se correlaciona positivamente con la actividad SOD nodular ($r= 0.86$) y negativamente con la MDHAR de nódulo ($r= -0.78$) (tabla 3.2). La peroxidación lipídica nodular se correlaciona significativamente de forma negativa con el contenido de ascorbato y glutatión total ($r= -0.80$ y $r= -0.92$ respectivamente), el glutatión reducido ($r= -0.93$) y los aminoácidos de nódulo ($r= -0.77$), y positivamente con la relación glutatión oxidado/reducido ($r= 0.85$) (tabla 3.3).

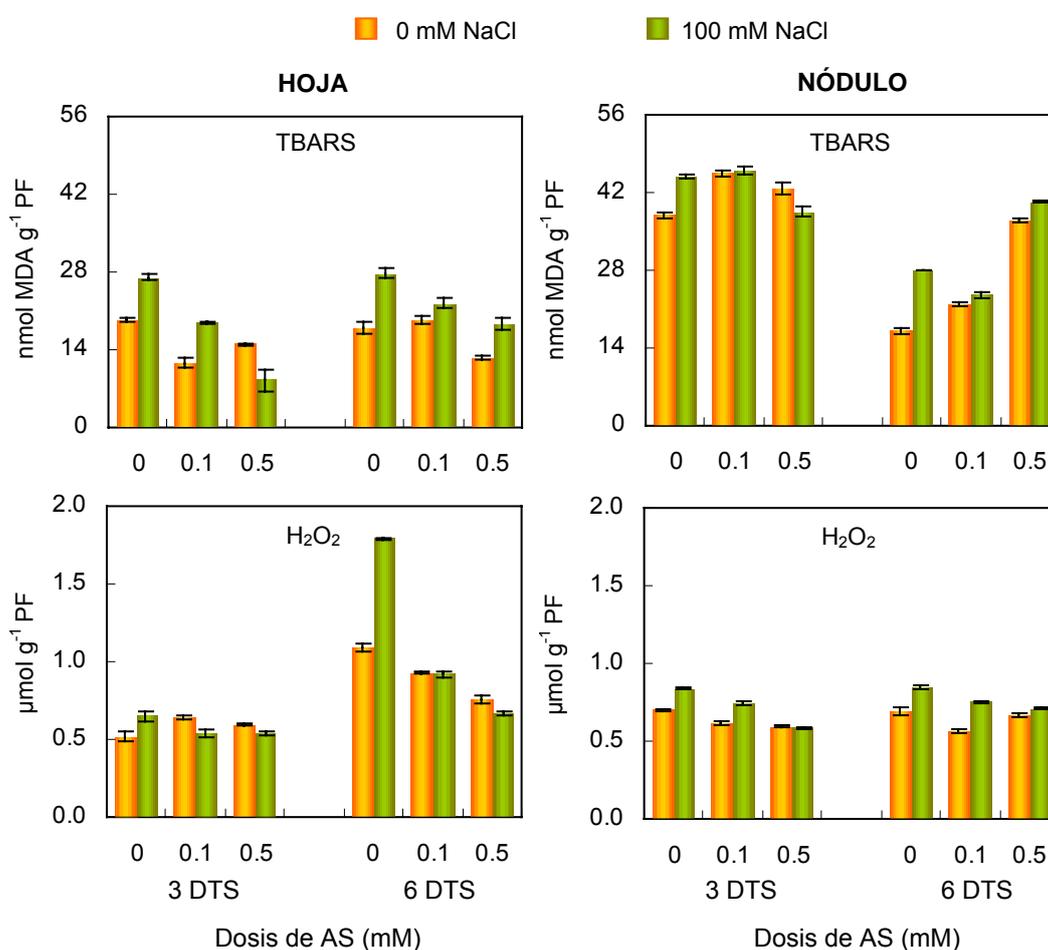


Figura 3.10. Contenido de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) y de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en hoja y nódulo de plantas de *P. vulgaris* tratadas con diferentes dosis de AS (0, 0.1, 0.5 mM) y NaCl (0, 100 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra ($n=6$) con el error estándar.

En los diagramas de barras de la figura 3.10 correspondiente al **contenido de peróxido de hidrógeno en hoja y nódulo** se manifiesta que el AS provoca una reducción en ambos órganos, mientras que el NaCl induce su acumulación. En plena floración se detecta que: **a)** el tratamiento con AS disminuye el peróxido de hidrógeno en ambos órganos; **b)** el estrés salino lo aumenta en hoja (40%) y en nódulo (20%); **c)** en hoja de plantas previamente tratadas con AS, y posteriormente con NaCl se reduce el H₂O₂ en un 48% y un 63% con 0.1 y 0.5 mM de AS respectivamente, y en nódulo en un 11% y un 16% con estas mismas dosis de AS respecto a las plantas únicamente salinizadas. El peróxido de hidrógeno nodular se correlaciona positivamente con los parámetros de crecimiento y fijación de nitrógeno, así como con la APX de nódulo y negativamente con la GR ($P \leq 0.05$) (tabla 3.1). El contenido de este parámetro en hoja se correlaciona positivamente con el ascorbato y glutatión total ($r = 0.74$ y $r = 0.80$ respectivamente) y glutatión reducido de nódulo ($r = 0.85$), y negativamente con el glutatión oxidado ($r = -0.81$) y la relación glutatión oxidado/reducido ($r = -0.85$) (tabla 3.2).

3.1.9. Ácido salicílico y ácido abscísico endógeno

El contenido de ácido salicílico y ácido abscísico endógeno en hoja y raíz de *P. vulgaris* se representa en la figura 3.11. El estudio estadístico de la varianza y los datos numéricos se recopilan en las tablas A 3.23 y A 3.24 del apéndice.

En hoja y raíz el contenido de **ácido salicílico endógeno libre** aumenta con el tratamiento de AS y NaCl en las dos recolectas, en la segunda en hoja es del 37% y 44% con 0.1 y 0.5 mM de AS respectivamente, y en raíz del 52% y 85% con estas mismas dosis. En este mismo muestreo el estrés salino también incrementó el AS endógeno multiplicándolo por 1.4 en hoja, y por 1.7 en raíz, aunque los valores más elevados se obtienen con 0.5 mM de AS y 100 mM de NaCl, puesto que el nivel de AS endógeno se multiplica por 2.8 en hoja y por 9.5 en raíz. El contenido de AS endógeno es mayor tanto en hoja como en raíz en plena floración. Es interesante comentar la correlación negativa que existe entre el contenido de ácido salicílico endógeno de hoja y el proceso de fijación de nitrógeno (ANT y TFN) ($P \leq 0.05$), y positiva con el contenido de prolina foliar ($r = 0.74$), también el AS endógeno radical se correlaciona con el contenido de prolina foliar ($r = 0.84$) (tabla 3.2).

El diagrama de barras de la figura 3.11 representa el contenido de **ácido abscísico libre endógeno**, en **hoja** refleja una rápida respuesta al tratamiento de AS y NaCl, de forma que en la primera cosecha el ABA se triplica con el AS, y se duplica con el NaCl, mientras que en la segunda se reduce un 75-80% con el AS y el NaCl, respecto al valor detectado en hojas de plantas control. El ABA endógeno en **raíz** no se afecta con la aplicación de AS exógeno al menos a los 3 DTS, sin embargo a los 6 DTS se observa una disminución del 85% respecto al control. El

Resultados

NaCl provoca que el ABA endógeno en raíz aumente un 35% (3 DTS) y se reduzca un 78% (6 DTS). En general el contenido endógeno de ABA es mayor en hoja que en raíz, independientemente del tratamiento aplicado a la planta. El contenido de ABA foliar y radical se correlaciona positivamente ($P \leq 0.05$) con el crecimiento (PSPA) (tabla 3.1).

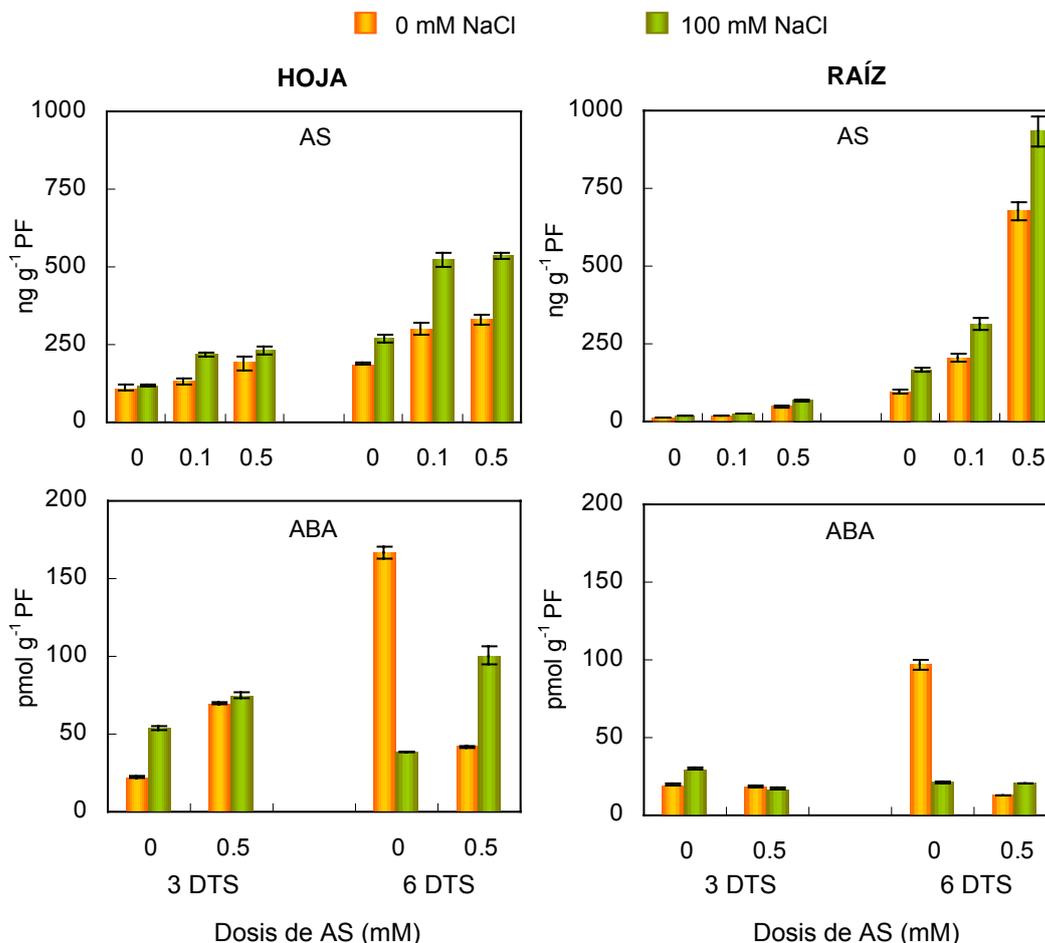


Figura 3.11. Contenido endógeno de ácido salicílico libre (AS) y ácido abscísico libre (ABA) en hoja y raíz de plantas de *P. vulgaris* tratadas con diferentes dosis de AS (0, 0.1, 0.5 mM) y NaCl (0, 100 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

3.1.10. Poliaminas endógenas

El contenido de las poliaminas putrescina, cadaverina, espermidina, espermina y diaminopropano en hoja, raíz y nódulo de plantas de *P. vulgaris* tratadas con AS y NaCl se muestran en las figuras 3.12 y 3.13. Los datos numéricos y el análisis de la varianza correspondiente se recogen en las tablas de la

A 3.25 a la A 3.30 del apéndice. Señalar que no se determinó el contenido de poliaminas en las plantas tratadas con 0.1 mM de AS.

En la figura 3.12 se observa que el AS provoca cambios en el contenido de **putrescina**: **a)** en el primer muestreo se reduce en hoja un 30%, y no inducen cambios significativos en raíz y nódulo; **b)** en el segundo muestreo no se alteran los niveles en hoja, y si disminuyen en un 12% en raíz, y en un 45% en nódulo; **c)** la PUT se acumula principalmente en hoja y nódulo, en los cuales el estrés salino provoca una reducción del contenido de PUT en los dos muestreos realizados; **d)** en raíz la salinidad favorece la acumulación de PUT en el primer muestreo, y en el segundo la reduce un 30% respecto al control.

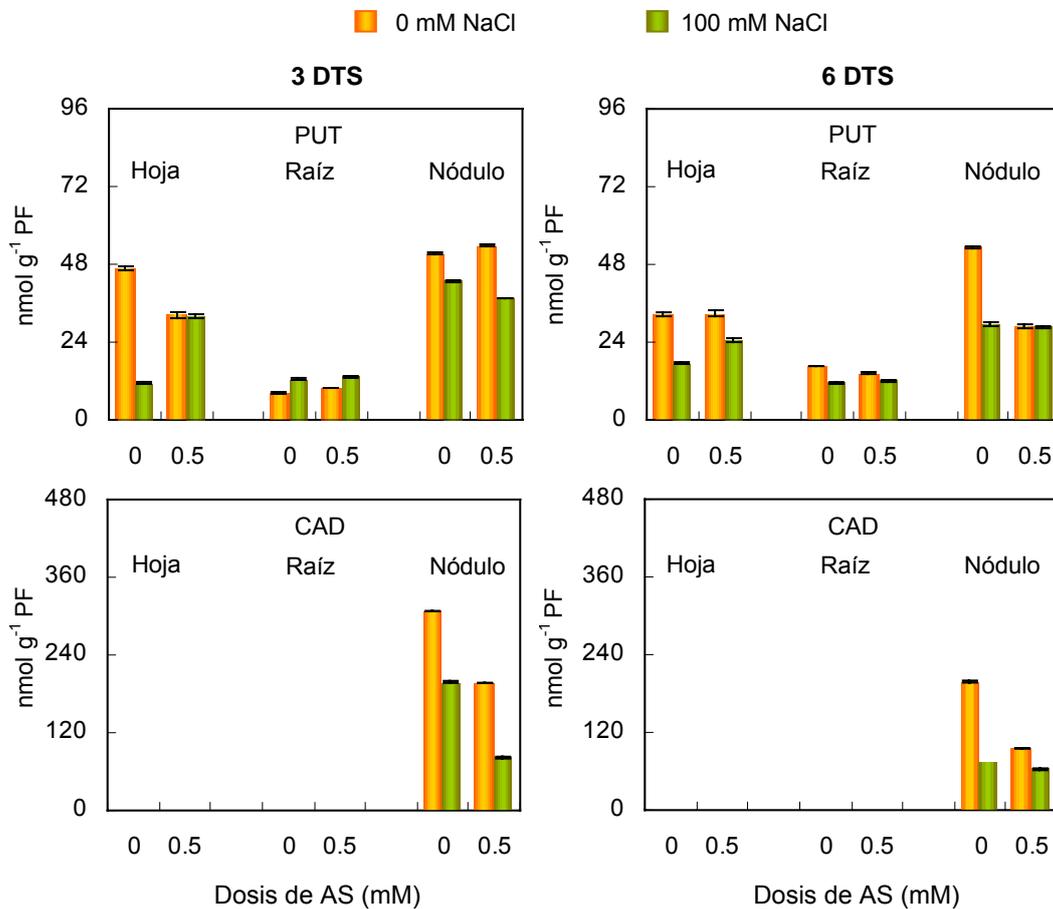


Figura 3.12. Contenido de putrescina (PUT) y cadaverina (CAD) en hoja, raíz y nódulo de plantas de *P. vulgaris* tratadas con diferentes dosis de AS (0, 0.5 mM) y NaCl (0, 100 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

La **cadaverina** no se detecto en hoja y raíz, sólo en nódulo, donde el AS y el NaCl inducen una reducción de su contenido, siendo del 36% en los nódulos de plantas al inicio de floración y del 52% en los de plena floración con el AS exógeno, mientras que el NaCl produce una reducción en el contenido de CAD del 35% y del 62% en el primer y segundo muestreo respectivamente. Los nódulos de plantas tratadas con AS y con NaCl son los que presentan menor contenido de CAD.

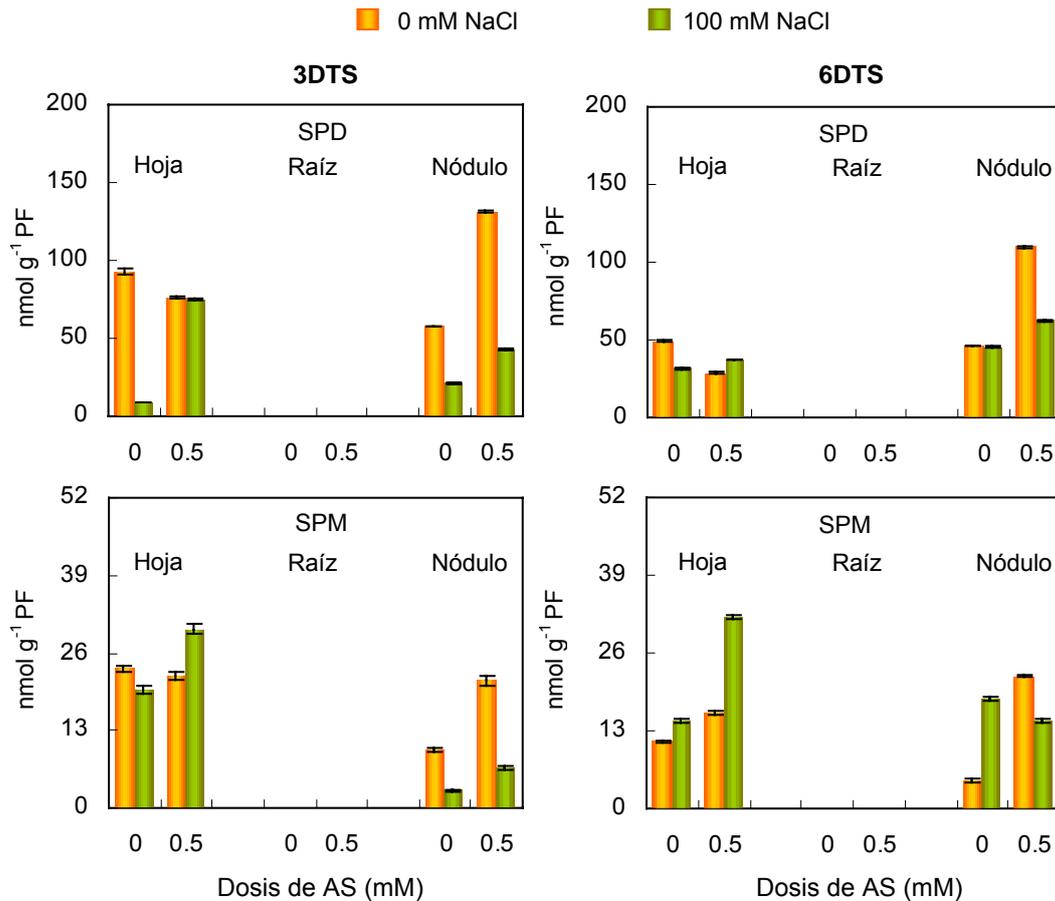


Figura 3.13. Contenido de espermidina (SPD) y espermina (SPM) en hoja, raíz y nódulo de plantas de *P. vulgaris* tratadas con diferentes dosis de AS (0, 0.5 mM) y NaCl (0, 100 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

El contenido de espermidina y espermina se representan en la figura 3.13, y se visualiza que no se detectan en raíz, percibiéndose en hoja y nódulo valores similares. El AS provoca que el contenido de **espermidina en hoja** disminuya un 20% en el primer muestreo, y un 40% en el segundo. En **nódulo** ocurre lo contrario, de forma que incrementa (60%) en los dos muestreos realizados. El

contenido de **espermina en hoja** no cambió significativamente durante la primera recolecta con el AS, mientras que en la segunda la aumentó un 30%. En **nódulo** con el tratamiento de AS se observa un incremento del 55% en la primera recolecta, y de un 80% en la segunda. La SPD y SPM experimentaron cambios con el estrés salino: **a)** en la primera recolecta su contenido disminuye en hoja y nódulo, observándose para la SPD una reducción del 90% en hoja, y del 62% en nódulo, y para la SPM del 15% y del 70% respectivamente en ambos órganos; **b)** en la segunda recolecta la disminución de la SPD de hoja (35%) y nódulo (3%) debido al NaCl es menor, y por el contrario la SPM se estimula multiplicándose por 1.3 en hoja y por 4 en nódulo.

En las plantas que fueron tratadas con AS y NaCl es interesante destacar que: **a)** el contenido de SPD en hoja y nódulo no sufre un descenso tan drástico como el observado en plantas sólo salinizadas; **b)** la SPM de hoja aumenta respecto al control en un 22% en el primer muestreo, y se triplica en el segundo, mientras que en nódulo disminuye (25%) en el primero y aumenta en el segundo (26%). Otro resultado que es importante destacar lo constituye la ausencia de DAP en todos las determinaciones realizadas

Las poliaminas putrescina y cadaverina de nódulo se correlacionan significativamente de forma negativa con el contenido de ácido salicílico endógeno de hoja y raíz ($P \leq 0.05$) (tabla 3.1), además la cadaverina de este órgano muestra una correlación positiva con el crecimiento radical ($r= 0.77$) y con la actividad nitrogenasa aparente y total ($r= 0.88$ y 0.82 respectivamente), y negativa con la actividad peroxidasa ($r= -0.69$) (tabla 3.1). Por otro lado, existe una correlación positiva entre la espermidina foliar y la actividad monodehidroascorbato reductasa ($r= 0.76$) (tabla 3.2). La espermidina nodular se correlaciona negativamente con el contenido de ascorbato reducido ($r= -0.88$) y positiva con la relación ascorbato oxidado/reducido ($r= 0.88$).

3.2. Experimento con *Medicago sativa*

3.2.1. Análisis del crecimiento

El crecimiento expresado como peso seco de planta, peso seco de parte aérea, peso seco de raíz y relación raíz/parte aérea se muestra en la figura 3.14. Los datos numéricos, junto con el correspondiente análisis de varianza se encuentran en las tablas A 3.31 y A 3.32 del apéndice.

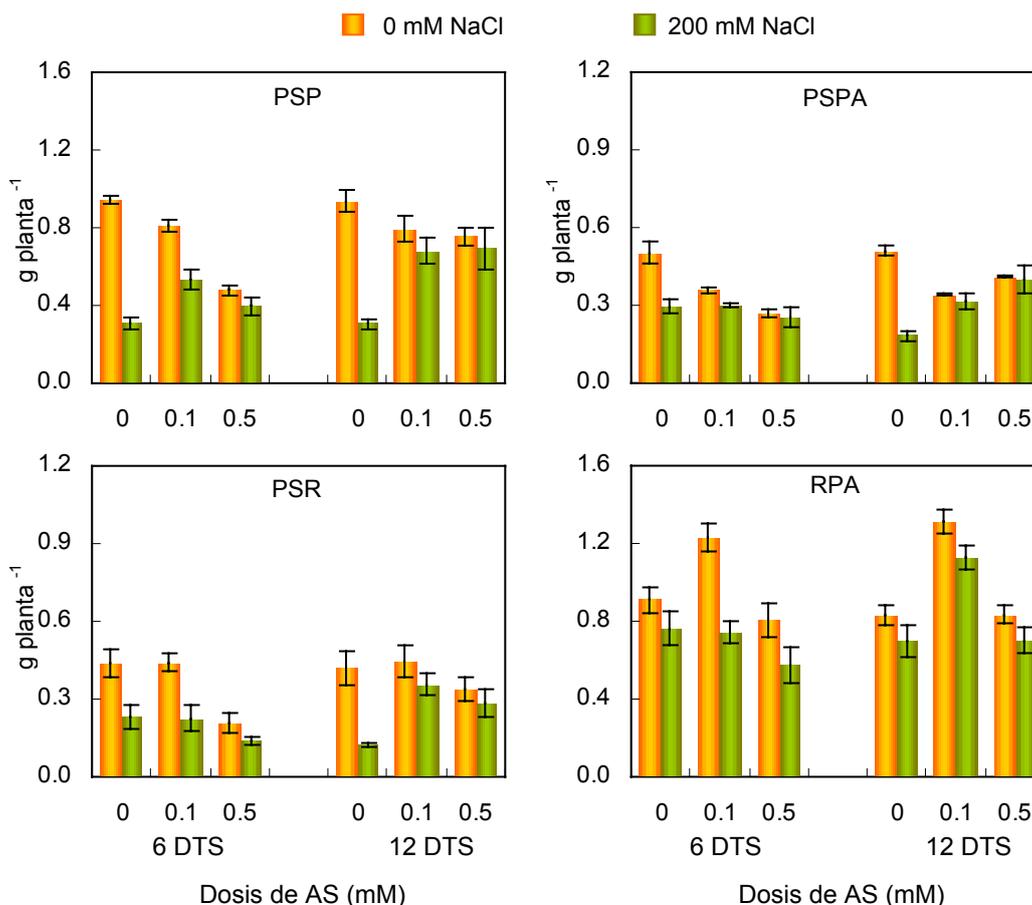


Figura 3.14. Peso seco de planta (PSP), peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de raíz (PSR) y relación raíz/parte aérea (RPA) de plantas de *M. sativa* tratadas con diferentes dosis de AS (0, 0.1, 0.5 mM) y NaCl (0, 200 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=10) con el error estándar.

El **peso seco de planta** disminuye proporcional a la dosis de AS, un 15% con 0.1 mM y un 50% con 0.5 mM en el primer muestreo, y un 15-20% en el segundo con las dos dosis. La salinidad conlleva una reducción del PSP, es más pronunciada que la inducida por AS, alcanzando el 70% tanto en inicio como en

plena floración. Destacar que la drástica disminución del crecimiento provocado por el NaCl se contrarresta con el pretratamiento de AS, produciéndose en el segundo muestreo una disminución del 25%.

El respuesta del **peso seco de parte aérea y raíz** al AS y al NaCl es semejante a la descrita para el PSP en ambos muestreos, aunque 0.1 mM de AS no induce cambios significativos. La **relación raíz/parte aérea** se incrementa con 0.1 mM de AS un 26% a los 6 DTS, y un 36% a los 12 DTS, mientras que 0.5 mM de AS no induce cambios significativos. En general, las plantas con NaCl mostraron una caída en la RPA en todos los tratamientos, siendo menos acusada en las previamente tratadas con 0.1 mM de AS. En el análisis de la varianza de los parámetros de crecimiento (Tabla A 3.32 del apéndice) se observa que la principal fuente de variación para el PSP (40%), el PSPA (26%) y PSR (32%) la constituye la salinidad, mientras que para la RPA (26%) lo es el tratamiento con AS.

3.2.2. Fijación de nitrógeno

Los parámetros relacionados con el proceso de fijación de nitrógeno: actividad nitrogenasa aparente, actividad nitrogenasa total, tasa de fijación de nitrógeno, peso seco de nódulo y peso normalizado de nódulo, junto con el correspondiente análisis de varianza se recogen en las tablas A 3.33 y A 3.34 del apéndice.

En la figura 3.15 se evidencia que la **actividad nitrogenasa aparente** disminuye un 20% con 0.1 mM de AS y un 45% con 0.5 mM al inicio de floración, y con el NaCl un 80%. Sin embargo cuando las plantas con estrés salino son tratadas previamente con AS, la disminución de ANA es de tan sólo un 40%, esta respuesta es similar a la descrita para los parámetros de crecimiento. En la **actividad nitrogenasa total** hay que destacar que 0.1 mM de AS produce un incremento en esta actividad, no presenta diferencias significativas en la primera recolecta, pero en la segunda supera el 45% la actividad detectada en nódulos de plantas control. Con 0.5 mM de AS al inicio de floración se registra un descenso del 45% en la ANT, mientras que en plena floración no hay cambios significativos. El NaCl induce una reducción del 63% en la ANT a los 6 DTS y a los 12 DTS del 50%, sin embargo en las plantas con sal y previamente tratadas con 0.1 mM de AS no presentan una caída tan pronunciada. La **tasa de fijación de nitrógeno** refleja que el AS no induce cambios significativos respecto al control, aunque a los 12 DTS aumenta un 50% con 0.1 mM. La salinidad provoca un descenso de este parámetro del 45-75% en el primer muestreo, y del 70-85% en el segundo.

El **peso seco de nódulo** en la primera cosecha incrementa un 25% con el tratamiento 0.1 mM de AS y con 0.5 mM se reduce un 40%, en la segunda se produce un aumento del peso seco nodular con 0.1 y 0.5 mM de AS. En general, el

PSN disminuye con la salinidad en ambos muestreos, siendo más intensa en los nódulos de plantas no pretratadas con AS. El **peso normalizado de nódulo** (Tabla A 3.33 del apéndice) muestra cierta tendencia a incrementarse con el AS y con el estrés salino en los dos muestreos realizados, registrándose con 0.1 mM de AS los valores mayores.

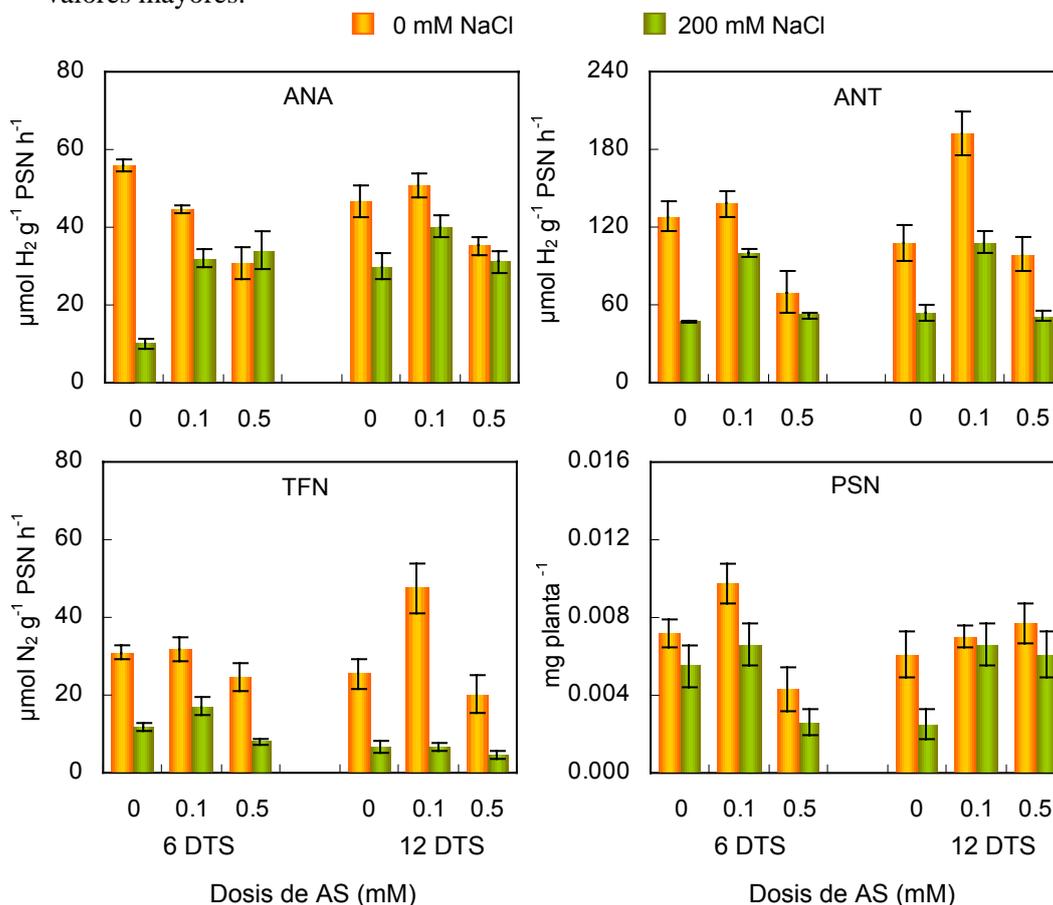


Figura 3.15. Actividad nitrogenasa aparente (ANA), actividad nitrogenasa total (ANT), tasa de fijación de nitrógeno (TFN) y peso seco de nódulo (PSN) de plantas de *M. sativa* tratadas con diferentes dosis de AS (0, 0.1, 0.5 mM) y NaCl (0, 200 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=10) con el error estándar.

3.2.3. Actividad aldehído oxidasa

En la figura 3.16 se muestra en geles de poliacrilamida la tinción por actividad de la enzima **aldehído oxidasa**, presentando dos isoformas en hoja, siendo más activa la AAO2, mientras que en nódulo sólo una. En general, la actividad AAO foliar y nodular disminuye entre inicio y plena floración, sin embargo la isoforma AAO2 de hoja parece que incrementa a los 12 DTS. Tanto el

tratamiento con AS y como el de NaCl inhibieron esta actividad en los dos órganos y en ambas recolectas, siendo más drástica en la segunda, donde en hoja se manifiesta una reducción del 98% con el AS y del 92% con la salinidad, mientras que en nódulo alcanza el 75% con los dos tratamientos.

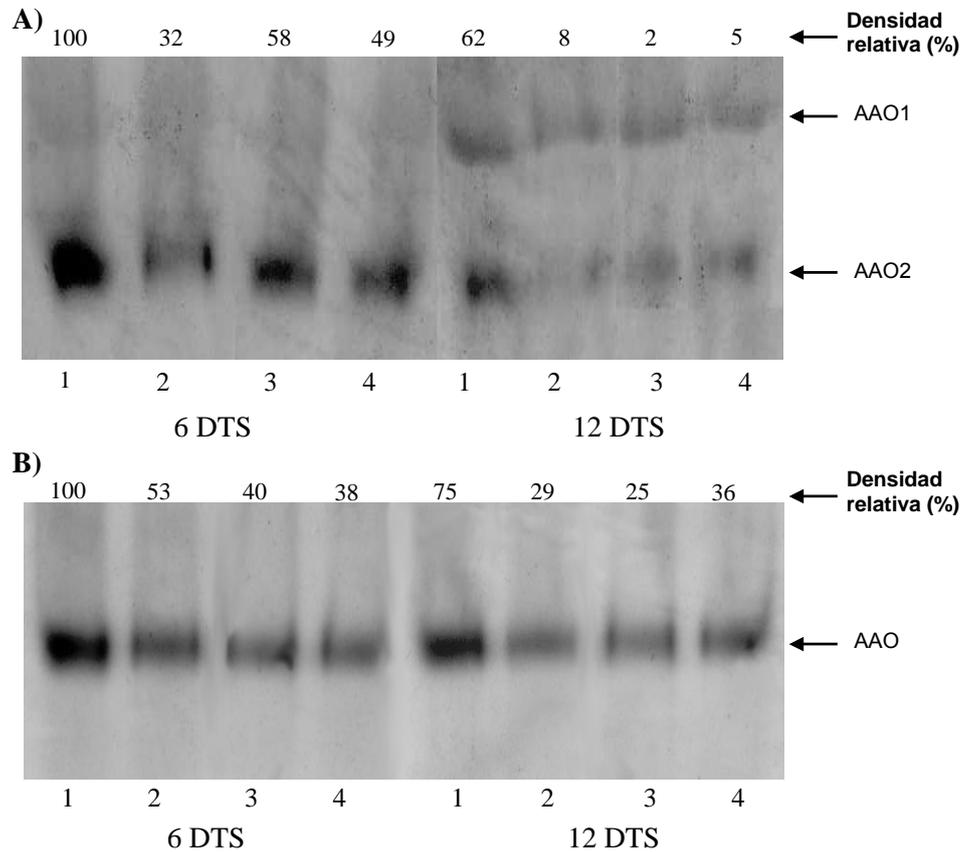


Figura 3.16. Patrón de bandas de actividad aldehído oxidasa en hoja (A) y nódulo (B) de *M. sativa* en gel nativo, detectada con el sustrato indol-3-aldehído. 1 (control), 2 (200 mM NaCl), 3 (0.5 mM AS) y 4 (0.5 mM AS + 200 mM NaCl). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. El zimograma representa una de las tres repeticiones que mostraron resultados similares.

3.2.3. Actividades antioxidantes

Las principales enzimas relacionadas con el metabolismo oxidativo en nódulo se muestran en las figuras 3.17 y 3.18: superóxido dismutasa, catalasa, guaiacol peroxidasa, y las enzimas del ciclo ascorbato-glutation, ascorbato peroxidasa, monodehidroascorbato reductasa, glutatión reductasa y dehidroascorbato reductasa. Los datos numéricos, y el correspondiente análisis de

Resultados

varianza de las determinaciones enzimáticas expresadas por proteína y por peso fresco de nódulo se exponen en las tablas de la A 3.35 a la A 3.42 del apéndice.

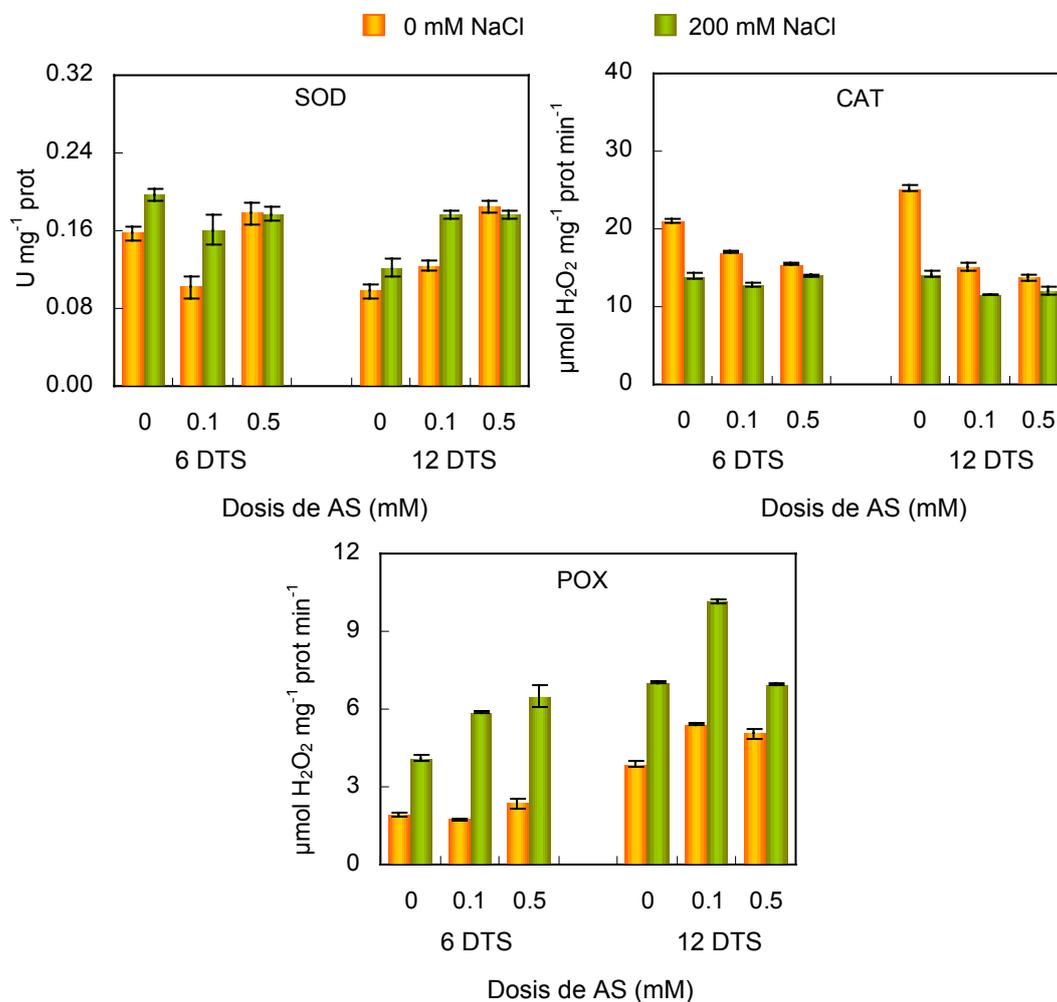


Figura 3.17. Actividades enzimáticas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y guaiacol peroxidasa (POX) en nódulo de plantas de *M. sativa* tratadas con diferentes dosis de AS (0, 0.1, 0.5 mM) y NaCl (0, 200 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

La actividad **superóxido dismutasa**: a) disminuye con el tiempo de experimentación puesto que entre inicio y plena floración se produce una disminución de la SOD (40%) en plantas control; b) el tratamiento 0.5 mM de AS no muestra diferencias significativas a los 6 DTS, mientras que a los 12 DTS prácticamente se duplica respecto al control; c) la salinidad incrementa esta actividad, multiplicándola por 1.2 en ambas recolectas respecto al control.

En el diagrama de barras correspondiente a la **catalasa** se evidencia una inhibición de esta actividad por el AS y NaCl, que es de un 20-40% a los 6 DTS, y de un 40-55% a los 12 DTS con ambos tratamientos. Por el contrario, la actividad **peroxidasa** nodular se induce con el AS y el NaCl de forma independiente, alcanzando un 25% (AS) y un 45% (NaCl). Los nódulos de plantas tratadas con 0.1 mM de AS y NaCl a los 12 DTS superan estos incrementos de actividad, puesto que alcanza el 60%.

Las enzimas antioxidantes de nódulo del **ciclo ascorbato-glutation** se representan en la figura 3.18, en la cual se observa que la **ascorbato peroxidasa** disminuye con el AS a los 6 DTS, mientras que a los 12 DTS aumenta un 52% y un 45% con 0.1 mM y 0.5 mM de AS respectivamente. La salinidad incrementa la actividad un 20% en la primera recolecta, y en la segunda estas diferencias desaparecen. Un hecho a señalar es que la actividad APX disminuye de forma generalizada entre los 6 DTS y 12 DTS, produciéndose en la segunda recolecta un descenso superior al 60% en nódulos de plantas control y del 70% en los tratados con NaCl, sin embargo en todas las plantas que fueron tratadas con AS (salinizadas o no) se evidencia una caída menos pronunciada de la actividad. La actividad APX se correlaciona significativamente de forma positiva con la SOD ($r= 0.70$) (tabla 3.4).

La respuesta de la **monodehidroascorbato reductasa** nodular fue: **a)** en el primer muestreo no se altera ni con 0.1 mM de AS ni con el estrés salino, mientras que con 0.5 mM de AS se estimula un 12%, y en los nódulos de plantas tratadas con AS y NaCl se reduce (25%); **b)** en el segundo muestreo disminuye tanto con el AS (19%) como con el estrés salino (13%).

En la figura 3.18 se detecta que en general el AS no provoca cambios significativos en la actividad **glutation reductasa**, mientras que el estrés salino la inhibe en un 27% a los 6 DTS y en un 33% a los 12 DTS. En los nódulos de las plantas tratadas con AS y NaCl la inhibición de esta actividad por la sal es menor, incluso en los nódulos de plantas tratadas con 0.5 mM de AS y NaCl aumenta la actividad en ambos muestreos.

La actividad **dehidroascorbato reductasa** se estimula en presencia de AS y NaCl tanto a los 6 DTS como a los 12 DTS, registrándose en los nódulos de plantas tratadas con 0.5 mM de AS y NaCl la máxima actividad, incrementando un 70% en el primer muestreo y un 85% en el segundo. Es interesante resaltar que entre inicio y plena floración se produce una caída de la actividad DHAR en todos los tratamientos.

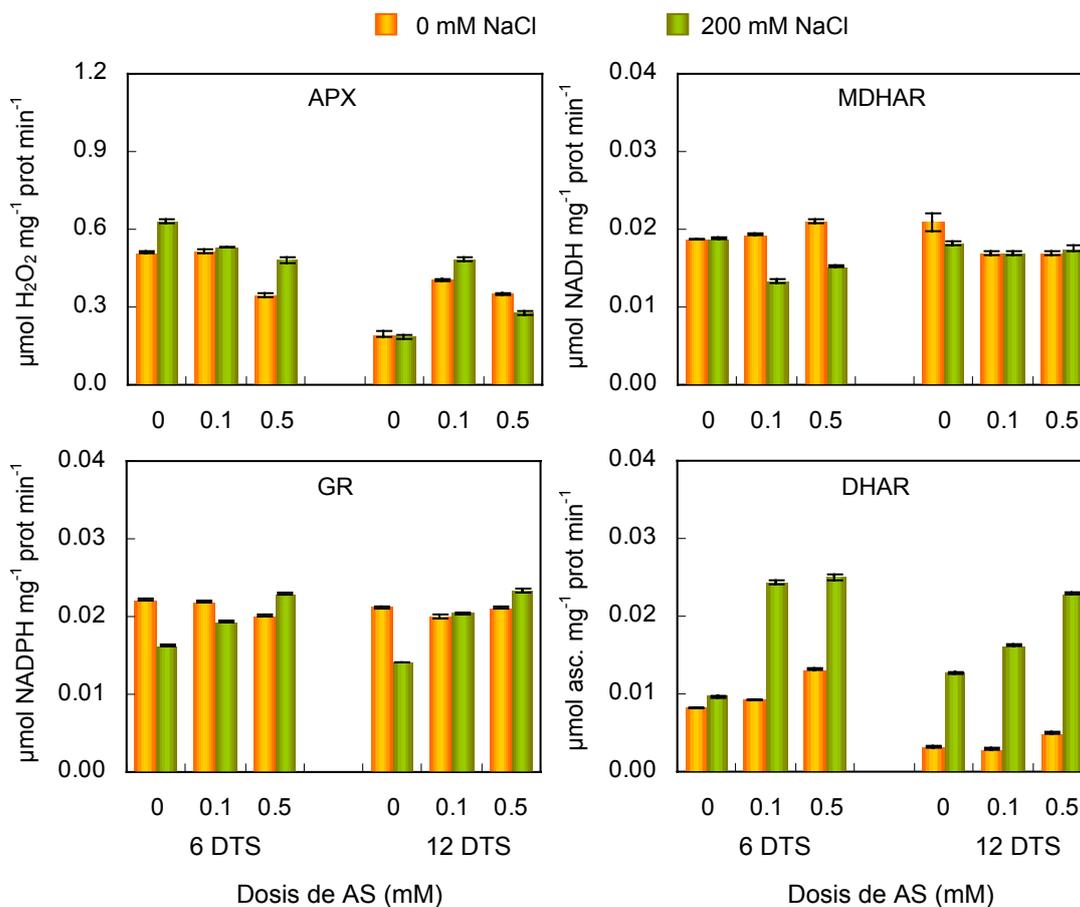


Figura 3.18. Actividades enzimáticas ascorbato peroxidasa (APX), monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), glutation reductasa (GR) y dehidroascorbato reductasa (DHAR) en nódulo de plantas de *M. sativa* tratadas con diferentes dosis de AS (0, 0.1, 0.5 mM) y NaCl (0, 200 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

3.2.5. Actividad lipoxigenasa

La figura 3.19 representa la actividad lipoxigenasa de nódulo, los datos numéricos y el correspondiente análisis de varianza se recoge en las tablas A 3.35 y A 3.36 del apéndice. En el mismo apartado se recogen los datos numéricos de actividad expresados en gramos de peso fresco y su estudio estadístico (Tablas A 3.37 y A 3.38 del apéndice).

El AS exógeno provoca una reducción de la actividad **lipoxigenasa** proporcional a la concentración de AS, en la primera recolecta se registran una caída del 40% y del 61% con 0.1 y 0.5 mM de AS respectivamente, y en la segunda no se observan diferencias significativas. Por el contrario, la actividad se induce

drásticamente con el estrés salino, multiplicándose por 1.9 a los 6 DTS, y por 3.1 a los 12 DTS. En los nódulos de las plantas tratadas con AS y NaCl no se percibe la inducción de la actividad LOX por la sal. Esta actividad se correlaciona negativamente con la glutatión reductasa nodular ($r = -0.71$) (tabla 3.4).

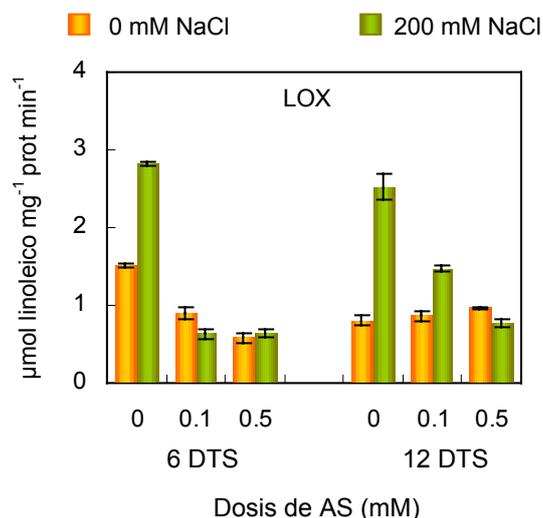


Figura 3.19. Actividad enzimática lipoxigenasa (LOX) en nódulo de plantas de *M. sativa* tratadas con diferentes dosis de AS (0, 0.1, 0.5 mM) y NaCl (0, 200 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra ($n=6$) con el error estándar.

3.2.6. Metabolitos antioxidantes

Se determinó en nódulo el contenido de las distintas formas de ascorbato y glutatión (reducido y oxidado), así como el ascorbato y el glutatión total, y la relación entre oxidado y reducido (Figs. 3.20 y 3.21). Los datos numéricos y el correspondiente análisis de varianza se recogen en las tablas de la A 3.43 a la A 3.46 del apéndice.

En el diagrama de barras de la figura 3.20 relativo al **ascorbato reducido** nodular se observa que disminuye con la concentración de AS, con 0.5 mM de AS la caída es del 66% a los 6 DTS y del 32% a los 12 DTS. El estrés salino también provoca una reducción del 15% en la primera recolecta, mientras que en la segunda aumenta un 10%. Como resultado del tratamiento combinado (AS+NaCl) se alcanzan en nódulo valores de AsA menores a los de plantas con NaCl. El AsA se correlaciona negativamente con la actividad LOX ($r = -0.70$) (tabla 3.4).

El **ascorbato oxidado o dehidroascorbato** con el NaCl incrementa un 28% a los 6 DTS y a los 12 DTS disminuye (25%). El AS induce la misma respuesta que la sal pero más intensa, con 0.5 mM de AS aumenta el 33% a los 6

Resultados

DTS y se reduce el 32% a los 12 DTS. Es interesante comentar que en nódulo el contenido de ascorbato oxidado supera el reducido independientemente del tratamiento aplicado.

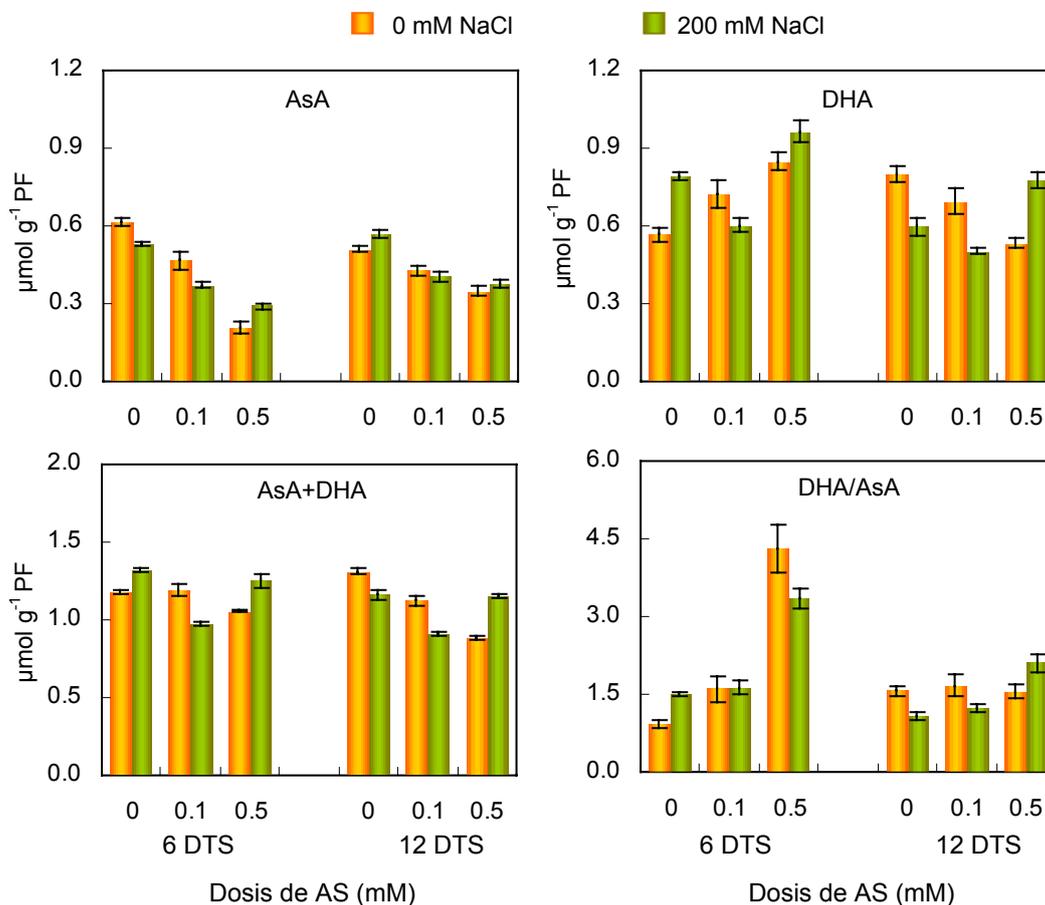


Figura 3.20. Contenido de ascorbato reducido (AsA), oxidado (DHA), total (AsA+DHA) y relación oxidado/reducido (DHA/AsA) en nódulo de plantas de *M. sativa* tratadas con diferentes dosis de AS (0, 0.1, 0.5 mM) y NaCl (0, 200 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

En general el contenido de **ascorbato total** disminuye con el AS en las dos recolectas, mientras que con el NaCl incrementa a los 6 DTS y se reduce a los 12 DTS. La relación **ascorbato oxidado/reducido**: **a)** al inicio de floración aumentan un 42% y un 80% con 0.1 y 0.5 mM de AS respectivamente, y un 38% con el NaCl; **b)** en plena floración no se observan cambios significativos con el AS y disminuye con la sal, aunque en los nódulos de plantas tratadas con 0.5 mM de AS y NaCl se duplicó respecto a los nódulos con sal.

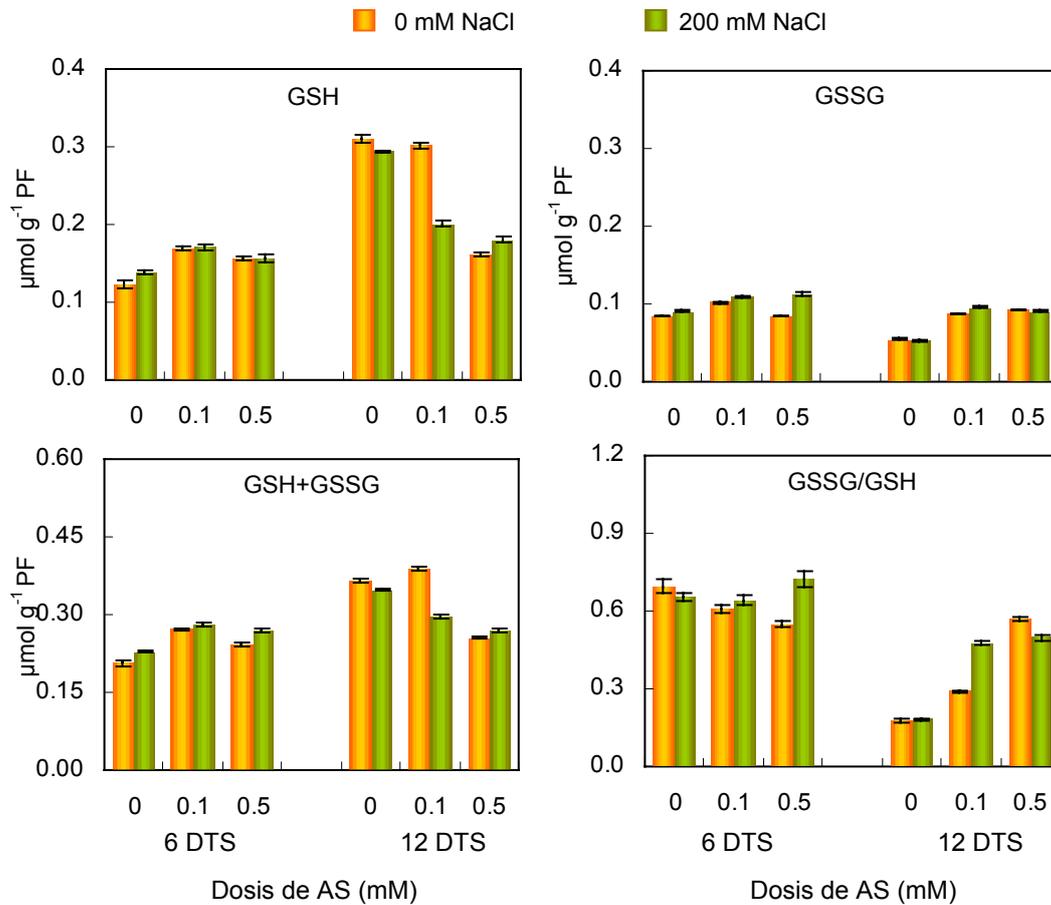


Figura 3.21. Contenido de glutatión reducido (GSH), oxidado (GSSG), total (GSH+GSSG) y relación oxidado/reducido (GSSG/GSH) en nódulo de plantas de *M. sativa* tratadas con diferentes dosis de AS (0, 0.1, 0.5 mM) y NaCl (0, 200 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

En la figura 3.21 se observa que el AS induce la acumulación de **glutatión reducido, glutatión oxidado y glutatión total** en nódulo al inicio de floración, mientras que en plena floración se observan respuestas diferentes: **a)** el GSH disminuye con el tratamiento de AS, con 0.1 mM de AS la reducción no es significativa, pero con 0.5 mM es del 50%; **b)** el GSSG aumenta un 36% y un 40% con 0.1 y 0.5 mM de AS respectivamente; **c)** el glutatión total aumenta con la dosis 0.1 mM de AS (6%), y disminuye con 0.5 mM de AS (30%).

En los nódulos de plantas tratadas con NaCl la respuesta de las dos formas de glutatión (reducido y oxidado) depende del tiempo de exposición al estrés salino: a los 6 DTS ambas formas de glutatión aumentan, mientras que cuando el tiempo de tratamiento salino es mayor (12 días) el GSH se reduce y no se detectan

cambios significativos en el GSSG. El contenido de glutatión total aumenta con el NaCl un 10% en la primera recolecta, y disminuye un 5% en la segunda. En general en nódulo el contenido de GSH es más elevado que el de GSSG, además la forma reducida se incrementa drásticamente entre inicio y plena floración, mientras que la oxidada disminuye, de hecho en la segunda recolecta se detectan valores para el GSH que superan en 5 veces el contenido de GSSG. El contenido de glutatión total y reducido se correlacionan negativa y estadísticamente significativo con la actividad SOD y CAT nodular ($P \leq 0.01$) (tabla 3.4).

La relación **glutatión oxidado/reducido** disminuye con el AS un 13% y un 21% con 0.1 y 0.5 mM de AS respectivamente al inicio de floración. En esta misma cosecha la salinidad no induce cambios significativos, sin embargo los nódulos de plantas con 0.5 mM de AS y NaCl muestran un incremento en la relación GSSG/GSH, llegando a superar el valor de nódulos de plantas control. En plena floración se detecta un aumento de la relación GSSG/GSH con el AS, siendo mayor con 0.5 mM (69%), mientras que el NaCl no provoca cambios significativos. En general la relación GSSG/GSH decrece drásticamente entre inicio y plena floración, de forma que en los nódulos de plantas control y salinizadas se registra una disminución superior al 70% en plena floración.

3.2.7. Otros metabolitos

La figura 3.22 representa el contenido de aminoácidos libres, prolina y azúcares solubles totales en hoja y nódulo. Los datos numéricos y análisis de la varianza para las determinaciones en hoja se recogen en las tablas A 3.47 y A 3.48, y para nódulo en las tablas A 3.49 y A 3.50 del apéndice.

El contenido de **aminoácidos** en hoja y nódulo disminuye con el AS en los dos muestreos, aunque en hoja a los 12 DTS con 0.5 mM de AS se alcanzan valores superiores al control. La salinidad provoca un incremento de los Aa en hoja (25%) y nódulo (8%) en la primera recolecta, y una reducción en la segunda, siendo más acusada en hoja (70%) que en nódulo (12%). Al analizar conjuntamente los diagramas de barras de hoja y nódulo se aprecia que en este último órgano las concentraciones son mayores.

La aplicación exógena de AS provoca que la **prolina** aumente en hoja y disminuya en nódulo, además el contenido de prolina registrado en nódulo es superior al de hoja, observándose mayores diferencias en estrés salino. No obstante, la salinidad provoca un aumento de la prolina en hoja y nódulo, al inicio de floración un 80% y en plena floración un 85-95% en ambos órganos. Es interesante destacar que los niveles mayores de prolina en hoja se alcanzan en las plantas con 0.1 mM de AS y NaCl, mientras que los nódulos de estas plantas presentan el nivel más bajo.

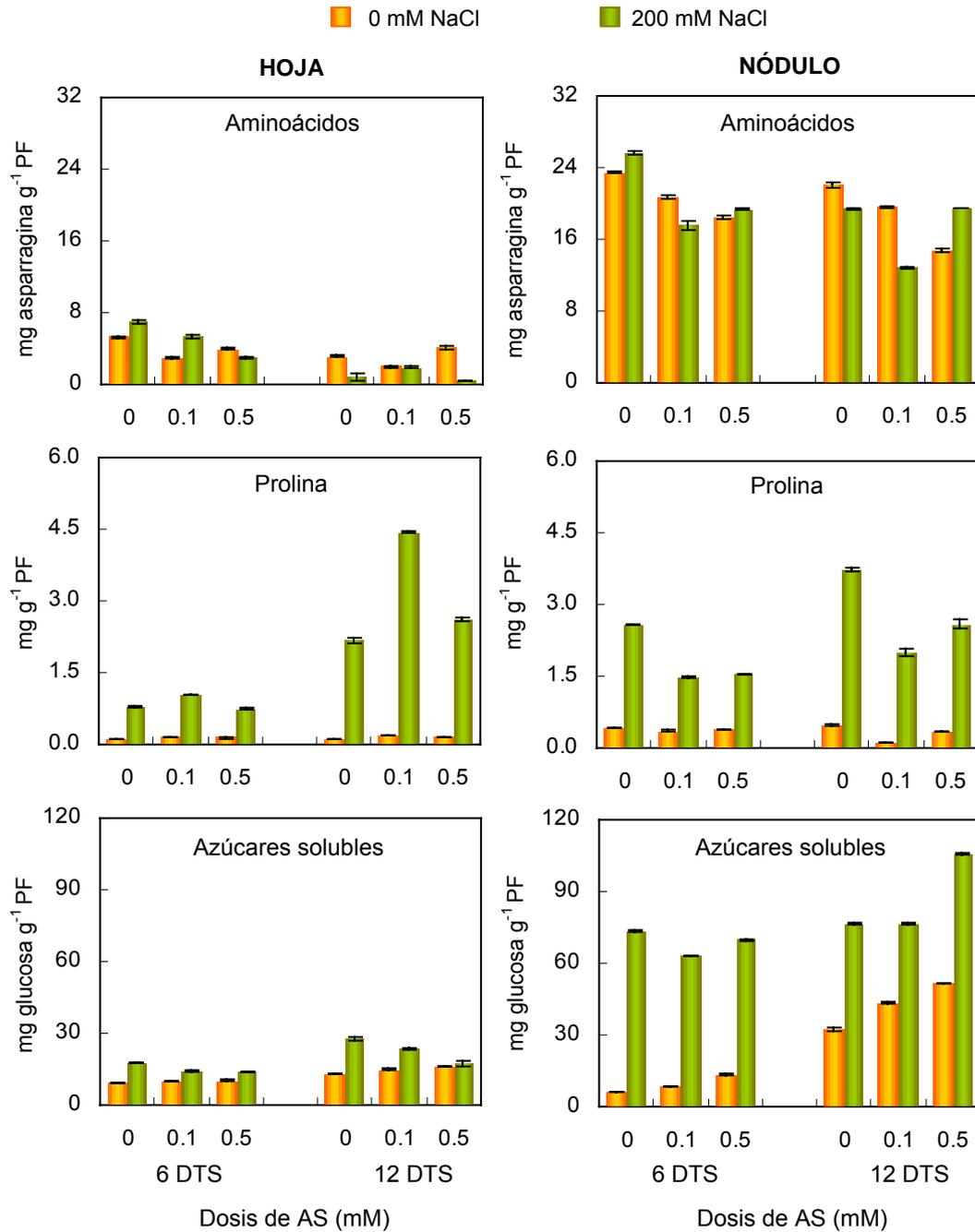


Figura 3.22. Contenido de aminoácidos, prolina y azúcares solubles totales en hoja y nódulo de plantas de *M. sativa* tratadas con diferentes dosis de AS (0, 0.1, 0.5 mM) y NaCl (0, 200 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

En la figura 3.22 se observa para el contenido de **azúcares solubles totales** que: **a)** el nódulo acumula un contenido más elevado que la hoja; **b)** el tiempo de experimentación provoca un incremento en los Ast; **c)** el tratamiento con AS induce su acumulación en ambos órganos; **d)** el estrés salino aumenta el contenido de este metabolito en hoja y nódulo; **e)** las hojas de plantas tratadas con AS y NaCl muestran un menor contenido de Ast que las de plantas con sal en ambos muestreos, en nódulo se observa el mismo comportamiento en el primer muestreo.

El contenido de prolina y azúcares solubles totales se correlaciona de forma negativa con la tasa de fijación de nitrógeno ($P \leq 0.01$) y positiva con la actividad POX ($P \leq 0.05$) (tabla 3.5).

3.2.8. Peroxidación de lípidos y peróxido de hidrógeno

En los diagramas de barras de la figura 3.23 se representa el contenido de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico y peróxido de hidrógeno en hoja y nódulo. Los datos numéricos y el correspondiente análisis de la varianza se recogen en las tablas A 3.51 y A 3.52 del apéndice.

El tratamiento con AS aumenta la **peroxidación lipídica** en hoja y nódulo, con 0.5 mM de AS un 32% (hoja) y un 26% (nódulo), y en plena floración supera el 35% en ambos órganos. El contenido de TBARS también incrementa con el estrés salino en hoja y nódulo, en la primera recolecta del 25-35% en ambos órganos, y en la segunda del 23% en hoja y del 55% en nódulo. En general, las plantas tratadas con AS y NaCl muestran los valores mayores para el contenido de TBARS en hoja y nódulo. Es de destacar que la peroxidación lipídica es más elevada en nódulo que en hoja.

En la figura 3.23 se observa que el contenido en **peróxido de hidrógeno** aumenta en hoja y en nódulo con la salinidad, alcanzando en hoja un aumento del 58% a los 6 DTS y del 38% a los 12 DTS. En general, el AS induce la acumulación de peróxido de hidrógeno en hoja y nódulo, con 0.1 mM de AS en plena floración aumenta un 22% (hoja) y un 20% (nódulo). Las plantas tratadas con AS y NaCl son las que alcanzan los mayores valores en ambos órganos.

Existe una correlación negativa entre la peroxidación lipídica nodular y el PSP ($r = -0.89$), TFN ($r = -0.77$), actividad CAT nodular ($r = -0.83$), mientras que la foliar lo hace de forma positiva con la actividad POX nodular ($r = 0.70$). El peróxido de hidrógeno de hoja se correlaciona positivamente con PSP ($r = 0.70$) y la actividad CAT ($r = 0.78$) y negativamente con la actividad SOD nodular ($r = -0.73$) y TBARS de nódulos ($r = -0.81$) (tabla 3.5).

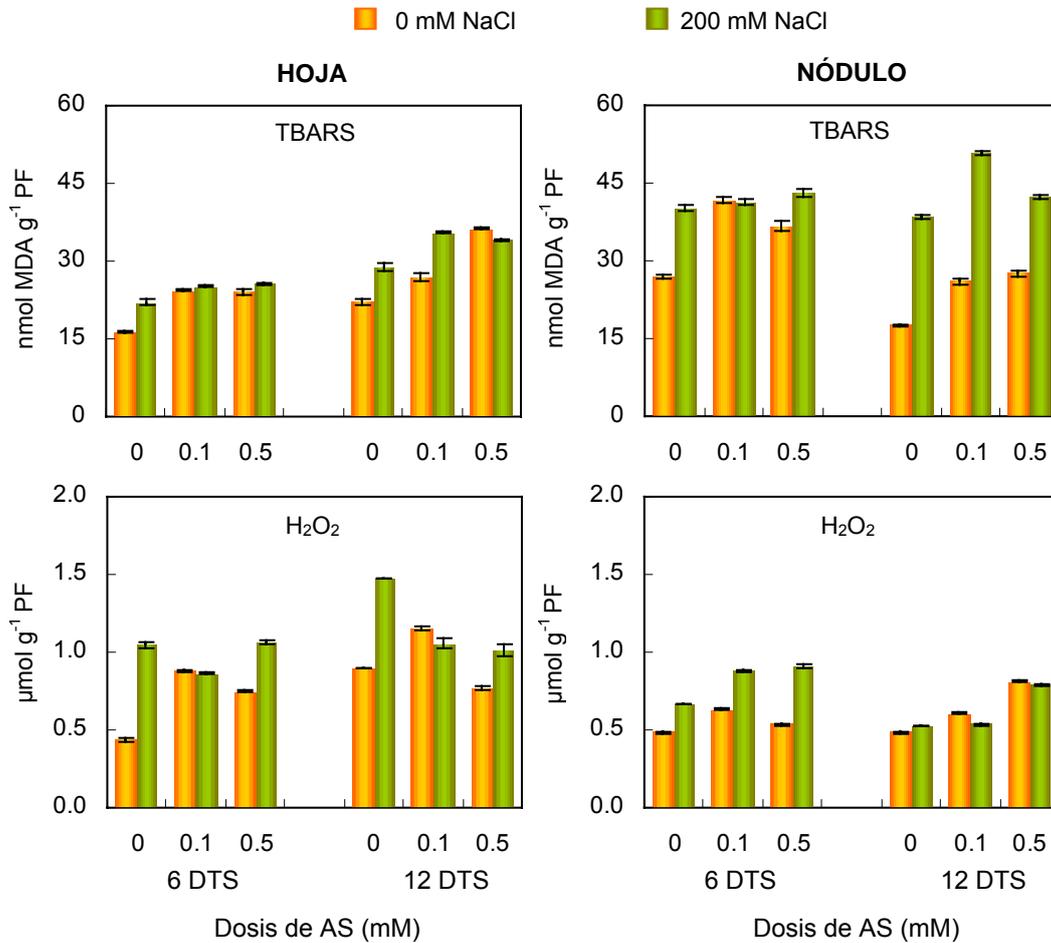


Figura 3.23. Contenido de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) y de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en hoja y nódulo de plantas de *M. sativa* tratadas con diferentes dosis de AS (0, 0.1, 0.5 mM) y NaCl (0, 200 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra ($n=6$) con el error estándar.

3.2.9. Ácido salicílico y ácido abscísico endógeno

El contenido endógeno de ácido salicílico y ácido abscísico en hoja y raíz se representa en la figura 3.24. Los datos numéricos y el estudio estadístico de la varianza se recopilan en las tablas A 3.53 y A 3.54 del apéndice.

En el diagrama de barras correspondiente al **ácido salicílico endógeno en hoja** se observa que incrementa en los dos muestreos proporcional a la concentración de AS aplicada al medio de cultivo, con 0.1 mM el 15%, y con 0.5 mM el 50% en ambos muestreos. El estrés salino reduce el contenido endógeno de AS en hoja (50-65%), y el tiempo de experimentación también provoca una caída en todos los tratamientos. En **raíz** se observa una respuesta del AS endógeno

similar a la descrita en hoja, incrementándose con el AS y disminuyendo con la salinidad. Es sugerente comentar que en plena floración la dosis 0.1 mM de AS no induce cambios significativos, mientras que con 0.5 mM el contenido de AS endógeno de raíz duplica al de plantas control. Destacar que se acumula más AS endógeno libre en hoja que en raíz, a pesar de que el tratamiento de AS se realizó a través de la solución de riego.

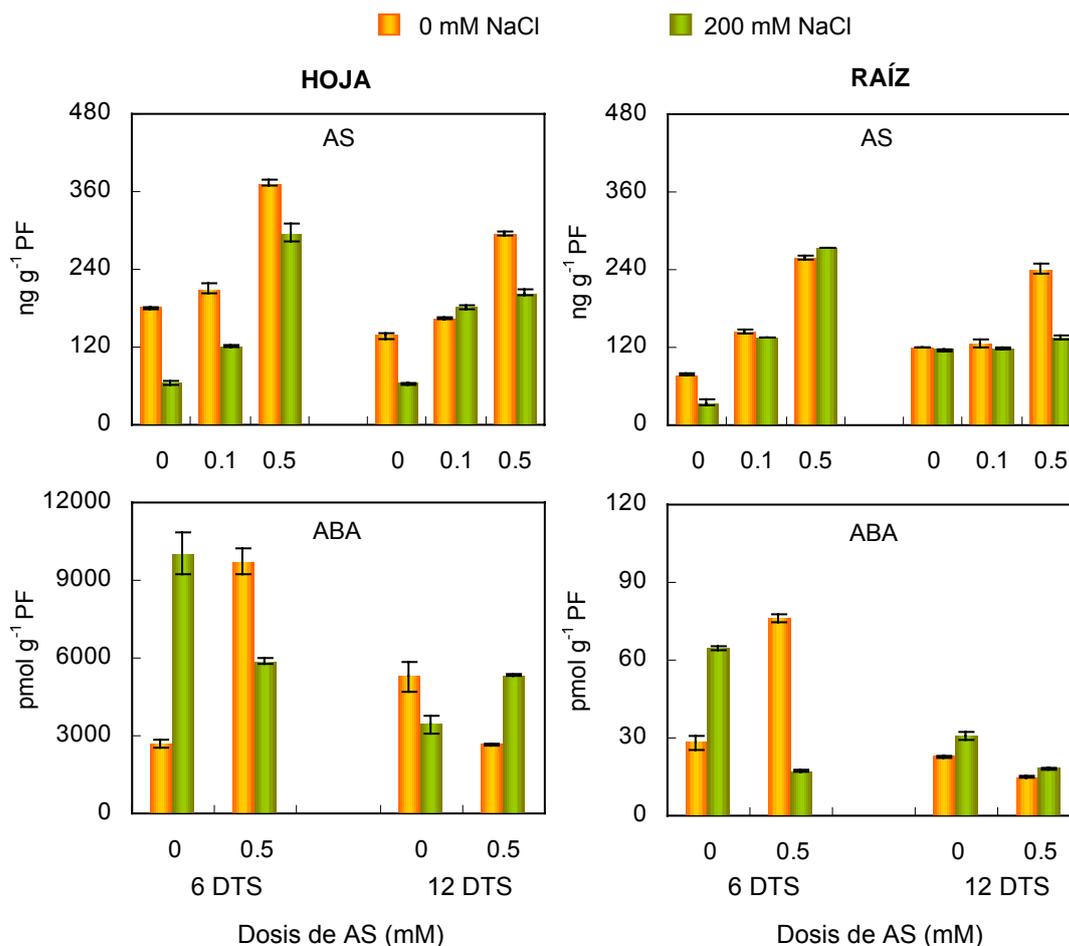


Figura 3.24. Contenido endógeno de ácido salicílico libre (AS) y ácido abscísico libre (ABA) en hoja y raíz de plantas de *M. sativa* tratadas con diferentes dosis de AS (0, 0.1, 0.5 mM) y NaCl (0, 200 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

En la figura 3.24 se evidencia que el **contenido endógeno de ácido abscísico** incrementó tanto con el AS y como con el NaCl en hoja (70-75%) y en raíz (55-65%) al inicio de floración, sin embargo en las plantas tratadas con AS y NaCl, contrario a lo esperado, acumulan menor contenido de ABA en ambos órganos al comparar con plantas tratadas sólo con AS o sal. En plena floración el

ABA endógeno de hoja disminuye con el AS y el NaCl, y el de raíz se reduce con el AS (35%) y aumenta con la sal (25%). Es interesante mencionar que el nivel de ABA endógeno es más elevado en hoja que en raíz, alcanzándose valores en hoja hasta 100 veces superiores a los de raíz.

3.2.10. Poliaminas endógenas

Se determinó el contenido de poliaminas endógenas libres en hoja, raíz y nódulo: diaminopropano, putrescina, cadaverina, espermidina y espermina. Los resultados correspondientes a los tratamientos con AS (0.5 mM) y NaCl (200 mM) se exponen en las figuras 3.25 y 3.26. Los datos numéricos y el análisis de la varianza se recogen en las tablas de la A 3.55 a la A 3.60 del apéndice.

En la figura 3.25 se observa que el **diaminopropano: a)** en hoja disminuye con el AS y el NaCl en ambos muestreos, reduciéndose a la mitad con la salinidad y detectándose una inhibición mayor con el AS; **b)** en raíz aumenta con los dos tratamientos, a los 12 DTS con el AS es del 40% y con el NaCl del 33%; **c)** en nódulo incrementa con el AS en la primera recolecta, y disminuye (27%) en la segunda. En este órgano la salinidad disminuye el contenido de DAP en las dos recolectas, **d)** en plantas tratadas con AS y NaCl disminuye en hoja y raíz, y aumenta en nódulo respecto a plantas control; **e)** en raíz alcanza valores superiores a los de hoja y nódulo en los dos muestreos.

El contenido de **putrescina: a)** en hoja disminuye con el AS (30%) y con el NaCl (55%) al inicio de floración, y en floración no se observan cambios significativos; **b)** en raíz incrementa tanto el AS como el NaCl en los dos muestreos; **c)** en nódulo al inicio de floración aumenta con el AS (20%) y con el NaCl (42%), y en floración el AS reduce el contenido de PUT y la salinidad no induce cambios significativos respecto al control.

En el diagrama de barras de la figura 3.25 que representa el contenido **cadaverina** se observa que: **a)** en hoja disminuye (50%) tanto con el AS como con el NaCl al inicio de floración, y en floración se reduce con el AS y se estimula por la sal; **b)** en raíz y nódulo aumenta con el AS y el NaCl en las dos recolectas; **c)** las plantas tratadas con AS y NaCl acumulan el nivel más elevado de esta poliamina en raíz y nódulo, al inicio de floración el aumento es del 28% en raíz y del 70% en nódulo, y en floración del 55% y del 73% en raíz y nódulo respectivamente.

Las poliaminas putrescina y cadaverina se acumulan principalmente en nódulo al inicio de floración independientemente del tratamiento aplicado a las plantas, estas diferencias respecto a los otros órganos son mayores en condiciones de salinidad.

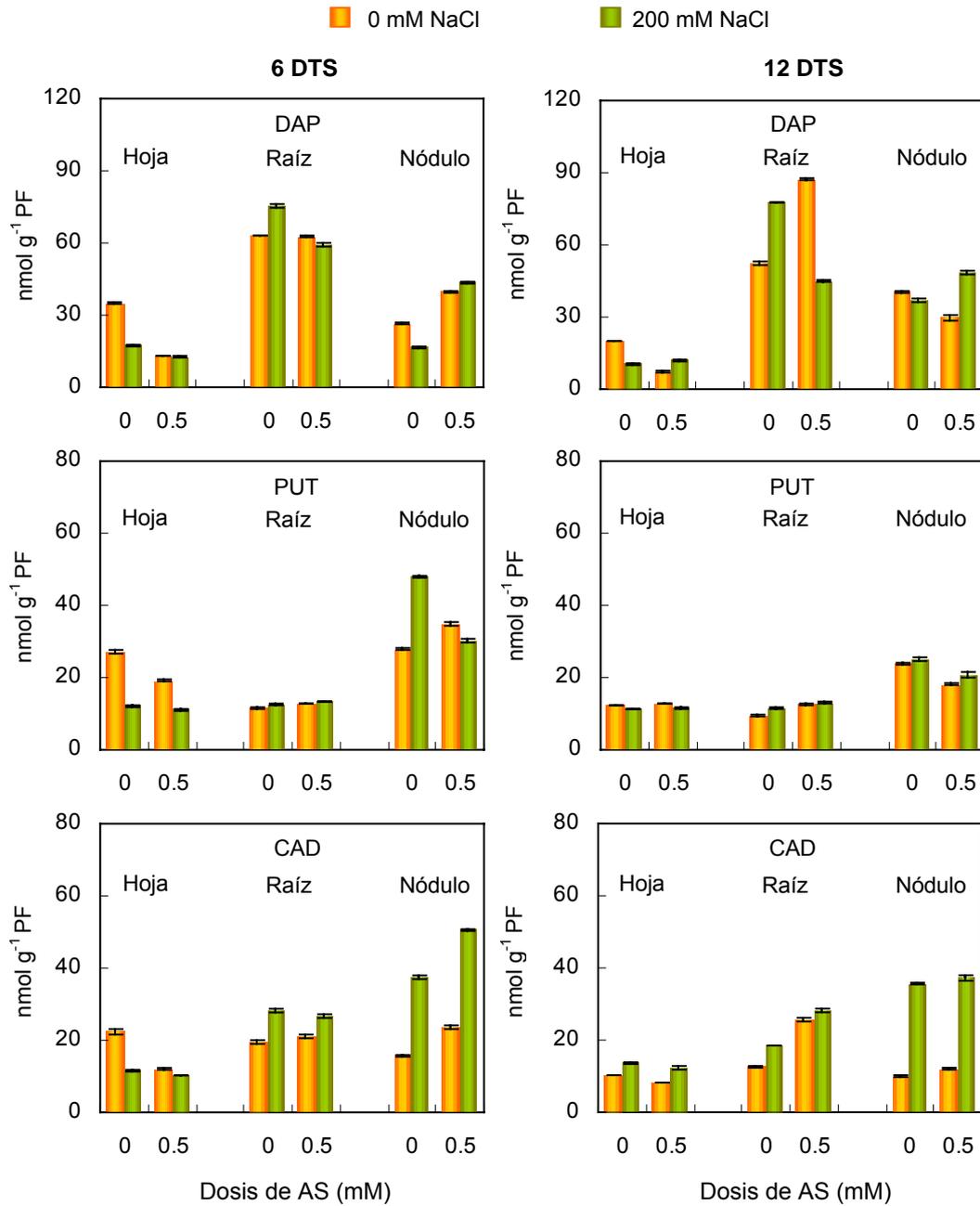


Figura 3.25. Contenido de poliaminas: diaminopropano (DAP), putrescina (PUT) y cadaverina (CAD) en hoja, raíz y nódulo de plantas de *M. sativa* tratadas con diferentes dosis de AS (0, 0.5 mM) y NaCl (0, 200 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

El contenido de putrescina nodular se correlaciona positivamente con la actividad APX de nódulo ($r=0.70$) y el ácido abscísico endógeno de hoja y raíz ($r=0.82$ y 0.80 respectivamente), y negativamente con la GR nodular ($r= -0.78$) (tablas 3.4 y 3.5). La concentración de cadaverina en nódulo se correlaciona significativamente de forma negativa con los parámetros de crecimiento y fijación de nitrógeno ($P \leq 0.05$), y positivamente con la peroxidación lipídica ($r= 0.91$) y el contenido de prolina ($r= 0.72$) de nódulo (tabla 3.5). La putrescina y la cadaverina de raíz muestran una correlación positiva con la actividad SOD y negativa con la CAT de nódulo ($P \leq 0.01$) (tabla 3.5).

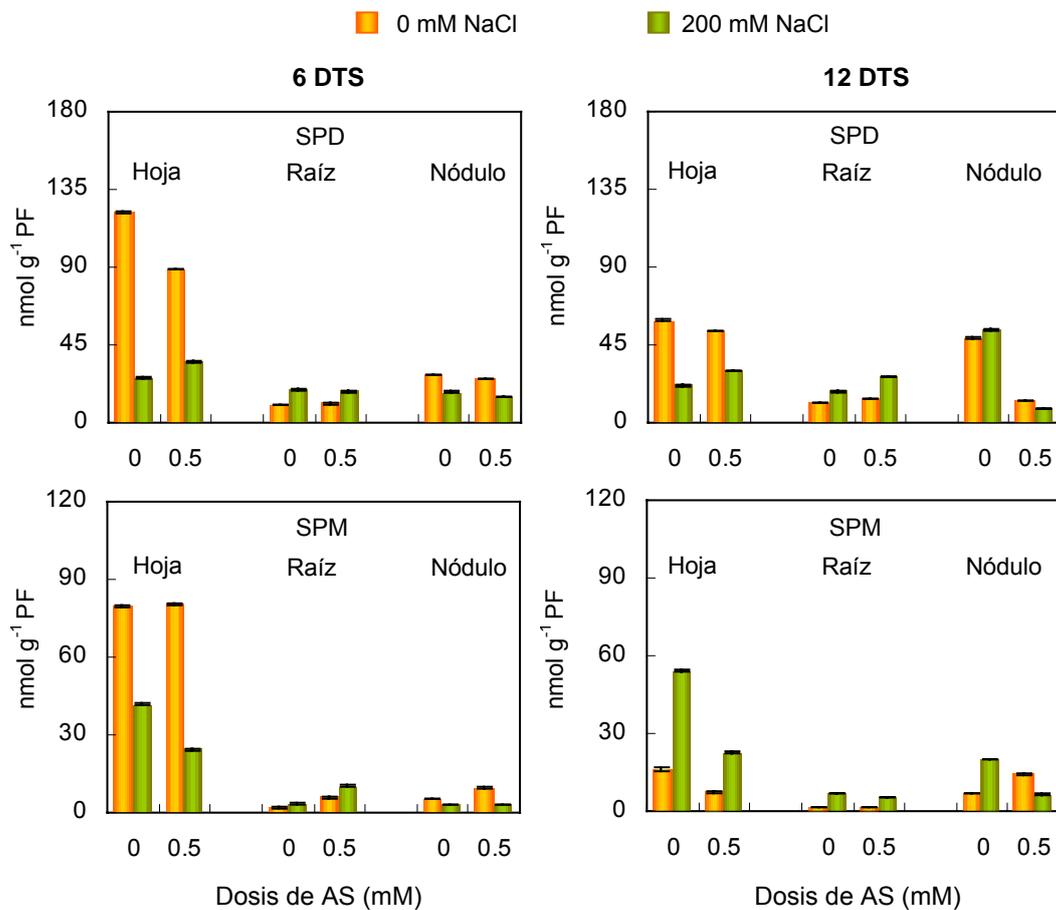


Figura 3.26. Contenido de poliaminas: espermidina (SPD) y espermina (SPM) en hoja, raíz y nódulo de plantas de *M. sativa* tratadas con diferentes dosis de AS (0, 0.5 mM) y NaCl (0, 200 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra ($n=6$) con el error estándar.

El contenido de **espermidina** (Fig. 3.26): **a**) en hoja tanto con el AS y como con el NaCl disminuye en las dos recolectas, en la primera el descenso es del 27% y del 78% con AS y sal respectivamente; **b**) en raíz aumenta con los dos tratamientos, detectándose los niveles mayores en las plantas tratadas con AS y NaCl, al inicio de floración un 44% y en plena floración un 57%; **c**) en nódulo se reduce con el AS, alcanzando un 75% en la segunda recolecta, y con la salinidad se reduce en la primera y aumenta en la segunda.

En la figura 3.26 se observa que la **espermina: a**) en hoja no cambia significativamente con el AS a los 6 DTS, mientras que a los 12 DTS se redujo a la mitad. La salinidad disminuye el contenido de esta poliamina (48%) en el primer muestreo y lo aumenta en el segundo (70%); **b**) en raíz incrementa principalmente en las plantas tratadas con AS previamente y después con NaCl, alcanzando el 80% al inicio de floración y el 70% en plena floración; **c**) en nódulo se estimula con el AS (45-55%) en las dos cosechas, y con la sal disminuye en la primera y aumenta (66%) en la segunda.

La hoja es el principal órgano donde se acumula la espermidina y la espermina independientemente del tratamiento aplicado. La espermidina de nódulo se correlaciona positivamente con el glutatión total ($r= 0.77$) y reducido ($r= 0.84$) nodular, y negativa con al actividad SOD ($r= -0.90$). El contenido espermidina de raíz muestra una correlación positiva significativamente con la prolina foliar y nodular, y los azúcares solubles totales y actividad peroxidasa de nódulo ($P \leq 0.01$).

Tabla 3.1. Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con el crecimiento peso seco planta (PSP), peso seco parte aérea (PSPA), peso seco raíz (PSR), relación raíz/parte aérea (RPA), actividad nitrogenasa aparente (ANA), actividad nitrogenasa total (ANT), tasa fijación nitrógeno (TFN), peso seco nódulo (PSN), actividades enzimáticas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasa (POX), lipoxigenasa (LOX), ascorbato peroxidasa (APX), monodehidroascorbato reductasa (MDR), glutatión reductasa (GR), dehidroascorbato reductasa (DHR), aminoácidos (Aa), prolina (Pro), azúcares (Ast), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), peroxidación de lípidos (TBAR), ácido salicílico (AS), ácido abscísico (ABA), putrescina (PUT) y cadaverina (CAD) en plantas de *P. vulgaris*. Los símbolos seguidos de “h”, “r” y “n” indican hoja, raíz y nódulo respectivamente

	PSP	PSPA	PSR	RPA	ANA	ANT	TFN	PSN	SOD (n)	CAT (n)	POX (n)	LOX (n)	APX (n)	MDR (n)	GR (n)	DHR (n)	Aa (n)	Pro (n)	Ast (n)	H ₂ O ₂ (n)	TBAR (n)	AS (h)	AS (r)	ABA (h)	ABA (r)	PUT (n)	CAD (n)	
PSP	1.00																											
PSPA	0.77	1.00																										
PSR	0.88	0.38	1.00																									
RPA	0.59	-0.06	0.90	1.00																								
ANA	0.55	-0.02	0.80	0.88	1.00																							
ANT	0.74	0.35	0.81	0.71	0.81	1.00																						
TFN	0.73	0.50	0.70	0.52	0.59	0.95	1.00																					
PSN	0.51	0.33	0.49	0.36	0.31	0.17	0.07	1.00																				
SOD(n)	-0.14	-0.59	0.23	0.53	0.35	-0.03	-0.23	-0.12	1.00																			
CAT(n)	0.84	0.89	0.58	0.21	0.35	0.69	0.77	0.22	-0.43	1.00																		
POX(n)	-0.40	-0.21	-0.44	-0.37	-0.36	-0.63	-0.68	-0.05	0.12	-0.30	1.00																	
LOX(n)	-0.43	-0.56	-0.21	0.02	-0.21	-0.25	-0.23	0.03	0.20	-0.69	-0.38	1.00																
APX(n)	0.54	-0.05	0.83	0.92	0.88	0.79	0.63	0.16	0.49	0.25	-0.62	0.07	1.00															
MDR(n)	0.02	0.26	-0.17	-0.31	-0.18	-0.17	-0.14	0.63	-0.65	0.01	-0.14	0.21	-0.34	1.00														
GR(n)	-0.61	-0.46	-0.55	-0.38	-0.23	-0.39	-0.42	-0.03	-0.30	-0.59	-0.09	0.52	-0.29	0.61	1.00													
DHR(n)	-0.78	-0.79	-0.55	-0.22	-0.18	-0.37	-0.42	-0.59	0.18	-0.77	0.01	0.51	-0.09	-0.11	0.71	1.00												
Aa(n)	0.45	0.61	0.21	-0.05	-0.32	-0.09	0.05	0.18	0.00	0.42	0.19	-0.29	-0.19	-0.21	-0.77	-0.73	1.00											
Pro(n)	0.63	0.41	0.62	0.46	0.21	0.54	0.63	0.24	-0.09	0.37	-0.79	0.33	0.52	0.03	-0.25	-0.29	0.30	1.00										
Ast(n)	-0.53	-0.37	-0.50	-0.38	-0.60	-0.83	-0.83	-0.29	0.30	-0.67	0.49	0.24	-0.44	-0.15	0.22	0.46	0.14	-0.28	1.00									
H ₂ O ₂ (n)	0.77	0.36	0.86	0.76	0.64	0.81	0.79	0.06	0.19	0.62	-0.34	-0.33	0.71	-0.52	-0.72	-0.43	0.30	0.58	-0.46	1.00								
TBAR(n)	-0.60	-0.66	-0.40	-0.11	0.11	-0.38	-0.58	-0.07	0.23	-0.61	0.32	0.11	-0.08	0.19	0.69	0.65	-0.77	-0.68	0.32	-0.58	1.00							
AS(h)	-0.25	0.04	-0.40	-0.45	-0.58	-0.72	-0.68	0.00	0.02	-0.21	0.90	-0.33	-0.70	-0.08	-0.18	-0.13	0.50	-0.52	0.65	-0.30	0.05	1.00						
AS(r)	-0.18	0.03	-0.29	-0.33	-0.35	-0.52	-0.53	-0.10	0.05	-0.07	0.94	-0.56	-0.57	-0.25	-0.28	-0.12	0.38	-0.64	0.49	-0.13	0.12	0.94	1.00					
ABA(h)	0.39	0.72	0.03	-0.31	-0.43	-0.02	0.19	-0.16	-0.50	0.47	-0.18	-0.26	-0.24	0.03	-0.24	-0.27	0.56	0.46	0.20	0.19	-0.58	0.19	0.10	1.00				
ABA(r)	0.60	0.68	0.39	0.09	-0.03	0.45	0.64	-0.21	-0.29	0.65	-0.53	-0.19	0.22	-0.24	-0.48	-0.34	0.50	0.73	-0.18	0.60	-0.79	-0.23	-0.24	0.83	1.00			
PUT(n)	0.61	0.45	0.56	0.40	0.52	0.64	0.61	0.22	-0.17	0.53	-0.83	-0.05	0.62	0.24	0.03	-0.20	-0.16	0.59	-0.46	0.34	-0.13	-0.73	-0.70	0.28	0.48	1.00		
CAD(n)	0.61	0.16	0.77	0.76	0.88	0.82	0.66	0.22	0.19	0.42	-0.69	-0.10	0.91	-0.06	-0.11	-0.13	-0.31	0.46	-0.53	0.58	0.03	-0.76	-0.61	-0.10	0.26	0.85	1.00	

Valor crítico
P ≤ 0.05 0.01 0.001
0.70 0.83 0.92

Tabla 3.2. Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con el crecimiento peso seco planta (PSP), peso seco parte aérea (PSPA), peso seco raíz (PSR), actividad nitrogenasa total (ANT), tasa fijación nitrógeno (TFN), actividades enzimáticas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), monodehidroascorbato reductasa (MDR), dehidroascorbato reductasa (DHR), ascorbato total (Asctot), ascorbato reducido (AsA), dehidroascorbato (DHA), relación ascorbato oxidado/reducido (Aox/rd), glutatión total (Glutot), glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG), relación glutatión oxidado/reducido (Gox/rd), aminoácidos (Aa), prolina (Pro), azúcares (Ast), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), peroxidación de lípidos (TBAR), ácido salicílico (AS), putrescina (PUT), espermidina (SPD) y espermina (SPM) en plantas de *P. vulgaris*. Los símbolos seguidos de “h”, “r” y “n” indican hoja, raíz y nódulo respectivamente

	PSP	PSPA	PSR	ANT	TFN	SOD (n)	CAT (n)	MDR (n)	DHR (n)	Asc tot(n)	AsA (n)	DHA (n)	Aox/rd (n)	Glu tot(n)	GSH (n)	GSSG (n)	Gox/rd (n)	Aa (h)	Pro (h)	Ast (h)	H ₂ O ₂ (h)	TBAR (h)	AS (h)	AS (r)	PUT (h)	SPD (h)	SPM (h)	
PSP	1.00																											
PSPA	0.77	1.00																										
PSR	0.88	0.38	1.00																									
ANT	0.74	0.35	0.81	1.00																								
TFN	0.73	0.50	0.70	0.95	1.00																							
SOD(n)	-0.14	-0.59	0.23	-0.03	-0.23	1.00																						
CAT(n)	0.84	0.89	0.58	0.69	0.77	-0.43	1.00																					
MDR(n)	0.02	0.26	-0.17	-0.17	-0.14	-0.65	0.01	1.00																				
DHR(n)	-0.78	-0.79	-0.55	-0.37	-0.42	0.18	-0.77	-0.11	1.00																			
Asctot(n)	0.25	0.48	0.02	-0.10	0.09	-0.07	0.36	-0.37	-0.57	1.00																		
AsA(n)	0.06	-0.14	0.19	0.05	0.16	0.23	-0.23	-0.28	0.12	0.33	1.00																	
DHA(n)	0.18	0.55	-0.14	-0.13	-0.04	-0.25	0.52	-0.12	-0.61	0.66	-0.49	1.00																
Aox/rd(n)	0.02	0.37	-0.24	-0.10	-0.09	-0.28	0.42	0.05	-0.42	0.25	-0.82	0.88	1.00															
Glutot(n)	0.36	0.55	0.12	0.02	0.24	-0.19	0.37	-0.10	-0.58	0.88	0.57	0.35	-0.07	1.00														
GSH(n)	0.37	0.50	0.18	0.08	0.29	-0.05	0.38	-0.24	-0.57	0.88	0.58	0.34	-0.08	0.98	1.00													
GSSG(n)	-0.35	-0.29	-0.30	-0.24	-0.35	-0.35	-0.33	0.58	0.43	-0.69	-0.50	-0.24	0.10	-0.73	-0.84	1.00												
Gox/rd(n)	-0.37	-0.48	-0.20	-0.06	-0.23	-0.11	-0.38	0.36	0.61	-0.88	-0.47	-0.44	-0.03	-0.92	-0.97	0.92	1.00											
Aa(h)	0.25	0.58	-0.06	0.19	0.42	-0.54	0.61	-0.23	-0.37	0.71	0.03	0.64	0.41	0.57	0.54	-0.32	-0.47	1.00										
Pro(h)	-0.29	-0.02	-0.41	-0.37	-0.28	-0.04	-0.01	-0.43	-0.07	0.61	-0.16	0.69	0.55	0.21	0.18	-0.06	-0.22	0.61	1.00									
Ast(h)	-0.58	-0.66	-0.36	-0.65	-0.70	0.62	-0.76	-0.38	0.32	0.23	0.38	-0.09	-0.23	0.08	0.09	-0.10	-0.13	-0.28	0.42	1.00								
H ₂ O ₂ (h)	-0.02	0.00	-0.02	-0.13	0.01	0.32	-0.07	-0.39	-0.28	0.74	0.66	0.15	-0.21	0.80	0.85	-0.81	-0.85	0.24	0.24	0.50	1.00							
TBAR(h)	-0.13	-0.47	0.17	0.06	0.00	0.86	-0.33	-0.78	0.24	0.14	0.55	-0.31	-0.46	0.11	0.27	-0.65	-0.38	-0.25	-0.06	0.52	0.56	1.00						
AS(h)	-0.25	0.04	-0.40	-0.72	-0.68	0.02	-0.21	-0.08	-0.13	0.50	-0.16	0.58	0.41	0.19	0.12	0.10	-0.17	0.20	0.74	0.57	0.14	-0.17	1.00					
AS(r)	-0.18	0.03	-0.29	-0.52	-0.53	0.05	-0.07	-0.25	-0.12	0.43	-0.33	0.66	0.56	0.02	-0.03	0.15	-0.05	0.29	0.84	0.45	-0.02	-0.17	0.94	1.00				
PUT(h)	0.74	0.57	0.64	0.55	0.46	-0.36	0.63	0.50	-0.64	-0.17	-0.37	0.14	0.24	-0.07	-0.14	0.29	0.18	0.00	-0.29	-0.61	-0.44	-0.61	-0.17	-0.08	1.00			
SPD(h)	0.54	0.38	0.49	0.32	0.22	-0.30	0.30	0.76	-0.43	-0.39	-0.18	-0.22	-0.09	-0.10	-0.18	0.34	0.24	-0.38	-0.67	-0.49	-0.38	-0.52	-0.30	-0.38	0.84	1.00		
SPM(h)	-0.33	-0.32	-0.26	-0.56	-0.69	-0.03	-0.56	0.49	0.38	-0.50	-0.18	-0.31	-0.17	-0.50	-0.60	0.76	0.64	-0.57	-0.12	0.28	-0.52	-0.36	0.40	0.30	0.11	0.33	1.00	

Valor crítico

P ≤ 0.05 0.01 0.001
0.70 0.83 0.92

Tabla 3.3. Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con el crecimiento peso seco planta (PSP), actividad nitrogenasa total (ANT), actividades enzimáticas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasa (POX), lipoxigenasa (LOX), ascorbato peroxidasa (APX), monodehidroascorbato reductasa (MDR), glutation reductasa (GR), dehidroascorbato reductasa (DHR), ascorbato total (Asctot), ascorbato reducido (AsA), relación ascorbato oxidado/reducido (Aox/rd), glutation total (Glutot), glutation reducido (GSH), relación glutation oxidado/reducido (Gox/rd), aminoácidos (Aa), prolina (Pro), azúcares (Ast), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), peroxidación de lípidos (TBAR), ácido salicílico (AS), putrescina (PUT), cadaverina (CAD), espermidina (SPD) y espermina (SPM) en plantas de *P. vulgaris*. Los símbolos seguidos de “h”, “r” y “n” indican hoja, raíz y nódulo respectivamente

	PSP	ANT	PNN	SOD (n)	CAT (n)	POX (n)	LOX (n)	APX (n)	MDR (n)	GR (n)	DHR (n)	Asc tot(n)	AsA (n)	Aox/rd (n)	Glu tot(n)	GSH (n)	Gox/rd (n)	Aa (n)	Pro (n)	Ast (n)	H ₂ O ₂ (n)	TBAR (n)	AS (h)	AS (r)	PUT (n)	CAD (n)	SPD (n)	SPM (n)	
PSP	1.00																												
ANT	0.74	1.00																											
PNN	-0.56	-0.23	1.00																										
SOD(n)	-0.14	-0.03	0.59	1.00																									
CAT(n)	0.84	0.69	-0.83	-0.43	1.00																								
POX(n)	-0.40	-0.63	0.09	0.12	-0.30	1.00																							
LOX(n)	-0.43	-0.25	0.68	0.20	-0.69	-0.38	1.00																						
APX(n)	0.54	0.79	0.21	0.49	0.25	-0.62	0.07	1.00																					
MDR(n)	0.02	-0.17	-0.07	-0.65	0.01	-0.14	0.21	-0.34	1.00																				
GR(n)	-0.61	-0.39	0.45	-0.30	-0.59	-0.09	0.52	-0.29	0.61	1.00																			
DHR(n)	-0.78	-0.37	0.61	0.18	-0.77	0.01	0.51	-0.09	-0.11	0.71	1.00																		
Asctot(n)	0.25	-0.10	-0.54	-0.07	0.36	0.26	-0.30	-0.32	-0.37	-0.75	-0.57	1.00																	
AsA(n)	0.06	0.05	0.23	0.23	-0.23	-0.38	0.65	0.23	-0.28	-0.17	0.12	0.33	1.00																
Aox/rd(n)	0.02	-0.10	-0.51	-0.28	0.42	0.54	-0.80	-0.44	0.05	-0.25	-0.42	0.25	-0.82	1.00															
Glutot(n)	0.36	0.02	-0.49	-0.19	0.37	-0.13	0.04	-0.19	-0.10	-0.58	-0.58	0.88	0.57	-0.07	1.00														
GSH(n)	0.37	0.08	-0.47	-0.05	0.38	-0.19	0.03	-0.07	-0.24	-0.67	-0.57	0.88	0.58	-0.08	0.98	1.00													
Gox/rd(n)	-0.37	-0.06	0.47	-0.11	-0.38	0.11	0.08	0.02	0.36	0.77	0.61	-0.88	-0.47	-0.03	-0.92	-0.97	1.00												
Aa(n)	0.45	-0.09	-0.56	0.00	0.42	0.19	-0.29	-0.19	-0.21	-0.77	-0.73	0.91	0.30	0.19	0.86	0.86	-0.89	1.00											
Pro(n)	0.63	0.54	-0.21	-0.09	0.37	-0.79	0.33	0.52	0.03	-0.25	-0.29	0.18	0.71	-0.66	0.54	0.56	-0.45	0.30	1.00										
Ast(n)	-0.53	-0.83	0.24	0.30	-0.67	0.49	0.24	-0.44	-0.15	0.22	0.46	0.09	0.20	-0.20	-0.04	-0.05	0.01	0.14	-0.28	1.00									
H ₂ O ₂ (n)	0.77	0.81	-0.27	0.19	0.62	-0.34	-0.33	0.71	-0.52	-0.72	-0.43	0.29	0.33	-0.19	0.28	0.35	-0.35	0.30	0.58	-0.46	1.00								
TBAR(n)	-0.60	-0.38	0.58	0.23	-0.61	0.32	0.11	-0.08	0.19	0.69	0.65	-0.80	-0.53	0.08	-0.92	-0.93	0.85	-0.77	-0.68	0.32	-0.58	1.00							
AS(h)	-0.25	-0.72	-0.13	0.02	-0.21	0.90	-0.33	-0.70	-0.08	-0.18	-0.13	0.50	-0.16	0.41	0.19	0.12	-0.17	0.50	-0.52	0.65	-0.30	0.05	1.00						
AS(r)	-0.18	-0.52	-0.17	0.05	-0.07	0.94	-0.56	-0.57	-0.25	-0.28	-0.12	0.43	-0.33	0.56	0.02	-0.03	-0.05	0.38	-0.64	0.49	-0.13	0.12	0.94	1.00					
PUT(n)	0.61	0.64	-0.34	-0.17	0.53	-0.83	-0.05	0.62	0.24	0.03	-0.20	-0.36	-0.06	-0.20	-0.09	-0.04	0.04	-0.16	0.59	-0.46	0.34	-0.13	-0.73	-0.70	1.00				
CAD(n)	0.61	0.82	-0.02	0.19	0.42	-0.69	-0.10	0.91	-0.06	-0.11	-0.13	-0.48	-0.06	-0.25	-0.33	-0.24	0.19	-0.31	0.46	-0.53	0.58	0.03	-0.76	-0.61	0.85	1.00			
SPD(n)	0.10	-0.07	-0.39	-0.22	0.36	0.31	-0.61	-0.27	0.34	-0.07	-0.45	-0.04	-0.88	0.88	-0.20	-0.20	0.08	0.06	-0.54	-0.26	-0.32	0.23	0.19	0.27	0.09	-0.02	1.00		
SPM(n)	-0.15	-0.32	-0.07	0.13	0.04	0.57	-0.38	-0.37	0.09	-0.23	-0.43	0.22	-0.60	0.77	0.00	0.01	-0.16	0.26	-0.64	-0.06	-0.38	0.16	0.44	0.45	-0.37	-0.35	0.82	1.00	

Valor crítico
 $P \leq 0.05$ 0.01 0.001
0.70 0.83 0.92

Tabla 3.4. Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con el crecimiento peso seco planta (PSP), peso seco parte aérea (PSPA), peso seco raíz (PSR), actividad nitrogenasa aparente (ANA), tasa fijación nitrógeno (TFN), actividades enzimáticas superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa (POX), lipoxigenasa (LOX), ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR), ascorbato total (Asctot), ascorbato reducido (AsA), glutatión total (Glutot), glutatión reducido (GSH), diamino propano (DAP), putrescina (PUT), cadaverina (CAD), espermidina (SPD) y espermina (SPM) en plantas de *M. sativa*. Los símbolos seguidos de "h", "r" y "n" indican hoja, raíz y nódulo respectivamente

	PSP	PSPA	PSR	ANA	TFN	SOD (n)	POX (n)	LOX (n)	APX (n)	GR (n)	Asc tot(n)	AsA (n)	Glu tot(n)	GSH (n)	DAP (h)	PUT (h)	CAD (h)	SPD (h)	SPM (h)	DAP (r)	PUT (r)	CAD (r)	SPD (r)	DAP (n)	PUT (n)	CAD (n)	SPD (n)	SPM (n)	
PSP	1.00																												
PSPA	0.96	1.00																											
PSR	0.94	0.98	1.00																										
ANA	0.85	0.70	0.66	1.00																									
TFN	0.67	0.62	0.72	0.51	1.00																								
SOD(n)	-0.34	-0.24	-0.24	-0.47	-0.21	1.00																							
POX(n)	-0.42	-0.45	-0.56	-0.24	-0.91	-0.03	1.00																						
LOX(n)	-0.48	-0.35	-0.25	-0.54	-0.26	-0.01	0.08	1.00																					
APX(n)	-0.22	-0.03	-0.01	-0.35	0.09	0.70	-0.36	0.30	1.00																				
GR(n)	0.48	0.31	0.18	0.78	-0.03	-0.21	0.29	-0.71	-0.41	1.00																			
Asctot(n)	-0.16	0.00	-0.06	-0.12	-0.17	-0.32	0.01	0.33	0.23	-0.22	1.00																		
AsA(n)	0.22	0.30	0.36	0.18	0.13	-0.47	-0.10	0.70	0.06	-0.24	0.45	1.00																	
Glutot(n)	0.14	0.02	-0.02	0.29	-0.12	-0.90	0.40	-0.09	-0.85	0.29	0.19	0.21	1.00																
GSH(n)	0.13	0.03	0.02	0.24	-0.07	-0.92	0.31	0.03	-0.84	0.15	0.21	0.31	0.98	1.00															
DAP(h)	0.52	0.58	0.62	0.53	0.63	-0.22	-0.67	0.13	0.38	0.03	0.42	0.60	-0.20	-0.15	1.00														
PUT(h)	0.46	0.40	0.49	0.53	0.76	0.05	-0.80	-0.09	0.31	0.11	-0.14	0.21	-0.43	-0.38	0.79	1.00													
CAD(h)	0.30	0.26	0.33	0.49	0.38	-0.12	-0.44	0.25	0.25	0.14	0.17	0.57	-0.24	-0.18	0.84	0.82	1.00												
SPD(h)	0.62	0.53	0.61	0.63	0.90	-0.05	-0.86	-0.33	0.17	0.20	-0.21	0.05	-0.30	-0.27	0.71	0.94	0.64	1.00											
SPM(h)	-0.14	-0.21	-0.09	0.07	0.39	0.03	-0.59	0.23	0.23	-0.20	0.04	0.15	-0.32	-0.24	0.51	0.76	0.73	0.61	1.00										
DAP(r)	-0.34	-0.34	-0.20	-0.46	0.04	0.23	-0.02	0.54	0.21	-0.54	-0.46	0.14	-0.20	-0.14	-0.27	-0.06	-0.15	-0.12	0.02	1.00									
PUT(r)	-0.46	-0.46	-0.49	-0.35	-0.42	0.89	0.23	-0.13	0.46	0.09	-0.40	-0.60	-0.70	-0.77	-0.37	-0.02	-0.10	-0.13	0.08	0.14	1.00								
CAD(r)	-0.44	-0.32	-0.38	-0.52	-0.58	0.90	0.37	0.06	0.55	-0.09	-0.18	-0.39	-0.69	-0.74	-0.39	-0.27	-0.24	-0.41	-0.23	0.13	0.87	1.00							
SPD(r)	-0.44	-0.35	-0.47	-0.38	-0.92	0.31	0.79	0.19	-0.03	0.09	0.17	-0.08	-0.03	-0.06	-0.46	-0.61	-0.24	-0.77	-0.38	-0.23	0.43	0.66	1.00						
DAP(n)	0.09	-0.07	-0.21	0.38	-0.31	-0.30	0.47	-0.69	-0.67	0.76	-0.06	-0.50	0.53	0.41	-0.37	-0.30	-0.25	-0.17	-0.23	-0.66	0.04	-0.12	0.30	1.00					
PUT(n)	-0.57	-0.38	-0.32	-0.68	-0.02	0.39	-0.36	0.51	0.70	-0.78	0.51	0.06	-0.52	-0.44	0.20	0.08	0.07	-0.05	0.42	0.14	0.17	0.25	-0.01	-0.57	1.00				
CAD(n)	-0.77	-0.71	-0.81	-0.51	-0.84	0.37	0.62	0.22	0.28	0.00	0.38	-0.21	-0.15	-0.22	-0.33	-0.45	-0.14	-0.62	-0.04	-0.15	0.57	0.60	0.73	0.22	0.37	1.00			
SPD(n)	0.03	-0.07	0.00	0.18	0.21	-0.90	-0.07	0.30	-0.55	-0.12	0.31	0.51	0.77	0.84	0.19	0.01	0.18	0.04	0.24	0.05	-0.81	-0.88	-0.38	0.05	-0.09	-0.28	1.00		
SPM(n)	-0.17	-0.35	-0.26	-0.04	-0.12	-0.34	0.31	0.22	-0.65	0.00	-0.57	0.08	0.46	0.51	-0.46	-0.18	-0.12	-0.19	0.04	0.54	-0.13	-0.29	-0.06	0.10	-0.46	-0.21	0.48	1.00	

Valor crítico
P ≤ 0.05 0.01 0.001
0.70 0.83 0.92

Tabla 3.5. Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con el crecimiento peso seco planta (PSP), tasa fijación nitrógeno (TFN), actividades enzimáticas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasa (POX), lipoxigenasa (LOX), prolina (Pro), azúcares (Ast), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), peroxidación de lípidos (TBAR), ácido salicílico (AS), ácido abscísico, diaminopropano (DAP), putrescina (PUT), cadaverina (CAD), espermidina (SPD) y espermina (SPM) en plantas de *M. sativa*. Los símbolos seguidos de "h", "r" y "n" indican hoja, raíz y nódulo respectivamente

	PSP	TFN	SOD (n)	CAT (n)	POX (n)	LOX (n)	Pro (h)	Ast (h)	H ₂ O ₂ (h)	TBAR (h)	Pro (n)	Ast (n)	H ₂ O ₂ (n)	TBAR (n)	AS (h)	AS (r)	ABA (h)	ABA (r)	DAP (r)	PUT (r)	CAD (r)	SPD (r)	DAP (n)	PUT (n)	CAD (n)	SPD (n)	SPM (n)		
PSP	1.00																												
TFN	0.67	1.00																											
SOD(n)	-0.34	-0.21	1.00																										
CAT(n)	0.68	0.74	-0.71	1.00																									
POX(n)	-0.42	-0.91	-0.03	-0.58	1.00																								
LOX(n)	-0.48	-0.26	-0.01	-0.16	0.08	1.00																							
Pro(h)	-0.38	-0.83	-0.03	-0.55	0.78	0.26	1.00																						
Ast(h)	-0.56	-0.72	-0.21	-0.46	0.75	0.61	0.73	1.00																					
H ₂ O ₂ (h)	0.70	0.67	-0.73	0.78	-0.36	-0.51	-0.43	-0.34	1.00																				
TBAR(h)	-0.14	-0.56	0.23	-0.65	0.70	-0.22	0.49	0.48	-0.15	1.00																			
Pro(n)	-0.49	-0.87	0.15	-0.57	0.69	0.40	0.91	0.63	-0.66	0.31	1.00																		
Ast(n)	-0.44	-0.94	0.19	-0.64	0.90	0.26	0.83	0.69	-0.61	0.61	0.87	1.00																	
H ₂ O ₂ (n)	0.27	0.28	0.44	-0.25	-0.32	-0.51	-0.10	-0.41	0.13	0.34	-0.20	-0.27	1.00																
TBAR(n)	-0.89	-0.77	0.49	-0.83	0.52	0.33	0.58	0.48	-0.81	0.22	0.66	0.56	-0.11	1.00															
AS(h)	0.13	0.22	0.32	-0.14	-0.15	-0.86	-0.38	-0.55	0.28	0.28	-0.48	-0.33	0.62	-0.06	1.00														
AS(r)	-0.22	0.00	0.45	-0.37	0.04	-0.60	-0.33	-0.31	-0.01	0.31	-0.40	-0.18	0.36	0.24	0.88	1.00													
ABA(h)	-0.52	-0.10	0.40	-0.20	-0.25	0.09	-0.11	-0.19	-0.38	-0.26	0.17	-0.03	0.12	0.36	0.15	0.15	1.00												
ABA(r)	-0.46	0.19	0.30	-0.10	-0.53	0.30	-0.23	-0.15	-0.24	-0.40	-0.04	-0.35	0.25	0.27	0.04	0.04	0.83	1.00											
DAP(r)	-0.34	0.04	0.23	-0.30	-0.02	0.54	-0.22	0.38	-0.24	0.20	-0.24	-0.06	-0.09	0.12	-0.16	0.15	-0.14	0.15	1.00										
PUT(r)	-0.46	-0.42	0.89	-0.85	0.23	-0.13	0.21	-0.04	-0.69	0.38	0.27	0.30	0.43	0.70	0.42	0.59	0.23	0.14	0.14	1.00									
CAD(r)	-0.44	-0.58	0.90	-0.84	0.37	0.06	0.32	0.09	-0.85	0.44	0.49	0.58	0.24	0.64	0.14	0.31	0.28	0.04	0.13	0.87	1.00								
SPD(r)	-0.44	-0.92	0.31	-0.69	0.79	0.19	0.88	0.56	-0.67	0.54	0.94	0.95	-0.08	0.64	-0.25	-0.17	0.11	-0.20	-0.23	0.43	0.66	1.00							
DAP(n)	0.09	-0.31	-0.30	-0.06	0.47	-0.69	0.41	0.03	0.34	0.38	0.19	0.23	0.18	0.09	0.47	0.29	-0.14	-0.38	-0.66	0.04	-0.12	0.30	1.00						
PUT(n)	-0.57	-0.02	0.39	-0.11	-0.36	0.51	-0.20	-0.10	-0.56	-0.56	0.14	-0.10	-0.22	0.40	-0.24	-0.08	0.82	0.80	0.14	0.17	0.25	-0.01	-0.57	1.00					
CAD(n)	-0.77	-0.84	0.37	-0.66	0.62	0.22	0.59	0.40	-0.77	0.13	0.72	0.67	-0.34	0.91	-0.11	0.16	0.33	0.05	-0.15	0.57	0.60	0.73	0.22	0.37	1.00				
SPD(n)	0.03	0.21	-0.90	0.58	-0.07	0.30	0.00	0.35	0.55	-0.35	-0.16	-0.27	-0.49	-0.28	-0.43	-0.43	-0.20	0.03	0.05	-0.81	-0.88	-0.38	0.05	-0.09	-0.28	1.00			
SPM(n)	-0.17	-0.12	-0.34	-0.21	0.31	0.22	0.28	0.65	0.23	0.49	-0.03	0.06	0.08	0.06	-0.08	0.02	-0.44	-0.11	0.54	-0.13	-0.29	-0.06	0.10	-0.46	-0.21	0.48	1.00		

Valor crítico
P ≤ 0.05 0.01 0.001
0.70 0.83 0.92

4. Efecto del ácido abscísico en las simbiosis *Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium tropici* y *Medicago sativa*-*Sinorhizobium meliloti* en estrés salino

En este experimento se aborda el efecto de la aplicación exógena de ácido abscísico en el crecimiento, fijación de nitrógeno, metabolismo oxidativo nodular, y contenido de ácido salicílico, ácido abscísico y poliaminas endógenas en condiciones de estrés salino, en dos simbiosis: *P. vulgaris*-*R. tropici* (nódulos determinados) y *M. sativa*-*S. meliloti* (nódulos indeterminados).

Las plantas de judía inoculadas con *R. tropici* crecieron con solución nutritiva hasta el día 23 de cultivo (crecimiento vegetativo), momento en el cual se adicionó al medio el tratamiento de ABA (0, 1 y 10 μ M), y 2 días después el salino (0 y 100 mM de NaCl), manteniéndose ambos tratamientos hasta el final del tiempo de experimentación. Se realizaron dos cosechas, a los 3 y 6 días de la adición de NaCl, coincidiendo con inicio de floración y floración respectivamente.

Las plantas de alfalfa inoculadas con *S. meliloti* crecieron con solución nutritiva hasta el día 49 de cultivo (crecimiento vegetativo), momento en el cual se adicionó al medio el tratamiento de ABA (0, 1 y 10 μ M), y 2 días después el salino (0 y 200 mM de NaCl), manteniéndose ambos tratamientos hasta la cosecha del experimento. La recolecta de material vegetal se realizó a los 6 y 12 días de tratamiento de NaCl, coincidiendo con inicio de floración y floración respectivamente.

4.1. Experimento con *Phaseolus vulgaris*

4.1.1. Análisis del crecimiento

Los parámetros estudiados que se relacionan con el crecimiento de plantas de judía se detallan en la figura 4.1, en la que se expone el peso seco de planta, el peso seco de parte aérea, el peso seco de raíz y la relación raíz/parte aérea. Los datos numéricos y el análisis de la varianza se reflejan en las tablas del apéndice A 4.1 y 4.2.

El ácido abscísico no causó cambios significativos en el **peso seco de planta** a los 3 DTS, mientras que a los 6 DTS se produce un descenso del 45% y del 20% con 1 μ M y 10 μ M de ABA respectivamente. La salinidad, como se observa en la figura 4.1, provocó una disminución en el crecimiento semejante a la descrita para el ABA, siendo del 40% en la primera cosecha, y del 20% en la segunda, sin embargo en presencia de ABA (tratamiento combinado) en el primer muestreo fue tan sólo del 25%.

Los **pesos secos de parte aérea y raíz** mostraron el mismo comportamiento que el PSP, disminuyendo con el ABA y con el tratamiento salino. Por otra parte, la **relación raíz/parte aérea** con la dosis más elevada de ABA (10

μM) presentó un incremento del 20% respecto al control en ambas cosechas, también el estrés salino provocó un aumento de este parámetro aunque no con diferencias significativas.

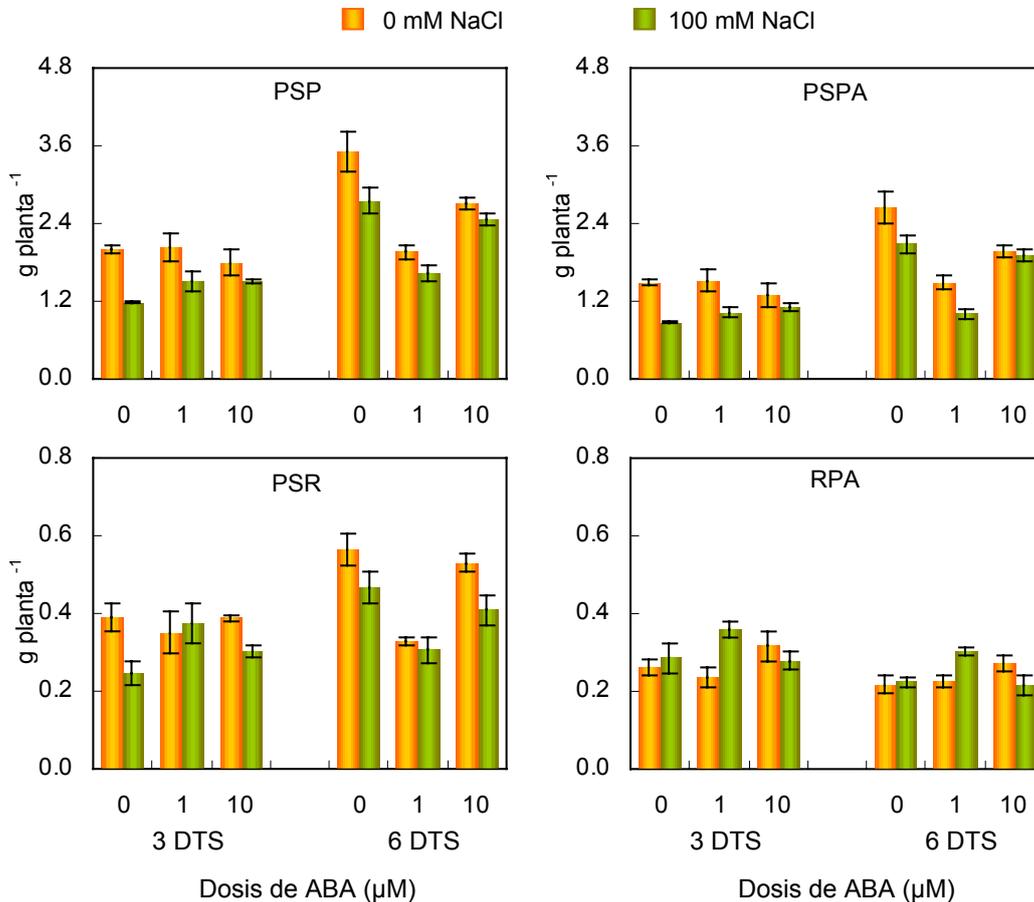


Figura 4.1. Peso seco de planta (PSP), peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de raíz (PSR) y relación raíz/parte aérea (RPA) de plantas de *P. vulgaris* crecidas con diferentes dosis de ABA (0, 1, 10 μM) y NaCl (0, 100 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=10) con el error estándar.

4.1.2. Fijación de nitrógeno

Relacionado con el proceso de fijación de nitrógeno, se han evaluado los parámetros representados en la figura 4.2, en la que se contempla la actividad nitrogenasa aparente, actividad nitrogenasa total, tasa de fijación de nitrógeno y peso seco de nódulos. Los datos numéricos y análisis de la varianza se recogen en las tablas de A 4.3 y 4.4 del apéndice.

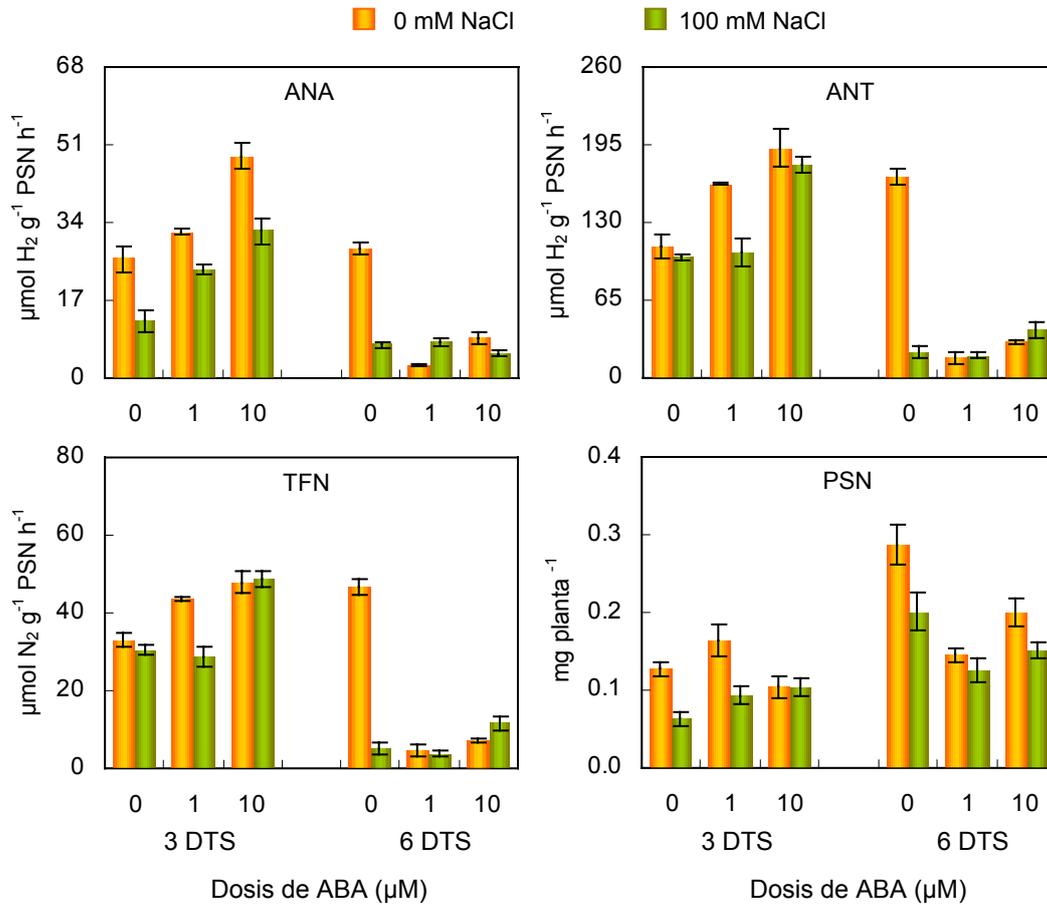


Figura 4.2. Actividad nitrogenasa aparente (ANA), actividad nitrogenasa total (ANT), tasa de fijación de nitrógeno (TFN) y peso seco de nódulo (PSN) de plantas de *P. vulgaris* crecidas con diferentes dosis de ABA (0, 1, 10 μM) y NaCl (0, 100 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=10) con el error estándar.

Al inicio de floración el tratamiento hormonal estimuló la **actividad nitrogenasa aparente y total**, y por lo tanto incrementó la **tasa de fijación de nitrógeno** de forma proporcional a la concentración de ABA, de hecho con 10 μM, la ANA aumentó en un 50%, la ANT en un 40% y la TFN en un 35%, mientras que en plena floración el tratamiento con ABA induce un drástico descenso en los tres parámetros citados anteriormente. El estrés salino provocó una disminución generalizada en todos estos parámetros de fijación de nitrógeno en ambos muestreos, siendo más acentuada al incrementarse el tiempo de exposición al NaCl (segunda cosecha), donde se alcanzaron descensos en la ANA, ANT y TFN del 75%, 85% y 90% respectivamente. Un aspecto destacable es que las plantas con tratamiento combinado (ABA + NaCl) presentaron una mayor fijación de nitrógeno que las salinizadas (3 DTS), resultados que coinciden con los del crecimiento, y

permiten intuir una mejora en el estado fisiológico de la planta en esta situación de estrés por la aplicación de ABA.

En el diagrama de barras de la figura 4.2, correspondiente al **peso seco de nódulo** se aprecia que la biomasa nodular disminuye con el ABA, excepto durante el primer muestreo con 1 μM de ABA, donde se evidencia un aumento del 20%. La salinidad por su parte también induce un descenso en el PSN. El análisis de varianza de los distintos parámetros estudiados (tabla A 4.4), indica la variabilidad observada se debe prioritariamente al tiempo de experimentación.

4.1.3. Actividad aldehído oxidasa

En la figura 4.3 se observa que la actividad **aldehído oxidasa** por tinción en geles de poliacrilamida y se aprecie que en hoja tres isoformas, siendo más activa la AAO3, sin embargo en nódulo sólo se detecta una.

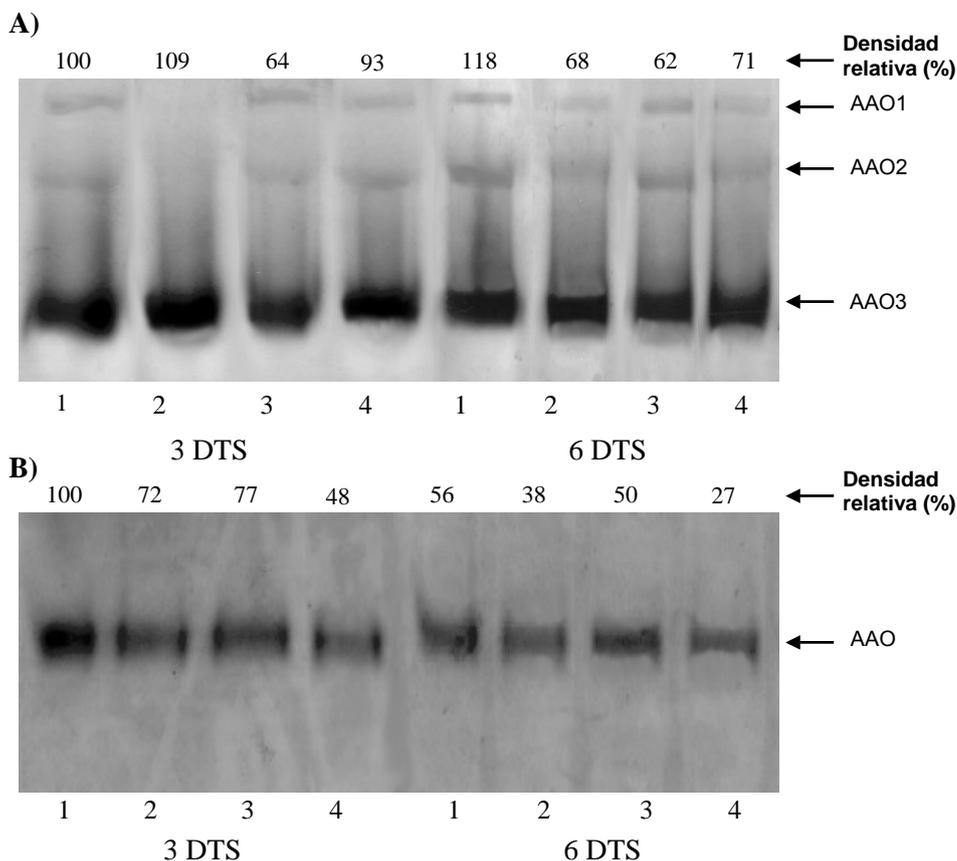


Figura 4.3. Patrón de bandas de actividad aldehído oxidasa en hoja (A) y nódulo (B) de *P. vulgaris* en gel nativo, detectada con el sustrato indol-3-aldehído. 1 (control), 2 (100 mM NaCl), 3 (10 μM ABA) y 4 (10 μM ABA + 100 mM NaCl). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. El zimograma representa una de las tres repeticiones que mostraron resultados similares.

La actividad AAO foliar incrementó (18%) con el tiempo de experimentación, mientras que la nodular disminuyó en un 44%. La aplicación exógena de ABA provocó en la actividad de hoja un descenso del 35% en los dos muestreos realizados, mientras que la salinidad en el primer muestreo la estimuló un 9% y en el segundo se detecta una caída superior al 30%. El tratamiento combinado (ABA+NaCl) favoreció que se inhibiera esta catálisis enzimática en un 7% a los 3DTS y en un 30% a los 6DTS. En nódulo tanto el ABA como la salinidad provocan un efecto similar al descrito en hoja con una disminución de la AAO del 25% en el primer muestreo, y del 50% (ABA) y el 62% (NaCl) en el segundo.

4.1.4. Actividades enzimáticas antioxidantes

En las figuras 4.4 y 4.5 se muestran las actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo oxidativo determinadas en nódulo: superóxido dismutasa, catalasa, guaiacol peroxidasa, ascorbato peroxidasa, monodehidroascorbato reductasa, glutatión reductasa y dehidroascorbato reductasa. En el apéndice se recogen los datos numéricos y el análisis de la varianza, también se presentan los datos numéricos y estadísticos de estas actividades cuando se expresan por peso fresco (tablas A 4.5-A 4.12).

El tratamiento de ABA provocó un aumento en la actividad **superóxido dismutasa** en el primer muestreo, aunque no fue significativa (Fig. 4.4). En el segundo esta actividad enzimática mostró una respuesta diferente según la dosis de ABA, así con 1 μM se incrementó un 20% respecto al control, en cambio con 10 μM descendió un 20%. En los nódulos de plantas tratadas con NaCl se observó un aumento entre el 15-20% de la SOD en ambas recolectas, sin embargo en los nódulos procedentes de plantas con 10 μM de ABA y NaCl disminuyó, alcanzando un 30% a los 6 DTS.

La actividad **catalasa** en los dos muestreos aumentó proporcional a la dosis de ABA, observándose las mayores diferencias respecto al control en la primera recolecta, en la cual se incrementa el 15% y el 30% con 1 y 10 μM respectivamente, mientras que el estrés salino causó una inhibición de alrededor el 50%. En los nódulos de plantas procedentes de tratamientos combinados (ABA+NaCl), se aprecia que efecto positivo del ABA es más intenso que el inhibidor del NaCl, ya que la CAT nodular se mantiene con valores superiores al de nódulos control. El análisis de la varianza (tabla A 4.6 del apéndice) indica que la variabilidad observada en los datos obtenidos de esta actividad es debida al factor tiempo de experimentación (87%). La actividad CAT nodular se correlaciona significativamente de forma negativa con los parámetros de crecimiento, y positivamente con el proceso de fijación de nitrógeno (tabla 4.1).

Resultados

La actividad **peroxidasa** no sufrió cambios significativos en el primer muestreo con el tratamiento hormonal (Fig. 4.4), mientras que a los 6 DTS se estimuló un 60%. La salinidad aumentó la POX en la primera cosecha 2.3 veces respecto a la detectada en nódulos control, y en la segunda prácticamente triplicó su valor. En los tratamientos combinados (ABA+NaCl) no se producen incrementos de actividad mayores a los registrados en condiciones salinas.

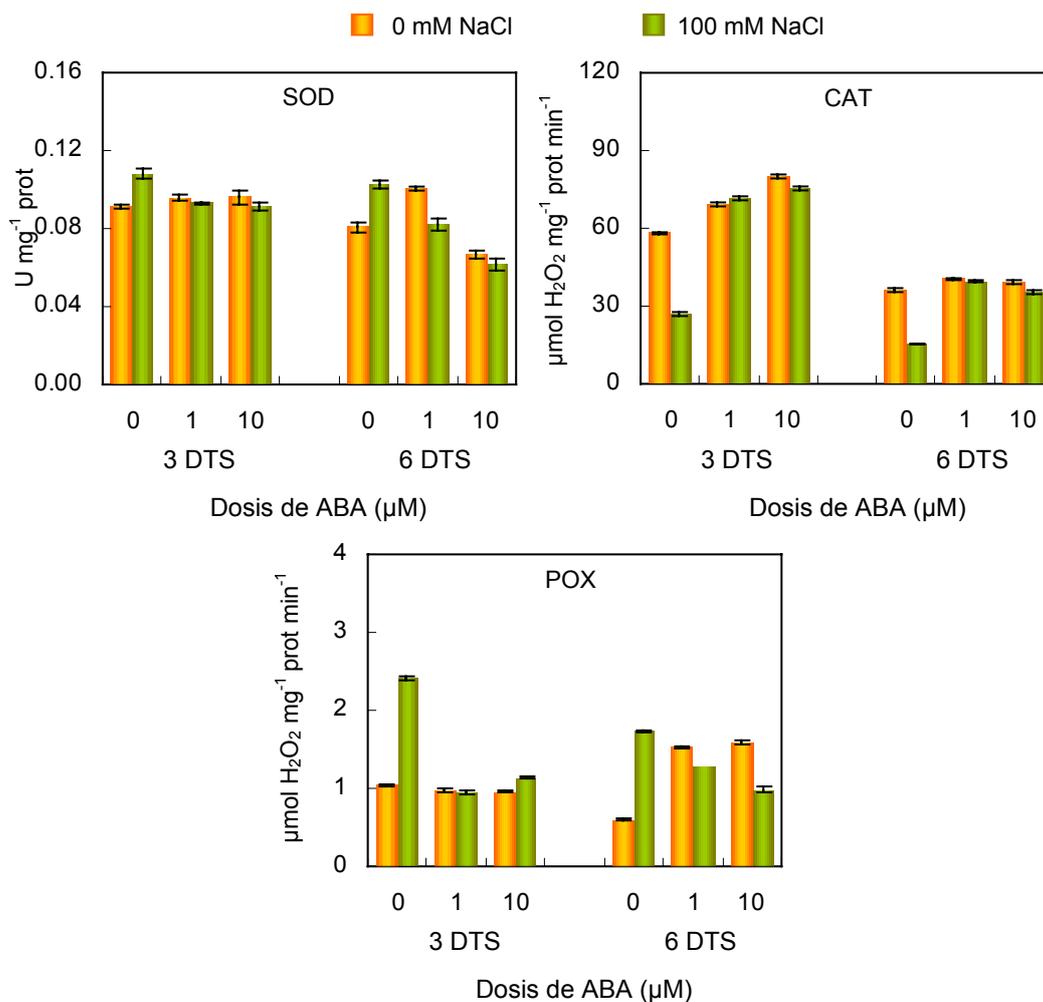


Figura 4.4. Actividades enzimáticas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y guaiacol peroxidasa (POX) en nódulo de plantas de *P. vulgaris* crecidas con diferentes dosis de ABA (0, 1, 10 μM) y NaCl (0, 100 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

En la figura 4.5 se representan en diagramas de barras las actividades enzimáticas antioxidantes del **ciclo ascorbato-glutation** en nódulo de *P. vulgaris*. La actividad **ascorbato peroxidasa** se vio afectada tanto por el tratamiento de ABA como por el estrés salino, de hecho el tratamiento hormonal provocó una inhibición del 20% y del 40% con 1 y 10 μM respectivamente en la primera recolecta, y del 15% en la segunda con ambas dosis, por su parte la salinidad disminuyó la APX nodular entre un 20%-30%.

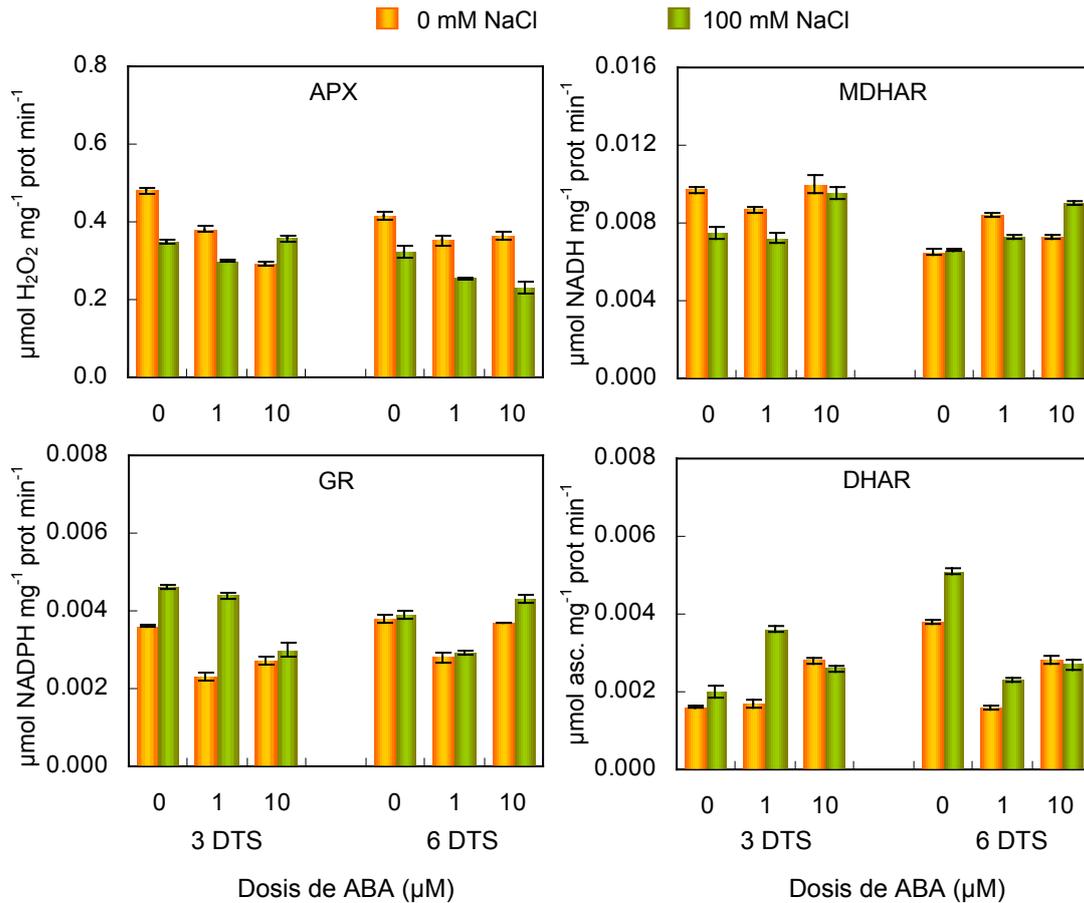


Figura 4.5. Actividades enzimáticas ascorbato peroxidasa (APX), monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), glutation reductasa (GR) y dehidroascorbato reductasa (DHAR) en nódulo de plantas de *P. vulgaris* crecidas con diferentes dosis de ABA (0, 1, 10 μM) y NaCl (0, 100 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra ($n=6$) con el error estándar.

La **monodehidroascorbato reductasa** nodular no varió significativamente con el tratamiento hormonal en el primer muestreo, sin embargo a los 6 DTS se estimula en un 20% con 1 μM de ABA. La salinidad causó un descenso en la

MDHAR del 20% en la primera recolecta, y no provocó cambios en la segunda. Los nódulos de plantas expuestas a los tratamientos combinados experimentaron un aumento en la MDHAR respecto a los salinizados en ambos muestreos, de hecho con 10 μM de ABA + 100 mM de NaCl, la actividad enzimática nodular se incrementó un 20% respecto a la de nódulos de plantas expuestas con sal.

En el diagrama de barras de la figura 4.5 correspondiente a la **glutacion reductasa** se observa que en ambos muestreos el ABA inhibe esta actividad, mientras que estimuló la **dehidroascorbato reductasa** con 10 μM de ABA en la primera recolecta, aunque a los 6 DTS hay una drástica inhibición. En condiciones de estrés salino aumentaron en un 20% las actividades encargadas de regenerar el ascorbato reducido (GR y DHAR) en la primera cosecha, mientras en la segunda no se observan cambios significativos en la GR, en cambio la actividad DHAR es un 25% superior a la de nódulos control.

En relación al estado fenológico del cultivo, en floración (6 DTS) se manifiesta una reducción del 15% en la actividad APX, y del 30% en la actividad MDHAR respecto a las actividades de nódulos recolectados al inicio de floración (3 DTS), por el contrario la actividad DHAR nodular aumentó en un 60%. Se detecta una correlación significativa y positiva de la actividad DHAR con el crecimiento de la planta (tabla 4.2).

4.1.5. Actividad lipoxigenasa

En la figura 4.6 se expone la actividad **lipoxigenasa** nodular, responsable de la oxidación de los ácidos grasos insaturados, formando hidroperóxidos.

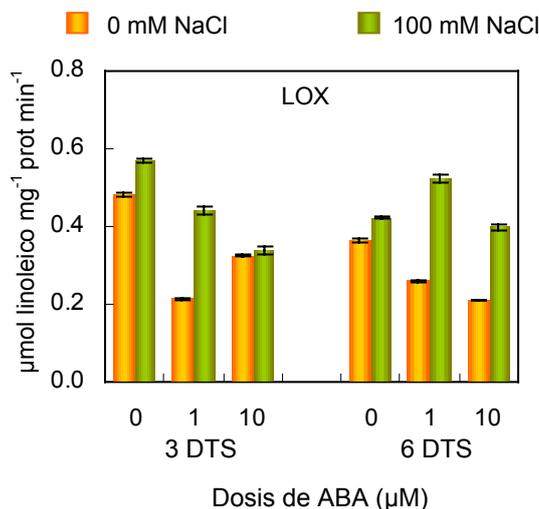


Figura 4.6. Actividad enzimática lipoxigenasa (LOX) en nódulo de plantas de *P. vulgaris* crecidas con diferentes dosis de ABA (0, 1, 10 μM) y NaCl (0, 100 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

La actividad lipoxigenasa experimenta un descenso con el ABA, del 30% en la primera recolecta con 10 μM , y del 40% con esta misma dosis en la segunda. La salinidad estimuló un 15% esta actividad en ambos muestreos. El análisis de la varianza junto con los datos numéricos se presentan en las tablas A 4.5 y A 4.6 del apéndice.

4.1.6. Metabolitos antioxidantes

En las figuras 4.7 y 4.8 se muestra el contenido de las distintas formas de ascorbato y glutation (reducido y oxidado), el total y la relación entre oxidado y reducido, en nódulos de *P. vulgaris*. Los datos numéricos correspondientes estos parámetros junto con su análisis de varianza se recogen en las tablas del apéndice A 4.13-4.16.

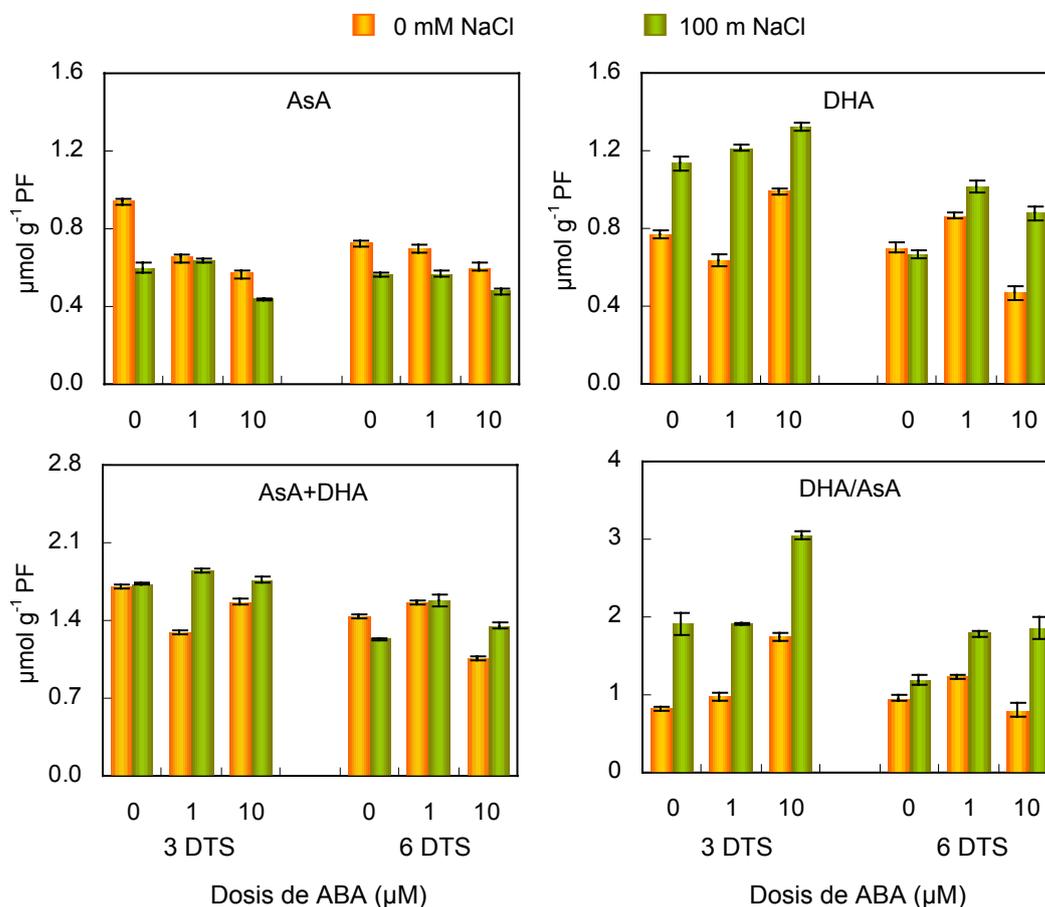


Figura 4.7. Contenido de ascorbato reducido (AsA), oxidado (DHA), total (AsA+DHA) y relación oxidado/reducido (DHA/AsA) en nódulo de plantas de *P. vulgaris* crecidas con diferentes dosis de ABA (0, 1, 10 μM) y NaCl (0, 100 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

El tratamiento de ABA provocó una caída en el **ascorbato reducido** nodular del 30% y del 40% con 1 μM y 10 μM respectivamente en la primera cosecha, mientras que en la segunda no se observan cambios significativos con 1 μM , y descendió un 20% con 10 μM . También el NaCl favoreció un descenso en el contenido de este metabolito, de hecho en la recolecta realizada 3 días después del tratamiento salino se observa una caída del 40%. Los nódulos de plantas tratadas con ABA y NaCl mostraron el contenido de AsA más bajo, así con 10 μM de ABA y 100 mM de NaCl, el descenso del AsA es del 55% y del 35% en inicio de floración y floración respectivamente.

El ABA induce en general la acumulación de **ascorbato oxidado** o **dehidroascorbato** en nódulo al inicio de floración con 1 y 10 μM de ABA, esta misma tendencia es observada en floración con 1 μM de ABA, por el contrario con 10 μM el DHA se reduce un 30%. El nivel de DHA aumenta en presencia de sal (30%), ésta es una respuesta rápida observada sólo en la primera recolecta, puesto que a los 6 DTS no se aprecian cambios significativos. El contenido mayor de DHA se detecta en inicio de floración con 10 μM de ABA y 100 mM de NaCl, donde prácticamente se duplica.

El contenido de **ascorbato total** experimentó un descenso del 20% entre inicio de floración y plena floración. La **relación ascorbato oxidado/reducido** manifestó un marcado aumento con los tratamientos de ABA y NaCl por separado, además en el tratamiento combinado 10 μM y NaCl se multiplicó por 3.7 en la primera recolecta y se duplicó en la segunda. Se aprecia una correlación negativa y estadísticamente significativa del ascorbato oxidado, total y relación oxidado/reducido con los parámetros de crecimiento, y positiva del ascorbato total con los de fijación de nitrógeno (tabla 4.2).

En la figura 4.8 se observan las diferentes formas de glutatión, el total y la relación oxidado/reducido. El **glutatión reducido** disminuye con el ABA y el estrés salino a los 3 y 6 DTS. Asimismo, en nódulos de plantas tratadas con 10 μM ABA y 100 mM NaCl en el segundo muestreo se detecta una disminución del 60% en el contenido de GSH. El contenido de **glutatión oxidado** no muestra cambios significativos por el tratamiento hormonal en el primer muestreo, pero en el segundo aumenta. El estrés salino disminuye el nivel de GSSG en un 20% en ambas recolectas, sin embargo los tratamientos combinados (ABA+NaCl) favorecen la acumulación de GSSG.

El **glutatión total** mostró una respuesta contraria a la descrita para el ascorbato total con el tiempo de experimentación, puesto que éste último disminuye entre inicio y plena floración, y el glutatión total aumenta en un 20% (Figs. 4.7 y 4.8). En cuanto a la relación **glutatión oxidado/reducido** incrementa

proporcional a la dosis ABA, y no varía con el tratamiento salino, sin embargo en los tratamientos (ABA + NaCl) es donde se alcanzan los valores más elevados.

El estudio del análisis de la varianza de los datos correspondientes a las distintas formas de glutatión estudiadas nos revela que en todas ellas entre el 65-75% de la variabilidad observada se debe al tratamiento hormonal (tabla A 4.16). El glutatión total se correlaciona positivamente con el ascorbato reducido ($r= 0.70$), y el glutatión oxidado con la actividad MDHAR ($r= 0.76$) y DHAR ($r= -0.76$) de nódulo (tabla 4.2).

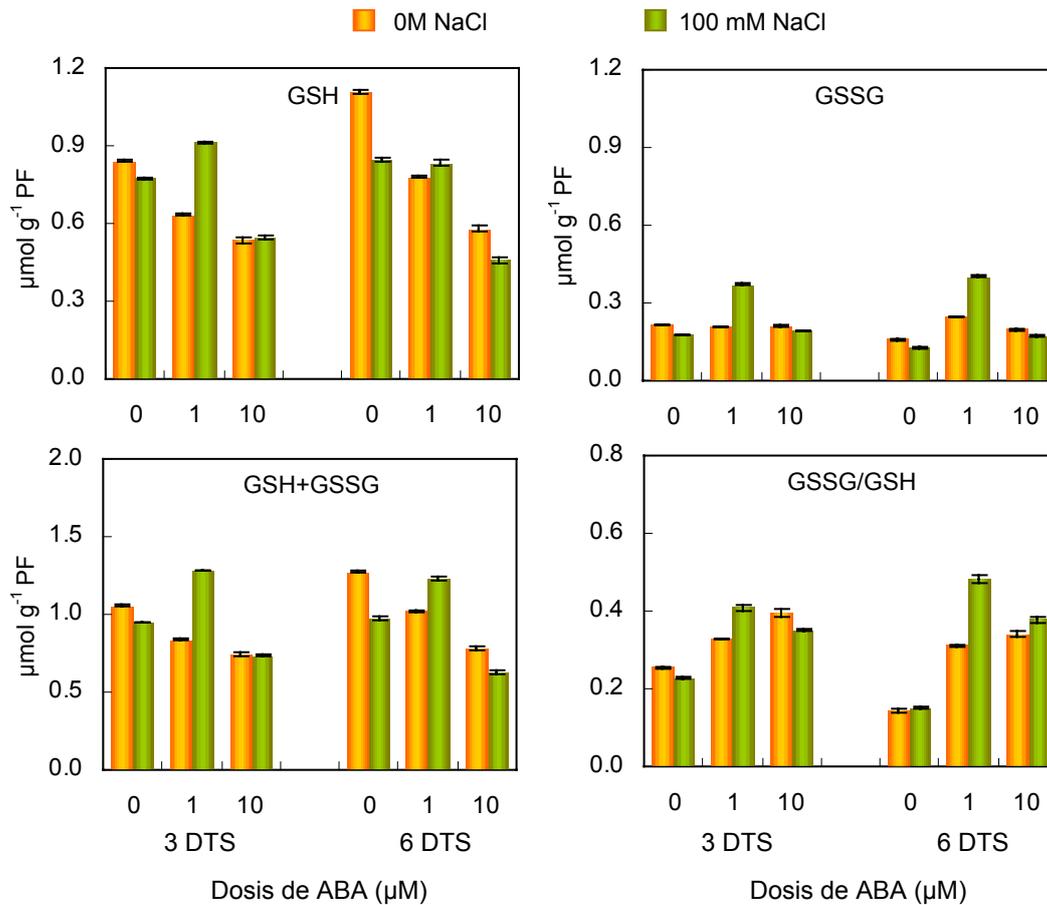


Figura 4.8. Contenido de glutatión reducido (GSH), oxidado (GSSG), total (GSH+GSSG) y relación oxidado/reducido (GSSG/GSH) en nódulo de plantas de *P. vulgaris* crecidas con diferentes dosis de ABA (0, 1, 10 μM) y NaCl (0, 100 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra ($n=6$) con el error estándar.

4.1.7. Otros metabolitos

En la figura 4.9 se puede visualizar el contenido de aminoácidos, prolina y azúcares solubles totales en hoja y nódulo de *P. vulgaris*. Los datos numéricos y el análisis de la varianza para éstas determinaciones se recogen en las tablas A 4.17-4.20 del apéndice.

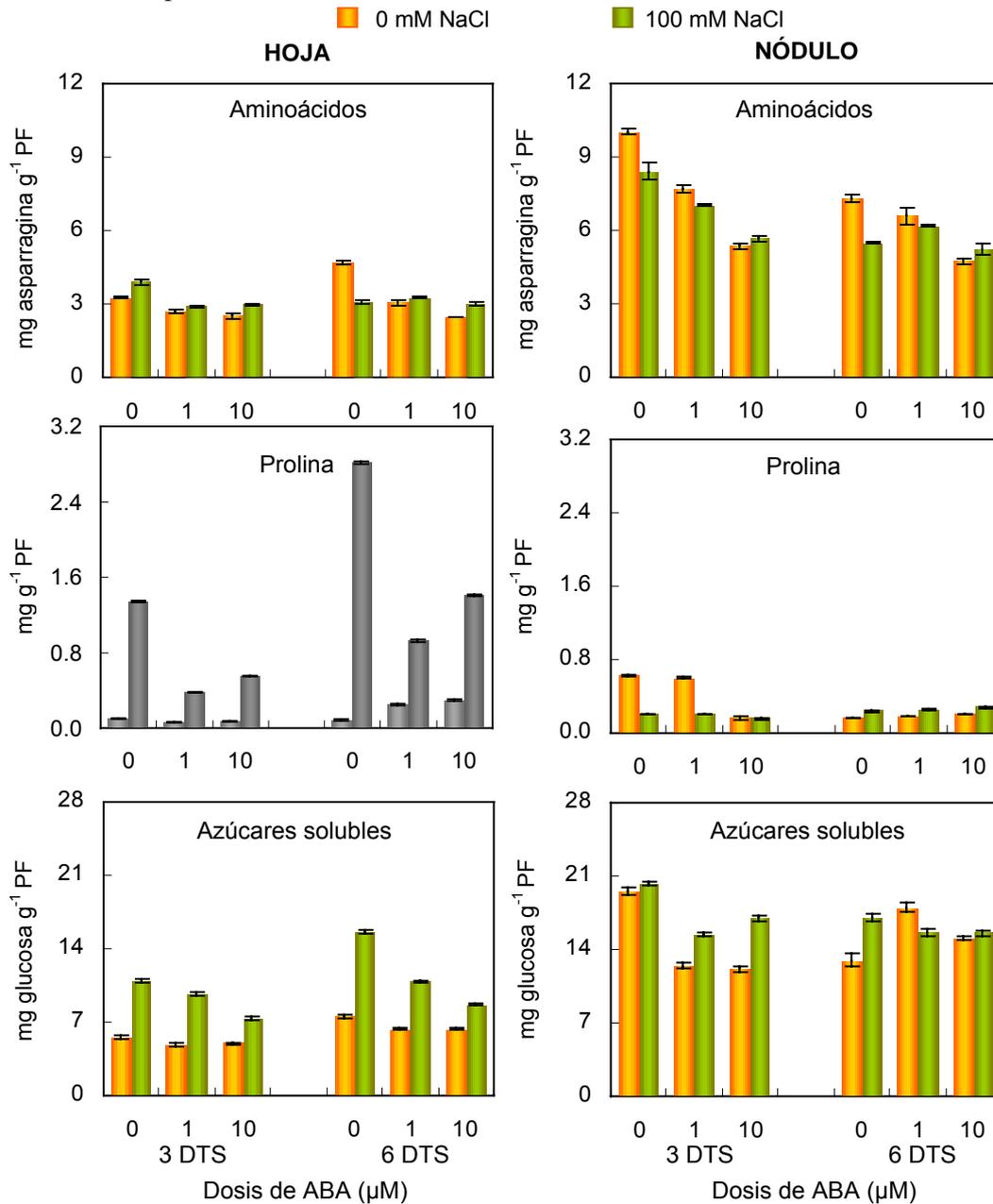


Figura 4.9. Contenido de aminoácidos, prolina y azúcares solubles totales en hoja y nódulo de plantas de *P. vulgaris* crecidas con diferentes dosis de ABA (0, 1, 10 μM) y NaCl (0, 100 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

El tratamiento de ABA produjo una disminución proporcional a la dosis, en el contenido de **aminoácidos totales** de **hoja** y **nódulo** en ambos muestreos, de hecho con 10 μM en la primera recolecta se observa un descenso del 20% en hoja y del 50% en nódulo, mientras que en la segunda la disminución en hoja fue del 50%, y en nódulo del 30% respecto al control. El estrés salino aumentó los Aa en hoja a los 3 DTS, mientras que a los 6 DTS disminuyó un 30%. En nódulos los Aa disminuyen con la sal en ambas recolectas, y es mayor en floración.

La acumulación de **prolina** a causa del ABA exógeno exhibe una tendencia semejante en ambos órganos, disminuye drásticamente en la primera recolecta, un 30% en hoja y un 75% en nódulo con 10 μM , y aumenta un 70% en hoja y un 20% en nódulo en la segunda. El NaCl favorece el aumento de prolina en **hoja**, sin embargo en el tratamiento combinado (ABA+NaCl) el incremento inducido es menor. En **nódulo** la salinidad provocó un descenso del 70% al inicio de floración, y un aumento del 30% en plena floración.

En los diagramas de barras de la figura 4.9 relativo al contenido de **azúcares solubles totales** en hoja y nódulo de *P. vulgaris*, se detecta que en **hoja** y **nódulo** el tratamiento con ABA causó un descenso en el contenido de Ast, que llegó en nódulo a ser del 40% en la primera recoleta con las dos dosis de ABA, aunque a los 6 DTS en nódulo aumento de este parámetro. El estrés salino favoreció la acumulación de Ast en ambos órganos, siendo del 50% en hoja y del 25% en nódulo a los 6 DTS.

Los aminoácidos libres y los azúcares solubles totales que contribuyen al ajuste osmótico, se acumulan principalmente en nódulo, donde los niveles de ambos parámetros triplican a los detectados en hoja. En cambio, el contenido de prolina es mayor en hoja que en nódulo. El análisis de la varianza indica que la variabilidad detectada en los valores de estos metabolitos (tablas A 4.18 y A 4.20) se debió principalmente al estrés salino (60%). La acumulación de Aa y prolina de nódulo se correlaciona de forma positiva y significativamente ($P \leq 0.05$) con las actividades enzimáticas antioxidantes (APX y GR) y con la LOX (tabla 4.1). Los Aa de hoja se correlacionan positivamente con el contenido de glutation total y reducido, y negativamente con la relación oxidado/reducido ($P \leq 0.01$) (tabla 4.2).

4.1.8. Peroxidación de lípidos y peróxido de hidrógeno

Se determinó la peroxidación de lípidos y el contenido de peróxido de hidrógeno en hoja y nódulo de *P. vulgaris*. Los datos numéricos correspondientes y el análisis de la varianza se recogen en las tablas A 4.21 y A 4.22 del apéndice.

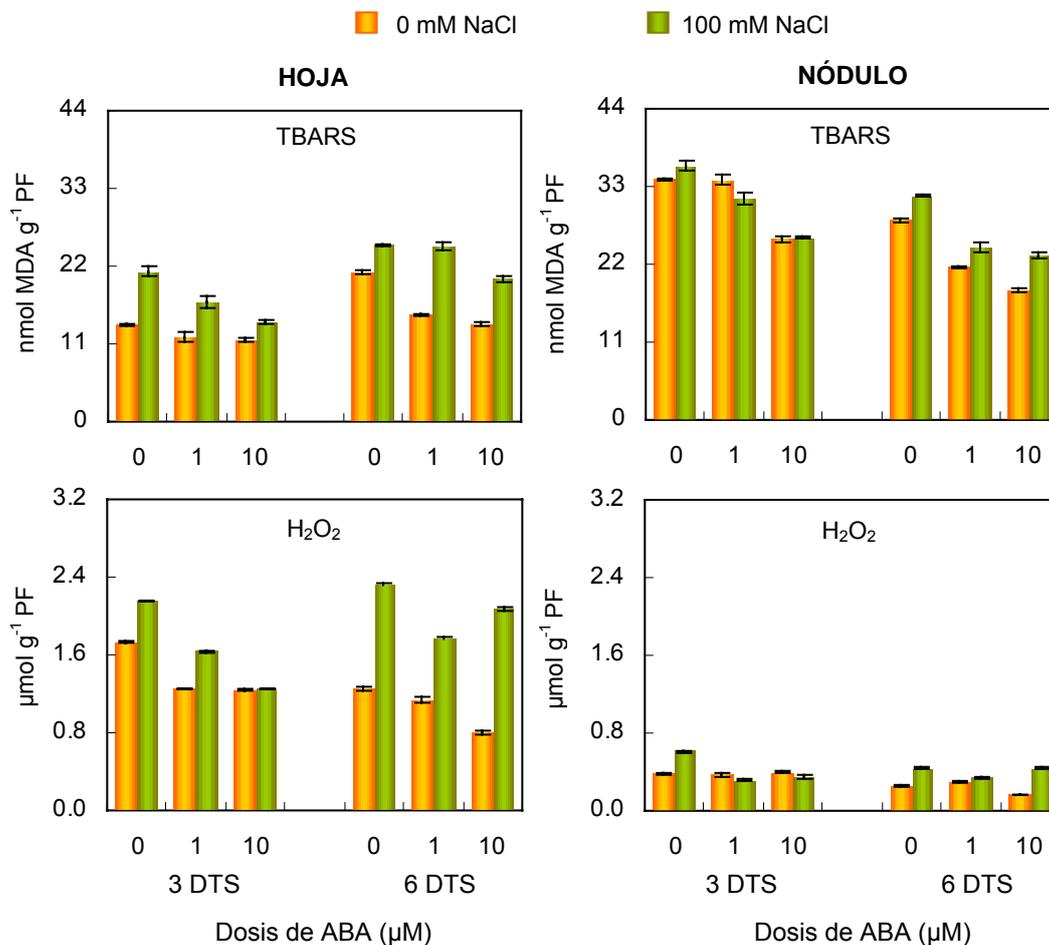


Figura 4.10. Contenido de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) y de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en hoja y nódulo de plantas de *P. vulgaris* crecidas con diferentes dosis de ABA (0, 1, 10 μM) y NaCl (0, 100 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

En la figura 4.10 se representa el contenido de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) y de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en hoja y nódulo. En el diagrama de barras correspondiente a la **peroxidación lipídica en hoja** se observa que el tratamiento de ABA disminuye el contenido de TBARS, en el segundo muestreo es del 30-35% con ambas dosis de ABA. Por el contrario, el estrés salino induce el aumento de TBARS en hoja tanto de plantas tratadas con ABA como en las no tratadas, aunque en presencia de ABA (ABA+NaCl) el daño oxidativo inducido por la salinidad es menor. La **peroxidación de lípidos en nódulo** es similar a la descrita en hoja, sugiriendo que el ABA disminuye el contenido de TBARS y el NaCl lo aumenta. El tratamiento combinado (ABA + NaCl) provocó en la segunda recolecta que la peroxidación lipídica de nódulo fuera un 25% menor

que en los nódulos de plantas tratadas con sal. La peroxidación lipídica foliar se correlaciona significativamente de forma negativa con las actividades enzimáticas antioxidantes CAT y MDHAR, y el glutatión oxidado nodular ($P \leq 0.05$), y positivamente con el contenido en hoja de prolina ($r= 0.76$) y azúcares solubles totales ($r= 0.83$) (tabla 4.2). La peroxidación lipídica nodular se correlaciona negativamente con los parámetros de crecimiento, y positivamente con la actividad SOD y LOX nodular, y el contenido de aminoácidos de nódulo ($P \leq 0.05$) (tabla 4.1).

La formación de **peróxido de hidrógeno** es semejante en hoja y nódulo de *P. vulgaris*, ya que disminuye con el ABA exógeno, y aumenta con el NaCl en las dos recolectas. En la primera la salinidad provocó un incremento del 20% del contenido de H_2O_2 de hoja, y del 40% en nódulo, y en la segunda el aumento en ambos órganos fue del 50-60%. En este muestreo, las plantas tratadas con $10 \mu M$ de ABA mostraron un descenso del 65% en hoja y nódulo. Es interesante señalar que en hoja los niveles de H_2O_2 superan a los detectados en nódulo, posiblemente debido al excelente sistema antioxidante que posee este último. El contenido de peróxido nodular se correlaciona con la actividad APX nodular ($r= 0.93$) (tabla 4.1), mientras que el foliar se correlaciona con el ascorbato reducido ($r= 0.76$) y el glutatión total ($r= 0.75$) (tabla 4.2).

4.1.9. Ácido salicílico y ácido abscísico endógeno

El contenido de ácido salicílico y ácido abscísico endógeno en hoja y raíz de *P. vulgaris* se representa en la figura 4.11. El estudio estadístico de la varianza y los datos numéricos se recopilan en las tablas A 4.23 y A 4.24 del apéndice.

El contenido de **ácido salicílico endógeno** en hoja y raíz de plantas tratadas con ABA disminuyó proporcional a la dosis de ABA, a los 6 DTS el descenso en hoja fue del 55% con $1 \mu M$ de ABA, y del 78% con $10 \mu M$ de ABA, y en raíz del 75% con las dos dosis. La salinidad induce la acumulación de AS en hoja y raíz, aumentando un 10% en hoja, y un 60% en raíz en la primera cosecha, y del 20% y el 35% respectivamente en la segunda. El tratamiento combinado (ABA+NaCl) condicionó que la acumulación de AS en hoja y en raíz fuera menor que la detectada en plantas salinizadas. Se puede establecer que en hoja se acumula más AS, a pesar de que los tratamientos de ABA y NaCl se aplican a través de la solución de riego.

En relación al **contenido endógeno de ABA** en hoja y raíz (Fig. 4.11) se detecta una respuesta rápida al ABA exógeno y NaCl en hoja y raíz, de hecho a los 3 DTS aumenta proporcional a la dosis de ABA y NaCl, sin embargo a los 6 DTS curiosamente las plantas control alcanzan los niveles de ABA más elevados en ambos órganos. El tratamiento $10 \mu M$ ABA + 100 mM NaCl induce un drástico

incremento del ABA endógeno en hoja (85%) y raíz (95%) en la primera cosecha, por el contrario en la segunda disminuye un 80% y 60% en hoja y raíz respectivamente.

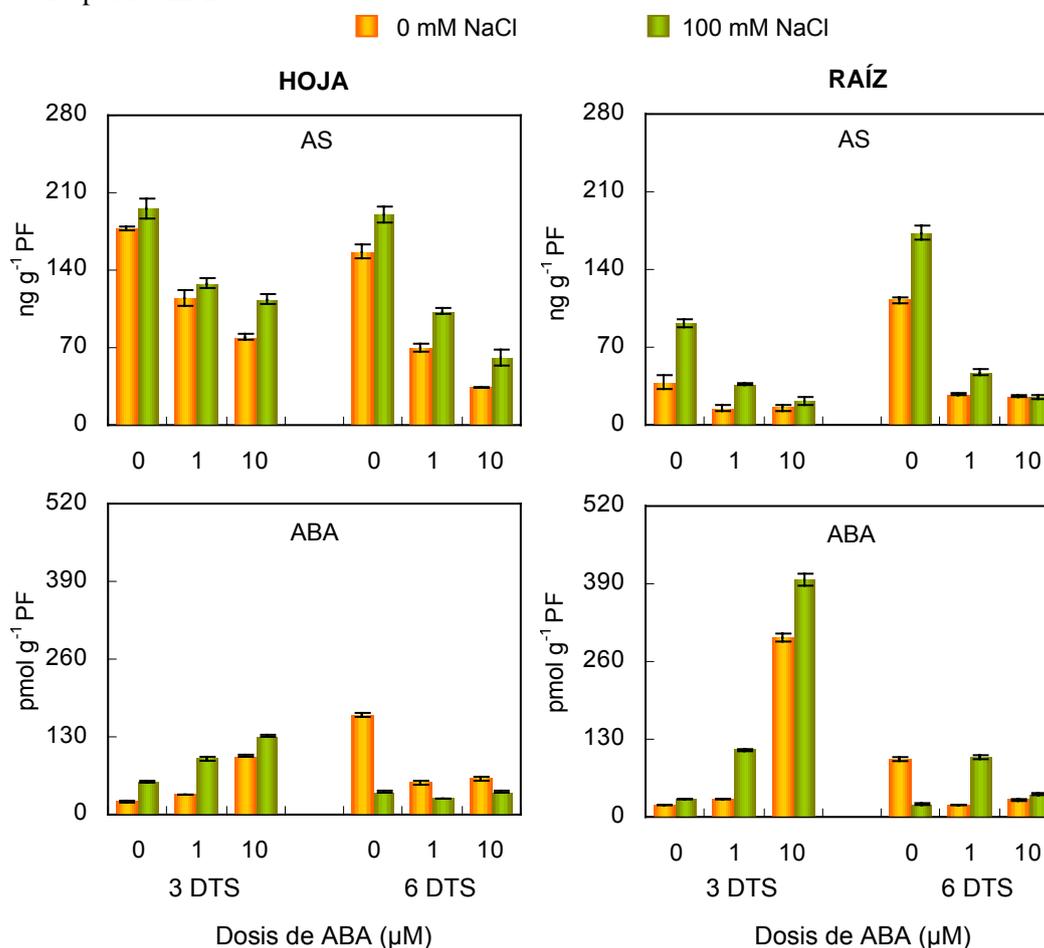


Figura 4.11. Contenido endógeno de ácido salicílico libre (AS) y ácido abscísico libre (ABA) en hoja y raíz de plantas de *P. vulgaris* crecidas con diferentes dosis de ABA (0, 1, 10 μM) y NaCl (0, 100 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

El análisis de varianza de los datos que se muestran en la tabla A 4.24 del apéndice indica que la variabilidad del ABA endógeno foliar se debe en un 75% se debe al tratamiento de ABA y a la interacción ABA-tiempo, mientras que la del ABA radical se debe a las interacciones ABA-tiempo y ABA-sal, también en un 75% de probabilidad. El contenido de ABA endógeno foliar y radical se correlaciona positivamente con los parámetros de fijación de nitrógeno ($P \leq 0.05$) (tabla 4.1).

4.1.10. Poliaminas endógenas

Se determinó el contenido de cinco poliaminas: putrescina, cadaverina, espermidina, espermina y diaminopropano en hoja, raíz y nódulo, de plantas cultivadas 3 y 6 días con el tratamiento salino, y con la aplicación exógena de 10 μM de ABA. Los resultados se muestran en las figuras 4.12 y 4.13, y los datos numéricos y el análisis de la varianza se recogen en las tablas de la A 4.25 a la A 4.30 del apéndice.

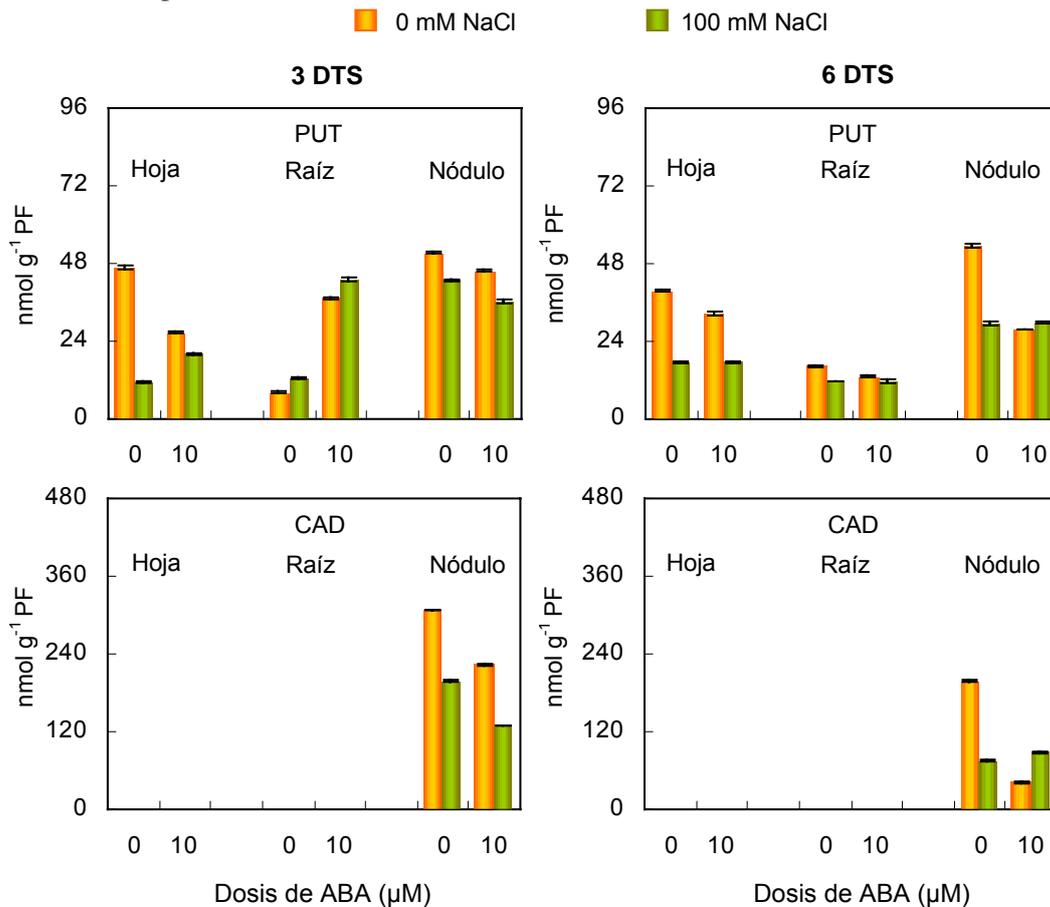


Figura 4.12. Contenido de putrescina (PUT) y cadaverina (CAD) en hoja, raíz y nódulo de plantas de *P. vulgaris* crecidas con diferentes dosis de ABA (0, 10 μM) y NaCl (0, 100 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

La **putrescina** está presente en los tres órganos estudiados, siendo el nódulo el órgano que mayor contenido exhibe (Fig. 4.12). La salinidad en general provocó una disminución del contenido de PUT en todos los órganos, excepto en raíz en la primera recolecta que lo aumentó, mientras que en hoja descende un 75%, y en nódulo alrededor del 20%. El tratamiento de ABA exógeno también

Resultados

provoca una disminución de esta poliamina en hoja y nódulo en las dos cosechas, y por el contrario en raíz aumentó la PUT en un 80% al inicio de floración, y la disminuyó (20%) en plena floración.

El contenido de **cadaverina** en nódulo desciende con el ABA y el estrés salino, en el primer muestreo el ABA provocó una caída del 25%, y la sal del 35%, mientras que en el segundo el descenso es del 80% (ABA) y del 60% (NaCl). La acumulación de CAD disminuyó con el tiempo de experimentación, ya que los nódulos de plantas en plena floración acumulan menor contenido de CAD que los desarrollados al inicio de floración. La CAD no fue detectada en hoja y raíz.

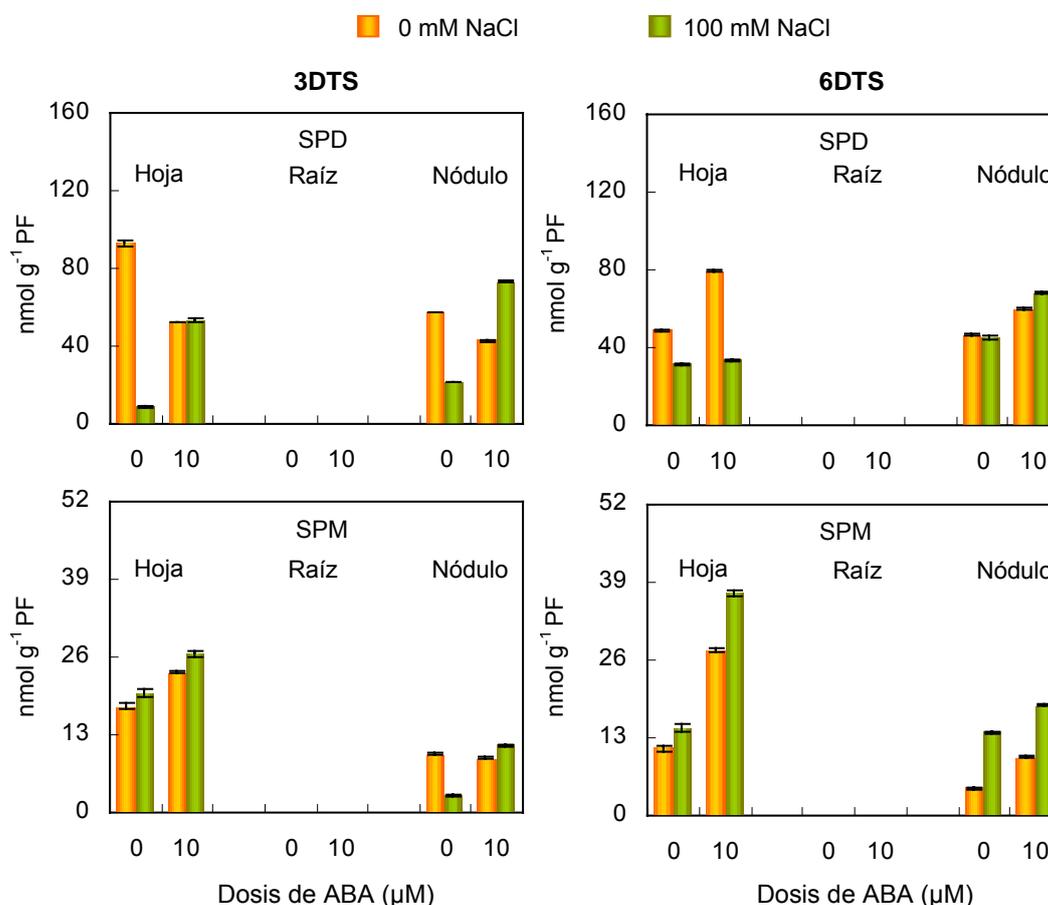


Figura 4.13. Contenido de espermidina (SPD) y espermina (SPM) en hoja, raíz y nódulo de plantas de *P. vulgaris* crecidas con diferentes dosis de ABA (0, 10 μM) y NaCl (0, 100 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

Las poliaminas **espermidina y espermina** no se detectaron en raíz (Fig. 4.13). Las hojas y nódulos de plantas tratadas con 10 μM de ABA acumulan menos **espermidina** que las control a los 3 DTS, mientras que a los 6 DTS se induce un

aumento del 40% en hoja, y del 20% en nódulo. El contenido de SPD disminuye en hoja y raíz con el estrés salino, observándose en el primer muestreo una caída del 90% en hoja y del 60% en nódulo, mientras que en el segundo fue del 35% en hoja y no se observan diferencias significativas en nódulo. El tratamiento combinado (ABA+NaCl) es el que favoreció la mayor acumulación de SPD en nódulo.

En general el contenido de **espermina** aumenta en hoja y raíz con el ABA y el NaCl, sin embargo en nódulo la salinidad provocó un descenso del 70% en la primera recolecta y el ABA no indujo cambios significativos. En la segunda se observa: **a)** la hoja acumula más SPM que el nódulo; **b)** el tratamiento de ABA provoca un incremento en la producción de SPM en los dos órganos, multiplicándose por 2.5 en hoja, y duplicándose en nódulo; **c)** la salinidad induce la acumulación de SPM en hoja y nódulo, que es en hoja del 25% y en nódulo del 70%; **d)** las hojas y nódulos procedentes del tratamiento combinado (ABA+NaCl) son las que acumulan mayor contenido de SPM, aumentando un 70-75% en ambos órganos. Es interesante destacar que la poliamina **diaminopropano** no se detectó en ninguno de los tres órganos analizados.

El contenido de putrescina nodular se correlaciona de forma positiva con el proceso de fijación de nitrógeno ($P \leq 0.05$), y el de cadaverina nodular con el de aminoácidos y con peroxidación lipídica ($P \leq 0.05$) (tabla 4.1). El contenido de putrescina y espermidina en hoja se correlaciona con la producción de peróxido de hidrógeno nodular y foliar ($P \leq 0.05$) (tabla 4.1).

4.2. Experimento con *Medicago sativa*

4.2.1. Análisis del crecimiento

El crecimiento expresado como peso seco de planta, peso seco de parte aérea, peso seco de raíz y relación raíz/parte aérea se muestra en la figura 4.14. Los datos numéricos, junto con el correspondiente análisis de varianza se encuentran en las tablas A 4.31 y A 4.32 del apéndice.

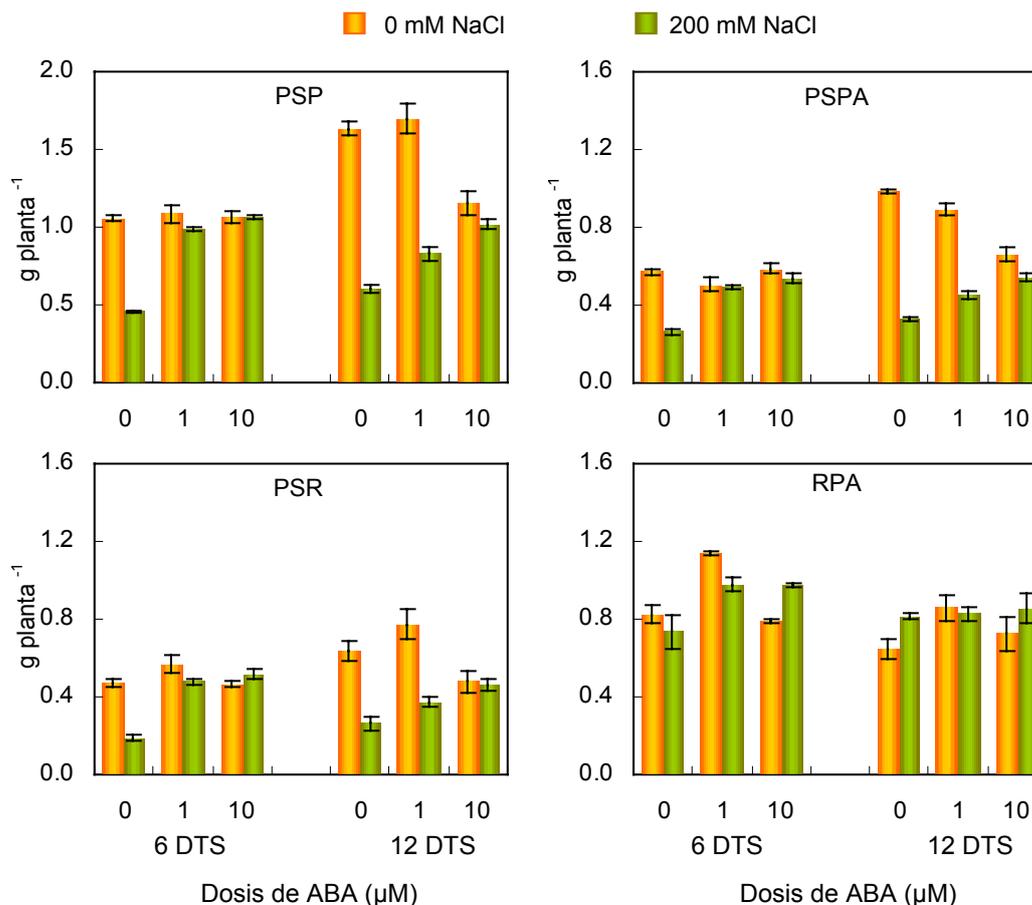


Figura 4.14. Peso seco de planta (PSP), peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de raíz (PSR) y relación raíz/parte aérea (RPA) de plantas de *M. sativa* crecidas con diferentes dosis de ABA (0, 1, 10 μ M) y NaCl (0, 200 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=10) con el error estándar.

Los **parámetros de crecimiento** (PSP, PSPA y PSR) de las plantas expuestas al tratamiento con ABA no experimentaron cambios significativos respecto al control en la primera recolecta, mientras que en la segunda el PSP incrementó un 30% con 10 μ M de ABA, el PSPA se redujo un 10% y un 30% con

1 y 10 μM de ABA respectivamente, y el PSR aumentó un 20% con 1 μM , sin embargo con 10 μM se reduce (25%). El estrés salino provocó una caída generalizada del crecimiento vegetal, siendo más acentuada en el segundo muestreo, en la cual los parámetros PSP, PSPA, PSR disminuyeron entre 60-70%. Un aspecto destacable es los tratamientos combinados (ABA+NaCl) condicionan una disminución menor del crecimiento de forma que por ejemplo el PSP en el primer muestreo no cambia significativamente con 10 μM de ABA-NaCl, mientras que con 200 mM de NaCl descendió en más del 50%. Es de esperar que el tratamiento de ABA mejora el crecimiento de la planta en condiciones salinas, paliando sus efectos adversos.

La **relación raíz/parte aérea**, no sufre cambios significativos con el ABA y NaCl en las dos cosechas, aunque al inicio de floración los tratamientos combinados (ABA+NaCl) incrementan RPA un 25% respecto al obtenido en plantas con NaCl.

El análisis de la varianza de los datos relacionados con el crecimiento de la planta, representado en la tabla A 4.32 del apéndice, indica que la principal fuente de variación la constituye la salinidad, superando el 40% para el PSP y PSPA, y alrededor del 30% para el PSR.

4.2.2. Fijación de nitrógeno

Los parámetros relacionados con el proceso de fijación de nitrógeno: actividad nitrogenasa aparente, actividad nitrogenasa total, tasa de fijación de nitrógeno, peso seco de nódulo y peso normalizado de nódulo, junto con el correspondiente análisis de varianza se recogen en las tablas A 4.33 y A 4.34 del apéndice.

En la figura 4.15 se observa que las alteraciones producidas por el ABA en la **actividad nitrogenasa aparente, total y tasa de fijación de nitrógeno** son distintas dependiendo de la dosis, con 1 μM de ABA la ANA desciende un 35%, y la ANT y la TFN entre un 20-25%, mientras que con 10 μM de ABA los porcentajes son menores. La presencia de ABA provocó que el **peso seco de nódulo** de las plantas expuestas a ambas dosis fuese inferior al de plantas control en las dos recolectas realizadas. Todos los parámetros de fijación de nitrógeno estudiados disminuyen con el estrés salino, siendo éste descenso más acentuado con el tiempo de exposición al NaCl, así en el segundo muestreo la ANA desciende un 70%, ANT un 50%, TFN un 40% y el PSN un 25%. Señalar que a los 12 DTS los nódulos procedentes de plantas de tratamientos combinados (ABA + NaCl) presentan una fijación de nitrógeno mayor que los de plantas tratadas con sal.

El **peso normalizado de nódulo**, considerado como un índice idóneo para relacionar la posible incidencia de ciertos factores como la salinidad en el

Resultados

crecimiento de los nódulos en su relación con la parte aérea de la planta, se incrementa en un 60% después de 12 días de exposición al NaCl (Tabla A 4.33 del apéndice).

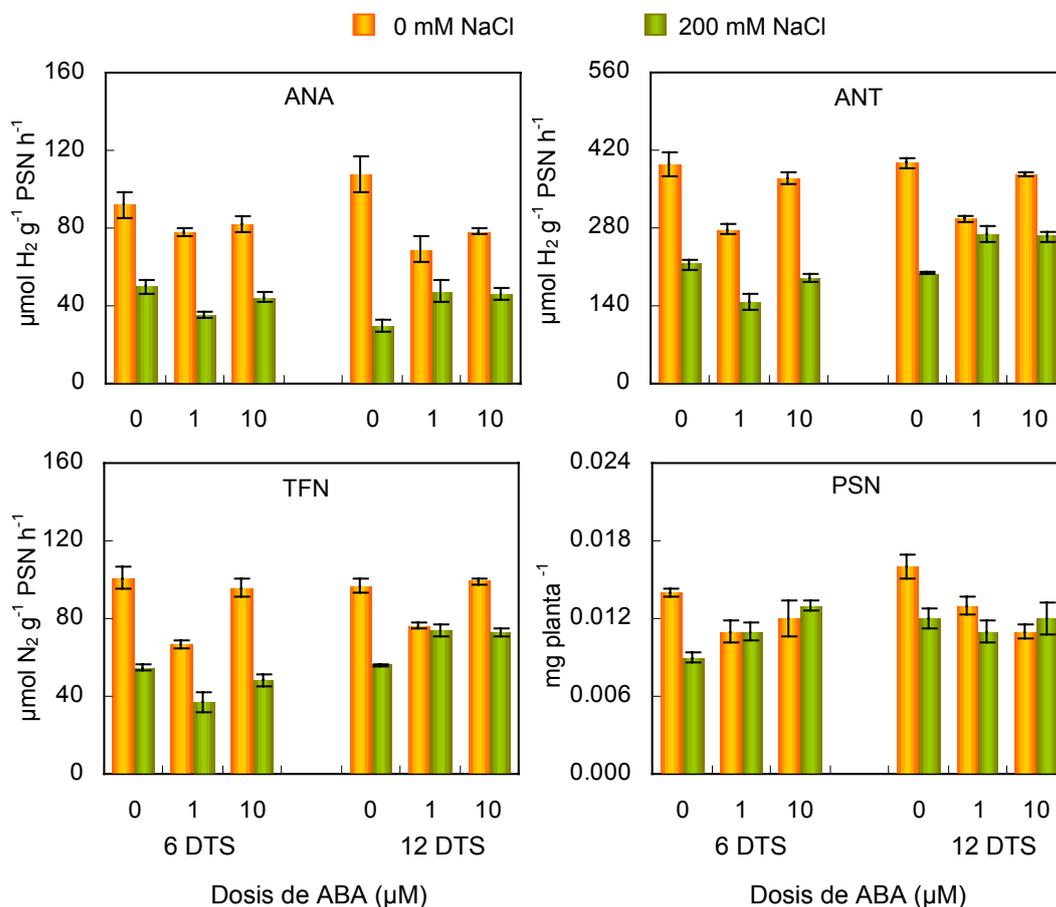


Figura 4.15. Actividad nitrogenasa aparente (ANA), actividad nitrogenasa total (ANT), tasa de fijación de nitrógeno (TFN) y peso seco de nódulo (PSN) de plantas de *M. sativa* crecidas con diferentes dosis de ABA (0, 1, 10 μM) y NaCl (0, 200 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=10) con el error estándar.

El análisis de la varianza realizado a los distintos parámetros de fijación, representado en la tabla A 4.34 del apéndice, muestra que la mayor fuente de variación se debió prioritariamente al estrés salino (70%), resultados que coinciden con los observados para los parámetros de crecimiento. La actividad nitrogenasa total se correlaciona con el PSP y PSPA ($P \leq 0.05$) (tabla 4.3).

4.2.3. Actividad aldehído oxidasa

La actividad aldehído oxidasa visualizada por tinción en gel de poliacrilamida se observa en la figura 4.16. La enzima **aldehído oxidasa** presenta dos isoformas en hoja, siendo más activa la AAO2, mientras que en nódulo se detecta una. La actividad AAO de hoja y nódulo desciende con el tiempo de experimentación en un 42% y 25% respectivamente, sin embargo la isoforma AAO2 de hoja parece que incrementa en el segundo muestreo. El tratamiento con ABA inhibe la AAO foliar y nodular, en el primer muestreo la reducción es del 11% y del 29% respectivamente, y en el segundo es del 68% en hoja y del 12% en nódulo. La salinidad también disminuye esta actividad en ambos órganos, por lo que en las plantas expuestas a los tratamientos combinados (ABA+NaCl) aparecen reducciones del 85% en hoja y del 96% en nódulo en el segundo muestreo.

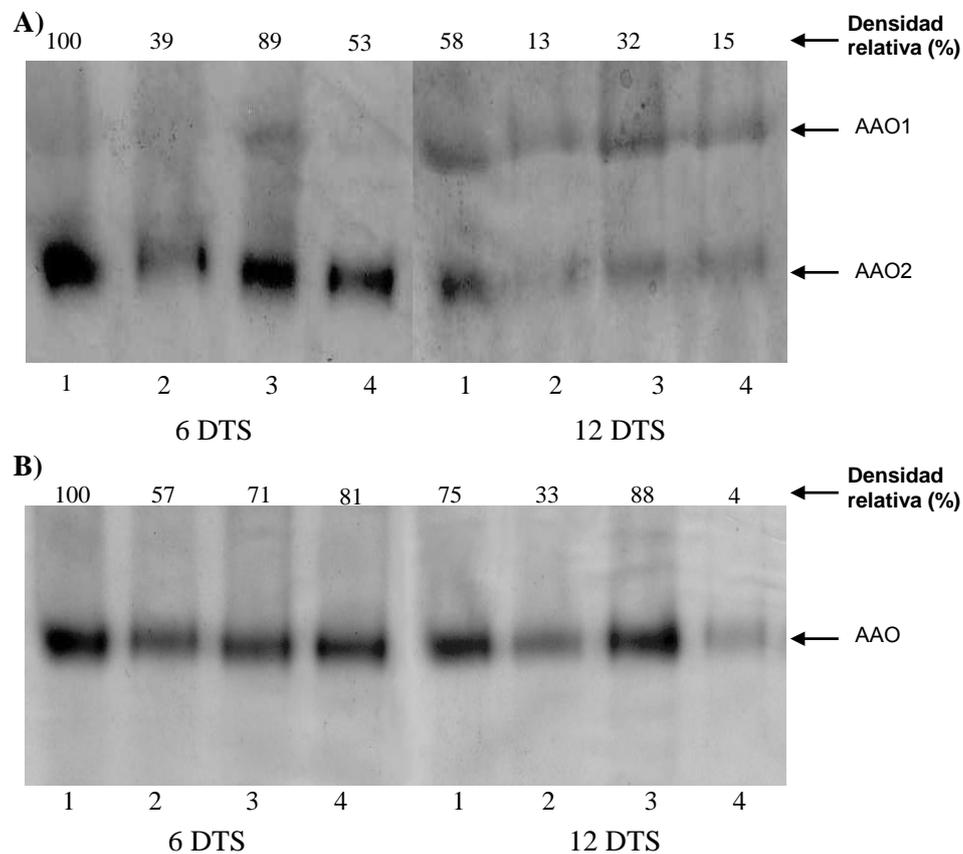


Figura 4.16. Patrón de bandas de actividad aldehído oxidasa en hoja (A) y nódulo (B) de *M. sativa* en gel nativo, detectada con el sustrato indol-3-aldehído. 1 (control), 2 (200 mM NaCl), 3 (10 μ M ABA) y 4 (10 μ M AS + 200 mM NaCl). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. El zimograma representa una de las tres repeticiones que mostraron resultados similares.

4.2.4. Actividades antioxidantes

Las enzimas relacionadas con el metabolismo oxidativo en nódulo se muestran en las figuras 4.17 y 4.18: superóxido dismutasa, catalasa, guaiacol peroxidasa, y las enzimas del ciclo ascorbato-glutation, ascorbato peroxidasa, monodehidroascorbato reductasa, glutacion reductasa y dehidroascorbato reductasa. Los datos numéricos, y el correspondiente análisis de varianza de las determinaciones enzimáticas expresadas por peso fresco de material vegetal así como por proteína se detallan en las tablas de la A 4.35 a la A 4.42 del apéndice de esta memoria.

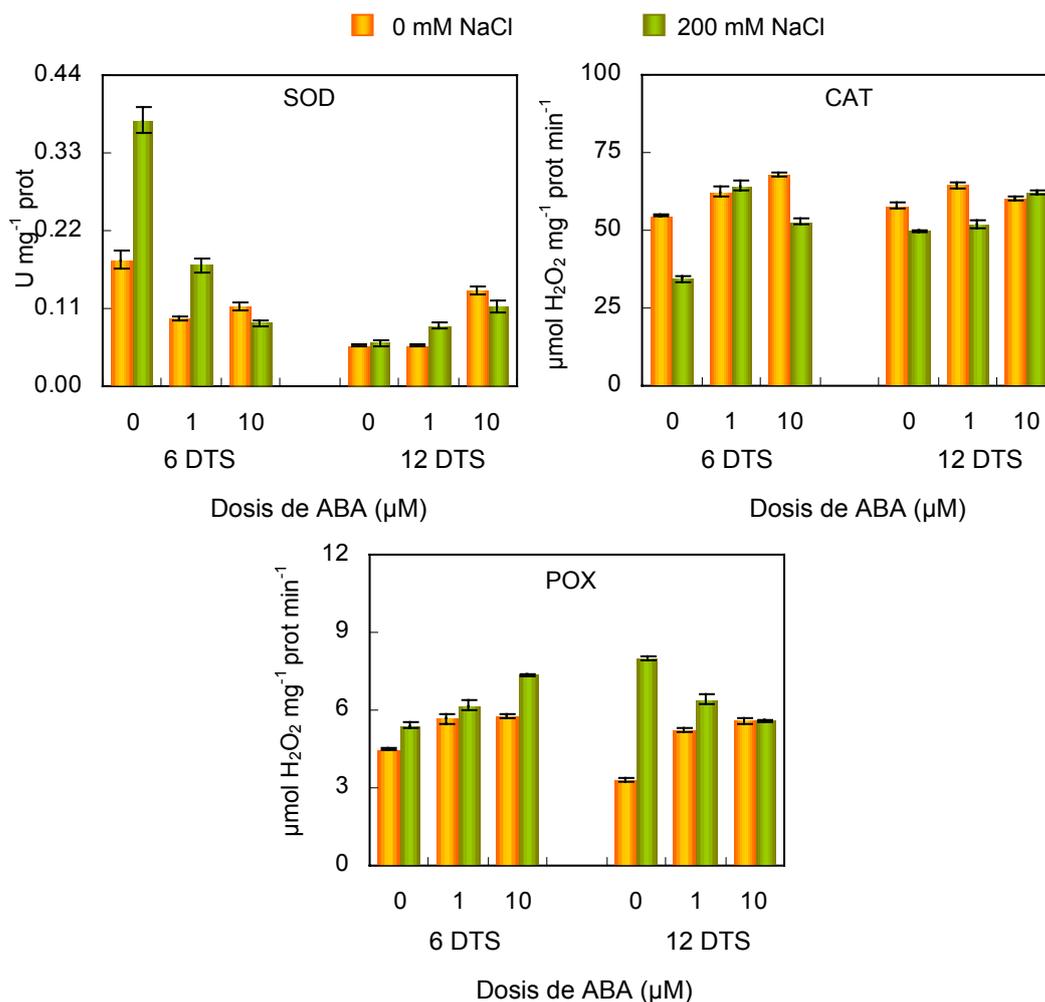


Figura 4.17. Actividades enzimáticas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y guaiacol peroxidasa (POX) en nódulo de plantas de *M. sativa* crecidas con diferentes dosis de ABA (0, 1, 10 μM) y NaCl (0, 200 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

La actividad **superóxido dismutasa** en nódulos de plantas tratadas con ABA desciende al inicio de floración, efecto que se revierte en plena floración detectándose un aumento del 60% con 10 μ M de ABA. La actividad SOD muestra una respuesta rápida al estrés salino, aumentando en más del doble en el primer muestreo, mientras que en el segundo no se aprecian cambios significativos. El tratamiento combinado (ABA + NaCl) induce en los nódulos una menor actividad SOD en la primera cosecha y mayor en la segunda respecto a la detectada en nódulos de plantas crecidas sólo con NaCl.

En general, la actividad **catalasa** se estimuló con el tratamiento de ABA, aumentando al inicio de floración proporcional a la concentración de la hormona, con 1 μ M incrementa un 12%, y con 10 μ M un 20%, mientras que el NaCl provoca una inhibición de la actividad cercana al 40% a los 6 días de tratamiento salino, y del 15% a los 12. Esta inhibición es menor con el ABA en el medio de cultivo, ello se evidencia claramente en la primera cosecha en la que el NaCl reduce en un 40% la actividad CAT, como se comentó anteriormente, mientras que los nódulos procedentes del tratamiento combinado (ABA+NaCl) muestran una actividad similar a la de nódulos control. La CAT presenta una correlación negativa y significativa con la actividad SOD (Tabla 4.3).

Como se observa en la figura 4.17 la actividad **peroxidasa** incrementa con el ABA y el NaCl, de hecho a los 6 DTS la actividad de nódulos que han recibido un tratamiento de 10 μ M de ABA + 200 mM de NaCl se multiplica por 1.6 respecto al obtenido en nódulos de plantas control. A los 12 DTS el máximo valor de actividad se obtiene con el tratamiento salino, donde se multiplica por 2.4, en esta misma cosecha los nódulos de plantas tratadas con ABA mantienen una mayor actividad POX que los de las control, con 40% más con ambas dosis de ABA. La actividad POX nodular en alfalfa se correlaciona negativamente con los parámetros de crecimiento ($P \leq 0.05$) y fijación de nitrógeno ($P \leq 0.01$) (Tabla 4.3).

Las enzimas antioxidantes de nódulo pertenecientes al **ciclo ascorbato-glutation** se muestran en la figura 4.18, en la que se observa una inhibición de la actividad **ascorbato peroxidasa** con el ABA, de hecho en la segunda cosecha la inhibición es del 20% con 1 μ M de ABA, y alcanza el 30% con 10 μ M. El estrés salino incrementó la actividad APX incluso cuando se combina con el ABA, registrándose el valor máximo en el tratamiento combinado de 10 μ M ABA + 200 mM NaCl) de la segunda recolecta.

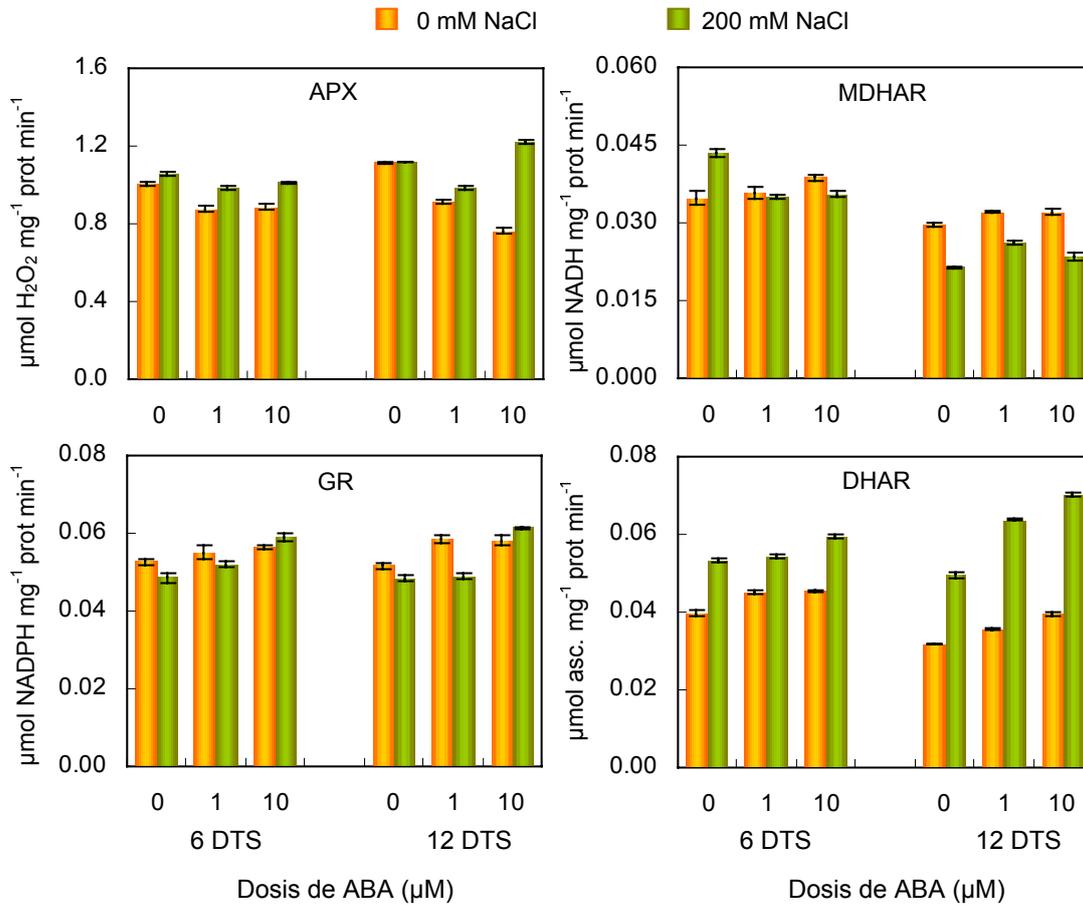


Figura 4.18. Actividades enzimáticas ascorbato peroxidasa (APX), monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), glutation reductasa (GR) y dehidroascorbato reductasa (DHAR) en nódulo de plantas de *M. sativa* crecidas con diferentes dosis de ABA (0, 1, 10 μM) y NaCl (0, 200 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

Al contrario de lo observado para la actividad APX, las actividades MDHAR, GR y DHAR se estimulan proporcional a la dosis de ABA en ambas recolectas, de forma que cuando el tratamiento hormonal es más prolongado (12 DTS), con la mayor dosis de ABA se detecta un aumento del 10-20% en éstas actividades. El efecto del estrés salino en la **monodehidroascorbato reductasa** nodular dependió del tiempo de exposición al NaCl, a los 6 días la actividad aumentó un 20% y a los 12 días disminuyó un 10%. Un aspecto a mencionar es que el ABA y el NaCl individualmente estimulan la actividad MDHAR a los 6 DTS. Los nódulos procedentes de plantas de tratamientos combinados (ABA + NaCl) exhiben igual o inferior actividad que los de plantas control. La actividad **glutacion reductasa** disminuye con la salinidad alcanzando una inhibición próxima al 10%

en plena floración, sin embargo el efecto inhibitor del NaCl queda enmascarado en los nódulos de plantas con tratamientos combinados, detectándose una actividad mayor que la de nódulos. La **dehidroascorbato reductasa** se estimula por el estrés salino, no obstante la máxima actividad se obtiene con 10 μM de ABA y 200 mM de NaCl, aumentando un 33% en el primer muestreo, y un 54% en el segundo. Esta actividad se correlaciona negativamente con los parámetros de fijación de nitrógeno ($P \leq 0.01$) y positivamente con la actividad POX ($P \leq 0.05$) (Tabla 4.3).

Al analizar las actividades del ciclo ascorbato-glutation estudiadas en función del estado fenológico del cultivo, sólo APX aumenta entre inicio y plena floración, en general el resto de actividades disminuyen con el tiempo de experimentación.

4.2.5. Actividad lipoxigenasa

La figura 4.19 representa la actividad lipoxigenasa de nódulo, los datos numéricos y el correspondiente análisis de varianza se recoge en las tablas A 4.35 y A 4.36 del apéndice. En este mismo apartado se muestran los datos numéricos de actividad expresados en g^{-1} PF y su estudio estadístico (Tablas A 4.37 y A 4.38).

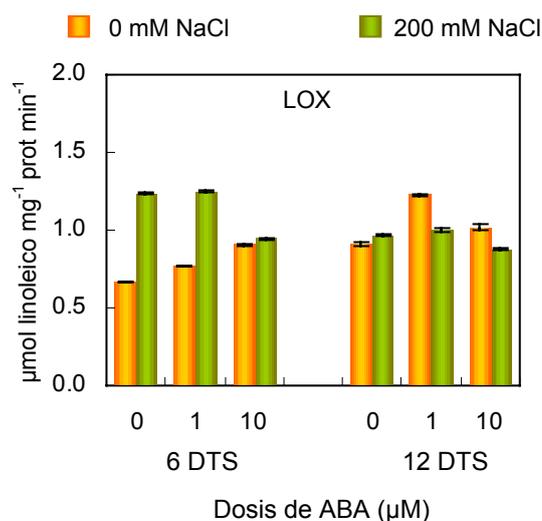


Figura 4.19. Actividad enzimática lipoxigenasa (LOX) en nódulo de plantas de *M. sativa* crecidas con diferentes dosis de ABA (0, 1, 10 μM) y NaCl (0, 200 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra ($n=6$) con el error estándar.

Los tratamientos con ABA aumentaron la actividad **lipoxigenasa** en ambos muestreos, en el primero el incremento fue del 15 y 25% con 1 y 10 μM de ABA respectivamente. La LOX muestra una respuesta rápida frente al estrés salino duplicándose la actividad a los 6 días de aplicar el NaCl, sin embargo a los 12 el

aumento es del 10%. En general el ABA y el NaCl favorecen esta actividad, sin embargo en los nódulos de plantas expuestas a el tratamiento combinado 10 μM de ABA + 200 mM NaCl en la primera recolecta presentó una caída cercana al 25% respecto al observado en nódulos de plantas con NaCl. El análisis de la varianza evidencia que la variabilidad de los datos de esta actividad enzimática se debe en un 40% a la interacción sal-tiempo y en un 30% al tiempo de experimentación (tabla A 4.38).

4.2.6. Metabolitos antioxidantes

Se determinó en nódulo el contenido de las distintas formas de ascorbato y glutatión (reducido y oxidado), así como el ascorbato y el glutatión total, y la relación entre las formas oxidadas y reducidas (Figs. 4.20 y 4.21). Los datos numéricos y el correspondiente análisis de varianza se recogen en las tablas de la A 4.43 a la A 4.46 del apéndice.

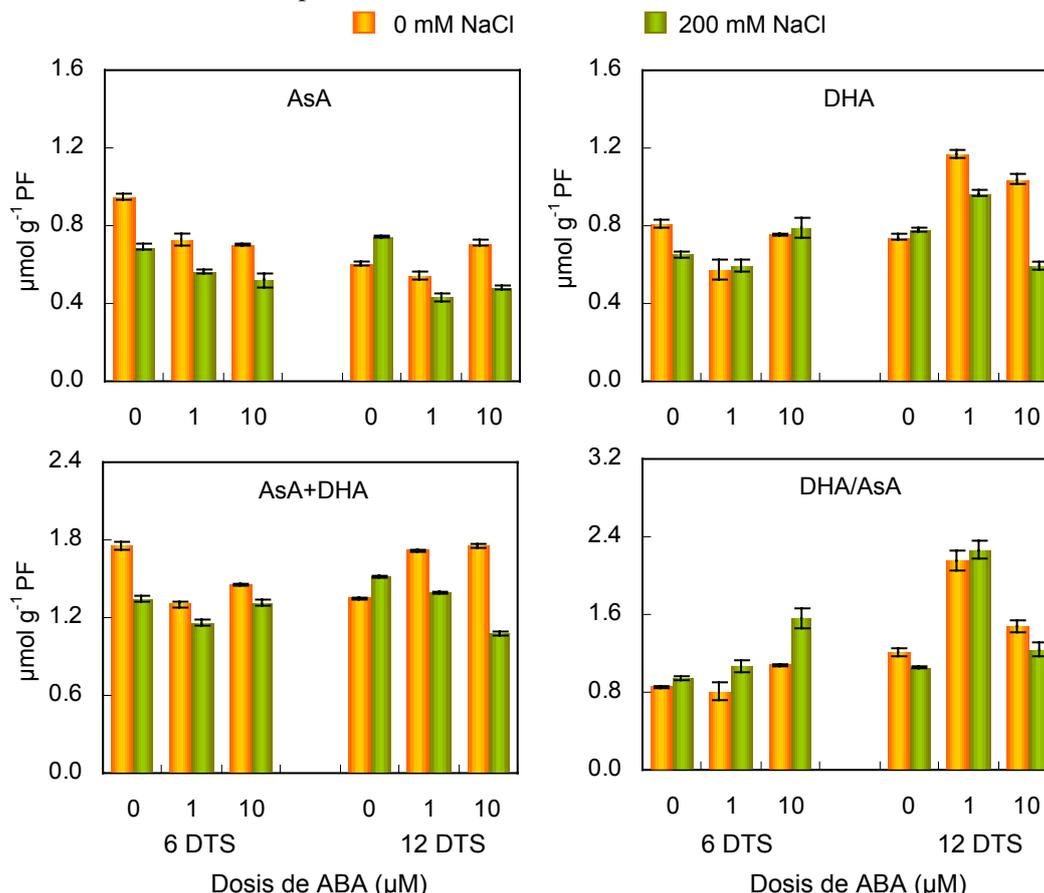


Figura 4.20. Contenido de ascorbato reducido (AsA), oxidado (DHA), total (AsA+DHA) y relación oxidado/reducido (DHA/AsA) en nódulo de plantas de *M. sativa* crecidas con diferentes dosis de ABA (0, 1, 10 μM) y NaCl (0, 200 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

El contenido de **ascorbato reducido** de nódulo disminuye con el ABA y el tratamiento salino en el primer muestreo, en los tratamientos combinados (ABA+NaCl) la acumulación de este metabolito es menor. En el segundo, al contrario de lo descrito, el ABA no induce cambios significativos en el contenido de AsA con 1 μM y lo aumentó con 10 μM , también la salinidad provocó un aumento de aproximadamente el 20%.

El ABA provoca cambios en el contenido de **dehidroascorbato** nodular dependiendo de la concentración y el tiempo de tratamiento, de forma que al inicio de floración los nódulos de plantas tratadas con 10 μM de ABA no presentan cambios significativos respecto al control, mientras que en plena floración esta misma dosis induce un incremento del 30%. La salinidad reduce la acumulación de DHA en el primer muestreo, pero la aumenta en el segundo.

En general, el contenido de **ascorbato total** disminuye con el ABA a los 6 DTS, y aumenta a los 12 DTS. El estrés salino disminuye este contenido a los 6 DTS y a los 12 se observa un aumento del 12%. Respecto a los cambios en la **relación oxidado/reducido**, sólo se refleja un incremento a los 12 DTS. El ascorbato total y reducido se correlaciona positiva y significativamente con la actividad peroxidasa (Tabla 4.4).

En la figura 4.21 se observa que el tratamiento hormonal estimula en ambos muestreos la acumulación de **glutation reducido, oxidado y total**, observándose las mayores diferencias respecto al control en plena floración, aunque curiosamente los valores máximos para estos parámetros se registran con 1 μM de ABA multiplicándose por 1.5-1.7. Las dos formas del glutacion y el total aumentan con el estrés salino (20%) en la primera recolecta, mientras que en la segunda los valores son inferiores al control. Es interesante señalar que los nódulos acumulan más glutacion reducido que oxidado, y además el contenido de ambos se incrementa con el tiempo de experimentación.

La relación entre **glutation oxidado/reducido** refleja cambios al inicio de floración, en la cual el ABA provocó un aumento de esta relación entre un 20-30%. En la segunda recolecta en general, no se observan cambios significativos con ningún tratamiento. En el análisis de la varianza (Tabla A 4.46 del apéndice) se manifiesta que la principal fuente de variación de las diversas formas de el glutacion es el tiempo de experimentación, siendo superior al 82% para GSH y glutacion total, del 70% para GSSG, y del 30% para la relación GSSG/GSH.

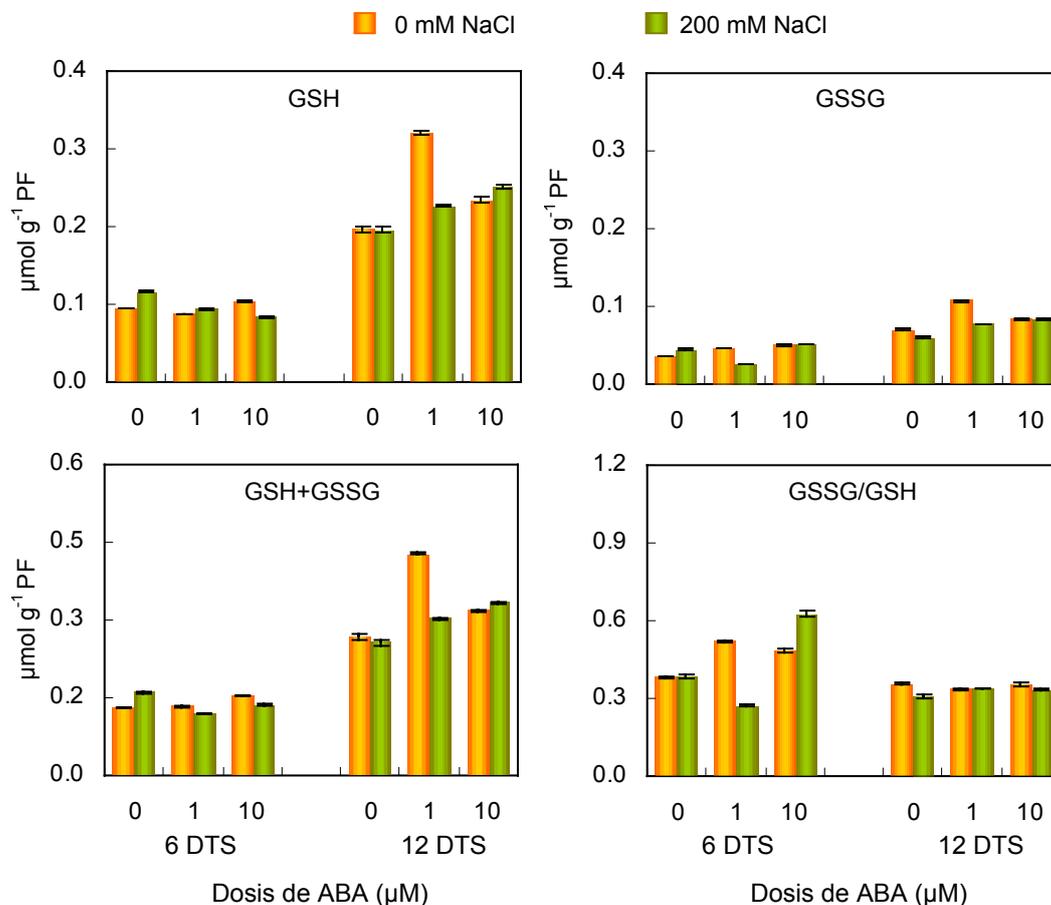


Figura 4.21. Contenido de glutatión reducido (GSH), oxidado (GSSG), total (GSH+GSSG) y relación oxidado/reducido (GSSG/GSH) en nódulo de plantas de *M. sativa* crecidas con diferentes dosis de ABA (0, 1, 10 μM) y NaCl (0, 200 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

4.2.7. Otros metabolitos

En la figura 4.22 se expone el contenido de aminoácidos libres, prolina y azúcares solubles totales en hoja y nódulo. Los datos numéricos y el correspondiente análisis de varianza para las determinaciones en hoja se recogen en las tablas A 4.47 y A 4.48, y para nódulo en las tablas A 4.49 y A 4.50 del apéndice.

Las hojas y nódulos de plantas tratadas con ABA mostraron un descenso en el contenido de **aminoácido libres** y **prolina** en ambos muestreos, con 10 μM de ABA la disminución fue del 26% en el contenido de Aa, y del 30-35% en el de

prolina en hoja y nódulo en el primer muestreo y en el segundo la reducción fue más drástica del 40% en los Aa, y del 65% en la prolina de ambos órganos.

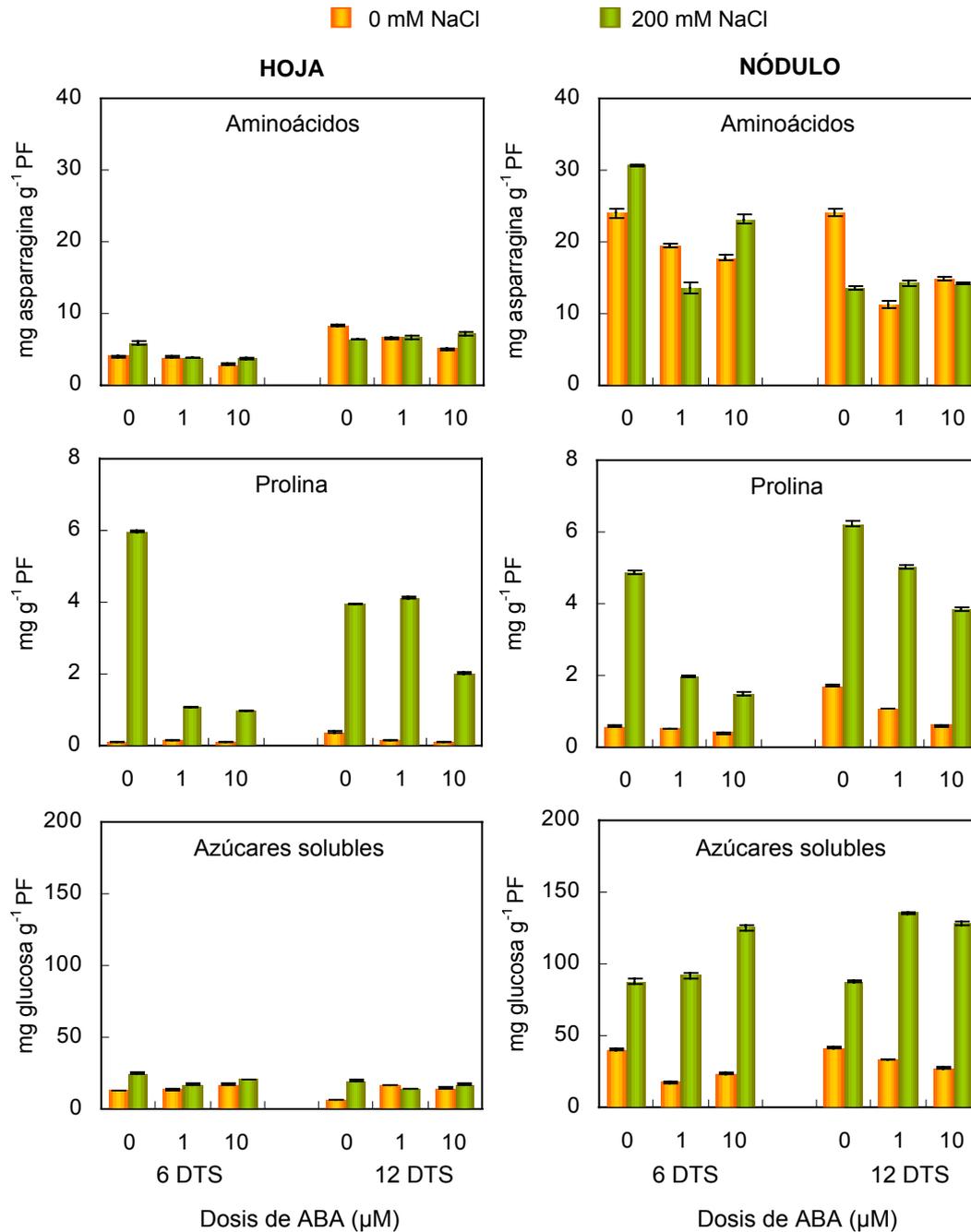


Figura 4.22. Contenido de aminoácidos, prolina y azúcares solubles totales en hoja y nódulo de plantas de *M. sativa* crecidas con diferentes dosis de ABA (0, 1, 10 μM) y NaCl (0, 200 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra ($n=6$) con el error estándar.

La respuesta del contenido de Aa al estrés salino es similar en hoja y nódulo, detectándose en el primer muestreo un aumento del 30% en hoja y del 20% en nódulo, mientras que a los 12 DTS disminuyen los Aa en los órganos. La prolina en hoja responde de forma espectacular al tratamiento salino multiplicándose por 56 y por 10 en la primera y segunda recolecta respectivamente, en nódulo este metabolito también aumenta con la salinidad multiplicándose por 8 a los 6 DTS y por 3.6 a los 12 DTS. En general, las plantas con tratamientos combinados (ABA+NaCl) acumulan menor cantidad de Aa y prolina en hoja y nódulo, que las tratadas sólo con NaCl.

Indicar que ambos metabolitos se acumulan prioritariamente en nódulo, multiplicando por 4-6 los valores de hoja. En el análisis de varianza del contenido de prolina foliar y nodular se observa que la principal fuente de variación la constituye el estrés salino (50-60%) (tabla A 4.48 y A 4.50 del apéndice). Los Aa de hoja se correlacionan de forma positiva y significativamente ($P \leq 0.05$) con todas las formas del glutation, mientras que la prolina foliar y nodular lo hace de forma negativa ($P \leq 0.05$) con los parámetros de crecimiento y fijación (tabla 4.3 y 4.4). El contenido de Aa de nódulo se correlaciona significativamente de forma negativa con la actividad CAT ($r = -0.69$) y positivamente con la MDHAR ($r = 0.75$), además existe una correlación significativa y positiva entre la actividad DHAR y el contenido de prolina ($r = 0.69$) (tabla 4.3).

En la figura 4.22 se observa que el ABA provoca respuestas distintas en el contenido de **azúcares solubles totales** según el órgano, en hoja induce la acumulación y en nódulo causa un descenso del contenido, con 10 μM de ABA en el segundo muestreo aumenta el 55% en hoja y en nódulo disminuye el 35%. La salinidad estimuló la acumulación de Ast en ambos órganos, detectándose valores que duplicaban los de plantas control. El nódulo es el órgano donde se acumulan principalmente los Ast, alcanzándose los valores más elevados en los tratamientos combinados (ABA+NaCl), superando en un 30-35% a los detectados en nódulos de plantas con sal. El contenido de azúcares solubles totales de nódulo se correlaciona negativamente con los parámetros de fijación de nitrógeno estudiados y positivamente con la actividad dehidroascorbato reductasa de nódulo ($P \leq 0.01$) (tabla 4.3).

4.2.8. Peroxidación de lípidos y peróxido de hidrógeno

En la figura 4.23 se representa el contenido de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) o peroxidación de lípidos y el contenido de peróxido de hidrógeno en hoja y nódulo. Los datos numéricos y el correspondiente análisis de la varianza se recogen en las tablas A 4.51 y A 4.52 del apéndice.

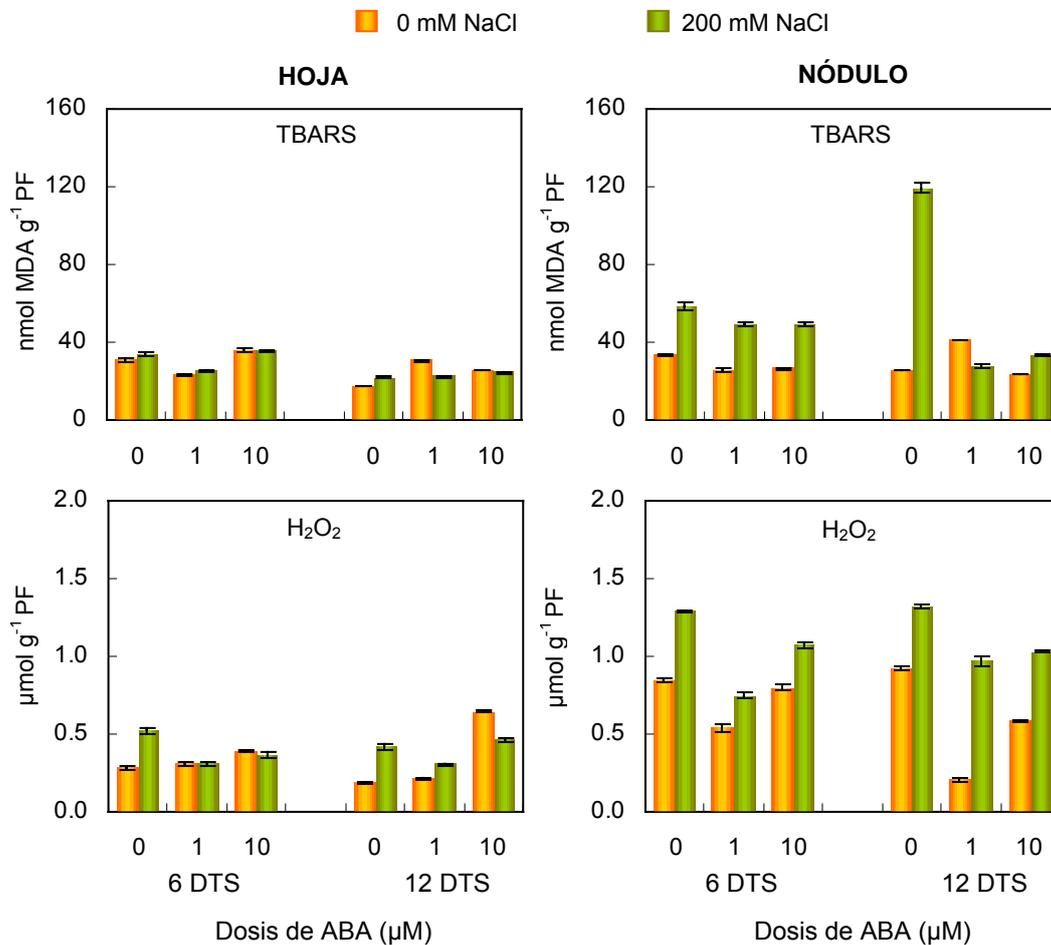


Figura 4.23. Contenido de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) y de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en hoja y nódulo de plantas de *M. sativa* crecidas con diferentes dosis de ABA (0, 1, 10 μM) y NaCl (0, 200 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

El tratamiento de ABA provoca cambios en la **peroxidación lipídica** en **hoja**, en el primer muestreo con 1 μM de ABA se reduce un 25% y con 10 μM aumenta en un 25%, y en el segundo ambas dosis inducen un incremento de la peroxidación (30-40%). En **nódulo** el ABA reduce el contenido de TBARS. La peroxidación de lípidos incrementa con el estrés salino, a los 12 DTS en nódulo se multiplica por 4.6 y en hoja por 1.2. Este drástico incremento en nódulo con la sal no se detecta en presencia de ABA (tratamiento combinado) puesto que el contenido de TBARS a los 12 DTS se mantiene cercano al control. La peroxidación lipídica nodular se correlaciona de forma negativa con los parámetros

de crecimiento y fijación de nitrógeno determinados ($P \leq 0.05$), y positiva con la actividad peroxidasa ($r= 0.74$) y prolina nodular ($r= 0.82$) (tabla 4.3). La peroxidación de lípidos foliar se correlaciona con la actividad monodehidroascorbato reductasa de nódulo ($r= 0.71$) (tabla 4.4).

El **peróxido de hidrógeno** del nódulo es mayor al de hoja, en cambio la salinidad provoca un aumento en el contenido de éste en ambos órganos, alcanzando valores del 45-55% en hoja, y del 30-35% en nódulo en ambas cosechas (Fig. 4.23). El tratamiento de ABA también aumenta el peróxido de hidrógeno en hoja, mientras que en nódulo lo reduce. El contenido de peróxido de hidrógeno nodular se correlaciona significativamente de forma positiva con los parámetros de fijación de nitrógeno estudiados ($P \leq 0.05$) y negativa con los Ast de nódulo y la actividad dehidroascorbato reductasa ($P \leq 0.01$) (tabla 4.3).

4.2.9. Ácido salicílico y ácido abscísico endógeno

El contenido de ácido salicílico y ácido abscísico endógeno en hoja y raíz se representa en la figura 4.24. Los datos numéricos y el estudio estadístico de la varianza se recopilan en las tablas A 4.53 y A 4.54 del apéndice.

El **ácido salicílico endógeno de hoja** aumenta drásticamente proporcional a la concentración de ABA aplicada, en la primera recolecta incrementa un 40% con 1 μM de ABA y un 55% con 10 μM , y en la segunda aumenta un 50% con ambas dosis, en cambio en **raíz** disminuye como consecuencia de la aplicación exógena de ABA. Las plantas con NaCl acumulan menos AS endógeno en hoja y raíz, reduciéndose en hoja un 15-20% en ambos muestreos, y en raíz un 50% al inicio de floración y un 32% en plena floración. El contenido de ácido salicílico endógeno de hoja se correlaciona negativamente con la actividad ascorbato peroxidasa, el ascorbato total y reducido, y la prolina foliar ($P \leq 0.05$) (tabla 4.4).

El **ácido abscísico endógeno** en hoja y raíz, muestra un rápido aumento en ambos órganos con los tratamientos de ABA y NaCl. En la primera recolecta con 10 μM de ABA + 200 mM de NaCl se observa el mayor contenido de ABA endógeno en hoja y raíz, multiplicándose por 18 y 34 veces respectivamente. Con el tratamiento salino prolongado (12 DTS), en hoja el contenido de la hormona se reduce un 35%, mientras que en raíz no se observan diferencias significativas.

Un aspecto destacable, es que la hoja acumula mayor cantidad de ácido salicílico y ácido abscísico que la raíz, a pesar de que los tratamientos de ABA y NaCl son aplicados a través de la solución de riego.

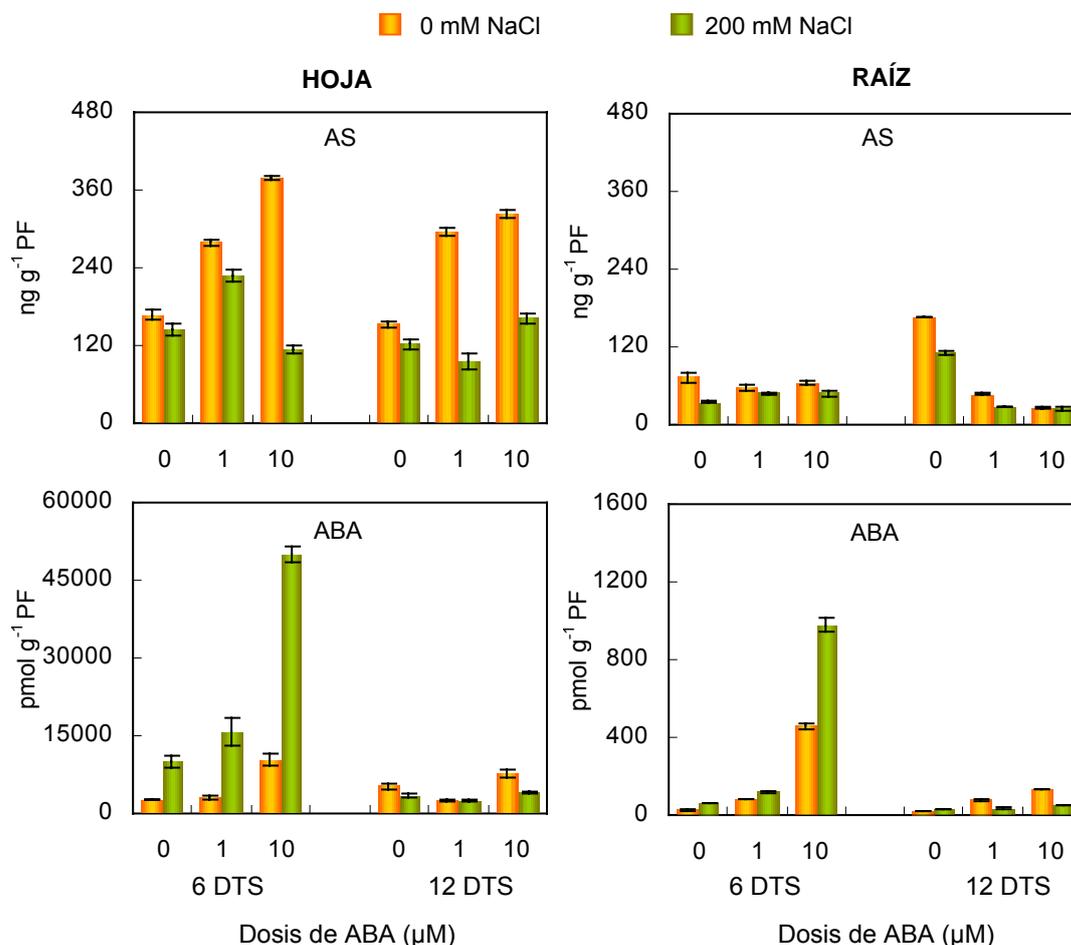


Figura 4.24. Contenido endógeno de ácido salicílico libre (AS) y ácido abscísico libre (ABA) en hoja y raíz de plantas de *M. sativa* crecidas con diferentes dosis de ABA (0, 1, 10 μ M) y NaCl (0, 200 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

4.2.10. Poliaminas endógenas

Se determinó el contenido de poliaminas endógenas libres: diaminopropano, putrescina, cadaverina, espermidina y espermina en hoja, raíz y nódulo, en inicio (6 DTS) y plena floración (12 DTS) con el tratamiento 10 μ M de ABA y 200 mM de NaCl. Los resultados se muestran en las figuras 4.25 y 4.26, y los datos numéricos y el análisis de la varianza se recogen en las tablas de la A 4.55 a la A 4.60 del apéndice.

La aplicación de ABA reduce la acumulación de **diaminopropano** en los dos muestreos realizados y en los tres órganos, excepto en nódulo que en el primero hay un ligero incremento respecto al control. En la primera recolecta se

Resultados

observa que el estrés salino reduce el 50% el contenido de DAP en hoja y el 37% en nódulo, mientras que en raíz lo aumenta (20%).

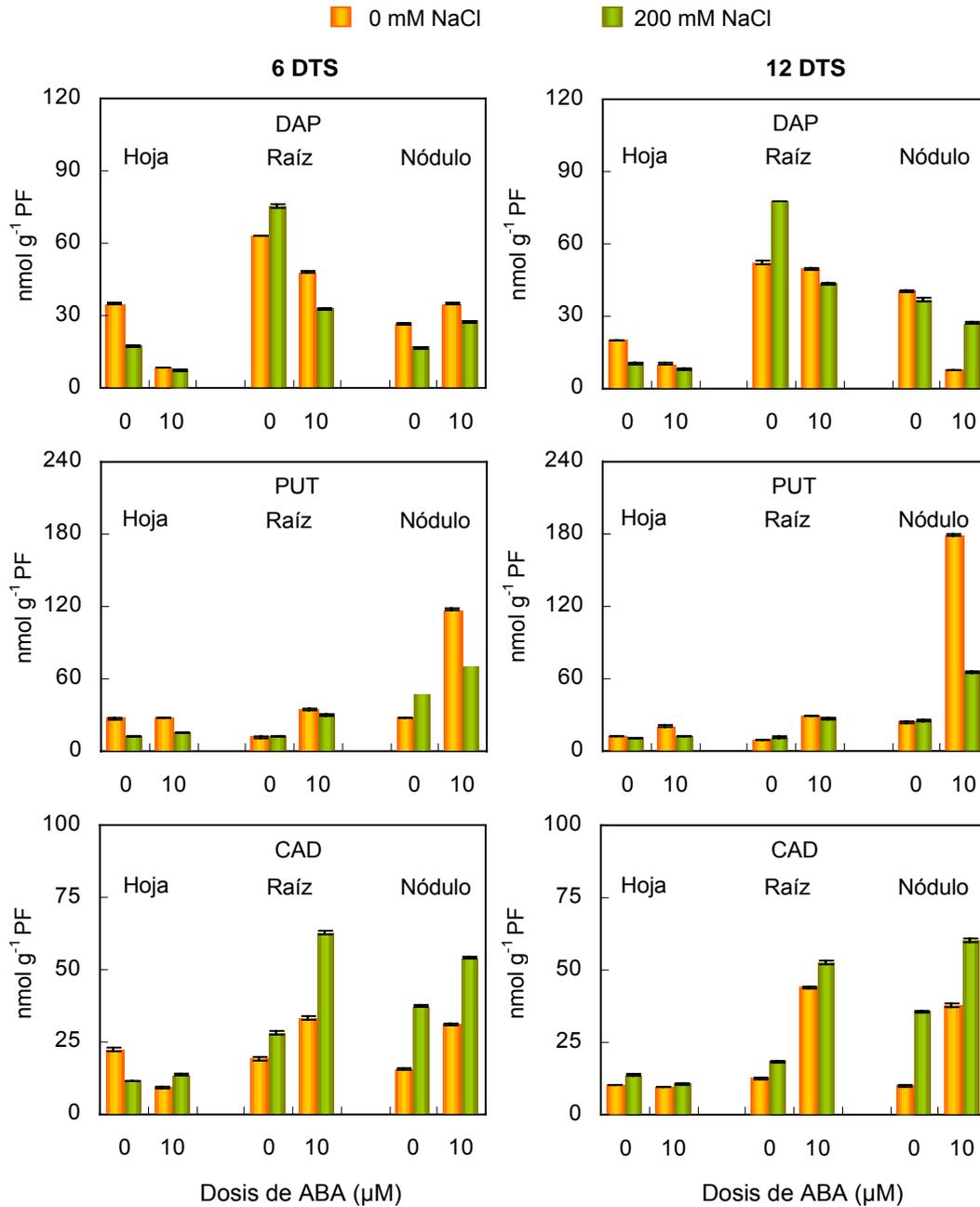


Figura 4.25. Contenido de poliaminas: diaminopropano (DAP), putrescina (PUT) y cadaverina (CAD) en hoja, raíz y nódulo de plantas de *M. sativa* crecidas con diferentes dosis de ABA (0, 10 μM) y NaCl (0, 200 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

En los diagramas de barras correspondientes al contenido de **putrescina** (Fig. 4.25), se refleja que el ABA estimula su acumulación en los tres órganos en las dos cosechas realizadas, destacando el drástico incremento en nódulo, en la primera recolecta es del 75% y en la segunda del 85%. La salinidad también promueve la acumulación de PUT en raíz y nódulo, aunque no tan espectacular como la descrita para el tratamiento hormonal, sin embargo en hoja la respuesta de la PUT al NaCl es distinta a la de raíz y nódulo.

El contenido de **cadaverina** incrementa con el ABA y el NaCl en raíz y nódulo en los dos muestreos y en hoja disminuye con ambos tratamientos en el primero, mientras que en el segundo el NaCl provoca un pequeño incremento, y el ABA no induce cambios significativos. Con el tratamiento combinado (ABA+NaCl) se alcanza el máximo contenido de CAD en raíz (70%) y nódulo (70-80%).

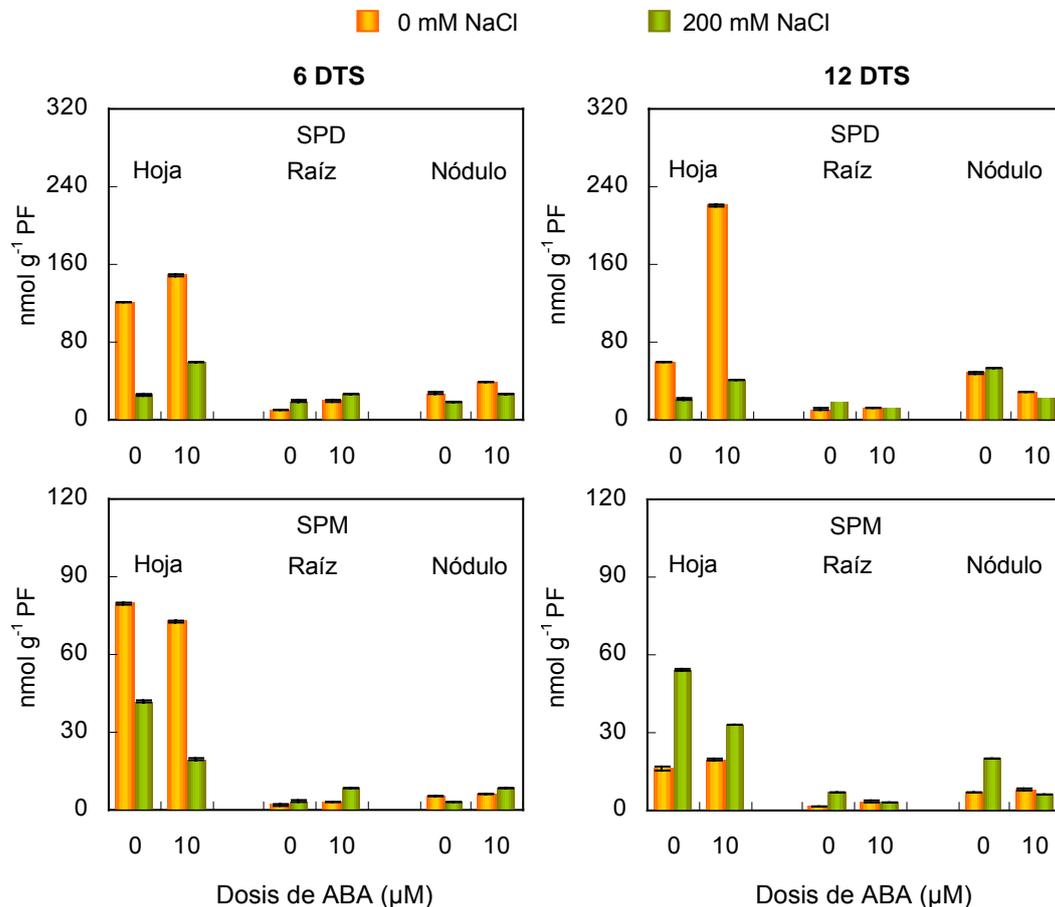


Figura 4.26. Contenido de poliaminas: espermidina (SPD) y espermina (SPM) en hoja, raíz y nódulo de plantas de *M. sativa* crecidas con diferentes dosis de ABA (0, 10 μ M) y NaCl (0, 200 mM). DTS: días después de aplicar el tratamiento salino. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

En la figura 4.26 se representa el contenido de **espermidina y espermina** en hoja, raíz y nódulo, observándose que la hoja es el principal órgano donde se acumulan estas poliaminas. El ABA aumenta el contenido de **espermidina** en hoja, en el primer muestreo un 20% y en el segundo un 75%, mientras que el NaCl la disminuye (60-80%). En las hojas de plantas con tratamiento combinado (ABA+NaCl) la acumulación de SPD es menor a la detectada en la tratadas con ABA, intuyéndose que el efecto inhibitor es debido al NaCl.

El ABA exógeno y el NaCl afectan al contenido de **espermina** de hoja reduciéndolo, aunque varía la intensidad de la respuesta con el tiempo de exposición de la planta a ambos tratamientos. En el primer muestreo, la reducción más drástica la causa el NaCl (50%), mientras que la del ABA es del 10% y la del tratamiento combinado (ABA+NaCl) del 75%. En el segundo con ambos tratamientos aumenta el contenido de SPM foliar, un 70% con el NaCl y un 15% con el ABA.

En raíz el contenido de SPD y SPM aumenta con el ABA y NaCl en las dos recolectas. En nódulo el ABA incrementa el contenido de ambas poliaminas en las dos cosechas, mientras que la salinidad a los 6 DTS reduce la SPD y SPM, y a los 12 DTS aumenta la SPD (10%) y la SPM (66%) respecto al control.

Tabla 4.1. Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con el crecimiento peso seco planta (PSP), peso seco parte aérea (PSPA), peso seco raíz (PSR), relación raíz/parte aérea (RPA), actividad nitrogenasa aparente (ANA), actividad nitrogenasa total (ANT), tasa fijación nitrógeno (TFN), actividades enzimáticas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), lipoxigenasa (LOX), ascorbato peroxidasa (APX), monodehidroascorbato reductasa (MDR), glutatión reductasa (GR), dehidroascorbato reductasa (DHR), aminoácidos (Aa), prolina (Pro), azúcares (Ast), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), peroxidación de lípidos (TBAR), ácido abscísico (ABA), putrescina (PUT), cadaverina (CAD), espermidina (SPD) y espermina (SPM) en plantas de *P. vulgaris*. Los símbolos seguidos de “h”, “r” y “n” indican hoja, raíz y nódulo respectivamente

	PSP	PSPA	PSR	RPA	ANA	ANT	TFN	SOD (n)	CAT (n)	LOX (n)	APX (n)	MDR (n)	GR (n)	DHR (n)	Aa (n)	Pro (n)	Ast (n)	H ₂ O ₂ (n)	TBAR (n)	ABA (h)	ABA (r)	PUT (h)	SPD (h)	SPM (h)	PUT (n)	CAD (n)	SPD (n)	SPM (n)		
PSP	1.00																													
PSPA	1.00	1.00																												
PSR	0.96	0.94	1.00																											
RPA	-0.74	-0.77	-0.53	1.00																										
ANA	-0.24	-0.26	-0.13	0.59	1.00																									
ANT	-0.27	-0.28	-0.24	0.48	0.92	1.00																								
TFN	-0.29	-0.30	-0.28	0.44	0.88	0.99	1.00																							
SOD(n)	-0.52	-0.53	-0.54	0.42	0.30	0.32	0.33	1.00																						
CAT(n)	-0.76	-0.78	-0.64	0.86	0.79	0.74	0.71	0.48	1.00																					
LOX(n)	-0.30	-0.27	-0.44	-0.16	-0.07	-0.01	0.08	0.48	0.04	1.00																				
APX(n)	-0.11	-0.13	-0.03	0.17	0.16	0.15	0.21	0.28	0.17	0.42	1.00																			
MDR(n)	-0.60	-0.59	-0.51	0.53	0.55	0.43	0.42	-0.01	0.75	0.17	0.05	1.00																		
GR(n)	0.37	0.39	0.25	-0.69	-0.62	-0.60	-0.53	-0.32	-0.68	0.56	0.31	-0.21	1.00																	
DHR(n)	0.70	0.70	0.63	-0.55	-0.16	-0.26	-0.31	0.02	-0.48	-0.24	-0.27	-0.56	0.01	1.00																
Aa(n)	-0.33	-0.32	-0.38	0.08	0.08	0.17	0.27	0.44	0.16	0.86	0.74	0.15	0.47	-0.50	1.00															
Pro(n)	-0.07	-0.06	-0.06	-0.13	-0.09	-0.20	-0.14	0.00	-0.05	0.71	0.65	0.34	0.74	-0.28	0.72	1.00														
Ast(n)	-0.33	-0.32	-0.42	-0.02	-0.15	0.11	0.23	0.15	0.02	0.59	0.58	0.00	0.42	-0.65	0.80	0.43	1.00													
H ₂ O ₂ (n)	-0.09	-0.12	0.03	0.33	0.38	0.37	0.42	0.19	0.29	0.25	0.93	0.13	0.13	-0.40	0.67	0.51	0.54	1.00												
TBAR(n)	-0.71	-0.69	-0.77	0.34	0.10	0.19	0.27	0.68	0.41	0.84	0.45	0.31	0.17	-0.58	0.85	0.50	0.67	0.36	1.00											
ABA(h)	0.24	0.23	0.22	0.05	0.57	0.74	0.72	-0.02	0.23	-0.44	-0.09	-0.12	-0.57	0.17	-0.27	-0.60	-0.07	0.11	-0.36	1.00										
ABA(r)	-0.35	-0.36	-0.27	0.58	0.83	0.80	0.74	0.19	0.80	-0.37	-0.20	0.55	-0.85	-0.07	-0.33	-0.45	-0.34	-0.02	-0.12	0.63	1.00									
PUT(h)	0.35	0.32	0.52	0.04	0.24	0.08	0.08	-0.34	-0.04	-0.04	0.67	0.15	0.32	-0.11	0.28	0.57	0.10	0.76	-0.15	-0.02	-0.13	1.00								
SPD(h)	0.20	0.17	0.38	0.14	0.29	0.09	0.08	-0.36	0.13	-0.12	0.63	0.35	0.21	-0.14	0.16	0.55	0.01	0.69	-0.19	-0.04	0.04	0.94	1.00							
SPM(h)	-0.25	-0.23	-0.25	-0.05	-0.38	-0.38	-0.36	-0.63	-0.04	-0.12	-0.26	0.47	0.25	-0.46	-0.20	0.19	0.09	-0.29	-0.10	-0.42	-0.11	-0.05	0.14	1.00						
PUT(n)	-0.03	-0.04	-0.05	0.17	0.65	0.72	0.76	0.35	0.34	0.46	0.48	0.17	0.00	-0.27	0.67	0.29	0.44	0.64	0.46	0.40	0.20	0.36	0.19	-0.55	1.00					
CAD(n)	-0.31	-0.31	-0.30	0.32	0.61	0.62	0.67	0.44	0.49	0.66	0.55	0.43	0.08	-0.45	0.81	0.54	0.48	0.64	0.70	0.07	0.16	0.35	0.25	-0.35	0.92	1.00				
SPD(n)	0.18	0.18	0.19	-0.24	-0.01	-0.06	-0.08	-0.65	-0.02	-0.30	-0.02	0.41	0.14	0.04	-0.35	0.17	-0.16	-0.06	-0.47	0.06	0.20	0.30	0.53	0.64	-0.36	-0.32	1.00			
SPM(n)	0.20	0.21	0.17	-0.36	-0.32	-0.52	-0.57	-0.14	-0.23	-0.06	-0.28	0.07	0.19	0.59	-0.44	0.13	-0.60	-0.51	-0.34	-0.42	-0.08	-0.12	0.06	0.28	-0.66	-0.51	0.50	1.00		

Valor crítico
 $P \leq 0.05$ 0.01 0.001
0.70 0.83 0.92

Tabla 4.2. Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con el crecimiento peso seco planta (PSP), peso seco parte aérea (PSPA), peso seco raíz (PSR), actividad nitrogenasa total (ANT), tasa fijación nitrógeno (TFN), actividades enzimáticas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), monodehidroascorbato reductasa (MDR), dehidroascorbato reductasa (DHR), ascorbato total (Asctot), ascorbato reducido (AsA), dehidroascorbato (DHA), relación ascorbato oxidado/reducido (Aox/rd), glutatión total (Glutot), glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG), relación glutatión oxidado/reducido (Gox/rd), aminoácidos (Aa), prolina (Pro), azúcares (Ast), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), peroxidación de lípidos (TBAR), ácido salicílico (AS), ácido abscísico (ABA), putrescina (PUT), espermidina (SPD) y espermina (SPM) en plantas de *P. vulgaris*. Los símbolos seguidos de "h", "r" y "n" indican hoja, raíz y nódulo respectivamente

	PSP	PSPA	PSR	ANT	TFN	SOD (n)	CAT (n)	MDR (n)	DHR (n)	Asc tot(n)	AsA (n)	DHA (n)	Aox/rd (n)	Glu tot(n)	GSH (n)	GSSG (n)	Gox/rd (n)	Aa (h)	Pro (h)	Ast (h)	H ₂ O ₂ (h)	TBAR (h)	AS (h)	ABA (h)	ABA (r)	PUT (h)	SPD (h)	SPM (h)	
PSP	1.00																												
PSPA	1.00	1.00																											
PSR	0.96	0.94	1.00																										
ANT	-0.27	-0.28	-0.24	1.00																									
TFN	-0.29	-0.30	-0.28	0.99	1.00																								
SOD(n)	-0.52	-0.53	-0.54	0.32	0.33	1.00																							
CAT(n)	-0.76	-0.78	-0.64	0.74	0.71	0.48	1.00																						
MDR(n)	-0.60	-0.59	-0.51	0.43	0.42	-0.01	0.75	1.00																					
DHR(n)	0.70	0.70	0.63	-0.26	-0.31	0.02	-0.48	-0.56	1.00																				
Asctot(n)	-0.71	-0.70	-0.77	0.69	0.75	0.56	0.73	0.56	-0.59	1.00																			
AsA(n)	0.20	0.19	0.24	0.09	0.15	0.12	-0.09	-0.01	-0.16	0.18	1.00																		
DHA(n)	-0.78	-0.76	-0.86	0.58	0.61	0.45	0.73	0.52	-0.46	0.82	-0.41	1.00																	
Aox/rd(n)	-0.64	-0.62	-0.71	0.40	0.40	0.21	0.58	0.44	-0.27	0.55	-0.71	0.92	1.00																
Glutot(n)	0.44	0.44	0.36	0.19	0.25	0.32	-0.30	-0.54	0.27	0.10	0.70	-0.31	-0.54	1.00															
GSH(n)	0.48	0.48	0.38	0.12	0.18	0.32	-0.37	-0.61	0.35	0.05	0.64	-0.32	-0.53	0.99	1.00														
GSSG(n)	-0.47	-0.49	-0.27	0.44	0.43	-0.15	0.65	0.76	-0.76	0.40	0.28	0.21	0.08	-0.31	-0.42	1.00													
Gox/rd(n)	-0.43	-0.44	-0.30	0.14	0.08	-0.41	0.50	0.75	-0.49	0.07	-0.44	0.32	0.45	-0.88	-0.93	0.68	1.00												
Aa(h)	0.30	0.32	0.11	0.26	0.34	0.20	-0.31	-0.51	0.08	0.27	0.36	0.05	-0.14	0.81	0.83	-0.41	-0.75	1.00											
Pro(h)	0.02	0.05	-0.13	-0.64	-0.64	0.28	-0.43	-0.42	0.51	-0.29	-0.39	-0.04	0.09	-0.10	0.01	-0.81	-0.37	-0.02	1.00										
Ast(h)	0.11	0.13	-0.05	-0.54	-0.53	0.39	-0.47	-0.62	0.58	-0.25	-0.29	-0.06	0.02	0.15	0.26	-0.90	-0.59	0.21	0.96	1.00									
H ₂ O ₂ (h)	0.32	0.29	0.40	0.13	0.18	0.01	-0.18	-0.38	-0.13	-0.02	0.76	-0.45	-0.64	0.75	0.69	0.20	-0.49	0.48	-0.52	-0.31	1.00								
TBAR(h)	0.55	0.59	0.34	-0.45	-0.44	0.00	-0.73	-0.72	0.73	-0.42	-0.23	-0.26	-0.13	0.30	0.41	-0.98	-0.64	0.45	0.76	0.83	-0.21	1.00							
AS(h)	-0.27	-0.26	-0.31	-0.02	0.00	0.90	0.08	-0.34	0.16	0.27	0.26	0.10	-0.13	0.49	0.52	-0.38	-0.66	0.33	0.47	0.60	0.16	0.26	1.00						
ABA(h)	0.24	0.23	0.22	0.74	0.72	-0.02	0.23	-0.12	0.17	0.18	-0.17	0.27	0.29	0.29	0.27	-0.02	-0.09	0.43	-0.46	-0.29	0.21	0.00	-0.21	1.00					
ABA(r)	-0.35	-0.36	-0.27	0.80	0.74	0.19	0.80	0.55	-0.07	0.43	-0.39	0.62	0.65	-0.32	-0.36	0.38	0.49	-0.25	-0.41	-0.43	-0.32	-0.43	-0.21	0.63	1.00				
PUT(h)	0.35	0.32	0.52	0.08	0.08	-0.34	-0.04	0.15	-0.11	-0.15	0.74	-0.57	-0.65	0.32	0.23	0.54	0.01	-0.10	-0.67	-0.64	0.69	-0.49	-0.30	-0.02	-0.13	1.00			
SPD(h)	0.20	0.17	0.38	0.09	0.08	-0.36	0.13	0.35	-0.14	-0.10	0.56	-0.41	-0.42	0.07	-0.02	0.62	0.23	-0.34	-0.64	-0.67	0.48	-0.59	-0.41	-0.04	0.04	0.94	1.00		
SPM(h)	-0.25	-0.23	-0.25	-0.38	-0.36	-0.63	-0.04	0.47	-0.46	-0.08	-0.35	0.13	0.31	-0.77	-0.77	0.33	0.71	-0.52	-0.01	-0.25	-0.46	-0.25	-0.68	-0.42	-0.11	-0.05	0.14	1.00	

Valor crítico
 $P \leq 0.05$ 0.01 0.001
0.70 0.83 0.92

Tabla 4.3. Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con el crecimiento peso seco planta (PSP), peso seco parte aérea (PSPA), peso seco raíz (PSR), actividad nitrogenasa total (ANT), tasa fijación nitrógeno (TFN), actividades enzimáticas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasa (POX), ascorbato peroxidasa (APX), monodehidroascorbato reductasa (MDR), glutatión reductasa (GR), dehidroascorbato reductasa (DHR), aminoácidos (Aa), prolina (Pro), azúcares (Ast), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), peroxidación de lípidos (TBAR), ácido abscísico (ABA), diaminopropano (DAP), putrescina (PUT), cadaverina (CAD), espermidina (SPD) y espermina (SPM) en plantas de *M. sativa*. Los símbolos seguidos de "h", "r" y "n" indican hoja, raíz y nódulo respectivamente

	PSP	PSPA	PSR	ANT	TFN	SOD (n)	CAT (n)	POX (n)	APX (n)	MDR (n)	GR (n)	DHR (n)	Aa (n)	Pro (n)	Ast (n)	H ₂ O ₂ (n)	TBAR (n)	ABA (h)	ABA (r)	DAP (r)	PUT (r)	CAD (r)	SPD (r)	DAP (n)	PUT (n)	CAD (n)	SPD (n)	SPM (n)					
PSP	1.00																																
PSPA	0.99	1.00																															
PSR	0.97	0.93	1.00																														
ANT	0.70	0.74	0.61	1.00																													
TFN	0.65	0.68	0.57	0.99	1.00																												
SOD(n)	-0.60	-0.54	-0.64	-0.18	-0.21	1.00																											
CAT(n)	0.64	0.58	0.68	0.56	0.61	-0.74	1.00																										
POX(n)	-0.72	-0.78	-0.62	-0.84	-0.78	0.00	-0.27	1.00																									
APX(n)	-0.13	-0.12	-0.13	-0.44	-0.45	-0.06	-0.25	0.01	1.00																								
MDR(n)	-0.15	-0.14	-0.15	0.13	0.06	0.70	-0.38	-0.15	-0.47	1.00																							
GR(n)	0.28	0.18	0.43	0.10	0.14	-0.11	0.48	-0.06	-0.21	0.06	1.00																						
DHR(n)	-0.56	-0.62	-0.45	-0.84	-0.78	-0.04	-0.16	0.71	0.59	-0.43	0.18	1.00																					
Aa(n)	-0.08	-0.05	-0.12	-0.04	-0.15	0.67	-0.69	-0.29	0.09	0.75	-0.26	-0.33	1.00																				
Pro(n)	-0.69	-0.64	-0.74	-0.74	-0.71	0.21	-0.56	0.53	0.65	-0.40	-0.50	0.69	-0.06	1.00																			
Ast(n)	-0.38	-0.45	-0.26	-0.85	-0.85	0.03	-0.34	0.54	0.67	-0.29	0.23	0.89	0.00	0.58	1.00																		
H ₂ O ₂ (n)	0.52	0.58	0.41	0.77	0.72	-0.14	0.16	-0.64	-0.35	0.21	-0.43	-0.90	0.27	-0.53	-0.83	1.00																	
TBAR(n)	-0.68	-0.66	-0.69	-0.71	-0.67	-0.03	-0.45	0.74	0.36	-0.39	-0.64	0.55	-0.17	0.82	0.39	-0.28	1.00																
ABA(h)	0.04	-0.07	0.19	-0.47	-0.53	-0.11	-0.13	0.43	-0.12	0.28	0.35	0.23	0.24	-0.21	0.46	-0.31	-0.01	1.00															
ABA(r)	0.09	-0.03	0.25	-0.33	-0.37	-0.22	0.12	0.42	-0.26	0.31	0.43	0.18	0.09	-0.35	0.30	-0.25	-0.10	0.94	1.00														
DAP(r)	-0.63	-0.52	-0.76	-0.16	-0.14	0.47	-0.60	0.14	0.18	0.01	-0.82	-0.01	0.20	0.63	-0.16	0.18	0.63	-0.58	-0.66	1.00													
PUT(r)	0.13	0.04	0.27	0.02	0.06	-0.23	0.58	0.25	-0.50	0.13	0.79	0.16	-0.44	-0.47	0.03	-0.40	-0.41	0.43	0.63	-0.74	1.00												
CAD(r)	-0.03	-0.14	0.14	-0.39	-0.37	-0.07	0.18	0.41	-0.14	0.04	0.84	0.48	-0.23	-0.18	0.55	-0.71	-0.24	0.68	0.68	-0.73	0.79	1.00											
SPD(r)	-0.39	-0.45	-0.28	-0.69	-0.72	0.05	-0.28	0.73	-0.10	0.32	-0.01	0.39	0.19	0.15	0.42	-0.40	0.38	0.81	0.82	-0.17	0.35	0.44	1.00										
DAP(n)	0.29	0.28	0.27	0.02	-0.01	-0.58	0.30	-0.09	0.53	-0.37	-0.39	0.09	-0.09	0.14	0.04	0.25	0.25	-0.06	0.04	0.01	-0.26	-0.41	0.07	1.00									
PUT(h)	0.13	0.11	0.15	0.27	0.32	-0.03	0.43	0.07	-0.81	0.19	0.56	-0.21	-0.40	-0.50	-0.35	-0.12	-0.44	0.11	0.25	-0.43	0.79	0.51	0.05	-0.62	1.00								
CAD(n)	-0.39	-0.48	-0.24	-0.69	-0.63	0.02	-0.01	0.65	0.16	-0.19	0.60	0.82	-0.34	0.31	0.77	-0.96	0.15	0.46	0.43	-0.39	0.59	0.87	0.45	-0.32	0.30	1.00							
SPD(h)	0.28	0.33	0.18	0.17	0.17	-0.68	0.31	0.00	0.08	-0.52	-0.63	-0.18	-0.37	0.13	-0.33	0.46	0.41	-0.25	-0.17	0.23	-0.30	-0.58	-0.05	0.71	-0.25	-0.49	1.00						
SPM(h)	-0.25	-0.25	-0.26	-0.38	-0.33	-0.54	0.06	0.60	0.15	-0.69	-0.48	0.37	-0.59	0.51	0.16	-0.10	0.82	-0.05	-0.05	0.32	-0.18	-0.18	0.19	0.36	-0.17	0.07	0.71	1.00					

Valor crítico
P ≤ 0.05 0.01 0.001
0.70 0.83 0.92

Tabla 4.4. Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con el crecimiento peso seco planta (PSP), peso seco parte aérea (PSPA), peso seco raíz (PSR), relación raíz/parte aérea (RPA), actividad nitrogenasa aparente (ANA), actividad nitrogenasa total (ANT), tasa fijación nitrógeno (TFN), actividades enzimáticas catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), monodehidroascorbato reductasa (MDR), ascorbato total (Asctot), ascorbato reducido (AsA), dehidroascorbato (DHA), relación ascorbato oxidado/reducido (Aox/rd), glutatión total (Glutot), glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG), relación glutatión oxidado/reducido (Gox/rd), aminoácidos (Aa), prolina (Pro), azúcares (Ast), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), peroxidación de lípidos (TBAR), ácido salicílico (AS), ácido abscísico (ABA) en plantas de *M. sativa*. Los símbolos seguidos de "h", "r" y "n" indican hoja, raíz y nódulo respectivamente

	PSP	PSPA	PSR	RPA	ANA	ANT	TFN	CAT (n)	APX (n)	MDR (n)	Asc tot(n)	AsA (n)	DHA (n)	Aox/rd (n)	Glu tot(n)	GSH (n)	GSSG (n)	Gox/rd (n)	Aa (h)	Pro (h)	Ast (h)	H ₂ O ₂ (h)	TBAR (h)	Aa (n)	AS (h)	AS (r)	ABA (h)	ABA (r)	
PSP	1.00																												
PSPA	0.98	1.00																											
PSR	0.96	0.88	1.00																										
RPA	-0.07	-0.27	0.20	1.00																									
ANA	0.64	0.70	0.53	-0.33	1.00																								
ANT	0.53	0.62	0.38	-0.50	0.91	1.00																							
TFN	0.46	0.56	0.31	-0.55	0.84	0.99	1.00																						
CAT(n)	0.64	0.56	0.70	0.28	0.29	0.29	0.28	1.00																					
APX(n)	-0.22	-0.16	-0.29	-0.19	-0.32	-0.30	-0.28	-0.33	1.00																				
MDR(n)	-0.07	-0.09	-0.03	0.08	0.27	0.06	-0.02	-0.19	-0.43	1.00																			
Asctot(n)	-0.27	-0.21	-0.34	-0.30	-0.31	-0.25	-0.21	-0.55	0.73	-0.14	1.00																		
AsA(n)	-0.45	-0.38	-0.50	-0.15	-0.20	-0.35	-0.39	-0.65	0.63	0.32	0.55	1.00																	
DHA(n)	0.01	0.04	-0.03	-0.24	-0.22	-0.03	0.04	-0.16	0.40	-0.41	0.77	-0.10	1.00																
Aox/rd(n)	0.32	0.30	0.33	-0.10	-0.03	0.17	0.23	0.25	-0.16	-0.38	0.21	-0.68	0.77	1.00															
Glutot(n)	0.42	0.46	0.33	-0.39	0.02	0.22	0.29	0.17	0.06	-0.59	0.20	-0.48	0.60	0.74	1.00														
GSH(n)	0.40	0.44	0.31	-0.40	-0.01	0.20	0.27	0.16	0.09	-0.61	0.21	-0.45	0.60	0.72	1.00	1.00													
GSSG(n)	0.49	0.52	0.41	-0.34	0.11	0.29	0.35	0.19	-0.04	-0.50	0.16	-0.53	0.60	0.77	0.97	0.94	1.00												
Gox/rd(n)	0.03	-0.05	0.14	0.42	0.17	0.02	-0.04	-0.01	-0.26	0.44	-0.17	-0.02	-0.19	-0.16	-0.48	-0.54	-0.24	1.00											
Aa(h)	-0.09	-0.01	-0.19	-0.40	-0.31	-0.14	-0.06	-0.30	0.56	-0.74	0.48	0.02	0.56	0.37	0.72	0.74	0.60	-0.59	1.00										
Pro(h)	-0.78	-0.71	-0.82	-0.22	-0.62	-0.52	-0.46	-0.82	0.46	-0.10	0.68	0.51	0.42	0.00	0.02	0.05	-0.07	-0.27	0.53	1.00									
Ast(h)	-0.45	-0.46	-0.42	0.08	-0.54	-0.65	-0.66	-0.50	0.56	0.23	0.57	0.63	0.21	-0.18	-0.28	-0.28	-0.29	0.15	0.14	0.60	1.00								
H ₂ O ₂ (h)	0.03	0.08	-0.04	-0.26	0.08	0.09	0.09	-0.06	0.28	0.16	0.36	0.43	0.11	-0.22	0.13	0.11	0.18	0.06	0.03	0.04	0.12	1.00							
TBAR(h)	-0.16	-0.21	-0.10	0.09	-0.08	-0.09	-0.09	-0.14	-0.26	0.71	0.02	0.10	-0.05	-0.01	-0.34	-0.37	-0.22	0.53	-0.55	-0.02	0.41	0.15	1.00						
Aa(n)	-0.23	-0.16	-0.30	-0.20	0.31	0.12	0.05	-0.64	0.18	0.63	0.27	0.73	-0.24	-0.60	-0.56	-0.58	-0.48	0.43	-0.29	0.22	0.38	0.29	0.33	1.00					
AS(h)	0.39	0.34	0.42	0.09	0.41	0.40	0.38	0.68	-0.74	0.35	-0.66	-0.58	-0.35	0.16	0.05	0.04	0.11	0.10	-0.48	-0.61	-0.42	0.05	0.25	-0.31	1.00				
AS(r)	0.32	0.41	0.18	-0.33	0.43	0.30	0.24	0.06	0.32	-0.21	-0.11	0.13	-0.23	-0.27	-0.08	-0.07	-0.11	-0.07	0.19	-0.17	0.03	-0.26	-0.43	0.22	-0.17	1.00			
ABA(h)	-0.06	-0.11	0.01	0.29	-0.30	-0.43	-0.46	-0.12	-0.01	0.30	0.00	0.24	-0.19	-0.29	-0.41	-0.45	-0.28	0.66	-0.43	-0.08	0.36	0.12	0.52	0.27	-0.21	-0.14	1.00		
ABA(r)	0.02	-0.04	0.10	0.28	-0.15	-0.22	-0.24	0.06	-0.15	0.31	-0.09	-0.01	-0.11	-0.09	-0.37	-0.42	-0.18	0.80	-0.52	-0.22	0.27	0.07	0.64	0.19	0.02	-0.14	0.92	1.00	

Valor crítico
P ≤ 0.05 0.01 0.001
0.57 0.70 0.82

5. Caracterización de la actividad catalasa de *P. vulgaris* y *M. sativa*

5.1. Actividad catalasa durante el desarrollo ontogénico

El experimento con plantas de judía y alfalfa se inició evaluando la actividad catalasa (CAT) lo largo de la ontogenia del cultivo, que finalizó en floración. Se realizaron 4 muestreos en cada leguminosa, los tres primeros correspondieron a crecimiento vegetativo y el último a floración. Las plantas de judía se cosecharon a los 7, 12, 17 y 28 días de cultivo y las de alfalfa a los 21, 35, 49 y 70.

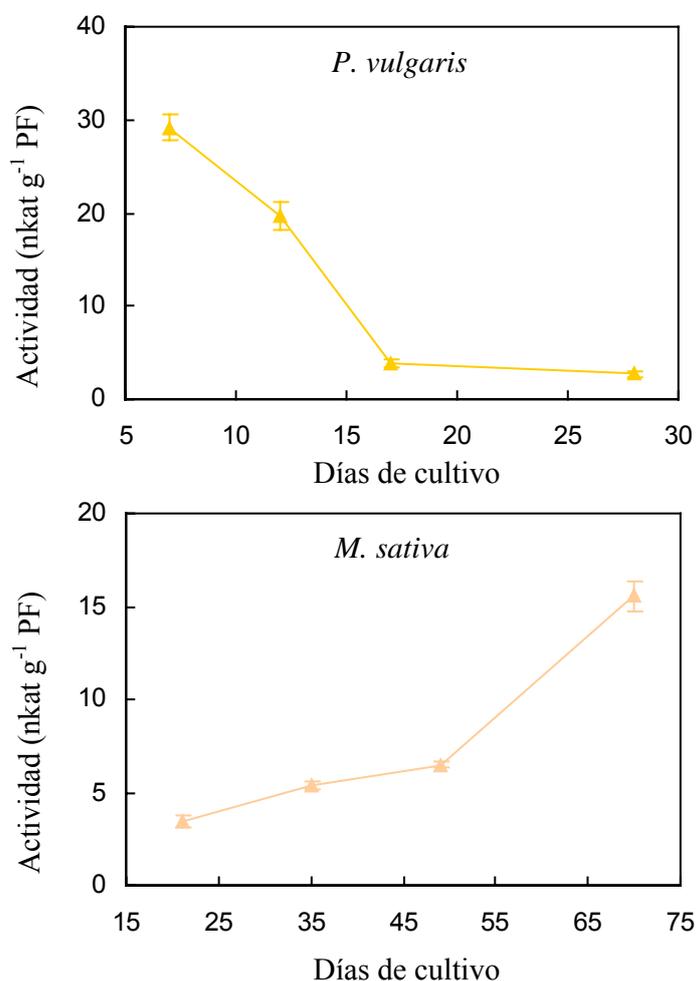


Figura 5.1. Actividad catalasa en hojas de *P. vulgaris* y *M. sativa* en la ontogenia del cultivo. La actividad enzimática se midió en extractos crudos del segundo trifolio de hoja completamente expandido. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

En la figura 5.1 se muestran los cambios en la actividad CAT foliar de judía y alfalfa a lo largo de la ontogenia del cultivo. La CAT disminuyó drásticamente en la leguminosa grano (judía) durante el crecimiento vegetativo, produciéndose un descenso del 85% entre el día 7 y 17 de cultivo, mientras que desde el día 17 hasta floración (día 28) sufrió un descenso del 30%. Por el contrario, la CAT de la forrajera (alfalfa) mostró un aumento continuado a lo largo de la ontogenia, incrementando la actividad un 50% en el crecimiento vegetativo, y un 60% entre el día 49 de cultivo hasta floración (día 70).

Se evidencia un comportamiento distinto en la evolución de ambas actividades CAT foliar a lo largo de la ontogenia, la actividad CAT de judía disminuyó y en alfalfa esta actividad aumentó con el incremento de la edad del cultivo.

5.2. Efecto de la salinidad en la actividad enzimática

También se evaluó el efecto de la salinidad en la CAT de plantas de judía y alfalfa, para lo cual se cultivaron con distintas dosis de NaCl, 0, 25 y 50 mM (*P. vulgaris*) y 0, 100 y 200 mM (*M. sativa*) desde el inicio del cultivo. Se cosecharon hojas y nódulos a los 28 y 70 días de cultivo respectivamente, cuando las dos especies se encuentran en floración. En ese material vegetal recolectado se determinó la actividad CAT en extractos crudos de cada tratamiento.

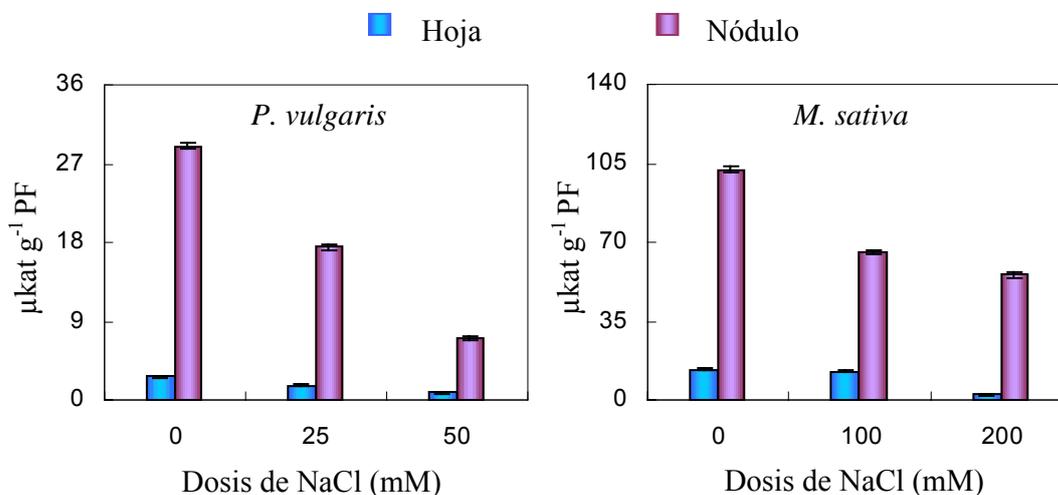


Figura 5.2. Efecto del NaCl en la actividad catalasa de hoja y nódulo en plantas de *P. vulgaris* y *M. sativa*, cultivadas durante 28 y 70 días respectivamente con 0, 25 y 50 mM de NaCl para *P. vulgaris*, y 0, 100 y 200 mM de NaCl para *M. sativa* desde el inicio del cultivo. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar.

La figura 5.2 representa la CAT en hoja y nódulo de *P. vulgaris* y *M. sativa* frente a distintas dosis de NaCl. Se observa que: **a)** el estrés salino induce una disminución de la CAT foliar y nodular en ambas leguminosas, así **en *P. vulgaris*** la disminución en hoja y nódulo es del 40% y el 75% con 25 y 50 mM de NaCl respectivamente, y **en *M. sativa*** la CAT foliar se mantuvo estable con 100 mM de NaCl, y con 200 mM se detectó una disminución del 80%, mientras que en nódulos esta actividad disminuyó alrededor del 35% con 100 mM de NaCl y del 45% con 200 mM. **b)** La actividad enzimática de nódulo en las dos leguminosas, es mayor que la detectada en hoja, de hecho en *P. vulgaris* es 10.5 veces mayor la nodular que la foliar, y en *M. sativa* la actividad nodular es 7.5 veces más elevada que la foliar. **c)** En *M. sativa* (leguminosa forrajera) la actividad CAT de ambos órganos es más elevada que la detectada en hoja y nódulo de *P. vulgaris* (leguminosa grano).

5.3. Purificación parcial de la enzima

La purificación parcial de la catalasa de nódulos de *P. vulgaris* y *M. sativa* no se pudo realizar usando los procedimientos clásicos de purificación (precipitación fraccionada con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico), debido a que esta actividad se inhibe total o parcialmente en presencia de sal (resultados que se muestran en este capítulo), por lo que se utilizaron otros procedimientos entre los que se incluyen: **a)** cromatografía de exclusión molecular, **b)** cromatografía de afinidad y **c)** separación por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS.

Se partió de 10 g de tejido nodular fresco, para disponer de cantidad suficiente de enzima purificada para llevar a cabo diversos ensayos. El material vegetal fue macerado con tampón fosfato potásico 50 mM, centrifugado, y el sobrenadante obtenido se utilizó para la purificación. La primera etapa del proceso de purificación consistió en pasar el extracto a través de una columna de cromatografía de exclusión molecular (gel filtración) con un doble propósito: purificar la enzima y estimar el peso molecular de la enzima nativa.

La figura 5.3 representa una recta obtenida con distintas proteínas patrón de pesos moleculares conocidos (indicados en el pie de figura), a partir de la cuál se puede estimar el **peso molecular nativo** de la CAT nodular de judía y alfalfa, comparando la fracción con actividad CAT con los volúmenes de elución de las proteínas patrón. Como se observa en la figura 5.3 aparecen dos picos de actividad para cada leguminosa, pudiendo sugerir que se trata de dos isoformas diferentes de la enzima. El peso molecular nativo de la CAT nodular de judía se estimó en 59 y 48 kDa, y el de la CAT nodular de alfalfa en 88 y 53 kDa.

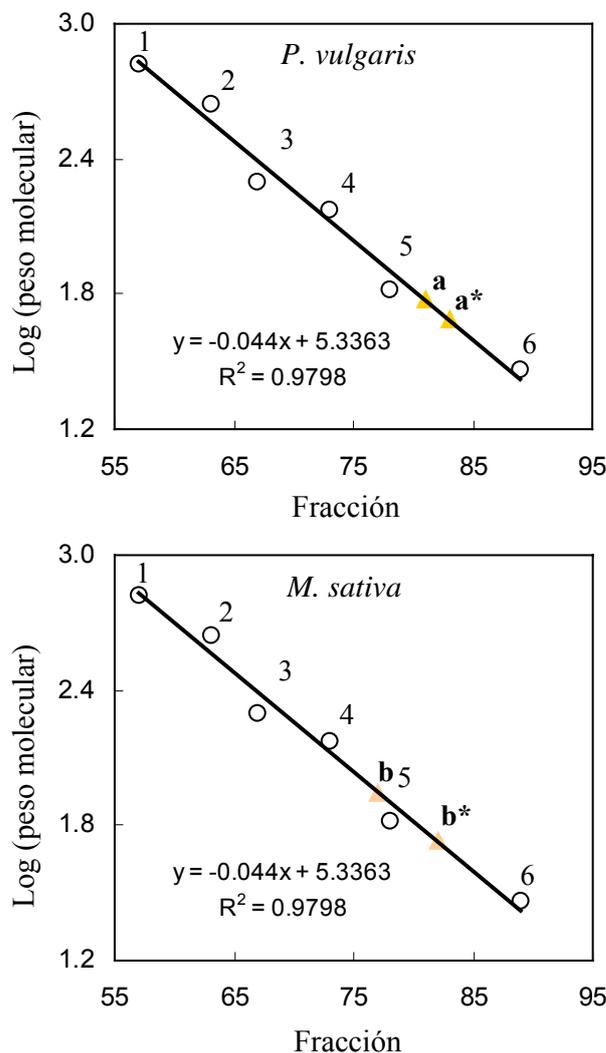


Figura 5.3. Estimación del peso molecular de la catalasa nodular de *P. vulgaris* y *M. sativa* por gel filtración. 1, tiroglobulina (669 kDa); 2, apoferritina (443 kDa); 3, β-amilasa (200 kDa); 4, alcohol deshidrogenasa (150 kDa); 5, albúmina de suero bovino (66 kDa); 6, anhidrasa carbónica (29 kDa); a y a*, catalasa nodular de *P. vulgaris* (59 y 48 kDa respectivamente), b y b*, catalasa nodular de *M. sativa* (88 y 53 kDa respectivamente).

Con las fracciones obtenidas por gel filtración para las distintas catalasas se llevo a cabo a un segundo paso de purificación, que consistió en una cromatografía por afinidad con ión inmobilizado (níquel), un método eficiente para purificar catalasas, obteniéndose una fracción que tenía mayor grado de purificación de la catalasa de ambas leguminosas. Esta fracción se utilizó para determinar el peso molecular de la catalasa nodular de las dos especies vegetales estudiadas, mediante

electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida con SDS, comparando con el peso molecular de proteínas patrón conocidas (indicados en el pie de figura).

Los datos presentados en la figura 5.4, muestran que la catalasa nodular de *P. vulgaris* y *M. sativa* migraron como un único polipéptido de 42 y 46 kDa respectivamente. Estos resultados sugirieron que las dos catalasas, tanto la detectada en nódulos de judía como en nódulos de alfalfa son enzimas monoméricas.

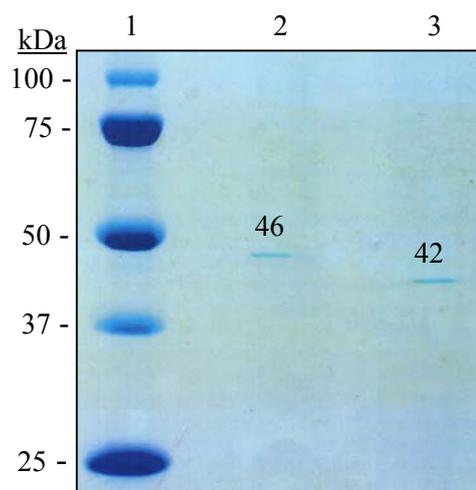


Figura 5.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS de la catalasa purificada de nódulos de *P. vulgaris* y *M. sativa*. 1. Marcadores de peso molecular: 25 kDa, 37 kDa, 50 kDa, 75 kDa y 100 kDa (Precision Plus Protein Standards, Bio-Rad) (10 μ l); 2. Enzima purificada de *M. sativa* (5 μ g); 3. Enzima purificada de *P. vulgaris* (5 μ g).

5.4. Efecto de la sal y otros inhibidores en la catalasa purificada

Para los ensayos de inhibición de la actividad catalasa, se usaron fracciones de la enzima obtenida por cromatografía de gel filtración procedente de hojas y nódulos de plantas de judía y alfalfa control, y se estudió tanto el efecto de la salinidad como de diferentes moléculas/compuestos que potencialmente pueden actuar como inhibidores de la CAT.

A) La sensibilidad de la enzima a las **condiciones salinas** se evaluó incubando fracciones de hoja y nódulo de judía y alfalfa durante 1 h con las siguientes dosis de NaCl de 0, 25, 50, 100, 150, 250 y 500 mM.

En la figura 5.5 se muestra la **actividad CAT foliar** de *P. vulgaris* y *M. sativa* en incubación con diferentes dosis de sal durante 1 h. En este diagrama de barras se puede apreciar: **a)** la inhibición de la CAT foliar con el aumento de la

Resultados

concentración de NaCl, en las dos leguminosas utilizadas; **b)** en *P. vulgaris* no se detecta una disminución significativa en la CAT de hoja con 25 mM de NaCl, necesiéndose dosis más elevadas a 150 mM de sal para observar una reducción de más de un 50%; **c)** en *M. sativa* con 25 mM de NaCl se manifiesta una inhibición del 25% y a partir de esta dosis se observó una caída drástica en la actividad; **d)** es interesante señalar que con la máxima concentración de sal (500 mM) la inhibición de la CAT en hoja de *M. sativa* es prácticamente del 100%, sin embargo todavía se percibe un 20% de actividad CAT en las hojas de *P. vulgaris*; **e)** se evidencia que la CAT foliar de *M. sativa* es más sensible al NaCl que la de *P. vulgaris*, que se muestra más tolerante.

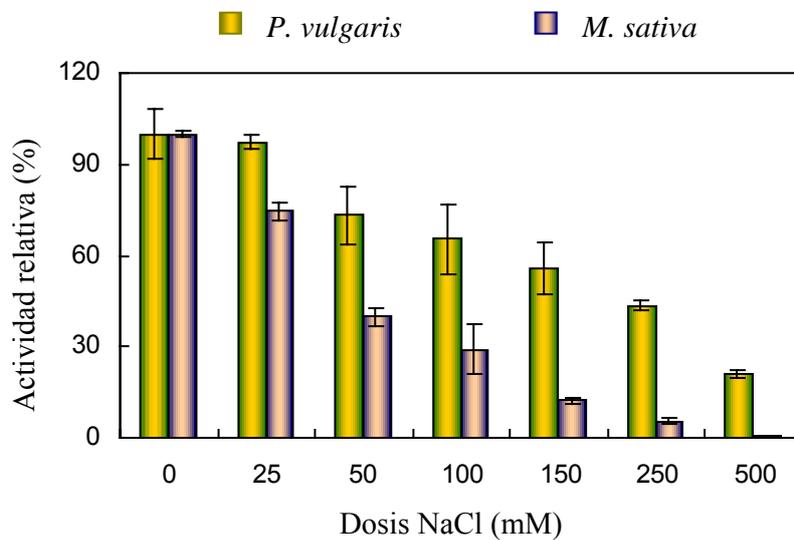


Figura 5.5. Actividad catalasa foliar de *P. vulgaris* y *M. sativa* durante la incubación *in vitro* (1h) con diferentes dosis de sal. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar, expresados como porcentaje relativo a la actividad en la reacción control sin NaCl (*P. vulgaris* 0.36 $\mu\text{kat ml}^{-1}$; *M. sativa* 1.35 $\mu\text{kat ml}^{-1}$)

Los cambios producidos en la **actividad CAT nodular** de judía y alfalfa durante la incubación con NaCl se visualizan en la figura 5.6, en la que se observa el efecto negativo de la sal en ambas actividades. Se detecta que la CAT de nódulo de judía es más sensible al estrés salino que la de los de alfalfa, de hecho con 25 mM de NaCl la CAT de nódulos determinados de judía presenta un porcentaje de inhibición superior al 50%, sin embargo la de los nódulos indeterminados de alfalfa no disminuyó su actividad con esta dosis de NaCl, incluso mantuvo algo más del 50% con 250 mM de NaCl.

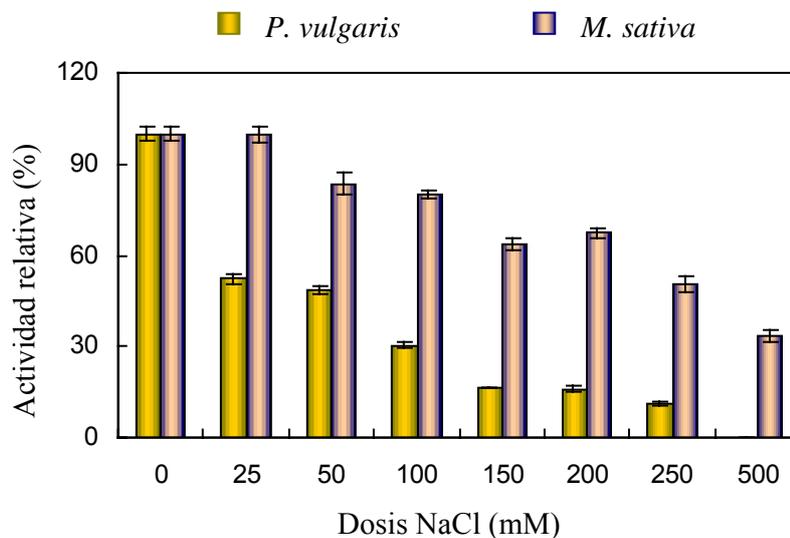


Figura 5.6. Actividad catalasa nodular de *P. vulgaris* y *M. sativa* durante la incubación *in vitro* (1h) con diferentes dosis de sal. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=6) con el error estándar, expresados como porcentaje relativo a la actividad en la reacción control sin NaCl (*P. vulgaris* 2.93 $\mu\text{kat ml}^{-1}$; *M. sativa* 4.75 $\mu\text{kat ml}^{-1}$)

En la incubación con la dosis de 500 mM de NaCl no se detecta actividad en los nódulos de judía, mientras que en los de alfalfa se mantiene un porcentaje de alrededor el 30%. Esta mayor tolerancia a la salinidad de la CAT nodular de alfalfa respecto a la de judía, coincide con los resultados descritos de actividad CAT en extractos crudos procedentes de nódulos de judía y alfalfa en estrés salino (Fig. 5.2).

En los ensayos *in vitro* del efecto del NaCl en la CAT foliar y nodular se detecta que: **a)** la CAT de hoja y nódulo de judía y alfalfa se inhibe por la salinidad; **b)** la CAT foliar de la leguminosa grano (judía) es más tolerante al NaCl que la de la forrajera (alfalfa); **c)** la actividad CAT de nódulos determinados (judía) es más sensible que la de nódulos indeterminados (alfalfa).

B) La sensibilidad de la enzima a **otros posibles inhibidores** se llevó a cabo con extractos parcialmente purificados de nódulo de ambas leguminosas, incubando durante 1 y 4 h en presencia de las moléculas/compuestos que se detallan en la tabla 5.1.

Tabla 5.1. Actividad catalasa nodular ($\mu\text{kat ml}^{-1}$) de *P. vulgaris* y *M. sativa* durante la incubación *in vitro* (1 y 4 h) en presencia de diferentes inhibidores. La actividad enzimática es expresada como porcentaje relativo a la actividad en la reacción control sin inhibidor. La actividad CAT en la reacción control era de $0.5 \mu\text{kat ml}^{-1}$.

Inhibidores	<i>P. vulgaris</i>		<i>M. sativa</i>	
	1 h	4 h	1 h	4 h
Control	100.0	100.0	100.0	100.0
Oxígeno	100.0	100.0	100.0	100.0
Superóxido	100.0	100.0	100.0	100.0
Citrato	85.4	79.6	90.9	99.7
Dithiothreitol	35.6	49.9	62.7	79.0
Ditionito	14.6	5.2	62.0	63.3
β -mercaptoetanol	9.7	2.4	49.0	51.7
Cianuro	0.0	19.8	1.9	15.9
MDS ($P < 0.05$)	6.1		7.3	

En la tabla 5.1 se comprueban los porcentajes de inhibición en la catalasa nodular de ambas leguminosas inducidos por la presencia de moléculas/compuestos, destacándose como resultado que:

- a) En general, la actividad CAT de nódulos determinados de judía está más afectada por las moléculas/compuestos estudiados que la evaluada en los nódulos indeterminados de alfalfa.
- b) El **radical superóxido** y el **oxígeno** no inhibieron la actividad CAT procedente de nódulos de judía y alfalfa.
- c) El **citrato** provocó una inhibición de la CAT de nódulos judía de alrededor el 20% en los dos tiempos de incubación (1 y 4 h), mientras que en los de alfalfa ésta disminuyó solamente un 10% después de 1 h y se recuperó prácticamente el 100% de la actividad a las 4 h.
- d) En la actividad CAT de **nódulos determinados** (judía) con **ditionito** se detectó una inhibición del 85% y del 95% cuando se incubaba durante 1 y 4 h respectivamente, mientras que el **dithiothreitol** con 1 h produce una

inhibición del 65%, y esta inhibición disminuyó en torno a un 15% con el aumento del tiempo de incubación.

- e) El **ditionito** y el **dithiothreitol** provocaron una inhibición parcial de la CAT de **nódulos indeterminados** (alfalfa) en torno al 40% durante la incubación de 1 h, sin embargo a las 4 h con el ditionito se mantuvo el mismo porcentaje de inhibición, pero con el dithiothreitol se recuperó un 20% de actividad.
- f) El **β -mercaptoetanol** inhibió drásticamente (85-95%) la catalasa de nódulos determinados, mientras que en los indeterminados la inhibición fue del 50%.
- g) El **cianuro** fue el inhibidor más potente para la CAT de ambos tipos de nódulos, como se observa en la tabla 5.1 los nódulos determinados no presentaron actividad con el tiempo de incubación de 1 h, mientras que con 4 h se detectó un porcentaje de actividad entre el 15-20% en la CAT nodular de las dos especies de leguminosas.

DISCUSIÓN

1. Estudio ontogénico de la simbiosis *Medicago sativa*-*Sinorhizobium meliloti* en condiciones de salinidad

El efecto adverso que induce la salinidad en determinados procesos fisiológicos del crecimiento y desarrollo de la planta ha sido descrito por diversos autores (Hasegawa *et al.*, 2000; Zhu, 2001; Munns y Tester, 2008). No obstante los resultados que se disponen son variados, sin duda debido a diversas causas: **a)** la mayoría de los datos obtenidos relacionados con la adaptación y/o tolerancia a la sal corresponden a una sola recogida realizada en un determinado periodo del cultivo (Schachtman y Munns, 1992); **b)** el efecto de la sal a largo plazo es diferente al que ejerce de forma inmediata tras la adicción del NaCl (Thiel *et al.*, 1998). El llevar a cabo un estudio durante la ontogenia del cultivo conlleva detectar las respuestas de adaptación a la salinidad en las distintas etapas del desarrollo (vegetativo, floración, fructificación y senescencia) con requerimientos energéticos y nutricionales distintos.

La salinidad provoca una reducción significativa del crecimiento y desarrollo de las plantas de alfalfa (Fig. 1.1), tal como se ha descrito en otras leguminosas como *Cicer arietinum* (Soussi *et al.*, 1999), *Pisum sativum* (Cordovilla *et al.*, 1999b) y *Medicago truncatula* (López *et al.*, 2008a) entre otras. La relación raíz/parte aérea (RPA), considerada como un índice de crecimiento entre los dos órganos, y por tanto de equilibrio entre raíz y parte aérea, reflejó los cambios inducidos por la salinidad, evidenciándose una mayor sensibilidad de la parte aérea al NaCl, ya que en plantas expuestas a la sal incrementó esta relación, resultados que coinciden con los obtenidos en *Vicia faba* (Cordovilla *et al.*, 1994) y *Phaseolus vulgaris* (Tejera *et al.*, 2005). Ocaña *et al.* (1999) en *Vicia faba*, leguminosa formadora de nódulos indeterminados como *Medicago sativa*, establecen que una elevada relación RPA puede estar relacionada con un menor suministro de nutrientes, potenciando el crecimiento de la raíz que favorece la captación de agua y elementos minerales necesarios para la planta.

Un descenso en el contenido de pigmentos fotosintéticos es a menudo uno de los primeros efectos del estrés salino asociado a la clorosis en hoja, que puede ser atribuida a la destrucción de la clorofila por el incremento de la actividad clorofilasa, la cual ha demostrado ser más activa en estas condiciones de estrés (Neera y Ranju, 2004). La medida de la fluorescencia de la clorofila como indicador de la actividad fotosintética entre otros métodos existentes ha sido revisado por Hunt (1978). En esencia el método conlleva la utilización de un pulso de luz para excitar la fluorescencia de la clorofila a una densidad de flujo fotónico fotosintético (FDF) que es insuficiente para activar la fijación del dióxido de carbono. Cuando esta luz es la única que incide en la muestra (adaptada a la oscuridad) se mide el rendimiento de la fluorescencia inicial (F_0). Posteriormente, la muestra se expone a un flash de luz ($5000-10000 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y se mide

el rendimiento de fluorescencia máxima F_m . La expresión de $(F_m - F_0)/F_m$ se simplifica como F_v/F_m , representando la eficiencia de la captura y/o absorción de energía (rendimiento del foton) del FSII y se considera proporcional a la eficiencia fotosintética, este valor es altamente estable y oscila alrededor de 0.83 en los tratamientos no estresados con sal (Fig. 1.2), lo que indica que se requiere de 9-10 fotones para producir una molécula de O_2 liberada por la fotosíntesis. La relación F_v/F_m disminuye con la dosis elevada de sal, indicando que son las plantas que más sufren el estrés, ya que el valor F_v/F_m es de 0.669 y 0.635 (Tabla A 1.3 del apéndice) intensificándose con el tiempo del cultivo, dañando la eficacia del fotosistema II (El-Shintinawy, 2000), o provocando una deficiencia de nitrógeno (Verhoeven *et al.*, 1997). No obstante, en los demás tratamientos el valor es cercano a 0.8 (Hunt, 1978).

El rendimiento fotosintético no fotoquímico del fotosistema II (F_0/F_m), indica 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. En esta expresión, que representa la eficacia e integridad del aparato fotosintético, se ha constatado que existe una correlación lineal con el rendimiento cuantitativo de CO_2 absorbido con baja presión de oxígeno, cuando la fotorespiración esta inhibida. De los datos obtenidos se observa que incrementa con el tiempo de crecimiento y con 150 mM de NaCl, Bilger *et al.* (1987) indicaron que este cociente se incrementa significativamente en plantas estresadas.

La evolución de la actividad nitrogenasa total a lo largo de la ontogenia en nódulos de judía presenta ciertas características constantes en leguminosas grano como *Vicia faba*, valores máximos de actividad durante el crecimiento vegetativo e inicio de floración y desciende a lo largo de la etapa reproductora (Ocaña *et al.*, 1999). También en *M. sativa* (forrajera) con un crecimiento vegetativo largo debido a la proliferación de hojas y raíces, se podría describir este mismo comportamiento. El estrés salino provoca la inhibición de esta actividad y de la tasa de fijación de nitrógeno en nódulos a lo largo de la ontogenia del cultivo (Fig. 1.3), coincidiendo con lo descrito en nódulos de *M. truncatula* (López *et al.*, 2008a). La respuesta de la nitrogenasa al estrés salino, se atribuye a la reducción en la respiración del nodular, como consecuencia de la limitación de O_2 o del sustrato (Soussi *et al.*, 2001; Serrat, 2002) o a la caída en la producción de proteína citosólica, especialmente la leghemoglobina en nódulos (Delgado *et al.*, 1994; López *et al.*, 2008a), aunque hay autores que confirman que la formación del nódulo es el evento de la simbiosis más sensible a la salinidad (Zahran, 1999). La salinidad inhibe más intensamente la nitrogenasa que el proceso de nodulación (Cordovilla *et al.*, 1995) o el de la diferenciación de nuevos nódulos (Hafeez *et al.*, 1988).

La sacarosa sintasa nodular alcanza la máxima actividad al inicio de floración, coincidiendo con las mayores tasas de fijación de nitrógeno (Fig. 1.4), al igual que los resultados de López y Lluch (2008) en plantas de *M. truncatula*. Se puede asumir que en el crecimiento vegetativo se inicia el aporte de fotosintato al nódulo, y la SS controla el metabolismo y suministro de carbono a los bacteroides, pero en el transcurso del vegetativo al reproductor se produce la caída de la SS, mientras que la PEPC continua incrementando su actividad y la MDH e ICDH no experimentan una drástica caída o inhibición (Fig. 1.4), por lo que los sustratos necesarios para el mantenimiento de estas actividades pueden proceder de la invertasa alcalina, enzima hidrolítica de la sacarosa también detectada en nódulos (Flemetakis *et al.*, 2006), que favorece el suministro de metabolitos carbonados al bacteroide (Delgado *et al.*, 1993; Soussi *et al.*, 1998). El comportamiento de la MDH se correlaciona con la actividad nitrogenasa, estando de acuerdo con lo observado por Gálvez *et al.* (2005) en nódulos de guisante en condiciones de estrés hídrico.

La evolución de la actividad glutamina sintetasa y glutamato sintasa del citosol nodular, es parecida a la descrita para la nitrogenasa aparente con máximos valores en crecimiento vegetativo y una disminución en el reproductor (Fig. 1.5). Khadri *et al.* (2001) describen una relación similar entre GS y nitrogenasa en *Vicia faba* con valores de GOGAT de dos órdenes de magnitud inferiores a los de GS, mientras que en estos resultados son de tres órdenes. La sal estimula estas actividades enzimáticas tal como se ha detectado en nódulos de soja expuestos a NaCl (Zilli *et al.*, 2008), sin embargo durante la ontogenia nodular se produjo una caída drástica de la actividad GOGAT, mientras que la GS tan sólo se afectó con dosis elevadas de NaCl, lo que sugiere que es más tolerante a la salinidad tal como se demostró en nódulos de *Vicia faba* y *Vigna radiata* (Cordovilla *et al.*, 1999a; Chakrabarti y Mukherji, 2003). Se ha establecido que los niveles de la actividad que exhibe la glutamato deshidrogenasa (Fig. 1.5) son parecidos a los de GOGAT, mientras que los de la aspartato aminotransferasa son superiores (Wang *et al.*, 2007b). También se muestra que la GDH alcanza el máximo de actividad en fructificación, y no se considera asociada a la fijación de nitrógeno, vinculándose al proceso de senescencia nodular (Groat y Vance, 1981). Se puede argumentar que no se afecta significativamente por la sal, pero no está asociada a la asimilación del amonio nodular, al menos en *M. sativa*, pero si podría tenerse en cuenta en condiciones adversas, de hecho en estrés hídrico se detectó un incremento de actividad GDH en nódulos de *Glycine max* (Sung y Chen, 1983) y *Vigna unguiculata* (Figueiredo *et al.*, 2007). Cordovilla *et al.* (1996) mostraron una inhibición de la actividad GDH en nódulos de haba, coincidiendo con nuestros resultados para, además la aspartato aminotransferasa desciende a lo largo de la ontogenia sin mostrar diferencias significativas tanto en nódulos control como en salinizados.

El malato se considera el sustrato carbonado en el nódulo dirigido al bacteroide, y su limitación debido al estrés salino afecta a la fijación de nitrógeno (Bekki *et al.*, 1987), sin embargo *M. sativa* mantiene con 100 mM de NaCl el contenido de malato nodular y se necesitan mayores niveles de sal para reducir el pool de este en nódulo. En bacteroides de nódulos de guisante Delgado *et al.* (1993) observaron que con 50 mM se provoca una caída del malato, proponiendo que el suscinato o la glucosa podrían mantener la actividad nodular en estas condiciones, también la abundancia de glutamato en nódulo (Fig. 1.6) y la actividad ICDH (Fig. 1.4) incluso con 150 mM de NaCl, podría intervenir en la regulación del metabolismo carbonado bacteroidal (Gálvez *et al.*, 1999).

El contenido de aminoácidos y prolina aumenta en la ontogenia nodular, y el NaCl intensificó esta respuesta 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 (Yamchi *et al.*, 2007). Es interesante resaltar que los niveles de Aa en nódulos salinizados disminuye en fructificación, al igual que en los de judía (Tejera *et al.*, 2004). El contenido de prolina en hoja y raíz mostró el mismo comportamiento que en nódulo, por lo que es importante resaltar implicación en el ajuste osmótico como proceso de adaptación al efecto negativo de altas dosis de NaCl (Chen *et al.*, 2002).

La acumulación de polioles o hidratos de carbono con grupos alcohol cíclicos, se relaciona con la tolerancia al estrés osmótico en un elevado número de plantas, ya que se acumulan en organismos expuestos a este tipo de estrés (Murakeozy *et al.*, 2002). Los datos de la figura 1.8 revelan que en nódulos de plantas expuestas al estrés salino se acumula mayor contenido de polioles (mioinositol, ononitol y pinitol), intensificándose este acumulo con el crecimiento, el comportamiento de cada uno de ellos es diferente, el mioinositol y ononitol descienden, el pinitol incrementa y alcanza el máximo en fructificación, debido a el precursor de la biosíntesis del pinitol, el mioinositol que se transforma en ononitol, y posteriormente pinitol (Chiera *et al.*, 2006). Una tendencia similar ocurre en los polioles acumulados en hoja y raíz, indicando el interés de estos compuestos en los mecanismos de tolerancia al estrés salino e hídrico (Bartels y Sunkar, 2005). Streeter *et al.* (2001) describen la acumulación de pinitol en soja como consecuencia del estrés hídrico, y en transgénicas de tabaco que acumulan ononitol se incrementó la tolerancia a la sequía y a salinidad (Sheveleva *et al.*, 1997). La respuesta del pinitol al estrés salino es semejante a la del contenido de azúcares solubles totales, glucosa y trehalosa, demostrando la implicación de la trehalosa en la respuesta a la salinidad, también descrito en nódulos de *L. japonicus* (López *et al.*, 2006).

2. Respuesta de plántulas de *Phaseolus vulgaris* a la aplicación de ácido salicílico y NaCl

La implicación del ácido salicílico endógeno como molécula reguladora en la planta se estableció en los estudios de termogénesis en la floración del lirio vudú (*Sauromatum guttatum*) (Raskin *et al.*, 1989), y en la actualidad se asume que puede controlar diversos procesos del crecimiento y desarrollo de la planta como la germinación de semillas (Shakirova *et al.*, 2003), diferenciación de raíces (Singh, 1993), crecimiento de plántulas (Klessig y Malamy, 1994), así como procesos metabólicos que se alteran por el estrés biótico (Ryals *et al.*, 1996) y abiótico (Janda *et al.*, 1999; Dat *et al.*, 2000), y en concreto el estrés salino (Senaratna *et al.*, 2000; Al-Hakimi y Hamada, 2001; Gunes *et al.*, 2007).

Las semillas pretratadas con AS desde la germinación y posteriormente crecidas en un medio con NaCl hasta el estado de plántula sufrieron una disminución en el crecimiento por el AS, mostrando una tendencia similar a la observada en plantas de tabaco crecidas en condiciones *in vitro* con AS (Dat *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2001a). La salinidad por sí misma también indujo una reducción drástica en los parámetros de crecimiento determinados comparándolas con las plántulas control. Este efecto del NaCl sobre el peso seco de judía ha sido descrito por Wignarajah (1990), Aouani *et al.* (1998), Pliego *et al.* (2003) y Mnasri *et al.* (2007), sin embargo con el pretratamiento de AS las plántulas adquirieron cierto grado de tolerancia frente a la salinidad (Fig. 2.1), puesto que la disminución del crecimiento no fue tan intensa como la ocasionada por el NaCl, mostrando que este comportamiento es semejante al descrito en maíz y pepino en estas condiciones de estrés (Gunes *et al.*, 2007; Yildirim *et al.*, 2008).

Como consecuencia del efecto primario del estrés salino en planta (daño osmótico e iónico) se produce el daño oxidativo (Zhu, 2001), lo que provoca en la planta que se inicie la producción de antioxidantes enzimáticos para controlar el nivel de EROs, y reparar el daño celular causado por estas (Rubio *et al.*, 2008). En este estudio se comprueba que la salinidad provoca un incremento en todas las actividades enzimáticas antioxidantes determinadas en hoja (Fig. 2.2), detectándose una alta correlación negativa con los parámetros de crecimiento (Tabla 2.1). No obstante en la CAT foliar el estrés salino no induce cambios ni correlaciones significativas, aunque en experimentos realizados *in vitro* se describe que la CAT de hoja de judía es sensible a la salinidad (Tejera *et al.*, 2007), pudiendo estar relacionado con la inhibición de alguna isoenzima de la CAT por el NaCl (Chen *et al.*, 1997b).

El NaCl induce la actividad dehidroascorbato reductasa, enzima necesaria para mantener el pool de ascorbato reducido junto con la glutatión reductasa que le aporta el poder reductor (Tejera *et al.*, 2004), esto encaja con el mantenimiento de

la actividad GR en condiciones de estrés salino (Fig. 2.2). El pretratamiento con AS inhibe las enzimas relacionadas con el ciclo ascorbato-glutation en hoja (Fig 2.2), excepto para la dehidroascorbato reductasa, siendo la inhibición mayor con dosis altas. Hay autores que demuestran el aumento de la defensa antioxidante en plantas tratadas con AS, a través de la inducción de alguna actividad antioxidante como la SOD en hoja de *Brassica juncea* (Yusuf *et al.*, 2008), la POX en hoja de guisante (Fernandes *et al.*, 2006), así como enzimas del ciclo ascorbato-glutation en hoja de *Cucumis sativa* (Shi *et al.*, 2006). No obstante, de acuerdo con Horvath *et al.* (2007) indican que la inhibición de la CAT y de la APX es un modo de acción del AS, con el fin de incrementar el contenido endógeno de H₂O₂ (Fig. 2.8).

El estrés salino en las plantas produce cambios en el contenido de ascorbato y glutacion en raíces de tomate (Mittova *et al.*, 2004), en hojas de plantas de judía incrementa el ascorbato reducido con 150 mM de NaCl (Fig. 2.3). El pretratamiento con AS en las semillas evita este incremento y condiciona que la relación entre DHA/AsA sea mayor, lo que sugiere que el AS favorece la oxidación del ascorbato foliar, como observaron Dat *et al.* (2000) en tabaco pretratado con AS. Sin embargo el AS favorece que en raíz se acumule la forma reducida del ascorbato y por tanto la relación DHA/Asa es menor. Wang y Li (2006) encontraron esta misma distribución foliar y radical en plántulas de uva pretratadas con AS, correlacionando esta distribución del pool de ascorbato con el incremento de calcio citosólico en células en condiciones de estrés por temperaturas extremas (frío y calor). Respecto al glutacion reducido, tanto en hoja como en raíz disminuye en presencia de AS, en contraste Mateo *et al.* (2006) describió un aumento del GSH y GSSG en respuesta al AS en de *A. thaliana*, sin embargo en transgénicas de *A. thaliana*, transformadas con el gen *NahG* procedente de *Pseudomonas putida* que codifica para la salicilato hidrolasa que elimina el AS formando catecol y por tanto la planta acumula menos hormona (AS), Zawoznik *et al.* (2007) obtienen resultados similares a los de este trabajo, ya que las transgénicas acumulan más GSH que las silvestres, y la relación GSSG/GSH es mayor. Las formas reducidas de ascorbato y glutacion (AsA y GSH) disminuyen en presencia de AS, y además la relación oxidado/reducido aumenta, indicando que el AS interviene en los mecanismos de oxidación (Borsani *et al.*, 2001).

La importancia de la prolina y los azúcares no estructurales y solubles ha estado relacionada con el mantenimiento del ajuste osmótico y del turgor celular (Yamchi *et al.*, 2007) evitando así el daño inducido por la salinidad, no obstante se les asigna también el papel de agentes protectores frente al estrés como estabilizadores de estructuras celulares (Rhodes *et al.*, 2002) y eliminadores de radicales libres (Chen y Murata, 2002; Hoque *et al.*, 2007). En estudios anteriores se comprobó que el comportamiento de estos solutos orgánicos en condiciones de estrés salino variaba dependiendo de la especie de leguminosa y del órgano

estudiado (Soussi *et al.*, 1999; Soussi *et al.*, 2001; Pliego *et al.*, 2003; López *et al.*, 2008a), así en nódulo disminuyen (Tejera *et al.*, 2004), mientras que en hoja aumentan (Jiménez-Bremont *et al.*, 2006; López *et al.*, 2008a). Sin embargo, el pretratamiento con AS no cambió significativamente el contenido de azúcares solubles totales y prolina en hoja y raíz de plántulas de judía (Fig. 2.7), aun cuando los estudios realizados por Shakirova *et al.* (2003) evidenciaron una disminución de la prolina en trigo después de 24 h de tratamiento con AS, mientras que en cebada el AS induce la acumulación de prolina en parte aérea y en raíz, siendo más pronunciado el aumento con el tratamiento combinado (AS+NaCl) (El-Tayeb, 2005). Además, el contenido de prolina y azúcares solubles totales aumentó progresivamente en hoja con el estrés salino. Estos resultados indican que el efecto negativo de la salinidad se podría atenuar por el tratamiento previo del SA.

El daño oxidativo inducido por la salinidad se manifiesta alterando biomoléculas fundamentales como los lípidos de membrana (Foyer y Noctor, 2005) que regulan la fluidez y estabilidad de ésta, siendo susceptible al ataque de EROs y generando peróxidos lipídicos (Koca *et al.*, 2007). Al valorar este proceso, en este trabajo, mediante el contenido de TBARS se estableció que la salinidad favoreció la peroxidación de lípidos (Fig. 2.8), efecto que también ha sido descrito por El-Tayeb (2005) en cebada, no obstante cuando las plántulas de judía han sido pretratadas con AS, aunque crezcan en medio salino se detecta una disminución del nivel de TBARS, semejante al descrito en tomate (Tari *et al.*, 2002), lo que evidencia la reducción del daño en las membranas causadas por el estrés salino en estas condiciones. Sin embargo en raíz se observa una respuesta distinta a la de hoja, puesto que el pretratamiento de AS aumenta la peroxidación lipídica (El-Tayeb *et al.*, 2006). El contenido de peróxido de hidrógeno incrementa en hoja y raíz en respuesta al AS y al NaCl, que puede estar relacionado con la inhibición de la actividad CAT ejercida por ambos tratamientos, tal como describe Gunes *et al.* (2007) en plántulas de maíz.

Los niveles endógenos de AS disminuyeron en hoja y raíz de plántulas de judía en estrés salino, resultados que coinciden con los observados en *Iris hexagona* en estas condiciones (Wang *et al.*, 2001), sin embargo en plántulas de arroz expuestas al NaCl se inducen las enzimas de la biosíntesis del AS, lo que favorece que el AS endógeno incremente (Sawada *et al.*, 2006). En este estudio sólo se observan niveles elevados de AS endógeno en las plántulas pretratadas con AS (Fig. 2.9).

En vista de estos resultados, es razonable sugerir que el AS es una molécula que regula procesos de adaptación y respuesta a la sal en plantas de judía. El pretratamiento con AS en presencia y ausencia de estrés salino provocó una supresión de las actividades CAT, POX, APX y MDHAR, que sugiere que estas actividades antioxidantes fueron reguladas negativamente por el AS. La

disminución de prolina, azúcares solubles totales y peroxidación lipídica observada en las plántulas pretratadas puede indicar una respuesta inducida por el AS que favorece la aclimatación de estas plantas a sobrevivir en mejores condiciones ante la salinidad. La dosis de AS menor 0.1 mM provoca una mejor adaptación en la planta que la más elevada (0.5 mM), ya que el crecimiento observado es superior, la inhibición de la CAT es menor, y además la peroxidación de lípidos y el contenido de peróxido de hidrógeno son más bajos, mientras que el resto de sistemas antioxidantes responden de una forma muy similar con ambas dosis. También su posible utilización en agricultura, sería más rentable desde el punto de vista económico y ecológico puesto que la aplicación sería 5 veces menor.

3. Efecto del ácido salicílico o ácido abscísico en las simbiosis *Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium tropici* y *Medicago sativa*-*Sinorhizobium meliloti* en estrés salino

En los experimentos que forman parte de esta memoria y que se discuten a continuación se utiliza ácido abscísico y ácido salicílico como moléculas implicadas en el crecimiento vegetal y que han sido descritas en bibliografía. Como se ha comentado en el experimento anterior de este apartado, realizado con plántulas, el AS regula diversos procesos del crecimiento y desarrollo de la planta, principalmente aquellos que se desencadenan en condiciones de estrés (Shakirova *et al.*, 2003; Gunes *et al.*, 2007). Por otra parte el ABA tradicionalmente se describe como inhibidor del crecimiento, involucrado en la germinación de las semillas (Toh *et al.*, 2008), en los cambios en la relación raíz/parte aérea ante un déficit nutricional (Vysotskaya *et al.*, 2008), y en su respuesta fisiológica más conocida la inducción del cierre estomático ante un estrés osmótico (Wang y Song, 2008).

En nuestro estudio plantas de judía y alfalfa reducen su crecimiento por AS, ABA y estrés salino; sin embargo, el efecto derivado del tratamiento con AS se observa en ambas leguminosas desde la primera cosecha (3 DTS judía, 6 DTS alfalfa), en cambio el de ABA sólo se aprecia en la segunda. También es interesante destacar que dichos efectos son menos drásticos que los ocasionados por la salinidad. En la mayoría de las publicaciones relacionadas con la aplicación de AS en plantas cultivadas en situación de estrés, no utilizan controles con tratamientos de AS en ausencia de estrés. Contrario a nuestros resultados Chen *et al.* (2007a) ha sugerido una posible estimulación de la elongación de plántulas de arroz con la adición exógena de AS. En relación al efecto del ABA nuestros resultados coinciden con los mostrados por Khadri *et al.* (2006; 2007) quienes señalan una ligera reducción del crecimiento en dos variedades de judía (África y Coco) por el tratamiento con ABA. A pesar de lo comentado anteriormente, las plantas de judía y alfalfa en estrés salino mejoran considerablemente su

crecimiento cuando el AS y ABA fueron aplicados al cultivo previo al NaCl. Resultados similares ha sido descritos en la termotolerancia de plantas de guisante (Liu *et al.*, 2006) y tabaco (Dat *et al.*, 2000), en déficit hídrico de cebada (Bandurska y Stroinski, 2005), y estrés salino en cebada (El-Tayeb, 2005), judía (Khadri *et al.*, 2006) y pepino (Yildirim *et al.*, 2008). Ingram y Bartels (1996) y Hasegawa *et al.* (2000) evidencian que el ABA regula la expresión de genes implicados en la protección celular contra la deshidratación y la salinidad.

El proceso de fijación de nitrógeno medido como actividad nitrogenasa aparente, total y tasa de fijación de nitrógeno se afectó negativamente en las dos leguminosas por los niveles de AS y ABA, excepto en judía (nódulos determinados) con el ABA en el primer muestreo. Esta reducción en los parámetros de fijación también ocurre con la salinidad en ambas leguminosas, siendo más acusada que la producida por las hormonas. En este sentido se ha indicado en *Vigna mungo* una disminución de la fijación de nitrógeno proporcional a la concentración de AS aplicada (Ramanujam *et al.*, 1998), además Stacey *et al.* (2006) ha puesto de manifiesto el papel regulador negativo del AS en la formación de nódulos determinados e indeterminados. Nuestros resultados muestran que la aplicación exógena de AS previa a las condiciones salinas mejora los parámetros de fijación de nitrógeno sólo en la leguminosa forrajera (alfalfa). Resultados de González *et al.* (2001a) han mostrado que en nódulos de guisante la tasa de fijación de nitrógeno disminuye un 80% después de nueve días con ABA, lo que se correlaciona con un decremento en la respiración nodular y el contenido de leghemoglobina. Al igual que ocurre en nuestros experimentos, se ha descrito la efectividad de los pretratamientos con ABA en la restauración de las alteraciones que se establecen en algunas leguminosas por efecto del NaCl tales como *Vicia faba* (Bano y Hillman, 1986), *Vigna radiata* (Chakrabarti y Mukherji, 2003) y *Phaseolus vulgaris* (Khadri *et al.*, 2006) mitigando el deterioro del proceso de fijación de nitrógeno. Es de destacar que la mejora de la fijación de nitrógeno por el ABA en condiciones de salinidad se aprecia en judía cuando el tiempo de tratamiento es menor (3 DTS) y en alfalfa a más largo plazo (12 DTS).

La actividad enzimática aldehído oxidasa cataliza la última reacción en la biosíntesis del ABA (Nambara y Marion-Poll, 2005). En general, en judía y alfalfa encontramos que la AAO de hoja y nódulo disminuye con los tratamientos de AS, ABA y NaCl. Zdunek y Lips (2001) indican un incremento en hoja del ABA endógeno por el estrés salino, pudiendo ser debido a la activación de la AAO de raíz y hojas viejas, pudiéndose explicar con esta respuesta nuestros resultados. Por otra parte, Seo *et al.* (2004) han descrito en *A. thaliana* cuatro isoformas de la AAO, siendo más activa la AAO3, igual que lo encontrado en hoja de judía.

Las actividades antioxidantes SOD y POX (Figs. 3.4 y 3.17) incrementaron en nódulos de judía y alfalfa con el AS en la recolecta realizada en plena floración,

en cambio CAT es inhibida por dicho tratamiento. Esta misma respuesta también se observa cuando el NaCl es aplicado al medio de cultivo, pudiendo ser un mecanismo de defensa frente al estrés salino. Se ha sugerido que un modo de acción del AS podría ser la inhibición de CAT y APX (Horvath *et al.*, 2007), o bien regulando la síntesis de enzimas antioxidantes durante el estrés (Fujita *et al.*, 2006). Además se ha descrito que la inhibición de la actividad CAT por estrés salino se relaciona con la acumulación de AS endógeno en plantas (Shim *et al.*, 2003).

Por otra parte el ABA puede causar un incremento transitorio en el contenido de peróxido de hidrógeno, y de este modo inducir la expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes, incrementando la actividad SOD, CAT, POX, APX y GR en plantas (Bellaire *et al.*, 2000; Yildiz-Aktas *et al.*, 2007). Nuestros resultados muestran que la actividades CAT y POX de ambos tipos de nódulos (Figs. 4.4 y 4.17) se estimulan con la presencia de ABA exógeno en la solución de riego, mientras que la SOD tan sólo se vio estimulada en alfalfa con el tratamiento más prolongado de ABA (2° muestreo). Es de destacar que la inhibición producida por CAT en estrés salino es menor con la presencia de ABA en la solución nutritiva, lo cual apoya la idea acerca de la inducción por la hormona de genes que codifican para CAT (Guan y Scandalios, 1998), contribuyendo de esta manera a mejorar la respuesta a la salinidad, ya que CAT es una importante barrera contra el daño oxidativo generado durante el estrés.

El ciclo ascorbato-glutation es crítico para el funcionamiento del nódulo, estando correlacionado con el proceso de fijación de nitrógeno, y por lo tanto jugando un papel muy importante en la protección del nódulo durante cualquier situación de estrés (Matamoros *et al.*, 2003b). APX, que al igual que CAT se encarga de la destrucción del peróxido de hidrógeno, es inhibida por el tratamiento de AS al inicio de floración en ambas leguminosas, lo cual es un comportamiento similar al descrito por Chen *et al.* (2007a) en plántulas de arroz tratadas con 0.1 mM de AS. Esta enzima además muestra un comportamiento diferente en las dos leguminosas frente a la salinidad, mientras que en judía se produce una inhibición, en alfalfa se estimula con el NaCl. Resultados de Tejera *et al.* (2004) también indican una inhibición de APX, MDHAR y GR en esta leguminosa grano en respuesta al estrés salino. En judía además las actividades enzimáticas del ciclo ascorbato-glutation son menores comparadas con las de la leguminosa forrajera, lo que indica una mayor capacidad antioxidante en esta última. Las dos actividades enzimáticas del ciclo encargadas de regenerar el ascorbato reducido (GR y DHAR), en general en nódulos de judía y alfalfa se estimulan tanto con NaCl como con AS, indicando que este último puede mejorar la tolerancia al estrés salino al incrementar dichas actividades, de este modo se mantiene elevado el pool de ascorbato reducido.

El tratamiento con ABA provocó una reducción de la actividad APX en ambas leguminosas, sin embargo estimuló la actividad GR y DHAR de alfalfa de forma proporcional a la dosis de ABA, en judía se inhibió GR, y DHAR se estimuló sólo en el primer muestreo. Contour-Ansel *et al.* (2006) han demostrado que la aplicación de ABA exógeno incrementa los niveles de expresión y actividad GR en hojas de *Vigna unguiculata*, resultado que coincide con lo comentado anteriormente para alfalfa. Por otro lado (Tsai y Kao, 2004) han mostrado que en raíces de arroz la APX y GR se inducen por el ABA.

Se ha descrito que la actividad LOX además de generar hidroperoxidación de lípidos, produce radicales superóxido vía oxidación de piridina, por lo tanto contribuye al estrés oxidativo en plantas (Roy *et al.*, 1994; Van Gestelen *et al.*, 1997). En general los tratamientos de AS y ABA conducen a una disminución en la actividad LOX nodular de judía y alfalfa, excepto en esta última que se induce por ABA. El efecto inhibitor del AS sobre la actividad de esta enzima ha sido descrito con anterioridad por (Nagabhushana *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004; Lapenna *et al.*, 2009). Por otra parte en plantas de soja el ABA causa una disminución de LOX-2 y no altera LOX-1 (Maccarrone *et al.*, 1995), sin embargo en judía Porta *et al.* (1999) ha observado que la aplicación de esta hormona activa la acumulación de ARNm de LOX. Nuestros resultados muestran una inducción de LOX nodular por el NaCl en las dos leguminosas estudiadas. Esta respuesta también ha sido observada en células de *Citrus sinensis* en respuesta al NaCl, pero no con otros estreses ensayados como osmótico, frío o calor (Ben-Hayyim *et al.*, 2001).

El ascorbato y el glutatión en sus formas reducidas (AsA y GSH) funcionan directamente como sistemas de defensa, o indirectamente como cofactores de distintas actividades enzimáticas antioxidantes, por lo tanto en condiciones de estrés se ha observado que las formas reducidas de ambos metabolitos son importantes en los nódulos radicales de leguminosas (Matamoras *et al.*, 2003b; Loscos *et al.*, 2008). En general nuestros resultados muestran una disminución de la forma reducida de ascorbato, y un aumento de la relación DHA/AsA con los tratamientos individuales de AS, ABA y NaCl. Este mismo comportamiento se refleja en el contenido de GSH en nódulos de judía, en cambio en alfalfa la tendencia varía según el tratamiento aplicado, la concentración de este metabolito se mantiene estable, aumenta (con ABA o NaCl) o incluso disminuye (AS). No obstante, es difícil obtener una explicación clara a este comportamiento teniendo en cuenta que dichos metabolitos se transforman continuamente en respuesta al estrés oxidativo. Coincidiendo con nuestros resultados, se ha descrito en hojas de tabaco (Dat *et al.*, 2000) y de plántulas de judía (Palma *et al.*, 2009) un decremento en el contenido de AsA por la aplicación exógena de AS. Asimismo se ha indicado una estrecha relación entre los niveles endógenos de AS y el pool de glutatión en plantas de arroz (Kusumi *et al.*, 2006), concretamente la forma

reducida GSH puede incrementar (Mateo *et al.*, 2006) o disminuir (Palma *et al.*, 2009). En relación al ABA, resultados de Jiang y Zhang (2001) sugieren un incremento significativo de las formas reducidas AsA y GSH en hojas de maíz cuando la hormona se aplica a bajas concentraciones (10-100 μM). El estrés salino en nódulos de *Cicer arietinum* provoca la disminución del contenido de AsA (Nandwal *et al.*, 2007), lo cual podría ser debido a su oxidación o a una velocidad de síntesis lenta en dichas condiciones (Gogorcena *et al.*, 1995).

En condiciones de salinidad se acumulan distintas moléculas orgánicas englobadas en el término “solutos compatibles” que son importantes para: mantener ajuste osmótico y el turgor celular, evitar la deshidratación celular y tener una función protectora, estabilizando la estructura terciaria de proteínas y de las membranas, destruir EROs o actuar como moléculas de transducción de señales (Rhodes *et al.*, 2002). Dentro de los solutos compatibles analizados en nuestros experimentos se encuentran Aa, prolina y Ast en hoja y nódulo de judía y alfalfa. En general prolina y Ast incrementan con la salinidad en los órganos estudiados de ambas leguminosas. En este sentido Yamchi *et al.* (2007) han señalado que la prolina actúa como mediador en el ajuste osmótico, mientras que López *et al.* (2008b) describen que en nódulos de leguminosas se incrementa el contenido de Ast con la salinidad como mecanismo de protección frente al estrés. En relación al contenido de Aa, disminuyó en hoja y nódulo de las dos simbiosis sólo en aquellos muestreos donde la exposición al NaCl fue más prolongada, resultados que concuerdan con los descritos previamente por Tejera *et al.* (2004) en nódulos de judía en estrés salino. Con los tratamientos de AS y ABA este metabolito mostró esa misma tendencia en los dos órganos de las leguminosas estudiadas, sin embargo la prolina aumentó en hoja y disminuyó en nódulo. Esto último ha sido comentado recientemente en hojas de *Brassica juncea* para el AS (Yusuf *et al.*, 2008), y para ABA en hojas de guisante (Fedina *et al.*, 1994), *A. thaliana* (Savoure *et al.*, 1997) y nódulos de judía (Khadri *et al.*, 2006).

El daño oxidativo inducido por estreses, y en particular el salino, se manifiesta por alteraciones en biomoléculas fundamentales de la célula vegetal (Foyer y Noctor, 2005), en estas condiciones se producen EROs como H_2O_2 que atacan los fosfolípidos de las membranas y generan peróxidos de lípidos (Koca *et al.*, 2007). La peroxidación de lípidos (TBARS), utilizada como marcador del estrés oxidativo, se determinó tanto en hoja como en nódulo de las dos leguminosas estudiadas. Las concentraciones de TBARS y H_2O_2 en dichos órganos incrementaron con la aplicación de AS en alfalfa, mientras que en judía disminuyeron con este tratamiento, excepto en las TBARS de nódulo. Estos resultados demuestran una relación directa entre H_2O_2 y TBARS, sin embargo la tendencia cambió de una leguminosa a otra. Se ha sugerido que el AS puede oxidarse induciendo la aparición de EROs, y éstas tienen la capacidad de peroxidar

lípidos de membrana y modificar otras macromoléculas (Rao *et al.*, 1997). Según Harfouche *et al.* (2008) el AS induce un estrés oxidativo transitorio, debido principalmente al incremento de la concentración de H₂O₂ provocado por una inhibición de la actividad CAT y una activación de la SOD (Shim *et al.*, 2003; Azevedo *et al.*, 2004). Esta misma respuesta con el AS se observa en las actividades SOD y CAT determinadas en nódulo de las dos leguminosas, coincidiendo sólo con el incremento de TBARS y H₂O₂ de alfalfa.

Por otra parte la aplicación exógena de ABA induce una disminución en la peroxidación lipídica y en el contenido de peróxido de hidrógeno foliar y nodular de ambas leguminosas, excepto en el H₂O₂ de hojas de alfalfa con 10 µM de ABA. Estos resultados son contrarios a los encontrados en hojas y raíces de arroz, donde el ABA induce la producción de H₂O₂ (Hung y Kao, 2003; Tsai y Kao, 2004). Como se ha comentado anteriormente la salinidad produce un estrés oxidativo en las plantas, que se reflejó en nuestros experimentos por un incremento en la peroxidación de lípidos y en el contenido de H₂O₂ en hoja y nódulo. Resultados similares a los nuestros han sido descritos en hojas (Eyidogan y Oz, 2007) y nódulos (Nandwal *et al.*, 2007) de *Cicer arietinum* en estrés salino. En relación con la respuesta hormona-sal, la disminución de TBARS y H₂O₂ con los tratamientos de AS y ABA puede indicar una mejora en la respuesta del vegetal a la salinidad, lo cual en nuestro experimento pudo observarse más claramente en plantas de judía.

Se ha encontrado una interrelación entre los niveles de ABA y AS en tejidos vegetales, demostrándose que hojas de guisante no alteran el contenido endógeno de éstos en respuesta a estrés por calor cuando se utilizan inhibidores de la biosíntesis de ABA (Abamina) (Liu *et al.*, 2006). Además, en plantas de cebada la aplicación exógena de AS provoca un incremento en el contenido de ABA endógeno (Bandurska y Stroinski, 2005). Los tratamientos de AS y ABA en las leguminosas estudiadas conllevaron a un incremento rápido y significativo de sus respectivos contenidos endógenos en los dos órganos vegetales (hoja y raíz), sin embargo con la aplicación de ABA este incremento se produjo sólo en el primer muestreo. Las variaciones producidas en los contenidos endógenos de una hormona cuando se aplica exógenamente la otra indica la relación que existe entre ambas, aunque al aplicar AS no siempre resulta en un incremento de ABA y viceversa. La salinidad produjo incremento (judía) o disminución (alfalfa) de AS en los órganos estudiados (hoja y raíz), y en el ABA un aumento de los niveles endógenos sólo en el primer muestreo (respuesta a corto plazo). Han sido publicados resultados contrapuestos en el contenido de AS endógeno en respuesta al estrés salino, incremento en plántulas de arroz (Sawada *et al.*, 2006) y disminución en las de judía (Palma *et al.*, 2009). En relación al ABA, resultados de Khadri *et al.* (2006) y Veselov *et al.* (2008) señalan estimulación del nivel endógeno de la hormona por la

salinidad, además coincidiendo con lo comentado en alfalfa plantas de *Iris hexagona* incrementan el contenido de ABA y disminuyen el de AS en respuesta al NaCl (Wang *et al.*, 2001).

Las poliaminas, consideradas moléculas reguladoras del crecimiento vegetal e incluso mensajeros secundarios, se relacionan con la resistencia de la planta a estreses abióticos, incluido el salino (Kuznetsov *et al.*, 2007; Duan *et al.*, 2008). Esta bien argumentado que las PAs intervienen contra el daño oxidativo de forma directa como destructoras de EROs (Roussos y Pontikis, 2007), o a través de la expresión de genes de enzimas antioxidantes (Wi *et al.*, 2006). Lamentablemente en la bibliografía consultada son escasos los resultados que abordan una posible relación entre PAs y las hormonas AS y ABA. Alcazar *et al.* (2006) describen que en condiciones de estrés hídrico se produce acumulación de ABA, y esta hormona regula el metabolismo de las PAs a nivel transcripcional. Sin embargo Jiménez-Bremont *et al.* (2007) destacan que no existen datos relevantes para establecer una conexión directa entre el ABA y los genes de la biosíntesis de las PAs. Otro aspecto a tener en cuenta es que el metabolismo y función de las PAs va a depender de la especie de planta y de la duración del estrés salino (Simon-Sarkadi *et al.*, 2002; Legocka y Kluk, 2005). En nuestros experimentos se determinaron los niveles de cinco poliaminas en hoja, raíz y nódulo de las dos leguminosas estudiadas con los tratamientos de AS, ABA y salinidad. Los resultados indican en judía una ausencia o concentración no detectable de DAP y CAD en hoja y raíz, SPD y SPM en raíz, y DAP en nódulo. Además en esta misma especie es interesante resaltar el decremento que en general se produce en el contenido de PUT (hoja y nódulo), CAD (nódulo) y SPD (hoja) con las hormonas y la sal, mientras que el de SPM (hoja y nódulo) aumenta con estos tratamientos cuando las plantas alcanzan plena floración. Por otra parte se ha descrito que la degradación de PAs por diaminoxidasa (DAO) y poliaminoxidasa contribuye a la biosíntesis de la prolina (Mutlu y Bozcuk, 2007), así usando un inhibidor específico para la DAO, se ha confirmado que 15-20% de la prolina acumulada en hojas de soja expuestas a salinidad proviene de la degradación de las PAs (Su y Bai, 2008). Estas evidencias podrían estar apoyadas por nuestros resultados que muestran una correlación negativa entre el contenido foliar de PUT ($r = -0.67$) y SPD ($r = -0.64$), y la concentración de prolina en este órgano.

En el caso de alfalfa la única poliamina que disminuye con los diversos tratamientos es la DAP en hoja, en las otras el comportamiento es variable dependiendo del órgano estudiado, tipo de poliamina, hormona aplicada y tiempo de muestreo. Respecto a la respuesta frente a la sal en general se destaca el incremento que se produce de todas las PAs en raíz. En este mismo órgano de *Cucumis sativus* se ha descrito un incremento drástico en el contenido de PAs en respuesta a la salinidad (Duan *et al.*, 2008), asimismo en plántulas de *Lupinus*

luteus el incremento de PAs enlazadas a membranas microsomales podrían prevenir el daño oxidativo generado por el estrés osmótico y salino (Legocka y Kluk, 2005).

5. Caracterización de la actividad catalasa de *P. vulgaris* y *M. sativa*

Los cambios en la **actividad catalasa** foliar de judía y alfalfa a lo largo de la ontogenia del cultivo constituye un resultado novedoso, tanto por el estudio comparativo entre dos leguminosas tipo (formadoras de nódulos determinados e indeterminados) como por la distinta evolución de esta actividad en el tiempo, durante la ontogenia en una esta actividad foliar disminuye (judía) y la otra aumenta (alfalfa) (Fig. 5.1). En condiciones de campo, Parra y Ascencio (1992) encontraron una disminución de la CAT foliar en judía con el incremento de la edad de la planta, también Dhindsa *et al.* (1981) detectaron una tendencia similar en hojas de tabaco durante la senescencia, e incluso se ha descrito que la CAT disminuye en cotiledones de judía en la senescencia seminal (Procházková y Wilhelmová, 2004), no encontrando estimaciones cercanas al patrón de comportamiento descrito en alfalfa (nódulos indeterminados).

Es interesante comprobar que en judía la CAT nodular es 10.5 veces más activa que la de hoja, y en alfalfa 7.5 veces (Fig. 5.2), lo que implica que la CAT nodular es importante para eliminar el H₂O₂ formado durante el funcionamiento del nódulo, debido a las elevadas condiciones reductoras de este (Gogorcena *et al.*, 1995). La salinidad inhibe la actividad CAT de hoja y nódulo al inicio del proceso reproductor (floración) (Fig 5.2). En esta situación de estrés es más activa la CAT nodular que la foliar en las dos leguminosas estudiadas, encontrándose un aumento entre 6.5 y 2.5 veces en nódulo de judía respecto a hoja, dependiendo de la dosis de NaCl, y una respuesta parecida en la CAT nodular y foliar de alfalfa. Estos resultados que muestran la susceptibilidad de la CAT al NaCl, están de acuerdo con los de Tejera *et al.* (2004) y Jebara *et al.* (2005) al menos en nódulos de *P. vulgaris*, sugiriendo que esta actividad es esencial para eliminar el H₂O₂ producido en el estrés (Willekens *et al.*, 1997), aunque según los resultados obtenidos este papel de la CAT en condiciones salinas está limitado debido a la inhibición que sufre la enzima.

Aunque la CAT se ha purificado en hojas de lenteja (Schiefer *et al.*, 1976), de guisante (Corpas *et al.*, 1999) y de acelga (Dincer y Aydemir, 2001), no hay muchas publicaciones relacionadas con la purificación de CAT en nódulos de leguminosas. La utilización de procedimientos clásicos (precipitación fraccionada con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico) no ha sido viable debido a que esta actividad se inhibe total o parcialmente en presencia de sal, por lo que se han debido de utilizar otros procedimientos entre los que se han incluido: **a)** la cromatografía de exclusión molecular, **b)** la cromatografía de afinidad y **c)** la

separación por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS. Mediante cromatografía por afinidad se estimó el peso molecular nativo de la CAT nodular de judía y alfalfa, encontrándose dos picos de actividad para cada leguminosa (Fig. 5.3), pudiendo sugerir que se trata de dos isoformas diferentes de la enzima. El peso molecular nativo de la CAT nodular de judía se estimó en 59 y 48 kDa, y el de la CAT nodular de alfalfa en 88 y 53 kDa.

El segundo paso de purificación (IMAC) había sido descrito para aislar otras catalasas de células hepáticas y bacterias (Yang y DePierre, 1998; Hidalgo *et al.*, 2004). Mediante electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida con SDS se muestra que la catalasa nodular de *P. vulgaris* y *M. sativa* migraron como un único polipéptido de 42 y 46 kDa respectivamente (Fig. 5.4). Esto sugiere que las dos catalasas, tanto la detectada en nódulos de judía como en nódulos de alfalfa son enzimas monoméricas, sin embargo los resultados obtenidos mediante gel filtración y los observados por Jebara *et al.* (2005) sugieren dos isoformas de las catalasas, por lo menos en nódulos de judía. Estos autores indicaron que estas isoenzimas tenían origen bacteriano y radical, pero no publicaron su peso molecular, además la identificación de posibles isoenzimas en tinciones de actividad para la CAT realizadas en geles de acrilamida no desnaturantes no fueron satisfactorias (Anderson *et al.*, 1995). Este resultado podría ser debido a la inhibición de la catalasa con el tampón Tris usado en SDS-PAGE (datos no mostrados), puesto que sólo las bandas que correspondían a los pesos moleculares más bajos de la CAT de ambas leguminosas fueron teñidas en el SDS, lo que posibilita que la otra isoforma de cada leguminosa no fuera atrapada en la columna de afinidad, además no se descartó que la isoforma de mayor tamaño (88 kDa) de *M. sativa* podría ser un dímero con subunidades de 48 kDa. El peso molecular de estas catalasas monoméricas es similar a la de cotiledones de *Gossypium hirsutum* (57 kDa) (Kunce *et al.*, 1988), la de hoja de *Nicotiana sylvestris* (53 y 55 kDa) (Havir y McHale, 1990) y la de hoja de *Pisum sativum* (57 kDa) (Corpas *et al.*, 1999).

La actividad CAT foliar es inhibida drásticamente en *P. vulgaris* y *M. sativa* por el NaCl (Fig. 5.2). Para saber si estos cambios en la actividad enzimática son un efecto directo de la inhibición por el NaCl, o indirecto a través de compuestos formados en condiciones de estrés, los extractos de CAT parcialmente purificados se incubaron en presencia de distintas concentraciones de sal, demostrándose *in vitro* una menor inhibición para la CAT foliar de *P. vulgaris* que para la de *M. sativa* (Fig. 5.5). Una posible explicación de este comportamiento, opuesto observado en condiciones *in vivo* (Fig. 5.2), podría estar relacionado con la estrategia de cada especie de leguminosa para limitar la toxicidad del Na⁺. Por ejemplo, en *P. vulgaris* (nódulos determinados) el mecanismo parece estar asociado con la exclusión de altas concentraciones de Na⁺ en parte aérea (Khadri *et*

al., 2007), mientras que en *Cicer arietinum* (nódulos indeterminados) podría estar relacionado con una reducción del transporte de Na^+ desde la raíz hasta la parte aérea (Tejera *et al.*, 2006). De esa manera, especulamos que las concentraciones de NaCl en la parte aérea en *P. vulgaris* y *M. sativa* podrían ser diferentes.

Respecto al efecto del NaCl sobre la CAT del nódulo de judía, estudios previos (Tejera *et al.*, 2004; Jebara *et al.*, 2005) junto con los resultados presentados en la Figura 5.2 indican que ésta actividad es inhibida en nódulos de plantas de *P. vulgaris*. En los experimentos realizados *in vitro* (Fig. 5.6) se observó que la salinidad provocó la disminución de la actividad CAT en los nódulos de ambas leguminosas, sin embargo la CAT de nódulos determinados (judía) es más sensible al estrés salino que la de nódulos indeterminados (alfalfa), de hecho en la incubación con 500 mM de NaCl no se detecta actividad en los nódulos de judía, mientras que en los nódulos de alfalfa se mantiene en un 30%. La mayor tolerancia a la salinidad de la CAT nodular de la leguminosa de nódulos indeterminados (alfalfa) respecto a la de los nódulos determinados (judía), coincide con los resultados de la figura 5.2 con extractos crudos de nódulos de plantas. Según este comportamiento, se postula que *P. vulgaris* (nódulos determinados) y *M. sativa* (nódulos indeterminados) probablemente tienen distintas catalasas.

Respecto a la sensibilidad de la enzima a otros inhibidores sorprendió que el radical superóxido y el oxígeno no inhibieron la actividad CAT nodular de ambas leguminosas. A este respecto, Shimizu *et al.* (1984) encontraron que las catalasas son inhibidas por el radical superóxido y otras EROs, y Engel *et al.* (2006) sugirieron que la mayoría de las catalasas pueden ser inactivadas por la luz en una reacción dependiente de O_2 . No obstante, estos autores también identificaron que catalasas de hoja de *Homogyne alpina* y *Helianthus annuus* eran resistentes a la inactivación por el superóxido tal como se describe en este trabajo. Por otro lado el citrato provocó una inhibición de la CAT de nódulos judía, mientras que en los de alfalfa la disminución fue menos intensa. El dithiothreitol, ditionito y β -mercaptoetanol redujeron la actividad CAT de nódulos indeterminados, mientras que la de nódulos determinados sufrió una inhibición más drástica (85-95%), se ha divulgado que la CAT de hoja de *Lens culinaris* es inhibida lentamente por el dithiothreitol y rápidamente por el β -mercaptoetanol (Schiefer *et al.*, 1976), y la de *Beta vulgaris* presenta una reducción leve por el ditionito y drástica por el dithiothreitol y el β -mercaptoetanol (Dincer y Aydemir, 2001). Por último el cianuro fue el inhibidor más potente para la CAT de ambos tipos de nódulos, describiéndose una tendencia similar para la catalasa de *Beta vulgaris* (Dincer y Aydemir, 2001) y *Thermus brockianus* (Thompson *et al.*, 2003). Nuestros resultados también están de acuerdo con los de Aydemir y Kuru (2003), que detectaron una inhibición similar en la catalasa de eritrocitos de ave incubada con algunos de estos inhibidores.

CONCLUSIONES

1. *Medicago sativa* muestra un crecimiento acelerado a lo largo de la ontogenia del cultivo. La salinidad, principalmente 150 mM a partir de la quinta semana de tratamiento, reduce el crecimiento vegetal y aumenta la RPA indicando que la parte aérea es más sensible a la sal que la raíz. Además, el estrés salino disminuye la actividad fotosintética medida como F_v/F_m (eficiencia fotoquímica FSII).
2. La simbiosis *Medicago sativa-Sinorhizobium meliloti* es moderadamente sensible a la sal. Los parámetros de fijación de nitrógeno disminuyen con el estrés y muestran su máximo al inicio de floración independientemente del tratamiento salino. En esta etapa ontogénica las plantas no estresadas alcanzan la mayor actividad en las enzimas del metabolismo carbonado nodular, sin embargo al aplicar la sal este máximo se adelanta a crecimiento vegetativo.
3. Las plántulas de *Phaseolus vulgaris* pretratadas con ácido salicílico (AS) desde la germinación incrementaron drásticamente el contenido endógeno de AS en hoja y raíz. Con la salinidad estos niveles se reducen, en cambio aumentan los de prolina, azúcares solubles totales, la peroxidación lipídica y las actividades enzimáticas antioxidantes en hoja. El pretratamiento con AS parece inducir la aclimatación de las plántulas al estrés salino, mejorando el crecimiento vegetal y reduciendo el daño en las membranas.
4. *Phaseolus vulgaris* y *Medicago sativa* en simbiosis reducen su crecimiento y fijación de nitrógeno por AS, ABA y más aun por el estrés salino, sin embargo en ambas leguminosas el resultado del AS se observa desde la primera cosecha y el de ABA sólo en la segunda. La aplicación previa de las hormonas a la sal induce una mejora de estos parámetros, aunque la fijación de nitrógeno se recupera por AS sólo en *Medicago sativa*.
5. En las dos simbiosis estudiadas la salinidad induce estrés oxidativo manifestado por un aumento de la peroxidación lipídica y del contenido de peróxido de hidrógeno. Las actividades del ciclo ascorbato-glutation en nódulo son más elevadas en *Medicago sativa*, indicando una capacidad antioxidante mayor que en *Phaseolus vulgaris*. El mecanismo involucrado en la respuesta de las dos leguminosas al AS en estrés salino podría implicar el incremento de las actividades superóxido dismutasa, peroxidasa y disminución de catalasa, mientras que al ABA el aumento de catalasa, peroxidasa y dehidroascorbato reductasa.
6. Se ha purificado y caracterizado la catalasa de hoja y nódulo de *Phaseolus vulgaris* y *Medicago sativa*. La actividad catalasa foliar varía durante la ontogenia, en *Phaseolus vulgaris* disminuye y en *Medicago sativa* aumenta. Las catalasas de hoja y nódulo de ambas leguminosas disminuyen con el estrés salino, sin embargo los experimentos *in vitro* demuestran que sólo la de hoja de *Medicago sativa* y la de nódulo de *Phaseolus vulgaris* son sensibles al NaCl. El peso molecular de la catalasa nodular, purificada por IMAC, es de 42 kDa y 46 kDa para la leguminosa grano y forrajera respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA

- Abrahám 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 brassinosteroid in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 51: 363-72.
- Achouak W, Christen R, Barakat M, Martel MH, Heulin T** (1999). *Burkholderia caribensis* sp.nov., an exopolysaccharide producing bacterium isolated from vertisol microaggregates in Martinique. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49: 787-794.
- Addicott FT, Carns HR, Cornforth JW, Lyon JL, Milborrow BV, Ohkuma K, Ryback G, Thiessen WE, Wareing PF** (1968). Abscisic acid: a proposal for the redesignation of abscisin II (dormin). En: *Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances*. Wightman F, Setterfield G (eds), pp. 1527-1529, Runge Press, Ottawa.
- Aebi H** (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105: 121-126.
- Ahmad K** (2001). Global population will increase to nine billion by 2050, says un report. *Lancet* 357: 864-864.
- Akao S, Kouchi H** (1992). A supernodulating mutant isolated from soybean cultivar Enrei. *Soil Science and Plant Nutrition* 38: 183-187.
- Al-Hakimi AMA, Hamada AM** (2001). Counteraction of salinity stress on wheat plants by grain soaking in ascorbic acid, thiamin or sodium salicylate. *Biologia Plantarum* 44: 253-261.
- Alcazar R, Cuevas JC, Patron M, Altabella T, Tiburcio AF** (2006). Abscisic acid modulates polyamine metabolism under water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* 128: 448-455.
- Alexieva V, Sergiev I, Mapelli S, Karanov E** (2001). The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell and Environment* 24: 1337-1344.
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS** (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 1331-1341.
- Alsheikh MK, Heyen BJ, Randall SK** (2003). Ion binding properties of the dehydrin ERD14 are dependent upon phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 278: 40882-40889.
- Amarger N, Macheret V, Laguerre G** (1997). *Rhizobium gallicum* sp.nov., and *Rhizobium giardinii* sp.nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47: 996-1006.
- Anderson MD, Prasad TK, Stewart CR** (1995). Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiology* 109: 1247-1257.
- Antunes F, Aguilar M, Pineda M, Sodek L** (2008). Nitrogen stress and the expression of asparagine synthetase in roots and nodules of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum* 133: 736-743.
- Aouani ME, Mhamdi R, Mars M, Ghrir R** (1998). Nodulation and growth of common bean under NaCl stress. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 1473-1475.
- Aroca R** (2006). Exogenous catalase and ascorbate modify the effects of abscisic acid (ABA) on root hydraulic properties in *Phaseolus vulgaris* L. plants. *Journal of Plant Growth Regulation* 25: 10-17.
- Aroca R, Ferrante A, Vernieri P, Chrispeels MJ** (2006). Drought, abscisic acid and transpiration rate effects on the regulation of PIP aquaporin gene expression and abundance in *Phaseolus vulgaris* plants. *Annals of Botany* 98: 1301-1310.
- Ashraf M, Harris PJC** (2004). Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science* 166: 3-16.
- Asselbergh B, De Vleeschauwer D, Hofte M** (2008). Global switches and fine tuning ABA modulates plant pathogen defense. *Molecular Plant Microbe Interactions* 21: 709-719.

- Axelrod B, Cheesbrough TM, Laakso S** (1981). Lipoxygenase from soybeans. *Methods in Enzymology* 71: 441-451.
- Aydemir T, Kuru K** (2003). Purification and partial characterization of catalase from chicken erythrocytes and the effect of various inhibitors on enzyme activity. *Turkish Journal of Chemistry* 27: 85-97.
- Aydi S, Drevon JJ, Abdely C** (2004). Effect of salinity on root nodule conductance to the oxygen diffusion in the *Medicago truncatula-Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 833-840.
- Aydi S, Sassi S, Abdely C** (2008). Growth, nitrogen fixation and ion distribution in *Medicago truncatula* subjected to salt stress. *Plant and Soil* 312: 59-67.
- Azevedo H, Lino-Neto T, Tavares RM** (2004). Salicylic acid up-regulates the expression of chloroplastic Cu,Zn-superoxide dismutase in needles of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Annals of Forest Science* 61: 847-850.
- Bae H, Kim SH, Kim MS, Sicher RC, Lary D, Strem MD, Natarajan S, Bailey BA** (2008). The drought response of *Theobroma cacao* (cacao) and the regulation of genes involved in polyamine biosynthesis by drought and other stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 174-188.
- Bagni N, Tassoni A** (2001). Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids* 20: 301-317.
- Bais HP, Ravishankar GA** (2002). Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 69: 1-34.
- Balen B, Krsnik-Rasol M, Simeon-Rudolf V** (2003). Isoenzymes of peroxidase and esterase related to morphogenesis in *Mammillaria gracillis* Pfeiff. tissue culture. *Journal of Plant Physiology* 160: 1401-1406.
- Ballester AR, Lafuente MT, González-Candelas L** (2006). Spatial study of antioxidant enzymes, peroxidase and phenylalanine ammonia lyase in the citrus fruit *Penicillium digitatum* interaction. *Postharvest Biology and Technology* 39: 115-124.
- Bandurska H, Stroinski A** (2005). The effect of salicylic acid on barley response to water deficit. *Acta Physiologiae Plantarum* 27: 379-386.
- Bano A, Hillman JR** (1986). Effect of abscisic acid on nodule morphology, nitrogenase activity and H₂ evolution in *Faba vulgaris*. *Annals of Botany* 58: 281-283.
- Bano A, Harper JE, Auge RM, Neuman DS** (2002). Changes in phytohormone levels following inoculation of two soybean lines differing in nodulation. *Functional Plant Biology* 29: doi: 10.1071/PP01166|UNSP 1445-4408/02/080965.
- Bari R, Jones J** (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology* 69: 473-488.
- Barrero JM, Rodríguez PL, Quesada V, Piqueras P, Ponce MR, Micol JL** (2006). Both abscisic acid (ABA) dependent and ABA independent pathways govern the induction of NCED3, AAO3 and ABA1 in response to salt stress. *Plant Cell and Environment* 29: 2000-2008.
- Bartels D, Sunkar R** (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 24: 23-58.
- Baurle I, Smith L, Baulcombe DC, Dean C** (2007). Widespread role for the flowering time regulators FCA and FPA in RNA mediated chromatin silencing. *Science* 318: 109-112.
- Becana M, Dalton DA, Moran JF, Iturbe-Ormaetxe I, Matamoros MA, Rubio MC** (2000). Reactive oxygen species and antioxidants in legume nodules. *Physiologia Plantarum* 109: 372-381.

- Bekki A, Trinchant JC, Rigaud J** (1987). Nitrogen fixation (C₂H₂ reduction) by *Medicago* nodules and bacteroids under sodium chloride stress. *Physiologia Plantarum* 71: 61-67.
- Bellaire BA, Carmody J, Braud J, Gossett DR, Banks SW, Lucas MC, Fowler TE** (2000). Involvement of abscisic acid dependent and -independent pathways in the upregulation of antioxidant enzyme activity during NaCl stress in cotton callus tissue. *Free Radical Research* 33: 531-545.
- Ben-Hayyim G, Gueta-Dahan Y, Avsian-Kretchmer O, Weichert H, Feussner I** (2001). Preferential induction of a 9-lipoxygenase by salt in salt-tolerant cells of *Citrus sinensis* L. Osbeck. *Planta* 212: 367-375.
- Benito B, Roig S, San Miguel A** (2000). Especies de gramíneas y leguminosas de interés pastoral. ETSIM. Fundación Conde del Valle de Salazar. Madrid.
- Berge O, Lodhi A, Brandelet G, Santaella C, Roncato MA, Christen R, Heulin T, Achouak W** (2009). *Rhizobium alamii* sp. nov., an exopolysaccharide producing species isolated from legume and non-legume rhizospheres. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 367-72.
- Beringer JE** (1974). R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology* 84: 188-198.
- Beyer WF, Fridovich I** (1987). Assaying for superoxide dismutase activity. Some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry* 161: 559-566.
- Beyhaut E, Tlustý B, van Berkum P, Graham PH** (2006). *Rhizobium giardinii* is the microsymbiont of Illinois bundleflower (*Desmanthus illinoensis* (Michx.) Macmillan) in midwestern prairies. *Canadian Journal of Microbiology* 52: 903-907.
- Bilger W, Schreiber U, Lange OL** (1987). Chlorophyll fluorescence as an indicator of heat induced limitation of photosynthesis in *Arbutus unedo* L. En: *Plant Response to Stress*. Tenhunen D, Catarino FM, Lange OL, Oechel WC (eds), pp. 391-399, Springer, New York.
- Boivin C, Ndoye I, Lortet G, Ndiaye A, De Lajudie P, Dreyfus B** (1997). The *Sesbania* root symbionts *Sinorhizobium saheli* and *Sinorhizobium teranga* by sesbanie can form stem nodules on *Sesbania rostrata*, although they are less adapted to stem nodulation than *Azorhizobium caulinodans*. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 1040-1047.
- Borisov AY, Madsen LH, Tsyganov VE, Umehara Y, Voroshilova VA, Batagov AO, Sandal N, Mortensen A, Schauser L, Ellis N, Tikhonovich IA, Stougaard J** (2003). The *sym35* gene required for root nodule development in pea is an ortholog of *Nin* from *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* 131: 1009-1017.
- Borsani O, Valpuesta V, Botella MA** (2001). Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiology* 126: 1024-1030.
- Borucki W, Sujkowska M** (2008). The effects of sodium chloride salinity upon growth, nodulation, and root nodule structure of pea (*Pisum sativum* L.) plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 30: 293-301.
- Brewin NJ** (2004). Plant cell wall remodelling in the *rhizobium* legume symbiosis. *Critical Reviews in Plant Sciences* 23: 293-316.
- Broughton WJ, Zhang F, Perret X, Staehelin C** (2003). Signals exchanged between legumes and *rhizobium*: agricultural uses and perspectives. *Plant and Soil* 252: 129-137.
- Casadesus J, Olivares J** (1979). Rough and fine linkage mapping of the *Rhizobium meliloti* chromosome. *Molecular and General Genetics* 174: 203-209.

- Cermola M, Fedorova E, Tate R, Riccio A, Favre R, Patriarca EJ** (2000). Nodule invasion and symbiosome differentiation during *Rhizobium etli-Phaseolus vulgaris* symbiosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 733-741.
- Cona A, Rea G, Angelini R, Federico R, Tavladoraki P** (2006). Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends in Plant Science* 11: 80-88.
- Cong L, Zheng HC, Zhang YX, Chai TY** (2008). *Arabidopsis* DREB1A confers high salinity tolerance and regulates the expression of GA dioxygenases in tobacco. *Plant Science* 174: 156-164.
- Contour-Ansel D, Torres-Franklin ML, De Carvalho MHC, D'Arcy-Lameta A** (2006). Glutathione reductase in leaves of cowpea: Cloning of two cDNAs, expression and enzymatic activity under progressive drought stress, desiccation and abscisic acid treatment. *Annals of Botany* 98: 1279-1287.
- Cordovilla MDP, Ligerio F, Lluch C** (1994). The effect of salinity on N fixation and assimilation in *Vicia faba*. *Journal of Experimental Botany* 45: 1483-1488.
- Cordovilla MDP, Ligerio F, Lluch C** (1995). Influence of host genotypes on growth, symbiotic performance and nitrogen assimilation in faba bean (*Vicia faba* L.) under salt stress. *Plant and Soil* 172: 289-297.
- Cordovilla MDP, Ligerio F, Lluch C** (1996). Growth and nitrogen assimilation in nodules in response to nitrate levels in *Vicia faba* under salt stress. *Journal of Experimental Botany* 47: 203-210.
- Cordovilla MDP, Ligerio F, Lluch C** (1999a). Effect of salinity on growth, nodulation and nitrogen assimilation in nodules of faba bean (*Vicia faba* L.). *Applied Soil Ecology* 11: 1-7.
- Cordovilla MDP, Ligerio F, Lluch C** (1999b). Effects of NaCl on growth and nitrogen fixation and assimilation of inoculated and KNO₃ fertilized *Vicia faba* L. and *Pisum sativum* L. plants. *Plant Science* 140: 127-136.
- Corpas FJ, Palma JM, Sandalio LM, Lopez-Huertas E, Romero-Puertas MC, Barroso JB, Del Río LA** (1999). Purification of catalase from pea leaf peroxisomes: Identification of five different isoforms. *Free Radical Research* 31: S235-S241.
- Costa C, Dwyer LM, Zhou XM, Dutilleul P, Hamel C, Reid LM, Smith DL** (2002). Root morphology of contrasting maize genotypes. *Agronomy Journal* 94: 96-101.
- Cresser MS, Aitkenhead MJ, Mian IA** (2008). A reappraisal of the terrestrial nitrogen cycle: what can we learn by extracting concepts from Gaia theory?. *Science of the Total Environment* 400: 344-355.
- Chakrabarti N, Mukherji S** (2003). Effect of phytohormone pretreatment on nitrogen metabolism in *Vigna radiata* under salt stress. *Biologia Plantarum* 46: 63-66.
- Chakraborty U, Tongden C** (2005). Evaluation of heat acclimation and salicylic acid treatments as potent inducers of thermotolerance in *Cicer arietinum* L. *Current Science* 89: 384-389.
- Charbonneau GA, Newcomb W** (1985). Growth regulators in developing effective root nodules of the garden pea (*Pisum sativum* L.). *Biochemi und Physiologie der Pflanzen* 180: 667-681.
- Chen FL, Cullimore JV** (1988). Two isoenzymes of NADH dependent glutamate synthase in root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. Purification, properties and activity changes during nodule development. *Plant Physiology* 88: 1411-1417.
- Chen THH, Murata N** (2002). Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 250-257.
- Chen WX, Yan GH, Li JL** (1988). Numerical taxonomic study of fast growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen.nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 38: 392-397.

- Chen WX, Li GS, Qi YL, Wang ET, Yuan HL, Li JL** (1991). *Rhizobium huakuii* sp.nov., isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41: 275-280.
- Chen WX, Wang E, Wang SY, Li YB, Chen XQ, Li YB** (1995). Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp.nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, Peoples Republic of China. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45: 153-159.
- Chen WX, Tan ZY, Gao JL, Li Y, Wang ET** (1997a). *Rhizobium hainanense* sp.nov., isolated from tropical legumes. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47: 870-873.
- Chen ZX, Iyer S, Caplan A, Klessig DF, Fan BF** (1997b). Differential accumulation of salicylic acid and salicylic acid sensitive catalase in different rice tissues. *Plant Physiology* 114: 193-201.
- Chen HJ, Hou WC, Kuc J, Lin YH** (2001a). Ca²⁺ dependent and Ca²⁺ independent excretion modes of salicylic acid in tobacco cell suspension culture. *Journal of Experimental Botany* 52: 1219-1226.
- Chen WM, Laevens S, Lee TM, Coenye T, De Vos P, Mergeay M, Vandamme P** (2001b). *Ralstonia taiwanensis* sp.nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 1729-1735.
- Chen WQ, Provart NJ, Glazebrook J, Katagiri F, Chang HS, Eulgem T, Mauch F, Luan S, Zou GZ, Whitham SA, Budworth PR, Tao Y, Xie ZY, Chen X, Lam S, Kreps JA, Harper JF, Si-Ammour A, Mauch-Mani B, Heinlein M, Kobayashi K, Hohn T, Dangl JL, Wang X, Zhu T** (2002). Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell* 14: 559-574.
- Chen J, Zhu C, Li LP, Sun ZY, Pan XB** (2007a). Effects of exogenous salicylic acid on growth and H₂O₂ metabolizing enzymes in rice seedlings under lead stress. *Journal of Environmental Sciences-China* 19: 44-49.
- Chen WM, de Faria SM, James EK, Elliott GN, Lin KY, Chou JH, Sheu SY, Cnockaert M, Sprent JI, Vandamme P** (2007b). *Burkholderia nodosa* sp.nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 1055-1059.
- Chen WM, de Faria SM, Chou JH, James EK, Elliott GN, Sprent JI, Bontemps C, Young JPW, Vandamme P** (2008). *Burkholderia sabiae* sp.nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpinifolia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 2174-2179.
- Cheng WH, Endo A, Zhou L, Penney J, Chen HC, Arroyo A, Leon P, Nambara E, Asami T, Seo M, Koshihara T, Sheen J** (2002). A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *Plant Cell* 14: 2723-2743.
- Chiera JM, Streeter JG, Finer JJ** (2006). Ononitol and pinitol production in transgenic soybean containing the inositol methyl transferase gene from *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Science* 171: 647-654.
- Dalton DA, Baird LM, Langeberg L, Taugher CY, Anyan WR, Vance CP, Sarath G** (1993). Subcellular localization of oxygen defense enzymes in soybean (*Glycine max* (L) Merr) root nodules. *Plant Physiology* 102: 481-489.
- Dangeard PA** (1926). Recherches sur les tubercules radicaux des legumineuses. *Botaniste* 16: 1-269.
- Dat JF, López-Delgado H, Foyer CH, Scott IM** (2000). Effects of salicylic acid on oxidative stress and thermotolerance in tobacco. *Journal of Plant Physiology* 156: 659-665.
- De Dios P, Matilla AJ, Gallardo M** (2006). Flower fertilization and fruit development prompt changes in free polyamines and ethylene in damson plum (*Prunus insititia* L.). *Journal of Plant Physiology* 163: 86-97.

- De Lajudie P, Willems A, Pot B, Dewettinck D, Maestrojuan G, Neyra M, Collins MD, Dreyfus B, Kersters K, Gillis M** (1994). Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb.nov., *Sinorhizobium saheli* sp.nov., and *Sinorhizobium teranga* sp.nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 715-733.
- De Lajudie P, Laurent-Fulele E, Willems A, Torck U, Coopman R, Collins MD, Kersters K, Dreyfus B, Gillis M** (1998). *Allorhizobium undicola* gen.nov., sp.nov., nitrogen fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 1277-1290.
- Debolt S, Melino V, Ford CM** (2007). Ascorbate as a biosynthetic precursor in plants. *Annals of Botany* 99: 3-8.
- Defraia CT, Schmelz EA, Mou Z** (2008). A rapid biosensor based method for quantification of free and glucose conjugated salicylic acid. *Plant Methods* 4: 28.
- Delgado MJ, Garrido JM, Ligerio F, Lluch C** (1993). Nitrogen fixation and carbon metabolism by nodules and bacteroids of pea plants under sodium chloride stress. *Physiologia Plantarum* 89: 824-829.
- Delgado MJ, Ligerio F, Lluch C** (1994). Effects of salt stress on growth and nitrogen fixation by pea, faba bean, common bean and soybean plants. *Soil Biology and Biochemistry* 26: 371-376.
- Delhaize E, Ryan PR, Randall PJ** (1993). Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). II. Aluminum stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiology* 103: 695-702.
- Demetriou G, Neonaki C, Navakoudis E, Kotzabasis K** (2007). Salt stress impact on the molecular structure and function of the photosynthetic apparatus-the protective role of polyamines. *Biochim Biophys Acta* 1767: 272-80.
- Demidchik V, Davenport RJ, Tester M** (2002). Nonselective cation channels in plants. *Annual Review of Plant Biology* 53: 67-107.
- Demir Y, Ozturk L** (2003). Influence of ethephon and 2,5-norbornadiene on antioxidative enzymes and proline content in salt stressed spinach leaves. *Biologia Plantarum* 47: 609-612.
- Desikan R, Cheung MK, Bright J, Henson D, Hancock JT, Neill SJ** (2004). ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *Journal of Experimental Botany* 55: 205-212.
- Dhindsa RS, Plumbdhindsa P, Thorpe TA** (1981). Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany* 32: 93-101.
- Dincer A, Aydemir T** (2001). Purification and characterization of catalase from chard (*Beta vulgaris* var. cicla). *Journal of Enzyme Inhibition* 16: 165-175.
- Ding YL, Kalo P, Yendrek C, Sun JH, Liang Y, Marsh JF, Harris JM, Oldroyd GED** (2008). Abscisic acid coordinates nod factor and cytokinin signaling during the regulation of nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 20: 2681-2695.
- Djordjevic MA, Gabriel DW, Rolfe BG** (1987). *Rhizobium*: the refined parasite of legumes. *Annual Review of Phytopathology* 25: 145-168.
- Doyle JJ, Luckow MA** (2003). The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiology* 131: 900-910.
- Dreyfus B, Garcia JL, Gillis M** (1988). Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen.nov., sp.nov., a stem nodulating nitrogen fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 38: 89-98.

- Duan JJ, Li J, Guo SR, Kang YY** (2008). Exogenous spermidine affects polyamine metabolism in salinity-stressed *Cucumis sativus* roots and enhances short-term salinity tolerance. *Journal of Plant Physiology* 165: 1620-1635.
- Edwards EA, Rawsthorne S, Mullineaux PM** (1990). Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* 180: 278-284.
- Efroze RC, Flemetakis E, Sfichi L, Stedel C, Kouri ED, Udvardi MK, Kotzabasis K, Katinakis P** (2008). Characterization of spermidine and spermine synthases in *Lotus japonicus*: induction and spatial organization of polyamine biosynthesis in nitrogen fixing nodules. *Planta* 228: 37-49.
- Eisenreich W, Bacher A, Arigoni D, Rohdich F** (2004). Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61: 1401-1426.
- El-Shintinawy F** (2000). Photosynthesis in two wheat cultivars differing in salt susceptibility. *Photosynthetica* 38: 615-620.
- El-Tayeb MA** (2005). Response of barley grains to the interactive effect of salinity and salicylic acid. *Plant Growth Regulation* 45: 215-224.
- El-Tayeb MA, El-Enany AE, Ahmed NL** (2006). Salicylic acid induced adaptive response to copper stress in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Growth Regulation* 50: 191-199.
- Elliott GN, Chen WM, Chou JH, Wang HC, Sheu SY, Perin L, Reis VM, Moulin L, Simon MF, Bontemps C, Sutherland JM, Bessi R, de Faria SM, Trinick MJ, Prescott AR, Sprent JL, James EK** (2007). *Burkholderia phymatum* is a highly effective nitrogen fixing symbiont of *Mimosa* spp. and fixes nitrogen ex planta. *New Phytologist* 173: 168-180.
- Endre G, Kereszt A, Kevei Z, Mihacea S, Kalo P, Kiss GB** (2002). A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 417: 962-966.
- Engel N, Schmidt M, Lutz C, Feierabend J** (2006). Molecular identification, heterologous expression and properties of light-insensitive plant catalases. *Plant Cell and Environment* 29: 593-607.
- Eyidogan F, Oz MT** (2007). Effect of salinity on antioxidant responses of chickpea seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum* 29: 485-493.
- Fageria NK, Baligar VC, Jones CA** (1997). Common bean and cowpea. En: *Growth and Mineral Nutrition of Field Crops*. Fageria NK, Baligar VC, Jones CA (eds), pp. 441-492, Marcel Dekker, New York, USA.
- Fageria NK, Santos AB** (2008). Yield physiology of dry bean. *Journal of Plant Nutrition* 31: 983-1004.
- FAO** (2008). Global network on integrated soil management for suitable use of salt affected soils. *FAO Land and Plant Nutrition Management Services*.
- Fedina IS, Tsonev TD, Guleva EI** (1994). ABA as a modulator of the response of *Pisum sativum* to salt stress. *Journal of Plant Physiology* 143: 245-249.
- Fedorova E, Redondo FJ, Koshiba T, Pueyo JJ, de Felipe MR, Lucas MM** (2005). Aldehyde oxidase (AO) in the root nodules of *Lupinus albus* and *Medicago truncatula*: identification of AO in meristematic and infection zones. *Molecular Plant Microbe Interactions* 18: 405-413.
- Feierabend J** (2005). Catalases in plants: molecular and functional properties and role in stress defense. En: *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. Smirnov N (ed), pp. 101-140, Blackwell Publishing, London, UK.
- Ferguson BJ, Mathesius U** (2003). Signaling interactions during nodule development. *Journal of Plant Growth Regulation* 22: 47-72.

- Fernandes CF, Moraes VCP, Vasconcelos IM, Silveira JAG, Oliveira JTA** (2006). Induction of an anionic peroxidase in cowpea leaves by exogenous salicylic acid. *Journal of Plant Physiology* 163: 1040-1048.
- Fey V, Wagner R, Brautigam K, Pfannschmidt T** (2005). Photosynthetic redox control of nuclear gene expression. *Journal of Experimental Botany* 56: 1491-1498.
- Figueiredo MVB, Burity HA, Martinez CR, Chanway CP** (2007). Drought stress response on some key enzymes of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) nodule metabolism. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 187-193.
- Flemetakis E, Efroze RC, Desbrosses G, Dimou M, Delis C, Aivalakis G, Udvardi MK, Katinakis P** (2004). Induction and spatial organization of polyamine biosynthesis during nodule development in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 1283-1293.
- Flemetakis E, Efroze RC, Ott T, Stedel C, Aivalakis G, Udvardi MK, Katinakis P** (2006). Spatial and temporal organization of sucrose metabolism in *Lotus japonicus* nitrogen-fixing nodules suggests a role for the elusive alkaline/neutral invertase. *Plant Molecular Biology* 62: 53-69.
- Flores HE, Galston AW** (1982). Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. *Plant Physiology* 69: 701-706.
- Flors V, Ton J, van Doorn R, Jakab G, García-Agustín P, Mauch-Mani B** (2008). Interplay between JA, SA and ABA signalling during basal and induced resistance against *Pseudomonas syringae* and *Alternaria brassicicola*. *The Plant Journal* 54: 81-92.
- Foyer CH** (2002). The contribution of photosynthetic oxygen metabolism to oxidative stress in plants. En: *Oxidative Stress in Plants*. Inzé D, Montago MV (eds), pp. 33-68, Taylor and Francis Publisher, New York, USA.
- Foyer CH, Noctor G** (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a reevaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell and Environment* 28: 1056-1071.
- Foyer CH, Noctor G** (2009). Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation and practical implications. *Antioxidants and Redox Signaling* 11: 1-45.
- Foyer CH, Theodoulou FL, Delrot S** (2001). The functions of inter and intracellular glutathione transport systems in plants. *Trends in Plant Science* 6: 486-492.
- Fujihara S, Abe H, Minakawa Y, Akao S, Yoneyama T** (1994). Polyamines in nodules from various plant-microbe symbiotic associations. *Plant and Cell Physiology* 35: 1127-1134.
- Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 436-442.
- Gálvez S, Lancien M, Hodges M** (1999). Are isocitrate dehydrogenases and 2-oxoglutarate involved in the regulation of glutamate synthesis? *Trends in Plant Science* 4: 484-490.
- Gálvez L, González EM, Arrese-Igor C** (2005). Evidence for carbon flux shortage and strong carbon/nitrogen interactions in pea nodules at early stages of water stress. *Journal of Experimental Botany* 56: 2551-2561.
- Gálvez-Valdivieso G, Osuna D, Maldonado JM, Pineda M, Aguilar M** (2005). Purification of a functional asparagine synthetase (PVAS2) from common bean (*Phaseolus vulgaris*), a protein predominantly found in root tissues. *Plant Science* 168: 89-94.
- Gao JL, Turner SL, Kan FL, Wang ET, Tan ZY, Qiu YH, Gu J, Terefework Z, Young JPW, Lindstrom K, Chen WX** (2004). *Mesorhizobium septentrionale* sp.nov and *Mesorhizobium temperatum* sp.nov., isolated from *Astragalus adsurgens* growing in the northern regions of China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 2003-2012.

- Garay-Arroyo A, Colmenero-Flores JM, Garcarrubio A, Covarrubias AA** (2000). Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *Journal of Biological Chemistry* 275: 5668-5674.
- García-Fraile P, Rivas R, Willems A, Peix A, Martens M, Martínez-Molina E, Mateos PF, Velázquez E** (2007). *Rhizobium cellulosilyticum* sp.nov., isolated from sawdust of *Populus alba*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 844-848.
- Geissler N, Hussin S, Koyro HW** (2008). Elevated atmospheric CO₂ concentration ameliorates effects of NaCl salinity on photosynthesis and leaf structure of *Aster tripolium* L. *Journal Experimental Botany*: doi: 10.1093/jxb/ern271.
- Gepts P** (1998). Origin and evolution of common bean: past events and recent trends. *Hortscience* 33: 1124-1130.
- 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 Physiology* 137: 1228-1235.
- Ghamsari L, Keyhani E, Golkhoo S** (2007). Kinetics properties of guaiacol peroxidase activity in *Crocus sativus* L. corm during rooting. *Iranian Biomedical Journal* 11: 137-46.
- Ghassemian M, Lutes J, Chang HS, Lange I, Chen WQ, Zhu T, Wang X, Lange BM** (2008). Abscisic acid induced modulation of metabolic and redox control pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 69: 2899-2911.
- Gogorcena Y, Iturbeormaetxe I, Escuredo PR, Becana M** (1995). Antioxidant defenses against activated oxygen in pea nodules subjected to water-stress. *Plant Physiology* 108: 753-759.
- González EM, Gordon AJ, James CL, Arrese-Igor C** (1995). The role of sucrose synthase in the response of soybean nodules to drought. *Journal of Experimental Botany* 46: 1515-1523.
- González EM, Gálvez L, Arrese-Igor C** (2001a). Abscisic acid induces a decline in nitrogen fixation that involves leghaemoglobin, but is independent of sucrose synthase activity. *Journal of Experimental Botany* 52: 285-293.
- González EM, Gálvez L, Royuela M, Aparicio-Tejo PM, Arrese-Igor C** (2001b). Insights into the regulation of nitrogen fixation in pea nodules: lessons from drought, abscisic acid and increased photoassimilate availability. *Agronomie* 21: 607-613.
- Gordon AJ, Mitchell DF, Ryle GJA, Powell CE** (1987). Diurnal production and utilization of photosynthate in nodulated white clover. *Journal of Experimental Botany* 38: 84-98.
- Gordon AJ, Minchin FR, Skot L, James CL** (1997). Stress induced declines in soybean N₂ fixation are related to nodule sucrose synthase activity. *Plant Physiology* 114: 937-946.
- Gosslova M, Svobodova H, Lipavska H, Albrechtova J, Vreugdenhil D** (2001). Comparing carbohydrate status during Norway spruce seed development and somatic embryo formation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 37: 24-28.
- Graham PH, Vance CP** (2003). Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology* 131: 872-877.
- Groat RG, Vance CP** (1981). Root nodule enzymes of ammonia assimilation in alfalfa (*Medicago sativa* L) developmental patterns and response to applied nitrogen. *Plant Physiology* 67: 1198-1203.
- Groten K, Vanacker H, Dutilleul C, Bastian F, Bernard S, Carzaniga R, Foyer CH** (2005). The roles of redox processes in pea nodule development and senescence. *Plant Cell and Environment* 28: 1293-1304.
- Guan LQ, Scandalios JG** (1998). Effects of the plant growth regulator abscisic acid and high osmoticum on the developmental expression of the maize catalase genes. *Physiologia Plantarum* 104: 413-422.

- Guan SH, Chen WF, Wang ET, Lu YL, Yan XR, Zhang XX, Chen WX** (2008). *Mesorhizobium caraganae* sp.nov., a novel rhizobial species nodulated with *Caragana* spp. in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 2646-2653.
- Gunes A, Inal A, Alpaslan M, Eraslan F, Bagci EG, Cicek N** (2007). Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. *Journal of Plant Physiology* 164: 728-736.
- Gunther C, Schlereth A, Udvardi M, Ott T** (2007). Metabolism of reactive oxygen species is attenuated in leghemoglobin deficient nodules of *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 1596-1603.
- Guo B, Liang Y, Zhu Y** (2009). Does salicylic acid regulate antioxidant defense system, cell death, cadmium uptake and partitioning to acquire cadmium tolerance in rice?. *Journal of Plant Physiology* 166: 20-31.
- Hafeez FY, Aslam Z, Malik KA** (1988). Effect of salinity and inoculation on growth, nitrogen fixation and nutrient uptake of *Vigna radiata* L. Wilczek. *Plant and Soil* 106: 3-8.
- Hamana K, Tanaka T, Hosoya R, Niitsu M, Itoh T** (2003). Cellular polyamines of the acidophilic, thermophilic and thermoacidophilic archaeobacteria, *Acidilobus*, *Ferroplasma*, *Pyrobaculum*, *Pyrococcus*, *Staphylothermus*, *Thermococcus*, *Thermoplasma* and *Vulcanisaeta*. *Journal of General and Applied Microbiology* 49: 287-293.
- Han TX, Han LL, Wu LJ, Chen WF, Sui XH, Gu JG, Wang ET, Chen WX** (2008a). *Mesorhizobium gobiense* sp.nov and *Mesorhizobium tarimense* sp.nov., isolated from wild legumes growing in desert soils of Xinjiang, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 2610-2618.
- Han TX, Wang ET, Wu LJ, Chen WF, Gu JG, Gu CT, Tian CF, Chen WX** (2008b). *Rhizobium multihospitium* sp.nov., isolated from multiple legume species native of Xinjiang, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 1693-1699.
- Han W, Rong H, Zhang H, Wang MH** (2009). Abscisic acid is a negative regulator of root gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 378: 695-700.
- Hao YJ, Kitashiba H, Honda C, Nada K, Moriguchi T** (2005a). Expression of arginine decarboxylase and ornithine decarboxylase genes in apple cells and stressed shoots. *Journal of Experimental Botany* 56: 1105-1115.
- Hao YJ, Zhang ZL, Kitashiba H, Honda C, Ubi B, Kita M, Moriguchi T** (2005b). Molecular cloning and functional characterization of two apple S-adenosylmethionine decarboxylase genes and their different expression in fruit development, cell growth and stress responses. *Gene* 350: 41-50.
- Harfouche AL, Rugini E, Mencarelli F, Botondi R, Muleo R** (2008). Salicylic acid induces H₂O₂ production and endochitinase gene expression but not ethylene biosynthesis in *Castanea sativa* in vitro model system. *Journal of Plant Physiology* 165: 734-744.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ** (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 463-499.
- Havir EA, McHale NA** (1990). Purification and characterization of an isozyme of catalase with enhanced peroxidatic activity from leaves of *Nicotiana glauca*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 283: 491-495.
- Hayashi S, Gresshoff PM, Kinkema M** (2008). Molecular analysis of lipoxygenases associated with nodule development in soybean. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 843-853.
- Hayat S, Fariduddin Q, Ali B, Ahmad A** (2005). Effect of salicylic acid on growth and enzyme activities of wheat seedlings. *Acta Agronomica Hungarica* 53: 433-437.

- Herrera-Medina MJ, Steinkellner S, Vierheilig H, Bote JAO, Garrido JMG** (2007). Abscisic acid determines arbuscule development and functionality in the tomato arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist* 175: 554-564.
- Herrera K, Cahoon RE, Kumaran S, Jez JM** (2007). Reaction mechanism of glutathione synthetase from *Arabidopsis thaliana*. Site directed mutagenesis of active residues. *Journal of Biological Chemistry* 282: 17157-17165.
- Herrera MJ, Gagnon H, Piche Y, Ocampo JA, García JM, Vierheilig H** (2003). Root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi is affected by the salicylic acid content of the plant. *Plant Science* 164: 993-998.
- Hidalgo A, Betancor L, Mateo C, López-Gallego F, Moreno R, Berenguer J, Guisan JM, Fernández-Lafuente R** (2004). Purification of a catalase from *Thermus thermophilus* via IMAC chromatography: Effect of the support. *Biotechnology Progress* 20: 1578-1582.
- Himmelbach A, Yang Y, Grill E** (2003). Relay and control of abscisic acid signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 470-479.
- Hiraga S, Yamamoto K, Ito H, Sasaki K, Matsui H, Honma M, Nagamura Y, Sasaki T, Ohashi Y** (2000). Diverse expression profiles of 21 rice *peroxidase* genes. *FEBS Letters* 471: 245-250.
- Holmstrom KO, Somersalo S, Mandal A, Palva TE, Welin B** (2000). Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine. *Journal of Experimental Botany* 51: 177-185.
- Hoque MA, Okuma E, Banu MNA, Nakamura Y, Shimoishi Y, Murata Y** (2007). Exogenous proline mitigates the detrimental effects of salt stress more than exogenous betaine by increasing antioxidant enzyme activities. *Journal of Plant Physiology* 164: 553-561.
- Horvath E, Janda T, Szalai G, Paldi E** (2002). In vitro salicylic acid inhibition of catalase activity in maize: differences between the isozymes and a possible role in the induction of chilling tolerance. *Plant Science* 163: 1129-1135.
- Horvath E, Szalai G, Janda T** (2007). Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. *Journal of Plant Growth Regulation* 26: 290-300.
- Hossain MA, Asada K** (1984). Inactivation of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts on dark addition of hydrogen peroxide: its protection by ascorbate. *Plant and Cell Physiology* 25: 1285-1295.
- Hossain MA, Nakano Y, Asada K** (1984). Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide. *Plant and Cell Physiology* 25: 385-395.
- Hu XL, Zhang AY, Zhang JH, Jiang MY** (2006). Abscisic acid is a key inducer of hydrogen peroxide production in leaves of maize plants exposed to water stress. *Plant and Cell Physiology* 47: 1484-1495.
- Hung KT, Kao CH** (2003). Nitric oxide counteracts the senescence of rice leaves induced by abscisic acid. *Journal of Plant Physiology* 160: 871-879.
- Hunt R** (1978). Plant growth analysis. En: *Studies in Biology n° 96*. Edward, Arnold (eds), pp. London, UK.
- Hunter WJ, Kuykendall LD, Manter DK** (2007). *Rhizobium selenireducens* sp.nov.: a selenite reducing alpha-Proteobacteria isolated from a bioreactor. *Current Microbiology* 55: 455-460.
- Hussain M, Malik MA, Farooq M, Ashraf MY, Cheema MA** (2008). Improving drought tolerance by exogenous application of glycinebetaine and salicylic acid in sunflower. *Journal of Agronomy and Crop Science* 194: 193-199.
- Igamberdiev AU, Hill RD** (2004). Nitrate, NO and haemoglobin in plant adaptation to hypoxia: an alternative to classic fermentation pathways. *Journal of Experimental Botany* 55: 2473-2482.

- Igarashi RY, Seefeldt LC** (2003). Nitrogen fixation: the mechanism of the Mo dependent nitrogenase. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 38: 351-384.
- Imperial J, Palácios JM, Brito B, Rey L, Cabrera E, Ureta AC, Ruíz-Argüeso T** (2006). El sistema hidrogenasa en las bacterias que nodulan leguminosas. En: *Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones*. Bedmar EJ, González J, Lluch C, Rodelas B (eds), pp. 35-44, Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN). Granada, España.
- Ingram J, Bartels D** (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 377-403.
- Irekti H, Drevon JJ** (2003). Acide abscisique et conductance à la diffusion de l'oxygène dans les nodosités du haricot soumises à un choc salin. En: *Fixation Symbiotique de l'Azote et Développement Durable dans le Bassin Méditerranéen*. Drevon JJ, Sifi B (eds), pp. 371-380, INRA, Paris, France.
- Irigoyen JJ, Emerich DW, Sánchez-Díaz M** (1992). Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia Plantarum* 84: 55-60.
- Ishikawa T, Shigeoka S** (2008). Recent advances in ascorbate biosynthesis and the physiological significance of ascorbate peroxidase in photosynthesizing organisms. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 72: 1143-1154.
- Islam MS, Kawasaki H, Muramatsu Y, Nakagawa Y, Seki T** (2008). *Bradyrhizobium iriomotense* sp.nov., isolated from a tumor like root of the legume *Entada koshunensis* from Iriomote Island in Japan. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 72: 1416-1429.
- Iturbe-Ormaetxe I, Matamoros MA, Rubio MC, Dalton DA, Becana M** (2001). The antioxidants of legume nodule mitochondria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 1189-1196.
- Janda T, Szalai G, Tari I, Paldi E** (1999). Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta* 208: 175-180.
- Jang JY, Lee SH, Rhee JY, Chung GC, Ahn SJ, Kang HS** (2007). Transgenic *Arabidopsis* and tobacco plants overexpressing an aquaporin respond differently to various abiotic stresses. *Plant Molecular Biology* 64: 621-632.
- Jarvis BDW, Pankhurst CE, Patel JJ** (1982). *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 32: 378-380.
- Jarvis BDW, VanBerkum P, Chen WX, Nour SM, Fernández MP, CleyetMarel JC, Gillis M** (1997). Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen.nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47: 895-898.
- Jebara S, Jebara M, Limam F, Aouani ME** (2005). Changes in ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. *Journal of Plant Physiology* 162: 929-936.
- Jiang F, Hartung W** (2008). Long-distance signalling of abscisic acid (ABA): the factors regulating the intensity of the ABA signal. *Journal of Experimental Botany* 59: 37-43.
- Jiang MY, Zhang JH** (2001). Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. *Plant and Cell Physiology* 42: 1265-1273.
- Jiménez-Bremont JF, Becerra-Flora A, Hernández-Lucero E, Rodríguez-Kessler M, Acosta-Gallegos JA, Ramírez-Pimentel JG** (2006). Proline accumulation in two bean cultivars under salt stress and the effect of polyamines and ornithine. *Biologia Plantarum* 50: 763-766.

- Jiménez-Bremont JF, Ruíz OA, Rodríguez-Kessler M** (2007). Modulation of spermidine and spermine levels in maize seedlings subjected to long-term salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 812-21.
- Jing-Hua Y, Yuan G, Yan-Man L, Xiao-Hua Q, Ming-Fang Z** (2008). Salicylic acid induced enhancement of cold tolerance through activation of antioxidative capacity in watermelon. *Scientia Horticulturae* 118: 200-205.
- Jordan DC** (1982). Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen nov, a genus of slow growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *International Journal of Systematic Bacteriology* 32: 136-139.
- Kahn ML, McDermott TM, Udvardi MK** (1998). Carbon and nitrogen metabolism in rhizobia. En: *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*. Spink HP, Kondorosi A, Hooykas JJ (eds), pp. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherland.
- Kaiser JJ, Lewis OAM** (1984). Nitrate reductase and glutamine synthetase activity in leaves and roots of nitrate fed *Helianthus annuus* L. *Plant and Soil* 77: 127-130.
- Kaldenhoff R, Fischer M** (2006). Functional aquaporin diversity in plants. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes* 1758: 1134-1141.
- Karatan E, Duncan TR, Watnick PI** (2005). NspS, a predicted polyamine sensor, mediates activation of *Vibrio cholerae* Biofilm formation by norspermidine. *Journal of Bacteriology* 187: 7434-7443.
- Kato M, Shimizu S** (1987). Chlorophyll metabolism in higher plants. VII. Chlorophyll degradation in senescing tobacco leaves: phenolic dependent peroxidative degradation. *Canadian Journal of Botany* 65: 729-735.
- Katsuhara M, Hanba YT** (2008). Barley plasma membrane intrinsic proteins (PIP aquaporins) as water and CO₂ transporters. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 456: 687-691.
- Khadri M, Pliego L, Soussi M, Lluch C, Ocana 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. *Journal of Plant Growth Regulation* 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. *Environmental and Experimental Botany* 60: 211-218.
- Klessig DF, Malamy J** (1994). The salicylic acid signal in plants. *Plant Molecular Biology* 26: 1439-1458.
- Koca H, Bor M, Ozdemir F, Turkan I** (2007). The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. *Environmental and Experimental Botany* 60: 344-351.
- Kono Y, Fridovich I** (1982). Superoxide radical inhibits catalase. *Journal of Biological Chemistry* 257: 5751-5754.
- Krieger-Liszkay A, Trebst A** (2006). Tocopherol is the scavenger of singlet oxygen produced by the triplet states of chlorophyll in the PSII reaction centre. *Journal of Experimental Botany* 57: 1677-1684.
- Kumar A, Altabella T, Taylor MA, Tiburcio AF** (1997). Recent advances in polyamine research. *Trends in Plant Science* 2: 124-130.
- Kunze CM, Trelease RN, Turley RB** (1988). Purification and biosynthesis of cottonseed (*Gossypium hirsutum* L.) catalase. *Biochemical Journal* 251: 147-155.

- Kurepin LV, Qaderi MM, Back TG, Reid DM, Pharis RP** (2008). A rapid effect of applied brassinolide on abscisic acid concentrations in *Brassica napus* leaf tissue subjected to short term heat stress. *Plant Growth Regulation* 55: 165-167.
- Kusumi K, Yaeno T, Kojo K, Hirayama M, Hirokawa D, Yara A, Iba K** (2006). The role of salicylic acid in the glutathione-mediated protection against photooxidative stress in rice. *Physiologia Plantarum* 128: 651-661.
- Kutuk C, Cayci G, Heng LK** (2004). Effects of increasing salinity and N¹⁵ labelled urea levels on growth, N uptake, and water use efficiency of young tomato plants. *Australian Journal of Soil Research* 42: 345-351.
- Kuykendall LD, Saxena B, Devine TE, Udell SE** (1992). Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp.nov. *Canadian Journal of Microbiology* 38: 501-505.
- Kuznetsov VV, Radyukina NL, Shevyakova NI** (2006). Polyamines and stress: biological role, metabolism, and regulation. *Russian Journal of Plant Physiology* 53: 583-604.
- Kuznetsov V, Shorina M, Aronova E, Stetsenko L, Rakitin V, Shevyakova N** (2007). NaCl- and ethylene-dependent cadaverine accumulation and its possible protective role in the adaptation of the common ice plant to salt stress. *Plant Science* 172: 363-370.
- Kwak SH, Lee SH** (2001). The regulation of ornithine decarboxylase gene expression by sucrose and small upstream open reading frame in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant and Cell Physiology* 42: 314-323.
- Ladrera R, Marino D, Larrainzar E, González EM, Arrese-Igor C** (2007). Reduced carbon availability to bacteroids and elevated ureides in nodules, but not in shoots, are involved in the nitrogen fixation response to early drought in soybean. *Plant Physiology* 145: 539-546.
- Laemmli UK** (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T₄. *Nature* 227: 680-685.
- Lahiri K, Chattopadhyay S, Ghosh B** (2004). Correlation of endogenous free polyamine levels with root nodule senescence in different genotypes in *Vigna mungo* L. *Journal of Plant Physiology* 161: 563-571.
- Lapenna D, Ciofani G, Pierdomenico SD, Neri M, Cuccurullo C, Giamberardino MA, Cuccurullo F** (2009). Inhibitory activity of salicylic acid on lipoxygenase dependent lipid peroxidation. *Biochimica Biophysica Acta* 1790: 25-30.
- Law MY, Charles SA, Halliwell B** (1992). Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacea oleracea*) chloroplast. The effect of hydrogen peroxide and paraquat. *Biochemical Journal* 210: 899-903.
- Lee A, Cho K, Jang S, Rakwal R, Iwahashi H, Agrawal GK, Shim J, Han O** (2004). Inverse correlation between jasmonic acid and salicylic acid during early wound response in rice. *Biochemical Biophysical Research Communications* 318: 734-8.
- Lee KH, Piao HL, Kim HY, Choi SM, Jiang F, Hartung W, Hwang I, Kwak JM, Lee IJ, Hwang I** (2006). Activation of glucosidase via stress induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. *Cell* 126: 1109-1120.
- Legocka J, Kluk A** (2005). Effect of salt and osmotic stress on changes in polyamine content and arginine decarboxylase activity in *Lupinus luteus* seedlings. *Journal of Plant Physiology* 162: 662-668.
- Lei T, Yan YC, Xi DH, Feng H, Sun X, Zhang F, Xu WL, Liang HG, Lin HH** (2008). Effects of salicylic acid on alternative pathway respiration and alternative oxidase expression in tobacco calli. *Zeitschrift Fur Naturforschung Section C-a Journal of Biosciences* 63: 706-712.

- Leonard LT** (1943). A simple assembly for use in the testing of cultures of rhizobia. *Journal of Bacteriology* 45: 523-527.
- Lester GE** (2000). Polyamines and their cellular anti-senescence properties in honey dew muskmelon fruit. *Plant Science* 160: 105-112.
- Lian B, Zhou X, Miransari M, Smith DL** (2000). Effects of salicylic acid on the development and root nodulation of soybean seedlings. *Journal of Agronomy and Crop Science* 185: 187-192.
- Lindstrom K** (1989). *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 39: 365-367.
- Liu HT, Liu YY, Pan QH, Yang HR, Zhan JC, Huang WD** (2006). Novel interrelationship between salicylic acid, abscisic acid, and PIP₂-specific phospholipase C in heat acclimation-induced thermotolerance in pea leaves. *Journal of Experimental Botany* 57: 3337-3347.
- Liu XG, Yue YL, Li B, Nie YL, Li W, Wu WH, Ma LG** (2007). A G protein coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid. *Science* 315: 1712-1716.
- Loake G, Grant M** (2007). Salicylic acid in plant defence the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 466-472.
- López-Raez JA, Charnikhova T, Gómez-Roldán V, Matusova R, Kohlen W, De Vos R, Verstappen F, Puech-Pages V, Becard G, Mulder P, Bouwmeester H** (2008). Tomato strigolactones are derived from carotenoids and their biosynthesis is promoted by phosphate starvation. *New Phytologist* 178: 863-874.
- López M, Lluch C** (2008). Nitrogen fixation is synchronized with carbon metabolism in *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula* nodules under salt stress *Journal of Plant Interactions* 3: 137-144.
- López M, Herrera-Cervera JA, Lluch C, Tejera NA** (2006). Trehalose metabolism in root nodules of the model legume *Lotus japonicus* in response to salt stress. *Physiologia Plantarum* 128: 701-709.
- López M, Herrera-Cervera JA, Iribarne C, Tejera NA, Lluch C** (2008a). Growth and nitrogen fixation in *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula* under NaCl stress: nodule carbon metabolism. *Journal of Plant Physiology* 165: 641-650.
- López M, Tejera NA, Iribarne C, Lluch C, Herrera-Cervera JA** (2008b). Trehalose and trehalase in root nodules of *Medicago truncatula* and *Phaseolus vulgaris* in response to salt stress. *Physiologia Plantarum* 134: 575-582.
- Lortet G, Mear N, Lorquin J, Dreyfus B, De Lajudie P, Rosenberg C, Boivin C** (1996). Nod factor thin layer chromatography profiling as a tool to characterize symbiotic specificity of rhizobial strains: application to *Sinorhizobium saheli*, *Sinorhizobium teranga*, and *Rhizobium* sp strains isolated from *Acacia* and *Sesbania*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9: 736-747.
- Loscos J, Matamoros MA, Becana M** (2008). Ascorbate and homogluthathione metabolism in common bean nodules under stress conditions and during natural senescence. *Plant Physiology* 146: 1282-1292.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Lu S, Su W, Li H, Guo Z** (2009). Abscisic acid improves drought tolerance of triploid bermudagrass and involves H₂O₂ and NO induced antioxidant enzyme activities. *Plant Physiology Biochemistry* 47: 132-8.
- Luu DT, Maurel C** (2005). Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. *Plant Cell and Environment* 28: 85-96.

- Lloret L, Ormeno-Orrillo E, Rincon R, Martínez-Romero J, Rogel-Hernandez MA, Martínez-Romero E** (2007). *Ensifer mexicanus* sp.nov., a new species nodulating *Acacia angustissima* (Mill.) Kuntze in Mexico. *Systematic and Applied Microbiology* 30: 280-290.
- Maccarrone M, Veldink GA, Agro AF, Vliegthart JFG** (1995). Modulation of soybean lipoxygenase expression and membrane oxidation by water deficit. *FEBS Letters* 371: 223-226.
- Maggio A, Miyazaki S, Veronese P, Fujita T, Ibeas JI, Damsz B, Narasimhan ML, Hasegawa PM, Joly RJ, Bressan RA** (2003). Does proline accumulation play an active role in stress induced growth reduction?. *Plant Journal* 31: 699-712.
- Mahdavian K, Ghorbanli M, Kalantari KM** (2008). Role of salicylic acid in regulating ultraviolet radiation induced oxidative stress in pepper leaves. *Russian Journal of Plant Physiology* 55: 560-563.
- Malamy J, Hennig J, Klessig DF** (1992). Temperature dependent induction of salicylic acid and its conjugates during the resistance response to tobacco mosaic virus Infection. *Plant Cell* 4: 359-366.
- Manchanda G, Garg N** (2008). Salinity and its effects on the functional biology of legumes. *Acta Physiologiae Plantarum* 30: 595-618.
- Mapelli S, Brambilla IM, Radyukina NL, Ivanov YV, Kartashov AV, Reggiani R, V. KV** (2008). Free and bound polyamines changes in different plants as a consequence of UV-B light irradiation. *General Applied Plant Physiology* 34: 55-66.
- Marino D, González EM, Frendo P, Puppo A, Arrese-Igor C** (2007). NADPH recycling systems in oxidatively stressed pea nodules: a key role for the NADP(+) dependent isocitrate dehydrogenase. *Planta* 225: 413-421.
- Marino D, Hohnjec N, Kuster H, Moran JF, González EM, Arrese-Igor C** (2008). Evidence for transcriptional and post-translational regulation of sucrose synthase in pea nodules by the cellular redox state. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 622-630.
- Markwell MAK, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE** (1978). Modification of Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry* 87: 206-210.
- Marsh JF, Rakocevic A, Mitra RM, Brocard L, Sun J, Eschstruth A, Long SR, Schultze M, Ratet P, Oldroyd GED** (2007). *Medicago truncatula* NIN is essential for rhizobial-independent nodule organogenesis induced by autoactive calcium/calmodulin dependent protein kinase. *Plant Physiology* 144: 324-335.
- Martin-Tanguy J** (2001). Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). *Plant Growth Regulation* 34: 135-148.
- Martínez-Abarca F, Herrera-Cervera JA, Bueno P, Sanjuan J, Bisseling T, Olivares J** (1998). Involvement of salicylic acid in the establishment of the *Rhizobium meliloti*-Alfalfa symbiosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 153-155.
- Martínez-Romero E, Segovia L, Mercante FM, Franco AA, Graham P, Pardo MA** (1991). *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L beans and *Leucaena* sp trees. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41: 417-426.
- 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*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 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 Physiology* 133: 499-509.

- Mateo A, Funck D, Muhlenbock P, Kular B, Mullineaux PM, Karpinski S** (2006). Controlled levels of salicylic acid are required for optimal photosynthesis and redox homeostasis. *Journal of Experimental Botany* 57: 1795-1807.
- Mattoo AK, Chung SH, Goyal RK, Fatima T, Solomos T, Srivastava A, Handa AK** (2007). Overaccumulation of higher polyamines in ripening transgenic tomato fruit revives metabolic memory, upregulates anabolism-related genes, and positively impacts nutritional quality. *Journal of Association of Official Analytical Chemists International* 90: 1456-1464.
- Maunoury N, Kondorosi A, Kondorosi E, Mergaert P** (2008). Cell biology of nodule infection and development. En: *Nitrogen-Fixing Leguminous Symbioses*. Dilworth MJ, James EK, Sprent JI, Newton WE (eds), pp. 153-189, Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Maurel C, Chrispeels MJ** (2001). Aquaporins. A molecular entry into plant water relations. *Plant Physiology* 125: 135-138.
- McCourt P, Creelman R** (2008). The ABA receptors - we report you decide. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 474-478.
- McManus MT, Bielecki RL, Caradus JR, Barker DJ** (2000). Pinitol accumulation in mature leaves of white clover in response to a water deficit. *Environmental and Experimental Botany* 43: 11-18.
- McSteen P, Zhao Y** (2008). Plant hormones and signaling: Common themes and new developments. *Developmental Cell* 14: 467-473.
- Meng FZ, Hu LP, Wang SH, Sui XL, Wei L, Wei YX, Sun JL, Zhang ZX** (2008). Effects of exogenous abscisic acid (ABA) on cucumber seedling leaf carbohydrate metabolism under low temperature. *Plant Growth Regulation* 56: 233-244.
- Metraux JP** (2002). Recent breakthroughs in the study of salicylic acid biosynthesis. *Trends in Plant Science* 7: 332-334.
- Mhadhbi H, Jebara M, Limam F, Aouani ME** (2004). Rhizobial strain involvement in plant growth, nodule protein composition and antioxidant enzyme activities of chickpea rhizobia symbioses: modulation by salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 717-722.
- Millar AH, Mittova V, Kiddle G, Heazlewood JL, Bartoli CG, Theodoulou FL, Foyer CH** (2003). Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. *Plant Physiology* 133: 443-447.
- Miller G, Shulaev V, Mittler R** (2008). Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiologia Plantarum* 133: 481-489.
- Mittova V, Guy M, Tal M, Volokita M** (2004). Salinity up-regulates the antioxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Journal of Experimental Botany* 55: 1105-1113.
- Mnasri B, Aouani ME, Mhamdi R** (2007). Nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris*) under water deficiency. *Soil Biology and Biochemistry* 39: 1744-1750.
- Mohr PG, Cahill DM** (2007). Suppression by ABA of salicylic acid and lignin accumulation and the expression of multiple genes, in *Arabidopsis* infected with *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Functional and Integrative Genomics* 7: 181-191.
- Molina A, Bueno P, Marín MC, Rodríguez-Rosales MP, Belver A, Venema K, Donaire JP** (2002). Involvement of endogenous salicylic acid content, lipoxygenase and antioxidant enzyme activities in the response of tomato cell suspension cultures to NaCl. *New Phytologist* 156: 409-415.
- Moller IM, Jensen PE, Hansson A** (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* 58: 459-481.
- Monson RK, Rosenstiel TN, Forbis TA, Lipson DA, Jaeger CH** (2006). Nitrogen and carbon storage in alpine plants. *Integrative and Comparative Biology* 46: 35-48.

- Moran JF, Iturbe-Ormaetxe I, Matamoros MA, Rubio MC, Clemente MR, Brewin NJ, Becana M** (2000). Glutathione and homoglutathione synthetases of legume nodules. Cloning, expression, and subcellular localization. *Plant Physiology* 124: 1381-1392.
- Moreira FMD, Cruz L, de Faria SM, Marsh T, Martínez-Romero E, Pedrosa FD, Pitard RM, Young JPW** (2006). *Azorhizobium doebereineriae* sp.nov., microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) pers. *Systematic and Applied Microbiology* 29: 197-206.
- Morell M, Copeland L** (1985). Sucrose synthase of soybean nodules. *Plant Physiology* 78: 149-154.
- Müller MH, Prosperi JM, Santoni S, Ronfort J** (2003). Inferences from mitochondrial DNA patterns on the domestication history of alfalfa (*Medicago sativa*). *Molecular Ecology* 12: 2187-2199.
- Munns R, Tester M** (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651-681.
- Mur LAJ, Laarhoven LJJ, Harren FJM, Hall MA, Smith AR** (2008). Nitric oxide interacts with salicylate to regulate biphasic ethylene production during the hypersensitive response. *Plant Physiology* 148: 1537-1546.
- Murakeozy EP, Smirnoff N, Nagy Z, Tuba Z** (2002). Seasonal accumulation pattern of pinitol and other carbohydrates in *Limonium gmelini* subsp. hungarica. *Journal of Plant Physiology* 159: 485-490.
- Mutlu F, Bozcuk S** (2007). Relationship between salt stress and levels of free and bound polyamines in sunflower plants. *Plant Biosystems* 141: 31-39.
- Nagabhushana KS, Umamaheshwari S, Tocoli FE, Prabhu SK, Green IR, Ramadoss CS** (2002). Inhibition of soybean and potato lipoxygenases by bhilawanols from bhilawan (*Semecarpus anacardium*) nut shell liquid and some synthetic salicylic acid analogues. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 17: 255-9.
- Nambara E, Marion-Poll A** (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology* 56: 165-185.
- Nandwal AS, Kukreja S, Kumar N, Sharma PK, Jain M, Mann A, Singh S** (2007). Plant water, status, ethylene evolution, N₂ fixing efficiency, antioxidant activity and lipid peroxidation in *Cicer arietinum* L. nodules as affected by short term salinization and desalinization. *Journal of Plant Physiology* 164: 1161-1169.
- Ndayiragije A, Lutts S** (2007). Long term exogenous putrescine application improves grain yield of a salt-sensitive rice cultivar exposed to NaCl. *Plant and Soil* 291: 225-238.
- Neera G, Ranju S** (2004). Growth, photosynthesis, nodule nitrogen and carbon fixation in the chickpea cultivars under salt stress. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 16: 50-74.
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Hancock JT** (2002). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 1237-1247.
- Nemeth M, Janda T, Horvath E, Paldi E, Szalai G** (2002). Exogenous salicylic acid increases polyamine content but may decrease drought tolerance in maize. *Plant Science* 162: 569-574.
- Nick G, de Lajudie P, Eardly BD, Suomalainen S, Paulin L, Zhang XP, Gillis M, Lindstrom K** (1999). *Sinorhizobium arboris* sp.nov., and *Sinorhizobium kostiense* sp.nov., isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49: 1359-1368.
- Niemi K, Haggman H, Sarjala T** (2002). Effects of exogenous diamines on the interaction between ectomycorrhizal fungi and adventitious root formation in Scots pine in vitro. *Tree Physiology* 22: 373-381.
- Nour SM, Fernández MP, Normand P, Cleyetmarel JC** (1994). *Rhizobium ciceri* sp.nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L). *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 511-522.

- Nour SM, Cleyetmarel JC, Normand P, Fernández MP** (1995). Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer-Arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp.nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45: 640-648.
- Ocaña A, Caba JM, Ligerio F, Lluch C** (1999). Nitrogen fixation and carbon metabolism in *Vicia faba* root nodules over ontogeny. *Israel Journal of Plant Sciences* 47: 35-41.
- Odeh IOA, Onus A** (2008). Spatial analysis of soil salinity and soil structural stability in a semiarid region of New South Wales, Australia. *Environmental Management* 42: 265-278.
- Ogasawara M, Suzuki T, Mutoh I, Annapurna K, Arora NK, Nishimura Y, Maheshwari DK** (2003). *Sinorhizobium indiaense* sp.nov., and *Sinorhizobium abri* sp.nov., isolated from tropical legumes, *Sesbania rostrata* and *Abrus precatorius*, respectively. *Symbiosis* 34: 53-68.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K** (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 95: 351-358.
- Oldroyd GED, Downie JM** (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual Review of Plant Biology* 59: 519-546.
- Ott T, van Dongen JT, Gunther C, Krusell L, Desbrosses G, Vigeolas H, Bock V, Czechowski T, Geigenberger P, Udvardi MK** (2005). Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Current Biology* 15: 531-535.
- Palma F, Lluch C, Iribarne C, García-Garrido JM, Tejera NA** (2009). Combined effect of salicylic acid and salinity on some antioxidant activities, oxidative stress and metabolite accumulation in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Growth Regulation* 58: 307-316.
- Pancheva TV, Popova LP, Uzunova AN** (1996). Effects of salicylic acid on growth and photosynthesis in barley plants. *Journal of Plant Physiology* 149: 57-63.
- Pang XM, Nada K, Liu JH, Kitashiba H, Honda C, Yamashita H, Tatsuki M, Moriguchi T** (2006). Interrelationship between polyamine and ethylene in 1-methylcyclopropene treated apple fruits after harvest. *Physiologia Plantarum* 128: 351-359.
- Pardo JM, Cubero B, Leidi EO, Quintero FJ** (2006). Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *Journal of Experimental Botany* 57: 1181-1199.
- Parra R, Ascencio J** (1992). Perfil de senescencia en la sucesión foliar base ápice de carota (*Phaseolus vulgaris* L. var. Tacarigua) durante la ontogenia. *Revista Facultad Agronomía (Maracay)* 18: 339-354.
- Paschalidis KA, Roubelakis-Angelakis KA** (2005). Spatial and temporal distribution of polyamine levels and polyamine anabolism in different organs/tissues of the tobacco plant. Correlations with age, cell division/expansion, and differentiation. *Plant Physiology* 138: 142-152.
- Paul MJ, Cockburn W** (1989). Pinitol, a compatible solute in *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Journal of Experimental Botany* 40: 1093-1098.
- Peng GX, Tan ZY, Wang ET, Reinhold-Hurek B, Chen WF, Chen WX** (2002). Identification of isolates from soybean nodules in Xinjiang region as *Sinorhizobium xinjiangense* and genetic differentiation of *Sinorhizobium xinjiangense* from *Sinorhizobium fredii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 457-462.
- Peng GX, Yuan QH, Li HX, Zhang W, Tan ZY** (2008). *Rhizobium oryzae* sp.nov., isolated from the wild rice *Oryza alta*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 2158-2163.
- Pliego L, Ocaña A, Lluch C** (2003). Carbon metabolism in nodule cytosol and bacteroid in the symbiosis *Rhizobium tropici*-*Phaseolus vulgaris* var. Africa under saline conditions. *Terra* 21: 203-212.

- Porta H, Rueda-Benitez P, Campos F, Colmenero-Flores JM, Colorado JM, Carmona MJ, Covarrubias AA, Rocha-Sosa M** (1999). Analysis of lipoxygenase mRNA accumulation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during development and under stress conditions. *Plant and Cell Physiology* 40: 850-858.
- Potlakayala SD, Reed DW, Covello PS, Fobert PR** (2007). Systemic acquired resistance in canola is linked with pathogenesis related gene expression and requires salicylic acid. *Phytopathology* 97: 794-802.
- Procházková D, Wilhelmová N** (2004). Changes in antioxidative protection in bean cotyledons during natural and continuous irradiation-accelerated senescence. *Biologia Plantarum* 48: 33-39.
- Prosperi JM, Jenczewski E, Angevain M, Ronfort J** (2006). Morphologic and agronomic diversity of wild genetic resources of *Medicago sativa* L. collected in Spain. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 843-856.
- Puppo A, Groten K, Bastian F, Carzaniga R, Soussi M, Lucas MM, de Felipe MR, Harrison J, Vanacker H, Foyer CH** (2005). Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *New Phytologist* 165: 683-701.
- Pye IF, Stonier C, McGale EHF** (1978). Double enzymatic assay for determination of glutamine and glutamic acid in cerebrospinal fluid and plasma. *Analytical Chemistry* 50: 951-953.
- Qin XQ, Yang SH, Kepsel AC, Schwartz SH, Zeevaart JAD** (2008). Evidence for abscisic acid biosynthesis in *Cuscuta reflexa*, a parasitic plant lacking neoxanthin. *Plant Physiology* 147: 816-822.
- Quan ZX, Bae HS, Baek JH, Chen WF, Im WT, Lee ST** (2005). *Rhizobium daejeonense* sp.nov., isolated from a cyanide treatment bioreactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 2543-2549.
- Qureshi MI, Qadir S, Zolla L** (2007). Proteomics based dissection of stress-responsive pathways in plants. *Journal of Plant Physiology* 164: 1239-1260.
- Rai VK** (2002). Role of amino acids in plant responses to stresses. *Biologia Plantarum* 45: 481-487.
- Ramanujam MP, Jaleel VA, Kumaravelu G** (1998). Effect of salicylic acid on nodulation, nitrogenous compounds and related enzymes of *Vigna mungo*. *Biologia Plantarum* 41: 307-311.
- Ramos J, Bisseling T** (2003). A method for the isolation of root hairs from the model legume *Medicago truncatula*. *Journal of Experimental Botany* 54: 2245-2250.
- Rao MV, Paliyath C, Ormrod DP, Murr DP, Watkins CB** (1997). Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂ metabolizing enzymes. Salicylic acid mediated oxidative damage requires H₂O₂. *Plant Physiology* 115: 137-149.
- Raskin I** (1992). Role of salicylic acid in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 439-463.
- Raskin I, Turner IM, Melander WR** (1989). Regulation of heat production in the inflorescences of an *Arum* lily by endogenous salicylic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 2214-2218.
- Razem FA, El-Kereamy A, Abrams SR, Hill RD** (2006). The RNA binding protein FCA is an abscisic acid receptor. *Nature* 439: 290-294.
- Reinoso B, Boto JA, González M** (2007). Variedades locales de alubia o judía grano (*Phaseolus vulgaris* L.) de la provincia de León. Universidad de León, Secretariado de Publicaciones, Leon, España.
- Ren HB, Gao ZH, Chen L, Wei KF, Liu J, Fan YJ, Davies WJ, Jia WS, Zhang JH** (2007). Dynamic analysis of ABA accumulation in relation to the rate of ABA catabolism in maize tissues under water deficit. *Journal of Experimental Botany* 58: 211-219.

- Rengasamy P** (2006). World salinization with emphasis on Australia. *Journal of Experimental Botany* 57: 1017-1023.
- Rhodes D, Nadolska-Orczyk A, Rich PJ** (2002). Salinity, osmolytes and compatible solutes. En: *Salinity: Environment-Plants-Molecules*. Läuchli A, Lüttge U (eds), pp. 181-204, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Riccillo PM, Muglia CI, de Bruijn FJ, Roe AJ, Booth IR, Aguilar OM** (2000). Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici*, including acid tolerance. *Journal of Bacteriology* 182: 1748-1753.
- Rigaud J, Puppo A** (1975). Indole-3-acetic-acid catabolism by soybean bacteroids. *Journal of General Microbiology* 88: 223-228.
- Rincon-Rosales R, Lloret L, Ponce E, Martínez-Romero E** (2009). Rhizobia with different symbiotic efficiencies nodulate *Acaciella angustissima* in Mexico, including *Sinorhizobium chiapanecum* sp nov which has common symbiotic genes with *Sinorhizobium mexicanum*. *Fems Microbiology Ecology* 67: 103-117.
- Risk JM, Macknight RC, Day CL** (2008). FCA does not bind abscisic acid. *Nature* 456.
- Rivas R, Willems A, Subba-Rao NS, Mateos PF, Dazzo FB, Kroppenstedt RM, Martínez-Molina E, Gillis M, Velázquez E** (2003). Description of *Devosia neptuniae* sp.nov., that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. *Systematic and Applied Microbiology* 26: 47-53.
- Rivas R, Willems A, Palomo JL, García-Benavides P, Mateos PF, Martínez-Molina E, Gillis M, Velázquez E** (2004). *Bradyrhizobium betae* sp.nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour like deformations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1271-1275.
- Robledo M, Jimenez-Zurdo JI, Velázquez E, Trujillo ME, Zurdo-Pineiro JL, Ramírez-Bahena MH, Ramos B, Díaz-Mínguez JM, Dazzo F, Martínez-Molina E, Mateos PF** (2008). *Rhizobium* cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 7064-7069.
- Rodríguez-Concepción M, Boronat A** (2002). Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiology* 130: 1079-1089.
- Rome S, Fernández MP, Brunel B, Normand P, CleyetMarel JC** (1996). *Sinorhizobium medicae* sp.nov., isolated from annual *Medicago* spp. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46: 972-980.
- Roussos PA, Pontikis CA** (2007). Changes of free, soluble conjugated and bound polyamine titers of jojoba explants under sodium chloride salinity in vitro. *Journal of Plant Physiology* 164: 895-903.
- Roy P, Roy SK, Mitra A, Kulkarni AP** (1994). Superoxide generation by lipoxygenase in the presence of NADH and NADPH. *Biochimica Et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism* 1214: 171-179.
- Rubio LM, Ludden PW** (2008). Biosynthesis of the iron molybdenum cofactor of nitrogenase. *Annual Review of Microbiology* 62: 93-111.
- Rubio MC, González EM, Minchin FR, Webb KJ, Arrese-Igor C, Ramos J, Becana M** (2002). Effects of water stress on antioxidant enzymes of leaves and nodules of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutases. *Physiologia Plantarum* 115: 531-540.
- Rubio MC, Becana M, Sato S, James EK, Tabata S, Spaink HP** (2007). Characterization of genomic clones and expression analysis of the three types of superoxide dismutases during nodule development in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 262-275.

- Rubio MC, Bustos-Sanmamed P, Clemente MR, Becana M** (2008). Effects of salt stress on the expression of antioxidant genes and proteins in the model legume *Lotus japonicus*. *New Phytologist*: doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02718.x.
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD** (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8: 1809-1819.
- Salehi M, Salehi F, Poustini K, Heidari-Sharifabad H** (2008). The effect of salinity on the nitrogen fixation in four cultivars of *Medicago sativa* L. in the seedling emergence stage. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 4: 413-415.
- Samac DA, Graham MA** (2007). Recent advances in legume microbe interactions: recognition, defense response, and symbiosis from a genomic perspective. *Plant Physiology* 144: 582-587.
- Sanchez-Casas P, Klessig DF** (1994). A salicylic acid binding activity and a salicylic acid inhibitable catalase activity are present in a variety of plant species. *Plant Physiology* 106: 1675-1679.
- Sannazzaro AI, Echeverria M, Alberto EO, Ruiz OA, Menendez AB** (2007). Modulation of polyamine balance in *Lotus glaber* by salinity and arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 39-46.
- Savoure A, Hua XJ, Bertauche N, VanMontagu M, Verbruggen N** (1997). Abscisic acid-independent and abscisic acid-dependent regulation of proline biosynthesis following cold and osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics* 254: 104-109.
- Sawada H, Kuykendall LD, Young JM** (2003). Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen fixing legume symbionts. *Journal of General and Applied Microbiology* 49: 155-179.
- Sawada H, Shim IS, Usui K** (2006). Induction of benzoic acid 2hydroxylase and salicylic acid biosynthesis. Modulation by salt stress in rice seedlings. *Plant Science* 171: 263-270.
- Schachtman DP, Munns R** (1992). Sodium accumulation in leaves of *Triticum* species that differ in salt tolerance. *Australian Journal of Plant Physiology* 19: 331-340.
- Schiefer S, Teifel W, Kindl H** (1976). Plant microbody proteins.1. Purification and characterization of catalase from leaves of *Lens culinaris*. *Hoppe Seylers Zeitschrift Fur Physiologische Chemie* 357: 163-175.
- Scholla MH, Elkan GH** (1984). *Rhizobium fredii* sp.nov., a fast growing species that effectively nodulates soybeans. *International Journal of Systematic Bacteriology* 34: 484-486.
- Segovia L, Young JPW, Martinezromero E** (1993). Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type 1 strains as *Rhizobium etli* sp.nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43: 374-377.
- Sellstedt A, Normand P, Dawson J** (2007). *Frankia* the friendly bacteria infecting actinorhizal plants. *Physiologia Plantarum* 130: 315-317.
- Senaratna T, Touchell D, Bunn E, Dixon K** (2000). Acetyl salicylic acid (Aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Plant Growth Regulation* 30: 157-161.
- Sengupta S, Patra B, Ray S, Majumder AL** (2008). Inositol methyl transferase from a halophytic wild rice, *Porteresia coarctata* Roxb. (Tateoka): regulation of pinitol synthesis under abiotic stress. *Plant Cell and Environment* 31: 1442-1459.
- Seo M, Aoki H, Koiwai H, Kamiya Y, Nambara E, Koshihara T** (2004). Comparative studies on the *Arabidopsis* aldehyde oxidase (AAO) gene family revealed a major role of AAO3 in ABA biosynthesis in seeds. *Plant and Cell Physiology* 45: 1694-1703.
- Serraj R, Sinclair TR** (2002). Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions?. *Plant Cell and Environment* 25: 333-341.

- Serrat R** (2002). Response of symbiotic nitrogen fixation to drought and salinity stress. *Physiology Molecular Biology Plant* 8: 77-86.
- Shabala S, Cuin TA, Pottosin I** (2007). Polyamines prevent NaCl induced K⁺ efflux from pea mesophyll by blocking non-selective cation channels. *FEBS Letters* 581: 1993-1999.
- Shakirova FM, Sakhabutdinova AR, Bezrukova MV, Fatkhutdinova RA, Fatkhutdinova DR** (2003). Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. *Plant Science* 164: 317-322.
- Shao HB, Chu LY, Zhao CX, Guo QJ, Liu XA, Ribaut JM** (2006). Plant gene regulatory network system under abiotic stress. *Acta Biologica Szeged* 50: 1-9.
- Shao HB, Chu LY, Wu G, Zhang JH, Lu ZH, Hu YC** (2007). Changes of some antioxidative physiological indices under soil water deficits among 10 wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes at tillering stage. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 54: 143-149.
- Shao HB, Chu LY, Lu ZH, Kang CM** (2008). Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. *International Journal of Biological Sciences* 4: 8-14.
- Shen YY, Wang XF, Wu FQ, Du SY, Cao Z, Shang Y, Wang XL, Peng CC, Yu XC, Zhu SY, Fan RC, Xu YH, Zhang DP** (2006). The Mg chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature* 443: 823-826.
- Sheveleva E, Chmara W, Bohnert HJ, Jensen RG** (1997). Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Nicotiana tabacum* L. *Plant Physiology* 115: 1211-1219.
- Shi HZ, Lee BH, Wu SJ, Zhu JK** (2003). Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotechnology* 21: 81-85.
- Shi Q, Bao Z, Zhu Z, Ying Q, Qian Q** (2006). Effects of different treatments of salicylic acid on heat tolerance, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzyme activity in seedlings of *Cucumis sativa* L. *Plant Growth Regulation* 48: 127-135.
- Shim IS, Momose Y, Yamamoto A, Kim DW, Usui K** (2003). Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to salicylic acid accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* 39: 285-292.
- Shimizu N, Kobayashi K, Hayashi K** (1984). The reaction of superoxide radical with catalase. Mechanism of the inhibition of catalase by superoxide radical. *Journal of Biological Chemistry* 259: 4414-4418.
- Simon-Sarkadi L, Kocsy G, Sebestyén Z** (2002). Effect of salt stress on free amino acid and polyamine content in cereals. *Acta Biologica Szegediensis* 46: 73-75.
- Singh SP** (1993). Effect of non-auxinic chemicals on root formation in some ornamental plant cuttings. *Advanced Horticulture Forestry* 3: 207-210.
- Singh RP, Srivastava HS** (1986). Increase in glutamate synthase (NADH) activity in maize seedlings in response to nitrate and ammonium nitrogen. *Physiologia Plantarum* 66: 413-416.
- Sivaci A, Elmas E, Gümüş F** (2008). Changes in abscisic acid contents of some aquatic plants exposed to cadmium and salinity. *International Journal of Botany* 4: 104-108.
- 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.). *Journal of Experimental Botany* 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. *Journal of Experimental Botany* 50: 1701-1708.

- Soussi M, Khadri M, Lluch C, Ocaña A** (2001). Carbon metabolism and bacteroid respiration in nodules of chickpea (*Cicer arietinum* L.) plants grown under saline conditions. *Plant Biosystems* 135: 157-163.
- Sprent JI, James EK** (2007). Legume evolution: where do nodules and mycorrhizas fit in?. *Plant Physiology* 144: 575-581.
- Squartini A, Struffi P, Doring H, Selenska-Pobel S, Tola E, Giacomini A, Vendramin E, Velázquez E, Mateos PF, Martínez-Molina E, Dazzo FB, Casella S, Nuti MP** (2002). *Rhizobium sullae* sp.nov., (formerly '*Rhizobium hedysari*'), the root nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 1267-1276.
- Stacey G, McAlvin CB, Kim SY, Olivares J, Soto MJ** (2006). Effects of endogenous salicylic acid on nodulation in the model legumes *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 141: 1473-1481.
- Stepkowski T, Moulin L, Krzyzanska A, McInnes A, Law IJ, Howieson J** (2005). European origin of *Bradyrhizobium* populations infecting lupins and serradella in soils of Western Australia and South Africa. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 7041-7052.
- 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 II. Distribution of compounds in seedlings during the onset of nitrogen fixation. *Plant Physiology* 66: 471-476.
- Streeter JG, Lohnes DG, Fioritto RJ** (2001). Patterns of pinitol accumulation in soybean plants and relationships to drought tolerance. *Plant Cell and Environment* 24: 429-438.
- Su GX, Bai X** (2008). Contribution of putrescine degradation to proline accumulation in soybean leaves under salinity. *Biologia Plantarum* 52: 796-799.
- Subramanian S, Stacey G, Yu O** (2006). Endogenous isoflavones are essential for the establishment of symbiosis between soybean and *Bradyrhizobium japonicum*. *The Plant Journal* 48: 261-273.
- Sung JM, Chen CL** (1983). The effect of water stress on enzymes of ammonia assimilation in cytosol of soybean nodules. *Journal of the Agricultural Association of China*: 20-27.
- Supanjani S, Habib A, Mabood F, Lee KD, Donnelly D, Smith DL** (2006). Nod factor enhances calcium uptake by soybean. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 866-872.
- Suzuki A, Akune M, Kogiso M, Imagama Y, Osuki K, Uchiumi T, Higashi S, Han SY, Yoshida S, Asami T, Abe M** (2004). Control of nodule number by the phytohormone abscisic acid in the roots of two leguminous species. *Plant and Cell Physiology* 45: 914-922.
- Szpesi A, Csiszar J, Bajkan S, Gemes K, Horvath F, Laszlo E, Deer AK, Simon ML, Tari I** (2005). Role of salicylic acid pretreatment on the acclimation of tomato plants to salt and osmotic stress. *Acta Biologica Szegediensis* 49: 123-125.
- Taiz L, Zeiger E** (2007). *Plant Physiology* (4ª Edición). Sunderland pp. 764, Massachusetts, USA.
- Takao K, Ozawa T, Shibata S, Wada M, Sugita Y, Shirahata A, Samejima K** (2007). Formation of spermidine or norspermidine from synthetic diacetylpolyamines by acetylpolyamine oxidase in cultured cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 30: 2389-2393.
- Tan ZY, Xu XD, Wang ET, Gag JL, Martínez Romero E, Chen WX** (1997). Phylogenetic and genetic relationships of *Mesorhizobium tianshanense* and related rhizobia. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47: 874-879.
- Tan ZY, Kan FL, Peng GX, Wang ET, Reinhold-Hurek B, Chen WX** (2001). *Rhizobium yanglingense* sp.nov., isolated from arid and semiarid regions in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 909-914.

- Tang W, Newton RJ** (2005). Polyamines reduce salt-induced oxidative damage by increasing the activities of antioxidant enzymes and decreasing lipid peroxidation in *Virginia pine*. *Plant Growth Regulation* 46: 31-43.
- Tari I, Csiszár J, Szalai G, Horváth F, Pécsváradi A, Kiss G, Szepesi Á, Szabó M, Erdei L** (2002). Acclimation of tomato plants to salinity after a salicylic acid pre-treatment. *Acta Biologica Szegediensis* 46: 55-56.
- Tari I, Simon LM, Deer KA, Csiszar J, Sz B, Kis GY, Szepesi A** (2004). Influence of salicylic acid on salt stress acclimation of tomato plants: oxidative stress responses and osmotic adaptation. *Acta Physiologiae Plantarum* 26: 237-237.
- Tassoni A, van Buuren M, Franceschetti M, Fornale S, Bagni N** (2000). Polyamine content and metabolism in *Arabidopsis thaliana* and effect of spermidine on plant development. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 383-393.
- Tejera NA, Campos R, Sanjuan 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. *Journal of Plant Physiology* 161: 329-338.
- Tejera NA, Campos R, Sanjuan J, Lluch C** (2005). Effect of sodium chloride on growth, nutrient accumulation, and nitrogen fixation of common bean plants in symbiosis with isogenic strains. *Journal of Plant Nutrition* 28: 1907-1921.
- Tejera NA, Soussi M, Lluch C** (2006). Physiological and nutritional indicators of tolerance to salinity in chickpea plants growing under symbiotic conditions. *Environmental and Experimental Botany* 58: 17-24.
- Tejera NA, Iribarne C, Palma F, Lluch C** (2007). Inhibition of the catalase activity from *Phaseolus vulgaris* and *Medicago sativa* by sodium chloride. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 535-541.
- Tester M, Davenport R** (2003). Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany* 91: 503-527.
- Therond P, Bonnefont-Rousselot D, Davit-Spraul A, Conti M, Legrand A** (2000). Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. *Current Opinion Clinical Nutrition Metabolic Care* 3: 373-84.
- Thiel G, Lych J, Läuchli AG** (1998). Short-term effects of salinity stress on the turgor and elongation of growing barley leaves. *Journal of Plant Physiology* 132: 38-44.
- Thompson VS, Schaller KD, Apel WA** (2003). Purification and characterization of a novel thermo-alkali-stable catalase from *Thermus brockianus*. *Biotechnology Progress* 19: 1292-1299.
- Todorova D, Sergiev I, Alexieva V, Karanov E, Smith A, Hall M** (2007). Polyamine content in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh during recovery after low and high temperature treatments. *Plant Growth Regulation* 51: 185-191.
- Toh S, Imamura A, Watanabe A, Nakabayashi K, Okamoto M, Jikumaru Y, Hanada A, Aso Y, Ishiyama K, Tamura N, Iuchi S, Kobayashi M, Yamaguchi S, Kamiya Y, Nambara E, Kawakami N** (2008). High temperature induced abscisic acid biosynthesis and its role in the inhibition of gibberellin action in *Arabidopsis* seeds. *Plant Physiology* 146: 1368-1385.
- Toledo I, Lloret L, Martínez-Romero E** (2003). *Sinorhizobium americanus* sp.nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. in Mexico. *Systematic and Applied Microbiology* 26: 54-64.
- Tsai YC, Kao CH** (2004). The involvement of hydrogen peroxide in abscisic acid-induced activities of ascorbate peroxidase and glutathione reductase in rice roots. *Plant Growth Regulation* 43: 207-212.
- Tsuda K, Sato M, Glazebrook J, Cohen JD, Katagiri F** (2008). Interplay between MAMP triggered and SA mediated defense responses. *The Plant Journal* 55: 1061-1061.

- Tully RE, Hanson AD, Nelsen CE** (1979). Proline accumulation in water stressed barley leaves in relation to translocation and the nitrogen budget. *Plant Physiology* 63: 518-523.
- Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, Magome H, Kamiya Y, Shirasu K, Yoneyama K, Kyoizuka J, Yamaguchi S** (2008). Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* 455: 195-200.
- Unal D, Senkardesler A, Sukatar A** (2008). Abscisic acid and polyamine contents in the lichens *Pseudevernia furfuracea* and *Ramalina farinacea*. *Russian Journal of Plant Physiology* 55: 115-118.
- Urano K, Maruyama K, Ogata Y, Morishita Y, Takeda M, Sakurai N, Suzuki H, Saito K, Shibata D, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2008). Characterization of the ABA regulated global responses to dehydration in *Arabidopsis* by metabolomics. *The Plant Journal*: doi: 10.1111/j.1365-3113X.2008.03748.x.
- van Berkum P, Beyene D, Bao GP, Campbell TA, Eardly BD** (1998). *Rhizobium mongolense* sp.nov., is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 13-22.
- van Berkum P, Eardly BD** (2002). The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificans* is a nitrogen fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1132-1136.
- van Berkum P, Lelbold JM, Eardly BD** (2006). Proposal for combining *Bradyrhizobium* spp. (*Aeschynomene indica*) with *Blastobacter denitrificans* and to transfer *Blastobacter denitrificans* (Hirsch and Muller, 1985) to the genus *Bradyrhizobium* as *Bradyrhizobium denitrificans* (comb. nov.). *Systematic and Applied Microbiology* 29: 207-215.
- van Gestelen P, Asard H, Caubergs RJ** (1997). Solubilization and separation of a plant plasma membrane NADPH-O₂⁻ synthase from other NAD(P)H oxidoreductases. *Plant Physiology* 115: 543-550.
- van Spronsen PC, Tak T, Rood AMM, van Brussel AAN, Kijne JW, Boot KJM** (2003). Salicylic acid inhibits indeterminate type nodulation but not determinate type nodulation. *Molecular Plant Microbe Interactions* 16: 83-91.
- Vance CP** (1998). Legume symbiotic nitrogen fixation: agronomic aspects. En: *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*. Spaink HP, Kondorosi A, Hooykas JJ (eds), pp. 509-530, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Vance CP** (2008). Carbon and nitrogen metabolism in legume nodules. En: *Nitrogen-Fixing Leguminous Symbioses*. Dilworth MJ, James EK, Sprent JI, W.E. N (eds), pp. 293-320, Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Vandamme P, Goris J, Chen WM, de Vos P, Willems A** (2002). *Burkholderia tuberum* sp.nov., and *Burkholderia phymatum* sp.nov., nodulate the roots of tropical legumes. *Systematic and Applied Microbiology* 25: 507-512.
- Vasyukova NI, Ozeretskovskaya OL** (2007). Induced plant resistance and salicylic acid: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 43: 367-373.
- Velázquez E, Igual JM, Willems A, Willems A, Fernández MP, Muñoz E, Mateos PF, Abril A, Toro N, Normand P, Cervantes E, Gillis M, Martínez-Molina E** (2001). *Mesorhizobium chacoense* sp.nov., a novel species that nodulates *Prosopis alba* in the Chaco Arido region (Argentina). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 1011-1021.
- Verdoy D, De la Pena TC, Redondo FJ, Lucas MM, Pueyo JJ** (2006). Transgenic *Medicago truncatula* plants that accumulate proline display nitrogen fixing activity with enhanced tolerance to osmotic stress. *Plant Cell and Environment* 29: 1913-1923.

- Verhoeven AS, DemmigAdams B, Adams WW** (1997). Enhanced employment of the xanthophyll cycle and thermal energy dissipation in spinach exposed to high light and N stress. *Plant Physiology* 113: 817-824.
- Veselov DS, Sharipova GV, Veselov SU, Kudoyarova GR** (2008). The effects of NaCl treatment on water relations, growth, and ABA content in barley cultivars differing in drought tolerance. *Journal of Plant Growth Regulation* 27: 380-386.
- Vidal C, Chantreuil C, Berge O, Maure L, Escarre J, Bena G, Brunel B, Cleyet-Marel JC** (2009). *Mesorhizobium metallidurans* sp. nov., a metal-resistant symbiont of *Anthyllis vulneraria* growing on metalcolous soil in Languedoc, France. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 850-5.
- Vinuesa P, León-Barrios M, Silva C, Willems A, Jarabo-Lorenzo A, Perez-Galdona R, Werner D, Martínez-Romero E** (2005). *Bradyrhizobium canariense* sp.nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae : Genisteeae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 569-575.
- Vysotskaya LB, Korobova AV, Kudoyarova GR** (2008). Abscisic acid accumulation in the roots of nutrient limited plants: its impact on the differential growth of roots and shoots. *Journal of Plant Physiology* 165: 1274-1279.
- Wang LJ, Li SH** (2006). Salicylic acid induced heat or cold tolerance in relation to Ca²⁺ homeostasis and antioxidant systems in young grape plants. *Plant Science* 170: 685-694.
- Wang PT, Song CP** (2008). Guard cell signalling for hydrogen peroxide and abscisic acid. *New Phytologist* 178: 703-718.
- Wang ET, van Berkum P, Beyene D, Sui XH, Dorado O, Chen WX, Martínez-Romero E** (1998). *Rhizobium huautlense* sp.nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 687-699.
- Wang ET, van Berkum P, Sui XH, Beyene D, Chen WX, Martínez-Romero E** (1999). Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp.nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49: 51-65.
- Wang YY, Mopper S, Hasenstein KH** (2001). Effects of salinity on endogenous ABA, IAA, JA, and SA in *Iris hexagona*. *Journal of Chemical Ecology* 27: 327-342.
- Wang ET, Rogel MA, Sui XH, Chen WX, Martínez-Romero E, van Berkum P** (2002a). *Mesorhizobium amorphae*, a rhizobial species that nodulates *Amorpha fruticosa*, is native to American soils. *Archives of Microbiology* 178: 301-305.
- Wang ET, Tan ZY, Willems A, Fernández-López M, Reinhold-Hurek B, Martínez-Romero E** (2002b). *Sinorhizobium morelense* sp.nov., a *Leucaena leucocephala* associated bacterium that is highly resistant to multiple antibiotics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 1687-1693.
- Wang PC, Du YY, An GY, Zhou Y, Miao C, Song CP** (2006). Analysis of global expression profiles of *Arabidopsis* genes under abscisic acid and H₂O₂ applications. *Journal of Integrative Plant Biology* 48: 62-74.
- Wang FQ, Wang ET, Liu J, Chen Q, Sui XH, Chen WF, Chen WX** (2007a). *Mesorhizobium albiziae* sp.nov., a novel bacterium that nodulates *Albizia kalkora* in a subtropical region of China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 1192-1199.
- Wang ZQ, Yuan YZ, Ou JQ, Lin QH, Zhang CF** (2007b). Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase contribute differentially to proline accumulation in leaves of wheat (*Triticum aestivum*) seedlings exposed to different salinity. *Journal of Plant Physiology* 164: 695-701.

- Wei GH, Wang ET, Tan ZY, Zhu ME, Chen WX** (2002). *Rhizobium indigoferae* sp.nov., and *Sinorhizobium kummerowiae* sp.nov., respectively isolated from *Indigofera* spp. and *Kummerowia stipulacea*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 2231-2239.
- Wei GH, Tan ZY, Zhu ME, Wang ET, Han SZ, Chen WX** (2003). Characterization of rhizobla isolated from legume species within the genera *Astragalus* and *Lespedeza* grown in the Loess Plateau of China and description of *Rhizobium loessense* sp.nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 1575-1583.
- Wei H, Layzell DB** (2006). Adenylate coupled ion movement. A mechanism for the control of nodule permeability to O₂ diffusion. *Plant Physiology* 141: 280-287.
- Whitehead LF, Tyerman SD, Day DA** (2001). Polyamines as potential regulators of nutrient exchange across the peribacteroid membrane in soybean root nodules. *Australian Journal of Plant Physiology* 28: 675-681.
- Wi SJ, Kim WT, Park KY** (2006). Overexpression of carnation S-adenosylmethionine decarboxylase gene generates a broad-spectrum tolerance to abiotic stresses in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Reports* 25: 1111-1121.
- Wignarajah K** (1990). Growth response of *Phaseolus vulgaris* to varying salinity regimes. *Environmental and Experimental Botany* 30: 141-147.
- Wild A** (2003). Soils, land and food: managing the land during the twenty-first century. Cambridge University Press pp. 245, Cambridge, UK.
- Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM** (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414: 562-565.
- Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, VanMontagu M, Inze D, VanCamp W** (1997). Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. *Embo Journal* 16: 4806-4816.
- Wisniewski JP, Rathbun EA, Knox JP, Brewin NJ** (2000). Involvement of diamine oxidase and peroxidase in insolubilization of the extracellular matrix: Implications for pea nodule initiation by *Rhizobium leguminosarum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 413-420.
- Witty JF, Minchin FR** (1998). Methods for the continuous measurement of O₂ consumption and H₂ production by nodulated legume root systems. *Journal of Experimental Botany* 49: 1041-1047.
- Wyn Jones RG, Storey R, Leigh RA, Ahmad N, Pollard A** (1977). A hypothesis on cytoplasmic osmoregulation. En: *Regulation of Cell Membrane Activities in Plants*. Marre E, Cifferi O (eds), pp. 121-136, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Xu LM, Ge C, Cui Z, Li J, Fan H** (1995). *Bradyrhizobium liaoningense* sp.nov., isolated from the root nodules of soybeans. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45: 706-711.
- Yamchi A, Jazii FR, Mousavi A, Karkhane AA** (2007). Proline accumulation in transgenic tobacco as a result of expression of *Arabidopsis* 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) during osmotic stress. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 16: 9-15.
- Yang Q, DePierre JW** (1998). Rapid one-step isolation of mouse liver catalase by immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expression and Purification* 12: 277-283.
- Yang YN, Qi M, Mei CS** (2004). Endogenous salicylic acid protects rice plants from oxidative damage caused by aging as well as biotic and abiotic stress. *Plant Journal* 40: 909-919.
- Yang JC, Zhang JH, Liu K, Wang ZQ, Liu LJ** (2007). Involvement of polyamines in the drought resistance of rice. *Journal of Experimental Botany* 58: 1545-1555.
- Yao ZY, Kan FL, Wang ET, Wei GH, Chen WX** (2002). Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp.nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 2219-2230.

- Yasuda M, Ishikawa A, Jikumaru Y, Seki M, Umezawa T, Asami T, Maruyama-Nakashita A, Kudo T, Shinozaki K, Yoshida S, Nakashita H** (2008). Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid-mediated abiotic stress response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 1678-92.
- Yemm EW, Cocking EC** (1955). The determination of amino acids with ninhydrin. *Analytic* 80: 209-213.
- Yildirim E, Turan M, Guvenc I** (2008). Effect of foliar salicylic acid applications on growth, chlorophyll, and mineral content of cucumber grown under salt stress. *Journal of Plant Nutrition* 31: 593-612.
- Yildiz-Aktas L, Türkyilmaz B, Akça H, Parlak S** (2007). Role of abscisic acid and proline treatment on induction of antioxidant enzyme activities and drought tolerance responses of *Laurus nobilis* L. seedlings. *Fen Bilimleri Dergisi* 28: 14-27.
- Yoo TH, Park CJ, Ham BK, Kim KJ, Paek KH** (2004). Ornithine decarboxylase gene (CaODC1) is specifically induced during TMV mediated but salicylate independent resistant response in hot pepper. *Plant and Cell Physiology* 45: 1537-1542.
- Yoshida K, Kaothien P, Matsui T, Kawaoka A, Shinmyo A** (2003). Molecular biology and application of plant peroxidase genes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60: 665-670.
- Yuan S, Lin HH** (2008). Role of salicylic acid in plant abiotic stress. *Zeitschrift Fur Naturforschung Section C. A Journal of Biosciences* 63: 313-320.
- Yusuf M, Hasan SA, Ali B, Hayat S, Fariduddin Q, Ahmad A** (2008). Effect of salicylic acid on salinity induced changes in *Brassica juncea*. *Journal of Integrative Plant Biology* 50: 1096-102.
- Zahrán HH** (1999). *Rhizobium* legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63: 968-989.
- Zahrán HH, Sprent JI** (1986). Effects of sodium chloride and polyethyleneglycol on root hair infection and nodulation of *Vicia faba* L plants by *Rhizobium leguminosarum*. *Planta* 167: 303-309.
- Zawoznik MS, Groppa MD, Tomaro ML, Benavides MP** (2007). Endogenous salicylic acid potentiates cadmium induced oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 173: 190-197.
- Zdunek E, Lips SH** (2001). Transport and accumulation rates of abscisic acid and aldehyde oxidase activity in *Pisum sativum* L. in response to suboptimal growth conditions. *Journal of Experimental Botany* 52: 1269-1276.
- Zhao FG, Song CP, He J, Zhu H** (2007). Polyamines improve K^+/Na^+ homeostasis in barley seedlings by regulating root ion channel activities. *Plant Physiol.* 145: 1061-1072.
- Zhu JK** (2001). Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* 6: 66-71.
- Zhu H, Ding GH, Fang K, Zhao FG, Qin P** (2006). New perspective on the mechanism of alleviating salt stress by spermidine in barley seedlings. *Plant Growth Regulation* 49: 147-156.
- Zilli CG, Balestrasse KB, Yannarelli GG, Polizio AH, Santa-Cruz DM, Tomaro ML** (2008). Heme oxygenase up-regulation under salt stress protects nitrogen metabolism in nodules of soybean plants. *Environmental and Experimental Botany* 64: 83-89.
- Zottini M, Costa A, De Michele R, Ruzzene M, Carimi F, Lo Schiavo M** (2007). Salicylic acid activates nitric oxide synthesis in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 58: 1397-1405.
- Zúñiga D** (1997). Contribución relativa de los simbioses en la fijación de nitrógeno por *Phaseolus vulgaris* en condiciones de estrés salino. Tesis Doctoral, Universidad de Granada. pp 302.

APÉNDICE

Tabla A 1.1. Peso seco de planta (PSP), peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco raíz (PSR) en g planta⁻¹, y relación raíz parte aérea (RPA) en plantas de *M. sativa*

Tiempo (D)	NaCl (mM)	PSP	PSPA	PSR	RPA
42	0	0.156 ^g	0.118 ^{gh}	0.037 ^f	0.315 ^{ef}
	100	0.136 ^g	0.097 ^{gh}	0.037 ^f	0.387 ^{def}
	150	0.113 ^g	0.073 ^h	0.039 ^f	0.534 ^{de}
56	0	0.472 ^c	0.367 ^{de}	0.097 ^{ef}	0.271 ^f
	100	0.317 ^f	0.193 ^f	0.119 ^{ef}	0.619 ^e
	150	0.283 ^f	0.140 ^g	0.139 ^e	1.003 ^c
70	0	0.983 ^c	0.520 ^b	0.454 ^c	0.876 ^c
	100	0.761 ^d	0.397 ^d	0.355 ^d	0.896 ^c
	150	0.775 ^d	0.340 ^e	0.425 ^{cd}	1.256 ^b
84	0	2.026 ^a	0.964 ^a	1.032 ^a	1.078 ^{bc}
	100	1.562 ^b	0.554 ^b	0.996 ^a	1.809 ^a
	150	1.032 ^c	0.451 ^c	0.569 ^b	1.260 ^b
MDS (P ≤ 0.05)		0.103	0.045	0.097	0.237

Tabla A 1.2. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) PSP					
Tiempo(D)	13922948	3	4640982	882.1	0.0000
NaCl(S)	1041371	2	520685	98.9	0.0000
D × S	1147621	6	191270	36.3	0.0000
Error	189403	36	5261		
Total	16301342	47			
b) PSPA					
Tiempo(D)	2120668	3	706889	698.8	0.0000
NaCl(S)	504301	2	252151	249.2	0.0000
D × S	268388	6	44731	44.2	0.0000
Error	36412	36	1011		
Total	2929770	47			
c) PSR					
Tiempo(D)	5049241	3	1683080	360.1	0.0000
NaCl(S)	108827	2	54414	11.6	0.0000
D × S	445766	6	74294	15.9	0.0000
Error	168216	36	4673		
Total	5772049	47			
d) RPA					
Tiempo(D)	6.58	3	2.194	77.55	0.0000
NaCl(S)	1.26	2	0.630	22.27	0.0000
D × S	1.44	6	0.240	8.48	0.0000
Error	1.01	36	0.028		
Total	10.30	47			

Tabla A 1.3. 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. sativa*

Tiempo (D)	NaCl (mM)	F_0	F_m	F_0/F_m	F_v/F_m
42	0	100 ^{ef}	603 ^c	0.166 ^c	0.834 ^{abc}
	100	111 ^d	613 ^{bc}	0.181 ^d	0.819 ^c
	150	108 ^{de}	641 ^a	0.168 ^{de}	0.832 ^{bc}
56	0	100 ^{ef}	602 ^c	0.167 ^{de}	0.833 ^{abc}
	100	89 ^{gh}	569 ^d	0.156 ^{ef}	0.844 ^{ab}
	150	162 ^c	601 ^c	0.270 ^c	0.768 ^d
70	0	96 ^{fg}	565 ^d	0.170 ^{de}	0.830 ^{bc}
	100	85 ^h	562 ^d	0.151 ^f	0.849 ^a
	150	208 ^b	629 ^{ab}	0.331 ^b	0.669 ^e
84	0	86 ^h	547 ^d	0.157 ^{ef}	0.829 ^{bc}
	100	75 ⁱ	520 ^e	0.144 ^f	0.832 ^{bc}
	150	224 ^a	642 ^a	0.349 ^a	0.635 ^f
MDS ($P \leq 0.05$)		8	22	0.014	0.016

Tabla A 1.4. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) F_0					
Tiempo(D)	4302	3	1434	43	0.0000
NaCl(S)	73183	2	36592	1099	0.0000
D × S	31634	6	5272	158	0.0000
Error	1198	36	33		
Total	110316	47			
b) F_m					
Tiempo(D)	15155	3	5052	19.81	0.0000
NaCl(S)	34634	2	17317	67.93	0.0000
D × S	15891	6	2648	10.39	0.0000
Error	9176	36	255		
Total	74857	47			
c) F_0/F_m					
Tiempo(D)	0.017	3	0.0055	40.9	0.0000
NaCl(S)	0.149	2	0.0744	552.0	0.0000
D × S	0.067	6	0.0111	82.4	0.0000
Error	0.005	36	0.0001		
Total	0.237	47			
d) F_v/F_m					
Tiempo(D)	0.030	3	0.0101	78.3	0.0000
NaCl(S)	0.124	2	0.0618	481.7	0.0000
D × S	0.070	6	0.0117	90.9	0.0000

Error	0.005	36	0.0001
Total	0.228	47	

Tabla A 1.5. 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 $\mu\text{mol de N}_2 \text{ g}^{-1} \text{ PSN h}^{-1}$, peso seco de nódulos (PSN) en mg planta^{-1} y peso normalizado de nódulos (PNN) en $\text{mg PSN mg}^{-1} \text{ PSPA}$ en *M. sativa*

Tiempo (D)	NaCl (mM)	ANA	ANT	TFN	PSN	PNN
	0	86 ^{de}	709 ^b	251 ^a	1.78 ^c	0.015 ^c
42	100	200 ^a	427 ^c	65 ^e	1.58 ^e	0.016 ^c
	150	104 ^{cd}	333 ^{cd}	52 ^e	1.13 ^e	0.015 ^c
	0	201 ^a	1051 ^a	284 ^a	8.02 ^{cd}	0.022 ^{bc}
56	100	182 ^a	777 ^b	201 ^b	5.40 ^{de}	0.028 ^{ab}
	150	129 ^{bc}	636 ^b	170 ^b	4.70 ^{de}	0.033 ^a
	0	111 ^{cd}	475 ^c	121 ^c	8.72 ^{bcd}	0.017 ^c
70	100	90 ^{de}	439 ^c	116 ^c	8.63 ^{bcd}	0.022 ^{bc}
	150	65 ^{ef}	393 ^c	109 ^{cd}	10.40 ^{bc}	0.031 ^{ab}
	0	146 ^b	371 ^{cd}	75 ^{de}	30.30 ^a	0.031 ^{ab}
84	100	47 ^f	190 ^e	47 ^e	12.58 ^b	0.022 ^{bc}
	150	52 ^f	235 ^{de}	60 ^e	11.20 ^{bc}	0.025 ^{abc}
MDS ($P \leq 0.05$)		30	142	34	4.49	0.010

Tabla A 1.6. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) ANA					
Tiempo(D)	61255	3	20418	44.10	0.0000
NaCl(S)	22162	2	11081	23.93	0.0000
D × S	47730	6	7955	17.18	0.0000
Error	16665	36	463		
Total	147812	47			
b) ANT					
Tiempo(D)	1951067	3	650356	64.69	0.0000
NaCl(S)	557058	2	278529	27.70	0.0000
D × S	188443	6	31407	3.12	0.0141
Error	361922	36	10053		
Total	3058490	47			
c) TFN					
Tiempo(D)	154317	3	51439	87.84	0.0000
NaCl(S)	69112	2	34556	59.01	0.0000
D × S	59561	6	9927	16.95	0.0000
Error	21081	36	586		
Total	304072	47			

Apéndice

d) PSN

Tiempo(D)	1755	3	585	61.38	0.0000
NaCl(S)	295	2	147	15.47	0.0000
D × S	646	6	108	11.29	0.0000
Error	343	36	10		
Total	3040	47			

e) PNN

Tiempo(D)	0.001	3	0.00036	7.596	0.0005
NaCl(S)	0.000	2	0.00011	2.244	0.1206
D × S	0.001	6	0.00011	2.305	0.0551
Error	0.002	36	0.00005		
Total	0.004	47			

Tabla A 1.7. Actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y malato deshidrogenasa (MDH) expresadas en $\mu\text{mol NADH mg}^{-1} \text{prot h}^{-1}$, isocitrato deshidrogenasa (ICDH) en $\mu\text{mol NADP mg}^{-1} \text{prot h}^{-1}$ y sacarosa sintasa (SS) en $\mu\text{mol NAD mg}^{-1} \text{prot h}^{-1}$ en nódulos de *M. sativa*

Tiempo (D)	NaCl (mM)	SS	PEPC	MDH	ICDH
42	0	0.0017 ^{gh}	0.123 ^{ef}	6.36 ^h	0.123 ^c
	100	0.0033 ^b	0.184 ^b	22.25 ^a	0.315 ^a
	150	0.0026 ^c	0.152 ^c	14.00 ^c	0.301 ^a
56	0	0.0038 ^a	0.177 ^b	12.93 ^d	0.266 ^b
	100	0.0018 ^{fg}	0.123 ^{ef}	16.15 ^b	0.263 ^b
	150	0.0006 ⁱ	0.037 ^g	4.81 ^j	0.084 ^f
70	0	0.0025 ^c	0.244 ^a	10.94 ^e	0.234 ^c
	100	0.0020 ^e	0.142 ^{cd}	7.71 ^g	0.224 ^c
	150	0.0022 ^d	0.137 ^{cde}	7.65 ^g	0.233 ^c
84	0	0.0019 ^{ef}	0.119 ^f	5.65 ⁱ	0.254 ^b
	100	0.0016 ^h	0.129 ^{def}	10.08 ^f	0.227 ^c
	150	0.0019 ^{ef}	0.145 ^{cd}	6.78 ^h	0.204 ^d
MDS ($P \leq 0.05$)		0.0001	0.016	0.51	0.014

Tabla A 1.8. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) SS					
Tiempo(D)	0.000003	3	0.00000105	104.76	0.0000
NaCl(S)	0.000004	2	0.00000175	174.44	0.0000
D × S	0.000023	6	0.00000385	382.68	0.0000
Error	0.000000	36	0.00000001		
Total	0.000030	47			
b) PEPC					
Tiempo(D)	0.026	3	0.0086	61.28	0.0000
NaCl(S)	0.019	2	0.0094	66.58	0.0000

D × S	0.059	6	0.0099	69.89	0.0000
Error	0.005	36	0.0001		
Total	0.109	47			
c) MDH					
Tiempo(D)	315	3	105.3	814	0.0000
NaCl(S)	315	2	157.7	1219	0.0000
D × S	533	6	88.9	687	0.0000
Error	4	36	0.1		
Total	1169	47			
d) ICDH					
Tiempo(D)	0.011	3	0.0037	72.8	0.0000
NaCl(S)	0.023	2	0.0116	230.5	0.0000
D × S	0.161	6	0.0269	534.6	0.0000
Error	0.002	36	0.0001		
Total	0.197	47			

Tabla A 1.9. Actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y malato deshidrogenasa (MDH) expresadas en $\mu\text{mol NADH g}^{-1} \text{PFN h}^{-1}$, isocitrato deshidrogenasa (ICDH) en $\mu\text{mol NADP g}^{-1} \text{PFN h}^{-1}$ y sacarosa sintasa (SS) en $\mu\text{mol NAD g}^{-1} \text{PFN h}^{-1}$ en nódulos de *M. sativa*

Tiempo (D)	NaCl (mM)	SS	PEPC	MDH	ICDH
	0	0.067 ^g	5.56 ^f	286 ⁱ	5.54 ^f
42	100	0.118 ^c	8.51 ^c	1031 ^a	14.60 ^{bc}
	150	0.104 ^d	7.15 ^d	660 ^c	14.22 ^c
56	0	0.163 ^a	8.31 ^c	605 ^d	16.17 ^a
	100	0.073 ^g	6.07 ^{ef}	799 ^b	13.32 ^c
	150	0.014 ^h	1.18 ^g	152 ^j	1.80 ^g
70	0	0.148 ^b	13.71 ^a	613 ^d	14.99 ^b
	100	0.089 ^f	8.03 ^c	436 ^f	12.48 ^c
	150	0.108 ^d	9.62 ^b	537 ^e	13.14 ^d
84	0	0.097 ^c	8.13 ^c	385 ^g	16.54 ^a
	100	0.073 ^g	7.00 ^d	546 ^e	12.05 ^e
	150	0.089 ^f	6.95 ^d	324 ^h	11.94 ^e
MDS ($P \leq 0.05$)		0.006	0.82	24	0.56

Tabla A 1.10. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) SS					
Tiempo(D)	0.007	3	0.00244	134.2	0.0000
NaCl(S)	0.014	2	0.00700	384.3	0.0000
D × S	0.045	6	0.00746	409.7	0.0000
Error	0.001	36	0.00002		
Total	0.067	47			

Apéndice

b) PEPC					
Tiempo(D)	171.1	3	57.05	170.1	0.0000
NaCl(S)	58.6	2	29.34	87.5	0.0000
D × S	137.4	6	22.90	68.3	0.0000
Error	12.0	36	0.33		
Total	379.3	47			
c) MDH					
Tiempo(D)	350034	3	116678	393.4	0.0000
NaCl(S)	731211	2	365605	1232.7	0.0000
D × S	1430150	6	238358	803.7	0.0000
Error	10676	36	297		
Total	2522071	47			
d) ICDH					
Tiempo(D)	86.1	3	28.7	183.3	0.0000
NaCl(S)	92.2	2	46.1	294.6	0.0000
D × S	649.7	6	108.2	691.4	0.0000
Error	5.6	36	0.1		
Total	833.7	47			

Tabla A 1.11. Actividad glutamina sintetasa (GS) expresada en nmol γ -glutamil mg^{-1} prot min^{-1} y glutamato sintasa (GOGAT), glutamato deshidrogenasa (GDH) y aspartato aminotransferasa (AAT) en nmol NADH mg^{-1} prot min^{-1} en nódulos de *M. sativa*

Tiempo (D)	NaCl (mM)	GS	GOGAT	GDH	AAT
	0	13.98 ^c	0.021 ^{ef}	0.025 ^{bc}	0.444 ^c
42	100	10.35 ^g	0.030 ^c	0.023 ^c	0.460 ^b
	150	23.36 ^a	0.035 ^b	0.027 ^b	0.482 ^a
56	0	12.14 ^c	0.037 ^a	0.019 ^d	0.382 ^e
	100	14.52 ^b	0.024 ^d	0.013 ^{ef}	0.481 ^a
	150	0.87 ^k	0.005 ^g	0.005 ^h	0.306 ^g
70	0	11.14 ^f	0.031 ^c	0.031 ^a	0.358 ^f
	100	12.98 ^d	0.021 ^{ef}	0.011 ^{fg}	0.399 ^d
	150	1.15 ^k	0.024 ^d	0.015 ^e	0.446 ^c
84	0	7.46 ⁱ	0.022 ^e	0.013 ^{ef}	0.366 ^f
	100	8.31 ^h	0.020 ^f	0.009 ^g	0.402 ^d
	150	7.06 ^j	0.022 ^e	0.011 ^{fg}	0.353 ^f
MDS ($P \leq 0.05$)		0.29	0.001	0.002	0.013

Tabla A 1.12. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) GS					
Tiempo(D)	520	3	173.4	4083	0.0000
NaCl(S)	113	2	56.9	1340	0.0000
D × S	999	6	166.5	3920	0.0000

Error	1	36	0.1		
Total	1635	47			
b) GOGAT					
Tiempo(D)	0.0003	3	0.0001	220.5	0.0000
NaCl(S)	0.0003	2	0.0002	307.0	0.0000
D × S	0.0022	6	0.0004	653.1	0.0000
Error	0.0001	36	0.0000		
Total	0.0030	47			
c) GDH					
Tiempo(D)	0.0014	3	0.0006	173.8	0.0000
NaCl(S)	0.0006	2	0.0003	111.9	0.0000
D × S	0.0007	6	0.0001	41.7	0.0000
Error	0.0001	36	0.0000		
Total	0.0029	47			
d) AAT					
Tiempo(D)	0.054	3	0.0179	189.1	0.0000
NaCl(S)	0.021	2	0.0104	110.3	0.0000
D × S	0.065	6	0.0107	113.8	0.0000
Error	0.003	36	0.0001		
Total	0.143	47			

Tabla A 1.13. Actividad glutamina sintetasa (GS) expresada en $\text{nmol } \gamma\text{-glutamil g}^{-1} \text{ PFN min}^{-1}$ y glutamato sintasa (GOGAT), glutamato deshidrogenasa (GDH) y aspartato aminotransferasa (AAT) en $\text{nmol NADH g}^{-1} \text{ PFN min}^{-1}$ en nódulos de *M. sativa*

Tiempo (D)	NaCl (mM)	GS	GOGAT	GDH	AAT
	0	618.35 ^{bc}	0.953 ^g	1.130 ^c	19.97 ^g
42	100	424.10 ^h	1.378 ^d	1.048 ^c	21.32 ^f
	150	470.14 ^g	1.631 ^b	1.278 ^b	22.75 ^{de}
56	0	639.21 ^a	1.726 ^a	0.900 ^d	23.22 ^{cd}
	100	628.78 ^{ab}	1.178 ^e	0.627 ^{ef}	24.36 ^b
	150	42.81 ⁱ	0.165 ^h	0.146 ^g	6.58 ^h
70	0	607.19 ^c	1.759 ^a	1.728 ^a	22.97 ^{de}
	100	565.83 ^d	1.206 ^e	0.648 ^e	22.26 ^c
	150	32.01 ⁱ	1.655 ^b	1.037 ^c	25.19 ^a
84	0	511.87 ^e	1.521 ^c	0.873 ^d	23.84 ^{bc}
	100	486.69 ^f	1.109 ^f	0.511 ^f	21.32 ^f
	150	491.37 ^f	1.051 ^f	0.550 ^{ef}	20.72 ^{fg}
MDS ($P \leq 0.05$)		13.62	0.063	0.127	0.78

Tabla A 1.14. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) GS					
Tiempo(D)	86754	3	28918	312	0.0000

Apéndice

NaCl(S)	1004278	2	502139	5430	0.0000
D × S	835133	6	139189	1505	0.0000
Error	3329	36	92		
Total	1929493	47			
b) GOGAT					
Tiempo(D)	1.657	3	0.552	330.2	0.0000
NaCl(S)	1.148	2	0.574	343.2	0.0000
D × S	6.026	6	1.004	600.5	0.0000
Error	0.060	36	0.002		
Total	8.891	47			
c) GDH					
Tiempo(D)	3.593	3	1.198	157.6	0.0000
NaCl(S)	1.963	2	0.981	129.1	0.0000
D × S	2.023	6	0.337	44.3	0.0000
Error	0.273	36	0.008		
Total	7.852	47			
d) AAT					
Tiempo(D)	187	3	62.6	203.4	0.0000
NaCl(S)	138	2	69.1	224.7	0.0000
D × S	710	6	118.3	384.3	0.0000
Error	11	36	0.3		
Total	1047	47			

Tabla A 1.15. Contenido de malato y glutamato (Glutam) expresados en mmol g⁻¹ PF en hoja (h) y nódulo (n) de *M. sativa*

Tiempo (D)	NaCl (mM)	Malato(h)	Malato(n)	Glutam(h)	Glutam(n)
	0	11.649 ^f	6.112 ^e	2.105 ^c	4.268 ^c
42	100	25.320 ^c	2.584 ⁱ	1.854 ^d	3.898 ^d
	150	17.820 ^d	3.558 ^g	1.805 ^d	3.458 ^e
	0	4.739 ⁱ	10.851 ^b	2.307 ^b	5.839 ^a
56	100	15.458 ^e	13.612 ^a	1.863 ^d	3.183 ^f
	150	32.643 ^b	0.369 ^j	1.369 ^e	1.373 ^j
	0	8.711 ^h	6.688 ^d	2.529 ^a	4.700 ^b
70	100	14.926 ^c	4.724 ^f	2.669 ^a	4.683 ^b
	150	37.028 ^a	0.591 ^j	0.498 ^f	0.584 ^k
	0	10.630 ^g	7.633 ^c	0.469 ^f	1.776 ⁱ
84	100	5.064 ⁱ	3.263 ^{gh}	0.255 ^h	2.229 ^g
	150	4.798 ⁱ	2.849 ^{hi}	0.337 ^{gh}	2.101 ^h
MDS (P ≤ 0.05)		0.745	0.517	0.148	0.100

Tabla A 1.16. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Malato(h)					

Tiempo(D)	1312	3	437.3	1591	0.0000
NaCl(S)	1607	2	803.3	2922	0.0000
D × S	2212	6	368.7	1341	0.0000
Error	10	36	0.3		
Total	5141	47			
b) Malato(n)					
Tiempo(D)	150.4	3	50.1	382	0.0000
NaCl(S)	301.7	2	150.9	1150	0.0000
D × S	249.0	6	41.5	316	0.0000
Error	4.7	36	0.1		
Total	705.9	47			
c) Glutam(h)					
Tiempo(D)	21.24	3	7.081	649.5	0.0000
NaCl(S)	6.36	2	3.180	291.7	0.0000
D × S	7.51	6	1.252	114.8	0.0000
Error	0.39	36	0.011		
Total	35.51	47			
d) Glutam(n)					
Tiempo(D)	22.7	3	7.58	1496	0.0000
NaCl(S)	43.6	2	21.81	4306	0.0000
D × S	43.5	6	7.25	1431	0.0000
Error	0.2	36	0.01		
Total	110.0	47			

Tabla A 1.17. Contenido de aminoácidos libres totales (Aa) expresados en mg asparragina g⁻¹ PF en hoja (h), raíz (r) y nódulo (n) de *M. sativa*

Tiempo (D)	NaCl (mM)	Aa(h)	Aa(r)	Aa(n)
	0	5.80 ^a	5.71 ^b	8.21 ^h
42	100	5.10 ^c	3.96 ^d	15.67 ^d
	150	4.17 ^d	3.39 ^d	11.29 ^{fg}
56	0	2.81 ^f	3.73 ^d	11.81 ^f
	100	5.50 ^b	0.72 ^f	17.58 ^c
	150	1.50 ⁱ	2.70 ^e	16.17 ^d
70	0	3.58 ^c	5.06 ^c	13.67 ^e
	100	4.14 ^d	6.81 ^a	31.04 ^a
	150	1.54 ⁱ	5.56 ^{bc}	24.57 ^b
84	0	1.86 ^h	5.21 ^{bc}	18.03 ^c
	100	2.95 ^f	5.41 ^{bc}	10.74 ^g
	150	2.53 ^g	5.33 ^{bc}	8.22 ^h
MDS (P ≤ 0.05)		0.28	0.64	0.70

Tabla A 1.18. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Aa(h)					
Tiempo(D)	43.6	3	14.56	361.4	0.0000
NaCl(S)	31.6	2	15.84	393.3	0.0000
D × S	24.2	6	4.04	100.4	0.0000
Error	1.4	36	0.04		
Total	101.1	47			
b) Aa(r)					
Tiempo(D)	82.6	3	27.54	134.1	0.0000
NaCl(S)	5.2	2	2.58	12.5	0.0001
D × S	31.9	6	5.31	25.9	0.0000
Error	7.4	36	0.21		
Total	127.1	47			
c) Aa(n)					
Tiempo(D)	984	3	328.2	1344	0.0000
NaCl(S)	278	2	139.1	570	0.0000
D × S	731	6	121.8	499	0.0000
Error	8	36	0.2		
Total	2002	47			

Tabla A 1.19. Contenido de prolina (Pro) expresados en mg prolina g⁻¹ PF en hoja (h), raíz (r) y nódulo (n) de *M. sativa*

Tiempo (D)	NaCl (mM)	Pro(h)	Pro(r)	Pro(n)
	0	0.388 ^f	0.235 ⁱ	0.622 ^g
42	100	0.545 ^d	0.676 ^f	0.421 ^h
	150	0.482 ^e	0.918 ^e	0.346 ⁱ
56	0	0.127 ⁱ	0.189 ^j	0.471 ^h
	100	0.384 ^f	0.450 ^g	1.394 ^d
	150	0.213 ^h	1.979 ^d	1.129 ^e
70	0	0.352 ^g	0.186 ^j	0.188 ^j
	100	0.816 ^c	2.002 ^d	2.122 ^c
	150	0.548 ^d	2.128 ^c	1.020 ^f
84	0	0.132 ⁱ	0.306 ^h	2.111 ^c
	100	2.250 ^a	5.418 ^a	6.487 ^a
	150	1.928 ^b	4.912 ^b	3.879 ^b
MDS (P ≤ 0.05)		0.024	0.045	0.063

Tabla A 1.20. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Pro(h)					
Tiempo(D)	9.84	3	3.281	10104	0.0000
NaCl(S)	4.78	2	2.394	7373	0.0000
D × S	6.25	6	1.041	3208	0.0000
Error	0.01	36	0.001		
Total	20.89	47			
b) Pro(r)					
Tiempo(D)	63.83	3	21.27	15966	0.0000
NaCl(S)	47.16	2	23.58	17696	0.0000
D × S	34.19	6	5.69	4276	0.0000
Error	0.04	36	0.01		
Total	145.24	47			
c) Pro(n)					
Tiempo(D)	101.0	3	33.66	17462.	0.0000
NaCl(S)	24.9	2	12.46	6463	0.0000
D × S	23.3	6	3.89	2018	0.0000
Error	0.1	36	0.01		
Total	149.3	47			

Tabla A 1.21. Contenido de mioinositol (Mio) expresados en mg mioinositol g⁻¹ PF en hoja (h), raíz (r) y nódulo (n) de *M. sativa*

Tiempo (D)	NaCl (mM)	Mio(h)	Mio(r)	Mio(n)
	0	3.61 ^b	0.174 ^{cd}	0.463 ^{de}
42	100	4.45 ^a	0.218 ^{ab}	2.925 ^a
	150	3.78 ^b	0.258 ^a	2.981 ^a
56	0	2.47 ^d	0.149 ^d	0.442 ^e
	100	2.11 ^e	0.147 ^d	1.464 ^b
	150	1.73 ^f	0.099 ^e	1.210 ^c
70	0	3.19 ^c	0.241 ^a	0.407 ^e
	100	1.56 ^f	0.199 ^{bc}	0.551 ^d
	150	1.19 ^g	0.070 ^{ef}	0.425 ^c
84	0	3.48 ^{bc}	0.075 ^{ef}	0.240 ^f
	100	2.15 ^e	0.093 ^e	0.497 ^{de}
	150	2.67 ^d	0.048 ^f	0.435 ^c
MDS (P ≤ 0.05)		0.31	0.040	0.090

Tabla A 1.22. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Mio(h)					
Tiempo(D)	29.25	3	9.75	210.8	0.0000
NaCl(S)	6.13	2	3.07	66.3	0.0000
D × S	9.16	6	1.53	33.1	0.0000
Error	1.66	36	0.05		
Total	46.22	47			
b) Mio(r)					
Tiempo(D)	0.135	3	0.045	57.14	0.0000
NaCl(S)	0.020	2	0.010	12.87	0.0000
D × S	0.068	6	0.011	14.46	0.0000
Error	0.028	36	0.001		
Total	0.251	47			
c) Mio(n)					
Tiempo(D)	23.09	3	7.69	1967	0.0000
NaCl(S)	9.16	2	4.58	1171	0.0000
D × S	9.84	6	1.64	419	0.0000
Error	0.14	36	0.01		
Total	42.22	47			

Tabla A 1.23. Contenido de ononitol (Ono) expresados en mg ononitol g⁻¹ PF en hoja (h), raíz (r) y nódulo (n) de *M. sativa*

Tiempo (D)	NaCl (mM)	Ono(h)	Ono(r)	Ono(n)
	0	3.978 ^b	0.339 ^{ef}	4.618 ^c
42	100	4.390 ^a	0.447 ^{de}	6.505 ^{ab}
	150	4.130 ^b	0.843 ^b	7.226 ^a
56	0	2.218 ^d	0.930 ^{ab}	3.922 ^{cd}
	100	2.118 ^d	1.014 ^a	6.503 ^{ab}
	150	3.195 ^c	0.654 ^c	4.518 ^c
70	0	3.040 ^c	0.555 ^{cd}	5.880 ^b
	100	1.452 ^{ef}	0.469 ^d	4.563 ^c
	150	1.502 ^{ef}	0.263 ^f	2.741 ^e
84	0	2.063 ^d	0.309 ^f	4.064 ^{cd}
	100	1.578 ^e	0.034 ^g	3.634 ^d
	150	1.286 ^f	0.027 ^g	3.653 ^d
MDS (P ≤ 0.05)		0.251	0.127	0.737

Tabla A 1.24. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Ono(h)					
Tiempo(D)	44.86	3	14.95	484.1	0.0000
NaCl(S)	1.61	2	0.80	26.1	0.0000
D × S	9.32	6	1.55	50.3	0.0000
Error	1.11	36	0.03		
Total	56.91	47			
b) Ono(r)					
Tiempo(D)	3.382	3	1.127	143.6	0.0000
NaCl(S)	0.060	2	0.030	3.8	0.0032
D × S	1.173	6	0.195	24.9	0.0000
Error	0.283	36	0.008		
Total	4.897	47			
c) Ono(n)					
Tiempo(D)	35.53	3	11.84	44.52	0.0000
NaCl(S)	5.64	2	2.82	10.60	0.0000
D × S	43.82	6	7.30	27.46	0.0000
Error	9.57	36	0.26		
Total	94.58	47			

Tabla A 1.25. Contenido de pinitol (Pin) expresados en mg pinitol g⁻¹ PF en hoja (h), raíz (r) y nódulo (n) de *M. sativa*

Tiempo (D)	NaCl (mM)	Pin(h)	Pin(r)	Pin(n)
	0	10.12 ^e	2.07 ^f	5.76 ^h
42	100	13.36 ^d	3.14 ^{ef}	8.89 ^f
	150	12.51 ^d	3.32 ^e	8.51 ^{fg}
56	0	9.63 ^e	2.11 ^f	7.28 ^g
	100	15.07 ^c	3.23 ^e	13.75 ^d
	150	12.40 ^d	7.50 ^c	20.07
70	0	14.76 ^c	3.25 ^e	10.62 ^e
	100	20.00 ^a	5.67 ^d	16.10 ^c
	150	19.59 ^a	6.02 ^d	21.05 ^b
84	0	15.63 ^c	7.23 ^c	13.80 ^d
	100	19.03 ^{ab}	14.70 ^b	21.07 ^b
	150	18.09 ^b	25.59 ^a	27.21 ^a
MDS (P ≤ 0.05)		1.18	1.08	1.37

Tabla A 1.26. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Pin(h)					
Tiempo(D)	388.1	3	129.3	189.2	0.0000
NaCl(S)	159.5	2	79.7	116.6	0.0000
D × S	14.8	6	2.4	3.6	0.0007
Error	24.6	36	0.7		
Total	587.1	47			
b) Pin(r)					
Tiempo(D)	1283.1	3	427.7	743.1	0.0000
NaCl(S)	387.4	2	193.7	336.6	0.0000
D × S	381.2	6	63.5	110.4	0.0000
Error	20.7	36	0.5		
Total	2072.4	47			
c) Pin(n)					
Tiempo(D)	910	3	303.3	329.5	0.0000
NaCl(S)	780	2	390.1	423.7	0.0000
D × S	282	6	47.1	51.2	0.0000
Error	33	36	0.9		
Total	2005	47			

Tabla A 1.27. Contenido de azúcares solubles totales (Ast) expresados en mg glucosa g⁻¹ PF en hoja (h), raíz (r) y nódulo (n) de *M. sativa*

Tiempo (D)	NaCl (mM)	Ast(h)	Ast(r)	Ast(n)
	0	9.84 ⁱ	16.10 ^f	14.61 ^j
42	100	11.49 ^g	18.84 ^e	27.89 ^g
	150	10.71 ^h	19.42 ^e	20.10 ⁱ
56	0	12.40 ^f	10.84 ^g	21.01 ⁱ
	100	13.91 ^e	16.91 ^f	31.28 ^f
	150	16.66 ^c	34.00 ^a	28.78 ^g
70	0	15.37 ^d	11.69 ^g	24.33 ^h
	100	19.10 ^b	24.23 ^c	55.25 ^c
	150	16.25 ^c	24.27 ^c	43.72 ^d
84	0	15.42 ^d	11.11 ^g	37.49 ^e
	100	24.91 ^a	21.05 ^d	74.23 ^a
	150	19.37 ^b	29.66 ^b	64.61 ^b
MDS (P ≤ 0.05)		0.61	1.33	1.16

Tabla A 1.28. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Ast(h)					
Tiempo(D)	551.3	3	183.7	965.9	0.0000
NaCl(S)	136.1	2	68.1	357.6	0.0000
D × S	118.7	6	19.8	104.0	0.0000
Error	6.8	36	0.2		
Total	813.1	47			
b) Ast(r)					
Tiempo(D)	49	3	16.6	18.7	0.0000
NaCl(S)	1662	2	831.3	940.9	0.0000
D × S	625	6	104.2	117.9	0.0000
Error	31	36	0.9		
Total	2369	47			
c) Ast(n)					
Tiempo(D)	10209	3	3403	5087	0.0000
NaCl(S)	4294	2	2147	3209	0.0000
D × S	1149	6	191	286	0.0000
Error	24	36	1		
Total	15677	47			

Tabla A 1.29. Contenido de glucosa (Glu) expresados en mg glucosa g⁻¹ PF en hoja (h), raíz (r) y nódulo (n) de *M. sativa*

Tiempo (D)	NaCl (mM)	Glu(h)	Glu(r)	Glu(n)
	0	1.654 ^{ab}	0.899 ⁱ	0.784 ^f
42	100	1.194 ^c	0.843 ⁱ	2.106 ^c
	150	1.089 ^c	1.077 ^h	2.137 ^c
56	0	1.582 ^b	1.937 ^{bc}	0.774 ^f
	100	1.191 ^c	1.303 ^g	3.227 ^a
	150	0.733 ^d	1.792 ^{cde}	3.071 ^b
70	0	1.772 ^a	2.189 ^a	0.855 ^f
	100	0.762 ^d	1.669 ^{ef}	1.790 ^d
	150	0.284 ^e	1.768 ^{de}	2.196 ^c
84	0	0.857 ^d	1.555 ^f	0.989 ^f
	100	0.806 ^d	1.904 ^{bcd}	1.914 ^d
	150	0.752 ^d	2.006 ^b	1.835 ^d
MDS (P ≤ 0.05)		0.145	0.156	0.130

Tabla A 1.30. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Glu(h)					
Tiempo(D)	1.86	3	0.62	60.3	0.0000
NaCl(S)	4.63	2	2.31	225.1	0.0000
D × S	2.17	6	0.36	35.2	0.0000
Error	0.37	36	0.01		
Total	9.03	47			
b) Glu(r)					
Tiempo(D)	6.77	3	2.26	185.1	0.0000
NaCl(S)	0.53	2	0.26	21.8	0.0000
D × S	1.52	6	0.25	20.8	0.0000
Error	0.43	36	0.01		
Total	9.27	47			
c) Glu(n)					
Tiempo(D)	4.90	3	1.63	197	0.0000
NaCl(S)	21.95	2	10.97	1322	0.0000
D × S	3.79	6	0.63	76	0.0000
Error	0.29	36	0.01		
Total	30.95	47			

Tabla A 1.31. Contenido de trehalosa (Treh) expresados en mg trehalosa g⁻¹ PF en hoja (h), raíz (r) y nódulo (n) de *M. sativa*

Tiempo (D)	NaCl (mM)	Treh(h)	Treh(r)	Treh(n)
	0	1.933 ^a	0.090 ^e	0.105 ^g
42	100	1.847 ^a	0.064 ^{fg}	0.201 ^{de}
	150	1.353 ^b	0.100 ^{de}	0.190 ^e
56	0	1.285 ^{bc}	0.126 ^{bc}	0.165 ^f
	100	1.018 ^{de}	0.100 ^{de}	0.212 ^{cd}
	150	0.855 ^{ef}	0.139 ^b	0.229 ^c
70	0	0.569 ^g	0.115 ^{cd}	0.202 ^{de}
	100	0.687 ^{fg}	0.133 ^{bc}	0.293 ^b
	150	0.823 ^f	0.084 ^{ef}	0.212 ^{cd}
84	0	0.683 ^{fg}	0.049 ^g	0.287 ^b
	100	1.158 ^{cd}	0.116 ^{cd}	0.360 ^a
	150	1.051 ^d	0.167 ^a	0.365 ^a
MDS (P ≤ 0.05)		0.180	0.020	0.018

Tabla A 1.32. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Treh(h)					
Tiempo(D)	6.71	3	2.23	139.7	0.0000
NaCl(S)	0.20	2	0.10	6.2	0.0005
D × S	1.58	6	0.26	16.5	0.0000
Error	0.57	36	0.02		
Total	9.07	47			
b) Treh(r)					
Tiempo(D)	0.009	3	0.003	14.88	0.0000
NaCl(S)	0.006	2	0.003	15.64	0.0000
D × S	0.032	6	0.005	27.32	0.0000
Error	0.007	36	0.001		
Total	0.054	47			
c) Treh(n)					
Tiempo(D)	0.182	3	0.060	363.5	0.0000
NaCl(S)	0.052	2	0.025	154.4	0.0000
D × S	0.029	6	0.005	29.8	0.0000
Error	0.006	36	0.001		
Total	0.269	47			

Apéndice

Tabla A 2.1. Peso seco de planta (PSP), peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco raíz (PSR) en g planta⁻¹, y relación raíz/parte aérea (RPA) en plántulas de *P. vulgaris*

AS (mM)	NaCl (mM)	PSP	PSPA	PSR	RPA
	0	0.279 ^a	0.228 ^a	0.052 ^{ab}	0.227 ^b
0.0	100	0.186 ^d	0.130 ^e	0.056 ^{ab}	0.448 ^a
	150	0.130 ^e	0.089 ^f	0.040 ^b	0.450 ^a
0.1	0	0.192 ^d	0.139 ^e	0.053 ^{ab}	0.382 ^a
	100	0.217 ^{bcd}	0.148 ^{cde}	0.070 ^a	0.472 ^a
	150	0.233 ^{bc}	0.164 ^{bcd}	0.069 ^a	0.423 ^a
0.5	0	0.243 ^{ab}	0.176 ^b	0.067 ^a	0.383 ^a
	100	0.241 ^{bc}	0.169 ^{bc}	0.072 ^a	0.426 ^a
	150	0.205 ^{cd}	0.141 ^{de}	0.064 ^a	0.455 ^a
MDS (P ≤ 0.05)		0.037	0.024	0.020	0.127

Tabla A 2.2. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) PSP					
AS	0.006	2	0.003	4.45	0.0210
NaCl(S)	0.014	2	0.007	10.90	0.0000
AS x S	0.038	4	0.010	14.50	0.0000
Error	0.018	27	0.001		
Total	0.076	35			
b) PSPA					
AS	0.001	2	0.001	2.25	0.1243
NaCl(S)	0.015	2	0.007	27.05	0.0000
AS x S	0.029	4	0.007	26.61	0.0000
Error	0.007	27	0.000		
Total	0.053	35			
c) PSR					
AS	0.002	2	0.001	5.463	0.0102
NaCl(S)	0.001	2	0.000	1.402	0.2635
AS x S	0.001	4	0.000	0.954	0.4485
Error	0.006	27	0.000		
Total	0.009	35			
d) RPA					
AS	0.019	2	0.009	1.125	0.3394
NaCl(S)	0.106	2	0.053	6.275	0.0058
AS x S	0.052	4	0.013	1.541	0.2186
Error	0.228	27	0.008		
Total	0.405	35			

Tabla A 2.3. Actividad catalasa (CAT) en $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ PF min}^{-1}$ y guaiacol peroxidasa (POX) en $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ PF min}^{-1}$ en hoja de plántulas de *P. vulgaris*

AS (mM)	NaCl (mM)	CAT	POX
	0	738 ^a	3.89 ^f
0.0	100	738 ^a	10.78 ^d
	150	763 ^a	31.16 ^a
0.1	0	755 ^a	3.89 ^f
	100	624 ^{bc}	8.78 ^e
	150	705 ^{ab}	11.51 ^c
0.5	0	393 ^d	2.58 ^g
	100	601 ^c	8.64 ^e
	150	554 ^c	13.41 ^b
MDS ($P \leq 0.05$)		82	0.43

Tabla A 2.4. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) CAT					
AS	351359	2	175679	52.18	0.0000
NaCl(S)	12566	2	6283	1.86	0.1741
AS x S	119392	4	29848	8.86	0.0001
Error	90896	27	3367		
Total	574213	35			
b) GPX					
AS	408	2	204.2	2254	0.0000
NaCl(S)	1416	2	708.1	7817	0.0000
AS x S	547	4	136.8	1511	0.0000
Error	2	27	0.1		
Total	2374	35			

Apéndice

Tabla A 2.5. Actividad ascorbato peroxidasa (APX) expresada $\mu\text{mol asc g}^{-1} \text{PF min}^{-1}$, monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) en $\mu\text{mol NADH g}^{-1} \text{PF min}^{-1}$, glutation reductasa (GR) en $\mu\text{mol NADPH g}^{-1} \text{PF min}^{-1}$ y dehidroascorbato reductasa (DHAR) en $\mu\text{mol asc g}^{-1} \text{PF min}^{-1}$ en hoja de plántulas de *P. vulgaris*

AS (mM)	NaCl (mM)	APX	MDHAR	GR	DHAR
0.0	0	7.84 ^d	0.215 ^d	0.218 ^c	0.176 ^f
	100	10.94 ^b	0.253 ^c	0.309 ^d	0.478 ^d
	150	16.99 ^a	0.559 ^a	0.514 ^a	0.533 ^c
0.1	0	3.56 ^g	0.216 ^d	0.283 ^d	0.201 ^e
	100	6.71 ^e	0.197 ^d	0.296 ^d	0.582 ^b
	150	10.29 ^{bc}	0.202 ^d	0.472 ^b	0.638 ^a
0.5	0	5.05 ^f	0.169 ^e	0.168 ^f	0.203 ^e
	100	7.50 ^d	0.246 ^c	0.349 ^c	0.486 ^d
	150	9.63 ^c	0.276 ^b	0.372 ^c	0.573 ^b
MDS ($P \leq 0.05$)		0.76	0.020	0.032	0.018

Tabla A 2.6. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) APX					
AS	186.0	2	93.0	322.9	0.0000
NaCl(S)	281.5	2	140.8	488.6	0.0000
AS x S	24.7	4	6.2	21.5	0.0000
Error	7.8	27	0.3		
Total	500.0	35			
b) MDHAR					
AS	0.128	2	0.064	314.0	0.0000
NaCl(S)	0.140	2	0.070	344.4	0.0000
AS x S	0.169	4	0.042	207.3	0.0000
Error	0.005	27	0.000		
Total	0.442	35			
c) GR					
AS	0.022	2	0.011	20.9	0.0000
NaCl(S)	0.320	2	0.160	306.5	0.0000
AS x S	0.053	4	0.013	25.3	0.0000
Error	0.014	27	0.001		
Total	0.409	35			
d) DHAR					
AS	0.038	2	0.019	110	0.0000
NaCl(S)	1.034	2	0.517	3003	0.0000
AS x S	0.013	4	0.003	19	0.0000
Error	0.005	27	0.000		
Total	1.089	35			

Tabla A 2.7. Contenido de ascorbato reducido (AsA), dehidroascorbato (DHA) y ascorbato total (AsA+DHA) expresados en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PFN, y la relación ascorbato oxidado/ascorbato reducido (DHA/AsA) en hoja de plántulas de *P. vulgaris*

AS (mM)	NaCl (mM)	AsA	DHA	AsA+DHA	DHA/AsA
0.0	0	0.345 ^c	0.580 ^{cd}	0.925 ^f	1.696 ^{de}
	100	0.436 ^d	0.839 ^b	1.275 ^d	1.944 ^{cd}
	150	1.518 ^a	0.802 ^b	2.320 ^a	0.532 ^f
0.1	0	0.216 ^f	0.532 ^d	0.748 ^g	2.532 ^{ab}
	100	0.300 ^e	0.855 ^b	1.155 ^e	2.870 ^a
	150	0.539 ^c	0.859 ^b	1.398 ^c	1.611 ^{de}
0.5	0	0.225 ^f	0.652 ^c	0.877 ^f	2.911 ^a
	100	0.616 ^b	0.864 ^b	1.480 ^b	1.403 ^e
	150	0.455 ^d	1.032 ^a	1.486 ^b	2.288 ^{bc}
MDS ($P \leq 0.05$)		0.060	0.078	0.051	0.421

Tabla A 2.8. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) AsA					
AS	1.164	2	0.582	316.3	0.0000
NaCl(S)	2.062	2	1.031	560.4	0.0000
AS x S	1.876	4	0.469	255.0	0.0000
Error	0.050	27	0.002		
Total	5.151	35			
b) DHA					
AS	0.088	2	0.044	15.9	0.0000
NaCl(S)	0.672	2	0.336	120.3	0.0000
AS x S	0.057	4	0.014	5.1	0.0035
Error	0.075	27	0.003		
Total	0.892	35			
c) AsA+DHA					
AS	0.997	2	0.499	384	0.0000
NaCl(S)	4.699	2	2.349	1808	0.0000
AS x S	1.360	4	0.340	262	0.0000
Error	0.035	27	0.001		
Total	7.09	35			
d) DHA/AsA					
AS	6.287	2	3.143	36.04	0.0000
NaCl(S)	5.052	2	2.526	28.96	0.0000
AS x S	7.486	4	1.871	21.46	0.0000
Error	2.355	27	0.087		
Total	21.179	35			

Apéndice

Tabla A 2.9. Contenido de ascorbato reducido (AsA), dehidroascorbato (DHA) y ascorbato total (AsA+DHA) expresados en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PFN, y la relación ascorbato oxidado/ascorbato reducido (DHA/AsA) en raíz de plántulas de *P. vulgaris*

AS (mM)	NaCl (mM)	AsA	DHA	AsA+DHA	DHA/AsA
0.0	0	0.127 ^c	0.534 ^a	0.661 ^c	4.232 ^a
	100	0.118 ^c	0.534 ^a	0.652 ^c	4.584 ^a
	150	0.198 ^d	0.339 ^c	0.536 ^e	4.524 ^a
0.1	0	0.218 ^{cd}	0.420 ^b	0.639 ^c	1.935 ^{bc}
	100	0.345 ^a	0.298 ^{cd}	0.643 ^c	0.897 ^e
	150	0.195 ^d	0.200 ^e	0.395 ^f	1.025 ^e
0.5	0	0.252 ^c	0.580 ^a	0.832 ^a	2.308 ^b
	100	0.318 ^{ab}	0.389 ^b	0.707 ^b	1.253 ^{de}
	150	0.302 ^b	0.270 ^d	0.573 ^d	0.909 ^e
MDS ($P \leq 0.05$)		0.032	0.04	0.047	0.032

Tabla A 2.10. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) AsA					
AS	0.132	2	0.066	86.57	0.0000
NaCl(S)	0.023	2	0.011	14.83	0.0000
AS x S	0.054	4	0.014	17.79	0.0000
Error	0.021	27	0.001		
Total	0.230	35			
b) DHA					
AS	0.164	2	0.082	74.6	0.0000
NaCl(S)	0.353	2	0.176	160.0	0.0000
AS x S	0.042	4	0.010	9.4	0.0001
Error	0.030	27	0.001		
Total	0.588	35			
c) AsA+DHA					
AS	0.127	2	0.064	125.5	0.0000
NaCl(S)	0.292	2	0.146	288.2	0.0000
AS x S	0.041	4	0.010	20.4	0.0000
Error	0.014	27	0.001		
Total	0.475	35			
d) DHA/AsA					
AS	36.39	2	18.20	131.7	0.0000
NaCl(S)	15.87	2	7.94	57.4	0.0000
AS x S	10.41	4	2.60	18.8	0.0000
Error	3.73	27	0.14		
Total	66.40	35			

Tabla A 2.11. Contenido de glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG) y glutatión total (GSH+GSSG) expresados en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PFN, y la relación glutatión oxidado/glutatión reducido (GSSG/GSH) en hoja de plántulas de *P. vulgaris*

AS (mM)	NaCl (mM)	GSH	GSSG	GSH+ GSSG	GSSG/ GSH
	0	0.274 ^b	0.063 ^g	0.337 ^d	0.232 ^f
0.0	100	0.271 ^b	0.193 ^c	0.463 ^c	0.713 ^c
	150	0.733 ^a	0.417 ^a	1.150 ^a	0.572 ^d
0.1	0	0.085 ^{de}	0.046 ^h	0.131 ^g	0.543 ^d
	100	0.175 ^c	0.114 ^f	0.289 ^e	0.651 ^c
	150	0.121 ^d	0.123 ^e	0.243 ^f	1.024 ^a
0.5	0	0.066 ^e	0.030 ⁱ	0.096 ^g	0.460 ^e
	100	0.292 ^b	0.144 ^d	0.436 ^c	0.494 ^{de}
	150	0.295 ^b	0.256 ^b	0.552 ^b	0.873 ^b
MDS ($P \leq 0.05$)		0.036	0.004	0.035	0.078

Tabla A 2.12 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) GSH					
AS	0.563	2	0.282	442.9	0.0000
NaCl(S)	0.352	2	0.176	277.0	0.0000
AS x S	0.369	4	0.092	145.1	0.0000
Error	0.017	27	0.001		
Total	1.301	35			
b) GSSG					
AS	0.103	2	0.052	4608	0.0000
NaCl(S)	0.288	2	0.144	12848	0.0000
AS x S	0.085	4	0.021	1895	0.0000
Error	0.000	27	0.000		
Total	0.476	35			
c) GSH+GSSG					
AS	1.147	2	0.574	888.0	0.0000
NaCl(S)	1.276	2	0.638	988.0	0.0000
AS x S	0.757	4	0.189	293.0	0.0000
Error	0.017	27	0.001		
Total	3.198	35			
d) GSSG/GSH					
AS	0.329	2	0.165	59.6	0.0000
NaCl(S)	1.015	2	0.508	183.7	0.0000
AS x S	0.404	4	0.101	36.5	0.0000
Error	0.075	27	0.003		
Total	1.823	35			

Apéndice

Tabla A 2.13. Contenido de glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG) y glutatión total (GSH+GSSG) expresados en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PFN, y la relación glutatión oxidado/glutatión reducido (GSSG/GSH) en raíz de plántulas de *P. vulgaris*

AS (mM)	NaCl (mM)	GSH	GSSG	GSH+ GSSG	GSSG/ GSH
	0	0.156 ^a	0.086 ^g	0.242 ^c	0.556 ^c
0.0	100	0.122 ^b	0.111 ^e	0.233 ^{cd}	0.917 ^d
	150	0.109 ^c	0.100 ^f	0.209 ^e	0.930 ^{cd}
0.1	0	0.124 ^b	0.083 ^g	0.207 ^e	0.670 ^c
	100	0.109 ^c	0.118 ^d	0.227 ^d	1.086 ^b
	150	0.124 ^b	0.133 ^b	0.257 ^b	1.084 ^b
0.5	0	0.092 ^d	0.134 ^b	0.226 ^d	1.454 ^a
	100	0.129 ^b	0.142 ^a	0.271 ^a	1.101 ^b
	150	0.118 ^{bc}	0.124 ^c	0.242 ^c	1.056 ^{bc}
MDS ($P \leq 0.05$)		0.012	0.004	0.010	0.127

Tabla A 2.14 Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) GSH					
AS	0.002	2	0.001	10.81	0.0004
NaCl(S)	0.000	2	0.000	2.28	0.1221
AS x S	0.008	4	0.002	28.09	0.0000
Error	0.002	27	0.000		
Total	0.012	35			
b) GSSG					
AS	0.007	2	0.004	330.0	0.0000
NaCl(S)	0.004	2	0.002	162.8	0.0000
AS x S	0.004	4	0.001	86.8	0.0000
Error	0.000	27	0.000		
Total	0.015	35			
c) GSH+GSSG					
AS	0.002	2	0.001	24.08	0.0000
NaCl(S)	0.002	2	0.001	20.86	0.0000
AS x S	0.009	4	0.002	46.96	0.0000
Error	0.001	27	0.000		
Total	0.015	35			
d) GSSG/GSH					
AS	0.998	2	0.499	64.49	0.0000
NaCl(S)	0.148	2	0.074	9.53	0.0007
AS x S	1.051	4	0.263	33.96	0.0000
Error	0.209	27	0.008		
Total	2.406	35			

Tabla A 2.15. Contenido de aminoácidos libres totales (Aa) expresados en mg asparragina g⁻¹ PF, prolina (Pro) en mg prolina g⁻¹ PF y azúcares solubles totales (Ast) expresados en mg glucosa g⁻¹ PF en hoja de plántulas de *P. vulgaris*

AS (mM)	NaCl (mM)	Aa	Pro	Ast
	0	6.32 ^a	0.036 ^c	8.40 ^g
0.0	100	5.72 ^b	0.060 ^d	11.87 ^d
	150	6.42 ^a	0.258 ^a	16.72 ^a
	0	4.26 ^d	0.015 ^g	8.78 ^f
0.1	100	4.59 ^c	0.033 ^e	9.94 ^c
	150	3.24 ^e	0.071 ^c	14.33 ^b
	0	3.20 ^e	0.026 ^f	8.69 ^f
0.5	100	1.74 ^f	0.035 ^e	9.96 ^c
	150	3.98 ^d	0.083 ^b	12.20 ^c
MDS (P ≤ 0.05)		0.32	0.004	0.18

Tabla A 2.16. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Aa					
AS	62.91	2	31.45	625.3	0.0000
NaCl(S)	2.46	2	1.23	24.4	0.0000
AS x S	13.10	4	3.28	65.1	0.0000
Error	1.36	27	0.05		
Total	79.82	35			
b) Pro					
AS	0.044	2	0.022	2253	0.0000
NaCl(S)	0.087	2	0.044	4461	0.0000
AS x S	0.046	4	0.011	1172	0.0000
Error	0.000	27	0.000		
Total	0.178	35			
c) Ast					
AS	25.8	2	12.9	773	0.0000
NaCl(S)	208.0	2	104.0	6245	0.0000
AS x S	25.3	4	6.3	380	0.0000
Error	0.5	27	0.0		
Total	259.5	35			

Apéndice

Tabla A 2.17. Contenido de aminoácidos libres totales (Aa) expresados en mg asparragina g⁻¹ PF, prolina (Pro) en mg prolina g⁻¹ PF y azúcares solubles totales (Ast) expresados en mg glucosa g⁻¹ PF en raíz de plántulas de *P. vulgaris*

AS (mM)	NaCl (mM)	Aa	Pro	Ast
	0	5.59 ^a	0.057 ^b	2.83 ^d
0.0	100	5.37 ^a	0.059 ^b	3.44 ^b
	150	3.56 ^b	0.066 ^a	2.00 ^g
0.1	0	2.95 ^{bc}	0.027 ^{ef}	2.52 ^e
	100	3.14 ^b	0.028 ^{ef}	1.63 ^b
	150	2.15 ^{cd}	0.047 ^c	4.05 ^a
0.5	0	1.67 ^d	0.024 ^f	3.13 ^c
	100	3.18 ^b	0.031 ^e	2.18 ^f
	150	1.86 ^d	0.041 ^d	2.56 ^e
MDS (P ≤ 0.05)		0.83	0.004	0.24

Tabla A 2.18. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Aa					
AS	45.65	2	22.82	66.55	0.0000
NaCl(S)	11.59	2	5.79	16.90	0.0000
AS x S	5.95	4	1.49	4.34	0.0077
Error	9.26	27	0.34		
Total	72.44	35			
b) Pro					
AS	0.006	2	0.003	289.3	0.0000
NaCl(S)	0.002	2	0.001	74.7	0.0000
AS x S	0.000	4	0.000	5.3	0.0028
Error	0.000	27	0.000		
Total	0.008	35			
c) Ast					
AS	0.13	2	0.063	2.1	0.1394
NaCl(S)	1.49	2	0.744	24.9	0.0000
AS x S	16.54	4	4.134	138.5	0.0000
Error	0.81	27	0.030		
Total	18.95	35			

Tabla A 2.19. Contenido de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) expresado en nmol MDA g⁻¹ PF y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en μmol g⁻¹ PF en hoja(h) y raíz(r) de plántulas de *P. vulgaris*

AS (mM)	NaCl (mM)	TBARS(h)	TBARS(r)	H ₂ O ₂ (h)	H ₂ O ₂ (r)
	0	25.91 ^c	8.52 ^d	0.449 ^g	0.084 ^e
0.0	100	32.15 ^c	8.35 ^d	0.624 ^c	0.316 ^{bc}
	150	45.99 ^a	9.20 ^d	0.943 ^a	0.308 ^c
0.1	0	27.00 ^{de}	15.44 ^{ab}	0.544 ^c	0.227 ^d
	100	28.69 ^d	14.60 ^{bc}	0.297 ⁱ	0.217 ^d
	150	22.62 ^f	15.78 ^a	0.362 ^h	0.235 ^d
0.5	0	28.78 ^d	13.67 ^c	0.590 ^d	0.337 ^b
	100	35.61 ^b	8.52 ^d	0.498 ^f	0.419 ^a
	150	37.13 ^b	7.09 ^e	0.719 ^b	0.417 ^a
MDS (P ≤ 0.05)		2.70	1.14	0.029	0.027

Tabla A 2.20. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) TBARS(h)					
AS	537	2	268.3	74.79	0.0000
NaCl(S)	392	2	196.2	54.68	0.0000
AS x S	690	4	172.5	48.09	0.0000
Error	97	27	3.6		
Total	1716	35			
b) TBARS(r)					
AS	299.5	2	149.7	232.5	0.0000
NaCl(S)	30.8	2	15.4	23.9	0.0000
AS x S	69.6	4	17.4	27.0	0.0000
Error	17.4	27	0.6		
Total	417.3	35			
c) H ₂ O ₂ (h)					
AS	0.475	2	0.238	565.0	0.0000
NaCl(S)	0.261	2	0.130	309.7	0.0000
AS x S	0.471	4	0.118	279.8	0.0000
Error	0.011	27	0.000		
Total	1.218	35			
d) H ₂ O ₂ (r)					
AS	0.205	2	0.102	280.2	0.0000
NaCl(S)	0.085	2	0.042	116.0	0.0000
AS x S	0.072	4	0.018	49.4	0.0000
Error	0.010	27	0.000		
Total	0.372	35			

Apéndice

Tabla A 2.21. Contenido de ácido salicílico libre endógeno (AS) expresado en ng g⁻¹ PF en hoja(h) y raíz(r) de plántulas de *P. vulgaris*

AS (mM)	NaCl (mM)	AS(h)	AS(r)
	0	71.47 ^{bc}	17.42 ^{ef}
0.0	100	62.77 ^{cd}	7.15 ^{fg}
	150	54.21 ^{cde}	5.83 ^g
0.1	0	91.63 ^b	100.20 ^d
	100	48.71 ^{de}	27.77 ^e
	150	40.35 ^e	17.36 ^{ef}
0.5	0	509.04 ^a	845.97 ^a
	100	66.14 ^{cd}	408.99 ^b
	150	63.25 ^{cd}	244.66 ^c
MDS (P ≤ 0.05)		21.75	10.83

Tabla A 2.22. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) AS(h)					
AS	183148	2	91574	395.2	0.0000
NaCl(S)	226425	2	113212	488.6	0.0000
AS x S	306737	4	76684	330.9	0.0000
Error	6257	27	232		
Total	722566	35			
b) AS(r)					
AS	1780414	2	890207	15472	0.0000
NaCl(S)	348932	2	174466	3032	0.0000
AS x S	440361	4	110090	1913	0.0000
Error	1554	27	58		
Total	2571261	35			

Tabla A 3.1. Peso seco de planta (PSP), peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco raíz (PSR) en g planta⁻¹, y relación raíz/parte aérea (RPA) en plantas de *P. vulgaris*

Tiempo (D)	AS (mM)	NaCl (mM)	PSP	PSPA	PSR	RPA
3	0	0	3.47 ^a	1.63 ^{cde}	1.70 ^a	1.041 ^a
		100	2.07 ^f	1.24 ^f	0.72 ^{def}	0.592 ^{bc}
	0.1	0	2.86 ^b	1.63 ^{cde}	1.14 ^b	0.696 ^b
		100	2.70 ^{bc}	1.63 ^{cde}	0.96 ^c	0.594 ^{bc}
6	0.5	0	2.71 ^{bc}	1.80 ^{bc}	0.78 ^{dc}	0.434 ^{de}
		100	2.33 ^e	1.60 ^{de}	0.60 ^f	0.375 ^{de}
	0	0	3.61 ^a	2.18 ^a	1.30 ^b	0.598 ^{bc}
		100	2.43 ^{de}	1.46 ^e	0.85 ^{cd}	0.589 ^{bc}
MDS (P ≤ 0.05)	0.1	0	2.67 ^{bcd}	1.87 ^b	0.66 ^{ef}	0.356 ^e
		100	2.57 ^{cde}	1.84 ^b	0.60 ^f	0.328 ^e
	0.5	0	2.57 ^{cde}	1.70 ^{bcd}	0.75 ^{def}	0.445 ^{de}
		100	2.55 ^{cde}	1.63 ^{cde}	0.79 ^{cde}	0.490 ^{cd}

Tabla A 3.2. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) PSP					
Tiempo(D)	0.020	1	0.020	0.60	0.4450
AS	0.999	2	0.500	14.75	0.0000
NaCl(S)	3.487	1	3.487	102.98	0.0000
D x AS	0.345	2	0.172	5.09	0.0113
D x S	0.137	1	0.137	4.04	0.0521
AS x S	3.336	2	1.668	49.27	0.0000
D x AS x S	0.045	2	0.023	0.67	0.5196
Error	1.219	36	0.034		
Total	9.587	47			
b) PSPA					
Tiempo(D)	0.427	1	0.427	27.26	0.0000
AS	0.102	2	0.051	3.26	0.0500
NaCl(S)	0.674	1	0.674	43.06	0.0000
D x AS	0.371	2	0.186	11.86	0.0001
D x S	0.018	1	0.018	1.12	0.2969
AS x S	0.647	2	0.323	20.65	0.0000
D x AS x S	0.114	2	0.057	3.63	0.0366
Error	0.564	36	0.016		
Total	2.915	47			
c) PSR					
Tiempo(D)	0.303	1	0.303	21.20	0.0000
AS	1.445	2	0.722	50.62	0.0000

Apéndice

NaCl(S)	1.083	1	1.083	75.91	0.0000
D x AS	0.514	2	0.257	18.02	0.0000
D x S	0.254	1	0.254	17.80	0.0002
AS x S	1.017	2	0.508	35.62	0.0000
D x AS x S	0.090	2	0.045	3.16	0.0545
Error	0.514	36	0.014		
Total	5.220	47			
d) RPA					
Tiempo(D)	0.286	1	0.286	42.48	0.0000
AS	0.644	2	0.322	47.87	0.0000
NaCl(S)	0.121	1	0.121	17.93	0.0002
D x AS	0.296	2	0.148	22.01	0.0000
D x S	0.128	1	0.128	19.04	0.0001
AS x S	0.106	2	0.053	7.90	0.0014
D x AS x S	0.083	2	0.041	6.14	0.0051
Error	0.242	36	0.007		
Total	1.905	47			

Tabla A 3.3. 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 $\mu\text{mol de N}_2 \text{ g}^{-1} \text{ PSN h}^{-1}$, peso seco de nódulos (PSN) en mg planta^{-1} y peso normalizado de nódulos (PNN) en $\text{mg PSN mg}^{-1} \text{ PSPA}$ en *P. vulgaris*

Tiempo (D)	AS (mM)	NaCl (mM)	ANA	ANT	TFN	PSN	PNN
	0	0	97.62 ^a	272 ^a	58.13 ^{abc}	0.136 ^{ab}	0.083 ^{ab}
		100	43.09 ^b	160 ^{cde}	39.16 ^{cd}	0.105 ^d	0.085 ^a
3	0.1	0	41.81 ^b	184 ^{bcd}	47.71 ^{bcd}	0.127 ^{abc}	0.050 ^e
		100	28.97 ^{cd}	178 ^{bcd}	49.78 ^{abcd}	0.128 ^{abc}	0.067 ^{cd}
	0.5	0	34.83 ^{bc}	132 ^{de}	32.54 ^d	0.082 ^e	0.070 ^{bcd}
		100	10.57 ^e	108 ^{ef}	32.65 ^d	0.109 ^{cd}	0.080 ^{abc}
6	0	0	33.11 ^{bc}	239 ^{ab}	68.83 ^a	0.120 ^{bcd}	0.056 ^{de}
		100	19.76 ^{de}	119 ^{de}	33.25 ^d	0.123 ^{abcd}	0.084 ^{ab}
	0.1	0	39.70 ^{bc}	221 ^{abc}	60.70 ^{ab}	0.142 ^a	0.077 ^{abc}
		100	17.89 ^{de}	107 ^{ef}	29.70 ^{de}	0.128 ^{abc}	0.070 ^{bcd}
	0.5	0	39.43 ^{bc}	174 ^{bcd}	44.97 ^{bcd}	0.118 ^{bcd}	0.070 ^{bcd}
		100	13.08 ^e	45 ^f	10.90 ^e	0.123 ^{abcd}	0.075 ^{abc}
MDS ($P \leq 0.05$)			12.71	67	20.90	0.020	0.014

Tabla A 3.4. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) ANA					
Tiempo(D)	2939	1	2939	37.11	0.0000

AS	4778	2	2389	30.16	0.0000
NaCl(S)	7818	1	7818	98.70	0.0000
D x AS	5002	2	2501	31.57	0.0000
D x S	303	1	303	3.82	0.0585
AS x S	552	2	276	3.49	0.0413
D x AS x S	1478	2	739	9.33	0.0005
Error	2852	36	79		
Total	25721	47			
b) ANT					
Tiempo(D)	5527	1	5527	2.49	0.1236
AS	57520	2	28760	12.94	0.0001
NaCl(S)	85167	1	85167	38.31	0.0000
D x AS	1493	2	746	0.34	0.7170
D x S	16349	1	16349	7.35	0.0102
AS x S	6448	2	3224	1.45	0.2479
D x AS x S	6378	2	3189	1.44	0.2515
Error	80028	36	2223		
Total	258910	47			
c) TFN					
Tiempo(D)	45	1	45	0.21	0.6493
AS	3577	2	1788	8.36	0.0010
NaCl(S)	4598	1	4598	21.48	0.0000
D x AS	115	2	58	0.27	0.7658
D x S	2344	1	2344	10.95	0.0021
AS x S	369	2	184	0.86	0.4309
D x AS x S	194	2	97	0.45	0.6395
Error	7705	36	214		
Total	18946	47			
d) PSN					
Tiempo(D)	0.0015	1	0.0015	7.68	0.0088
AS	0.0006	2	0.0003	1.53	0.2314
NaCl(S)	0.0000	1	0.0000	0.16	0.6954
D x AS	0.0050	2	0.0025	12.68	0.0001
D x S	0.0000	1	0.0000	0.02	0.8934
AS x S	0.0010	2	0.0005	2.52	0.0949
D x AS x S	0.0028	2	0.0014	7.07	0.0026
Error	0.0071	36	0.0002		
Total	0.0180	47			
e) PNN					
Tiempo(D)	0.0000	1	0.0000	0.08	0.7813
AS	0.0011	2	0.0005	5.33	0.0094
NaCl(S)	0.0010	1	0.0010	10.48	0.0026
D x AS	0.0017	2	0.0008	8.43	0.0010
D x S	0.0000	1	0.0000	0.01	0.9134
AS x S	0.0002	2	0.0001	1.13	0.3339
D x AS x S	0.0013	2	0.0007	6.59	0.0036
Error	0.0036	36	0.0001		
Total	0.0089	47			

Tabla A 3.5. Actividad superóxido dismutasa (SOD) expresada U mg⁻¹ prot, catalasa (CAT) en µmol H₂O₂ mg⁻¹ prot min⁻¹, guaiacol peroxidasa (POX) en µmol H₂O₂ mg⁻¹ prot min⁻¹ y actividad lipoxigenasa (LOX) en µmol mg⁻¹ prot min⁻¹ en nódulos de *P. vulgaris*

Tiempo (D)	AS (mM)	AS (mM)	SOD	CAT	POX	LOX
3	0	0	0.0524 ^a	104.77 ^a	1.55 ^g	1.79 ^{cd}
			0.0562 ^a	38.15 ^g	1.56 ^{fg}	2.11 ^b
	0.1	0.1	0.0431 ^{bc}	70.52 ^{cd}	1.83 ^d	1.70 ^{de}
			0.0366 ^{cd}	52.05 ^e	1.83 ^d	2.33 ^a
	0.5	0.5	0.0410 ^c	69.46 ^d	1.61 ^{fg}	1.35 ^g
			0.0269 ^e	45.76 ^f	1.69 ^e	1.81 ^c
6	0	0	0.0331 ^{de}	73.73 ^c	1.37 ^h	1.52 ^f
			0.0560 ^a	44.67 ^f	1.78 ^d	2.32 ^a
	0.1	0.1	0.0416 ^c	67.92 ^d	1.63 ^{ef}	1.62 ^{ef}
			0.0513 ^a	68.45 ^d	2.07 ^c	2.09 ^b
	0.5	0.5	0.0373 ^{cd}	79.46 ^b	2.19 ^b	1.15 ^h
			0.0496 ^{ab}	46.31 ^f	2.34 ^a	1.58 ^f
MDS (P ≤ 0.05)			0.0078	3.61	0.07	0.10

Tabla A 3.6. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) SOD					
Tiempo(D)	0.0001	1	0.0001	3.50	0.0696
AS	0.0008	2	0.0004	15.37	0.0000
NaCl(S)	0.0002	1	0.0002	7.79	0.0083
D x AS	0.0007	2	0.0004	13.76	0.0000
D x S	0.0014	1	0.0014	56.39	0.0000
AS x S	0.0004	2	0.0002	6.87	0.0030
D x AS x S	0.0001	2	0.0000	1.04	0.3628
Error	0.0009	36	0.0000		
Total	0.0045	47			
b) CAT					
Tiempo(D)	1278	1	1278	200	0.0000
AS	247	2	123	19	0.0000
NaCl(S)	9687	1	9687	1515	0.0000
D x AS	435	2	217	34	0.0000
D x S	75	1	75	12	0.0016
AS x S	3021	2	1511	236	0.0000
D x AS x S	978	2	489	76	0.0000
Error	230	36	6		
Total	15950	47			

c) POX					
Tiempo(D)	0.569	1	0.569	185.6	0.0000
AS	1.280	2	0.640	208.5	0.0000
NaCl(S)	0.393	1	0.393	128.2	0.0000
D x AS	0.933	2	0.466	152.0	0.0000
D x S	0.272	1	0.272	88.7	0.0000
AS x S	0.025	2	0.012	4.0	0.0263
D x AS x S	0.080	2	0.040	13.1	0.0001
Error	0.110	36	0.003		
Total	3.663	47			
d) LOX					
Tiempo(D)	0.219	1	0.219	43.4	0.0000
AS	0.577	2	0.289	57.1	0.0000
NaCl(S)	3.204	1	3.204	633.7	0.0000
D x AS	1.753	2	0.877	173.4	0.0000
D x S	0.029	1	0.029	5.7	0.0222
AS x S	0.017	2	0.008	1.6	0.2094
D x AS x S	0.239	2	0.12	23.7	0.0000
Error	0.182	36	0.005		
Total	6.221	47			

Tabla A 3.7. Actividad superóxido dismutasa (SOD) expresada U g⁻¹ PFN, catalasa (CAT) en µmol H₂O₂ g⁻¹ PFN min⁻¹, guaiacol peroxidasa (POX) en µmol H₂O₂ g⁻¹ PFN min⁻¹ y actividad lipoxigenasa (LOX) en µmol g⁻¹ PFN min⁻¹ en nódulos de *P. vulgaris*

Tiempo (D)	AS (mM)	NaCl (mM)	SOD	CAT	POX	LOX	
	0	0	5.33 ^{ab}	2108 ^d	31.65 ^{fg}	38.18 ^c	
		100	4.68 ^{bcd}	1721 ^f	29.44 ^h	34.80 ^d	
	3	0.1	0	4.20 ^d	2375 ^c	35.79 ^e	33.18 ^c
			100	3.42 ^e	3158 ^a	39.32 ^d	34.46 ^c
	0.5	0	4.67 ^{bcd}	2725 ^b	36.77 ^c	37.00 ^c	
		100	2.41 ^f	2820 ^b	30.53 ^{gh}	38.26 ^c	
	6	0	0	4.58 ^{cd}	2313 ^c	32.22 ^f	31.02 ^d
			100	5.75 ^a	2100 ^d	43.42 ^c	43.68 ^a
	0.1	0	5.71 ^a	1931 ^{ef}	36.62 ^e	42.84 ^{ab}	
		100	5.80 ^a	2099 ^d	31.58 ^{fg}	40.84 ^b	
	0.5	0	4.44 ^d	1830 ^{ef}	45.45 ^b	26.40 ^f	
		100	5.29 ^{abc}	1942 ^e	50.75 ^a	28.58 ^e	
MDS (P ≤ 0.05)			0.70	113	1.66	2.07	

Tabla 3.8. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) SOD					
Tiempo(D)	15.74	1	15.74	63.91	0.0000
AS	6.42	2	3.21	13.04	0.0001
NaCl(S)	0.84	1	0.84	3.40	0.0735
D x AS	6.52	2	3.26	13.24	0.0000
D x S	11.21	1	11.21	45.52	0.0000
AS x S	1.90	2	0.95	3.86	0.0303
D x AS x S	2.48	2	1.24	5.04	0.0118
Error	8.87	36	0.25		
Total	53.98	47			
b) CAT					
Tiempo(D)	2416217	1	2416217	382.5	0.0000
AS	986328	2	493164	78.1	0.0000
NaCl(S)	103571	1	103571	16.4	0.0003
D x AS	3329625	2	1664813	263.5	0.0000
D x S	60144	1	60144	9.5	0.0039
AS x S	1202933	2	601467	95.2	0.0000
D x AS x S	349590	2	174795	27.7	0.0000
Error	227437	36	6318		
Total	8675845	47			
c) POX					
Tiempo(D)	445	1	445.1	328.1	0.0000
AS	389	2	194.6	143.4	0.0000
NaCl(S)	14	1	14.3	10.5	0.0026
D x AS	650	2	325.1	239.6	0.0000
D x S	90	1	89.6	66.0	0.0000
AS x S	70	2	34.8	25.7	0.0000
D x AS x S	297	2	148.6	109.5	0.0000
Error	49	36	1.4		
Total	2004	47			
d) LOX					
Tiempo(D)	2	1	2.1	1.0	0.3244
AS	254	2	127.0	59.9	0.0000
NaCl(S)	48	1	48.0	22.6	0.0000
D x AS	669	2	334.7	157.8	0.0000
D x S	62	1	62.4	29.4	0.0000
AS x S	50	2	25.2	11.9	0.0001
D x AS x S	207	2	103.3	48.7	0.0000
Error	76	36	2.1		
Total	1,369	47			

Tabla A 3.9. Actividad ascorbato peroxidasa (APX) expresada $\mu\text{mol asc mg}^{-1} \text{prot min}^{-1}$, monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) en $\mu\text{mol NADH mg}^{-1} \text{prot min}^{-1}$, glutation reductasa (GR) en $\mu\text{mol NADPH mg}^{-1} \text{prot min}^{-1}$ y dehidroascorbato reductasa (DHAR) en $\mu\text{mol asc mg}^{-1} \text{prot min}^{-1}$ en nódulos de *P. vulgaris*

Tiempo (D)	AS (mM)	NaCl (mM)	APX	MDHAR	GR	DHAR
3	0	0	0.805 ^a	0.0180 ^c	0.0156 ^{fg}	0.0025 ^g
		100	0.559 ^c	0.0144 ^f	0.0201 ^c	0.0059 ^a
	0.1	0	0.706 ^b	0.0137 ^f	0.0175 ^e	0.0032 ^{ef}
		100	0.314 ^g	0.0144 ^f	0.0232 ^a	0.0037 ^d
	0.5	0	0.392 ^f	0.0210 ^b	0.0193 ^d	0.0028 ^{fg}
		100	0.218 ⁱ	0.0231 ^a	0.0238 ^a	0.0042 ^c
6	0	0	0.499 ^d	0.0168 ^{de}	0.0123 ⁱ	0.0018 ^h
		100	0.414 ^{ef}	0.0160 ^c	0.0141 ^h	0.0028 ^{fg}
	0.1	0	0.422 ^c	0.0165 ^c	0.0152 ^g	0.0038 ^{cd}
		100	0.405 ^{ef}	0.0179 ^{cd}	0.0209 ^b	0.0050 ^b
	0.5	0	0.274 ^h	0.0167 ^c	0.0150 ^g	0.0027 ^g
		100	0.251 ^h	0.0168 ^{de}	0.0161 ^f	0.0034 ^{de}
MDS ($P \leq 0.05$)			0.028	0.0011	0.0006	0.0004

Tabla A 3.10. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) APX					
Tiempo(D)	0.1770	1	0.1770	433.0	0.0000
AS	0.6666	2	0.3333	815.3	0.0000
NaCl(S)	0.2922	1	0.2922	714.7	0.0000
D x AS	0.0705	2	0.0352	86.2	0.0000
D x S	0.1572	1	0.1572	384.5	0.0000
AS x S	0.0230	2	0.0115	28.2	0.0000
D x AS x S	0.0322	2	0.0161	39.4	0.0000
Error	0.0147	36	0.0004		
Total	1.4334	47			
b) MDHAR					
Tiempo(D)	0.00000	1	0.00000	8.8	0.0054
AS	0.00010	2	0.00010	117.4	0.0000
NaCl(S)	0.00000	1	0.00000	0.0	0.9421
D x AS	0.00010	2	0.00010	131.4	0.0000
D x S	0.00000	1	0.00000	1.2	0.2830
AS x S	0.00000	2	0.00000	26.9	0.0000
D x AS x S	0.00000	2	0.00000	11.1	0.0002
Error	0.00000	36	0.00000		

Apéndice

Total	0.00030	47			
c) GR					
Tiempo(D)	0.00022	1	0.00022	1149	0.0000
AS	0.00012	2	0.00006	320	0.0000
NaCl(S)	0.00018	1	0.00018	925	0.0000
D x AS	0.00003	2	0.00001	71	0.0000
D x S	0.00001	1	0.00001	64	0.0000
AS x S	0.00002	2	0.00001	49	0.0000
D x AS x S	0.00001	2	0.00000	16	0.0000
Error	0.00001	36	0.00000		
Total	0.00060	47			
d) DHAR					
Tiempo(D)	0.00000	1	0.00000	30.7	0.0000
AS	0.00000	2	0.00000	28.9	0.0000
NaCl(S)	0.00002	1	0.00002	291.4	0.0000
D x AS	0.00002	2	0.00001	101.2	0.0000
D x S	0.00000	1	0.00000	24.0	0.0000
AS x S	0.00000	2	0.00000	26.1	0.0000
D x AS x S	0.00000	2	0.00000	30.6	0.0000
Error	0.00000	36	0.00000		
Total	0.00006	47			

Tabla A 3.11. Actividad ascorbato peroxidasa (APX) expresada $\mu\text{mol asc g}^{-1} \text{PFN min}^{-1}$, monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) en $\mu\text{mol NADH g}^{-1} \text{PFN min}^{-1}$, glutation reductasa (GR) en $\mu\text{mol NADPH g}^{-1} \text{PFN min}^{-1}$ y dehidroascorbato reductasa (DHAR) en $\mu\text{mol asc g}^{-1} \text{PFN min}^{-1}$ en nódulos de *P. vulgaris*

Tiempo (D)	AS (mM)	NaCl (mM)	APX	MDHAR	GR	DHAR
3	0	0	16.36 ^a	0.367 ^{def}	0.506 ^b	0.0800 ^{cd}
		100	10.52 ^d	0.270 ^g	0.491 ^c	0.1434 ^a
	0.1	0	13.78 ^b	0.267 ^g	0.433 ^d	0.1000 ^b
		100	8.29 ^f	0.381 ^{cde}	0.614 ^a	0.0623 ^e
6	0.5	0	8.92 ^e	0.477 ^a	0.440 ^d	0.0643 ^c
		100	3.92 ⁱ	0.416 ^b	0.428 ^d	0.0751 ^d
	0	0	11.67 ^c	0.394 ^{bc}	0.287 ^h	0.0420 ^f
		100	10.07 ^d	0.389 ^{cd}	0.300 ^{gh}	0.0594 ^e
0.1	0	9.43 ^e	0.368 ^{def}	0.341 ^e	0.0843 ^c	
	100	6.17 ^g	0.273 ^g	0.318 ^f	0.0763 ^{cd}	
0.5	0	5.68 ^{gh}	0.347 ^f	0.311 ^{fg}	0.0563 ^c	
	100	5.43 ^h	0.364 ^{ef}	0.333 ^e	0.0746 ^d	
MDS ($P \leq 0.05$)			0.61	0.024	0.013	0.0090

Tabla A 3.12. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) APX					
Tiempo(D)	59.3	1	59.3	327.5	0.0000
AS	305.6	2	152.8	843.5	0.0000
NaCl(S)	153.2	1	153.2	845.9	0.0000
D x AS	12.0	2	6.0	33.0	0.0000
D x S	42.0	1	42.0	231.7	0.0000
AS x S	6.3	2	3.1	17.3	0.0000
D x AS x S	3.6	2	1.8	9.8	0.0004
Error	6.5	36	0.2		
Total	588.4	47			
b) MDHAR					
Tiempo(D)	0.0006	1	0.0006	2.3	0.1366
AS	0.0503	2	0.0252	92.9	0.0000
NaCl(S)	0.0054	1	0.0054	19.8	0.0001
D x AS	0.0543	2	0.0271	100.2	0.0000
D x S	0.0005	1	0.0005	2.0	0.1672
AS x S	0.0072	2	0.0036	13.4	0.0000
D x AS x S	0.0577	2	0.0288	106.4	0.0000
Error	0.0098	36	0.0003		
Total	0.1859	47			
c) GR					
Tiempo(D)	0.3483	1	0.3483	3,988	0.0000
AS	0.0192	2	0.0096	110	0.0000
NaCl(S)	0.0091	1	0.0091	105	0.0000
D x AS	0.0205	2	0.0103	117	0.0000
D x S	0.0066	1	0.0066	75	0.0000
AS x S	0.0159	2	0.0079	91	0.0000
D x AS x S	0.0362	2	0.0181	207	0.0000
Error	0.0031	36	0.0001		
Total	0.4590	47			
d) DHAR					
Tiempo(D)	0.0058	1	0.0058	162.7	0.0000
AS	0.0019	2	0.0010	26.7	0.0000
NaCl(S)	0.0014	1	0.0014	38.4	0.0000
D x AS	0.0091	2	0.0046	127.3	0.0000
D x S	0.0000	1	0.0000	0.7	0.3988
AS x S	0.0081	2	0.0041	112.9	0.0000
D x AS x S	0.0030	2	0.0015	42.2	0.0000
Error	0.0013	36	0.0000		
Total	0.0307	47			

Tabla A 3.13. Contenido de ascorbato reducido (AsA), dehidroascorbato (DHA) y ascorbato total (AsA+DHA) expresados en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PFN, y la relación ascorbato oxidado/ascorbato reducido (DHA/AsA) en nódulos de *P. vulgaris*

Tiempo (D)	AS (mM)	NaCl (mM)	AsA	DHA	AsA+DHA	DHA/AsA
3	0	0	0.730 ^{cd}	0.323 ^{dc}	1.052 ^c	0.442 ^{fg}
		100	0.668 ^{de}	0.386 ^d	1.055 ^c	0.581 ^{ef}
	0.1	0	0.868 ^a	0.241 ^c	1.109 ^c	0.279 ^g
		100	0.718 ^{cd}	0.334 ^{de}	1.052 ^c	0.470 ^{fg}
6	0.5	0	0.452 ^g	0.648 ^{bc}	1.100 ^c	1.441 ^b
		100	0.723 ^{cd}	0.386 ^d	1.109 ^c	0.550 ^{ef}
	0	0	0.868 ^a	0.561 ^c	1.430 ^a	0.650 ^{def}
		100	0.798 ^b	0.682 ^b	1.480 ^a	0.858 ^{cd}
0.1	0	0.741 ^{bc}	0.557 ^c	1.298 ^b	0.774 ^{de}	
	100	0.548 ^f	0.739 ^b	1.286 ^b	1.360 ^b	
0.5	0	0.445 ^g	0.875 ^a	1.320 ^b	1.965 ^a	
	100	0.652 ^e	0.684 ^b	1.336 ^b	1.057 ^c	
MDS ($P \leq 0.05$)			0.064	0.110	0.078	0.225

Tabla A 3.14. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) AsA					
Tiempo(D)	0.004	1	0.004	1.67	0.2051
AS	0.341	2	0.171	74.72	0.0000
NaCl(S)	0.024	1	0.024	10.32	0.0028
D x AS	0.163	2	0.081	35.63	0.0000
D x S	0.003	1	0.003	1.39	0.2455
AS x S	0.339	2	0.170	74.31	0.0000
D x AS x S	0.003	2	0.001	0.62	0.5457
Error	0.082	36	0.002		
Total	0.959	47			
b) DHA					
Tiempo(D)	1.056	1	1.056	169.10	0.0000
AS	0.313	2	0.157	25.09	0.0000
NaCl(S)	0.044	1	0.044	6.97	0.0122
D x AS	0.024	2	0.012	1.95	0.1571
D x S	0.003	1	0.003	0.56	0.4597
AS x S	0.271	2	0.135	21.67	0.0000
D x AS x S	0.013	2	0.006	1.01	0.3757
Error	0.225	36	0.006		
Total	1.948	47			

c) AsA+DHA					
Tiempo(D)	0.933	1	0.933	273.49	0.0000
AS	0.037	2	0.018	5.38	0.0090
NaCl(S)	0.003	1	0.003	0.89	0.3516
D x AS	0.090	2	0.045	13.21	0.0000
D x S	0.000	1	0.000	0.00	0.9644
AS x S	0.005	2	0.002	0.72	0.4896
D x AS x S	0.004	2	0.002	0.64	0.5318
Error	0.123	36	0.003		
Total	1.195	47			
d) DHA/AsA					
Tiempo(D)	2.807	1	2.807	113.56	0.0000
AS	3.604	2	1.802	72.89	0.0000
NaCl(S)	0.625	1	0.625	25.26	0.0000
D x AS	0.412	2	0.206	8.33	0.0011
D x S	0.032	1	0.032	1.28	0.2645
AS x S	3.335	2	1.668	67.46	0.0000
D x AS x S	0.129	2	0.064	2.61	0.0877
Error	0.890	36	0.025		
Total	11.833	47			

Tabla A 3.15. Contenido de glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG) y glutatión total (GSH+GSSG) expresados en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PFN, y la relación glutatión oxidado/glutatión reducido (GSSG/GSH) en nódulos de *P. vulgaris*

Tiempo (D)	AS (mM)	NaCl (mM)	GSH	GSSG	GSH+GSSG	GSSG/GSH	
	0	0	0.138 ^g	0.090 ^c	0.228 ^g	0.655 ^{bc}	
		100	0.123 ^h	0.085 ^g	0.207 ^h	0.694 ^{ab}	
	3	0.1	0	0.169 ^e	0.102 ^c	0.272 ^{cd}	0.605 ^{de}
			100	0.171 ^{de}	0.109 ^b	0.280 ^c	0.642 ^{cd}
	0.5	0	0.156 ^f	0.085 ^g	0.242 ^f	0.548 ^f	
		100	0.156 ^f	0.113 ^a	0.269 ^d	0.725 ^a	
	6	0	0	0.311 ^a	0.055 ^h	0.367 ^b	0.177 ⁱ
			100	0.294 ^b	0.053 ^h	0.348 ^c	0.182 ⁱ
	0.1	0	0.302 ^{ab}	0.087 ^{fg}	0.389 ^a	0.289 ^h	
		100	0.201 ^c	0.096 ^d	0.297 ^d	0.477 ^g	
	0.5	0	0.162 ^{ef}	0.092 ^e	0.254 ^c	0.570 ^{ef}	
		100	0.180 ^d	0.089 ^{ef}	0.270 ^d	0.498 ^g	
MDS ($P \leq 0.05$)			0.010	0.003	0.009	0.045	

Tabla A 3.16. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) GSH					
Tiempo(D)	0.0965	1	0.0965	1824	0.0000
AS	0.0270	2	0.0135	255	0.0000
NaCl(S)	0.0043	1	0.0043	82	0.0000
D x AS	0.0499	2	0.0250	472	0.0000
D x S	0.0025	1	0.0025	47	0.0000
AS x S	0.0070	2	0.0035	66	0.0000
D x AS x S	0.0084	2	0.0042	79	0.0000
Error	0.0019	36	0.0001		
Total	0.1975	47			
b) GSSG					
Tiempo(D)	0.0041	1	0.0041	1001	0.0000
AS	0.0073	2	0.0037	885	0.0000
NaCl(S)	0.0004	1	0.0004	88	0.0000
D x AS	0.0014	2	0.0007	165	0.0000
D x S	0.0002	1	0.0002	48	0.0000
AS x S	0.0006	2	0.0003	66	0.0000
D x AS x S	0.0007	2	0.0004	88	0.0000
Error	0.0002	36	0.0000		
Total	0.0148	47			
c) GSH+GSSG					
Tiempo(D)	0.0607	1	0.0607	1354	0.0000
AS	0.0209	2	0.0104	233	0.0000
NaCl(S)	0.0022	1	0.0022	49	0.0000
D x AS	0.0351	2	0.0176	392	0.0000
D x S	0.0041	1	0.0041	91	0.0000
AS x S	0.0083	2	0.0042	93	0.0000
D x AS x S	0.0062	2	0.0031	69	0.0000
Error	0.0016	36	0.0000		
Total	0.1390	47			
d) GSSG/GSH					
Tiempo(D)	0.936	1	0.936	914.3	0.0000
AS	0.201	2	0.100	98.1	0.0000
NaCl(S)	0.046	1	0.046	45.4	0.0000
D x AS	0.317	2	0.158	154.8	0.0000
D x S	0.006	1	0.006	5.7	0.0228
AS x S	0.017	2	0.009	8.4	0.0010
D x AS x S	0.081	2	0.040	39.5	0.0000
Error	0.037	36	0.001		
Total	1.641	47			

Tabla A 3.17. Contenido de aminoácidos libres totales (Aa) expresados en mg asparragina g⁻¹ PF, prolina (Pro) en mg prolina g⁻¹ PF y azúcares solubles totales (Ast) expresados en mg glucosa g⁻¹ PF en hoja de *P. vulgaris*

Tiempo (D)	AS (mM)	NaCl (mM)	Aa	Pro	Ast
0	0	0	2.61 ^g	0.21 ^h	7.82 ^g
		100	3.15 ^{cde}	0.63 ^{ef}	10.33 ^d
	0.1	0	2.73 ^{fg}	0.22 ^h	8.09 ^{fg}
		100	3.01 ^d	0.60 ^f	6.45 ^h
3	0.5	0	2.83 ^{efg}	0.23 ^h	6.16 ^h
		100	3.41 ^c	0.61 ^f	8.82 ^e
	0	0	4.91 ^b	0.39 ^g	5.16 ⁱ
		100	3.33 ^{cd}	1.45 ^c	10.92 ^c
6	0.1	0	3.45 ^c	0.81 ^d	8.06 ^{fg}
		100	6.80 ^a	2.55 ^a	14.50 ^a
	0.5	0	4.61 ^b	0.69 ^e	8.48 ^{ef}
		100	3.31 ^{cd}	1.87 ^b	13.70 ^b
MDS (P ≤ 0.05)			0.38	0.07	0.47

Tabla A 3.18. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Aa					
Tiempo(D)	25.04	1	25.04	352.7	0.0000
AS	2.46	2	1.23	17.3	0.0000
NaCl(S)	1.16	1	1.16	16.4	0.0003
D x AS	4.28	2	2.14	30.2	0.0000
D x S	0.29	1	0.29	4.1	0.0506
AS x S	13.70	2	6.85	96.5	0.0000
D x AS x S	17.14	2	8.57	120.7	0.0000
Error	2.56	36	0.07		
Total	66.62	47			
b) Pro					
Tiempo(D)	3542	1	3542	135.4	0.0000
AS	11736	2	5868	224.4	0.0000
NaCl(S)	25737	1	25737	984.1	0.0000
D x AS	12807	2	6403	244.8	0.0000
D x S	377	1	377	14.4	0.0005
AS x S	3952	2	1976	75.6	0.0000
D x AS x S	4250	2	2125	81.3	0.0000
Error	942	36	26		
Total	63343	47			

Apéndice

c) Ast					
Tiempo(D)	57.7	1	57.7	534	0.0000
AS	10.7	2	5.3	49	0.0000
NaCl(S)	146.3	1	146.3	1354	0.0000
D x AS	16.2	2	8.1	75	0.0000
D x S	64.4	1	64.4	596	0.0000
AS x S	57.7	2	28.8	267	0.0000
D x AS x S	9.1	2	4.6	42	0.0000
Error	3.9	36	0.1		
Total	366.0	47			

Tabla A 3.19. Contenido de aminoácidos libres totales (Aa) expresados en mg asparragina g⁻¹ PF, prolina (Pro) en mg prolina g⁻¹ PF y azúcares solubles totales (Ast) expresados en mg glucosa g⁻¹ PF en nódulo de *P. vulgaris*

Tiempo (D)	AS (mM)	NaCl (mM)	Aa	Pro	Ast
0	0	0	7.08 ^{fg}	0.123 ^c	10.22 ^g
		100	6.02 ^h	0.099 ^f	16.05 ^c
	0.1	0	8.49 ^{dc}	0.150 ^b	12.35 ^f
		100	6.61 ^{gh}	0.157 ^a	13.57 ^c
3	0.5	0	9.12 ^{cd}	0.092 ^g	13.51 ^c
		100	7.73 ^{ef}	0.110 ^{de}	14.25 ^{de}
	0	0	13.27 ^a	0.113 ^d	10.66 ^g
		100	12.30 ^b	0.149 ^b	14.73 ^d
6	0.1	0	12.32 ^b	0.104 ^{ef}	13.88 ^c
		100	11.81 ^b	0.124 ^c	22.93 ^a
	0.5	0	12.03 ^b	0.064 ⁱ	11.84 ^f
		100	9.48 ^c	0.084 ^h	21.20 ^b
MDS (P ≤ 0.05)			0.90	0.005	0.74

Tabla A 3.20. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Aa					
Tiempo(D)	228.3	1	228.3	565.2	0.0000
AS	2.8	2	1.4	3.5	0.0423
NaCl(S)	1.7	1	1.7	4.2	0.0486
D x AS	24.9	2	12.4	30.8	0.0000
D x S	13.8	1	13.8	34.2	0.0000
AS x S	11.6	2	5.8	14.3	0.0000
D x AS x S	5.0	2	2.5	6.2	0.0050
Error	14.5	36	0.4		
Total	302.6	47			

b) Pro					
Tiempo(D)	2883	1	2883	178.9	0.0000
AS	18594	2	9297	577.1	0.0000
NaCl(S)	7	1	7	0.4	0.5232
D x AS	7804	2	3902	242.2	0.0000
D x S	4	1	4	0.2	0.6317
AS x S	5719	2	2859	177.5	0.0000
D x AS x S	318	2	159	9.9	0.0004
Error	580	36	16		
Total	35908	47			
c) Ast					
Tiempo(D)	77.9	1	77.9	285	0.0000
AS	51.2	2	25.6	94	0.0000
NaCl(S)	305.4	1	305.4	1118	0.0000
D x AS	57.4	2	28.7	105	0.0000
D x S	71.8	1	71.8	263	0.0000
AS x S	3.4	2	1.7	6	0.0050
D x AS x S	94.2	2	47.1	172	0.0000
Error	9.8	36	0.3		
Total	671.2	47			

Tabla A 3.21. Contenido de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) expresado en nmol MDA g⁻¹ PF y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en µmol g⁻¹ PF en hoja(h) y nódulo(n) de *P. vulgaris*

Tiempo (D)	AS (mM)	NaCl (mM)	TBARS(h)	TBARS(n)	H ₂ O ₂ (h)	H ₂ O ₂ (n)	
	0	0	19.49 ^{bc}	37.91 ^d	0.517 ^h	0.699 ^{dc}	
		100	27.09 ^a	44.81 ^a	0.648 ^{ef}	0.838 ^a	
	3	0.1	0	11.65 ^{de}	45.51 ^a	0.640 ^{ef}	0.612 ^f
			100	18.92 ^{bc}	45.95 ^a	0.538 ^{gh}	0.745 ^{bc}
	0.5	0	14.94 ^{cd}	42.78 ^b	0.595 ^{fg}	0.595 ^{fg}	
		100	8.61 ^e	38.54 ^d	0.540 ^{gh}	0.588 ^{fg}	
	6	0	0	17.91 ^{bc}	17.09 ^g	1.091 ^b	0.689 ^{dc}
			100	27.78 ^a	27.91 ^e	1.793 ^a	0.845 ^a
	0.1	0	19.43 ^{bc}	22.03 ^f	0.926 ^c	0.563 ^g	
		100	22.41 ^b	23.61 ^f	0.920 ^c	0.752 ^b	
	0.5	0	12.59 ^{de}	36.90 ^d	0.760 ^d	0.667 ^e	
		100	18.67 ^{bc}	40.32 ^c	0.666 ^c	0.710 ^{cd}	
MDS (P ≤ 0.05)			4.59	1.66	0.057	0.035	

Tabla A 3.22. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) TBARS(h)					
Tiempo(D)	109	1	109.2	10.59	0.0025
AS	703	2	351.4	34.07	0.0000
NaCl(S)	252	1	251.5	24.39	0.0000
D x AS	78	2	39.1	3.79	0.0322
D x S	36	1	35.9	3.48	0.0703
AS x S	159	2	79.4	7.70	0.0016
D x AS x S	142	2	70.8	6.87	0.0030
Error	371	36	10.3		
Total	1849	47			
b) TBARS(n)					
Tiempo(D)	2561	1	2,561	1885	0.0000
AS	499	2	250	184	0.0000
NaCl(S)	119	1	119	88	0.0000
D x AS	978	2	489	360	0.0000
D x S	54	1	54	40	0.0000
AS x S	199	2	100	73	0.0000
D x AS x S	21	2	11	8	0.0015
Error	49	36	1		
Total	4482	47			
c) H₂O₂(h)					
Tiempo(D)	2.389	1	2.389	1515	0.0000
AS	1.158	2	0.579	367	0.0000
NaCl(S)	0.396	1	0.396	251	0.0000
D x AS	1.099	2	0.549	348	0.0000
D x S	0.088	1	0.088	56	0.0000
AS x S	0.331	2	0.166	105	0.0000
D x AS x S	0.249	2	0.124	79	0.0000
Error	0.057	36	0.002		
Total	5.766	47			
d) H₂O₂(n)					
Tiempo(D)	0.007	1	0.007	13.0	0.0009
AS	0.145	2	0.072	127.8	0.0000
NaCl(S)	0.142	1	0.142	251.7	0.0000
D x AS	0.032	2	0.016	27.9	0.0000
D x S	0.005	1	0.005	8.9	0.0052
AS x S	0.050	2	0.025	44.3	0.0000
D x AS x S	0.001	2	0.000	0.8	0.4605
Error	0.020	36	0.001		
Total	0.402	47			

Tabla A 3.23. Contenido de ácido salicílico libre endógeno (AS) expresados en ng g⁻¹ PF y ácido abscísico libre endógeno (ABA) expresado en pmol g⁻¹ PF en hoja(h) y raíz(r) de *P. vulgaris*

Tiempo (D)	AS (mM)	NaCl (mM)	AS(h)	AS(r)	ABA(h)	ABA(r)
3	0	0	109.8 ^f	13.6 ^g	22.1 ^f	19.4 ^{cd}
		100	118.1 ^f	19.4 ^{fg}	53.8 ^d	30.1 ^b
	0.1	0	132.9 ^f	19.4 ^{fg}	-	-
		100	219.6 ^{de}	24.6 ^{fg}	-	-
	0.5	0	189.4 ^c	48.8 ^{efg}	69.8 ^c	18.5 ^{cd}
		100	230.4 ^d	69.2 ^{ef}	74.7 ^c	16.8 ^{de}
6	0	0	186.8 ^c	97.8 ^c	166.7 ^a	96.9 ^a
		100	269.5 ^c	166.7 ^d	38.1 ^c	21.3 ^c
	0.1	0	298.6 ^{bc}	203.7 ^d	-	-
		100	523.1 ^a	312.7 ^c	-	-
	0.5	0	331.9 ^b	676.8 ^b	41.9 ^c	12.8 ^c
		100	535.9 ^a	935.4 ^a	100.6 ^b	20.2 ^{cd}
MDS (P ≤ 0.05)			38.5	50.7	8.1	4.0

Tabla A 3.24. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) AS(h)					
Tiempo(D)	437517	1	437517	601.6	0.0000
AS	205594	2	102797	141.4	0.0000
NaCl(S)	139568	1	139568	191.9	0.0000
D x AS	35544	2	17772	24.4	0.0000
D x S	46945	1	46945	64.6	0.0000
AS x S	25506	2	12753	17.5	0.0000
D x AS x S	4168	2	2084	2.9	0.0700
Error	26180	36	727		
Total	921023	47			
b) AS(r)					
Tiempo(D)	1610563	1	1610563	1280	0.0000
AS	1163125	2	581563	462	0.0000
NaCl(S)	73015	1	73015	58	0.0000
D x AS	898833	2	449416	357	0.0000
D x S	54744	1	54744	44	0.0000
AS x S	23495	2	11748	9	0.0005
D x AS x S	16802	2	8401	7	0.0034
Error	45292	36	1258		
Total	3885870	47			

Apéndice

c) ABA(h)					
Tiempo(D)	8057	1	8057	259.0	0.0000
AS	21	1	21	0.7	0.4231
NaCl(S)	559	1	559	18.0	0.0003
D x AS	8562	1	8562	275.2	0.0000
D x S	5664	1	5664	182.1	0.0000
AS x S	12858	1	12858	413.3	0.0000
D x AS x S	22917	1	22917	736.7	0.0000
Error	747	24	31		
Total	59384	31			
d) ABA(r)					
Tiempo(D)	2206	1	2206	285.5	0.0000
AS	4937	1	4937	639.0	0.0000
NaCl(S)	1763	1	1763	228.2	0.0000
D x AS	2519	1	2519	326.0	0.0000
D x S	2990	1	2990	386.9	0.0000
AS x S	2493	1	2493	322.6	0.0000
D x AS x S	4553	1	4553	589.3	0.0000
Error	185	24	8		
Total	21647	31			

Tabla A 3.25. Contenido de diaminopropano (DAP), putrescina (PUT), cadaverina (CAD), espermidina (SPD) y espermina (SPM) expresado en nmol g⁻¹ PF en hoja de *P. vulgaris*

Tiempo (D)	AS (mM)	NaCl (mM)	PUT	SPD	SPM
3	0	0	46.67 ^a	92.84 ^a	23.44 ^c
		100	11.15 ^e	9.01 ^g	19.92 ^d
	0.5	0	32.34 ^b	75.68 ^b	22.16 ^c
		100	31.82 ^b	74.66 ^b	30.00 ^b
6	0	0	32.58 ^b	48.93 ^c	11.17 ^f
		100	17.47 ^d	31.59 ^c	14.74 ^e
	0.5	0	32.84 ^b	28.67 ^f	15.99 ^e
		100	24.61 ^c	37.24 ^d	32.16 ^a
MDS (P ≤ 0.05)			1.61	2.48	1.54

El DAP y la CAD no fueron detectados

Tabla A 3.26. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) PUT					
Tiempo(D)	105	1	105	85	0.0000
AS	95	1	95	77	0.0000
NaCl(S)	1763	1	1763	1436	0.0000
D x AS	1	1	1	0	0.5124
D x S	81	1	81	66	0.0000

AS x S	877	1	877	714	0.0000
D x AS x S	396	1	396	322	0.0000
Error	29	24	1		
Total	3345	31			
b) SPD					
Tiempo(D)	5592	1	5592	1935	0.0000
AS	574	1	574	199	0.0000
NaCl(S)	4382	1	4382	1517	0.0000
D x AS	1991	1	1991	689	0.0000
D x S	2893	1	2893	1001	0.0000
AS x S	5910	1	5910	2045	0.0000
D x AS x S	1619	1	1619	560	0.0000
Error	69	24	3		
Total	23031	31			
c) SPM					
Tiempo(D)	230	1	230.2	205.7	0.0000
AS	482	1	481.8	430.5	0.0000
NaCl(S)	290	1	289.5	258.7	0.0000
D x AS	90	1	90.3	80.7	0.0000
D x S	119	1	118.8	106.2	0.0000
AS x S	287	1	287.0	256.4	0.0000
D x AS x S	1	1	0.8	0.7	0.4117
Error	27	24	1.1		
Total	1525	31			

Tabla A 3.27. Contenido de diaminopropano (DAP), putrescina (PUT), cadaverina (CAD), espermidina (SPD) y espermina (SPM) expresado en nmol g⁻¹ PF en raíz de *P. vulgaris*

Tiempo (D)	AS (mM)	NaCl (mM)	PUT
3	0	0	8.23 ^f
		100	12.42 ^d
	0.5	0	9.82 ^c
		100	13.41 ^c
6	0	0	16.46 ^a
		100	11.64 ^d
	0.5	0	14.45 ^b
		100	12.29 ^d
MDS (P ≤ 0.05)			0.79

El DAP, CAD, SPD y SPM no fueron detectados

Tabla A 3.28. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) PUT					
Tiempo(D)	60.1	1	60.1	203.8	0.0000
AS	0.7	1	0.7	2.5	0.1240
NaCl(S)	0.3	1	0.3	1.1	0.3036
D x AS	7.7	1	7.7	26.2	0.0000
D x S	109.0	1	109.0	369.7	0.0000
AS x S	2.1	1	2.1	7.2	0.0131
D x AS x S	5.3	1	5.3	18.0	0.0003
Error	7.1	24	0.3		
Total	192.4	31			

Tabla A 3.29. Contenido de diaminopropano (DAP), putrescina (PUT), cadaverina (CAD), espermidina (SPD) y espermina (SPM) expresado en nmol g⁻¹ PF en nódulo de *P.vulgaris*

Tiempo (D)	AS (mM)	NaCl (mM) DAP	PUT	CAD	SPD	SPM
3	0	0	51.25 ^b	308.36 ^a	57.53 ^d	9.74 ^d
		100	42.81 ^c	197.71 ^b	21.54 ^e	2.97 ^e
	0.5	0	53.75 ^a	196.51 ^b	131.20 ^a	21.35 ^a
		100	37.50 ^d	82.01 ^d	42.94 ^f	6.67 ^c
6	0	0	53.26 ^a	197.92 ^b	46.28 ^c	4.61 ^f
		100	29.53 ^c	75.29 ^e	45.00 ^e	18.39 ^b
	0.5	0	29.01 ^c	94.90 ^c	109.87 ^b	22.06 ^a
		100	28.78 ^e	63.41 ^f	62.60 ^c	14.58 ^c
MDS (P ≤ 0.05)			1.14	2.07	1.74	1.03

El DAP no fue detectado

Tabla A 3.30. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) PUT					
Tiempo(D)	1001	1	1001	1640	0.0000
AS	387	1	387	634	0.0000
NaCl(S)	1183	1	1183	1939	0.0000
D x AS	246	1	246	403	0.0000
D x S	0	1	0	0	0.5156
AS x S	123	1	123	201	0.0000
D x AS x S	490	1	490	803	0.0000
Error	15	24	1		
Total	3445	31			

b) CAD

Tiempo(D)	62330	1	62330	30959	0.0000
AS	58635	1	58635	29124	0.0000
NaCl(S)	71923	1	71923	35724	0.0000
D x AS	6346	1	6346	3152	0.0000
D x S	2523	1	2523	1253	0.0000
AS x S	3810	1	3810	1892	0.0000
D x AS x S	4513	1	4513	2241	0.0000
Error	48	24	2		
Total	210129	31			
c) SPD					
Tiempo(D)	56	1	56	39	0.0000
AS	15537	1	15537	10827	0.0000
NaCl(S)	14928	1	14928	10402	0.0000
D x AS	96	1	96	67	0.0000
D x S	2865	1	2865	1997	0.0000
AS x S	4827	1	4827	3364	0.0000
D x AS x S	20	1	20	14	0.0011
Error	34	24	1		
Total	38363	31			
d) SPM					
Tiempo(D)	179	1	178.7	356.4	0.0000
AS	419	1	419.3	836.1	0.0000
NaCl(S)	115	1	114.9	229.0	0.0000
D x AS	1	1	1.4	2.8	0.1091
D x S	385	1	385.3	768.3	0.0000
AS x S	425	1	425.3	848.1	0.0000
D x AS x S	89	1	88.9	177.2	0.0000
Error	12	24	0.5		
Total	1626	31			

Tabla A 3.31. Peso seco de planta (PSP), peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco raíz (PSR) en g planta⁻¹, y relación raíz/parte aérea (RPA) en plantas de *M. sativa*

Tiempo (D)	AS (mM)	NaCl (mM)	PSP	PSPA	PSR	RPA
6	0	0	0.945 ^a	0.501 ^a	0.437 ^a	0.909 ^{bc}
		200	0.307 ^f	0.296 ^{cde}	0.231 ^{bcde}	0.764 ^c
	0.1	0	0.812 ^{abc}	0.361 ^{bc}	0.442 ^a	1.231 ^{ab}
		200	0.533 ^{de}	0.301 ^{cde}	0.225 ^{cde}	0.743 ^c
	0.5	0	0.481 ^c	0.268 ^{de}	0.209 ^{de}	0.807 ^c
		200	0.395 ^{ef}	0.254 ^{ef}	0.139 ^e	0.576 ^c
12	0	0	0.936 ^{ab}	0.511 ^a	0.420 ^a	0.831 ^c
		200	0.305 ^f	0.181 ^f	0.121 ^e	0.697 ^c
	0.1	0	0.793 ^{bc}	0.339 ^{bcd}	0.447 ^a	1.314 ^a
		200	0.680 ^{cd}	0.317 ^{cde}	0.357 ^{ab}	1.128 ^{ab}
	0.5	0	0.758 ^c	0.409 ^b	0.341 ^{abc}	0.835 ^c
		200	0.693 ^c	0.401 ^b	0.286 ^{bcd}	0.700 ^c
MDS (P ≤ 0.05)			0.151	0.078	0.127	0.373

Tabla A 3.32. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) PSP					
Tiempo(D)	0.160	1	0.160	14.53	0.0005
AS	0.125	2	0.062	5.67	0.0072
NaCl(S)	1.094	1	1.094	99.41	0.0000
D x AS	0.188	2	0.094	8.52	0.0009
D x S	0.013	1	0.013	1.15	0.2914
AS x S	0.693	2	0.346	31.46	0.0000
D x AS x S	0.016	2	0.008	0.72	0.4943
Error	0.396	36	0.011		
Total	2.684	47			
b) PSPA					
Tiempo(D)	0.010	1	0.010	3.62	0.0652
AS	0.018	2	0.009	3.19	0.0532
NaCl(S)	0.136	1	0.136	47.40	0.0000
D x AS	0.084	2	0.042	14.61	0.0000
D x S	0.002	1	0.002	0.75	0.3915
AS x S	0.157	2	0.078	27.30	0.0000
D x AS x S	0.015	2	0.007	2.58	0.0899
Error	0.103	36	0.003		
Total	0.526	47			
c) PSR					

Tiempo(D)	0.028	1	0.028	3.42	0.0726
AS	0.123	2	0.062	7.45	0.0020
NaCl(S)	0.292	1	0.292	35.31	0.0000
D x AS	0.085	2	0.043	5.15	0.0108
D x S	0.001	1	0.001	0.10	0.7563
AS x S	0.072	2	0.036	4.36	0.0202
D x AS x S	0.024	2	0.012	1.45	0.2477
Error	0.298	36	0.008		
Total	0.923	47			
d) RPA					
Tiempo(D)	0.075	1	0.075	1.092	0.3030
AS	1.268	2	0.634	9.186	0.0006
NaCl(S)	0.579	1	0.579	8.395	0.0064
D x AS	0.188	2	0.094	1.360	0.2696
D x S	0.055	1	0.055	0.802	0.3765
AS x S	0.086	2	0.043	0.623	0.5421
D x AS x S	0.045	2	0.022	0.325	0.7249
Error	2.485	36	0.069		
Total	4.781	47			

Tabla A 3.33. 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 $\mu\text{mol de N}_2 \text{ g}^{-1} \text{ PSN h}^{-1}$, peso seco de nódulos (PSN) en mg planta^{-1} y peso normalizado de nódulos (PNN) en $\text{mg PSN mg}^{-1} \text{ PSPA}$ en *M. sativa*

Tiempo (D)	AS (mM)	NaCl (mM)	ANA	ANT	TFN	PSN	PNN	
	0	0	55.96 ^a	128 ^{bc}	30.99 ^b	0.0072 ^c	0.014 ^b	
		200	10.03 ^f	47 ^e	11.83 ^{def}	0.0055 ^f	0.018 ^{ab}	
	6	0.1	0	44.59 ^{bcd}	138 ^b	31.85 ^b	0.0097 ^a	0.027 ^a
			200	32.03 ^e	100 ^{cd}	17.15 ^{cde}	0.0066 ^d	0.022 ^{ab}
	0.5	0	30.71 ^e	70 ^{de}	24.66 ^{bc}	0.0043 ^g	0.016 ^{ab}	
		200	33.90 ^e	52 ^e	8.00 ^{ef}	0.0026 ^h	0.011 ^b	
	12	0	0	46.66 ^{abc}	108 ^{bc}	25.44 ^{bc}	0.0061 ^e	0.012 ^b
			200	29.96 ^e	54 ^e	6.72 ^{ef}	0.0025 ^h	0.014 ^b
	0.1	0	50.77 ^{ab}	193 ^a	47.57 ^a	0.0070 ^{cd}	0.021 ^{ab}	
		200	40.19 ^{cde}	108 ^{bc}	6.63 ^{ef}	0.0066 ^d	0.021 ^{ab}	
	0.5	0	35.15 ^{de}	99 ^{cd}	20.08 ^{cd}	0.0077 ^b	0.019 ^{ab}	
		200	31.16 ^e	51 ^e	4.49 ^f	0.0061 ^e	0.014 ^b	
MDS (P ≤ 0.05)			10.43	34	10.49	0.0004	0.011	

Tabla A 3.34. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) ANA					
Tiempo(D)	237	1	237	4.45	0.0419
AS	202	2	101	1.90	0.1648
NaCl(S)	2498	1	2498	46.86	0.0000
D x AS	19	2	10	0.18	0.8357
D x S	192	1	192	3.61	0.0655
AS x S	2527	2	1264	23.71	0.0000
D x AS x S	715	2	358	6.71	0.0033
Error	1919	36	53		
Total	8310	47			
b) ANT					
Tiempo(D)	2085	1	2085	3.63	0.0648
AS	38554	2	19277	33.54	0.0000
NaCl(S)	34696	1	34696	60.37	0.0000
D x AS	2918	2	1459	2.54	0.0930
D x S	857	1	857	1.49	0.2300
AS x S	2722	2	1361	2.37	0.1081
D x AS x S	3020	2	1510	2.63	0.0861
Error	20692	36	575		
Total	105544	47			
c) TFN					
Tiempo(D)	61	1	61	1.13	0.2940
AS	1075	2	538	9.96	0.0004
NaCl(S)	5273	1	5273	97.70	0.0000
D x AS	145	2	73	1.34	0.2736
D x S	204	1	204	3.78	0.0596
AS x S	298	2	149	2.76	0.0767
D x AS x S	486	2	243	4.51	0.0179
Error	1943	36	54		
Total	9486	47			
d) PSN					
Tiempo(D)	0.00000	1	0.00000	0.000	1.0000
AS	0.00005	2	0.00003	3.158	0.0545
NaCl(S)	0.00005	1	0.00005	5.742	0.0219
D x AS	0.00007	2	0.00004	4.170	0.0235
D x S	0.00000	1	0.00000	0.028	0.8673
AS x S	0.00000	2	0.00000	0.148	0.8632
D x AS x S	0.00001	2	0.00001	0.633	0.5368
Error	0.00031	36	0.00001		
Total	0.00049	47			
e) PNN					
Tiempo(D)	0.00001	1	0.00001	0.187	0.6681
AS	0.00066	2	0.00033	4.965	0.0125
NaCl(S)	0.00002	1	0.00002	0.307	0.5830

D x AS	0.00011	2	0.00006	0.840	0.4402
D x S	0.00001	1	0.00001	0.093	0.7628
AS x S	0.00011	2	0.00005	0.815	0.4505
D x AS x S	0.00002	2	0.00001	0.171	0.8433
Error	0.00240	36	0.00007		
Total	0.00335	47			

Tabla A 3.35. Actividad superóxido dismutasa (SOD) expresada U mg⁻¹ prot, catalasa (CAT) en $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$, guaiacol peroxidasa (POX) en $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$ y actividad lipoxigenasa (LOX) en $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$ en nódulos de *M. sativa*

Tiempo (D)	AS (mM)	NaCl (mM)	SOD	CAT	POX	LOX
6	0	0	0.157 ^c	21.08 ^b	1.94 ^{gh}	1.504 ^c
		200	0.197 ^a	13.96 ^e	4.10 ^f	2.831 ^a
	0.1	0	0.102 ^{de}	16.95 ^c	1.74 ^h	0.890 ^d
		200	0.161 ^{bc}	12.74 ^f	5.85 ^d	0.630 ^{ef}
	0.5	0	0.178 ^{abc}	15.45 ^d	2.35 ^g	0.583 ^f
		200	0.177 ^{abc}	14.08 ^e	6.49 ^c	0.649 ^{ef}
12	0	0	0.098 ^e	25.23 ^a	3.88 ^f	0.805 ^{de}
		200	0.122 ^{de}	14.20 ^e	7.02 ^b	2.523 ^b
	0.1	0	0.124 ^d	15.17 ^d	5.42 ^e	0.870 ^d
		200	0.176 ^{abc}	11.50 ^g	10.15 ^a	1.472 ^c
	0.5	0	0.185 ^{ab}	13.74 ^e	5.06 ^c	0.965 ^d
		200	0.177 ^{abc}	12.14 ^{fg}	6.95 ^b	0.776 ^{def}
MDS (P ≤ 0.05)			0.025	0.90	0.43	0.193

Tabla A 3.36. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) SOD					
Tiempo(D)	0.0027	1	0.0027	9.15	0.0046
AS	0.0150	2	0.0075	25.65	0.0000
NaCl(S)	0.0092	1	0.0092	31.38	0.0000
D x AS	0.0165	2	0.0083	28.32	0.0000
D x S	0.0003	1	0.0003	1.03	0.3174
AS x S	0.0073	2	0.0036	12.42	0.0001
D x AS x S	0.0001	2	0.0000	0.11	0.8965
Error	0.0105	36	0.0003		
Total	0.0615	47			
b) CAT					
Tiempo(D)	1.7	1	1.7	4.5	0.0414
AS	230.8	2	115.4	295.8	0.0000
NaCl(S)	280.6	1	280.6	719.3	0.0000

Apéndice

D x AS	40.1	2	20.1	51.4	0.0000
D x S	4.4	1	4.4	11.2	0.0019
AS x S	120.3	2	60.1	154.2	0.0000
D x AS x S	11.3	2	5.6	14.5	0.0000
Error	14.0	36	0.4		
Total	703.2	47			
e) POX					
Tiempo(D)	85.3	1	85.3	932	0.0000
AS	19.8	2	9.9	108	0.0000
NaCl(S)	135.4	1	135.4	1481	0.0000
D x AS	11.8	2	5.9	65	0.0000
D x S	0.1	1	0.1	2	0.2173
AS x S	7.0	2	3.5	38	0.0000
D x AS x S	6.3	2	3.1	34	0.0000
Error	3.3	36	0.1		
Total	269.0	47			
d) LOX					
Tiempo(D)	0.04	1	0.035	2.0	0.1660
AS	12.42	2	6.207	352.6	0.0000
NaCl(S)	3.55	1	3.551	201.7	0.0000
D x AS	1.91	2	0.956	54.3	0.0000
D x S	0.33	1	0.333	18.9	0.0000
AS x S	5.86	2	2.928	166.3	0.0000
D x AS x S	0.63	2	0.315	17.9	0.0000
Error	0.63	36	0.018		
Total	25.36	47			

Tabla A 3.37. Actividad superóxido dismutasa (SOD) expresada U g⁻¹ PFN, catalasa (CAT) en µmol H₂O₂ g⁻¹ PFN min⁻¹, guaiacol peroxidasa (POX) en µmol H₂O₂ g⁻¹ PFN min⁻¹ y actividad lipoxigenasa (LOX) en µmol g⁻¹ PFN min⁻¹ en nódulos de *M. sativa*

Tiempo (D)	AS (mM)	NaCl (mM)	SOD	CAT	POX	LOX
6	0	0	21.60 ^{ef}	1833 ^b	93 ^f	59.0 ^c
		200	23.39 ^{def}	1413 ^{cd}	217 ^d	122.0 ^a
	0.1	0	10.54 ^g	1232 ^f	88 ^f	43.2 ^d
		200	23.56 ^{def}	1042 ^g	248 ^b	29.1 ^f
	0.5	0	24.69 ^{cde}	1337 ^{de}	96 ^f	31.0 ^{ef}
		200	22.86 ^{def}	1393 ^{cd}	256 ^b	30.0 ^f
12	0	0	20.50 ^f	2054 ^a	164 ^c	16.2 ^g
		200	22.55 ^{ef}	1443 ^c	238 ^{bc}	84.0 ^b
	0.1	0	26.36 ^{cd}	1795 ^b	256 ^b	29.8 ^f
		200	40.34 ^a	1255 ^{ef}	340 ^a	42.6 ^d
	0.5	0	28.30 ^c	1380 ^{cd}	239 ^{bc}	38.0 ^{de}
		200	32.86 ^b	1393 ^{cd}	223 ^{cd}	30.4 ^f
MDS (P ≤ 0.05)			3.63	91	18	7.3

Tabla 3.38. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) SOD					
Tiempo(D)	653	1	652.6	100.9	0.0000
AS	218	2	108.9	16.8	0.0000
NaCl(S)	375	1	375.4	58.0	0.0000
D x AS	599	2	299.5	46.3	0.0000
D x S	19	1	19.2	3.0	0.0931
AS x S	376	2	187.8	29.0	0.0000
D x AS x S	23	2	11.3	1.7	0.1899
Error	233	36	6.5		
Total	2495	47			
b) CAT					
Tiempo(D)	382073	1	382073	93.6	0.0000
AS	1195852	2	597926	146.4	0.0000
NaCl(S)	955161	1	955161	233.9	0.0000
D x AS	286368	2	143184	35.1	0.0000
D x S	113786	1	113786	27.9	0.0000
AS x S	644919	2	322460	79.0	0.0000
D x AS x S	47428	2	23714	5.8	0.0065
Error	146997	36	4083		
Total	3772584	47			

Apéndice

c) POX

Tiempo(D)	71273	1	71273	451.2	0.0000
AS	24060	2	12030	76.2	0.0000
NaCl(S)	114412	1	114412	724.3	0.0000
D x AS	16996	2	8498	53.8	0.0000
D x S	29910	1	29910	189.3	0.0000
AS x S	5024	2	2512	15.9	0.0000
D x AS x S	8912	2	4456	28.2	0.0000
Error	5687	36	158		
Total	276275	47			

d) LOX

Tiempo(D)	1792	1	1792	68.1	0.0000
AS	13971	2	6985	265.5	0.0000
NaCl(S)	4874	1	4874	185.3	0.0000
D x AS	4804	2	2402	91.3	0.0000
D x S	210	1	210	8.0	0.0077
AS x S	12310	2	6155	234.0	0.0000
D x AS x S	581	2	291	11.0	0.0002
Error	947	36	26		
Total	39489	47			

Tabla A 3.39. Actividad ascorbato peroxidasa (APX) expresada $\mu\text{mol asc mg}^{-1} \text{prot min}^{-1}$, monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) en $\mu\text{mol NADH mg}^{-1} \text{prot min}^{-1}$, glutation reductasa (GR) en $\mu\text{mol NADPH mg}^{-1} \text{prot min}^{-1}$ y dehidroascorbato reductasa (DHAR) en $\mu\text{mol asc mg}^{-1} \text{prot min}^{-1}$ en nódulos de *M. sativa*

Tiempo (D)	AS (mM)	NaCl (mM)	APX	MDHAR	GR	DHAR
0	0	0	0.511 ^c	0.0187 ^b	0.0221 ^c	0.0082 ^g
		200	0.630 ^a	0.0188 ^b	0.0162 ^h	0.0097 ^f
	0.1	0	0.513 ^{bc}	0.0193 ^b	0.0219 ^c	0.0092 ^f
		200	0.533 ^b	0.0133 ^f	0.0193 ^g	0.0243 ^b
6	0.5	0	0.344 ^f	0.0211 ^a	0.0201 ^{ef}	0.0132 ^e
		200	0.481 ^d	0.0152 ^e	0.0229 ^b	0.0251 ^a
	0	0	0.196 ^h	0.0209 ^a	0.0212 ^d	0.0031 ⁱ
		200	0.187 ^h	0.0182 ^{bc}	0.0141 ⁱ	0.0127 ^e
12	0.1	0	0.404 ^e	0.0169 ^d	0.0200 ^f	0.0029 ⁱ
		200	0.484 ^d	0.0170 ^d	0.0204 ^e	0.0162 ^d
	0.5	0	0.352 ^f	0.0169 ^d	0.0211 ^d	0.0050 ^h
		200	0.276 ^g	0.0175 ^{cd}	0.0233 ^a	0.0229 ^c
MDS (P ≤ 0.05)			0.021	0.0011	0.0003	0.0005

Tabla A 3.40. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) APX					
Tiempo(D)	0.4125	1	0.4125	1772	0.0000
AS	0.1350	2	0.0675	290	0.0000
NaCl(S)	0.0245	1	0.0245	105	0.0000
D x AS	0.2250	2	0.1125	483	0.0000
D x S	0.0259	1	0.0259	111	0.0000
AS x S	0.0013	2	0.0007	3	0.0734
D x AS x S	0.0389	2	0.0194	83	0.0000
Error	0.0084	36	0.0002		
Total	0.8715	47			
b) MDHAR					
Tiempo(D)	0.0000	1	0.0000	0.53	0.4727
AS	0.0001	2	0.0000	40.21	0.0000
NaCl(S)	0.0001	1	0.0001	98.46	0.0000
D x AS	0.0000	2	0.0000	5.73	0.0069
D x S	0.0000	1	0.0000	51.20	0.0000
AS x S	0.0000	2	0.0000	4.90	0.0132
D x AS x S	0.0001	2	0.0000	42.34	0.0000
Error	0.0000	36	0.0000		
Total	0.0002	47			
c) GR					
Tiempo(D)	0.0000	1	0.0000	27.3	0.0000
AS	0.0001	2	0.0000	579.6	0.0000
NaCl(S)	0.0000	1	0.0000	549.8	0.0000
D x AS	0.0001	2	0.0000	475.5	0.0000
D x S	0.0000	1	0.0000	8.5	0.0061
AS x S	0.0001	2	0.0001	825.9	0.0000
D x AS x S	0.0000	2	0.0000	287.4	0.0000
Error	0.0000	36	0.0000		
Total	0.0003	47			
d) DHAR					
Tiempo(D)	0.0002	1	0.0002	1704	0.0000
AS	0.0004	2	0.0002	1559	0.0000
NaCl(S)	0.0016	1	0.0016	11382	0.0000
D x AS	0.0001	2	0.0001	409	0.0000
D x S	0.0001	1	0.0001	356	0.0000
AS x S	0.0003	2	0.0001	1017	0.0000
D x AS x S	0.0000	2	0.0000	140	0.0000
Error	0.0000	36	0.0000		
Total	0.0028	47			

Tabla A 3.41. Actividad ascorbato peroxidasa (APX) expresada $\mu\text{mol asc g}^{-1} \text{PFN min}^{-1}$, monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) en $\mu\text{mol NADH g}^{-1} \text{PFN min}^{-1}$, glutation reductasa (GR) en $\mu\text{mol NADPH g}^{-1} \text{PFN min}^{-1}$ y dehidroascorbato reductasa (DHAR) en $\mu\text{mol asc g}^{-1} \text{PFN min}^{-1}$ en nódulos de *M. sativa*

Tiempo (D)	AS (mM)	NaCl (mM)	APX	MDHAR	GR	DHAR
6	0	0	24.54 ^c	0.899 ^b	1.061 ^b	0.392 ^h
		200	33.28 ^a	0.994 ^a	0.858 ^f	0.513 ^c
	0.1	0	25.97 ^b	0.977 ^a	1.108 ^a	0.466 ^f
		200	22.54 ^d	0.563 ^e	0.815 ^g	1.028 ^a
	0.5	0	14.06 ^g	0.862 ^b	0.822 ^g	0.538 ^d
		200	18.96 ^e	0.600 ^{de}	0.902 ^e	0.991 ^b
12	0	0	8.29 ^h	0.882 ^b	0.897 ^c	0.131 ^j
		200	6.36 ⁱ	0.619 ^d	0.475 ^j	0.431 ^g
	0.1	0	19.05 ^e	0.797 ^c	0.944 ^d	0.137 ^j
		200	16.24 ^f	0.571 ^c	0.694 ⁱ	0.521 ^{de}
	0.5	0	16.59 ^f	0.797 ^c	0.996 ^c	0.234 ⁱ
		200	8.87 ^h	0.563 ^e	0.748 ^h	0.769 ^c
MDS ($P \leq 0.05$)			0.91	0.047	0.015	0.022

Tabla 3.42. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) APX					
Tiempo(D)	1363	1	1363	3274	0.0000
AS	322	2	161	387	0.0000
NaCl(S)	2	1	2	4	0.0537
D x AS	732	2	366	879	0.0000
D x S	171	1	171	412	0.0000
AS x S	92	2	46	110	0.0000
D x AS x S	102	2	51	123	0.0000
Error	15	36	0		
Total	2798	47			
b) MDHAR					
Tiempo(D)	0.147	1	0.147	136.7	0.0000
AS	0.190	2	0.095	88.3	0.0000
NaCl(S)	0.569	1	0.569	529.0	0.0000
D x AS	0.046	2	0.023	21.2	0.0000
D x S	0.007	1	0.007	6.3	0.0166
AS x S	0.117	2	0.059	54.6	0.0000
D x AS x S	0.158	2	0.079	73.2	0.0000
Error	0.039	36	0.001		

Total	1.273	47			
c) GR					
Tiempo(D)	0.220	1	0.220	1860	0.0000
AS	0.015	2	0.008	65	0.0000
NaCl(S)	0.597	1	0.597	5040	0.0000
D x AS	0.143	2	0.071	603	0.0000
D x S	0.085	1	0.085	715	0.0000
AS x S	0.178	2	0.089	752	0.0000
D x AS x S	0.054	2	0.027	229	0.0000
Error	0.004	36	0.000		
Total	1.297	47			
d) DHAR					
Tiempo(D)	0.970	1	0.970	3955	0.0000
AS	0.516	2	0.258	1052	0.0000
NaCl(S)	1.850	1	1.850	7543	0.0000
D x AS	0.094	2	0.047	191	0.0000
D x S	0.002	1	0.002	10	0.0039
AS x S	0.302	2	0.151	615	0.0000
D x AS x S	0.063	2	0.031	128	0.0000
Error	0.009	36	0.000		
Total	3.805	47			

Tabla A 3.43. Contenido de ascorbato reducido (AsA), dehidroascorbato (DHA) y ascorbato total (AsA+DHA) expresados en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PFN, y la relación ascorbato oxidado/ascorbato reducido (DHA/AsA) en nódulos de *M. sativa*

Tiempo (D)	AS (mM)	NaCl (mM)	AsA	DHA	AsA+DHA	DHA/AsA
6	0	0	0.614 ^a	0.566 ^{ef}	1.180 ^{de}	0.926 ^c
		200	0.530 ^{bc}	0.791 ^{bc}	1.320 ^a	1.494 ^{cde}
	0.1	0	0.466 ^{de}	0.723 ^{cd}	1.189 ^{cd}	1.601 ^{cd}
		200	0.373 ^{fg}	0.602 ^e	0.975 ^g	1.631 ^{cd}
	0.5	0	0.207 ⁱ	0.848 ^b	1.055 ^f	4.304 ^a
		200	0.289 ^h	0.964 ^a	1.252 ^{bc}	3.350 ^b
12	0	0	0.511 ^{cd}	0.798 ^{bc}	1.309 ^{ab}	1.567 ^{cd}
		200	0.566 ^{ab}	0.598 ^e	1.164 ^{de}	1.061 ^{de}
	0.1	0	0.427 ^{ef}	0.695 ^d	1.123 ^e	1.659 ^{cd}
		200	0.407 ^f	0.502 ^f	0.909 ^h	1.245 ^{de}
	0.5	0	0.348 ^g	0.534 ^{ef}	0.882 ^h	1.556 ^{cd}
		200	0.375 ^{fg}	0.777 ^{bcd}	1.152 ^{de}	2.098 ^c
MDS (P ≤ 0.05)			0.054	0.090	0.064	0.606

Tabla A 3.44. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) AsA					
Tiempo(D)	0.008	1	0.008	5.7	0.0221
AS	0.504	2	0.252	175.9	0.0000
NaCl(S)	0.000	1	0.000	0.3	0.6062
D x AS	0.048	2	0.024	16.7	0.0000
D x S	0.008	1	0.008	5.7	0.0221
AS x S	0.025	2	0.013	8.8	0.0008
D x AS x S	0.019	2	0.01	6.7	0.0033
Error	0.052	36	0.001		
Total	0.664	47			
b) DHA					
Tiempo(D)	0.115	1	0.115	26.01	0.0000
AS	0.183	2	0.092	20.64	0.0000
NaCl(S)	0.002	1	0.002	0.37	0.5454
D x AS	0.152	2	0.076	17.14	0.0000
D x S	0.046	1	0.046	10.30	0.0028
AS x S	0.226	2	0.113	25.48	0.0000
D x AS x S	0.156	2	0.078	17.61	0.0000
Error	0.160	36	0.004		
Total	1.041	47			
c) AsA+DHA					
Tiempo(D)	0.062	1	0.062	25.70	0.0000
AS	0.342	2	0.171	70.60	0.0000
NaCl(S)	0.000	1	0.000	0.18	0.6720
D x AS	0.030	2	0.015	6.27	0.0046
D x S	0.015	1	0.015	6.29	0.0168
AS x S	0.401	2	0.201	82.97	0.0000
D x AS x S	0.072	2	0.036	14.90	0.0000
Error	0.087	36	0.002		
Total	1.010	47			
d) DHA/AsA					
Tiempo(D)	5.66	1	5.66	30.74	0.0000
AS	22.38	2	11.19	60.82	0.0000
NaCl(S)	0.18	1	0.18	0.98	0.3295
D x AS	10.49	2	5.25	28.51	0.0000
D x S	0.00	1	0.00	0.00	0.9762
AS x S	0.14	2	0.07	0.38	0.6856
D x AS x S	3.59	2	1.79	9.75	0.0004
Error	6.62	36	0.18		
Total	49.06	47			

Tabla A 3.45. Contenido de glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG) y glutatión total (GSH+GSSG) expresados en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PFN, y la relación glutatión oxidado/glutatión reducido (GSSG/GSH) en nódulos de *M. sativa*

Tiempo (D)	AS (mM)	NaCl (mM)	GSH	GSSG	GSH+GSSG	GSSG/GSH
6	0	0	0.123 ^h	0.085 ^f	0.207 ^j	0.694 ^{ab}
		200	0.138 ^g	0.090 ^e	0.228 ⁱ	0.655 ^{bc}
	0.1	0	0.169 ^e	0.102 ^c	0.272 ^{ef}	0.605 ^{de}
		200	0.171 ^{de}	0.109 ^b	0.280 ^e	0.642 ^{cd}
	0.5	0	0.156 ^f	0.085 ^f	0.242 ^h	0.548 ^f
		200	0.156 ^f	0.113 ^a	0.269 ^f	0.725 ^a
12	0	0	0.311 ^a	0.055 ^g	0.367 ^b	0.177 ⁱ
		200	0.294 ^b	0.053 ^g	0.348 ^c	0.182 ⁱ
	0.1	0	0.302 ^{ab}	0.087 ^f	0.389 ^a	0.289 ^h
		200	0.201 ^c	0.096 ^d	0.297 ^d	0.477 ^g
	0.5	0	0.162 ^{ef}	0.092 ^e	0.254 ^g	0.570 ^{ef}
		200	0.180 ^d	0.090 ^e	0.270 ^f	0.498 ^g
MDS ($P \leq 0.05$)			0.010	0.002	0.009	0.045

Tabla A 3.46. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) GSH					
Tiempo(D)	0.097	1	0.097	1824	0.0000
AS	0.027	2	0.014	255	0.0000
NaCl(S)	0.004	1	0.004	82	0.0000
D x AS	0.050	2	0.025	472	0.0000
D x S	0.003	1	0.003	47	0.0000
AS x S	0.007	2	0.004	66	0.0000
D x AS x S	0.008	2	0.004	79	0.0000
Error	0.002	36	0.000		
Total	0.198	47			
b) GSSG					
Tiempo(D)	0.004	1	0.004	1001	0.0000
AS	0.007	2	0.004	885	0.0000
NaCl(S)	0.000	1	0.000	88	0.0000
D x AS	0.001	2	0.001	165	0.0000
D x S	0.000	1	0.000	48	0.0000
AS x S	0.001	2	0.000	66	0.0000
D x AS x S	0.001	2	0.000	88	0.0000
Error	0.000	36	0.000		
Total	0.015	47			

Apéndice

c) GSH+GSSG					
Tiempo(D)	0.061	1	0.061	1354	0.0000
AS	0.021	2	0.010	233	0.0000
NaCl(S)	0.002	1	0.002	49	0.0000
D x AS	0.035	2	0.018	392	0.0000
D x S	0.004	1	0.004	91	0.0000
AS x S	0.008	2	0.004	93	0.0000
D x AS x S	0.006	2	0.003	69	0.0000
Error	0.002	36	0.000		
Total	0.139	47			
d) GSSG/GSH					
Tiempo(D)	0.936	1	0.936	914.3	0.0000
AS	0.201	2	0.100	98.1	0.0000
NaCl(S)	0.046	1	0.046	45.4	0.0000
D x AS	0.317	2	0.158	154.8	0.0000
D x S	0.006	1	0.006	5.7	0.0228
AS x S	0.017	2	0.009	8.4	0.0010
D x AS x S	0.081	2	0.040	39.5	0.0000
Error	0.037	36	0.001		
Total	1.641	47			

Tabla A 3.47. Contenido de aminoácidos libres totales (Aa) expresados en mg asparragina g⁻¹ PF, prolina (Pro) en mg prolina g⁻¹ PF y azúcares solubles totales (Ast) expresados en mg glucosa g⁻¹ PF en hoja de *M. sativa*

Tiempo (D)	AS (mM)	NaCl (mM)	Aa	Pro	Ast
6	0	0	5.24 ^b	0.125 ^g	9.18 ^g
		200	6.95 ^a	0.775 ^c	17.63 ^c
	0.1	0	2.93 ^d	0.160 ^{fg}	10.01 ^g
		200	5.36 ^b	1.038 ^d	14.23 ^{ef}
12	0.5	0	3.97 ^c	0.142 ^{fg}	10.28 ^g
		200	3.01 ^d	0.749	13.87 ^{ef}
	0	0	3.13 ^d	0.125 ^g	13.07 ^f
		200	0.86 ^f	2.178 ^c	27.62 ^a
0.1	0	1.96 ^c	0.174 ^f	14.89 ^{de}	
	200	1.89 ^e	4.435 ^a	23.55 ^b	
0.5	0	4.03 ^c	0.152 ^{fg}	15.97 ^d	
	200	0.38 ^f	2.613 ^b	17.38 ^c	
MDS (P ≤ 0.05)			0.56	0.045	1.23

Tabla A 3.48. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Aa					
Tiempo(D)	76.9	1	76.94	496.1	0.0000
AS	13.3	2	6.64	42.8	0.0000
NaCl(S)	2.6	1	2.60	16.8	0.0002
D x AS	16.5	2	8.23	53.1	0.0000
D x S	27.9	1	27.93	180.1	0.0000
AS x S	24.5	2	12.23	78.9	0.0000
D x AS x S	1.3	2	0.64	4.1	0.0243
Error	5.6	36	0.16		
Total	168.5	47			
b) Pro					
Tiempo(D)	14.91	1	14.91	10765	0.0000
AS	3.87	2	1.94	1397	0.0000
NaCl(S)	39.66	1	39.66	28641	0.0000
D x AS	2.21	2	1.10	797	0.0000
D x S	14.70	1	14.70	10617	0.0000
AS x S	3.45	2	1.73	1246	0.0000
D x AS x S	2.15	2	1.08	777	0.0000
Error	0.05	36	0.00		
Total	81.00	47			
c) Ast					
Tiempo(D)	464	1	463.7	621.4	0.0000
AS	50	2	25.0	33.5	0.0000
NaCl(S)	557	1	557.4	746.8	0.0000
D x AS	16	2	7.8	10.5	0.0003
D x S	23	1	23.2	31.1	0.0000
AS x S	163	2	81.4	109.1	0.0000
D x AS x S	38	2	19.2	25.7	0.0000
Error	27	36	0.7		
Total	1338	47			

Tabla A 3.49. Contenido de aminoácidos libres totales (Aa) expresados en mg asparragina g⁻¹ PF, prolina (Pro) en mg prolina g⁻¹ PF y azúcares solubles totales (Ast) expresados en mg glucosa g⁻¹ PF en nódulo de *M. sativa*

Tiempo (D)	AS (mM)	NaCl (mM)	Aa	Pro	Ast
6	0	0	23.46 ^b	0.413 ^{ef}	6.05 ^k
		200	25.58 ^a	2.579 ^b	73.44 ^c
	0.1	0	20.70 ^d	0.363 ^f	8.39 ^j
		200	17.58 ^g	1.480 ^d	63.10 ^e
	0.5	0	18.42 ^f	0.375 ^{ef}	13.37 ⁱ
		200	19.37 ^e	1.537 ^d	69.71 ^d
12	0	0	22.09 ^e	0.471 ^e	32.28 ^h
		200	19.44 ^e	3.731 ^a	76.42 ^b
	0.1	0	19.63 ^e	0.123 ^g	43.37 ^g
		200	12.83 ⁱ	2.006 ^c	76.35 ^b
	0.5	0	14.78 ^h	0.359 ^f	51.71 ^f
		200	19.52 ^e	2.588 ^b	105.47 ^a
MDS (P ≤ 0.05)			0.64	0.101	0.75

Tabla A 3.50. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Aa					
Tiempo(D)	94.1	1	94.1	467.5	0.0000
AS	245.7	2	122.8	610.4	0.0000
NaCl(S)	7.6	1	7.6	37.6	0.0000
D x AS	8.1	2	4.1	20.2	0.0000
D x S	7.2	1	7.2	35.8	0.0000
AS x S	123.6	2	61.8	307.2	0.0000
D x AS x S	43.4	2	21.7	107.7	0.0000
Error	7.2	36	0.2		
Total	536.9	47			
b) Pro					
Tiempo(D)	2.13	1	2.13	410	0.0000
AS	1.97	2	0.99	190	0.0000
NaCl(S)	46.55	1	46.55	8956	0.0000
D x AS	1.91	2	0.96	184	0.0000
D x S	2.86	1	2.86	550	0.0000
AS x S	2.19	2	1.10	211	0.0000
D x AS x S	3.41	2	1.70	328	0.0000
Error	0.19	36	0.01		
Total	61.21	47			

c) Ast					
Tiempo(D)	7657	1	7657	27880	0.0000
AS	1060	2	530	1930	0.0000
NaCl(S)	31893	1	31893	116131	0.0000
D x AS	1567	2	783	2852	0.0000
D x S	754	1	754	2745	0.0000
AS x S	658	2	329	1198	0.0000
D x AS x S	62	2	31	113	0.0000
Error	10	36	0		
Total	43661	47			

Tabla A 3.51. Contenido de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) expresado en nmol MDA g⁻¹ PF y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en µmol g⁻¹ PF en hoja(h) y nódulo(n) de *M. sativa*

Tiempo (D)	AS (mM)	NaCl (mM)	TBARS(h)	TBARS(n)	H ₂ O ₂ (h)	H ₂ O ₂ (n)
6	0	0	16.33 ^g	26.96 ^g	0.438 ^g	0.533 ^h
		200	22.03 ^f	40.19 ^d	1.048 ^{cd}	0.664 ^c
	0.1	0	24.37 ^{dc}	41.65 ^{bcd}	0.879 ^e	0.631 ^f
		200	25.06 ^{dc}	41.14 ^{cd}	0.862 ^e	0.880 ^b
12	0.5	0	24.11 ^c	36.65 ^f	0.748 ^f	0.483 ⁱ
		200	25.70 ^{cd}	43.10 ^b	1.067 ^c	0.910 ^a
	0	0	22.15 ^f	17.53 ^h	0.900 ^e	0.483 ⁱ
		200	28.86 ^b	42.28 ^{bc}	1.471 ^a	0.523 ^h
0.1	0	26.90 ^c	26.01 ^g	1.157 ^b	0.606 ^g	
	200	35.51 ^a	50.82 ^a	1.057 ^{cd}	0.536 ^h	
0.5	0	36.20 ^a	27.53 ^g	0.767 ^f	0.811 ^c	
	200	34.11 ^b	38.35 ^e	1.012 ^d	0.790 ^d	
MDS (P ≤ 0.05)			1.34	1.65	0.045	0.014

Tabla A 3.52. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) TBARS(h)					
Tiempo(D)	710	1	709.6	796.0	0.0000
AS	507	2	253.3	284.1	0.0000
NaCl(S)	150	1	149.8	168.1	0.0000
D x AS	39	2	19.7	22.1	0.0000
D x S	9	1	9.2	10.3	0.0028
AS x S	91	2	45.4	51.0	0.0000
D x AS x S	68	2	33.9	38.1	0.0000
Error	32	36	0.9		
Total	1606	47			

Apéndice

b) TBARS(n)

Tiempo(D)	246	1	246	187	0.0000
AS	537	2	268	204	0.0000
NaCl(S)	2110	1	2110	1603	0.0000
D x AS	36	2	18	14	0.0000
D x S	566	1	566	430	0.0000
AS x S	222	2	111	84	0.0000
D x AS x S	227	2	113	86	0.0000
Error	47	36	1		
Total	3990	47			

c) H₂O₂(h)

Tiempo(D)	0.584	1	0.584	506.8	0.0000
AS	0.070	2	0.035	30.4	0.0000
NaCl(S)	0.884	1	0.884	767.0	0.0000
D x AS	0.426	2	0.213	184.8	0.0000
D x S	0.013	1	0.013	11.0	0.0021
AS x S	0.843	2	0.421	365.5	0.0000
D x AS x S	0.001	2	0.001	0.5	0.6146
Error	0.041	36	0.001		
Total	2.862	47			

d) H₂O₂(n)

Tiempo(D)	0.042	1	0.042	425	0.0000
AS	0.315	2	0.158	1612	0.0000
NaCl(S)	0.190	1	0.190	1948	0.0000
D x AS	0.176	2	0.088	898	0.0000
D x S	0.246	1	0.246	2514	0.0000
AS x S	0.036	2	0.018	182	0.0000
D x AS x S	0.065	2	0.033	334	0.0000
Error	0.004	36	0.000		
Total	1.073	47			

Tabla A 3.53. Contenido de ácido salicílico libre endógeno (AS) expresados en ng g⁻¹ PF y ácido abscísico libre endógeno (ABA) expresado en pmol g⁻¹ PF en hoja(h) y raíz(r) de *M. sativa*

Tiempo (D)	AS (mM)	NaCl (mM)	AS(h)	AS(r)	ABA(h)	ABA(r)
6	0	0	180.2 ^d	77.7 ^h	2682 ^c	28.23 ^c
		200	64.4 ^h	34.2 ⁱ	10010 ^a	64.74 ^b
	0.1	0	210.4 ^c	145.6 ^d	--	--
		200	121.1 ^g	134.6 ^c	--	--
	0.5	0	373.2 ^a	258.2 ^b	9710 ^a	76.29 ^a
		200	296.6 ^b	274.1 ^a	5870 ^b	17.07 ^e
12	0	0	137.1 ^f	120.3 ^{fg}	5279 ^b	22.95 ^d
		200	63.4 ^h	115.6 ^g	3430 ^c	30.71 ^c
	0.1	0	164.1 ^c	125.9 ^f	--	--
		200	181.2 ^d	118.3 ^g	--	--
	0.5	0	294.3 ^b	241.5 ^c	2679 ^c	14.98 ^e
		200	204.5 ^c	135.7 ^e	5317 ^b	18.38 ^e
MDS (P ≤ 0.05)			11.9	7.6	1446	3.66

Tabla A 3.54. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) AS(h)					
Tiempo(D)	6569	1	6569	93	0.0000
AS	273039	2	136519	1942	0.0000
NaCl(S)	61092	1	61092	869	0.0000
D x AS	24788	2	12394	176	0.0000
D x S	8726	1	8726	124	0.0000
AS x S	7714	2	3857	55	0.0000
D x AS x S	4539	2	2270	32	0.0000
Error	2531	36	70		
Total	388997	47			
b) AS(r)					
Tiempo(D)	140444	1	140444	4918	0.0000
AS	28171	2	14086	493	0.0000
NaCl(S)	4983	1	4983	175	0.0000
D x AS	25729	2	12865	451	0.0000
D x S	1488	1	1488	52	0.0000
AS x S	8960	2	4480	157	0.0000
D x AS x S	7655	2	3827	134	0.0000
Error	1028	36	29		
Total	218458	47			

Apéndice

c) ABA(h)					
Tiempo(D)	66894313	1	66894313	68.1	0.0000
AS	2362666	1	2362666	2.4	0.1341
NaCl(S)	9146619	1	9146619	9.3	0.0055
D x AS	6482620	1	6482620	6.6	0.0169
D x S	3640117	1	3640117	3.7	0.0662
AS x S	22324513	1	22324513	22.7	0.0001
D x AS x S	122539460	1	122539460	124.7	0.0000
Error	23585289	24	982720		
Total	256975597	31			
d) ABA(r)					
Tiempo(D)	4932	1	4932	781.4	0.0000
AS	198	1	198	31.4	0.0000
NaCl(S)	67	1	67	10.5	0.0034
D x AS	214	1	214	33.9	0.0000
D x S	574	1	574	91.0	0.0000
AS x S	5009	1	5009	793.7	0.0000
D x AS x S	4175	1	4175	661.6	0.0000
Error	151	24	6		
Total	15320	31			

Tabla A 3.55. Contenido de diaminopropano (DAP), putrescina (PUT), cadaverina (CAD), espermidina (SPD) y espermina (SPM) expresado en nmol g⁻¹ PF en hoja de *M. sativa*

Tiempo (D)	AS (mM)	NaCl (mM)	DAP	PUT	CAD	SPD	SPM
6	0	0	34.74 ^a	27.06 ^a	22.32 ^a	121.74 ^a	79.90 ^a
		200	17.40 ^c	12.08 ^d	11.59 ^c	25.96 ^g	41.72 ^c
	0.5	0	13.07 ^d	19.04 ^b	11.98 ^c	88.67 ^b	80.55 ^a
		200	12.60 ^{dc}	11.15 ^e	10.21 ^d	35.36 ^e	24.35 ^d
12	0	0	19.97 ^b	12.24 ^{cd}	10.21 ^d	59.14 ^c	16.22 ^f
		200	10.63 ^f	11.20 ^e	13.75 ^b	21.35 ^h	54.11 ^b
	0.5	0	7.29 ^g	12.84 ^c	8.20 ^e	53.31 ^d	7.45 ^g
		200	12.03 ^e	11.56 ^{dc}	12.45 ^c	30.26 ^f	22.55 ^e
MDS (P ≤ 0.05)			1.01	0.74	0.93	0.95	1.26

Tabla A 3.56. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) DAP					
Tiempo(D)	389	1	388.9	814	0.0000
AS	712	1	711.9	1489	0.0000
NaCl(S)	251	1	251.4	526	0.0000
D x AS	115	1	115.3	241	0.0000
D x S	87	1	87.2	182	0.0000
AS x S	479	1	479.4	1003	0.0000

D x AS x S	4	1	3.9	8	0.0088
Error	11	24	0.5		
Total	2049	31			
b) PUT					
Tiempo(D)	230.8	1	230.8	891	0.0000
AS	32.0	1	32.0	123	0.0000
NaCl(S)	317.1	1	317.1	1224	0.0000
D x AS	49.2	1	49.2	190	0.0000
D x S	211.1	1	211.1	815	0.0000
AS x S	23.5	1	23.5	91	0.0000
D x AS x S	26.8	1	26.8	103	0.0000
Error	6.2	24	0.3		
Total	896.6	31			
c) CAD					
Tiempo(D)	65.9	1	65.9	159.9	0.0000
AS	112.9	1	112.9	273.7	0.0000
NaCl(S)	11.1	1	11.1	26.9	0.0000
D x AS	35.4	1	35.4	85.8	0.0000
D x S	205.8	1	205.8	498.8	0.0000
AS x S	46.7	1	46.7	113.1	0.0000
D x AS x S	34.1	1	34.1	82.6	0.0000
Error	9.9	24	0.4		
Total	521.7	31			
d) SPD					
Tiempo(D)	5798	1	5798	13474	0.0000
AS	212	1	212	493	0.0000
NaCl(S)	22034	1	22034	51205	0.0000
D x AS	358	1	358	831	0.0000
D x S	3894	1	3894	9051	0.0000
AS x S	1637	1	1637	3804	0.0000
D x AS x S	385	1	385	894	0.0000
Error	10	24	0		
Total	34327	31			
e) SPM					
Tiempo(D)	7960	1	7960	10610	0.0000
AS	1628	1	1628	2170	0.0000
NaCl(S)	856	1	856	1141	0.0000
D x AS	279	1	279	372	0.0000
D x S	10859	1	10859	14474	0.0000
AS x S	833	1	833	1110	0.0000
D x AS x S	11	1	11	15	0.0007
Error	18	24	1		
Total	22443	31			

Tabla A 3.57. Contenido de diaminopropano (DAP), putrescina (PUT), cadaverina (CAD), espermidina (SPD) y espermina (SPM) expresado en nmol g⁻¹ PF en raíz de *M. sativa*

Tiempo (D)	AS (mM)	NaCl (mM)	DAP	PUT	CAD	SPD	SPM
6	0	0	63.10 ^d	11.77 ^c	19.32 ^d	10.10 ^f	1.93 ^f
		200	75.70 ^c	12.37 ^b	28.22 ^a	19.14 ^b	3.35 ^c
	0.5	0	62.68 ^d	12.81 ^{ab}	21.15 ^c	11.25 ^c	6.03 ^c
		200	59.14 ^c	13.26 ^a	26.61 ^b	18.02 ^c	10.21 ^a
12	0	0	52.29 ^f	9.40 ^d	12.60 ^e	11.25 ^e	1.53 ^f
		200	77.68 ^b	11.46 ^c	18.44 ^d	18.36 ^{bc}	6.80 ^b
	0.5	0	87.03 ^a	12.68 ^{ab}	25.55 ^b	13.57 ^d	1.69 ^f
		200	44.95 ^g	12.97 ^a	28.36 ^a	26.33 ^a	5.31 ^d
MDS (P ≤ 0.05)			1.39	0.59	1.38	0.99	0.65

Tabla A 3.58. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) DAP					
Tiempo(D)	1	1	1	1	0.3350
AS	112	1	112	124	0.0000
NaCl(S)	29	1	29	32	0.0000
D x AS	180	1	180	199	0.0000
D x S	332	1	332	365	0.0000
AS x S	3496	1	3496	3853	0.0000
D x AS x S	1317	1	1317	1452	0.0000
Error	22	24	1		
Total	5489	31			
b) PUT					
Tiempo(D)	6.84	1	6.84	41.4	0.0000
AS	22.57	1	22.57	136.5	0.0000
NaCl(S)	5.73	1	5.73	34.7	0.0000
D x AS	4.10	1	4.10	24.8	0.0000
D x S	0.85	1	0.85	5.1	0.0329
AS x S	1.86	1	1.86	11.2	0.0027
D x AS x S	1.30	1	1.30	7.9	0.0097
Error	3.97	24	0.17		
Total	47.22	31			
c) CAD					
Tiempo(D)	53.6	1	53.6	59.7	0.0000
AS	266.4	1	266.4	296.7	0.0000
NaCl(S)	264.7	1	264.7	294.8	0.0000
D x AS	256.4	1	256.4	285.6	0.0000
D x S	16.4	1	16.4	18.2	0.0003
AS x S	20.8	1	20.8	23.2	0.0001

D x AS x S	0.1	1	0.1	0.1	0.7644
Error	21.6	24	0.9		
Total	900.0	31			
d) SPD					
Tiempo(D)	60.4	1	60.4	130	0.0000
AS	53.2	1	53.2	114	0.0000
NaCl(S)	636.4	1	636.4	1368	0.0000
D x AS	52.6	1	52.6	113	0.0000
D x S	8.3	1	8.3	18	0.0003
AS x S	5.7	1	5.7	12	0.0018
D x AS x S	31.3	1	31.3	67	0.0000
Error	11.2	24	0.5		
Total	859.1	31			
e) SPM					
Tiempo(D)	19.2	1	19.2	115.1	0.0000
AS	46.5	1	46.5	279.5	0.0000
NaCl(S)	105.0	1	105.0	630.7	0.0000
D x AS	75.5	1	75.5	453.6	0.0000
D x S	5.4	1	5.4	32.5	0.0000
AS x S	0.6	1	0.6	3.7	0.0659
D x AS x S	9.7	1	9.7	58.4	0.0000
Error	4.0	24	0.2		
Total	266.0	31			

Tabla A 3.59. Contenido de diaminopropano (DAP), putrescina (PUT), cadaverina (CAD), espermidina (SPD) y espermina (SPM) expresado en nmol g⁻¹ PF en nódulo de *M. sativa*

Tiempo (D)	AS (mM)	NaCl (mM)	DAP	PUT	CAD	SPD	SPM
6	0	0	26.41 ^f	27.86 ^d	15.65 ^e	27.68 ^c	5.31 ^e
		200	16.59 ^g	48.02 ^a	37.50 ^b	17.86 ^c	3.13 ^f
	0.5	0	39.74 ^c	35.00 ^b	23.39 ^d	25.68 ^d	9.57 ^c
		200	43.57 ^b	30.36 ^c	50.52 ^a	15.44 ^f	3.09 ^f
12	0	0	40.42 ^c	23.91 ^e	9.95 ^g	48.91 ^b	6.69 ^d
		200	37.11 ^d	25.23 ^e	35.63 ^c	53.80 ^a	19.95 ^a
	0.5	0	29.64 ^e	18.10 ^g	12.03 ^f	12.58 ^g	14.24 ^b
		200	48.57 ^a	20.65 ^f	37.37 ^b	8.46 ^h	6.51 ^d
MDS (P ≤ 0.05)			1.63	1.32	1.20	1.18	0.61

Tabla A 3.60. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) DAP					
Tiempo(D)	433	1	433.0	343.7	0.0000
AS	840	1	840.1	666.8	0.0000
NaCl(S)	46	1	46.4	36.8	0.0000

Apéndice

D x AS	785	1	785.5	623.5	0.0000
D x S	234	1	233.6	185.4	0.0000
AS x S	644	1	643.9	511.1	0.0000
D x AS x S	37	1	36.9	29.3	0.0000
Error	30	24	1.3		
Total	3050	31			
b) PUT					
Tiempo(D)	1424	1	1424	1737	0.0000
AS	219	1	219	267	0.0000
NaCl(S)	188	1	188	230	0.0000
D x AS	0	1	0	0	0.9198
D x S	68	1	68	83	0.0000
AS x S	278	1	278	339	0.0000
D x AS x S	338	1	338	413	0.0000
Error	20	24	1		
Total	2534	31			
c) CAD					
Tiempo(D)	515	1	515	750	0.0000
AS	302	1	302	440	0.0000
NaCl(S)	5000	1	5000	7284	0.0000
D x AS	143	1	143	209	0.0000
D x S	2	1	2	3	0.0958
AS x S	12	1	12	18	0.0003
D x AS x S	16	1	16	23	0.0001
Error	16	24	1		
Total	6007	31			
d) SPD					
Tiempo(D)	688	1	688	1054	0.0000
AS	3706	1	3706	5679	0.0000
NaCl(S)	186	1	186	285	0.0000
D x AS	2983	1	2983	4571	0.0000
D x S	217	1	217	333	0.0000
AS x S	44	1	44	68	0.0000
D x AS x S	37	1	37	57	0.0000
Error	16	24	1		
Total	7876	31			
e) SPM					
Tiempo(D)	345.9	1	345.9	1958	0.0000
AS	1.4	1	1.4	8	0.0098
NaCl(S)	5.0	1	5.0	28	0.0000
D x AS	51.0	1	51.0	289	0.0000
D x S	100.7	1	100.7	570	0.0000
AS x S	319.7	1	319.7	1810	0.0000
D x AS x S	139.3	1	139.3	789	0.0000
Error	4.2	24	0.2		
Total	967.3	31			

Tabla A 4.1. Peso seco de planta (PSP), peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco raíz (PSR) en g planta⁻¹, y relación raíz/parte aérea (RPA) en plantas de *P. vulgaris*

Tiempo (D)	ABA (μM)	NaCl (mM)	PSP	PSPA	PSR	RPA
3	0	0	2.00 ^d	1.49 ^c	0.389 ^{cde}	0.261 ^{bcd}
		100	1.18 ^g	0.87 ^e	0.246 ^f	0.285 ^{bcd}
	1	0	2.03 ^{cd}	1.51 ^c	0.351 ^{de}	0.234 ^{cde}
		100	1.50 ^{fg}	1.03 ^{de}	0.375 ^{cde}	0.361 ^a
	10	0	1.79 ^{def}	1.30 ^{cd}	0.389 ^{cde}	0.316 ^{ab}
		100	1.51 ^{efg}	1.10 ^{de}	0.303 ^{ef}	0.279 ^{bcd}
6	0	0	3.51 ^a	2.66 ^a	0.566 ^a	0.217 ^{de}
		100	2.75 ^b	2.08 ^b	0.466 ^{bc}	0.225 ^{de}
	1	0	1.96 ^{de}	1.49 ^c	0.329 ^{def}	0.224 ^{de}
		100	1.64 ^{def}	1.01 ^{de}	0.306 ^{ef}	0.301 ^{abc}
	10	0	2.70 ^b	1.97 ^b	0.529 ^{ab}	0.271 ^{bcd}
		100	2.46 ^{bc}	1.91 ^b	0.408 ^{cd}	0.215 ^e
MDS (P ≤ 0.05)			0.45	0.36	0.099	0.069

Tabla A 4.2. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) PSP					
Tiempo(D)	8.43	1	8.43	84.70	0.0000
ABA	2.68	2	1.34	13.43	0.0000
NaCl(S)	2.94	1	2.94	29.53	0.0000
D x ABA	4.56	2	2.28	22.88	0.0000
D x S	0.03	1	0.03	0.34	0.5622
ABA x S	0.61	2	0.30	3.04	0.0602
D x ABA x S	0.02	2	0.01	0.09	0.9184
Error	3.58	36	0.10		
Total	22.85	47			
b) PSPA					
Tiempo(D)	4.88	1	4.88	75.45	0.0000
ABA	2.12	2	1.06	16.43	0.0000
NaCl(S)	1.97	1	1.97	30.43	0.0000
D x ABA	3.02	2	1.51	23.35	0.0000
D x S	0.01	1	0.01	0.16	0.6899
ABA x S	0.48	2	0.24	3.68	0.0353
D x ABA x S	0.01	2	0.00	0.06	0.9406
Error	2.33	36	0.07		
Total	14.81	47			
c) PSR					
Tiempo(D)	0.101	1	0.101	21.11	0.0001
ABA	0.055	2	0.028	5.78	0.0067

Apéndice

NaCl(S)	0.067	1	0.067	14.03	0.0006
D x ABA	0.124	2	0.062	12.94	0.0001
D x S	0.001	1	0.001	0.11	0.7473
ABA x S	0.034	2	0.017	3.59	0.0378
D x ABA x S	0.005	2	0.002	0.51	0.6057
Error	0.173	36	0.005		
Total	0.561	47			
d) RPA					
Tiempo(D)	0.026	1	0.026	11.29	0.0019
ABA	0.009	2	0.005	1.99	0.1518
NaCl(S)	0.007	1	0.007	2.92	0.0962
D x ABA	0.001	2	0.000	0.20	0.8181
D x S	0.002	1	0.002	1.03	0.3163
ABA x S	0.044	2	0.022	9.46	0.0005
D x ABA x S	0.001	2	0.000	0.15	0.8622
Error	0.084	36	0.002		
Total	0.175	47			

Tabla A 4.3. 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 $\mu\text{mol de N}_2 \text{ g}^{-1} \text{ PSN h}^{-1}$, peso seco de nódulos (PSN) en mg planta^{-1} y peso normalizado de nódulos (PNN) en $\text{mg PSN mg}^{-1} \text{ PSPA}$ en *P. vulgaris*

Tiempo (D)	ABA (μM)	NaCl (mM)	ANA	ANT	TFN	PSN	PNN
	0	0	26.04 ^c	110 ^c	32.92 ^b	0.128 ^{def}	0.086 ^{bcd}
		100	12.43 ^d	101 ^c	30.36 ^b	0.063 ^g	0.074 ^d
3	1	0	31.99 ^b	162 ^b	43.55 ^a	0.164 ^{bcd}	0.108 ^b
		100	23.73 ^c	105 ^c	28.73 ^b	0.093 ^{fg}	0.090 ^{bcd}
	10	0	48.51 ^a	192 ^a	47.92 ^a	0.104 ^{efg}	0.080 ^{cd}
		100	32.15 ^b	178 ^{ab}	48.63 ^a	0.103 ^{efg}	0.096 ^{bcd}
6	0	0	28.46 ^{bc}	168 ^b	46.68 ^a	0.287 ^a	0.107 ^b
		100	7.31 ^{ef}	22 ^{de}	5.06 ^d	0.201 ^b	0.096 ^{bcd}
	1	0	2.77 ^f	17 ^e	4.62 ^d	0.145 ^{cdef}	0.099 ^{bcd}
		100	7.84 ^{de}	19 ^{de}	3.67 ^d	0.125 ^{def}	0.324 ^a
	10	0	8.89 ^{de}	30 ^{de}	7.04 ^{cd}	0.200 ^{bc}	0.102 ^{bc}
		100	5.27 ^{ef}	40 ^d	11.66 ^c	0.151 ^{bcd}	0.079 ^{cd}
MDS ($P \leq 0.05$)			4.86	21	6.04	0.055	0.026

Tabla A 4.4. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) ANA					
Tiempo(D)	4355	1	4355	375.5	0.0000

ABA	432	2	216	18.6	0.0000
NaCl(S)	1118	1	1118	96.4	0.0000
D x ABA	2109	2	1055	90.9	0.0000
D x S	114	1	114	9.9	0.0034
ABA x S	499	2	249	21.5	0.0000
D x ABA x S	283	2	141	12.2	0.0001
Error	417	36	12		
Total	9327	47			
b) ANT					
Tiempo(D)	101400	1	101400	458.3	0.0000
ABA	10235	2	5118	23.1	0.0000
NaCl(S)	15351	1	15351	69.4	0.0000
D x ABA	42458	2	21229	96.0	0.0000
D x S	920	1	920	4.2	0.0489
ABA x S	11903	2	5952	26.9	0.0000
D x ABA x S	21818	2	10909	49.3	0.0000
Error	7965	36	221		
Total	212050	47			
c) TFN					
Tiempo(D)	7843	1	7843	438.9	0.0000
ABA	797	2	398	22.3	0.0000
NaCl(S)	995	1	995	55.7	0.0000
D x ABA	2446	2	1223	68.5	0.0000
D x S	151	1	151	8.5	0.0062
ABA x S	1234	2	617	34.5	0.0000
D x ABA x S	1583	2	791	44.3	0.0000
Error	643	36	18		
Total	15691	47			
d) PSN					
Tiempo(D)	0.142	1	0.142	92.99	0.0000
ABA	0.015	2	0.008	5	0.0121
NaCl(S)	0.003	1	0.003	1.81	0.1868
D x ABA	0.012	2	0.006	3.78	0.0322
D x S	0.011	1	0.011	7.18	0.0110
ABA x S	0.034	2	0.017	11.13	0.0002
D x ABA x S	0.055	2	0.028	18.03	0.0000
Error	0.055	36	0.002		
Total	0.327	47			
e) PNN					
Tiempo(D)	0.025	1	0.025	72.78	0.0000
ABA	0.046	2	0.023	66.69	0.0000
NaCl(S)	0.010	1	0.01	30.57	0.0000
D x ABA	0.028	2	0.014	40.49	0.0000
D x S	0.014	1	0.014	41.91	0.0000
ABA x S	0.033	2	0.017	48.36	0.0000
D x ABA x S	0.047	2	0.023	68.23	0.0000
Error	0.012	36	0.000		
Total	0.215	47			

Tabla A 4.5. Actividad superóxido dismutasa (SOD) expresada U mg⁻¹ prot, catalasa (CAT) en µmol H₂O₂ mg⁻¹ prot min⁻¹, guaiacol peroxidasa (POX) en µmol H₂O₂ mg⁻¹ prot min⁻¹ y actividad lipoxigenasa (LOX) en µmol mg⁻¹ prot min⁻¹ en nódulos de *P. vulgaris*

Tiempo (D)	ABA (µM)	NaCl (mM)	SOD	CAT	POX	LOX
3	0	0	0.0912 ^d	58.23 ^c	1.04 ^g	0.484 ^c
		100	0.1081 ^a	26.85 ^h	2.41 ^a	0.570 ^a
	1	0	0.0955 ^{cd}	69.24 ^d	0.98 ^{gh}	0.213 ^j
		100	0.0930 ^d	71.69 ^c	0.95 ^h	0.440 ^d
	10	0	0.0960 ^{bcd}	80.11 ^a	0.96 ^h	0.325 ^h
		100	0.0915 ^d	75.54 ^b	1.14 ^f	0.338 ^h
6	0	0	0.0806 ^e	36.16 ^g	0.60 ^g	0.364 ^g
		100	0.1025 ^{ab}	15.40 ⁱ	1.74 ^b	0.422 ^e
	1	0	0.1001 ^{bc}	40.76 ^f	1.53 ^d	0.260 ⁱ
		100	0.0825 ^e	39.50 ^f	1.29 ^e	0.523 ^b
	10	0	0.0666 ^f	39.32 ^f	1.60 ^c	0.211 ^j
		100	0.0616 ^f	35.35 ^g	0.98 ^{gh}	0.398 ^f
MDS (P ≤ 0.05)			0.0065	1.63	0.06	0.017

Tabla A 4.6. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) SOD					
Tiempo(D)	0.0022	1	0.0022	103.2	0.0000
ABA	0.0025	2	0.0013	59.4	0.0000
NaCl(S)	0.0000	1	0.0000	1.4	0.2525
D x ABA	0.0016	2	0.0008	37.4	0.0000
D x S	0.0000	1	0.0000	1.7	0.1949
ABA x S	0.0020	2	0.0010	46.0	0.0000
D x ABA x S	0.0002	2	0.0001	4.9	0.0129
Error	0.0008	36	0.0000		
Total	0.0094	47			
b) CAT					
Tiempo(D)	11429	1	11429	8743	0.0000
ABA	1061	2	531	406	0.0000
NaCl(S)	30	1	30	23	0.0000
D x ABA	703	2	352	269	0.0000
D x S	2	1	2	2	0.2145
ABA x S	49	2	24	19	0.0000
D x ABA x S	12	2	6	5	0.0152
Error	47	36	1		
Total	13334	47			

c) POX					
Tiempo(D)	0.02	1	0.023	13	0.0010
ABA	0.77	2	0.383	218	0.0000
NaCl(S)	1.08	1	1.082	615	0.0000
D x ABA	2.23	2	1.117	635	0.0000
D x S	0.50	1	0.499	284	0.0000
ABA x S	5.50	2	2.752	1565	0.0000
D x ABA x S	0.22	2	0.111	63	0.0000
Error	0.06	36	0.002		
Total	10.39	47			
d) LOX					
Tiempo(D)	0.012	1	0.012	87	0.0000
ABA	0.171	2	0.085	594	0.0000
NaCl(S)	0.014	1	0.014	100	0.0000
D x ABA	0.079	2	0.039	275	0.0000
D x S	0.218	1	0.218	1520	0.0000
ABA x S	0.028	2	0.014	96	0.0000
D x ABA x S	0.074	2	0.037	256	0.0000
Error	0.005	36	0.000		
Total	0.601	47			

Tabla A 4.7. Actividad superóxido dismutasa (SOD) expresada U g⁻¹ PFN, catalasa (CAT) en $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ PFN min}^{-1}$, guaiacol peroxidasa (POX) en $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ PFN min}^{-1}$ y actividad lipoxigenasa (LOX) en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ PFN min}^{-1}$ en nódulos de *P. vulgaris*

Tiempo (D)	ABA (μM)	NaCl (mM)	SOD	CAT	POX	LOX	
	0	0	12.07 ^a	3404 ^a	55.49 ^d	30.56 ^a	
		100	11.57 ^a	3233 ^{bc}	121.35 ^a	23.72 ^c	
	3	1	0	8.84 ^d	3179 ^c	40.94 ^{fg}	14.88 ^f
			100	8.62 ^d	3257 ^b	51.37 ^e	7.20 ^j
	10	0	8.29 ^{dc}	2939 ^e	38.91 ^g	11.74 ^h	
		100	7.82 ^{ef}	3096 ^d	42.35 ^f	13.66 ^g	
	6	0	0	9.53 ^{bc}	2011 ^f	26.11 ⁱ	18.86 ^e
			100	9.79 ^b	1647 ^g	62.20 ^b	20.06 ^d
	1	0	11.44 ^a	1988 ^f	58.42 ^c	14.98 ^f	
		100	8.93 ^{cd}	1939 ^f	58.98 ^c	24.72 ^b	
	10	0	7.30 ^f	1711 ^g	50.98 ^e	10.50 ⁱ	
		100	5.80 ^g	1527 ^h	30.79 ^h	19.10 ^e	
MDS (P \leq 0.05)			0.66	75	2.35	0.74	

Tabla 4.8. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) SOD					
Tiempo(D)	6.5	1	6.53	30.0	0.0000
ABA	96.7	2	48.37	222.0	0.0000
NaCl(S)	8.1	1	8.12	37.3	0.0000
D x ABA	29.8	2	14.88	68.3	0.0000
D x S	2.2	1	2.17	9.9	0.0033
ABA x S	3.3	2	1.63	7.5	0.0019
D x ABA x S	4.7	2	2.37	10.9	0.0002
Error	7.8	36	0.22		
Total	159.2	47			
b) CAT					
Tiempo(D)	22876529	1	22876529	8177	0.0000
ABA	743990	2	371995	133	0.0000
NaCl(S)	94372	1	94372	34	0.0000
D x ABA	112282	2	56141	20	0.0000
D x S	145197	1	145197	52	0.0000
ABA x S	192212	2	96106	34	0.0000
D x ABA x S	23960	2	11980	4	0.0215
Error	100712	36	2798		
Total	24289254	47			
c) POX					
Tiempo(D)	1320	1	1320	485	0.0000
ABA	5227	2	2614	960	0.0000
NaCl(S)	3085	1	3085	1133	0.0000
D x ABA	7148	2	3574	1312	0.0000
D x S	1334	1	1334	490	0.0000
ABA x S	7711	2	3856	1416	0.0000
D x ABA x S	208	2	104	38	0.0000
Error	98	36	3		
Total	26132	47			
d) LOX					
Tiempo(D)	14	1	13.9	51	0.0000
ABA	831	2	415.4	1531	0.0000
NaCl(S)	16	1	16.1	59	0.0000
D x ABA	550	2	275.1	1014	0.0000
D x S	344	1	344.3	1269	0.0000
ABA x S	131	2	65.3	241	0.0000
D x ABA x S	68	2	34.2	126	0.0000
Error	10	36	0.3		
Total	1964	47			

Tabla A 4.9. Actividad ascorbato peroxidasa (APX) expresada $\mu\text{mol asc mg}^{-1} \text{prot min}^{-1}$, monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) en $\mu\text{mol NADH mg}^{-1} \text{prot min}^{-1}$, glutation reductasa (GR) en $\mu\text{mol NADPH mg}^{-1} \text{prot min}^{-1}$ y dehidroascorbato reductasa (DHAR) en $\mu\text{mol asc mg}^{-1} \text{prot min}^{-1}$ en nódulos de *P. vulgaris*

Tiempo (D)	ABA (μM)	NaCl (mM)	APX	MDHAR	GR	DHAR	
	0	0	0.480 ^a	0.0097 ^{ab}	0.0036 ^d	0.0016 ^f	
		100	0.349 ^{de}	0.0075 ^d	0.0046 ^a	0.0020 ^e	
	3	1	0	0.382 ^c	0.0087 ^c	0.0023 ^g	0.0017 ^f
			100	0.300 ^{fg}	0.0072 ^{de}	0.0044 ^{ab}	0.0036 ^b
	10	0	0.291 ^g	0.0100 ^a	0.0027 ^f	0.0028 ^c	
		100	0.357 ^{cd}	0.0095 ^{ab}	0.0030 ^e	0.0026 ^c	
	6	0	0	0.415 ^b	0.0065 ^f	0.0038 ^{cd}	0.0038 ^b
			100	0.323 ^{ef}	0.0066 ^{ef}	0.0039 ^c	0.0051 ^a
	1	0	0.352 ^d	0.0084 ^c	0.0028 ^{ef}	0.0016 ^f	
		100	0.254 ^h	0.0073 ^{de}	0.0029 ^{ef}	0.0023 ^d	
	10	0	0.363 ^{cd}	0.0073 ^{de}	0.0037 ^{cd}	0.0028 ^c	
		100	0.233 ^h	0.0090 ^b	0.0043 ^b	0.0027 ^c	
MDS ($P \leq 0.05$)			0.027	0.0007	0.0002	0.0002	

Tabla A 4.10. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) APX					
Tiempo(D)	0.016	1	0.016	43.374	0.0000
ABA	0.034	2	0.017	45.458	0.0000
NaCl(S)	0.073	1	0.073	193.898	0.0000
D x ABA	0.011	2	0.005	14.218	0.0000
D x S	0.010	1	0.010	26.128	0.0000
ABA x S	0.016	2	0.008	21.606	0.0000
D x ABA x S	0.045	2	0.023	60.177	0.0000
Error	0.014	36	0.000		
Total	0.219	47			
b) MDHAR					
Tiempo(D)	19×10^{-6}	1	19×10^{-6}	72.05	0.0000
ABA	16×10^{-6}	2	8×10^{-6}	31.23	0.0000
NaCl(S)	4×10^{-6}	1	4×10^{-6}	15.77	0.0003
D x ABA	8×10^{-6}	2	4×10^{-6}	15.57	0.0000
D x S	8×10^{-6}	1	8×10^{-6}	29.58	0.0000
ABA x S	9×10^{-6}	2	4×10^{-6}	16.68	0.0000
D x ABA x S	2×10^{-6}	2	1×10^{-6}	4.06	0.0256
Error	9×10^{-6}	36	1×10^{-6}		
Total	76×10^{-6}	47			
c) GR					

Apéndice

Tiempo(D)	1x 10 ⁻⁶	1	3x 10 ⁻⁷	8.4	0.0063
ABA	6x 10 ⁻⁶	2	32x 10 ⁻⁷	92.5	0.0000
NaCl(S)	1x 10 ⁻⁶	1	13x 10 ⁻⁷	36.2	0.0000
D x ABA	7x 10 ⁻⁶	2	33x 10 ⁻⁷	94.7	0.0000
D x S	5x 10 ⁻⁶	1	49x 10 ⁻⁷	140.6	0.0000
ABA x S	4x 10 ⁻⁶	2	22x 10 ⁻⁷	63.1	0.0000
D x ABA x S	2x 10 ⁻⁶	2	9x 10 ⁻⁷	27.2	0.0000
Error	1x 10 ⁻⁶	36	1x 10 ⁻⁷		
Total	27x 10 ⁻⁶	47			
d) DHAR					
Tiempo(D)	5x 10 ⁻⁶	1	51x 10 ⁻⁷	193.8	0.0000
ABA	5x 10 ⁻⁶	2	27x 10 ⁻⁷	101.2	0.0000
NaCl(S)	1x 10 ⁻⁶	1	14x 10 ⁻⁷	54.0	0.0000
D x ABA	24x 10 ⁻⁶	2	121x 10 ⁻⁷	460.4	0.0000
D x S	3x 10 ⁻⁶	1	29x 10 ⁻⁷	111.0	0.0000
ABA x S	6x 10 ⁻⁶	2	31x 10 ⁻⁷	116.3	0.0000
D x ABA x S	1x 10 ⁻⁶	2	7x 10 ⁻⁷	27.4	0.0000
Error	1x 10 ⁻⁶	36	1x 10 ⁻⁷		
Total	48x 10 ⁻⁶	47			

Tabla A 4.11. Actividad ascorbato peroxidasa (APX) expresada $\mu\text{mol asc g}^{-1} \text{ PFN min}^{-1}$, monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) en $\mu\text{mol NADH g}^{-1} \text{ PFN min}^{-1}$, glutation reductasa (GR) en $\mu\text{mol NADPH g}^{-1} \text{ PFN min}^{-1}$ y dehidroascorbato reductasa (DHAR) en $\mu\text{mol asc g}^{-1} \text{ PFN min}^{-1}$ en nódulos de *P. vulgaris*

Tiempo (D)	ABA (μM)	NaCl (mM)	APX	MDHAR	GR	DHAR	
	0	0	25.60 ^a	0.517 ^a	0.246 ^a	0.1086 ^d	
		100	17.55 ^b	0.378 ^{bcd}	0.180 ^b	0.0804 ^{gh}	
	3	1	0	15.91 ^c	0.362 ^{cde}	0.184 ^b	0.1504 ^c
			100	16.15 ^c	0.387 ^{bc}	0.123 ^e	0.0935 ^{ef}
	10	0	11.74 ^c	0.403 ^b	0.108 ^{fg}	0.1112 ^d	
		100	13.31 ^d	0.355 ^{de}	0.111 ^{fg}	0.0955 ^c	
	6	0	0	15.32 ^c	0.285 ^g	0.166 ^c	0.1645 ^b
			100	11.52 ^c	0.235 ^h	0.140 ^d	0.1809 ^a
	1	0	15.86 ^c	0.320 ^f	0.106 ^g	0.0875 ^{efg}	
		100	11.57 ^e	0.332 ^{ef}	0.134 ^d	0.0718 ^h	
	10	0	11.52 ^e	0.232 ^h	0.117 ^{ef}	0.0896 ^{efg}	
		100	7.29 ^f	0.281 ^g	0.136 ^d	0.0841 ^{fg}	
MDS ($P \leq 0.05$)			1.04	0.031	0.010	0.0095	

Tabla 4.12. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) APX					
Tiempo(D)	246.4	1	246.4	463.4	0.0000
ABA	346.1	2	173.0	325.4	0.0000
NaCl(S)	114.9	1	114.9	216.1	0.0000
D x ABA	80.1	2	40.1	75.3	0.0000
D x S	12.3	1	12.3	23.2	0.0000
ABA x S	49.1	2	24.6	46.2	0.0000
D x ABA x S	59.9	2	29.9	56.3	0.0000
Error	19.1	36	0.5		
Total	927.9	47			
b) MDHAR					
Tiempo(D)	0.171	1	0.171	356.0	0.0000
ABA	0.013	2	0.006	13.2	0.0001
NaCl(S)	0.008	1	0.008	15.9	0.0003
D x ABA	0.039	2	0.019	40.3	0.0000
D x S	0.010	1	0.010	21.0	0.0001
ABA x S	0.030	2	0.015	31.0	0.0000
D x ABA x S	0.008	2	0.004	8.0	0.0014
Error	0.017	36	0.000		
Total	0.295	47			
c) GR					
Tiempo(D)	0.0078	1	0.0078	140.3	0.0000
ABA	0.0364	2	0.0182	328.9	0.0000
NaCl(S)	0.0036	1	0.0036	64.7	0.0000
D x ABA	0.0123	2	0.0061	111.1	0.0000
D x S	0.0071	1	0.0071	127.5	0.0000
ABA x S	0.0065	2	0.0032	58.5	0.0000
D x ABA x S	0.0028	2	0.0014	24.9	0.0000
Error	0.0020	36	0.0001		
Total	0.0783	47			
d) DHAR					
Tiempo(D)	0.0005	1	0.0005	11.1	0.0020
ABA	0.0138	2	0.0069	152.5	0.0000
NaCl(S)	0.0037	1	0.0037	82.4	0.0000
D x ABA	0.0322	2	0.0161	355.9	0.0000
D x S	0.0031	1	0.0031	68.1	0.0000
ABA x S	0.0021	2	0.0011	23.6	0.0000
D x ABA x S	0.0007	2	0.0004	8.0	0.0014
Error	0.0016	36	0.0000		
Total	0.0578	47			

Tabla A 4.13. Contenido de ascorbato reducido (AsA), dehidroascorbato (DHA) y ascorbato total (AsA+DHA) expresados en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PFN, y la relación ascorbato oxidado/ascorbato reducido (DHA/AsA) en nódulos de *P. vulgaris*

Tiempo (D)	ABA (μM)	NaCl (mM)	AsA	DHA	AsA+DHA	DHA/AsA
3	0	0	0.945 ^a	0.766 ^f	1.711 ^b	0.811 ^c
		100	0.598 ^{ef}	1.134 ^c	1.732 ^b	1.915 ^b
	1	0	0.655 ^{cd}	0.636 ^g	1.291 ^{ef}	0.974 ^{de}
		100	0.634 ^{de}	1.214 ^b	1.848 ^a	1.914 ^b
	10	0	0.573 ^f	0.993 ^d	1.566 ^c	1.737 ^b
		100	0.436 ^g	1.327 ^a	1.764 ^b	3.043 ^a
6	0	0	0.732 ^b	0.702 ^{fg}	1.434 ^d	0.960 ^e
		100	0.564 ^f	0.666 ^g	1.230 ^f	1.185 ^{cd}
	1	0	0.702 ^{bc}	0.864 ^e	1.566 ^c	1.231 ^c
		100	0.568 ^f	1.014 ^d	1.582 ^c	1.786 ^b
	10	0	0.595 ^{ef}	0.468 ^h	1.064 ^g	0.800 ^c
		100	0.477 ^g	0.877 ^e	1.355 ^e	1.854 ^b
MDS ($P \leq 0.05$)			0.070	0.047	0.070	0.078

Tabla A 4.14. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) AsA					
Tiempo(D)	0.014	1	0.014	12.9	0.0010
ABA	0.293	2	0.146	138.6	0.0000
NaCl(S)	0.285	1	0.285	269.9	0.0000
D x ABA	0.052	2	0.026	24.6	0.0000
D x S	0.002	1	0.002	2.2	0.1440
ABA x S	0.070	2	0.035	32.9	0.0000
D x ABA x S	0.043	2	0.022	20.4	0.0000
Error	0.038	36	0.001		
Total	0.797	47			
b) DHA					
Tiempo(D)	0.730	1	0.730	247.2	0.0000
ABA	0.124	2	0.062	21.0	0.0000
NaCl(S)	1.083	1	1.083	366.8	0.0000
D x ABA	0.505	2	0.252	85.4	0.0000
D x S	0.191	1	0.191	64.6	0.0000
ABA x S	0.109	2	0.054	18.4	0.0000
D x ABA x S	0.161	2	0.080	27.2	0.0000
Error	0.106	36	0.003		
Total	3.008	47			

c) AsA+DHA					
Tiempo(D)	0.943	1	0.943	386.1	0.0000
ABA	0.150	2	0.075	30.8	0.0000
NaCl(S)	0.257	1	0.257	105.0	0.0000
D x ABA	0.496	2	0.248	101.4	0.0000
D x S	0.151	1	0.151	61.7	0.0000
ABA x S	0.344	2	0.172	70.4	0.0000
D x ABA x S	0.201	2	0.101	41.1	0.0000
Error	0.088	36	0.002		
Total	2.629	47			
d) DHA/AsA					
Tiempo(D)	2.21	1	2.215	100.7	0.0000
ABA	3.32	2	1.662	75.5	0.0000
NaCl(S)	8.95	1	8.956	407.3	0.0000
D x ABA	2.65	2	1.329	60.4	0.0000
D x S	0.76	1	0.765	34.7	0.0000
ABA x S	0.61	2	0.307	13.9	0.0000
D x ABA x S	0.21	2	0.109	4.9	0.0125
Error	0.79	36	0.022		
Total	19.54	47			

Tabla A 4.15. Contenido de glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG) y glutatión total (GSH+GSSG) expresados en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PFN, y la relación glutatión oxidado/glutatión reducido (GSSG/GSH) en nódulos de *P. vulgaris*

Tiempo (D)	ABA (μM)	NaCl (mM)	GSH	GSSG	GSH+GSSG	GSSG/GSH
0	0	0	0.841 ^c	0.213 ^d	1.054 ^c	0.254 ^g
		100	0.774 ^d	0.176 ^f	0.951 ^e	0.228 ^h
	1	0	0.631 ^e	0.207 ^d	0.838 ^f	0.328 ^{ef}
		100	0.912 ^b	0.373 ^b	1.285 ^a	0.409 ^b
3	10	0	0.536 ^g	0.211 ^d	0.748 ^h	0.395 ^b
		100	0.545 ^g	0.191 ^e	0.736 ^h	0.351 ^d
	0	0	1.109 ^a	0.161 ^g	1.270 ^a	0.145 ⁱ
		100	0.847 ^c	0.128 ^h	0.974 ^e	0.151 ⁱ
6	1	0	0.779 ^d	0.243 ^c	1.023 ^d	0.312 ^f
		100	0.834 ^c	0.402 ^a	1.236 ^b	0.482 ^a
	10	0	0.579 ^f	0.197 ^e	0.776 ^g	0.340 ^{de}
		100	0.460 ^h	0.173 ^f	0.633 ⁱ	0.377 ^c
MDS ($P \leq 0.05$)			0.023	0.024	0.023	0.006

Tabla A 4.16. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) GSH					
Tiempo(D)	0.045	1	0.045	161	0.0000
ABA	1.117	2	0.559	1983	0.0000
NaCl(S)	0.004	1	0.004	13	0.0010
D x ABA	0.077	2	0.039	137	0.0000
D x S	0.101	1	0.101	358	0.0000
ABA x S	0.230	2	0.115	409	0.0000
D x ABA x S	0.005	2	0.003	9	0.0007
Error	0.010	36	0.000		
Total	1.589	47			
b) GSSG					
Tiempo(D)	0.002	1	0.002	69	0.0000
ABA	0.170	2	0.085	3792	0.0000
NaCl(S)	0.015	1	0.015	661	0.0000
D x ABA	0.014	2	0.007	312	0.0000
D x S	0.000	1	0.000	1	0.4141
ABA x S	0.097	2	0.049	2162	0.0000
D x ABA x S	0.000	2	0.000	2	0.2215
Error	0.001	36	0.000		
Total	0.299	47			
c) GSH+GSSG					
Tiempo(D)	0.030	1	0.030	107	0.0000
ABA	1.358	2	0.679	2401	0.0000
NaCl(S)	0.004	1	0.004	13	0.0008
D x ABA	0.051	2	0.026	90	0.0000
D x S	0.103	1	0.103	366	0.0000
ABA x S	0.616	2	0.308	1089	0.0000
D x ABA x S	0.005	2	0.003	9	0.0006
Error	0.010	36	0		
Total	2.177	47			
d) GSSG/GSH					
Tiempo(D)	0.008	1	0.008	58	0.0000
ABA	0.347	2	0.174	1232	0.0000
NaCl(S)	0.017	1	0.017	119	0.0000
D x ABA	0.030	2	0.015	108	0.0000
D x S	0.013	1	0.013	96	0.0000
ABA x S	0.047	2	0.023	165	0.0000
D x ABA x S	0.002	2	0.001	7	0.0036
Error	0.005	36	0.000		
Total	0.470	47			

Tabla A 4.17. Contenido de aminoácidos libres totales (Aa) expresados en mg asparragina g⁻¹ PF, prolina (Pro) en mg prolina g⁻¹ PF y azúcares solubles totales (Ast) expresados en mg glucosa g⁻¹ PF en hoja de *P. vulgaris*

Tiempo (D)	ABA (μM)	NaCl (mM)	Aa	Pro	Ast
3	0	0	3.26 ^c	0.104 ⁱ	5.51 ^g
		100	3.89 ^b	1.344 ^c	10.93 ^b
	1	0	2.70 ^{ef}	0.064 ^j	4.81 ^h
		100	2.90 ^c	0.379 ^f	9.71 ^c
	10	0	2.51 ^{fg}	0.072 ^j	4.97 ^h
		100	2.99 ^{de}	0.554 ^e	7.34 ^e
6	0	0	4.70 ^a	0.087 ^{ij}	7.54 ^e
		100	3.11 ^{cd}	2.812 ^a	15.66 ^a
	1	0	3.05 ^{de}	0.251 ^h	6.34 ^f
		100	3.26 ^c	0.927 ^d	10.90 ^b
	10	0	2.44 ^g	0.297 ^g	6.32 ^f
		100	3.00 ^{de}	1.406 ^b	8.69 ^d
MDS (P ≤ 0.05)			0.19	0.023	0.41

Tabla A 4.18. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Aa					
Tiempo(D)	0.57	1	0.57	29.6	0.0000
ABA	8.76	2	4.38	228.7	0.0000
NaCl(S)	0.08	1	0.08	4.1	0.0500
D x ABA	0.38	2	0.19	9.9	0.0000
D x S	1.48	1	1.48	77.1	0.0000
ABA x S	2.07	2	1.03	53.9	0.0000
D x ABA x S	3.41	2	1.71	89.1	0.0000
Error	0.69	36	0.02		
Total	17.43	47			
b) Pro					
Tiempo(D)	3.55	1	3.55	1326	0.0000
ABA	4.00	2	2.00	7478	0.0000
NaCl(S)	14.28	1	14.28	53356	0.0000
D x ABA	0.26	2	0.13	481	0.0000
D x S	2.04	1	2.04	7617	0.0000
ABA x S	4.95	2	2.48	9246	0.0000
D x ABA x S	0.69	2	0.34	1287	0.0000
Error	0.01	36	0.00		
Total	29.79	47			

Apéndice

c) Ast					
Tiempo(D)	49.5	1	49.5	578	0.0000
ABA	77.9	2	38.9	455	0.0000
NaCl(S)	256.6	1	256.6	3000	0.0000
D x ABA	10.9	2	5.5	64	0.0000
D x S	1.9	1	1.9	21	0.0000
ABA x S	38.8	2	19.4	226	0.0000
D x ABA x S	5.5	2	2.8	32	0.0000
Error	3.1	36	0.1		
Total	444.2	47			

Tabla A 4.19. Contenido de aminoácidos libres totales (Aa) expresados en mg asparragina g⁻¹ PF, prolina (Pro) en mg prolina g⁻¹ PF y azúcares solubles totales (Ast) expresados en mg glucosa g⁻¹ PF en nódulo de *P. vulgaris*

Tiempo (D)	ABA (μM)	NaCl (mM)	Aa	Pro	Ast	
	0	0	10.02 ^a	0.630 ^a	19.56 ^a	
		100	8.42 ^b	0.201 ^e	20.27 ^a	
	3	1	0	7.70 ^c	0.602 ^b	12.47 ^e
			100	7.03 ^{de}	0.205 ^e	15.49 ^d
	10	0	5.35 ^h	0.162 ^g	12.14 ^e	
		100	5.68 ^g	0.156 ^g	16.98 ^c	
	6	0	0	7.31 ^{cd}	0.165 ^{fg}	12.98 ^e
			100	5.50 ^h	0.241 ^d	17.08 ^{bc}
	1	0	6.61 ^{ef}	0.188 ^{ef}	18.00 ^b	
		100	6.19 ^{fg}	0.253 ^{cd}	15.59 ^d	
	10	0	4.74 ⁱ	0.203 ^e	15.05 ^d	
		100	5.22 ^{hi}	0.277 ^c	15.59 ^d	
MDS (P ≤ 0.05)			0.51	0.024	0.94	

Tabla A 4.20. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Aa					
Tiempo(D)	24.71	1	24.71	194.3	0.0000
ABA	49.74	2	24.87	195.6	0.0000
NaCl(S)	4.55	1	4.55	35.8	0.0000
D x ABA	17.91	2	8.95	70.4	0.0000
D x S	0.01	1	0.01	0.1	0.7595
ABA x S	6.61	2	3.31	26.0	0.0000
D x ABA x S	0.47	2	0.23	1.8	0.1750
Error	4.58	36	0.13		
Total	108.58				

b) Pro					
Tiempo(D)	0.132	1	0.132	459	0.0000
ABA	0.132	2	0.066	229	0.0000
NaCl(S)	0.127	1	0.127	442	0.0000
D x ABA	0.208	2	0.104	362	0.0000
D x S	0.366	1	0.366	1274	0.0000
ABA x S	0.112	2	0.056	195	0.0000
D x ABA x S	0.109	2	0.055	190	0.0000
Error	0.010	36	0.000		
Total	1.196	47			
c) Ast					
Tiempo(D)	2.3	1	2.27	5.2	0.0288
ABA	58.5	2	29.25	66.8	0.0000
NaCl(S)	2.3	1	2.27	5.2	0.0288
D x ABA	127.0	2	63.52	145.0	0.0000
D x S	70.5	1	70.49	160.9	0.0000
ABA x S	38.6	2	19.32	44.1	0.0000
D x ABA x S	0.6	2	0.31	0.7	0.4955
Error	15.8	36	0.44		
Total	315.6	47			

Tabla A 4.21. Contenido de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) expresado en nmol MDA g⁻¹ PF y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en μmol g⁻¹ PF en hoja(h) y nódulo(n) de *P. vulgaris*

Tiempo (D)	ABA (μM)	NaCl (mM)	TBARS(h)	TBARS(n)	H ₂ O ₂ (h)	H ₂ O ₂ (n)	
	0	0	13.80 ^{de}	33.99 ^b	1.732 ^d	0.386 ^c	
		100	21.27 ^b	35.95 ^a	2.152 ^b	0.607 ^a	
	3	1	0	11.90 ^f	33.92 ^b	1.246 ^f	0.371 ^{cd}
			100	16.96 ^c	31.27 ^c	1.632 ^e	0.314 ^c
	10	0	11.65 ^f	25.57 ^c	1.232 ^f	0.393 ^c	
		100	14.18 ^{de}	25.76 ^e	1.252 ^f	0.350 ^d	
	6	0	0	21.14 ^b	28.23 ^d	1.248 ^f	0.254 ^f
			100	25.06 ^a	31.65 ^c	2.318 ^a	0.441 ^b
	1	0	15.13 ^d	21.58 ^g	1.138 ^g	0.294 ^c	
		100	24.75 ^a	24.37 ^{ef}	1.771 ^d	0.346 ^d	
	10	0	13.73 ^e	18.35 ^h	0.807 ^h	0.164 ^g	
		100	20.25 ^b	23.23 ^{fg}	2.073 ^c	0.437 ^b	
MDS (P ≤ 0.05)			1.36	1.79	0.051	0.027	

Tabla A 4.22. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) TBARS(h)					
Tiempo(D)	306	1	306.4	337.2	0.0000
ABA	154	2	76.9	84.7	0.0000
NaCl(S)	411	1	411.3	452.8	0.0000
D x ABA	84	2	42.1	46.3	0.0000
D x S	8	1	8.3	9.2	0.0045
ABA x S	43	2	21.7	23.9	0.0000
D x ABA x S	13	2	6.7	7.4	0.0020
Error	33	36	0.9		
Total	1054	47			
b) TBARS(n)					
Tiempo(D)	508	1	508.3	320.5	0.0000
ABA	549	2	274.3	173.0	0.0000
NaCl(S)	37	1	37.2	23.5	0.0000
D x ABA	190	2	95.2	60.0	0.0000
D x S	45	1	44.7	28.2	0.0000
ABA x S	12	2	5.8	3.6	0.0367
D x ABA x S	15	2	7.4	4.7	0.0157
Error	57	36	1.6		
Total	1413	47			
c) H ₂ O ₂ (h)					
Tiempo(D)	0.004	1	0.004	3	0.0852
ABA	2.431	2	1.216	963	0.0000
NaCl(S)	4.800	1	4.800	3802	0.0000
D x ABA	0.255	2	0.128	101	0.0000
D x S	1.533	1	1.533	1214	0.0000
ABA x S	0.111	2	0.055	44	0.0000
D x ABA x S	0.505	2	0.252	200	0.0000
Error	0.045	36	0.001		
Total	9.684	47			
d) H ₂ O ₂ (n)					
Tiempo(D)	0.078	1	0.078	213.2	0.0000
ABA	0.084	2	0.042	113.9	0.0000
NaCl(S)	0.134	1	0.134	364.0	0.0000
D x ABA	0.032	2	0.016	43.9	0.0000
D x S	0.051	1	0.051	138.2	0.0000
ABA x S	0.086	2	0.043	117.7	0.0000
D x ABA x S	0.062	2	0.031	84.4	0.0000
Error	0.013	36	0.000		
Total	0.540	47			

Tabla A 4.23. Contenido de ácido salicílico libre endógeno (AS) expresados en ng g⁻¹ PF y ácido abscísico libre endógeno (ABA) expresado en pmol g⁻¹ PF en hoja(h) y raíz(r) de *P. vulgaris*

Tiempo (D)	ABA (μM)	NaCl (mM)	AS(h)	AS(r)	ABA(h)	ABA(r)	
	0	0	177.3 ^b	38.2 ^{de}	22.1 ^g	19.4 ^f	
		100	195.0 ^a	91.7 ^c	53.8 ^e	30.1 ^{ef}	
	3	1	0	115.5 ^{de}	15.1 ^h	34.1 ^f	30.0 ^{ef}
			100	127.9 ^d	36.3 ^{ef}	94.2 ^c	112.5 ^c
	10	0	79.2 ^f	15.4 ^h	97.4 ^c	300.2 ^b	
		100	113.6 ^{de}	22.2 ^{gh}	131.3 ^b	395.9 ^a	
	6	0	0	157.0 ^c	112.2 ^b	166.7 ^a	96.9 ^d
			100	189.8 ^{ab}	172.9 ^a	38.1 ^f	21.3 ^f
	1	0	70.0 ^{fg}	27.7 ^{fg}	53.2 ^e	20.8 ^f	
		100	102.7 ^e	47.5 ^d	25.9 ^g	100.9 ^d	
	10	0	33.4 ^h	25.9 ^g	59.4 ^d	28.5 ^{ef}	
		100	60.8 ^g	25.1 ^g	37.2 ^f	38.2 ^e	
MDS (P ≤ 0.05)			15.3	9.6	5.3	11.5	

Tabla A 4.24. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) AS(h)					
Tiempo(D)	12646	1	12646	109.4	0.0000
ABA	57080	2	28540	247.0	0.0000
NaCl(S)	1057	1	1057	9.2	0.0046
D x ABA	2323	2	1161	10.1	0.0003
D x S	1	1	1	0.0	0.9203
ABA x S	48705	2	24352	210.7	0.0000
D x ABA x S	1082	2	541	4.7	0.0156
Error	4160	36	116		
Total	127055	47			
b) AS(r)					
Tiempo(D)	12352	1	12352	275.3	0.0000
ABA	63772	2	31886	710.7	0.0000
NaCl(S)	8675	1	8675	193.4	0.0000
D x ABA	12481	2	6241	139.1	0.0000
D x S	1	1	1	0.0	0.8715
ABA x S	6111	2	3055	68.1	0.0000
D x ABA x S	112	2	56	1.2	0.3002
Error	1615	36	45		
Total	105120	47			

Apéndice

c) ABA(h)					
Tiempo(D)	912	1	912	66	0.0000
ABA	7081	2	3540	255	0.0000
NaCl(S)	917	1	917	66	0.0000
D x ABA	35551	2	17776	1281	0.0000
D x S	30753	1	30753	2215	0.0000
ABA x S	9686	2	4843	349	0.0000
D x ABA x S	5716	2	2858	206	0.0000
Error	500	36	14		
Total	91114	47			
d) ABA(r)					
Tiempo(D)	112668	1	112668	1730	0.0000
ABA	204012	2	102006	1566	0.0000
NaCl(S)	13758	1	13758	211	0.0000
D x ABA	288501	2	144251	2215	0.0000
D x S	10184	1	10184	156	0.0000
ABA x S	28058	2	14029	215	0.0000
D x ABA x S	4682	2	2341	36	0.0000
Error	2345	36	65		
Total	664209	47			

Tabla A 4.25. Contenido de diaminopropano (DAP), putrescina (PUT), cadaverina (CAD), espermidina (SPD) y espermina (SPM) expresado en nmol g⁻¹ PF en hoja de *P. vulgaris*

Tiempo (D)	ABA (μM)	NaCl (mM)	PUT	SPD	SPM
3	0	0	46.67 ^a	92.84 ^a	17.76 ^c
		100	11.15 ^g	9.01 ^f	19.92 ^d
	10	0	26.72 ^d	52.32 ^c	23.44 ^c
		100	20.16 ^e	53.44 ^c	26.61 ^b
6	0	0	39.61 ^b	48.93 ^d	11.17 ^g
		100	17.47 ^f	31.59 ^e	14.74 ^f
	10	0	32.58 ^c	79.06 ^b	27.66 ^b
		100	17.55 ^f	33.52 ^e	37.32 ^a
MDS (P ≤ 0.05)			1.22	2.54	1.51

DAP y CAD no fueron detectados

Tabla A 4.26. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) PUT					
Tiempo(D)	3	1	3	5	0.0434
ABA	7	1	7	10	0.0036
NaCl(S)	3140	1	3140	4476	0.0000
D x ABA	163	1	163	232	0.0000
D x S	12	1	12	17	0.0004

ABA x S	242	1	242	345	0.0000
D x ABA x S	645	1	645	919	0.0000
Error	17	24	1		
Total	4229	31			
b) SPD					
Tiempo(D)	105	1	105	35	0.0000
ABA	647	1	647	213	0.0000
NaCl(S)	10600	1	10600	3494	0.0000
D x ABA	396	1	396	131	0.0000
D x S	196	1	196	65	0.0000
ABA x S	1610	1	1610	531	0.0000
D x ABA x S	6402	1	6402	2110	0.0000
Error	73	24	3		
Total	20028	31			
c) SPM					
Tiempo(D)	5	1	5.0	4.6	0.0425
ABA	803	1	803.1	742.3	0.0000
NaCl(S)	172	1	172.4	159.3	0.0000
D x ABA	724	1	723.8	668.9	0.0000
D x S	31	1	31.1	28.8	0.0000
ABA x S	170	1	170.5	157.5	0.0000
D x ABA x S	20	1	19.7	18.2	0.0003
Error	26	24	1.1		
Total	1952	31			

Tabla A 4.27. Contenido de diaminopropano (DAP), putrescina (PUT), cadaverina (CAD), espermidina (SPD) y espermina (SPM) expresado en nmol g⁻¹ PF en raíz de *P. vulgaris*

Tiempo (D)	ABA (μM)	NaCl (mM)	PUT
3	0	0	8.23 ^f
		100	12.42 ^{de}
	10	0	37.34 ^b
		100	43.10 ^a
6	0	0	16.46 ^c
		100	11.64 ^c
	10	0	13.02 ^d
		100	11.74 ^e
MDS (P ≤ 0.05)			1.04

DAP, CAD, SPD y SPM no fueron detectados

Tabla A 4.28. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) PUT					
Tiempo(D)	1163	1	1163	2281	0.0000
ABA	1594	1	1594	3125	0.0000
NaCl(S)	7	1	7	15	0.0008
D x ABA	1992	1	1992	3907	0.0000
D x S	129	1	129	252	0.0000
ABA x S	13	1	13	26	0.0000
D x ABA x S	2	1	2	4	0.0617
Error	12	24	1		
Total	4913	31			

Tabla A 4.29. Contenido de diaminopropano (DAP), putrescina (PUT), cadaverina (CAD), espermidina (SPD) y espermina (SPM) expresado en nmol g⁻¹ PF en nódulo de *P.vulgaris*

Tiempo (D)	ABA (μM)	NaCl (mM)	PUT	CAD	SPD	SPM
3	0	0	51.25 ^b	308.36 ^a	57.53 ^d	9.74 ^d
		100	42.81 ^d	197.71 ^c	21.54 ^g	2.97 ^f
	10	0	45.68 ^c	223.28 ^b	42.63 ^f	9.11 ^d
		100	36.17 ^e	129.53 ^d	73.33 ^a	11.20 ^c
6	0	0	53.26 ^a	197.92 ^c	46.28 ^e	4.61 ^e
		100	29.53 ^f	75.29 ^f	45.00 ^e	13.85 ^b
	10	0	27.73 ^g	41.69 ^g	59.74 ^c	9.71 ^d
		100	29.77 ^f	87.99 ^e	68.10 ^b	18.39 ^a
MDS (P ≤ 0.05)			1.30	2.14	1.40	0.76

DAP no fue detectado

Tabla A 4.30. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) PUT					
Tiempo(D)	635	1	634.6	791.8	0.0000
ABA	703	1	703.1	877.3	0.0000
NaCl(S)	785	1	785.5	980.1	0.0000
D x ABA	85	1	85.5	106.6	0.0000
D x S	7	1	7.0	8.8	0.0068
ABA x S	305	1	304.7	380.2	0.0000
D x ABA x S	360	1	359.7	448.9	0.0000
Error	19	24	0.8		
Total	2899	31			
b) CAD					
Tiempo(D)	103963	1	103963	48337	0.0000

Apéndice

ABA	44036	1	44036	20474	0.0000
NaCl(S)	39404	1	39404	18321	0.0000
D x ABA	47	1	47	22	0.0001
D x S	8201	1	8201	3813	0.0000
ABA x S	17267	1	17267	8028	0.0000
D x ABA x S	11557	1	11557	5373	0.0000
Error	52	24	2		
Total	224528	31			
c) SPD					
Tiempo(D)	290	1	290	316	0.0000
ABA	2698	1	2698	2935	0.0000
NaCl(S)	2	1	2	2	0.1976
D x ABA	0	1	0	0	0.8050
D x S	77	1	77	83	0.0000
ABA x S	2913	1	2913	3169	0.0000
D x ABA x S	1628	1	1628	1771	0.0000
Error	22	24	1		
Total	7630	31			
d) SPM					
Tiempo(D)	91.7	1	91.7	333.8	0.0000
ABA	33.4	1	33.4	121.7	0.0000
NaCl(S)	87.5	1	87.5	318.6	0.0000
D x ABA	24.7	1	24.7	90.0	0.0000
D x S	255.5	1	255.5	930.2	0.0000
ABA x S	0.3	1	0.3	1.1	0.3023
D x ABA x S	170.9	1	170.9	622.3	0.0000
Error	6.6	24	0.3		
Total	670.6	31			

Apéndice

Tabla A 4.31. Peso seco de planta (PSP), peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco raíz (PSR) en g planta⁻¹, y relación raíz/parte aérea (RPA) en plantas de *M. sativa*

Tiempo (D)	ABA (μ M)	NaCl (mM)	PSP	PSPA	PSR	RPA
6	0	0	1.056 ^{bc}	0.573 ^d	0.471 ^{cd}	0.825 ^{bc}
		200	0.459 ^e	0.263 ^g	0.189 ^f	0.736 ^c
	1	0	1.085 ^{bc}	0.506 ^{ef}	0.569 ^{bc}	1.135 ^a
		200	0.987 ^c	0.493 ^{ef}	0.480 ^{cd}	0.976 ^{ab}
12	10	0	1.065 ^{bc}	0.587 ^d	0.463 ^{cd}	0.789 ^{bc}
		200	1.067 ^{bc}	0.536 ^{de}	0.516 ^c	0.977 ^{ab}
	0	0	1.634 ^a	0.985 ^a	0.635 ^b	0.645 ^c
		200	0.602 ^c	0.325 ^g	0.262 ^{ef}	0.815 ^{bc}
MDS (P \leq 0.05)	1	0	1.695 ^a	0.897 ^b	0.771 ^a	0.857 ^{bc}
		200	0.830 ^d	0.449 ^f	0.372 ^{de}	0.826 ^{bc}
	10	0	1.149 ^b	0.660 ^c	0.477 ^{cd}	0.725 ^c
		200	1.019 ^{bc}	0.545 ^{de}	0.463 ^{cd}	0.854 ^{bc}
			0.143	0.064	0.110	0.216

Tabla A 4.32. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) PSP					
Tiempo(D)	0.488	1	0.488	51.1	0.0000
ABA	0.368	2	0.184	19.2	0.0000
NaCl(S)	2.463	1	2.463	257.4	0.0000
D x ABA	0.239	2	0.119	12.5	0.0001
D x S	0.593	1	0.593	62.0	0.0000
ABA x S	1.133	2	0.566	59.2	0.0000
D x ABA x S	0.202	2	0.101	10.5	0.0002
Error	0.344	36	0.010		
Total	5.830	47			
b) PSPA					
Tiempo(D)	0.273	1	0.273	137.0	0.0000
ABA	0.024	2	0.012	6.1	0.0051
NaCl(S)	0.852	1	0.852	427.3	0.0000
D x ABA	0.080	2	0.04	20.0	0.0000
D x S	0.239	1	0.239	120.1	0.0000
ABA x S	0.331	2	0.165	83.0	0.0000
D x ABA x S	0.075	2	0.038	18.9	0.0000
Error	0.072	36	0.002		
Total	1.947	47			
c) PSR					
Tiempo(D)	0.029	1	0.029	4.66	0.0376
ABA	0.202	2	0.101	16.55	0.0000

NaCl(S)	0.407	1	0.407	66.59	0.0000
D x ABA	0.038	2	0.019	3.11	0.0568
D x S	0.073	1	0.073	12.01	0.0014
ABA x S	0.262	2	0.131	21.43	0.0000
D x ABA x S	0.036	2	0.018	2.94	0.0657
Error	0.220	36	0.006		
Total	1.268	47			
d) RPA					
Tiempo(D)	0.170	1	0.170	7.398	0.0100
ABA	0.302	2	0.151	6.556	0.0037
NaCl(S)	0.015	1	0.015	0.639	0.4294
D x ABA	0.057	2	0.029	1.247	0.2994
D x S	0.036	1	0.036	1.561	0.2195
ABA x S	0.129	2	0.065	2.809	0.0735
D x ABA x S	0.051	2	0.026	1.112	0.3400
Error	0.828	36	0.023		
Total	1.588	47			

Tabla A 4.33. 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 $\mu\text{mol de N}_2 \text{ g}^{-1} \text{ PSN h}^{-1}$, peso seco de nódulos (PSN) en mg planta^{-1} y peso normalizado de nódulos (PNN) en $\text{mg PSN mg}^{-1} \text{ PSPA}$ en *M. sativa*

Tiempo (D)	ABA (μM)	NaCl (mM)	ANA	ANT	TFN	PSN	PNN
	0	0	92.05 ^b	395 ^a	100.94 ^a	0.014 ^{ab}	0.022 ^{de}
		200	49.83 ^d	214 ^d	54.74 ^c	0.009 ^c	0.033 ^{ab}
6	1	0	77.78 ^c	278 ^{bc}	66.60 ^b	0.011 ^{bc}	0.023 ^{cd}
		200	35.15 ^{ef}	146 ^e	37.08 ^d	0.011 ^{bc}	0.023 ^{cd}
	10	0	82.12 ^{bc}	369 ^a	95.71 ^a	0.012 ^{bc}	0.021 ^{def}
		200	44.51 ^{de}	189 ^d	48.03 ^c	0.013 ^{ab}	0.029 ^{bc}
12	0	0	107.56 ^a	398 ^a	96.90 ^a	0.016 ^a	0.015 ^f
		200	29.50 ^f	198 ^d	56.24 ^c	0.012 ^{bc}	0.037 ^a
	1	0	69.18 ^c	297 ^b	76.01 ^b	0.013 ^{ab}	0.015 ^f
		200	47.47 ^{de}	269 ^{bc}	73.85 ^b	0.011 ^{bc}	0.024 ^{cd}
	10	0	78.32 ^c	376 ^a	99.09 ^a	0.011 ^{bc}	0.016 ^{ef}
		200	46.46 ^{de}	264 ^c	72.50 ^b	0.012 ^{bc}	0.022 ^{de}
MDS ($P \leq 0.05$)			13.48	29	9.10	0.003	0.006

Tabla A 4.34. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) ANA					
Tiempo(D)	3	1	2.911	0.0	0.8575

Apéndice

ABA	1223	2	611.748	6.9	0.0030
NaCl(S)	21520	1	21520.21	241.7	0.0000
D x ABA	38	2	18.781	0.2	0.8108
D x S	28	1	28.042	0.3	0.5781
ABA x S	1912	2	956.193	10.7	0.0002
D x ABA x S	1728	2	864.018	9.7	0.0004
Error	3205	36	89.033		
Total	29658	47			
b) ANT					
Tiempo(D)	14911	1	14911	35.0	0.0000
ABA	29759	2	14880	34.9	0.0000
NaCl(S)	231031	1	231031	541.9	0.0000
D x ABA	12155	2	6078	14.3	0.0000
D x S	7782	1	7782	18.3	0.0001
ABA x S	24855	2	12427	29.1	0.0000
D x ABA x S	7963	2	3981	9.3	0.0005
Error	15348	36	426		
Total	343805	47			
c) TFN					
Tiempo(D)	1703	1	1703	42.0	0.0000
ABA	2305	2	1152	28.4	0.0000
NaCl(S)	12392	1	12392	305.5	0.0000
D x ABA	1211	2	606	14.9	0.0000
D x S	972	1	972	23.9	0.0000
ABA x S	1672	2	836	20.6	0.0000
D x ABA x S	253	2	126	3.1	0.0567
Error	1460	36	41		
Total	21969	47			
d) PSN					
Tiempo(D)	0.000001	1	0.000001	0.078	0.7812
ABA	0.000007	2	0.000004	0.548	0.5830
NaCl(S)	0.000008	1	0.000008	1.179	0.2849
D x ABA	0.000058	2	0.000029	4.355	0.0202
D x S	0.000003	1	0.000003	0.497	0.4853
ABA x S	0.000058	2	0.000029	4.361	0.0201
D x ABA x S	0.000010	2	0.000005	0.787	0.4628
Error	0.000239	36	0.000007		
Total	0.000385	47			
e) PNN					
Tiempo(D)	0.00017	1	0.00017	6.96	0.0122
ABA	0.00027	2	0.00014	5.57	0.0078
NaCl(S)	0.00105	1	0.00105	43.06	0.0000
D x ABA	0.00004	2	0.00002	0.84	0.4416
D x S	0.00011	1	0.00011	4.34	0.0443
ABA x S	0.00034	2	0.00017	6.95	0.0028
D x ABA x S	0.00012	2	0.00006	2.52	0.0945
Error	0.00088	36	0.00002		
Total	0.00298	47			

Tabla A 4.35. Actividad superóxido dismutasa (SOD) expresada U mg⁻¹ prot, catalasa (CAT) en µmol H₂O₂ mg⁻¹ prot min⁻¹, guaiacol peroxidasa (POX) en µmol H₂O₂ mg⁻¹ prot min⁻¹ y actividad lipoxigenasa (LOX) en µmol mg⁻¹ prot min⁻¹ en nódulos de *M.sativa*

Tiempo (D)	ABA (µM)	NaCl (mM)	SOD	CAT	POX	LOX
6	0	0	0.179 ^b	54.55 ^e	4.50 ^f	0.668 ^g
		200	0.376 ^a	34.32 ^g	5.42 ^{de}	1.237 ^a
	1	0	0.095 ^{def}	62.27 ^{bc}	5.68 ^d	0.769 ^f
		200	0.171 ^{bc}	64.37 ^b	6.17 ^c	1.245 ^a
	10	0	0.113 ^{de}	67.91 ^a	5.76 ^d	0.904 ^d
		200	0.089 ^{ef}	52.66 ^{ef}	7.35 ^b	0.947 ^c
12	0	0	0.057 ^f	57.96 ^d	3.28 ^g	0.907 ^d
		200	0.061 ^f	49.76 ^f	8.00 ^a	0.966 ^c
	1	0	0.057 ^f	64.52 ^b	5.23 ^e	1.225 ^a
		200	0.086 ^{ef}	51.94 ^{ef}	6.41 ^c	1.002 ^b
	10	0	0.135 ^{cd}	60.25 ^{cd}	5.59 ^d	1.017 ^b
		200	0.113 ^{de}	62.25 ^{bc}	5.61 ^d	0.876 ^e
MDS (P ≤ 0.05)			0.040	2.93	0.33	0.025

Tabla A 4.36. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) SOD					
Tiempo(D)	0.088	1	0.088	112.3	0.0000
ABA	0.040	2	0.020	25.8	0.0000
NaCl(S)	0.023	1	0.023	28.9	0.0000
D x ABA	0.120	2	0.060	76.7	0.0000
D x S	0.019	1	0.019	23.7	0.0000
ABA x S	0.031	2	0.016	19.9	0.0000
D x ABA x S	0.020	2	0.010	13.1	0.0001
Error	0.028	36	0.001		
Total	0.369	47			
b) CAT					
Tiempo(D)	1247	2	623.7	160.2	0.0000
ABA	907	1	906.9	233.0	0.0000
NaCl(S)	561	2	280.3	72.0	0.0000
D x ABA	71	1	71.0	18.3	0.0001
D x S	118	2	59.0	15.2	0.0000
ABA x S	713	2	356.5	91.6	0.0000
D x ABA x S	140	36	3.9		
Error	3795	47			
Total					

Apéndice

c) POX	2.90	2	1.45	26.4	0.0000
Tiempo(D)	26.63	1	26.63	486.1	0.0000
ABA	4.09	2	2.05	37.3	0.0000
NaCl(S)	2.85	1	2.85	51.9	0.0000
D x ABA	17.74	2	8.87	161.9	0.0000
D x S	10.98	2	5.49	100.2	0.0000
ABA x S	1.97	36	0.06		
D x ABA x S	67.35	47			
Error					
Total					
d) LOX					
Tiempo(D)	0.017	1	0.016	54	0.0000
ABA	0.155	2	0.077	252	0.0000
NaCl(S)	0.204	1	0.203	664	0.0000
D x ABA	0.031	2	0.015	50	0.0000
D x S	0.647	1	0.647	2111	0.0000
ABA x S	0.264	2	0.131	430	0.0000
D x ABA x S	0.135	2	0.067	220	0.0000
Error	0.011	36	0.000		
Total	1.463	47			

Tabla A 4.37. Actividad superóxido dismutasa (SOD) expresada U g⁻¹ PFN, catalasa (CAT) en µmol H₂O₂ g⁻¹ PFN min⁻¹, guaiacol peroxidasa (POX) en µmol H₂O₂ g⁻¹ PFN min⁻¹ y actividad lipoxigenasa (LOX) en µmol g⁻¹ PFN min⁻¹ en nódulos de *M.sativa*

Tiempo (D)	ABA (µM)	NaCl (mM)	SOD	CAT	POX	LOX
6	0	0	70.19 ^b	2260 ^{cd}	149 ^c	33.88 ^h
		200	153.92 ^a	1099 ⁱ	162 ^d	53.92 ^c
	1	0	29.61 ^c	1942 ^{gh}	147 ^{ef}	28.70 ⁱ
		200	45.53 ^{bc}	1893 ^h	139 ^f	43.28 ⁶
	10	0	35.58 ^{bc}	2174 ^{de}	169 ^d	35.36 ^g
		200	26.81 ^c	2118 ^{ef}	202 ^b	39.08 ^f
12	0	0	23.81 ^c	2331 ^{bc}	106 ^h	47.40 ^d
		200	21.11 ^c	2026 ^{fg}	223 ^a	40.18 ^f
	1	0	27.58 ^c	2566 ^a	120 ^g	58.78 ^a
		200	27.32 ^c	1685 ⁱ	183 ^c	43.18 ^e
	10	0	47.98 ^{bc}	2365 ^b	183 ^c	57.18 ^b
		200	32.50 ^c	2195 ^{de}	146 ^{ef}	48.06 ^d
MDS (P ≤ 0.05)			34.97	95	9	1.25

Tabla 4.38. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) SOD					
Tiempo(D)	10961	1	10961	18.27	0.0000
ABA	11802	2	5901	9.84	0.0004
NaCl(S)	1749	1	1749	2.92	0.0963
D x ABA	21884	2	10942	18.24	0.0000
D x S	3984	1	3984	6.64	0.0142
ABA x S	5650	2	2825	4.71	0.0153
D x ABA x S	3792	2	1896	3.16	0.0544
Error	21599	36	600		
Total	81421	47			
b) CAT					
Tiempo(D)	942728	1	942728	212.9	0.0000
ABA	672288	2	336144	75.9	0.0000
NaCl(S)	2293118	1	2293118	517.8	0.0000
D x ABA	297768	2	148884	33.6	0.0000
D x S	2700	1	2700	0.6	0.4400
ABA x S	770990	2	385495	87.0	0.0000
D x ABA x S	1435241	2	717620	162.0	0.0000
Error	159434	36	4429		
Total	6574268	47			
c) POX					
Tiempo(D)	16	1	16	0.4	0.5307
ABA	6179	2	3090	75.4	0.0000
NaCl(S)	10975	1	10975	268.0	0.0000
D x ABA	2315	2	1157	28.3	0.0000
D x S	3835	1	3835	93.7	0.0000
ABA x S	9163	2	4582	111.9	0.0000
D x ABA x S	17079	2	8540	208.5	0.0000
Error	1474	36	41		
Total	51038	47			
d) LOX					
Tiempo(D)	1223	1	1223	1664	0.0000
ABA	18	2	9	12	0.0001
NaCl(S)	14	1	14	19	0.0001
D x ABA	625	2	312	425	0.0000
D x S	1646	1	1646	2242	0.0000
ABA x S	181	2	90	123	0.0000
D x ABA x S	172	2	86	117	0.0000
Error	26	36	1		
Total	3905	47			

Tabla A 4.39. Actividad ascorbato peroxidasa (APX) expresada $\mu\text{mol asc mg}^{-1} \text{prot min}^{-1}$, monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) en $\mu\text{mol NADH mg}^{-1} \text{prot min}^{-1}$, glutation reductasa (GR) en $\mu\text{mol NADPH mg}^{-1} \text{prot min}^{-1}$ y dehidroascorbato reductasa (DHAR) en $\mu\text{mol asc mg}^{-1} \text{prot min}^{-1}$ en nódulos de *M.sativa*

Tiempo (D)	ABA (μM)	NaCl (mM)	APX	MDHAR	GR	DHAR
6	0	0	1.005 ^{de}	0.0348 ^c	0.0527 ^{de}	0.0397 ^g
		200	1.061 ^c	0.0435 ^a	0.0486 ^f	0.0533 ^d
	1	0	0.876 ^g	0.0359 ^c	0.0550 ^{cd}	0.0452 ^f
		200	0.984 ^c	0.0350 ^c	0.0520 ^e	0.0542 ^d
	10	0	0.886 ^g	0.0387 ^b	0.0566 ^{bc}	0.0455 ^f
		200	1.013 ^d	0.0354 ^c	0.0589 ^{ab}	0.0594 ^c
12	0	0	1.115 ^b	0.0296 ^d	0.0516 ^e	0.0318 ⁱ
		200	1.118 ^b	0.0214 ^f	0.0484 ^f	0.0495 ^e
	1	0	0.915 ^f	0.0321 ^d	0.0585 ^b	0.0356 ^h
		200	0.986 ^{de}	0.0261 ^e	0.0489 ^f	0.0637 ^b
	10	0	0.764 ^h	0.0321 ^d	0.0582 ^b	0.0395 ^g
		200	1.221 ^a	0.0236 ^e	0.0613 ^a	0.0702 ^a
MDS ($P \leq 0.05$)			0.028	0.0020	0.0028	0.0014

Tabla A 4.40. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) APX					
Tiempo(D)	0.0289	1	0.0289	73.8	0.0000
ABA	0.1586	2	0.0793	202.3	0.0000
NaCl(S)	0.2248	1	0.2248	573.6	0.0000
D x ABA	0.0081	2	0.0041	10.4	0.0003
D x S	0.0191	1	0.0191	48.9	0.0000
ABA x S	0.1516	2	0.0758	193.3	0.0000
D x ABA x S	0.0936	2	0.0468	119.4	0.0000
Error	0.0141	36	0.0004		
Total	0.6989	47			
b) MDHAR					
Tiempo(D)	0.0011	1	0.0011	559.0	0.0000
ABA	0.0000	2	0.0000	0.7	0.4841
NaCl(S)	0.0001	1	0.0001	53.6	0.0000
D x ABA	0.0001	2	0.0001	35.1	0.0000
D x S	0.0002	1	0.0002	122.8	0.0000
ABA x S	0.0001	2	0.0000	15.6	0.0000
D x ABA x S	0.0001	2	0.0000	16.3	0.0000
Error	0.0001	36	0.0000		

Total	0.0018	47			
c) GR					
Tiempo(D)	0.0000	1	0.0000	0.87	0.3569
ABA	0.0005	2	0.0002	66.99	0.0000
NaCl(S)	0.0001	1	0.0001	19.26	0.0001
D x ABA	0.0001	2	0.0000	13.34	0.0000
D x S	0.0000	1	0.0000	2.25	0.1427
ABA x S	0.0002	2	0.0001	24.89	0.0000
D x ABA x S	0.0000	2	0.0000	3.07	0.0586
Error	0.0001	36	0.0000		
Total	0.0010	47			
d) DHAR					
Tiempo(D)	0.0000	1	0	17	0.0002
ABA	0.0006	2	0.0003	321	0.0000
NaCl(S)	0.0043	1	0.0043	4617	0.0000
D x ABA	0.0004	2	0.0002	203	0.0000
D x S	0.0005	1	0.0005	582	0.0000
ABA x S	0.0002	2	0.0001	101	0.0000
D x ABA x S	0.0000	2	0.0000	19	0.0000
Error	0.0000	36	0.0000		
Total	0.0060	47			

Tabla A 4.41. Actividad ascorbato peroxidasa (APX) expresada $\mu\text{mol asc g}^{-1} \text{PFN min}^{-1}$, monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) en $\mu\text{mol NADH g}^{-1} \text{PFN min}^{-1}$, glutation reductasa (GR) en $\mu\text{mol NADPH g}^{-1} \text{PFN min}^{-1}$ y dehidroascorbato reductasa (DHAR) en $\mu\text{mol asc g}^{-1} \text{PFN min}^{-1}$ en nódulos de *M. sativa*

Tiempo (D)	ABA (μM)	NaCl (mM)	APX	MDHAR	GR	DHAR
6	0	0	33.21 ^b	1.186 ^a	1.817 ^b	1.314 ^f
		200	27.77 ^c	1.138 ^a	1.361 ^d	1.396 ^c
	1	0	22.69 ^h	0.900 ^e	1.365 ^d	1.171 ^h
		200	28.16 ^e	1.003 ^{bcd}	1.391 ^d	1.551 ^d
	10	0	26.00 ^f	1.135 ^a	1.662 ^c	1.334 ^f
		200	27.76 ^c	0.971 ^{cd}	1.614 ^c	1.626 ^c
12	0	0	35.86 ^a	0.952 ^{dc}	1.659 ^c	1.143 ^h
		200	31.17 ^c	0.598 ^g	1.349 ^d	1.778 ^b
	1	0	30.06 ^d	1.055 ^b	1.923 ^a	1.044 ⁱ
		200	28.14 ^e	0.746 ^f	1.395 ^d	1.413 ^e
	10	0	24.23 ^g	1.019 ^{bc}	1.847 ^{ab}	1.253 ^g
		200	36.63 ^a	0.707 ^f	1.839 ^b	2.108 ^a
MDS ($P \leq 0.05$)			0.84	0.064	0.078	0.045

Tabla 4.42. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) APX					
Tiempo(D)	140.1	1	140.1	407.6	0.0000
ABA	190.2	2	95.1	276.7	0.0000
NaCl(S)	19.2	1	19.2	55.8	0.0000
D x ABA	1.0	2	0.5	1.4	0.2569
D x S	5.4	1	5.4	15.6	0.0003
ABA x S	296.5	2	148.2	431.3	0.0000
D x ABA x S	163.0	2	81.5	237.2	0.0000
Error	12.4	36	0.3		
Total	827.7	47			
b) MDHAR					
Tiempo(D)	0.527	1	0.527	297.6	0.0000
ABA	0.016	2	0.008	4.5	0.0187
NaCl(S)	0.391	1	0.391	221.1	0.0000
D x ABA	0.228	2	0.114	64.4	0.0000
D x S	0.249	1	0.249	140.9	0.0000
ABA x S	0.039	2	0.019	11.0	0.0002
D x ABA x S	0.035	2	0.018	9.9	0.0004
Error	0.064	36	0.002		
Total	1.549	47			
c) GR					
Tiempo(D)	0.214	1	0.214	70.1	0.0000
ABA	0.468	2	0.234	76.6	0.0000
NaCl(S)	0.584	1	0.584	191.0	0.0000
D x ABA	0.298	2	0.149	48.7	0.0000
D x S	0.045	1	0.045	14.7	0.0005
ABA x S	0.257	2	0.129	42.0	0.0000
D x ABA x S	0.284	2	0.142	46.4	0.0000
Error	0.110	36	0.003		
Total	2.260	47			
d) DHAR					
Tiempo(D)	0.040	1	0.040	51	0.0000
ABA	0.663	2	0.332	420	0.0000
NaCl(S)	2.275	1	2.275	2881	0.0000
D x ABA	0.235	2	0.117	149	0.0000
D x S	0.405	1	0.405	513	0.0000
ABA x S	0.115	2	0.057	73	0.0000
D x ABA x S	0.215	2	0.108	136	0.0000
Error	0.028	36	0.001		
Total	3.977	47			

Tabla A 4.43. Contenido de ascorbato reducido (AsA), dehidroascorbato (DHA) y ascorbato total (AsA+DHA) expresados en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PFN, y la relación ascorbato oxidado/ascorbato reducido (DHA/AsA) en nódulos de *M. sativa*

Tiempo (D)	ABA (μM)	NaCl (mM)	AsA	DHA	AsA+DHA	DHA/AsA
6	0	0	0.948 ^a	0.811 ^c	1.759 ^a	0.856 ^{fg}
		200	0.689 ^b	0.652 ^d	1.341 ^{de}	0.948 ^{efg}
	1	0	0.727 ^b	0.575 ^d	1.302 ^e	0.802 ^g
		200	0.561 ^{cd}	0.595 ^d	1.157 ^f	1.064 ^{defg}
	10	0	0.700 ^b	0.755 ^c	1.455 ^{bc}	1.078 ^{def}
		200	0.520 ^{de}	0.793 ^c	1.314 ^e	1.563 ^b
12	0	0	0.609 ^c	0.739 ^c	1.348 ^{de}	1.215 ^{cde}
		200	0.741 ^b	0.777 ^c	1.518 ^b	1.049 ^{defg}
	1	0	0.545 ^d	1.170 ^a	1.716 ^a	2.156 ^a
		200	0.432 ^f	0.966 ^b	1.398 ^{cd}	2.264 ^a
	10	0	0.711 ^b	1.041 ^b	1.752 ^a	1.468 ^{bc}
		200	0.480 ^{ef}	0.593 ^d	1.073 ^g	1.241 ^{cd}
MDS ($P \leq 0.05$)			0.053	0.078	0.064	0.271

Tabla A 4.44. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) AsA					
Tiempo(D)	0.131	1	0.131	96.4	0.0000
ABA	0.290	2	0.145	106.7	0.0000
NaCl(S)	0.223	1	0.223	164.1	0.0000
D x ABA	0.049	2	0.024	17.9	0.0000
D x S	0.051	1	0.051	37.4	0.0000
ABA x S	0.040	2	0.020	14.9	0.0000
D x ABA x S	0.107	2	0.054	39.5	0.0000
Error	0.049	36	0.001		
Total	0.941	47			
b) DHA					
Tiempo(D)	0.407	1	0.407	147.7	0.0000
ABA	0.055	2	0.027	9.9	0.0004
NaCl(S)	0.170	1	0.170	61.7	0.0000
D x ABA	0.536	2	0.268	97.5	0.0000
D x S	0.088	1	0.088	31.9	0.0000
ABA x S	0.046	2	0.023	8.4	0.0010
D x ABA x S	0.238	2	0.119	43.3	0.0000
Error	0.099	36	0.003		
Total	1.639	47			

Apéndice

c) AsA+DHA					
Tiempo(D)	0.076	1	0.076	48.6	0.0000
ABA	0.098	2	0.049	31.4	0.0000
NaCl(S)	0.782	1	0.782	501.4	0.0000
D x ABA	0.411	2	0.205	131.5	0.0000
D x S	0.005	1	0.005	3.2	0.0812
ABA x S	0.167	2	0.084	53.6	0.0000
D x ABA x S	0.661	2	0.331	212.0	0.0000
Error	0.056	36	0.002		
Total	2.257	47			
d) DHA/AsA					
Tiempo(D)	3.165	1	3.165	88.61	0.0000
ABA	2.481	2	1.240	34.72	0.0000
NaCl(S)	0.102	1	0.102	2.862	0.0993
D x ABA	3.576	2	1.788	50.05	0.0000
D x S	0.420	1	0.420	11.75	0.0015
ABA x S	0.107	2	0.053	1.49	0.2385
D x ABA x S	0.176	2	0.088	2.47	0.0988
Error	1.286	36	0.036		
Total	11.313	47			

Tabla A 4.45. Contenido de glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG) y glutatión total (GSH+GSSG) expresados en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PFN, y la relación glutatión oxidado/glutatión reducido (GSSG/GSH) en nódulos de *M. sativa*

Tiempo (D)	ABA (μM)	NaCl (mM)	GSH	GSSG	GSH+GSSG	GSSG/GSH
6	0	0	0.095 ^h	0.036 ⁱ	0.132 ⁱ	0.381 ^d
		200	0.115 ^f	0.044 ^h	0.160 ^g	0.386 ^d
	1	0	0.087 ^{ij}	0.045 ^h	0.133 ⁱ	0.520 ^b
		200	0.093 ^{hi}	0.025 ^j	0.119 ^j	0.273 ^h
	10	0	0.103 ^g	0.050 ^g	0.154 ^h	0.485 ^c
		200	0.083 ^j	0.052 ^f	0.135 ⁱ	0.626 ^a
12	0	0	0.197 ^e	0.070 ^d	0.267 ^e	0.357 ^e
		200	0.196 ^e	0.060 ^e	0.256 ^f	0.307 ^g
	1	0	0.320 ^a	0.107 ^a	0.428 ^a	0.335 ^f
		200	0.226 ^d	0.076 ^c	0.302 ^d	0.338 ^{ef}
	10	0	0.234 ^c	0.083 ^b	0.318 ^c	0.357 ^e
		200	0.251 ^b	0.083 ^b	0.334 ^b	0.331 ^f
MDS ($P \leq 0.05$)			0.007	0.002	0.006	0.020

Tabla A 4.46. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) GSH					
Tiempo(D)	0.238	1	0.238	10471	0.0000
ABA	0.008	2	0.004	168	0.0000
NaCl(S)	0.002	1	0.002	77	0.0000
D x ABA	0.017	2	0.009	380	0.0000
D x S	0.002	1	0.002	107	0.0000
ABA x S	0.006	2	0.003	141	0.0000
D x ABA x S	0.010	2	0.005	209	0.0000
Error	0.001	36	0.000		
Total	0.284	47			
b) GSSG					
Tiempo(D)	0.017	1	0.017	11509	0.0000
ABA	0.002	2	0.001	607	0.0000
NaCl(S)	0.001	1	0.001	593	0.0000
D x ABA	0.002	2	0.001	736	0.0000
D x S	0.000	1	0.000	233	0.0000
ABA x S	0.002	2	0.001	578	0.0000
D x ABA x S	0.000	2	0.000	42	0.0000
Error	0.000	36	0.000		
Total	0.024	47			
c) GSH+GSSG					
Tiempo(D)	0.383	1	0.383	16039	0.0000
ABA	0.015	2	0.008	315	0.0000
NaCl(S)	0.005	1	0.005	214	0.0000
D x ABA	0.031	2	0.015	640	0.0000
D x S	0.005	1	0.005	193	0.0000
ABA x S	0.015	2	0.007	305	0.0000
D x ABA x S	0.011	2	0.005	222	0.0000
Error	0.001	36	0.000		
Total	0.464	47			
d) GSSG/GSH					
Tiempo(D)	23.82	1	23.82	10471	0.0000
ABA	0.76	2	0.38	168	0.0000
NaCl(S)	0.18	1	0.18	77	0.0000
D x ABA	1.73	2	0.87	380	0.0000
D x S	0.24	1	0.24	107	0.0000
ABA x S	0.64	2	0.32	141	0.0000
D x ABA x S	0.95	2	0.48	209	0.0000
Error	0.08	36	0.00		
Total	28.4				

Tabla A 4.47. Contenido de aminoácidos libres totales (Aa) expresados en mg asparragina g⁻¹ PF, prolina (Pro) en mg prolina g⁻¹ PF y azúcares solubles totales (Ast) expresados en mg glucosa g⁻¹ PF en hoja de *M. sativa*

Tiempo (D)	ABA (μM)	NaCl (mM)	Aa	Pro	Ast
6	0	0	4.00 ^f	0.106 ⁱ	12.88 ^c
		200	5.81 ^d	5.969 ^a	24.71 ^a
	1	0	3.92 ^f	0.151 ^{hi}	13.73 ^{de}
		200	3.86 ^f	1.073 ^e	17.29 ^c
12	10	0	2.93 ^g	0.120 ⁱ	16.95 ^c
		200	3.79 ^f	0.974 ^f	20.47 ^b
	0	0	8.31 ^a	0.384 ^g	6.58 ^f
		200	6.45 ^c	3.947 ^c	19.53 ^b
1	0	6.61 ^c	0.176 ^h	16.44 ^c	
	200	6.74 ^c	4.122 ^b	13.93 ^{de}	
10	10	0	5.10 ^c	0.122 ⁱ	14.58 ^d
		200	7.22 ^b	2.025 ^d	17.19 ^c
MDS (P ≤ 0.05)			0.47	0.045	1.15

Tabla A 4.48. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Aa					
Tiempo(D)	86.8	1	86.76	780.2	0.0000
ABA	15.6	2	7.78	70.0	0.0000
NaCl(S)	15.1	1	15.07	135.5	0.0000
D x ABA	0.3	2	0.13	1.2	0.3214
D x S	0.8	1	0.76	6.8	0.0133
ABA x S	7.3	2	3.63	32.7	0.0000
D x ABA x S	0.9	2	0.44	4.0	0.0271
Error	4.0	36	0.11		
Total	130.6	47			
b) Pro					
Tiempo(D)	1.89	1	1.89	1873	0.0000
ABA	26.81	2	13.41	13263	0.0000
NaCl(S)	96.90	1	96.90	95876	0.0000
D x ABA	11.71	2	5.85	5791	0.0000
D x S	1.05	1	1.05	1036	0.0000
ABA x S	23.24	2	11.62	11496	0.0000
D x ABA x S	14.48	2	7.24	7165	0.0000
Error	0.04	36	0.00		
Total	176.12	47			

c) Ast					
Tiempo(D)	105.6	1	105.6	162.7	0.0000
ABA	72.2	2	36.1	55.7	0.0000
NaCl(S)	340.6	1	340.6	525.0	0.0000
D x ABA	93.7	2	46.8	72.2	0.0000
D x S	11.5	1	11.5	17.7	0.0002
ABA x S	141.9	2	70.9	109.3	0.0000
D x ABA x S	122.9	2	61.5	94.7	0.0000
Error	23.4	36	0.6		
Total	911.6	47			

Tabla A 4.49. Contenido de aminoácidos libres totales (Aa) expresados en mg asparragina g⁻¹ PF, prolina (Pro) en mg prolina g⁻¹ PF y azúcares solubles totales (Ast) expresados en mg glucosa g⁻¹ PF en nódulo de *P. vulgaris*

Tiempo (D)	ABA (μM)	NaCl (mM)	Aa	Pro	Ast	
	0	0	24.06 ^b	0.586 ⁱ	40.24 ^c	
		200	30.74 ^a	4.869 ^c	87.66 ^d	
	6	1	0	19.50 ^c	0.509 ^{ij}	17.53 ⁱ
			200	13.68 ^{ef}	1.963 ^c	92.07 ^c
	10	0	17.79 ^d	0.390 ^j	23.49 ^h	
		200	23.16 ^b	1.492 ^g	125.49 ^b	
	12	0	0	24.04 ^b	1.714 ^f	41.59 ^c
			200	13.56 ^f	6.229 ^a	87.80 ^d
	1	0	11.28 ^g	1.079 ^h	33.49 ^f	
		200	14.29 ^{ef}	5.035 ^b	135.46 ^a	
	10	0	14.90 ^e	0.593 ⁱ	27.39 ^g	
		200	14.21 ^{ef}	3.835 ^d	128.34 ^b	
MDS (P ≤ 0.05)			1.32	0.120	3.05	

Tabla A 4.50. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) Aa					
Tiempo(D)	448	1	448.1	523.6	0.0000
ABA	587	2	293.3	342.7	0.0000
NaCl(S)	1	1	1.2	1.4	0.2377
D x ABA	46	2	23.1	26.9	0.0000
D x S	69	1	68.9	80.5	0.0000
ABA x S	43	2	21.5	25.1	0.0000
D x ABA x S	340	2	170.2	198.9	0.0000
Error	31	36	0.9		
Total	1565	47			

Apéndice

b) Pro					
Tiempo(D)	25.1	1	25.1	3523	0.0000
ABA	26.2	2	13.1	1839	0.0000
NaCl(S)	114.7	1	114.7	16115	0.0000
D x ABA	0.8	2	0.4	59	0.0000
D x S	7.9	1	7.9	1112	0.0000
ABA x S	10.8	2	5.4	759	0.0000
D x ABA x S	3.0	2	1.5	209	0.0000
Error	0.3	36	0.0		
Total	188.8	47			
c) Ast					
Tiempo(D)	1523	1	1523	333	0.0000
ABA	1129	2	564	123	0.0000
NaCl(S)	74603	1	74603	16305	0.0000
D x ABA	2048	2	1024	224	0.0000
D x S	211	1	211	46	0.0000
ABA x S	6507	2	3253	711	0.0000
D x ABA x S	544	2	272	59	0.0000
Error	165	36	5		
Total	86728	47			

Tabla A 4.51. Contenido de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) expresado en nmol MDA g⁻¹ PF y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en µmol g⁻¹ PF en hoja(h) y nódulo(n) de *M. sativa*

Tiempo (D)	ABA (µM)	NaCl (mM)	TBARS(h)	TBARS(n)	H ₂ O ₂ (h)	H ₂ O ₂ (n)
6	0	0	30.32 ^a	33.42 ^c	0.281 ^f	0.846 ^c
		200	33.92 ^b	58.67 ^b	0.521 ^b	1.294 ^a
	1	0	23.10 ^{ef}	25.76 ^{fg}	0.307 ^f	0.537 ^h
		200	25.19 ^d	49.11 ^c	0.305 ^f	0.750 ^f
	10	0	35.76 ^a	26.52 ^{fg}	0.390 ^{de}	0.801 ^e
		200	35.76 ^a	49.18 ^c	0.364 ^e	1.071 ^b
12	0	0	17.71 ^g	25.51 ^{fg}	0.188 ^g	0.919 ^d
		200	21.84 ^f	119.24 ^a	0.418 ^d	1.320 ^a
	1	0	30.43 ^c	41.01 ^d	0.213 ^g	0.210 ⁱ
		200	22.45 ^f	27.78 ^f	0.304 ^f	0.971 ^c
	10	0	25.59 ^d	23.73 ^g	0.646 ^a	0.589 ^g
		200	24.11 ^{de}	33.10 ^e	0.461 ^c	1.030 ^b
MDS (P ≤ 0.05)			1.60	3.18	0.031	0.045

Tabla A 4.52. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) TBARS(h)					
Tiempo(D)	586	1	586.1	465.9	0.0000
ABA	238	2	118.8	94.4	0.0000
NaCl(S)	0	1	0.0	0.0	0.8461
D x ABA	521	2	260.6	207.2	0.0000
D x S	40	1	40.4	32.1	0.0000
ABA x S	97	2	48.3	38.4	0.0000
D x ABA x S	63	2	31.6	25.2	0.0000
Error	45	36	1.3		
Total	1590	47			
b) TBARS(n)					
Tiempo(D)	256	1	256	51	0.0000
ABA	6561	2	3281	659	0.0000
NaCl(S)	8655	1	8655	1739	0.0000
D x ABA	2909	2	1455	292	0.0000
D x S	115	1	115	23	0.0000
ABA x S	6631	2	3315	666	0.0000
D x ABA x S	6089	2	3045	612	0.0000
Error	179	36	5		
Total	31396	47			
c) H₂O₂(h)					
Tiempo(D)	0.001	1	0.001	2.5	0.1230
ABA	0.274	2	0.137	289.7	0.0000
NaCl(S)	0.006	1	0.006	12.5	0.0011
D x ABA	0.171	2	0.086	180.5	0.0000
D x S	0.055	1	0.055	115.3	0.0000
ABA x S	0.047	2	0.024	49.6	0.0000
D x ABA x S	0.201	2	0.101	212.5	0.0000
Error	0.017	36	0.001		
Total	0.772	47			
d) H₂O₂(n)					
Tiempo(D)	0.023	1	0.023	17	0.0002
ABA	1.827	2	0.914	663	0.0000
NaCl(S)	2.143	1	2.143	1555	0.0000
D x ABA	0.063	2	0.031	23	0.0000
D x S	0.151	1	0.151	109	0.0000
ABA x S	0.035	2	0.017	13	0.0001
D x ABA x S	0.182	2	0.091	66	0.0000
Error	0.050	36	0.001		
Total	4.473	47			

Tabla A 4.53. Contenido de ácido salicílico libre endógeno (AS) expresados en ng g⁻¹ PF y ácido abscísico libre endógeno (ABA) expresado en pmol g⁻¹ PF en hoja(h) y raíz(r) de *M. sativa*

Tiempo (D)	ABA (μM)	NaCl (mM)	AS(h)	AS(r)	ABA(h)	ABA(r)
6	0	0	167.1 ^c	72.8 ^c	2682 ^c	28.2 ^{ef}
		200	143.7 ^{fg}	34.5 ^g	10010 ^{bc}	64.7 ^{de}
	1	0	279.2 ^c	58.2 ^{dc}	2914 ^c	83.2 ^d
		200	228.3 ^d	49.1 ^{ef}	15778 ^b	120.5 ^c
	10	0	377.4 ^a	65.8 ^{cd}	10248 ^{bc}	457.6 ^b
		200	113.1 ^{hi}	48.6 ^f	50017 ^a	979.3 ^a
12	0	0	152.9 ^{ef}	166.3 ^a	5279 ^{bc}	22.9 ^f
		200	122.9 ^{gh}	112.2 ^b	3430 ^c	30.7 ^{ef}
	1	0	295.9 ^c	47.5 ^f	2601 ^c	78.8 ^d
		200	96.2 ⁱ	27.7 ^{gh}	2482 ^c	35.5 ^{ef}
	10	0	323.6 ^b	25.9 ^{gh}	7809 ^{bc}	130.4 ^c
		200	161.8 ^{ef}	25.1 ^h	4055 ^{bc}	53.9 ^{def}
MDS (P ≤ 0.05)			22.3	9.2	11878	36.5

Tabla A 4.54. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) AS(h)					
Tiempo(D)	8027	1	8027	32.9	0.0000
ABA	85080	2	42540	174.4	0.0000
NaCl(S)	177709	1	177709	728.5	0.0000
D x ABA	6505	2	3253	13.3	0.0000
D x S	937	1	937	3.8	0.0578
ABA x S	69568	2	34784	142.6	0.0000
D x ABA x S	31777	2	15889	65.1	0.0000
Error	8782	36	244		
Total	388385	47			
b) AS(r)					
Tiempo(D)	1920	1	1920	46.1	0.0000
ABA	30067	2	15033	361.0	0.0000
NaCl(S)	6468	1	6468	155.3	0.0000
D x ABA	32447	2	16224	389.6	0.0000
D x S	34	1	34	0.8	0.3694
ABA x S	3226	2	1613	38.7	0.0000
D x ABA x S	601	2	301	7.2	0.0023
Error	1499	36	42		
Total	76263	47			

c) ABA(h)					
Tiempo(D)	1451706884	1	1451706884	21.01	0.0001
ABA	1638953641	2	819476821	11.86	0.0001
NaCl(S)	980589827	1	980589827	14.19	0.0006
D x ABA	1092083279	2	546041640	7.90	0.0014
D x S	1438059371	1	1438059371	20.81	0.0001
ABA x S	508884324	2	254442162	3.68	0.0351
D x ABA x S	70959271	2	354479636	5.13	0.0110
Error	2487246177	36	69090172		
Total	1.0306E+10	47			
d) ABA(r)					
Tiempo(D)	635949	1	635949	972.2	0.0000
ABA	1300817	2	650408	994.3	0.0000
NaCl(S)	77959	1	77959	119.2	0.0000
D x ABA	942394	2	471197	720.4	0.0000
D x S	166848	1	166848	255.1	0.0000
ABA x S	122279	2	61139	93.5	0.0000
D x ABA x S	198281	2	99141	151.6	0.0000
Error	23548	36	654		
Total	3468074	47			

Tabla A 4.55. Contenido de diaminopropano (DAP), putrescina (PUT), cadaverina (CAD), espermidina (SPD) y espermina (SPM) expresado en nmol g⁻¹ PF en hoja de *M. sativa*

Tiempo (D)	ABA (μM)	NaCl (mM)	DAP	PUT	CAD	SPD	SPM
6	0	0	34.74 ^a	27.06 ^b	22.32 ^a	121.74 ^c	79.90 ^a
		200	17.40 ^c	12.08 ^c	11.59 ^c	25.96 ^f	41.72 ^d
	10	0	8.31 ^e	27.84 ^a	9.38 ^f	149.06 ^b	72.73 ^b
		200	7.55 ^e	15.81 ^d	13.62 ^b	59.22 ^d	19.40 ^f
12	0	0	19.97 ^b	12.24 ^c	10.21 ^{de}	59.14 ^d	16.22 ^g
		200	10.63 ^d	11.20 ^f	13.75 ^b	21.35 ^g	54.11 ^c
	10	0	10.29 ^d	20.49 ^c	9.43 ^{ef}	221.15 ^a	19.40 ^f
		200	8.28 ^e	12.55 ^e	10.68 ^d	41.64 ^e	33.07 ^e
MDS (P ≤ 0.05)			0.78	0.75	0.81	1.41	1.26

Tabla A 4.56. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) DAP					
Tiempo(D)	177	1	177	616	0.0000
ABA	1167	1	1167	4053	0.0000
NaCl(S)	434	1	434	1507	0.0000
D x ABA	294	1	294	1021	0.0000
D x S	23	1	23	79	0.0000
ABA x S	286	1	286	995	0.0000

Apéndice

D x ABA x S	43	1	43	148	0.0000
Error	7	24	0		
Total	2430	31			
b) PUT					
Tiempo(D)	346	1	345.9	1,284	0.0000
ABA	100	1	99.6	370	0.0000
NaCl(S)	648	1	647.6	2,404	0.0000
D x ABA	13	1	13.0	48	0.0000
D x S	162	1	162.4	603	0.0000
ABA x S	8	1	7.8	29	0.0000
D x ABA x S	48	1	48.5	180	0.0000
Error	6	24	0.3		
Total	1331	31			
c) CAD					
Tiempo(D)	82.4	1	82.4	266.1	0.0000
ABA	109.0	1	109.0	351.9	0.0000
NaCl(S)	1.4	1	1.4	4.6	0.0418
D x ABA	24.9	1	24.9	80.4	0.0000
D x S	63.6	1	63.6	205.2	0.0000
ABA x S	80.4	1	80.4	259.6	0.0000
D x ABA x S	149.1	1	149.1	481.2	0.0000
Error	7.4	24	0.3		
Total	518.2	31			
d) SPD					
Tiempo(D)	81	1	81	86	0.0000
ABA	29492	1	29492	31438	0.0000
NaCl(S)	81171	1	81171	86529	0.0000
D x ABA	7408	1	7408	7897	0.0000
D x S	501	1	501	534	0.0000
ABA x S	9218	1	9218	9827	0.0000
D x ABA x S	10901	1	10901	11621	0.0000
Error	23	24	1		
Total	138794	31			
e) SPM					
Tiempo(D)	4135	1	4135	5523	0.0000
ABA	1121	1	1121	1497	0.0000
NaCl(S)	798	1	798	1066	0.0000
D x ABA	67	1	67	90	0.0000
D x S	10235	1	10235	13670	0.0000
ABA x S	775	1	775	1035	0.0000
D x ABA x S	41	1	41	55	0.0000
Error	18	24	1		
Total	17190	31			

Tabla A 4.57. Contenido de diaminopropano (DAP), putrescina (PUT), cadaverina (CAD), espermidina (SPD) y espermina (SPM) expresado en nmol g⁻¹ PF en raíz de *P. vulgaris*

Tiempo (D)	ABA (μM)	NaCl (mM)	DAP	PUT	CAD	SPD	SPM
6	0	0	63.10 ^c	11.77 ^c	19.32 ^f	10.10 ^f	1.93 ^d
		200	75.70 ^b	12.37 ^e	28.22 ^e	19.14 ^{bc}	3.35 ^e
	10	0	47.94 ^f	35.08 ^a	33.44 ^d	19.53 ^b	3.11 ^c
		200	32.89 ^h	30.03 ^b	62.81 ^a	26.82 ^a	8.33 ^a
12	0	0	52.29 ^d	9.40 ^f	12.60 ^g	11.25 ^c	1.53 ^c
		200	77.68 ^a	11.46 ^c	18.44 ^f	18.36 ^c	6.80 ^b
	10	0	49.69 ^e	29.77 ^c	44.09 ^c	12.42 ^d	3.37 ^c
		200	43.65 ^g	26.93 ^d	52.50 ^b	11.41 ^{dc}	3.18 ^c
MDS (P ≤ 0.05)			1.45	0.94	1.39	1.09	0.32

Tabla A 4.58. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) DAP					
Tiempo(D)	7	1	6.741	6.777	0.0156
ABA	4475	1	4475.467	4499.297	0.0000
NaCl(S)	143	1	142.823	143.583	0.0000
D x ABA	227	1	227.444	228.656	0.0000
D x S	238	1	237.552	238.817	0.0000
ABA x S	1746	1	1745.728	1755.023	0.0000
D x ABA x S	7	1	7.129	7.167	0.0132
Error	24	24	0.995		
Total	6867	31			
b) PUT					
Tiempo(D)	68	1	68.36	163.704	0.0000
ABA	2949	1	2948.88	7061.795	0.0000
NaCl(S)	14	1	13.699	32.806	0.0000
D x ABA	13	1	13.16	31.514	0.0000
D x S	7	1	6.741	16.144	0.0005
ABA x S	56	1	55.618	133.191	0.0000
D x ABA x S	0	1	0.285	0.683	0.4167
Error	10	24	0.418		
Total	3117	31			
c) CAD					
Tiempo(D)	131	1	130.596	142.399	0.0000
ABA	6527	1	6527.126	7117.026	0.0000
NaCl(S)	1379	1	1378.945	1503.57	0.0000
D x ABA	142	1	141.768	154.581	0.0000
D x S	289	1	288.625	314.71	0.0000
ABA x S	266	1	265.819	289.843	0.0000

Apéndice

D x ABA x S	160	1	160.224	174.704	0.0000
Error	22	24	0.917		
Total	8915	31			
d) SPD					
Tiempo(D)	245.6	1	245.565	435.872	0.0000
ABA	64.2	1	64.163	113.888	0.0000
NaCl(S)	251.4	1	251.37	446.176	0.0000
D x ABA	262.0	1	261.99	465.026	0.0000
D x S	52.4	1	52.371	92.958	0.0000
ABA x S	48.7	1	48.706	86.453	0.0000
D x ABA x S	20.4	1	20.354	36.127	0.0000
Error	13.5	24	0.563		
Total	958.0	31			
e) SPM					
Tiempo(D)	1.7	1	1.69	26	0.0000
ABA	9.6	1	9.59	148	0.0000
NaCl(S)	68.7	1	68.68	1,062	0.0000
D x ABA	31.5	1	31.52	487	0.0000
D x S	1.2	1	1.22	19	0.0002
ABA x S	1.4	1	1.38	21	0.0001
D x ABA x S	42.9	1	42.87	663	0.0000
Error	1.6	24	0.06		
Total	158.5	31			

Tabla A 4.59. Contenido de diaminopropano (DAP), putrescina (PUT), cadaverina (CAD), espermidina (SPD) y espermina (SPM) expresado en nmol g⁻¹ PF en nódulo de *M. sativa*

Tiempo (D)	ABA (μM)	NaCl (mM)	DAP	PUT	CAD	SPD	SPM
6	0	0	26.41 ^d	27.86 ^f	15.65 ^f	27.68 ^e	5.31 ^d
		200	16.59 ^c	48.02 ^c	37.50 ^c	17.86 ^g	3.13 ^c
	10	0	34.90 ^c	117.58 ^b	31.25 ^e	38.13 ^c	6.09 ^c
		200	27.42 ^d	71.02 ^c	54.11 ^b	26.72 ^e	8.30 ^b
12	0	0	40.42 ^a	23.91 ^g	9.95 ^g	48.91 ^b	6.69 ^c
		200	37.11 ^b	25.23 ^g	35.63 ^d	53.80 ^a	19.95 ^a
	10	0	7.68 ^f	178.91 ^a	37.89 ^c	29.38 ^d	7.99 ^b
		200	27.16 ^d	65.03 ^d	60.34 ^a	21.85 ^f	6.09 ^c
MDS (P ≤ 0.05)			1.21	1.85	1.81	1.18	0.61

Tabla A 4.60. Análisis de la varianza correspondiente a los resultados de la tabla anterior

	SC	gl	CM	F calculada	P
a) DAP					
Tiempo(D)	25	1	25	36	0.0000
ABA	273	1	273	393	0.0000
NaCl(S)	1	1	1	1	0.3514

D x ABA	1922	1	1922	2769	0.0000
D x S	560	1	560	807	0.0000
ABA x S	316	1	316	455	0.0000
D x ABA x S	209	1	209	301	0.0000
Error	17	24	1		
Total	3322	31			
b) PUT					
Tiempo(D)	409	1	409	252	0.0000
ABA	47278	1	47278	29148	0.0000
NaCl(S)	9655	1	9655	5952	0.0000
D x ABA	3369	1	3369	2077	0.0000
D x S	3711	1	3711	2288	0.0000
ABA x S	16549	1	16549	10203	0.0000
D x ABA x S	1176	1	1176	725	0.0000
Error	39	24	2		
Total	82184	31			
c) CAD					
Tiempo(D)	14	1	14	9	0.0061
ABA	3601	1	3601	2336	0.0000
NaCl(S)	4309	1	4309	2795	0.0000
D x ABA	209	1	209	136	0.0000
D x S	6	1	6	4	0.0639
ABA x S	2	1	2	2	0.2196
D x ABA x S	9	1	9	6	0.0236
Error	37	24	2		
Total	8188	31			
d) SPD					
Tiempo(D)	948	1	948	1451	0.0000
ABA	518	1	518	793	0.0000
NaCl(S)	285	1	285	436	0.0000
D x ABA	2505	1	2505	3835	0.0000
D x S	173	1	173	265	0.0000
ABA x S	98	1	98	150	0.0000
D x ABA x S	59	1	59	90	0.0000
Error	16	24	1		
Total	4601	31			
e) SPM					
Tiempo(D)	160.2	1	160.2	896	0.0000
ABA	21.7	1	21.7	122	0.0000
NaCl(S)	64.7	1	64.7	362	0.0000
D x ABA	171.3	1	171.3	958	0.0000
D x S	64.2	1	64.2	359	0.0000
ABA x S	57.9	1	57.9	324	0.0000
D x ABA x S	191.1	1	191.1	1069	0.0000
Error	4.3	24	0.2		
Total	735.4	31			

Tabla A 5.1. Actividad catalasa expresada en nkat g⁻¹ PF en hoja de *P. vulgaris* a lo largo de la ontogenia del cultivo

Tiempo (D)	Actividad	Error estándar
7	29.1	1.4
12	19.7	1.4
17	3.9	0.4
28	2.7	0.2

Tabla A 5.2. Actividad catalasa expresada en nkat g⁻¹ PF en hoja de *M. sativa* a lo largo de la ontogenia del cultivo

Tiempo (D)	Actividad	Error estándar
21	3.5	0.3
35	5.4	0.2
49	6.5	0.1
70	15.6	0.8

Tabla A 5.3. Actividad catalasa expresada en μ kat g⁻¹ PF en hoja y nódulo de *P. vulgaris* en condiciones de estrés salino

NaCl (mM)	Hoja	Error estándar	Nódulo	Error estándar
0	2.7	0.14	29	0.40
25	1.7	0.10	17.5	0.30
50	0.8	0.06	7.1	0.25

Tabla A 5.4. Actividad catalasa expresada en μ kat g⁻¹ PF en hoja y nódulo de *M. sativa* en condiciones de estrés salino

NaCl (mM)	Hoja	Error estándar	Nódulo	Error estándar
0	13.5	0.49	102.3	1.38
100	12.7	0.35	65.8	1.02
200	2.3	0.30	55.5	1.07

Tabla A 5.5. Porcentaje relativo de actividad catalasa en hoja de *P. vulgaris* y *M. sativa* durante la incubación *in vitro* (1h) con diferentes dosis de sal

NaCl (mM)	<i>P. vulgaris</i>		<i>M. sativa</i>	
	% Actividad	Error estándar	% Actividad	Error estándar
0	100	8.5	100	1.1
25	97.2	2.2	74.5	3.2
50	73.2	9.3	39.8	2.7
100	65.4	11.4	29.0	8.1
150	55.9	8.5	12.4	1.0
250	43.5	1.6	5.4	1.0
500	21.1	1.5	0.6	0.2

Tabla A 5.6. Porcentaje relativo de actividad catalasa en nódulo de *P. vulgaris* y *M. sativa* durante la incubación *in vitro* (1h) con diferentes dosis de sal

NaCl (mM)	<i>P. vulgaris</i>		<i>M. sativa</i>	
	% Actividad	Error estándar	% Actividad	Error estándar
0	100	2.2	100	2.2
25	52.3	1.6	99.5	2.6
50	48.6	1.2	83.4	3.7
100	30.3	1.0	79.9	1.5
150	16.3	0.1	63.5	2.2
200	16.0	1.0	67.2	1.5
250	11.3	0.5	50.3	2.6
500	0.0	0.0	33.3	2.1

Tabla 5.1. Actividad catalasa nodular ($\mu\text{kat ml}^{-1}$) de *P. vulgaris* y *M. sativa* durante la incubación *in vitro* (1 y 4 h) en presencia de diferentes inhibidores. La actividad enzimática es expresada como porcentaje relativo a la actividad en la reacción control sin inhibidor. La actividad CAT en la reacción control era de $0.5 \mu\text{kat ml}^{-1}$.

Inhibidores	<i>P. vulgaris</i>		<i>M. sativa</i>	
	1 h	4 h	1 h	4 h
Control	100.0	100.0	100.0	100.0
Oxígeno	100.0	100.0	100.0	100.0
Superóxido	100.0	100.0	100.0	100.0
Citrato	85.4	79.6	90.9	99.7
Dithiothreitol	35.6	49.9	62.7	79.0
Ditionito	14.6	5.2	62.0	63.3
β -mercaptoetanol	9.7	2.4	49.0	51.7
Cianuro	0.0	19.8	1.9	15.9
MDS (P<0.05)	6.1		7.3	



GRUPO DE FIJACIÓN DE NITRÓGENO
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE GRANADA

