



98

170

246

98 SECCIÓN SEQUÍA
170 SECCIÓN METALES PESADOS
246 SECCIÓN RIZOBIOS



Universidad Politécnica de Cartagena
Departamento de Producción Vegetal

TESIS DOCTORAL 2012

**Respuestas fisiológicas de
Bituminaria bituminosa frente a
sequía y metales pesados.**

Domingo Martínez-Fernández





Universidad Politécnica de Cartagena

Departamento de Producción Vegetal

**Respuestas fisiológicas de
Bituminaria bituminosa frente a
sequía y metales pesados.**

Domingo Martínez Fernández

2012



Universidad Politécnica de Cartagena

Departamento de Producción Vegetal

**Respuestas fisiológicas de
Bituminaria bituminosa frente a
sequía y metales pesados.**

Domingo Martínez Fernández

Director

Dr. D. David-James Walker

2012

**CONFORMIDAD DE SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN DE DEPÓSITO DE TESIS DOCTORAL POR
EL DIRECTOR DE LA TESIS**

Doctor D. David-James Walker, Director de la Tesis doctoral

“Respuestas fisiológicas de *Bituminaria bituminosa* frente a sequía y metales pesados”

INFORMA:

Que la referida Tesis Doctoral, ha sido realizada por **D. Domingo Martínez Fernández**, dando mi conformidad para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

La rama de conocimiento por la que esta tesis ha sido desarrollada es:

- Ciencias
- Ciencias Sociales y Jurídicas
- Ingeniería y Arquitectura

En Cartagena, a 17 de Abril de 2012

EL DIRECTOR DE LA TESIS



Fdo.: David-James Walker

COMISIÓN DE DOCTORADO

**CONFORMIDAD DE SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN DE DEPÓSITO DE TESIS DOCTORAL POR
EL TUTOR DEL PROGRAMA**

Doctor D. Rafael Domingo Miguel, Tutor del Programa Técnicas Avanzadas en Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario,

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral “**Respuestas fisiológicas de *Bituminaria bituminosa* frente a sequía y metales pesados**” ha sido realizada por **D. Domingo Martínez Fernández**, dando mi conformidad para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

La rama de conocimiento por la que esta tesis ha sido desarrollada es:

- Ciencias
- Ciencias Sociales y Jurídicas
- Ingeniería y Arquitectura

En Cartagena, a 17 de Abril de 2012

EL TUTOR DEL PROGRAMA

Fdo.:



COMISIÓN DE DOCTORADO



CONFORMIDAD DE DEPOSITO DE TESIS DOCTORAL
POR LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA

D/D^a. Francisco Artés Hernández, Presidente/a de la Comisión Académica del Programa
Técnicas Avanzadas en Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada, **Respuestas fisiológicas de *Bituminaria bituminosa* frente a sequía y metales pesados**", ha sido realizada por **D. Domingo Martínez Fernández**, bajo la dirección y supervisión del **Dr. David-James Walker**, dando su conformidad a la misma la Comisión Académica, con la finalidad de que sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

La Rama de conocimiento por la que esta tesis ha sido desarrollada es:

- Ciencias
- Ciencias Sociales y Jurídicas
- Ingeniería y Arquitectura

En Cartagena, a 17 de Abril de 2012

EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA

Fdo: 
Francisco Artés Hernández

COMISIÓN DE DOCTORADO

Publicaciones Científico-Técnicas derivadas de esta Tesis Doctoral

- Bernal, M.P., Clemente, R., de la Fuente, C., Pardo, T., Albuquerque, J.A., Bustamante, M.A., Martínez-Alcaraz, I., **Martínez-Fernández, D.**, Walker, D.J. 2010. Nuevas opciones y revalorización del purín porcino. *Tierras de Castilla*, 174, 54-57. Gestora de Comunicaciones de Castilla León (Valladolid).
- Martínez-Fernández, D.**, Walker, D.J., Romero, P., Correal, E. 2010. The physiology of drought tolerance in Tecera (*Bituminaria bituminosa*). *Options méditerranéennes. The contributions of grasslands to the conservation of Mediterranean biodiversity. Series A: Mediterranean Seminars*, Number 92, 155-159. ISSN: 1016-121-X.
- Martínez-Fernández, D.**, Walker, D.J., Romero-Espinar, P., Flores Fernández-Villamil, M.P., del Río, J.A. 2011. Physiological responses of *Bituminaria bituminosa* to heavy metals. *Journal of Plant Physiology*, 168, 2206– 2211.
- Martínez-Fernández, D.**, Walker, D.J. 2012. The Effects of Soil Amendments on the Growth of *Atriplex halimus* and *Bituminaria bituminosa* in Heavy Metal-Contaminated Soils. *Water, Air, and Soil Pollution*, 223, 63-72.
- Martínez-Fernández, D.**, Walker, D.J., Romero-Espinar, Martínez-Ballesta, M.C., Correal, E. The response of the leguminous fodder plant *Bituminaria bituminosa* to water stress. Aceptado para publicación en *Journal of Agronomy and Crop Science* (online: 9, Abril, 2012. DOI: 10.1111/j.1439-037X.2012.00515.x).
- Walker, D.J., **Martínez-Fernández, D.**, Correal, E., Romero-Espinar, P., del Río, J.A. 2012. Accumulation of furanocoumarins by *Bituminaria bituminosa* in relation to plant development and environmental stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 54, 133-139.
- Clemente, R., Walker, D.J., Pardo, T., **Martínez-Fernández, D.**, Bernal, M.P. 2012. The use of a halophytic plant species and organic amendments for the remediation of a trace elements-contaminated soil under semi-arid conditions. Aceptado para publicación en *Journal of Hazardous Materials* 223-224, 63-71.
- Pardo, T., **Martínez-Fernández, D.**, Clemente, R., Bernal, M.P., Walker, D.J. Phytostabilisation with native plants of a heavy metal-contaminated soil and natural attenuation by vegetation succession. En redacción.

Participación en Proyectos de I+D financiados en Convocatorias públicas

Fitoestabilización de suelos contaminados por metales pesados: efecto suelo-planta. Entidad financiadora: Ministerio de Ciencia e Innovación, Plan Nacional de I+D+I, proyecto nº. CTM2007-66401-C02-01/TECNO. Duración: 1/10/2007 - 31/12/2010.

Selección masal, propagación y producción de semilla de dos cultivares sintéticos de *Bituminaria bituminosa* con tolerancia a frío y sequía. Entidad financiadora: Ministerio de Educación y Ciencia – INIA, proyecto nº. RTA2007-00046-00-00. Duración: 1/1/2008 – 31/12/2010.

Efecto de las condiciones de cultivo sobre la producción de furanocumarinas por *Bituminaria bituminosa*. Entidad financiadora: Fundación Séneca-Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia, proyecto nº. 11776/PI/09. Duración: 1/1/2010 – 31/12/2011.

Estudio de la biosíntesis, regulación y actividad terapéutica de las furanocumarinas de *Bituminaria bituminosa*. Entidad financiadora: Ministerio de Ciencia e Innovación, proyecto nº. BFU2010-19599. Duración: 1/1/2011 – 31/12/2013.

Contribuciones a Congresos

Bernal, M.P., Pardo, T., Martínez-Fernández, D., Walker, D.J., Clemente, R. Utilización de enmiendas orgánicas para la fitorrecuperación de suelos contaminados por elementos traza en la zona minera de La Unión (Murcia).

Tipo de participación: Comunicación Oral

Congreso: V Simposio Nacional sobre control de la degradación y uso sostenible del suelo

Lugar celebración: Murcia, España **Fecha:** 27-30 /Junio/2011

Walker, D.J., Martínez-Fernández, D., Romero Espinar, P., Romero Azorín, P., Dabauza Micó, M., Pazos Navarro, M., Correal, E., del Río, J.A. The effect of environmental conditions on the accumulation of furanocoumarins by *Bituminaria bituminosa*.

Tipo de participación: Comunicación Oral

Congreso: Plant Abiotic Stress Tolerance

Publicación: Book of proceedings. ISBN 978-90-367-4982-4

Lugar celebración: Groningen, Holanda **Fecha:** 5-9/junio/2011

Pardo T., Clemente, R., Martínez-Fernández, D., Walker, D.J., Bernal, M.P. The use of compost and pig slurry in the phytostabilisation of heavy metals contaminated soil.

Tipo de participación: Poster

Congreso: 20th The Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) Congress

Publicación: Europe: Extended Abstracts. Science and Technology for Environmental Protection

Lugar celebración: Sevilla, España **Fecha:** 23-27/Mayo/2010

Martínez-Fernández, D., Walker, D.J., Romero, P., Correal, E. The Physiology of Drought Tolerance in Tедера (*Bituminaria bituminosa*).

Tipo de participación: Poster

Congreso: the 13th Meeting of the FAO-CIEAM sub-Network on Mediterranean Pastures and Fodder Crops

Publicación: The contributions of grasslands to the conservation of Mediterranean biodiversity. C. Porqueddu, S. Ríos (eds). Zaragoza: CIHEAM/ CIBIO/ FAO/ SEEP. 2010, 286 p. (Options Méditerranéennes, Series A: Mediterranean Seminars, No. 92). ISSN: 1016-121-X- ISBN: 2-85352-435-3

Lugar celebración: Alicante, España **Fecha:** 7-10/Abril/2010

Walker.J. D., Martínez-Fernández. D., Clemente R., Pardo T., Bernal M.P. Phytoremediation using the heavy metal, cold, salt and drought-tolerant species *Atriplex halimus L.*

Tipo de participación: Poster

Congreso: COST Action 859 “Phytotechnologies to promote sustainable land use and improve food safety” Final Conference

Publicación: página web de COST Action 859 (<http://www.gre.ac.uk/cost859/>)

Lugar celebración: Ascona, Suiza **Fecha:** 11-16/Octubre/2009

Martínez-Fernández, D. , Walker, D.J. The Physiological Response to Water Stress of Plants Grown in Pots, in the Field and in Hydroponics.

Tipo de participación: Poster

Congreso: Plant Abiotic Stress Tolerance

Publicación: Book of proceedings

Lugar celebración: Viena, Austria **Fecha:** 08-11/Febrero/2009

Abreviaturas

[]	Concentración
[Zn] _{ext}	Concentración externa de Zinc
μM	micromolar
μmol	micromoles
A	Tasa fotosintética
AAs	Aminoácidos
ABA	Ácido abscísico
AFE	Área Foliar Específica (SLA, Specific Leaf Area)
AO	Ajuste Osmótico
CCC	Capacidad de cambio de cationes
CRA	Contenido Relativo de Agua (RWC, Relative Water Content)
DN	Disolución nutritiva
FCs	Furanocumarinas
HR	Humedad Relativa
MO	Materia Orgánica
MPs	Metales Pesados
MS	Materia Seca
Mt	Millones de toneladas
pg	picogramos
pm	peso molecular
Pob.	Población
Pro	Prolina
PS	Peso Seco
PSI	Fotosistema I
ROS	Reactive Oxygen Species
TCR	Tasa de Crecimiento Relativa
TNCs	total nonstructural carbohydrate
UE	Unión Europea
UFL	Unidades Forrajeras de Leche
Var.	Variedad
Ψ _p	Potencial Turgor
Ψ _s	Potencial Osmótico
Ψ _w	Potencial Hídrico de la hoja (Leaf Water Potential)

Resumen

Bituminaria bituminosa (L.) C.H. Stirton es una especie leguminosa (Fabaceae), con tres intrataxones: variedad *bituminosa*, que aparece en toda la Cuenca mediterránea e Islas Canarias (precipitación anual de 200-800 mm), y variedades *albomarginata* (120-180 mm), y *crassiuscula* (zonas de alta montaña y fríos inviernos) que únicamente crecen de manera natural en las Islas Canarias.

El interés de su estudio nace en sus múltiples aplicaciones potenciales. Se ha utilizado de manera tradicional para la producción de alimento para ganado en las Islas Canarias, y existe un creciente interés internacional por el uso forrajero de *B. bituminosa*. Gracias a su capacidad para rebrotar tras el pastoreo y para permanecer verde durante periodos secos, esta especie se utiliza actualmente como planta modelo en programas de producción de forraje en Australia. Los frutos y hojas de *B. bituminosa* pueden llegar a acumular cerca de 4000 $\mu\text{g g}^{-1}$ de psoraleno, y 10000 $\mu\text{g g}^{-1}$ de angelicina (del Río y col., 2010), compuestos de aplicación farmacéutica muy amplia. *B. bituminosa* también crece de manera natural en suelos contaminados con elevadas concentraciones de metales pesados (MPs), como en la Sierra Minera de La Unión, por lo que resulta muy relevante evaluar su uso potencial en la fitorremediación en este tipo de suelos con clima semiárido.

B. bituminosa presenta características que la catalogan como una especie que posee una elevada resistencia constitutiva a la sequía. Aunque escapa de la sequía estival mediante la pérdida de parte de sus hojas, las poblaciones más tolerantes estarán mejor adaptadas para soportar periodos secos, tanto en verano como durante el resto del año, evitando el estrés interno a través del mantenimiento de sus relaciones hídricas. La selección de cada variedad dependerá del uso en el que se pretendan utilizar, habiéndose detectado diferencias en sus respuestas fisiológicas frente a sequía.

B. bituminosa es capaz de germinar en suelos altamente contaminados con Zn, y posee una alta tolerancia al Zn, en comparación con otras especies, sobre todo la población C2, procedente de un suelo contaminado por MPs cercano a la antigua zona minera de La Unión, de la cual podría decirse que posee resistencia. La población C2 es

menos sensible a altos niveles tisulares de Zn que LA, de suelo limpio, inhibiendo menos su crecimiento, tanto en parte aérea como en raíz.

B. bituminosa es capaz de restringir el transporte de MPs a las partes aéreas, lo que la hace relevante en el campo de la fitoestabilización (fijación química de los contaminantes a través del uso de plantas). Podría considerarse que *B. bituminosa* es una especie apropiada para una etapa inicial en la revegetación de suelos no salinos, moderadamente contaminados por MPs, y con pH en el intervalo neutro-alcalino (pH 6,5-8,0). Se trata de una especie capaz de formar nódulos con bacterias simbiotes que le permiten fijar N₂ atmosférico y mejorar la fertilidad del lugar, algo especialmente de interés para la revegetación de sitios contaminados, normalmente muy pobres en nutrientes. Por otro lado, desde una perspectiva fitorremediadora, una escasa biomasa podría suponer una ventaja por disminuir la posibilidad de que los metales contaminantes se incorporen a las cadenas tróficas desde la parte aérea de las plantas.

Para la extracción de FCs para aplicaciones farmacéuticas, resultaría interesante seleccionar plantas con mayor retención de hojas durante los periodos secos, cuando precisamente su concentración es más elevada. Las poblaciones canarias presentan mayor proporción de psoraleno mientras que las poblaciones peninsulares presentaron mayor proporción de angelicina. La presencia de distintos MPs en el medio afecta de diferente manera a las relaciones hídricas, y a su vez a la acumulación de FCs, sin que la relación psoraleno:angelicina se vea afectada por la exposición a MPs.

La alta acumulación de FCs, y su mantenimiento de las relaciones hídricas, hacen de *B. bituminosa* una candidata adecuada para la producción de estos compuestos a escala de campo. Asumiendo los niveles de psoraleno obtenidos en los ensayos, para una producción en campo de *B. bituminosa* de 20-40 toneladas de materia verde ha⁻¹ año⁻¹, podrían obtenerse entre 4,6-9,2 Kg de psoraleno ha⁻¹ año⁻¹.

Existe diversidad genética de cepas que nodulan con *B. bituminosa*, con diferencias en su comportamiento simbiótico. Puede ser nodulada por bacterias de los géneros *Phylobacterium* y *Rhizobium*, y por la especie *Mesorhizobium ciceri*.

2 INTRODUCCIÓN

70 OBJETIVOS

74 MATERIAL Y MÉTODOS

98 SECCIÓN SEQUÍA

100 **CAPÍTULO I:** Sequía en maceta

118 **CAPÍTULO II:** Sequía en parcela

136 **CAPÍTULO III:** Sequía en hidropónico

148 **DISCUSIÓN SEQUÍA**

170 SECCIÓN METALES PESADOS

172 **CAPÍTULO IV:** Metales pesados en maceta

194 **CAPÍTULO V:** Metales pesados en parcela

224 **CAPÍTULO VI:** Metales pesados en hidropónico

246 SECCIÓN RIZOBIOS

248 **CAPÍTULO VII:** Cepas nodulantes de *B. bituminosa*

266 CONCLUSIONES GENERALES

272 BIBLIOGRAFÍA

308 ANEXOS



1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. <i>Bituminaria bituminosa</i>	2
1.1.1. Botánica.....	2
1.1.2. Distribución de las variedades	5
1.1.3. <i>B. bituminosa</i> mediante técnicas genéticas y moleculares	12
1.1.4. Usos	13
1.1.4.1. Ganadería.....	13
1.1.4.2. Producción de compuestos secundarios	15
1.1.4.3. Otros usos de la planta	19
1.2. Nutrición mineral.....	20
1.2.1. Macronutrientes	21
1.2.2. Micronutrientes	24
1.3. Metabolismo nitrogenado.....	29
1.3.1. Incorporación de nitrógeno a la planta.....	29
1.3.2. Fijación de nitrógeno en raíces de leguminosas.....	32
1.3.3. Prolina	36
1.4. Interacciones entre factores ambientales y plantas	38
1.4.1. Sequía.....	39
1.4.2. Calor	48
1.4.3. Alta intensidad lumínica.....	49
1.4.4. Metales pesados (MPs)	49
1.4.5. Combinación de estreses abióticos.....	55
1.5. Fitotecnologías para la protección de tierras marginales	57
1.5.1. Contra la erosión y desertificación	57
1.5.2. Suelos contaminados por MPs.....	59
1.5.2.1. La antigua zona minera de La Unión	61
1.5.2.2. Remediación de suelos contaminados por MPs	63

2. OBJETIVOS	70
3. MATERIAL Y MÉTODOS	74
3.1. Condiciones para los ensayos	75
3.2. Determinaciones analíticas referentes a plantas	78
3.2.1. Biomasa	78
3.2.2. Tasa de Crecimiento Relativa (TCR)	78
3.2.3. CCC (Capacidad de Cambio de Cationes)	78
3.2.4. Relaciones hídricas	79
3.2.4.1. Potencial hídrico del xilema de la hoja a mediodía (Ψ_w)	79
3.2.4.2. Potencial osmótico (Ψ_s)	79
3.2.4.3. Potencial de turgor (Ψ_p)	79
3.2.4.4. Contenido Relativo de Agua (CRA)	80
3.2.4.5. Área Foliar Específica (AFE)	81
3.2.5. Nitrógeno y compuestos nitrogenados	81
3.2.5.1. Aminoácidos	81
3.2.5.2. Nitrógeno total	82
3.2.5.3. Amonio	82
3.2.6. Carbohidratos	83
3.2.6.1. Azúcares libres	83
3.2.6.2. Almidón	84
3.2.7. Ácidos orgánicos	84
3.2.8. Furanocumarinas (FCs)	85
3.2.9. Conductividad hidráulica de las raíces (L_o)	85
3.2.10. Análisis elemental	86
3.3. Suelos	87
3.3.1. Capacidad de campo o WHC (Water Holding Capacity)	87
3.3.2. pH del suelo	87
3.3.3. Elementos disponibles /asimilables en el suelo	87

3.3.4. MPs asimilables (Extracción con DTPA)	88
3.3.5. MPs disponibles (Extracción con CaCl ₂)	88
3.3.6. Nitrógeno total en suelo	89
3.4. Disoluciones nutritivas.....	89
3.4.1. Disolución nutritiva completa	89
3.4.2. Disolución nutritiva para ensayo MPs.....	89
3.4.3. Disolución nutritiva para ensayos Rizobios.....	90
3.5. Técnicas relacionadas con cepas nodulantes	90
3.5.1. Composición medio YEM	90
3.5.2. Composición medio LA.....	91
3.5.3. REP-PCR	91
3.5.4. ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis).....	91
3.5.5. Preparación de suspensión inoculante	92
3.5.6. Identificación de bacterias mediante 16S.....	92
3.5.6.1. Amplificación de la región 16S.....	92
3.5.6.2. Preparación para secuenciación	94
3.6. Análisis estadístico.....	95
SECCIÓN SEQUÍA	98
Justificación del estudio de <i>B. bituminosa</i> frente a sequía	99
4. CAPITULO I: Ensayo de sequía en maceta	100
4.1. Objetivos específicos	100
4.2. Procedimientos ensayo sequía en maceta	101
4.3. Resultados ensayo sequía en maceta.....	103
4.3.1. Suelo.....	103
4.3.2. Crecimiento de la parte aérea.....	104
4.3.3. Área foliar específica (AFE)	106
4.3.4. Azúcar y solutos	106

4.3.5. Compuestos nitrogenados	108
4.3.6. Relaciones hídricas	110
4.3.7. Nutrientes minerales.....	113
4.3.8. Furanocumarinas (FCs).....	115
5. CAPITULO II: Ensayo de sequía en parcela	118
5.1. Objetivos específicos	118
5.2. Procedimientos ensayo sequía en parcela	119
5.3. Resultados.....	124
5.3.1. Condiciones edáficas	124
5.3.2. Crecimiento de la parte aérea.....	124
5.3.3. Área Foliar Específica (AFE).....	127
5.3.4. Azúcares y almidón	128
5.3.5. Compuestos nitrogenados	129
5.3.6. Relaciones hídricas	131
5.3.7. Nutrientes minerales.....	133
5.3.8. Furanocumarinas (FCs).....	134
6. CAPITULO III: Ensayos de sequía en hidropónico	136
6.1. Objetivos específicos	136
6.2. Primer ensayo en hidropónico	137
6.3. Segundo ensayo en hidropónico	140
6.4. Resultados ensayos de sequía en hidropónico	141
6.4.1. Crecimiento	141
6.4.2. Azúcar y almidón	145
6.4.3. Compuestos nitrogenados	145
6.4.4. Relaciones hídricas	146

7.	DISCUSIÓN SEQUÍA	148
7.1.	Crecimiento y cambios morfológicos	148
7.1.1.	Crecimiento relativo de las raíces y la parte aérea.....	149
7.1.2.	Área foliar específica (AFE)	150
7.2.	Compuestos nitrogenados.....	151
7.2.1.	Nitrógeno y NH_4^+	151
7.2.2.	Aminoácidos.....	154
7.3.	Azúcares y almidón.....	157
7.4.	Nutrientes minerales	158
7.5.	Relaciones hídricas	160
7.6.	Furanocumarinas (FCs)	165
7.7.	Conclusiones.....	166
	SECCIÓN METALES PESADOS (MPs)	170
	Justificación del estudio de <i>B. bituminosa</i> frente a MPs.....	171
8.	CAPITULO IV: Ensayo en maceta con suelos contaminados por MPs	172
8.1.	Objetivos específicos	172
8.2.	Procedimientos del ensayo en maceta con MPs.....	173
8.3.	Resultados y discusión ensayo de maceta	177
8.3.1.	Germinación, supervivencia y crecimiento.....	177
8.3.2.	Efecto de las enmiendas del suelo sobre la disponibilidad de nutrientes minerales en suelo y su incorporación por las plantas ...	182
8.3.3.	Efecto de las enmiendas del suelo sobre la disponibilidad de As y MPs en suelo y su captura por las plantas.....	186
8.4.	Conclusiones ensayo maceta MPs.....	192
9.	CAPITULO V: Ensayos en parcela con suelos contaminados por MPs	194
9.1.	Objetivos específicos	194
9.2.	Procedimientos de los ensayos	195

9.2.1. En San Ginés de la Jara (SG).....	197
9.2.2. En Llano del Beal (LB).....	199
9.2.3. Determinación de la cobertura vegetal.....	200
9.3. Resultados y discusión de los ensayos en parcela.....	200
9.3.1. Ensayo en San Ginés de la Jara (SG).....	201
9.3.1.1. Crecimiento de las plantas.....	201
9.3.1.2. Composición mineral de los tejidos vegetales de <i>B. bituminosa</i> ..	204
9.3.1.3. Composición mineral de <i>A. halimus</i>	210
9.3.1.4. El efecto de la presencia de plantas y de los tratamientos sobre las propiedades del suelo	210
9.3.2. Ensayo en Llano del Beal (LB).....	213
9.3.2.1. Crecimiento de las plantas.....	213
9.3.2.2. Composición mineral de <i>A. halimus</i>	216
9.3.2.3. Composición mineral de <i>B. bituminosa</i>	220
9.4. Conclusiones de los ensayos en parcela.....	221
10. CAPITULO VI: Ensayos en hidropónico con MPs	224
10.1. Objetivos específicos de los ensayos en hidropónico con MPs	224
10.2. Ensayo de germinación: procedimiento y resultados	225
10.3. Ensayo en hidropónico con tratamiento con Zn	226
10.3.1. Procedimientos	226
10.3.1.1. Procedencia de las semillas y obtención de plántulas.....	226
10.3.1.2. Condiciones de cultivo	227
10.3.1.3. Determinación de parámetros vegetales relacionados con la exposición a altas concentraciones externas de Zn	228
10.3.2. Resultados	230
10.4. Ensayo en hidropónico con MPs y su efecto en la síntesis de FCs.....	234
10.4.1. Procedimientos	234
10.4.2. Resultados.....	235

10.5. Discusión ensayos.....	238
10.5.1. Germinación: el efecto del Zn.....	238
10.5.2. Crecimiento: el efecto del Zn.....	238
10.5.3. Cambios fisiológicos causados por exposición a Zn.....	239
10.5.4. Efectos de MPs sobre relaciones hídricas y la acumulación de FCs	242
10.6. Conclusiones ensayos en hidropónico con MPs.....	243
SECCIÓN RIZOBIOS	246
Justificación del estudio de las cepas nodulantes de <i>B. bituminosa</i>	247
11. CAPITULO VII: Cepas nodulantes de <i>B. bituminosa</i>	248
11.1. Objetivos específicos	248
11.2. Aislamiento a partir de nódulos de raíces de <i>B. bituminosa</i>	249
11.3. Caracterización inicial tras inoculación de plantas.....	253
11.3.1. Ensayo de infectividad y eficiencia en perlita.....	253
11.4. Identificación mediante secuenciación de genes rRNA 16S	256
11.5. Conclusiones	261
12. CONCLUSIONES GENERALES	266
13. BIBLIOGRAFÍA	272
14. ANEXOS	308

1.	INTRODUCCIÓN.....	2
1.1.	<i>Bituminaria bituminosa</i>	2
1.1.1.	Botánica.....	2
1.1.2.	Distribución de las variedades.....	5
1.1.3.	<i>B. bituminosa</i> mediante técnicas genéticas y moleculares.....	12
1.1.4.	Usos	13
1.1.4.1.	Ganadería	13
1.1.4.2.	Producción de compuestos secundarios	15
1.1.4.3.	Otros usos de la planta	19
1.2.	Nutrición mineral.....	20
1.2.2.	Micronutrientes.....	24
1.3.	Metabolismo nitrogenado.....	29
1.3.1.	Incorporación de nitrógeno a la planta.....	29
1.3.2.	Fijación de nitrógeno en raíces de leguminosas	32
1.3.3.	Prolina	36
1.4.	Interacciones entre factores ambientales y plantas	38
1.4.1.	Sequía	39
1.4.2.	Calor	48
1.4.3.	Alta intensidad lumínica.....	49
1.4.4.	Metales pesados (MPs)	49
1.4.5.	Combinación de estreses abióticos.....	55
1.5.	Fitotecnologías para la protección de tierras marginales	57
1.5.1.	Contra la erosión y desertificación.....	57
1.5.2.	Suelos contaminados por MPs	59
1.5.2.1.	La antigua zona minera de La Unión	61
1.5.2.2.	Remediación de suelos contaminados por MPs.....	63

INTRODUCCIÓN

1

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Bituminaria bituminosa*

1.1.1. Botánica

Bituminaria bituminosa (L.) C.H. Stirton es una especie perteneciente a la familia de las Leguminosas (Fabaceae), conocida con los nombres comunes de tедера, trébol hediondo o hierba pestosa (en inglés “Arabian pea”). Anteriormente de adquirir su nombre científico actual, fue nombrada con los seudónimos taxonómicos *Psoralea bituminosa* (L.) y *Aspalthium bituminosum* (L.) Kuntze. Todos sus nombres hacen referencia al carácter que la convierte en una de las leguminosas más fáciles de reconocer, además de por sus características flores violáceas, gracias al olor inconfundible de la planta a betún, y de ahí su nombre, que puede percibirse por ejemplo cuando se machacan sus folíolos entre los dedos. Es una planta de porte arbustivo muy frecuente en los márgenes de caminos y carreteras.



Fotografía 1.1.1.a.- Detalle del glomérulo floral de *Bituminaria bituminosa*, fácil de identificar por su aspecto y característico olor a betún.

Figura 1.1.1.- Clasificación taxonómica de *Bituminaria bituminosa* (L.) C.H. Stirton.

Reino	<i>Plantae</i> – Plantas
Subreino	<i>Tracheobionta</i> – Plantas vasculares
Superdivisión	<i>Spermatophyta</i> – Plantas con semillas
División	<i>Magnoliophyta</i> – Plantas con flores
Clase	<i>Magnoliopsida</i> – Dicotiledoneas
Subclase	<i>Rosidae</i>
Orden	<i>Fabales</i>
Familia	<i>Fabaceae</i> – Leguminosas
Sub-familia	Faboideae (Papilionoideae)
Tribu	Psoraleeae
Género	<i>Bituminaria</i> Heist. ex Fabr.
Especie	<i>Bituminaria bituminosa</i> (L.) C.H. Stirton

**Fotografías 1.1.1.b.-** Porte y detalle del glomérulo floral de plantas de *B. bituminosa*.

Se trata de una planta herbácea de 20-150 cm de altura, con varios tallos poco ramificados (pluricaule). Las hojas basales son mayores que las caulinares, de 4-18 cm de longitud, lanceoladas, con 3-7 nervios marcados. Los peciolos son de 15-90 mm de largo, con 5-6 costillas, con un surco o canal entre las 2 costillas adaxiales. Las inflorescencias son mucho más largas que las hojas axilantes, globosas u ovoideas, con 15-25 flores. Cada planta puede llegar a tener 2500 inflorescencias, por lo que cada

planta podría producir hasta 70000 flores (Correal y col., 2008). El estandarte, alas y quilla de las flores son de color violeta a blanco-azulado (Flora Ibérica).



Fotografías 1.1.1.c.- Típica flor leguminosa de *B. bituminosa* (izquierda), con colores que incluyen desde el blanco puro al violeta completo (derecha). Son flores prácticamente cerradas, que se fecundan mediante autopolinización en la mayoría de los casos (imagenes cedidas por Enrique Correal).

Presenta una elevada producción de semillas, alcanzando 190 g de semillas por planta (Correal y col., 2008). Herranz y col. (1998), demostraron la estimulación de su germinación por altas temperaturas, indicando su papel en la revegetación de zonas afectadas por incendios.



Fotografía 1.1.1.d.- Semillas de distintas accesiones de *B. bituminosa*. Las más grandes proceden de poblaciones canarias, y las pequeñas de peninsulares (imagen cedida por Enrique Correal).

1.1.2. Distribución de las variedades

La pérdida de hojas tras la floración y maduración de semillas durante la estación seca y la rebrotación otoñal supone para *B. bituminosa* un mecanismo de evitación de la sequía, perdiendo durante estos periodos gran porcentaje de su parte aérea. Así, las variedades más tolerantes a este estrés retienen por más tiempo sus hojas, llegando a sobrevivir incluso todo el verano. El letargo de esta especie no se puede definir como completo (Volaire y Norton, 2006), porque es capaz de crecer continuamente, o favorecer su crecimiento tras algún evento lluvioso estival. Se comprueba que, si se quita las flores y/o frutos a las plantas de *B. bituminosa*, estas son capaces de mantener sus hojas todo el verano, por lo que no tienen que pasar por un letargo estival.

	VERANO			OTOÑO			INVIERNO			PRIMAVERA		
	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN
Botón floral												
Flor												
Fruto verde												
Fruto maduro												
Hojas												

Figura 1.1.2.a.- Periodo fenológico general de las poblaciones murcianas de *B. bituminosa*.

B. bituminosa es una planta indiferente edáfica, que puede colonizar un amplio rango de bioclimas, que varía desde el termomediterráneo-semiárido o el infracanario-semiárido, al supramediterráneo-subhúmedo o mesocanario-subhúmedo (Rivas-Martínez y col., 1999; Muñoz y col., 2000). Se encuentra distribuida por toda la Cuenca Mediterránea, y archipiélago canario, donde se han identificado además dos variedades perennes (*var. albomarginata* y *var. crassiuscula*) que no están presentes en la península Ibérica. La variedad *bituminosa* o “común”, es la que se encuentra presente en todas partes. Además de que existen diferencias morfológicas entre el material canario y peninsular, Pazos-Navarro y col., (2011) encontraron evidencias de diferencias genéticas entre variedades peninsulares y canarias. Las variedades canarias tienen un mayor carácter de perennidad que las peninsulares, que tienden a ser bianuales. La re-brotación otoñal es el mecanismo de tolerancia genérico a excepción la variedad *crassiuscula*, que se comporta como hemicriptófito, cuyas yemas de

reemplazo subsisten a ras del suelo en forma de rosetón. En la Europa meridional, se encuentra por casi toda la península ibérica, faltando únicamente en el norte y noroeste. En Francia, ocupa toda la zona sur y cuadrante sureste. En Italia, se encuentra sobre todo en las áreas meridionales. La distribución continua por la ribera del Mar Negro, antigua URSS, proximidades del Mar Muerto, Turquía, Siria, Líbano, Israel, Jordania, e incluso en la península del Sinaí. En África del Norte, en Marruecos, Argelia, Túnez y Libia. Según la página Web de la USDA, está presente en los estados americanos de California y Florida (<http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=BIBI4> 15-06-2011), y también fue introducida en Australia por su adaptabilidad para crecer en suelos arenosos con clima mediterráneo (Real y Verbyla, 2010; Yates y col., 2009).



Figura 1.1.2.b.- Distribución de *Bituminaria bituminosa* señalada con color verde sobre el mapa de la cuenca del Mar Mediterráneo.

En cuanto a su ecología, se mueve en amplios rangos. En general, en la península Ibérica, prefiere zonas térmicas y soleadas, con precipitaciones que van desde los 300 a los 600 mm. No obstante, puede aparecer en zonas de características climáticas dispares. Así por ejemplo, se han hallado citas de su presencia en las zonas más áridas del sureste peninsular, con temperaturas elevadas y precipitaciones que rondan los 250 mm anuales. En otro extremo, existen citas que indican su presencia en Santander,

con más de 1000 mm anuales. Por otro lado, en la zona de Palestina, una de las variedades descritas (var. *hulensis*), está asociada a zonas húmedas (Zohary, 1972).

Respecto a la altitud, ocupa un amplio rango, habiéndose observado una buena compensación altitudinal con la latitud. Así, en las zonas más meridionales, como Canarias, Atlas de Marruecos, etc., asciende hasta los 2200 m, mientras que en las más septentrionales apenas rebasa los 1100 m. En la Península, el máximo altitudinal meridional se encuentra en S^a Nevada, donde llega a los 1500 m (Morales y Esteve, 1975). Por otro lado, el máximo altitudinal septentrional se ha encontrado en Lérida, donde ronda los 1250 m (Perdigó, 1979).

Dentro del territorio español, se reconocen tres taxones intraespecíficos pertenecientes a la especie *Bituminaria bituminosa*:

- *B. bituminosa* var. *albomarginata* (Famara, Lanzarote, Islas Canarias).
- *B. bituminosa* var. *crassiuscula* (Teide, Islas Canarias).
- *B. bituminosa* var. *bituminosa* (Islas Canarias y Cuenca Mediterránea).

Las poblaciones de tедера de las islas Canarias se encuentran repartidas por los pisos bioclimáticos árido-semiárido (precipitaciones ≤ 350 mm) (*B. bituminosa* var. *albomarginata*), Termocanario seco-subhúmedo (precipitaciones 350-800 mm) (*B. bituminosa* var. *bituminosa*), y Mesocanario seco (precipitaciones 350-600mm con nieve ocasional) (*B. bituminosa* var. *crassiuscula*). De manera general, el material vegetal peninsular (var. *bituminosa*) tiene poco interés forrajero, pero se adapta a un gran rango de suelos, altitudes y pluviometrías, lo que explica su amplia distribución por la península Ibérica y países de la Cuenca Mediterránea. Por el contrario, la variedad *bituminosa* del archipiélago canario es cosechada como forraje para el ganado y a diferencia del material peninsular, el material canario tiene mayor tendencia a comportarse como perenne y produce mayor cantidad de biomasa forrajera.

Atendiendo a características morfológicas, además de a su distribución, aparecen claras diferencias entre grupos peninsulares y canarios:

- **Ramificación:** en grupos peninsulares, desde el inicio del desarrollo aparece una roseta basal, a partir de la que surgen numerosos escapos. Por el contrario, las poblaciones canarias se desarrollan a partir de un tallo principal del que surgen otros secundarios, excepto en la var. *crassiuscula*, cuya ramificación se aproxima al tipo peninsular.

- **Longitud de los entrenudos:** corta en poblaciones canarias, y larga en las de origen peninsular.

- **Tallos zigzagueantes:** frecuentes en poblaciones peninsulares y poco o nada en tallos canarios.

- **Flores:** de color azul pálido las canarias, y azul violáceo las peninsulares.

- **Semillas:** bastante más grandes en las canarias que en las peninsulares.

- **Hojas:** el ápice de la hoja basal es generalmente apuntado en poblaciones canarias y escotado en las peninsulares (ver Fotografías 1.1.2.a.), de modo que la relación entre longitud del peciolo y del foliolo de la hoja basal es mayor en las peninsulares.



Fotografías 1.1.2.a.- Foliolo apuntado y escotado de poblaciones canarias y peninsulares respectivamente.

Las características generales de las tres variedades que aparecen en el archipiélago canario son los siguientes:

- Var. *bituminosa* canaria, cv. Tenerife: porte arbustivo bajo con elevado grado de lignificación en tallos. Hojas basales pequeñas y superiores más pequeñas y cortamente pecioladas. Inflorescencia cortamente pedunculada y con bajo número de flores. Flores de color azul pálido, comparables a las de poblaciones peninsulares, pero más pequeñas que las de la var. *crassiuscula*. Semilla grande, pero con pico corto y glabrescente.

- Var. *albomarginata*, población *Famara*: próxima a Tenerife, pero de menor porte y forma almohadillada. Hojas algo mayores, con borde "albo" muy peloso. Semillas mayores, con pico más largo, estilizado y peloso.

- Var. *crassiuscula*, población *Boca de Tauce* - Cañadas del Teide: porte superior a las anteriores. Ramificación próxima a roseta, con numerosos escapos poco lignificados. Hojas con peciolo y folíolos mayores, algo crasos y color más claro. Las hojas superiores son más estrechas, lo que junto a la ramificación le aproxima a los grupos peninsulares. Inflorescencia largamente pedunculada y con gran número de flores de color casi blanco y de mayor tamaño que anteriores. Semilla grande, con pico largo, similar a *albomarginata*, pero glabra.

Aunque todas las plantas que crecen de manera natural en la península ibérica pertenecen únicamente a la misma variedad, aparecen diferencias entre poblaciones:

- Var. *bituminosa*, población *Llano del Beal* (Murcia): población peninsular con gran porte, mayor número de escapos y longitud de entrenudos. Tallos de color negro y hojas basales largamente pecioladas, grandes y redondeadas, de color oscuro. Hojas superiores estrechas, de mayores dimensiones que el resto de las peninsulares, y lo mismo ocurre con su inflorescencia, número de flores y tamaño, que son los mayores del grupo peninsular. Flores de color azul violáceo intenso.

- Var. *bituminosa*, población *Mijas* (Málaga): grupo similar a *Llano del Beal*, pero con dimensiones inferiores en porte, longitud de entrenudos, hojas y flores, que son de color azul violáceo, no intenso. Sus tallos son los más zigzagueantes. Semilla y pico más grande que Llano Beal.

- Var. *bituminosa*, población *La Perdiz* (Murcia): población próxima a *Mijas*, pero de porte más elevado, menor número de escapos, y mayor longitud de entrenudos. Tallos negros, pero menos zigzagueantes. Hojas oscuras y más pequeñas, sobre todo las basales. Hojas superiores largamente pecioladas. Flores más pequeñas, próximas al grupo general, con color azul violáceo intenso. Semilla similar a la de Málaga, pero con pico más corto.

En general, la tolerancia a frío de las variedades canarias es baja, sin embargo, la var. *crassiuscula* y algunas formas mediterráneas (var. *bituminosa*), incluso de Murcia, han mostrado buena resistencia a frío y sequía (Muñoz y Correal, 1998, 1999; Correal y col., 2003; Walker y col., 2009). Walker y col. (2009), demostraron que la tolerancia a frío en esta especie está relacionada con el ajuste osmótico (potenciales osmótico e hídrico) que la planta es capaz de realizar en el invierno y con su acumulación de prolina, azúcares solubles y aminoácidos.

Esta especie es relativamente resistente a infecciones, y no es consumida habitualmente por insectos y otros animales herbívoros debido probablemente a su alto contenido en furanocumarinas (FCs) (Larbat y col., 2007). Algunas especies de insectos se alimentan de las semillas, como la hormiga *Messor barbarus* L. (Fotografía



1.1.2.b.), aunque estas seleccionan entre todas las semillas sólo aquellas con la cubierta menos gruesa y dura (Oliveras y col., 2008). Se ha demostrado que es susceptible a la infección por un virus que provoca el marchitamiento de la base del tallo (Cardin y Moury, 2009), y se ha publicado la primeras evidencia de su susceptibilidad a fitoplasma (Aryamanesh y col., 2011), causando un desarrollo anómalo, con la formación de hojas pequeñas y cortos entrenudos (ver Fotografía 1.1.2.b.).



Fotografías 1.1.2.b.- Hormiga (*Messor barbarus*) portando una semilla de *B. bituminosa* (izquierda). Ataque por fitoplasma, causando una exagerada producción de hojas diminutas de típico color amarillento (derecha).

B. bituminosa también crece de manera natural en suelos contaminados con elevadas concentraciones de metales pesados (MPs), como en suelos de varias localidades dentro de España: Cataluña (Cu) (Poschenrieder y col., 2001); en la zona afectada por el vertido en 1998 en Aznalcóllar, Sevilla, (Cd, Cu, Pb, Zn) (del Río y col., 2002); en Ciudad Real (Hg) (Millán y col., 2006); y en la Sierra Minera de La Unión-Cartagena (Zn, Pb) (Walker y col., 2007). Ésta no desarrolla facultad hiperacumuladora, pero muestra una adaptación a vivir en suelo con MPs, debido a su capacidad para limitar su transporte hasta sus partes aéreas (Walker y col., 2007), además de condiciones normalmente asociadas con tales suelos como son las altas concentraciones de MPs y/o metaloides, mala estructura del suelo y falta de nutrientes. Su presencia en este tipo de suelos puede ser favorable para la retención de los contaminantes en sus raíces.

1.1.3. *B. bituminosa* mediante técnicas genéticas y moleculares

La especie *Bituminaria bituminosa* es diploide ($2n=2x=20$; Stirton 1981). Las mediciones de ADN nuclear por citometría de flujo en hojas de 6 poblaciones de *B. bituminosa* (3 canarias, 2 peninsulares, 1 italiana) (Walker y col., 2005; 2006) dieron un rango entre 0,998 y 1,094 pg ADN por núcleo diploide, habiéndose detectado diferencias significativas entre poblaciones. El genoma de las poblaciones canarias resultó ser de menor tamaño que las accesiones mediterráneas del tipo común (var. *bituminosa*). Esto hace pensar que las variedades *albomarginata* y *crassiuscula* podrían ser el resultado de colonizaciones y adaptaciones de la var. *bituminosa*, tras su aislamiento en Lanzarote (Famara) o en las cumbres del Teide (Boca de Tauce). Se han llevado a cabo recientes estudios a cerca de la variabilidad molecular poblacional del agregado *B. bituminosa*. Mediante la técnica AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), Juan y col. (2005), pudieron ordenar poblaciones Ibéricas y mediterráneas de la variedad típica en un gran grupo, mientras que en el otro grupo se agrupan las poblaciones canarias, resultados concordantes con los análisis morfológicos descritos anteriormente.

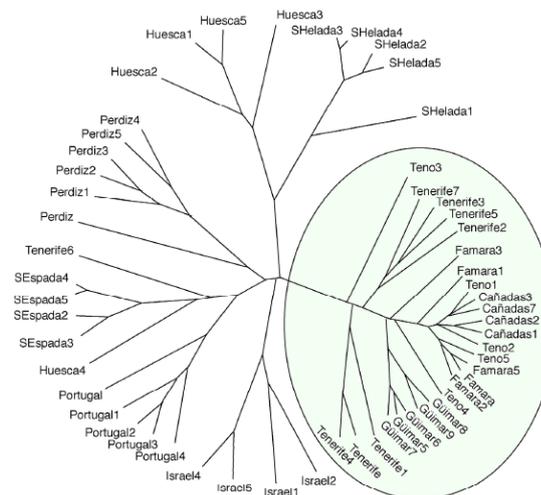


Figura 1.1.3.a.- Dendrograma de plantas de *B. bituminosa* en el que quedan agrupadas todas las poblaciones canarias (en verde), y separadas del resto de poblaciones de diferentes lugares mediterráneos (Juan y col., 2005). El grupo de la población *La Perdiz* aparece a partir de una única ramificación.

También han sido analizados algunos marcadores moleculares por Pazos-Navarro y col., (2011), estudios que incluían plantas madre utilizadas en ensayos recogidos en esta tesis, concluyendo que individuos de cada población tienden a agruparse entre sí durante su distribución en un análisis de componentes principales, de modo que dentro de cada población existen unas características genéticas propias, y por lo tanto fenotípicas.

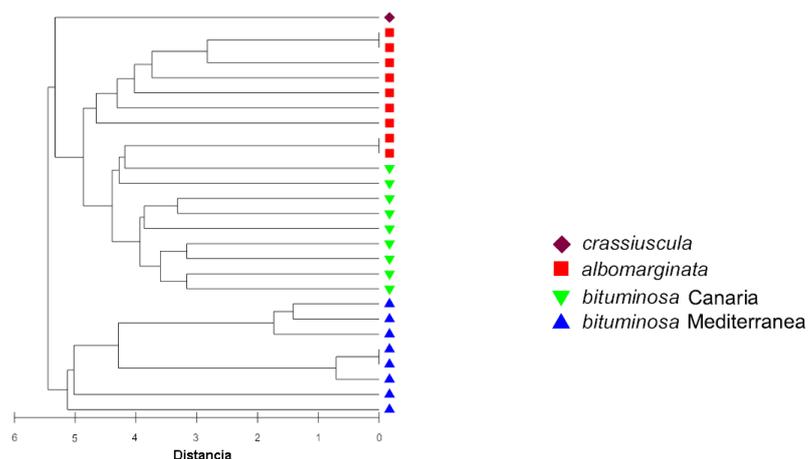


Figura 1.1.3.b.- Distancia genética entre individuos de cuatro variedades de *B. bituminosa* (modificado de Pazos-Navarro y col., 2011).

Cuando poblaciones de las tres variedades de *B. bituminosa* se han cultivado en proximidad, como ha sido el caso del IMIDA-Murcia, se ha observado la producción de híbridos naturales en los que varios caracteres interesantes pueden estar presentes.

1.1.4. Usos

1.1.4.1. Ganadería

Aunque se haya utilizado como forraje de manera tradicional principalmente en las Islas Canarias, se ha detectado un creciente interés internacional por el uso forrajero de *B. bituminosa*, principalmente en países de la cuenca mediterránea como Grecia, Italia, Israel (Gutman y col., 2000), Portugal, y Turquía (Gulumser y col., 2010), pero también en otros países de clima mediterráneo como Australia, donde su introducción y estudio ya se han iniciado con resultados prometedores (Yates y col., 2009; Real y Verbyla, 2010; Teakle y Real, 2010).



Fotografías 1.1.4.1.a.- Ensayo de palatabilidad y posibles efectos de fotosensibilidad de las FCs en ovejas llevados a cabo por *Future Farm Industries CRC* en Perth (Australia) (Izquierda). Estudio de capacidad para la rebrotación de *B. bituminosa* llevado a cabo en Murcia por María Sánchez (IMIDA) (derecha; imagen cedida por María Sanchez).

Puede llegar a producir 20 toneladas de materia verde por hectárea en el primer año de cultivo, y 34-40 toneladas de materia verde a partir del segundo año (Méndez y col., 2000). Según Pang y col. (2009), *B. bituminosa* es capaz de formar mayor biomasa que la alfalfa en suelos pobres en P. Su valor nutritivo para el ganado ha sido analizado (Ventura y col., 2004), estando su rango de contenido energético neto entre 4,6-5,3 MJ Kg⁻¹ de Materia Seca (0,71-0,84 UFL Kg⁻¹MS). Además no contiene taninos. La materia orgánica y degradabilidad de *B. bituminosa* (57,5 y 72,2% respectivamente) fueron los valores más elevados alcanzados en el estudio realizado por Ventura y col. (2004) al compararla con otras especies de pastos. Su materia necesita ser henificada, ya que puede ser rechazada cuando se encuentra en estado fresco. Gracias a la capacidad de *B. bituminaria* para rebrotar tras el pastoreo y para permanecer verde durante periodos secos, esta especie se utiliza actualmente como planta modelo en programas de producción de alimento para ganado en Australia (Real y Verbyla, 2010). Además, en ensayos iniciales, Teakle y Real (2010), observaron una relativa tolerancia de *B. bituminosa* (población Canaria, var. *albomarginata*) frente a la salinidad y/o encharcamiento (hipoxia), lo que destaca a esta especie como una herramienta útil en los típicos suelos arenosos del sur de Australia para la producción de forraje.

1.1.4.2. Producción de compuestos secundarios

Los frutos y hojas de *B. bituminosa* contienen elevadas cantidades de furanocumarinas (FCs). El término se aplica colectivamente a un gran número de compuestos que poseen el núcleo benzo-2-pirona (cumarina), con un anillo furánico unido en las posiciones 6 y 7 para las lineales, y 7 y 8 para las angulares (Santana y col., 2004). La mayoría de las FCs son lineales (como el psoraleno (7H-Furan[3,2-g]benzopiran-7-ona) o derivados angulares (como la angelicina (2-oxo-(2H)-furan(2,3-h)-1-benzopirano) que proceden de la ruta del siquimato (ver Figura 1.1.4.2.a.)

Tabla 1.1.4.2.- Concentraciones ($\mu\text{g g}^{-1}$) de FCs determinadas en *B. bituminosa* por distintos autores.

Autores	Órgano	Psoraleno	Angelicina	FCs totales
Martínez y col. (2010)	Hoja	2204-3920	2530-10571	4856-14494
Méndez y col. (2001)	Hoja	Hasta 2187	Hasta 9128	Hasta 6200
Martínez-Fernández y col. (2011)	Parte aérea	1330-3123	237-1960	Hasta 3785
	Raíz	657-2154	171-2522	Hasta 3519
Innocenti y col. (1984)	Semilla	5	9	nd
Zobel y col. (1991)	Frutos	1700	nd	2480
Tava y col. (2007)	Aceite hoja	1-2 %	1-4 %	2.5 %
	Aceite flor	1-2 %	3-7 %	4-9 %

La FCs lineales están principalmente distribuidas en cuatro familias de angiospermas: Apiaceae, Moraceae, Rutaceae y Fabaceae (restringido a los géneros Psoralea y Coronilla). Las FCs angulares no están tan ampliamente distribuidas, apareciendo en Apiaceae (Milesi y col., 2001) y Leguminosae (Bourgaud y col., 2006). Su función en el metabolismo vegetal se enmarca dentro de los diferentes mecanismos de defensa que poseen las plantas para evitar a los herbívoros polípagos y a los hongos patógenos (Appel, 1993; Cooper y Pérez-Mellado, 2001; Calcagno y col., 2002; Diawara y Kulkosky, 2003). En este sentido, las FCs son conocidas como potentes fitoalexinas que aumentan su concentración durante la interacción con patógenos (Beier y Oertli, 1983; Bohlmann y col., 1995), y como compuestos alelopáticos (Baskin y col., 1967).

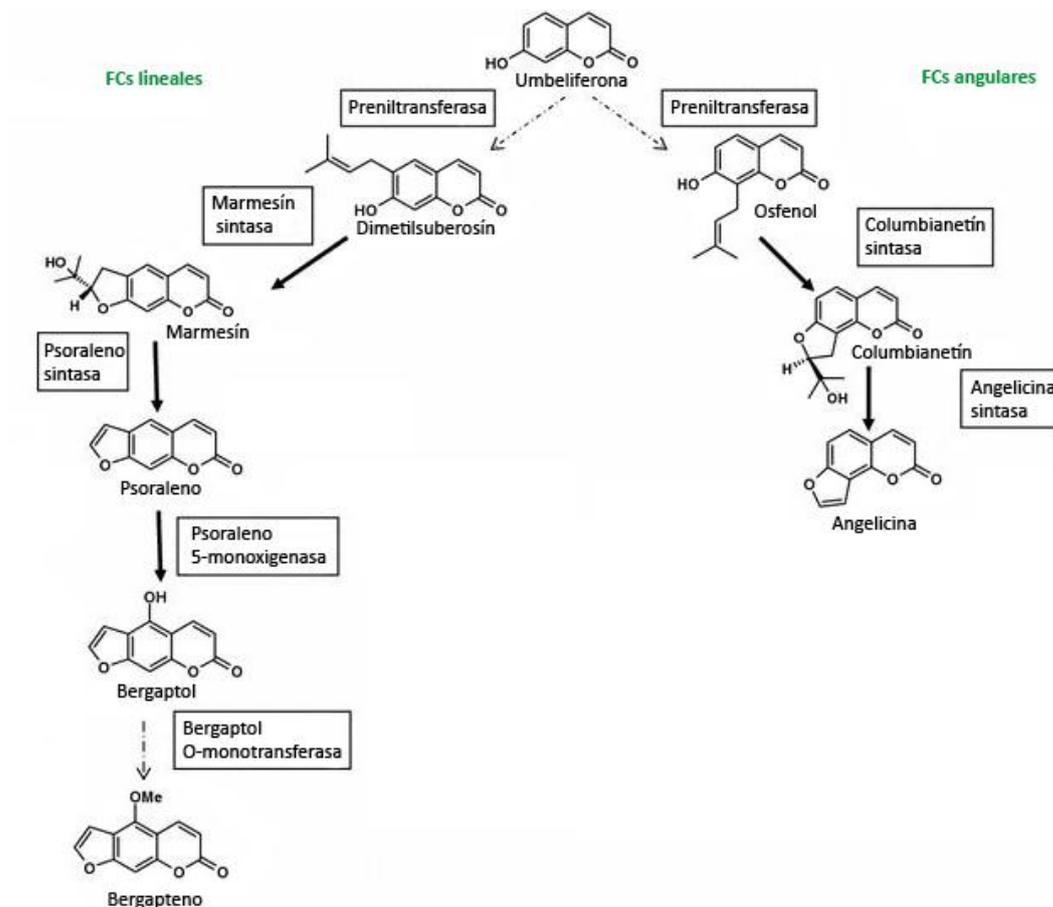


Figura 1.1.4.2.a.- Rutas y enzimas que participan en la síntesis de FCs a partir de umbeliferona hasta psoraleno y bergapteno, y angelicina (esquema modificado de Bourgaud y col., 2006).

Tava y col., (2007) demostraron la presencia de psoraleno y angelicina en los aceites esenciales de las hojas y flores de *B. bituminosa*. Según del Río y col. (2010), las hojas de *B. bituminosa* pueden llegar a acumular cerca de $4000 \mu\text{g g}^{-1}\text{PS}$ de psoraleno, y $10000 \mu\text{g g}^{-1}\text{PS}$ de angelicina. Como se puede ver en la Tabla 1.1.4.2., existe mucha variación en los niveles de las FCs en *B. bituminosa*, debido a diferencias en el método de cultivo, el tejido analizado y el método de extracción/análisis. Las FCs se acumulan tanto en la superficie como en el interior de la hoja, en semillas y órganos reproductivos (McKey, 1979).

Aunque hay especies que sintetizan sólo FCs lineales, parece ser que no hay especies que sintetizan únicamente las angulares (Larbat y col., 2007). Esto induce a pensar que, para contrarrestar resistencias espontáneas por parte de los insectos mediante métodos para la detoxificación del psoraleno, las plantas que lo sintetizan evolucionaron produciendo además de estas FCs lineales, otros derivados con estructuras ligeramente diferentes, y de ahí el origen de las FCs angulares como la angelicina, que inhibe las monooxigenasas que funcionan en la detoxificación del psoraleno (Larbat y col., 2007).

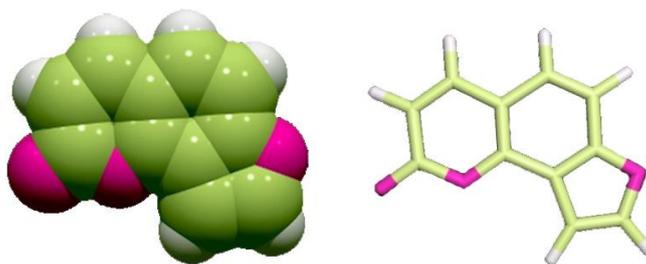


Figura 1.1.4.2.b.- Modelos tridimensionales de la estructura molecular de la angelicina (www.sciencephoto.com, 1-08-2011).

En distintas especies se ha demostrado el efecto de varios factores sobre la acumulación de FCs, como la temperatura (extremos de temperatura aumentan la síntesis de FCs), la exposición a la luz UV, la sequía, tratamiento con metales pesados y el suministro de nutrientes (Bourgaud y col., 2001). De particular interés es el hecho que altas temperaturas (por encima de 30°C) y estrés hídrico (las condiciones que predominan en el verano en zonas Mediterráneas) estimulen la acumulación de psoraleno en tejidos vegetales (Bourgaud y col., 2001).

Extractos o partes de planta que contenían psoraleno ya fueron usados en Egipto y la India hace 4000 años para tratar enfermedades de la piel (Santana y col., 2004). La aplicación farmacéutica actual del psoraleno es muy amplia, habiéndose utilizado tradicionalmente en las llamadas terapias PUVA (Psoraleno+UVA) para combatir melanomas y otras enfermedades hiperproliferativas de la piel como psoriasis (y de ahí su nombre), vitíligo y dermatitis. Además presenta uso en cosmética y bronceadores (Kligman y Forlot, 1989), e incluso se ha comprobado recientemente el poder

antidepresivo del psoraleno (Xu y col., 2008), y como producto anticaída del cabello (Rivera y Obón, 1995).

Las FCs deben su actividad biológica a que reaccionan foto-químicamente con los ácidos nucleicos (particularmente ADN) en presencia de la luz. Se intercalan directamente entre pares de bases del ADN, y en presencia de luz UV (340-400 nm), se activan. Entonces, sus electrones alcanzan un estado de alta energía, pudiendo unirse a las bases pirimidínicas (citosina y timina), con lo cual bloquean la replicación, transcripción y reparación, por lo que la interacción del psoraleno con el ADN inhibe la multiplicación de las células y eventualmente llevan a la célula a la muerte (Santana y col., 2004). Otra área de investigación en desarrollo es la combinación de psoraleno con diferentes tipos de oligonucleótidos para incrementar su habilidad para penetrar en las células, sirviendo los oligos para dirigir al psoraleno a sitios de interés (Wang y col., 1995; Mariano y col., 2002). También puede usarse en las llamada fotoaféresis extracorpórea, para la limpieza de productos sanguíneos antes de una transfusión (Maurich y col., 2004; Knobler y col., 2009).

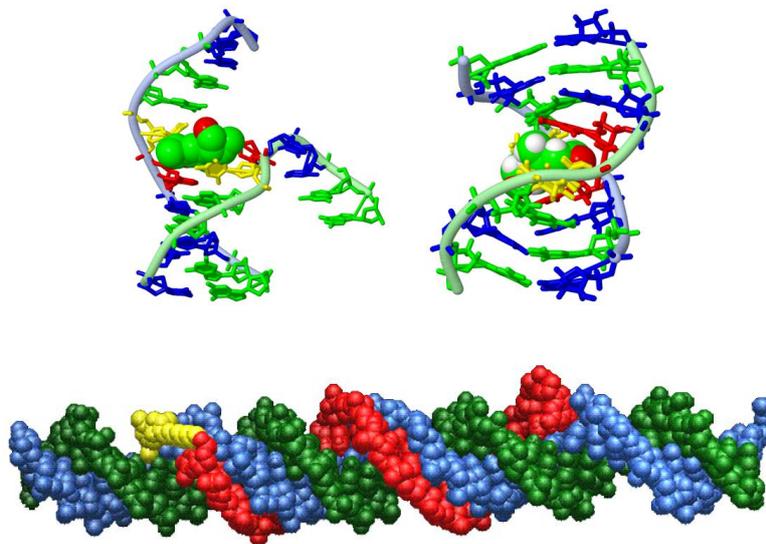


Figura 1.1.4.2.c.- Representaciones tridimensionales de la interacción del psoraleno con las bases adenina y timina del ADN (arriba; <http://proteopedia.org/wiki/index.php/204d>, 1/08/2011). Representación de la utilización de psoraleno (amarillo) conjugado a un oligonucleotido (rojo) para formar cadenas triples de ADN y localizar su acción sobre determinadas zonas genéticas (abajo; <http://ncmi.bcm.tmc.edu/homes/wensellab/#coolpix>, 1/08/2011).

Hay que tener en cuenta posibles efectos secundarios de la aplicación del psoraleno, como quemaduras por el sol, náuseas, vómito, hiperpigmentación y el riesgo del cáncer de la piel.

La angelicina muestra actividad tranquilizante, sedativa y anticonvulsiva, y se ha patentado su uso en el tratamiento contra la talasemia, como por ejemplo en los EEUU según el "Use of angelicin and of its structural analogues for the treatment of thalassemia" (Patente US2006111433(A1)).

Actualmente, la FC aportada a la industria farmacéutica procede básicamente del aceite esencial de *Citrus bergamia* (Risso y Poit), que contiene bergapteno, un derivado del psoraleno ampliamente usado en medicina (Lane-Brown, 1981; Massot y col., 2000). Sin embargo, su producción es baja y su síntesis química presenta un elevado coste de producción. Por lo tanto, es necesario investigar para encontrar nuevos medios de obtención.

Además de FCs, *B. bituminosa* es capaz de sintetizar otros compuestos de potencial interés, como pterocarpanos (Pistelli y col., 2003; Bertoli y col., 2004; Tava y col., 2007), tales como bergapteno, xanthotoxina, beta-sitosterol, erybraedin C, 8-prenyldaidzeína, bitucarpin B, y plicatín B. El bitucarpin A es un tipo de pterocarpano extraído de *B. bituminosa* con eficacia comprobada para la estimulación de la apoptosis de células cancerosas durante el cáncer de colon (Maurich y col., 2006).

1.1.4.3. Otros usos de la planta

Según la medicina tradicional y estudios más recientes, extractos de *B. bituminosa* se usan en restauración de cuero cabelludo y lucha contra la alopecia (Behrens-Williams y col., 2001). Se emplea generalmente como vulnerario, es decir, sana llagas y heridas. También se ha utilizado como astringente en heridas y llagas. Se ha usado para amortiguar dolores en picaduras de serpientes. De manera tradicional, también se puede tomar en forma de infusión a partir de hojas frescas de *B. bituminosa*.

1.2. Nutrición mineral

Para que un elemento se considere esencial, se debe cumplir que en deficiencia/ausencia la planta sea incapaz de completar su ciclo biológico, que no sea reemplazable por otro elemento, y que esté directamente implicado en la nutrición de la planta (Mengel y Kirby, 2001). Estos elementos aparecen listados en la Tabla 1.2.a. El sodio, silicio, níquel y cobalto han sido establecidos como elementos esenciales pero no para todas las plantas superiores (Mengel y Kirby, 2001).

Tabla 1.2.a.- Elementos químicos esenciales para las plantas superiores, pudiendo serlo también los elementos marcados en azul para ciertas especies vegetales.

Macronutrientes		Micronutrientes	
C	Carbono	Fe	Hierro
H	Hidrógeno	Mn	Manganeso
O	Oxígeno	Cu	Cobre
N	Nitrógeno	Zn	Zinc
P	Fósforo	Mo	Molibdeno
S	Azufre	B	Boro
K	Potasio	Cl	Cloro
Ca	Calcio	Ni	Níquel
Mg	Magnesio	Co	Cobalto
Na	Sodio		
Si	Silicio		

Se subdividen en dos categorías, los macronutrientes y los micronutrientes, dependiendo de la concentración con la que son encontrados en las plantas superiores. La concentración tisular del macronutriente N, por ejemplo, está unas cien veces por encima de la concentración del micronutriente Zn (Mengel y Kirby, 2001). Pueden ser además móviles e inmóviles, según puedan distribuirse desde órganos con mayor concentración a otros con menor durante deficiencia. Así, son elementos móviles el N, P, K, Mg, Na, Zn, Mo y Cl, y son inmóviles el S, Ca, Fe, Mn, Cu y B. Las plantas siempre procuran mantener las condiciones químicas en el citoplasma estables ("homeostasis"), para optimizar los procesos bioquímicos que tienen lugar en ese compartimiento intracelular: actividades enzimáticas, síntesis de proteínas etc. Por ejemplo, la concentración del K^+ se mantiene a 100-150 mM en el citoplasma (Walker y col., 1996). En caso de deficiencia, la planta es capaz de movilizar reservas de

nutrientes de sus “almacenes” internos y/o activar mecanismos de absorción de alta afinidad. En casos de exceso, las plantas disponen de varios mecanismos para conseguir este fin, especialmente exclusión a través de transportadores en las membranas celulares y acumulación en vacuola, retículo endoplasmático, y expulsión (Clemens, 2001; Walker y col., 1996).

1.2.1. Macronutrientes

Para un desarrollo óptimo, las plantas no sólo deben tener una cantidad apropiada de cualquier elemento activo en la célula, sino también un equilibrio respecto al resto de elementos químicos (Kabata-Pendias, 2001). El N, por sus implicaciones relevantes en el metabolismo nitrogenado durante sequía y otros estreses, ha sido ubicado en una sección propia (ver sección 1.3.).

• **Fosforo (P):** Más del 90% del P está normalmente fijado en el suelo y no puede ser usado por las plantas debido a su baja disponibilidad. Es el P inorgánico (P_i) que pasa a la fracción soluble del suelo, el que puede ser incorporado por las plantas como $H_2PO_4^-$ o HPO_4^{2-} . Su absorción se realiza por transporte activo, ya que la concentración de P en el citosol de las células (5-8 mM) es unas mil veces superior a la disponible en el suelo (Mengel y Kirkby, 2001). Es el principal regulador de la homeostasis energética celular, ya que forma parte del adenosin-tri-fosfato (ATP), y actúa como modulador de la actividad proteica al ser transferido a residuos Ser y Thr por quinasas y fosfatasas. Las plantas con falta de P presentan reducción del crecimiento, inhibición de la expansión foliar y área foliar específica (AFE). Durante deficiencia, la raíz actúa como principal sumidero de P desde las hojas maduras, lo que induce una mayor exploración del suelo.

• **Potasio (K):** Es absorbido desde la fracción intercambiable y disponible del suelo en su única forma química en condiciones fisiológicas, K^+ , pasivamente a través de canales, o activamente junto a H^+ si la concentración de K en el exterior es inferior a 0,1-0,2 mM. (Walker y col., 1996). El transporte de K^+ en el xilema es exclusivamente desde raíz a parte aérea, mientras que en el floema se transporta asociado hacia órganos sumideros (Mengel y Kirkby, 2001). En las células vegetales, el K^+ no es metabolizado y existe únicamente como ion univalente (Magnuson y col., 1973). La concentración crítica de K^+ se encuentra en torno al 1% (Leigh y Wyn-Jones, 1984), habiéndose situado este límite en 1,9% para la leguminosa *Medicago sativa* L. (Smith y col., 1982). Su deficiencia causa reducción del crecimiento por un aumento de la respiración y reducción de la fotosíntesis, por lo que se produce un descenso de la síntesis de azúcares, clorosis en el margen de la hoja o en punteado, y necrosis. Normalmente los síntomas aparecen primero en las hojas maduras, debido a que se trata de un elemento móvil. Las plantas que sufren deficiencia de K^+ muestran un descenso del turgor celular, y bajo estrés hídrico, se vuelven flácidas (Mengel y Kirkby, 2001). Por lo tanto, la resistencia a sequía es muy sensible en condiciones con falta de K^+ disponible en el suelo (Pissarek, 1973).

El K^+ es el catión celular más abundante en el citoplasma, con concentraciones reguladas de 100-150 mM (Leigh y Wyn-Jones, 1984). Las vacuolas pueden acumular más de 400 mM K^+ , y desde allí se libera al citoplasma para neutralizar los aniones solubles y macromoleculares, donde no existen muchos cationes orgánicos. De esta manera, el K^+ contribuye con el potencial osmótico, siendo el principal osmolito celular. El movimiento y regulación de elevadas concentraciones de K^+ entre vacuola y citoplasma participa en la apertura y cierre estomático (MacRobbie, 1981), movimientos de hojas, además de requerirse altas concentraciones de K^+ para la correcta conformación activa de muchas enzimas que participan en el metabolismo nitrogenado, de carbohidratos y para la síntesis proteica (Gibson y col., 1984). Una de las más importantes es la piruvato-quinasa, la enzima principal de la glucólisis y respiración.

• **Azufre (S):** La mayor parte del azufre es obtenido en forma de sulfato (SO_4^{2-}) por la raíz mediante transporte activo utilizando el gradiente protónico creado por las H^+ -ATPasa de membrana (Mengel y Kirkby, 2001). Su asimilación se lleva a cabo mediante la reducción del sulfato y síntesis de cisteína como producto final. El azufre es un elemento esencial por su presencia en aminoácidos, como la cisteína, de vital importancia en la formación de puentes disulfuro, en las proteínas Fe-S transportadoras de electrones, o como parte de muchas proteínas y coenzimas, como el coenzima A. También forma parte del glutatión, el cual participa en la detoxificación de ROS, MPs y As, por lo que existe una fuerte relación entre estrés por MPs y captura de S (Clemens, 2006). Las deficiencias de azufre en países industriales son muy raras, ya que el dióxido de azufre SO_2 de la atmósfera liberado al quemar carbón, madera, gasolina y otros combustibles fósiles, es absorbido por las hojas a través de los estomas.

• **Calcio (Ca):** De manera general en el reino vegetal, la concentración de Ca en plantas está controlada genéticamente, estando poco afectado por el aporte de Ca en las raíces (Mengel y Kirkby, 2001). Los calcisoles son los suelos más abundantes de la Región de Murcia, puesto que cubren casi la mitad de su superficie. Comprenden aquellos suelos cuya característica fundamental de diagnóstico es la presencia de un horizonte cálcico, si la acumulación de carbonato cálcico no está consolidada, o petrocálcico si está en forma de costra caliza. La vía típica de captura de Ca se realiza a través del apoplasto. A pesar de que el Ca sea uno de los elementos inorgánicos que alcanza las más elevadas concentraciones en material vegetal, sus concentraciones en citosol se mantienen siempre bajas, en torno a 10^{-3} - 10^{-5} mM (Mengel y Kirkby, 2001) acumulándose en la vacuola gracias a bombas Ca^{2+} -ATPasas, en formas precipitadas como oxalatos, carbonatos y fosfatos en concentraciones medias de 1 mM.

Su principal función es la de mantener la estabilidad e integridad de la pared celular, por lo que es requerido para la elongación y división celular (Burström, 1968 citado en Mengel y Kirkby, 2001). Actúa en la selectividad de la membrana plasmática, por ejemplo frente a K^+ y Na^+ (Marschner, 1995), y participa como segundo mensajero en la activación y propagación de señales, como durante la traducción de señales tras deshidratación (quinasas dependientes de Ca^{2+}). La deficiencia de Ca causa, como

consecuencia de sus funciones, una reducción del crecimiento, principalmente en de las zonas jóvenes. Afecta a la rigidez de las hojas y planta debido a la pérdida de dureza de las paredes celulares.

• **Magnesio (Mg):** Aunque su concentración en el suelo sea mucho mayor que la de K^+ , la tasa de absorción de Mg^{2+} es mucho menor que la del K^+ , por lo que existen mecanismos para restringir una absorción y transporte excesivo hasta el resto de tejidos (Mengel y Kirkby, 2001). Ya que apenas hay diferencias en la concentración de Mg^{2+} en citosol (≤ 5 mM) y en vacuola, es razonable que los transportadores celulares y del tonoplasto estén mediados por difusión facilitada. Se trata de un catión difusible que se asocia con aniones inorgánicos e orgánicos como el malato y el citrato.

La función del Mg más relevante es la de constituir al centro de la molécula de clorofila. Sin embargo, la mayoría del Mg^{2+} celular tiene papel como cofactor enzimático, al formar puentes entre el ATP y algunas enzimas. (Mengel y Kirkby, 2001). Participa en estabilización de nucleótidos y ácidos nucleicos (Travers, 1989 citado en Mengel y Kirkby, 2001), y es requerido para la formación de ciertas metaloproteínas fundamentales para la síntesis proteica, como las ribozimas (Ahsen y Noller, 1995 citado en Mengel y Kirkby, 2001). Al ser un elemento móvil, sus deficiencias siempre comienzan en las hojas más maduras. Causa clorosis en los espacios entre los nervios de la hoja, y caída prematura de las hojas maduras. Produce inhibición del crecimiento foliar y radicular, fotosensibilidad y fotooxidación de los tilacoides de los cloroplastos.

1.2.2. Micronutrientes

• **Cobre (Cu):** En las raíces, el Cu apenas se incorpora en forma acomplejada, y al igual que otros metales, entra como catión disociado Cu^+ (Kabata-Pendias, 2001). Bajo condiciones fisiológicas, Cu existe como Cu^{2+} y Cu^+ . El catión Cu^{2+} está a menudo unido al nitrógeno de la histidina, mientras que el Cu^+ prefiere interactuar con el sulfuro de la cisteína o metionina (Yruela, 2009). Inmediatamente tras su captura, la inmensa mayoría de los iones de Cu se une a proteínas secuestradoras como las

metaloproteínas, para prevenir la acumulación de cobre en formas tóxicas, implicadas tanto en el transporte de electrones en cloroplastos y mitocondria, como en respuesta a estrés oxidativo, debido a sus múltiples estados redox. En citoplasma, las células lo asocian a chaperonas que lo transportan hasta la vacuola o lo entregan a proteínas que lo necesitan (Palmer y Guerinot, 2009), controlando así su nivel citoplasmático.

El ión Cu^+ actúa como cofactor, como en enzimas Cu/Zn-superóxido dismutasa, citocromo C-oxidasa, ascorbato oxidasa, etc. La proteína con Cu más abundante es la plastocianina, encargada de transportar los electrones desde el citocromo al PSI (Palmer y Guerinot, 2009). A nivel celular, es esencial en el metabolismo de la pared celular, señalizando la transcripción de la maquinaria del tráfico de proteínas, fosforilación oxidativa, y movilización de hierro (Yruela, 2009). Es esencial para la fotosíntesis, cofactor frente a ROS, formación del polen, adecuado metabolismo nitrogenado y de carbohidratos, respiración mitocondrial (Hänsch y Mendel, 2009). Influye en la permeabilidad de los vasos xilemáticos, por lo que también controla las relaciones hídricas (Kabata-Pendias, 2001).

• **Hierro (Fe):** En los suelos, la movilidad del Fe está controlada por la solubilidad del Fe^{3+} y del Fe^{2+} . El contenido de Fe soluble en los suelos es extremadamente bajo en comparación con el contenido de Fe total (Kabata-Pendias, 2001). Puede ser absorbido como Fe^{2+} generalmente, pero también como Fe^{3+} , y formas quelatadas. Para la asimilación del Fe, las plantas han desarrollado dos tipos de estrategias:

○ Las plantas monocotiledóneas no gramíneas y las dicotiledóneas producen sustancias que reducen los quelatos de hierro ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$) y otros complejos presentes en la rizosfera para facilitar su asimilación junto con los iones de Fe^{+2} libres, a través de la membrana plasmática.

○ Las gramíneas monocotiledóneas excretan quelatos como fitosideróforos o fitometalóforos, dependiendo de si se asocian sólo con hierro o con más metales en la rizosfera, los cuales si que pueden penetrar a través de la membrana plasmática (Palmer y Guerinot, 2009).

Debido a que la reactividad del Fe con ligandos orgánicos es muy alta, en el xilema, el Fe es mayoritariamente complejoado con citrato (Briat y col., 2007) y debido al pH del xilema, el hierro existe como quelato de Fe^{3+} -citrato (Palmer y Guerinot, 2009). En floema, el hierro circula quelatado asociado a nicotianamina. Aunque puede ser almacenado en el apoplasto, organelas como vacuolas y plastidios juegan un papel clave en la compartimentación de hierro. Las plantas son capaces de acidificar la rizosfera (incluso 2,5 unidades) para facilitar su movilidad cuando el aporte de ciertos nutrientes es deficiente (Olsen y Brown, 1980; Marschner y col., 1986; Brown y Jolley, 1988). Al ser un elemento inmóvil, la cantidad de Fe es relativamente baja en partes de la planta con intenso crecimiento (Kabatas-Pendias, 2001).

Como el Cu, es vital para la vida, participando en la transferencia de electrones durante la fotosíntesis, respiración mitocondrial, producción y secuestro de ROS, asimilación de nitratos y sulfatos, metabolismo implicado en los ácidos nucleicos, biosíntesis de hormonas, etc.

• **Manganeso (Mn):** La absorción de Mn está regulada metabólicamente, aunque puede ocurrir mediante incorporación pasiva, sobretodo en suelos con altas concentraciones (Kabatas-Pendias, 2001). Una vez dentro de la planta, es transportado como Mn^{2+} o a complejado con moléculas de gran tamaño.

Este elemento sirve como metal catalítico activo cuando está unido a proteínas, principalmente de las que intervienen en procesos de oxidación-reducción, como la superóxido-dismutasa. Activa y desactiva a las proteínas por cambios de valencia entre Mn^{3+} y Mn^{2+} . Las proteínas pertenecientes a este grupo están implicadas en la ruta del ácido sikímico, y subsecuentemente en rutas para la formación de aminoácidos aromáticos y flavonoides. Juega un papel esencial en la cadena de transporte de electrones durante la fotosíntesis, y oxidación de H_2O (Kabatas-Pendias, 2001).

• **Molibdeno (Mo):** Las plantas lo absorben como ión molibdato, siendo proporcional a su concentración en el suelo. Aunque no sea muy utilizado en procesos fisiológicos (se necesita $\leq 1 \mu\text{g g}^{-1}$ PS), está íntimamente implicado en la regulación de enzimas muy importantes, como la nitrogenasa, la enzima clave para la asimilación de N. Su concentración en nódulos es mucho más elevada. Todo esto hace que su deficiencia cause síntomas similares a los de la deficiencia de N (Mengel y Kirkby, 2001).

• **Níquel (Ni):** Existe como Ni^{2+} en sistemas biológicos y es usado como cofactor por enzimas eucarióticas como la ureasa. Está relacionado con el metabolismo nitrogenado de legumbres que transportan N desde las raíces a la parte aérea como ureidos (Mengel y Kirkby, 2001; Kabata-Pendias, 2001). Su absorción está muy condicionada por el pH del suelo, aumentando por debajo de 7.

• **Zinc (Zn):** Es absorbido desde el suelo por las raíces en forma de catión divalente (Zn^{2+}), su único estado redox en condiciones fisiológicas, pero también potencialmente acomplejado por ligandos orgánicos en las raíces, para posteriormente transportarlo a las partes aéreas vía xilema (Broadley y col., 2007). En el floema, viaja quelatado con nicotinamina (Palmer y Guerinot, 2009). La concentración de Zn soluble en agua en la solución del suelo es muy baja ($4 \times 10^{-10} - 4 \times 10^{-6}$ M) (Barber, 1995). En solución nutritiva de cultivo hidropónico con altas concentraciones de P pero bajas de Zn, el P induce deficiencia de Zn (Marschner, 1995) debido a la formación de complejos Zn-P.

En la planta, el Zn puede asociarse con ligandos. En savia xilemática aparece asociado a citrato, y el resto en forma libre Zn^{2+} . En hoja y tallo, la mayoría aparece asociado a citrato, oxalato y otros ácidos orgánicos, His (en la vacuola), y a pared celular, y con una fracción inferior como catión libre (Salt y col., 1998; Brown y col., 1993). La formación de complejos con P, como “phytates” conduce a su inmovilización en las raíces (Broadley y col., 2007; Alloway, 2008).

El Zn interviene en el transporte de agua, síntesis de pared celular, metabolismo de auxinas, transpiración, conductancia estomática (Barceló y Poschenrieder, 1990; Broadley y col., 2007; Sagardoy y col., 2009; Shi y Cai, 2009), participa en fotosíntesis, formación de sacarosa y almidón, proteínas de membrana, y reproducción (Alloway, 2008). Además interviene en producción de energía y mantenimiento interno de la integridad estructural de biomembranas. Se predice que más de 1200 proteínas contienen, unen o transportan Zn, siendo el único metal que forma parte de todos los tipos de enzimas (Broadley y col., 2007) y es requerido como cofactor por más de 300 enzimas conocidas, incluyendo ARN polimerasa, SOD, etc. (Palmer y Guerinot, 2009).

• **Sodio (Na):** El Na actúa como un micronutriente en especies con el sistema fotosintético C4 (como *Atriplex halimus* L.) (Brownell y Crossland, 1972), aunque en halófitos, el papel de su gran acumulación es bajar el potencial hídrico y así mantener la absorción de agua frente a estreses como la salinidad y sequía.

1.3. Metabolismo nitrogenado

1.3.1. Incorporación de nitrógeno a la planta

A pesar de que alrededor del 80% de nuestra atmósfera está constituida por nitrógeno en su forma molecular (N_2), las plantas lo obtienen principalmente del suelo ya que es extremadamente estable y no está inmediatamente disponible para las plantas (Maathuis, 2009). Tanto microorganismos de vida libre como simbióticos son los capaces de fijar N_2 atmosférico en la forma de amonio (NH_4^+) que puede ser directamente tomado por las plantas o convertido a nitrato (NO_3^-) por bacterias nitrificantes. Tanto el NO_3^- como el NH_4^+ son muy móviles en el suelo, aunque este último puede estar más o menos retenido por minerales de arcilla con carga negativa (Mengel y Kirkby, 2001).

De manera general (con algunas excepciones como los miembros de la familia de las Fabaceae y las plantas carnívoras), el N se incorpora a las plantas como NO_3^- a partir del suelo, después de un proceso de mineralización catalizada por los microorganismos del suelo, el cual procede en la siguiente dirección:

Nitrógeno orgánico \rightarrow amonio \rightarrow nitrito \rightarrow nitrato

La absorción de NH_4^+ sucede principalmente a pH por debajo de 6 (Mengel y Kirkby, 2001). Si la planta incorpora nitrato directamente desde el suelo, tendrá que utilizar las enzimas nitrato reductasa (de nitrato a nitrito) y nitrito reductasa (de nitrito a amonio).

Las células vegetales evitan la toxicidad del amonio metabolizándolo rápidamente hacia la síntesis de amidas (glutamina, asparragina, etc.) a través de reacciones catalizadas por glutamina sintetasa (GS) y glutamina 2-oxoglutarato aminotransferasa (GOGAT) (Mengel y Kirkby, 2001; Sánchez-Rodríguez y col., 2011). En leguminosas, la asimilación de nitrato se realiza fundamentalmente en raíces antes de ser exportado al xilema (Andrews, 1986).

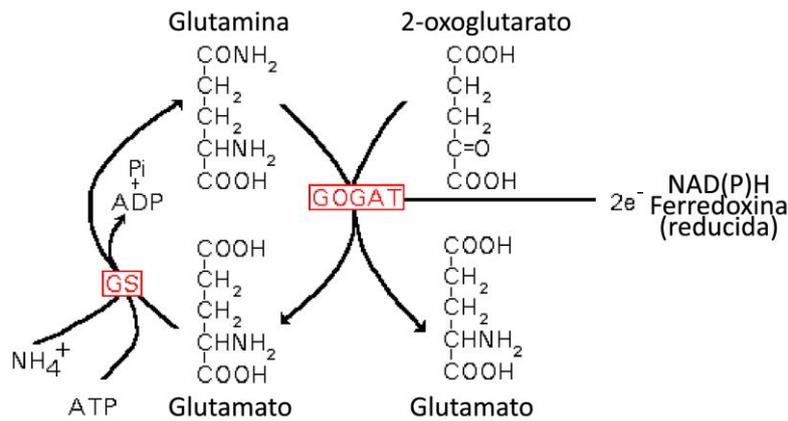


Figura 1.3.1.a.- Primer paso en la ruta de incorporación del NH_4^+ a los aminoácidos.

Una vez asimilado el nitrógeno en glutamina y glutamato, el nitrógeno es incorporado a otros aminoácidos por reacciones de transaminación mediante las enzimas aminotrasferasas, primeramente en hojas verdes. (Serraj y col., 1999).

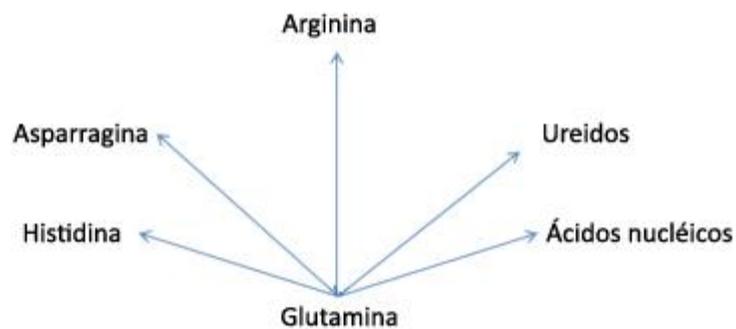


Figura 1.3.1.b.- Esquema de las posibles vías de incorporación de compuestos nitrogenados hacia las rutas de síntesis de aminoácidos a partir de la glutamina.

Es un nutriente de gran importancia debido a su presencia en las principales biomoléculas de la materia vegetal. En términos mundiales, es el nutriente que más limita las cosechas y por ello, el que más se fertiliza. Una evidencia de su importancia es el hecho de que la enzima más abundante del mundo sea la rubisco. Cuando el aporte de N desde las raíces es inadecuado, nitrógeno desde hojas más viejas es movilizado para proveer los órganos más jóvenes de la planta. Por esa causa, las plantas que sufren deficiencia en N muestran los primeros síntomas en las hojas jóvenes (Mengel y Kirkby, 2001).

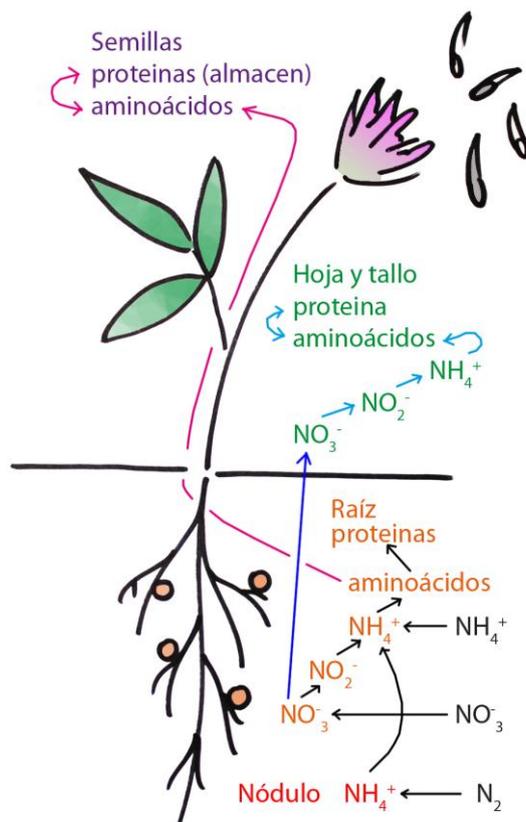


Figura 1.3.1.c.- Esquema de la distribución de compuestos específicos del metabolismo nitrogenado de su incorporación desde el suelo y la atmósfera (nódulos) hasta los distintos órganos de una planta de *B. bituminosa*.

Los principales síntomas de deficiencia de N se pueden resumir en:

- Reducción del crecimiento, e incluso paralizarse.
- Clorosis en las hojas adultas (el nitrógeno se transporta de hojas adultas a hojas más jóvenes debido a su alta movilidad).
- Aumento de la concentración de azúcares.
- Menor crecimiento foliar frente al desarrollo radicular.
- Disminución de tamaño celular.
- Disminución de síntesis de proteínas.
- La floración queda muy restringida con notable reflejo en fructificación.
- Las enfermedades, heladas y granizadas producen mayores efectos.
- Adelanto de la floración y la maduración.

1.3.2. Fijación de nitrógeno en raíces de leguminosas

Independientemente del uso, la asociación simbiótica entre bacterias nodulantes y leguminosas juega un papel muy relevante en el mundo agrícola, con una producción mundial de 100 millones de toneladas de dinitrógeno atmosférico hasta amonio (Howieson y col., 2008). Podría decirse que tras la fotosíntesis, es el proceso biológico más importante del planeta. Cuando la concentración de NO_3^- en el suelo es elevada, se pueden producir nódulos pero que se mantienen en estado senescente (Suleiman y Schulze, 2010). Cuando su concentración es escasa, el N_2 es absorbido por las plantas de la familia Fabaceae en forma de NH_4^+ a través de las bacterias simbióticas fijadoras de N_2 . Para este proceso, el N_2 es transformado en NH_4^+ en una reacción catalizada por la enzima dinitrogenasa, que constituye el equipo enzimático que cataliza la reducción del nitrógeno a amoníaco, exclusiva de los procariotas ($\text{N}_2 + 8 \text{H}^+ + 8 \text{e}^- \rightarrow 2 \text{NH}_3 + \text{H}_2$).

Los rizobios son aerobios estrictos, por lo que necesitan oxígeno para la respiración y poder fijar N_2 , pero los dos componentes de la dinitrogenasa son inactivados por el oxígeno. En los nódulos radicales, donde el microbio encuentra las condiciones idóneas para expresar su actividad fijadora, existe un pigmento hemoproteico que regula el suministro de oxígeno al microbio para su respiración, a niveles que no afecten a la actividad fijadora, la leghemoglobina. El amonio producido por fijación de nitrógeno es transportado al citoplasma de las células nodulares.

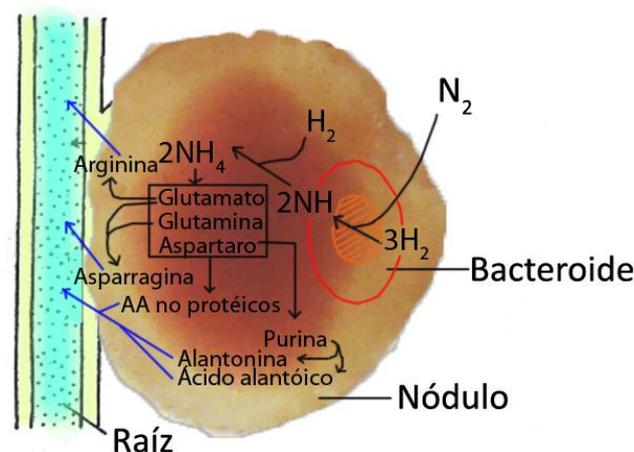


Figura 1.3.2.a.- Esquema del transporte nitrogenado, y aporte de carbono en la regulación de la fijación de nitrógeno (basado en Serraj y col., 1999).

La fijación simbiótica de nitrógeno en los nódulos de las leguminosas es el resultado de una serie de complejas interacciones entre la bacteria y las raíces de la planta, entre las que se distinguen las siguientes etapas:

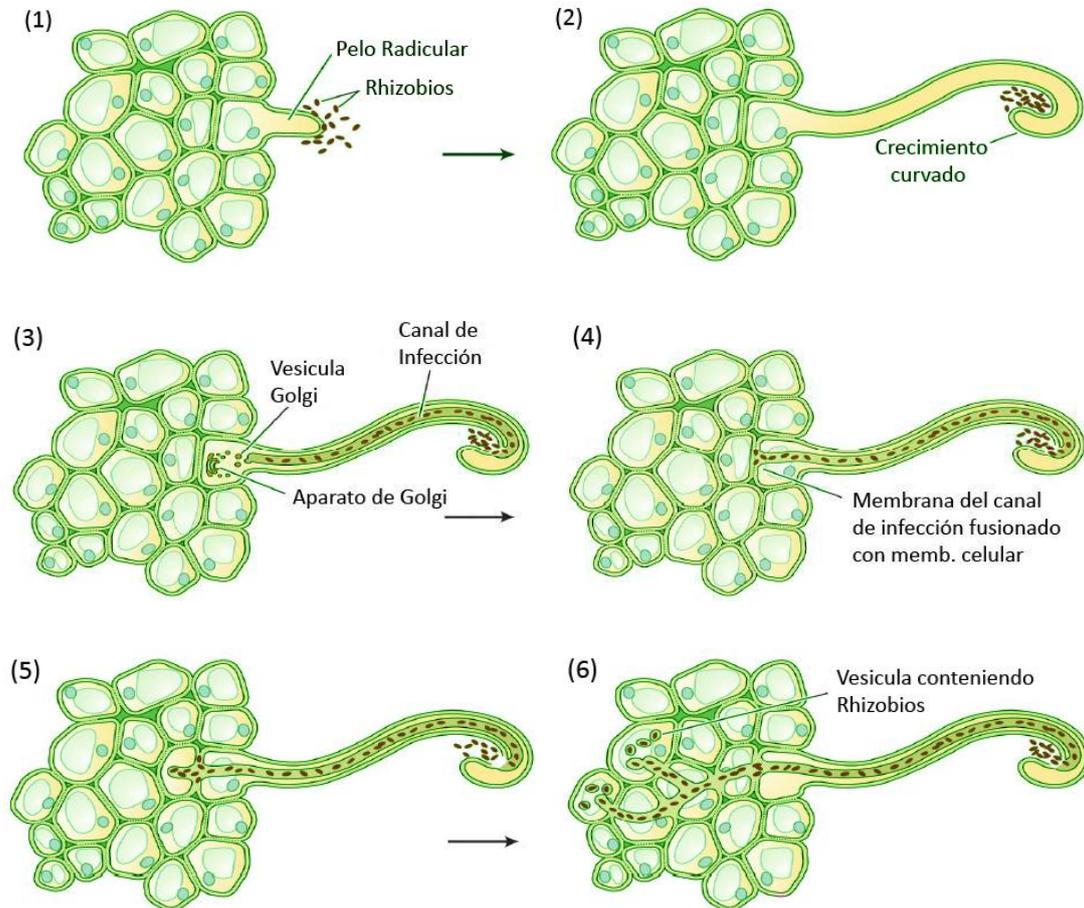


Figura 1.3.2.b.- Representación del proceso de infección por el que las bacterias nodulantes consiguen entrar al interior de las células de la raíz tras el cual dará comienzo la formación del nódulo (modificado de Plant Physiology, 3ª edición, Figura 12.11).

- **(1)** Los rizobios que se encuentran junto a los pelos radiculares secretan factores *nod* que producen una pronunciada curvatura del pelo radicular.
- **(2)** Los rizobios de la curvatura degradan la pared celular, permitiendo el acceso directo de las células bacterianas a la superficie externa de la membrana plasmática.

- **(3)** Entonces se forma un canal de infección por la deposición de material desde el aparato de Golgi en el lugar de infección.
- **(4)** El canal de infección alcanza el final de la célula, y se fusiona con él, de modo que ambas membranas plasmáticas se fusionan. Entonces las bacterias son capaces de llegar hasta el espacio intermembrana.
- **(5)** Los Rhizobia alcanzan el apoplasto y la lamina media, permitiendo la continuación de un nuevo canal de infección, fusionado con el primero.
- **(6)** El canal de infección se expande creando ramificaciones hasta alcanzar células diana y vesículas compuestas de membrana plasmática, encerrando células bacterianas.

La fijación de nitrógeno se produce varios días después de la entrada de las bacterias a las raíces. Al hacerlo, las bacterias fijan nitrógeno atmosférico y excretan amoníaco en el citoplasma de la célula, que será utilizado por la planta como fuente para la síntesis de sustancias que contienen nitrógeno, como AAs. Esta localización plantea la necesidad de la existencia de un intercambio metabólico entre los dos simbioses, que implica el suministro por la planta de los nutrientes, compuestos carbonados y agua necesarios para el microbio, así como el transporte hacia la planta de los productos nitrogenados resultantes de la actividad fijadora del microbio. Hacia el xilema, la glutamina puede salir como tal del nódulo, o bien sufrir transformaciones a asparaguina, o a ureidos como alantoína y ácido alantóico (ver Figura 1.3.2.a.).

La nodulación es un proceso susceptible, que se ve muy afectado por las condiciones del medio, como la sequía (Antolín y col., 2010) o las altas concentraciones de MPs en el suelo (Obbard y Jones, 2001). Cuando existe NO_3^- en el suelo, la planta detiene la fijación de N_2 atmosférico, debido a que la actividad nitrato reductasa se encarga de inhibir la formación y crecimiento de los nódulos al afectar a la funcionalidad de la leghemoglobina (Kanayama y col., 1990; Sodek y Moura Silva, 1996; Goergen y col., 2009). Hay evidencias de que el As en altas concentraciones reduce en número de nódulos, y alarga su periodo de formación (Reichman, 2007). Por otro lado, el cobalto (Co) es necesario para la fijación simbiótica del N, aunque a

concentraciones muy bajas en la disolución externa ($\leq 10 \mu\text{g L}^{-1}$), ya que aumenta la leghemoglobina a través de la coenzima-vitamina B12 en los nódulos (Mengel y Kirkby, 2001). La sequía también puede inhibir la fijación de N en nódulos (Streeter, 2003) por varias causas: descenso de la infección por bacterias fijadoras de N, menor permeabilidad de oxígeno de los nódulos, descenso del aporte de fotoasimilados, y reducción del aporte de agua en el floema de la planta hospedadora (Sánchez-Díaz y Aguirreolea, 1991; Serraj y col., 1999; Arrese-Igor y col., 2011). Aun así, las leguminosas son capaces de establecer relaciones simbióticas en condiciones extremas, como en zonas desérticas o zonas contaminadas por MPs, por lo que esta familia supone una de las más abundantes en territorios hostiles (Gehlot y col., 2012).

Tabla 1.3.2.- La cantidad de N_2 fijado por leguminosas es altamente variable (desde 5 KgN ha^{-1} en pastizales naturales, hasta 400 KgN ha^{-1}). La tabla muestra ejemplos representativos de las cantidades de N_2 fijado gracias a interacciones entre leguminosas comestibles y sus correspondientes especies de bacterias del género *Rhizobium* (West y Mallarino, 1996; Racca y col., 2001).

Leguminosa	Nitrógeno fijado $\text{KgN ha}^{-1}\text{año}^{-1}$	Especie de rizobio
Alfalfa	200-250	<i>Rhizobium meliloti</i>
Altramuz	150	<i>R. lupini</i>
Garbanzo	60-80	<i>R. leguminosarum</i>
Guisante	100	<i>R. leguminosarum</i>
Judía	50	<i>R. phaseoli</i>
Lenteja	100	<i>R. leguminosarum</i>
Meliloto	100-125	<i>R. meliloti</i>
Soja	80-90	<i>R. japonicum</i>
Trébol	100-150	<i>R. trifolii</i>
Vicia	100-120	<i>R. leguminosarum</i>



Fotografías 1.3.2.- Nódulos de rizobios en raíces de *B. bituminosa* cultivada en la estación experimental del IMIDA (izquierda). Nódulo de plantas cultivadas en cámara de cultivo cortado por la mitad para mostrar su color rojizo interno (derecha).

1.3.3. Prolina

El aminoácido prolina, o ácido pirrolidin-2-carboxílico – $C_5H_9NO_2$, conocido con la abreviatura “Pro”, se encuentra incluido dentro de los compuestos llamados "osmolitos" que participan en el ajuste osmótico en el citoplasma.

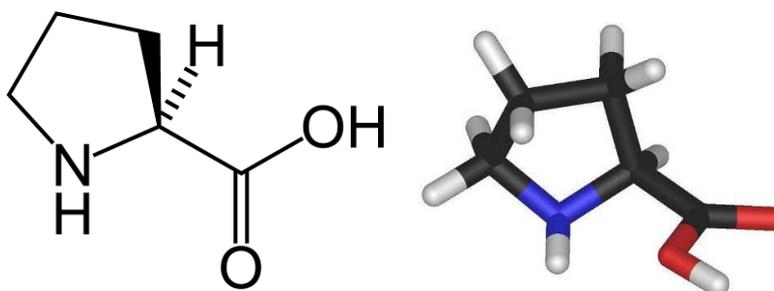


Figura 1.3.3.- Estructura química lineal y tridimensional del aminoácido prolina.

Los osmolitos comparten la característica de no presentar carga en pH neutro (pH citoplasma = 7,4), y ser de solubilidad alta en el agua (Ballantyne y Chamberlin, 1994). Aunque la acumulación de prolina sea una respuesta metabólica común en plantas superiores durante déficit hídrico y salinidad (Barnett y Naylor, 1966; Boggess y col., 1976; Jones y col., 1980), su papel como síntoma o respuesta sigue siendo controvertido aún tras 20 años de numerosas revisiones (Stewart, 1981; Delauney y Verma, 1993; Verbruggen y Hermans, 2008). La prolina protege membranas y proteínas contra los efectos adversos de altas concentraciones de iones inorgánicos, evitando la acidosis citoplasmática, pudiendo mantener proporciones $NADP^+/NADPH$

en valores compatibles con el metabolismo (Hare, 1998; Bandurska, 2001). Además, su rápido catabolismo puede generar ATP para la recuperación y la reparación de daño inducido por el estrés. Actualmente se le adjudica también un papel importante como antioxidante (Vendruscolo y col., 2007) y mantenimiento del potencial redox (Hare y col., 1998).

De acuerdo con Kamaranos y col. (1983), hay tres razones principales para la acumulación de prolina en hojas estresadas. La primera, y principal componente para su acumulación, es la estimulación de la síntesis de prolina a partir de ácido glutámico, la segunda es una inhibición de la oxidación de otros compuestos solubles, y la tercera una inhibición de la síntesis proteica. La prolina se sintetiza principalmente en el citoplasma, aunque también en mitocondria y cloroplasto, a partir de glutamato, transformación activada por ABA, y es metabolizada en el interior de las mitocondrias (Szabados y Saviouré, 2009). Evidencias directas del papel de la prolina durante el estrés osmótico han sido probadas mediante ingeniería genética, por las cuales se comprobó que elevadas concentraciones de prolina mejoran la tolerancia (Vendruscolo y col., 2007). Un factor a tener en cuenta para la acumulación de prolina, es su distribución entre la vacuola y el citoplasma. Se considera que la Pro se acumula principalmente en el citosol, por lo que un ligero aumento al nivel de tejido completo puede significar grandes cambios de su concentración en estos compartimentos que ocupan menos del 5% del volumen total de la célula. Por otro lado, se ha documentado que existen especies que realizan una síntesis más conservadora y gradual de la prolina (esclerófilos), mientras que otras sufren rápidos y bruscos cambios en su concentración para una estrategia oportunista (especies que pierden parcialmente su follaje) (Ain-Lhout y col., 2001).

1.4. Interacciones entre factores ambientales y plantas

Las plantas superiores, al igual que el resto de organismos, presentan una tasa máxima de crecimiento y desarrollo a un óptimo de las condiciones medioambientales para las cuales estén adaptadas. Cuando las condiciones se desvían de ese punto óptimo, deberán ocurrir cambios a nivel fisiológico, bioquímico, metabólico y molecular con los que las plantas se esforzarán para maximizar su crecimiento así como el mantenimiento de su homeostasis celular.

Se puede definir **estrés** como la condición de alteración fisiológica causada por factores que tienden a alterar un equilibrio (Gaspar y col., 2002). Un **agente estresante** es aquel factor inusual, o factor usual modificado de cierta manera, por exceso o déficit, que tiene la capacidad de causar daños o enfermedades (Gaspar y col., 2002). Por otro lado, Gaspar y col., (2002) proponen que los mecanismos que permiten sobrevivir al tolerar o evitar el estrés son los que constituyen la **Resistencia**. Estos mecanismos pueden dividirse en dos categorías. Se considera **Tolerancia** a los mecanismos que mantienen alta actividad metabólica (similar a la de en ausencia de estrés) bajo suaves estreses y reducir la actividad bajo estreses severos. Por el contrario, los mecanismos de **Evitación** implican una reducción de la actividad metabólica, provocando un estado de letargo, bajo exposición a estrés extremo. De acuerdo con Carpena y col. (2006), la **tolerancia** de la planta a elementos potencialmente tóxicos es la supervivencia en un suelo tóxico que se manifiesta por la interacción entre un genotipo y su ambiente. En cambio, la **resistencia** a elementos tóxicos es la capacidad global de la planta para soportar un exceso de los mismos sin síntomas de toxicidad. Por tanto, existen mecanismos constitutivos (resistencia, en fenotipos sensibles y tolerantes) y, adaptativos (tolerancia, en fenotipos tolerantes).

Los mecanismos de tolerancia pueden clasificarse a dos niveles. Se habla de **Adaptación** cuando los mecanismos de tolerancia se encuentran a nivel poblacional. **Aclimatación** es la habilidad para ajustar atributos fisiológicos y estructurales con un sólo genotipo a nivel de individuo, respuesta fenotípica (Gaspar y col., 2002).

1.4.1. Sequía

Aumentar la eficacia del agua dentro de sistemas agrícolas es una prioridad esencial en muchas regiones, incluyendo la mediterránea (Parry y col., 2005) (“More crop per drop”). Antes de proceder a hablar sobre sequía, se definirán unos términos claves en cuanto las relaciones hídricas de las plantas.

El agua y los nutrientes minerales disueltos entran en la planta desde la superficie externa de la raíz (epidermis más capas exteriores del cortex) hasta los vasos xilemáticos por dos rutas. En la ruta célula a célula (transcelular o simplasto), el agua y solutos pasan a través de las acuoporinas de las membranas plasmáticas de las células que forman la epidermis de los pelos de la raíz y, a través de los plasmodesmos célula a célula hasta llegar al xilema. En la ruta extracelular o apoplasto, el agua y los solutos penetran a través de la pared celular de las células de los pelos de la raíz y pasan entre la pared celular y la membrana plasmática hasta que encuentran la endodermis, hasta llegar al xilema (Vandeleur y col., 2009).

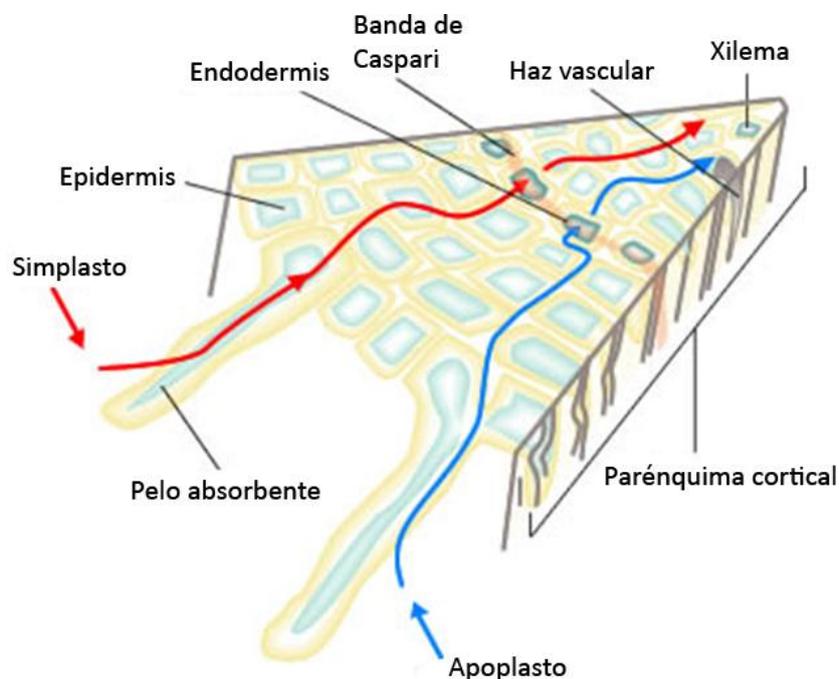


Figura 1.4.1.a.- Representación de las dos vías a través de las cuales el agua y los solutos pueden llegar hasta el xilema de las raíces. En rojo, la vía simplasto, y en azul la vía a través del apoplasto.

Las raíces son un medio conductor, a menudo con una conductividad del agua mayor que la del suelo externo seco. Por lo tanto, estas son capaces de actuar como un conducto pasivo para el transporte de agua gracias al gradiente de potencial desde el subsuelo profundo a las partes superficiales (Whitmore y Whalley, 2009), y crear zonas más húmedas alrededor de las raíces (Nambiar, 1977). Este proceso (“Hydraulic lift”) también ha sido descrito en arbustos mediterráneos de climas semiáridos (Prieto y col., 2010). Se estima que la cantidad de agua que sea posible que se mueva de esta manera se encuentre entre el 14 y el 33% de la demanda de evapotranspiración diaria (Liste y White, 2008). Este hecho puede justificar el empleo de varias especies de manera conjunta, de modo que unas plantas con una conductividad muy eficiente puedan incrementar la disponibilidad de agua de plantas anuales y microfauna cercanas (Facelli y Temby, 2002).

En cuanto a las relaciones hídricas, la movilidad de las moléculas de agua depende de su energía libre, es decir, de la fracción de la energía total que puede transformarse en trabajo. La magnitud más empleada para expresar y medir su estado de energía libre es el potencial hídrico. El concepto de potencial del agua (Ψ_w , expresado en MPa) es de gran utilidad puesto que permite predecir cómo se moverá el agua bajo diversas condiciones (Krizek, 1985). El agua se mueve de forma espontánea desde una zona de potencial hídrico alto, es decir menos negativo (suelo), a una zona con el potencial menor a través de la planta (atmosfera). En la célula vegetal el agua está presente en la pared celular y en el protoplasto (principalmente en la vacuola). Los flujos de entrada y salida de agua del protoplasto dependerán de la relación que exista entre su Ψ y el Ψ del medio:

- Si $\Psi_{\text{interno}} = \Psi_{\text{externo}}$: equilibrio dinámico y no hay flujo neto.
- Si $\Psi_{\text{interno}} > \Psi_{\text{externo}}$: habrá una salida neta de agua del protoplasto, pudiéndose alcanzar el estado de plasmólisis.
- Si $\Psi_{\text{interno}} < \Psi_{\text{externo}}$: hay una entrada neta de agua y, en consecuencia, un aumento de volumen del protoplasto, alcanzándose el estado de turgencia.

El Ψ se puede expresar en función de sus componentes: $\Psi_w = \Psi_s + \Psi_p + \Psi_m + \Psi_g$

El Ψ_w , **potencial hídrico**, es nulo para el agua pura a presión atmosférica, positivo para presiones por encima de la atmosférica, y negativo en condiciones de tensión o vacío. Durante sequía, las plantas se ven obligadas a disminuir su Ψ_w para que el agua ascienda por gradiente de potencial desde el suelo a la planta. Al alba se considera que está en equilibrio con el Ψ_w del suelo.

El Ψ_s , **potencial osmótico**, representa la disminución de la capacidad de desplazamiento del agua debido a la presencia de solutos. A medida que la concentración de soluto (es decir, el número de partículas de soluto por unidad de volumen de la disolución) aumenta, el Ψ_s se hace más negativo. Sin la presencia de otros factores que alteren el potencial hídrico, las moléculas de agua de las disoluciones se moverán desde lugares con poca concentración de solutos a lugares con mayor concentración de solutos. El Ψ_s se considera 0 para el agua pura.

Se llama **potencial de turgor (Ψ_p) o potencial de presión**, al resultado del contenido celular de agua por las interacciones entre la concentración osmótica de la célula, tamaño celular y la elasticidad de la pared celular (Tyree y Jarvis, 1982), el cual es por lo tanto sensible al estado hídrico de la planta (Calkin y Pearcy, 1984). Puede estimarse mediante la ecuación $\Psi_p = \Psi_w - \Psi_s$ (Krizek, 1985; Nonami y Boyer, 1989), siendo $\Psi_m < 0,01$ MPa y el componente gravimétrico (Ψ_g) sin importancia cuando se trata de plantas herbáceas.

El Ψ_m , **potencial matricial**, representa el grado de retención del agua, debido a las interacciones con matrices sólidas o coloidales. Puede valer cero, si no hay interacciones, o ser negativo. Su aportación al Ψ en células vegetales es escasa, ya que adquiere valores muy pequeños.

Se define ajuste osmótico (AO) al proceso de acumulación activo de solutos en el interior de las células frente a una reducción en el Ψ_w del medio externo, permitiendo entonces el mantenimiento positivo de la presión de turgor.

El equilibrio hídrico en plantas superiores es consecuencia de la diferencia entre captura de agua y la pérdida a través de los estomas durante transpiración. Para el movimiento de agua en el continuo suelo/planta/aire, la conductividad hidráulica de

las raíces (L_o), es un parámetro clave que contribuye a la tasa de flujo hídrico (Steudle y col., 1987), definida como la tasa con la que el agua es capaz de pasar desde el exterior al interior de las raíces de una planta.

Se puede definir **sequía** como la carencia de humedad disponible en una región particular en última instancia como resultado de la sequedad del suelo (Iljin, 1957). Las estrategias empleadas por plantas frente a sequía, también definida como periodo extenso con aporte subóptimo de agua, pueden dividirse en tres:

- **Evasión:** dormancia o letargo de partes no reproductivas aéreas para permitir la supervivencia de semillas o de órganos vegetativos bajo el suelo (Volaire y Norton, 2006; Bell y col., 2007). Las plantas también pueden acelerar su desarrollo para asegurar la producción de semillas viables.
- **Evitación:** posponer la deshidratación interna mediante el mantenimiento del agua tisular y del potencial hídrico usando mecanismos que minimicen la pérdida y maximicen la absorción de agua, incluyendo control de la transpiración a través de los estomas, modificaciones anatómicas y morfológicas de las hojas, y crecimiento y transporte de agua eficiente de las raíces (Rhizopoulou y Psaras, 2003; Bell y col., 2007; Parent y col., 2009; Maurel y col., 2010).
- **Tolerancia a la deshidratación interna** es el mantenimiento del crecimiento a pesar del descenso del Ψ_w . Implica AO a través de la acumulación de solutos y cambios en las propiedades de la pared celular, para preservar el turgor (Ψ_p), y un eficiente sistema de prevención de daños oxidativos (Büssis y Heineke, 1998; Iannucci y col., 2000; Kusaka y col., 2005; Bell y col., 2007; Sánchez-Blanco y col., 2009). Como los metabolitos se destinan a la osmoregulación en vez de al crecimiento, obviamente se intenta evitar esta situación en agricultura porque reducen el rendimiento. La **tolerancia a la desecación**, por el contrario, se refiere a una situación en que la planta es capaz de perder la mayoría del agua celular sin sufrir daños permanentes e irreversibles en la estructura de la pared celular y la organización de sus polímeros (Moore y col., 2008).

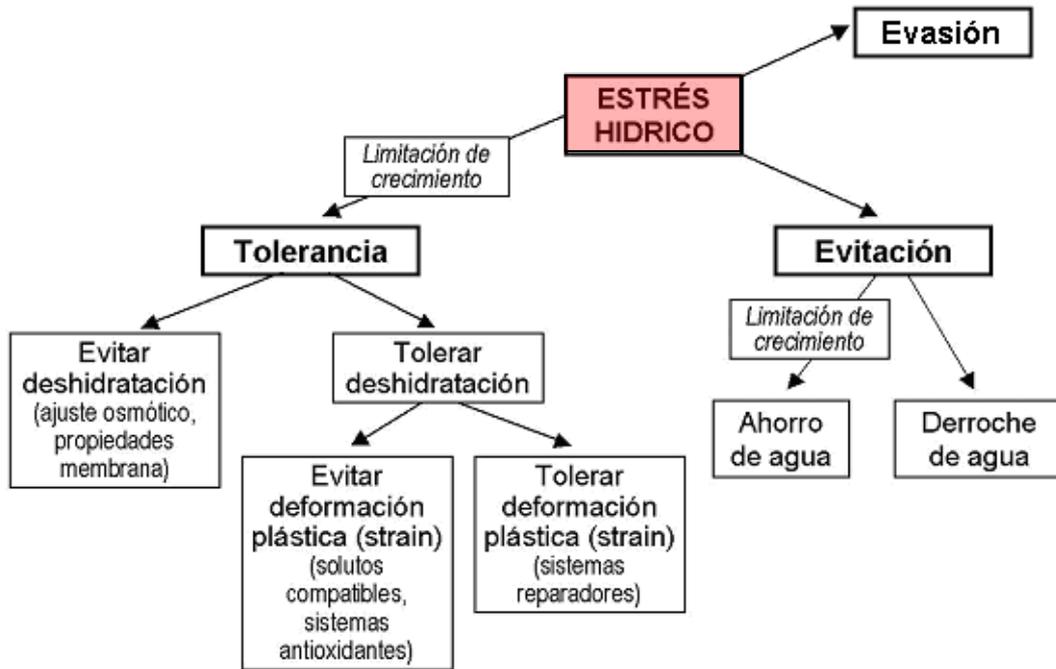


Figura 1.4.1.b.- Ante el estrés hídrico caben tres respuestas posibles: evadir, evitar o tolerarlo (Valladares y col., 2004).

El contenido relativo de agua (CRA) de un tejido vegetal es una manera apropiada de estimar el estado de hidratación celular durante un posible efecto sobre el Ψ_w y el AO frente a las condiciones ambientales. Durante sequía, la planta experimenta un descenso de su CRA (cálculo en sección 3.2.5.4 de Materiales y Métodos), lo que está asociado a cambios en el Ψ_w (0,5-1,0 MPa). Cuando el suelo se seca y baja el Ψ_w del agua del suelo, si la planta no es capaz de efectuar AO para mantener su $\Psi_s < \Psi_w$, a la misma vez que reduce su Ψ_w interno, experimenta una disminución en su Ψ_p y a menudo de su CRA. Una planta es más tolerante cuantos más cambios experimente en su Ψ_w como consecuencia de la sequía, sin sufrir cambios en su CRA (Irigoyen y col., 1992). Aunque las células necesitan un Ψ_p determinado para mantener su expansión, este Ψ_p no tiene por qué ser siempre máximo para que se produzca crecimiento celular. Aunque éste disminuya un poco, las células podrán seguir creciendo, hasta que la sequía provoque un descenso por debajo de un límite, y entonces la célula no pueda crecer (Nonami, 1998). Hay que tener en cuenta además que la reducción del crecimiento durante las primeras fases del estrés hídrico se debe

más al colapso del gradiente del potencial de agua entre la zona de elongación y el tejido maduro, que a la reducción de Ψ_p (Nonami y Boyer, 1989). Por eso no siempre hay una relación clara entre crecimiento y el Ψ_p de un órgano entero. El Ψ_p de la zona de elongación sí que puede mostrar una relación estrecha con el crecimiento (Maurel y col., 2010).

La disponibilidad de nutrientes minerales esenciales en el suelo esta generalmente perturbada por estrés hídrico, provocando deficiencias nutricionales o desequilibrios en plantas. Un adecuado aporte de nutrientes podría promover el crecimiento radicular bajo condiciones de sequía, el cual podría proveer una mejor extracción de agua y nutrientes a partir de estratos más profundos (Hu y Schmidhalter, 2005). De hecho, una respuesta común entre las plantas durante déficit hídrico es la estimulación del crecimiento radicular, lo que le permite alcanzar capas de suelo más húmedas donde aún hay agua disponible (Khan y col., 2010), aumentando la relación de Raíz en función de la de Parte Aérea (R:PA), y mejorando la relación absorción : pérdida de agua.

Durante las primeras fases de la sequía (10-30 días), el crecimiento está más afectado que la fotosíntesis, produciendo un aumento en los niveles de “NSC”, “non-structural carbohydrates” (azúcares, almidón etc.) (McDowell, 2011). Si la sequía se mantiene durante meses, los NSC bajan (“carbon starvation”) y, junto con la disrupción en las relaciones hídricas, conduce a la muerte de la planta. Los efectos pueden ser directos, como el descenso de la disponibilidad de CO_2 causada por la limitación de la difusión a través de los estomas y el mesófilo, o las alteraciones del metabolismo fotosintético, o efectos secundarios como el estrés oxidativo (Chaves y col., 2009). La respuesta de aclimatación a sequía ayuda a mantener el estado hídrico de la planta y por lo tanto la asimilación de carbono (Chaves y col., 2009). La muerte del ápice de la raíz ocurre como respuesta frente a sequía cuando se alcanzan altos déficits hídricos, activando la muerte celular programada y la acumulación de ROS en las células del ápice (Duan y col., 2010).

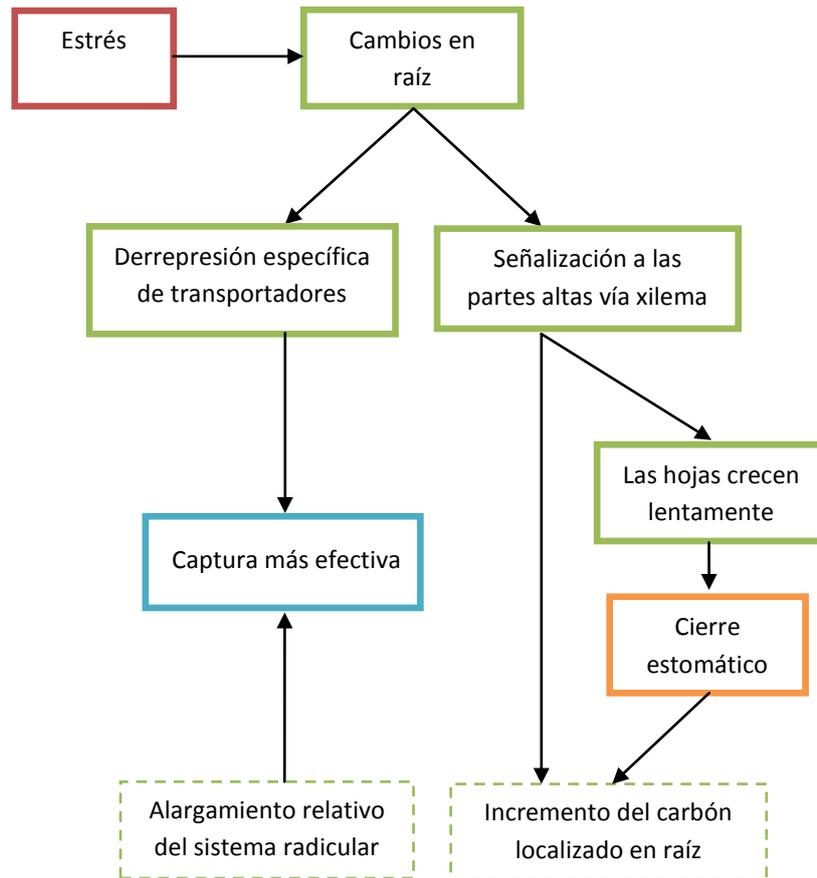


Figura 1.4.1.c.- Cascada de reacción por estrés hídrico (modificado de Clarkson y col., 2000).

Tabla 1.4.1.a.- Las respuestas generales de las plantas frente a sequía están resumidas según la escala de tiempo en el cual se producen (Adaptada de Munns, 2002; McDowell, 2011).

Tiempo	Respuesta
Minutos	Movimiento cierre estomático, ABA
Horas	Movimiento foliar, AO
1-2 días	Reducción de tasa fotosintética y formación de hojas
3-7 días	Senescencia foliar, estrés oxidativo
Semanas	Reducción del tamaño de las hojas y/o brotes laterales, aumento del grosor, aumento en el crecimiento radicular, caída de hojas
Meses	Alteración del periodo de floración

Tabla 1.4.1.b.- Principales mecanismos de tolerancia o evitación del déficit hídrico según Valladares y col., (2004).

	Evitación	Tolerancia
En Hojas	<ul style="list-style-type: none"> – Mantenimiento del Ψ alto – Cierre de estomas a CRA alto – Fuerte cierre de estomas al mediodía – Baja absorción de la radiación – Alta capacitancia foliar – Baja conductancia cuticular – Poca cantidad de hojas – Abscisión foliar durante el estrés 	<ul style="list-style-type: none"> – Mantenimiento de Ψ bajo – Cierre de estomas a CRA bajo
En Raíces	<ul style="list-style-type: none"> – Raíces profundas – Gran densidad de raíces – Alta superficie de absorción en relación con baja superficie transpirante – Raíces suberificadas – Alta relación biomasa radical / biomasa aérea – Alto peso específico radical – Alta conductividad hidráulica 	
Anatomía/ Metabolismo	<ul style="list-style-type: none"> – Tejidos sensibles a deshidratación (CRA letal > 50%) 	<ul style="list-style-type: none"> – Tejidos resistentes a deshidratación (CRA letal < 25%) – Resistente a la cavitación del xilema – Pequeño tamaño celular y Ajuste osmótico – Alta elasticidad de la pared celular – Capacidad de rebrote – Resistencia a la disfuncionalidad de la membrana celular – Acumulación de sustancias osmoprotectoras – Sistemas antioxidantes – Estabilidad pigmentos fotosintéticos

Las respuestas que han sido demostradas específicamente en *B. bituminosa* frente a estrés hídrico se podrían resumir en las siguientes:

- Paraheliotropismo (plegamiento de las hojas), lo que ayuda a reducir la transpiración y la intercepción de la radiación solar.



Fotografías 1.4.1.a.- Planta Control (izquierda) y no regada (derecha) mostrando diferente posición de las hojas frente a sequía (Fotografías cedidas por Kevin Foster).

- Mayor apertura de los estómas durante las horas favorables, y cierre durante horas de calor.
- Cambio de contenido de cloroplastos y pelos foliares.



Fotografía 1.4.1.b.- Comparación de la formación de pelos entre plantas control y no regadas (izquierda) e imagen de microscopía electrónica de tilosas en el haz vascular de *B. bituminosa* (derecha) (Imágenes cedidas por Kevin Foster).

- Producción de tilosas (protección mecánica mediante crecimientos excesivos del protoplasto de las células parenquimáticas adyacentes) en el xilema para restringir la pérdida de agua por interrupción de la continuidad del flujo.
- Sistema radicular extenso que permite explorar un gran volumen de agua y nutrientes desde el suelo.

1.4.2. Calor

Es difícil separar los efectos de la sequía de los del calor en el campo, porque normalmente ocurren simultáneamente (Guy y col., 2008). El estrés por calor es definido como la circunstancia cuando las temperaturas son lo bastante elevadas y durante suficiente tiempo como para causar daños irreversibles en las funciones o desarrollo de la planta (www.plantstress.com, 20/07/2011).

Todas las plantas tienen un rango de temperaturas óptimo para el crecimiento y la reproducción, pero son incapaces de regularla. Las temperaturas por encima del rango óptimo afectan a las relaciones hídricas, transporte de solutos, síntesis de los grana de los cloroplastos, crecimiento radicular, descenso de la actividad fotosintética, y pueden llegar a causar daños irreversibles, pobre desarrollo floral, esterilidad del polen, desnaturación de proteínas, inestabilidad de membranas celulares, etc (Crafts-Brandner y Salvucci, 2002). Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son la causa potencial del daño oxidativo a células durante estreses ambientales, aunque también juegan un papel en la traducción de señales implicadas en la mediación de respuesta frente al propio estrés, programando la muerte celular y estimulación del desarrollo (Mittler y col., 2004; Suzuki y Mittler, 2006).

Para compensar todos esos efectos, las plantas adaptadas a altas temperaturas activan una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos necesarios para restablecer una nueva homeostasis celular adecuada a la nueva temperatura. La mayoría de las respuestas metabólicas al calor ocurren en los primeros 30 minutos tras el comienzo del tratamiento (Guy y col., 2008). Por ejemplo, se activa la síntesis de proteínas (Heat Shock Proteins, HSPs) que protegen a la célula (Huang y Xu, 2008), se activa la síntesis de etileno y ABA (Kotak y col., 2007). Entre las respuestas por parte de la planta al calor se encuentran, además de los generales frente sequía, la producción de ceras (Zhang y col., 2005), aumento de los niveles de ABA y consecuente cierre estomático (Socias y col., 1997; Schachtman y Goodger, 2008), aumento de la síntesis de AAs como Glu, Met, Ile, Val, y sobretodo Pro (Marur y col., 1994; Rivero y col., 2004).

En relación con el efecto de incendios forestales sobre la germinación de especies silvestres, se ha demostrado que las especies de ecosistemas mediterráneas pueden clasificarse según su respuesta a tratamientos con altas temperaturas: ningún efecto, estimulación (*B. bituminosa*) e inhibición (Herranz y col., 1998; Luna y col., 2007), lo que indica el papel de *B. bituminosa* en la revegetación de zonas afectadas por tales incendios.

1.4.3. Alta intensidad lumínica

El estrés por alta luminosidad potencia la producción de ROS, causando daño oxidativo en cloroplastos. Por eso, las plantas adaptadas a la alta luminosidad poseen sistemas para la fotoprotección mediante mecanismos de prevención frente al exceso de absorción de luz, eliminación del exceso de excitación directa por inactivación de los sistemas de captura, y eliminación de ROS formados en el aparato fotoquímico.

B. bituminosa es una especie adaptada a vivir en condiciones de alta intensidad lumínica. Su fotosíntesis neta tiene una temperatura óptima de 25-30°C y satura a alta luminosidad, a radiación por encima de 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Méndez y col., 2000).

1.4.4. Metales pesados (MPs)

De todos los elementos de la tabla periódica, son considerados metales pesados (MPs) aquellos que tienen una densidad superior a 6 g cm^{-3} cuando están en forma elemental (Adriano, 2001), o cuyo número atómico sea superior a 20 (excluyendo alcalinos y alcalinotérreos). Los metaloides se encuentran comúnmente relacionados con los MPs debido a que aparecen junto a éstos en suelos con problemas de contaminación, como el antimonio (Sb), arsénico (As), y selenio (Se), por lo que habitualmente se incluyen dentro de la definición de MPs. Esta tesis recoge información de los principales contaminantes de la Sierra Minera de La Unión-Cartagena, cuyos suelos son objeto de una parte importante del trabajo experimental realizado: As y los MPs Cd, Cu, Fe, Mn, Pb y Zn, es decir excluyendo Al, Hg, Ni, Cr, Mo, Tl, W, Sb, Sn, etc.

Algunos de ellos son necesarios para las plantas en muy bajas cantidades (oligoelementos), pudiendo causar toxicidad cuando se superan ciertos límites de concentración en el interior de las células (ver sección 1.2.2.). Los MPs sin papel conocido en la planta (Cd, Pb, etc.) entran a través de sistemas de transporte de otros cationes (Ca, Fe, Mg, K) de baja selectividad, debido a su similitud química (Verbruggen y col., 2009).

Aunque las principales fuentes naturales de MPs son la roca madre del suelo y los minerales metálicos, y puedan existen suelos naturales con niveles muy altos de ciertos elementos (como el Ni), las fuentes más importantes de MPs son las antrópicas, que pueden llegar a crear grandes extensiones con altas concentraciones de uno o varios MPs en el suelo. La industria y la actividad minera suponen el mayor aporte de MPs al medio ambiente (fuentes de tipo puntual localizada), tanto en forma gaseosa, como en forma de residuos líquidos o gaseosos (fundición de metales, combustión de gasolina con Pb, componentes electrónicos, plásticos, cenizas y escorias de los procesos de combustión de carbón fósil o derivados del petróleo, etc). Uno de los desequilibrios con mayores consecuencias son las explotaciones mineras, desencadenando graves procesos erosivos y permitiendo la acumulación de determinados elementos en lugares accesibles para la flora y fauna. Algunos fertilizantes y plaguicidas han sido utilizados de manera tradicional continuada en agricultura (fuentes tipo de contaminación difusa), causando un aumento de ciertos MPs en el suelo, como en As, Cd, Cr, Pb, o Zn, por contener estos elementos en su composición.

Todas estas fuentes han conducido a una extrema polución por MPs a nivel mundial. De los 2 millones de sitios contaminados que existen en la UE, muchos de ellos por MPs, más de 100000 necesitan ser remediados (EEA, 2005). Sólo en Reino Unido, existen más de 400000 ha afectadas por contaminación por Pb (Thornton, 1981). La jungla del Amazonas ha sido contaminada por más de 2000 toneladas de Hg desde 1980 debido a la minería ilegal para la extracción de oro (Osava, 2005).

Los principales mecanismos de tolerancia a MPs en plantas se basan en evitar su acumulación excesiva en citoplasma, y de manera resumida se incluyen en (Marschner, 1995; Clemens, 2001):

- Unión a la pared celular: La retención de MPs en pared celular es uno de los principales mecanismos de desintoxicación de Pb y Cd, reduciendo el paso de estos elementos al citoplasma.

- Restringir su influjo a través de la membrana plasmática según la selectividad de los transportadores.

- Eflujo activo hacia el exterior de la célula.

- Compartimentación en vacuola: Para evitar la toxicidad del metal, todas las plantas poseen mecanismos basales de tolerancia, en los cuales aparecen implicados la evitación de la acumulación en concentraciones tóxicas. Los MPs pueden trasladarse directamente a través de transportadores en la membrana de la vacuola. Por ejemplo, existe un cotransportador de Cd^{2+}/H^{+} ubicado en la membrana de la misma (Salt y Wagner, 1993). Una vez dentro, se quedan en formas inmóviles, como en el caso del Zn asociado con P o con ácidos orgánicos (Broadley y col., 2007).

- Quelación: Una estrategia principal que las plantas emplean para combatir la toxicidad de MPs es la secuestro y quelación a moléculas portadoras dentro del citoplasma (Palmer y Guerinot, 2009). Las dos clases de quelantes principales son las fitoquelatinas y las metalotioninas (Clemens, 2001; Zhao y col., 2010).

- Transformación en formas menos tóxicas (orgánicas): Exclusivo para los elementos que pueden existir en formas orgánicas, como el As y el Se (Zhao y col., 2010).

A continuación se detalla por separado As y los principales MPs que cuasan toxicidad en las plantas superiores:

• **Arsénico (As):** La toxicidad del As depende más de su forma química que de su cantidad (Woolson y col., 1971). Está comprobado que el As(III) es más tóxico y móvil que el As(V), aunque el As(V) es la forma más predominante en suelos aeróbicos (Zhao y col., 2009). El As puede ser absorbido por sistemas de transporte de fosfato (H_2PO_4^-) desde la disolución de nutrientes a través de la raíz (Hilbold, 1975). Esto se debe a que el arseniato (AsO_4^{3-}) y el fosfato (PO_4^{3-}) son químicamente similares y compiten por las mismas superficies de absorción en los suelos y en los sistemas de transporte. Debido a su similitud estructural con el P, sus efectos están relacionados estrictamente con su sustitución por P en las plantas y la inhibición de la absorción y del transporte del fosfato (Řezanka y Sigler, 2008).

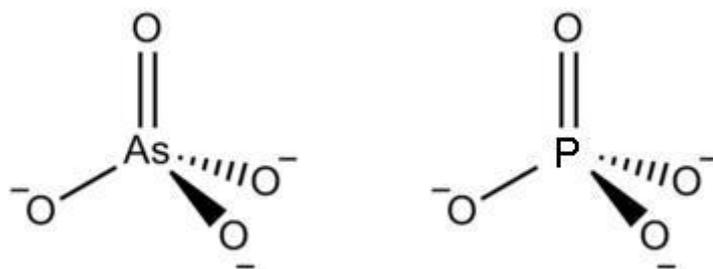


Figura 1.4.4.a.- Similitud de la estructura molecular del arseniato y del fosfato.

El fósforo ha sido usado para reducir la toxicidad del As, habiendo notado diversos autores (Woolson y col., 1971) una disminución en la toxicidad al aumentar los niveles de P en una amplia variedad de cultivos (Carbonell-Barrachina y col., 1999). En disolución nutritiva (DN), sólo hay inhibición de la absorción radicular de As por parte del P cuando el P pueda desplazar al As de óxidos y oxihidróxidos de Fe/Mn (Fitz y Wenzel, 2002). Un buen ejemplo de cuánto pueden llegar a reemplazarse uno al otro es el reciente descubrimiento realizado por Wolfe-Simon y col. (2011), al encontrar en las aguas tóxicas de California, una bacteria Halomonadaceae que puede sustituir completamente el P (que hasta la fecha se consideraba indispensable para la vida) con As, llegando incluso a incorporarlo a su ADN.

La concentración de As afecta a la nodulación con bacterias rizobiales. Por ejemplo Reichman (2007), demostró que a medida que la concentración de As aumenta en la DN, se requería más tiempo para formar nódulos, que además aparecieron en menor número durante la cosecha, lo que además está relacionado con la alteración de la expresión de nodulinas (Lafuente y col., 2010).

La presencia de altas concentraciones de As junto con MPs, representa un problema en cuanto la remediación del suelo (Farrell y Jones, 2010), ya que su comportamiento frente a las condiciones del suelo son inversas, como aumentando su biodisponibilidad al intentar inmovilizar MPs al aumentar el pH del suelo.

• **Cadmio (Cd):** Produce fitotoxicidad en leguminosas a partir de 3-10 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS (Davis y Beckett, 1978; Balsberg Pålsson, 1989). En general, el Cd interfiere en la entrada, transporte y utilización de elementos esenciales (Ca, Mg, P y K) y del agua, provocando desequilibrios nutricionales e hídricos en la planta (Poschenrieder y col., 1989; Sandalio y col., 2001; Singh y Tewari, 2003). Las plantas expuestas a suelos contaminados con Cd presentan modificaciones en la apertura estomática, fotosíntesis y transpiración (Sandalio y col., 2001). Uno de los síntomas más extendidos de la toxicidad por Cd es la clorosis producida por una deficiencia de Fe (Benavides y col., 2005), fosfatos o por la reducción del transporte de Mn (Goldbol y Hutterman, 1985). En la planta, el Cd se acumula preferentemente en la raíz, secuestrado en la vacuola de las células. Una vez en la raíz, el Cd puede pasar al xilema a través del apoplasto y/o a través del simplasto formando complejos (Clemens y col., 2002). Sólo una pequeña parte es transportada a la parte aérea de la planta concentrándose en orden decreciente en tallos, hojas, frutos y semillas (Chan y Hale, 2004). Sin embargo, debido a su movilidad en la cadena trófica, el Cd es uno de los MPs más preocupantes, a pesar de sus niveles relativamente bajos en suelos y organismos en comparación con el Zn, Pb, etc.

• **Cobre (Cu):** El nivel crítico de toxicidad en hojas está en torno a $\geq 20 \mu\text{g g}^{-1}$ PS (Kabata-Pendias, 2001). En altas concentraciones es tóxico ya que dispara la generación masiva de radicales libres (Yruela, 2009), induciendo daño en las proteínas, ADN y otras biomoléculas. Su toxicidad causa síntomas cloróticos al interaccionar en la

biosíntesis de la maquinaria fotosintética, necrosis, e inhibición del crecimiento. La toxicidad por Cu puede inducir además deficiencia de Fe (Taylor y Foy, 1985; Bergmann, 1988). Los mecanismos celulares que potencialmente implican tolerancia a altas concentraciones de Cu incluyen reducción de su captura e inmovilización del exceso de Cu en exudados de las raíces, y estimulación del bombeo hacia fuera de la membrana plasmática, quelación con fitoquelatinas, ácidos orgánicos o proteínas.

• **Hierro (Fe):** Elevadas concentraciones de Fe en el citoplasma podrían generar altos niveles de ROS e hidrógeno, debido al intercambio entre Fe^{2+} y Fe^{3+} . El exceso de Fe se acumula en vacuola en forma de ferritina, una proteína sin carga que puede llegar a almacenar más de 4500 átomos de Fe^{3+} en su interior. En el citoplasma aparece a menudo asociado a niconiamina, citrato y fotosideróforos. Otra vía de detoxificación es la complejación con proteínas portadoras, como la transferrina.

• **Manganeso (Mn):** Los valores a partir de los cuales el Mn se considera tóxico está particularmente asociado a la temperatura, de modo que esta aumenta con la temperatura a la que hayan crecido las plantas (Mengel y Kirkby, 2001), establecido de manera general entre 100-800 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS (Davis y Beckett, 1978; Balsberg Pålsson, 1989). Los síntomas de toxicidad son típicamente punteado marrón en hojas maduras y alrededor de áreas cloróticas, y reducción de la síntesis de auxinas (Mengel y Kirkby, 2001). Puede inducir deficiencia de otros elementos como el Fe, Mg o Ca.

• **Plomo (Pb):** Es el más abundante de todos los MPs. A partir de las 5 mg l^{-1} en DN o en el agua del suelo ($\geq 30 \mu\text{g g}^{-1}$ PS en plantas, según la especie), se produce un considerable retraso del crecimiento acompañado de decoloración y anomalías morfológicas (Kabata-Pendias, 2001), habiéndose encontrado referencias específicas para leguminosas que sitúan dicho límite algo más elevado, en torno a 100-200 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS (Meers y col., 2005). La fotosíntesis, la respiración y otros procesos de intercambio metabólico se ven perturbados, así como la asimilación de nutrientes esenciales del suelo (Kabata-Pendias, 2001). Sin embargo, es un elemento de baja movilidad en el

suelo y en plantas, de modo que la inmensa mayoría del Pb que es absorbido por la planta, permanece retenido en raíces. Existe una gran afinidad del Pb con las sustancias húmicas (Bernal y col., 2007). El valor pH juega un papel importante para la disponibilidad del Pb contenido en sus compuestos: cuanto más bajo sea el pH, más alta es su disponibilidad en la solución de suelo (Bernal y col., 2007). Pero, puesto que el Pb es muy poco móvil, permanece en los horizontes superiores como la materia orgánica (MO), por lo que los suelos resultan ser una importante trampa para los compuestos del Pb.

• **Zinc (Zn):** En suelos contaminados, la toxicidad de Zn se produce por encima de 100-300 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS en hojas, y causa clorosis en hojas jóvenes, pudiendo además provocar deficiencias de Fe y Mg debido a su similar radio iónico (Loneragan y Webb, 1993; Kabata-Pendias, 2001), causando clorosis por la degradación de cloroplastos e interferencia con P (Marschner, 1995) con reducción de la producción de biomasa.

Las especies no hiperacumuladoras sufren inhibición del crecimiento (producción de biomasa) cuando la concentración total de Zn en la solución nutritiva ($[\text{Zn}]_{\text{ext}}$) está entre 1,5 y 240 μM (Harmens y col., 1993; Sagardoy y col., 2009; Disante y col., 2010; Lefèvre y col., 2010). Este amplio rango de concentraciones fitotóxicas se debe al diferente comportamiento entre especies, tejidos, tiempos de exposición y composición de la DN.

1.4.5. Combinación de estreses abióticos

En la naturaleza rara vez las plantas se vean afectadas por un único estrés de manera aislada. Sorprendentemente, la ocurrencia simultánea de estreses abióticos ha sido escasamente investigada. Estudios recientes han revelado que la respuesta de plantas a la combinación de dos estreses abióticos diferentes es única y no puede ser directamente extrapolada a partir de la respuesta de la planta a cada estrés diferente aplicado individualmente (Rizhsky y col., 2002; Rizhsky y col., 2004; Mittler, 2006; Shulaev y col., 2008). Por ejemplo, durante circunstancias en las que se solapan

condiciones de altas temperaturas y sequía, las rutas de síntesis de prolina son desviadas hacia otras rutas metabólicas, como la síntesis de sacarosa (Rizhsky y col., 2004; Mittler, 2006; Shulaev y col., 2008), ya que en estas circunstancias, la prolina puede presentar toxicidad al acumularse en las células (Nanjo y col., 2003).

La sequía y el calor son los dos estreses abióticos que más afectan al crecimiento de áreas agrícolas, especialmente en las zonas tropicales. Tanto la sequía como las altas temperaturas causan daños en la integridad de la membrana y peroxidación de lípidos, y la combinación de esos estreses empeora aún más esos desequilibrios fisiológicos. Por ejemplo, el potencial hídrico de plantas de *Jatropha curcas* L. expuestas a sequía y calor fue más alto que el de plantas expuestas únicamente a sequía, y similar al de las expuestas sólo a calor (Silva y col., 2010).

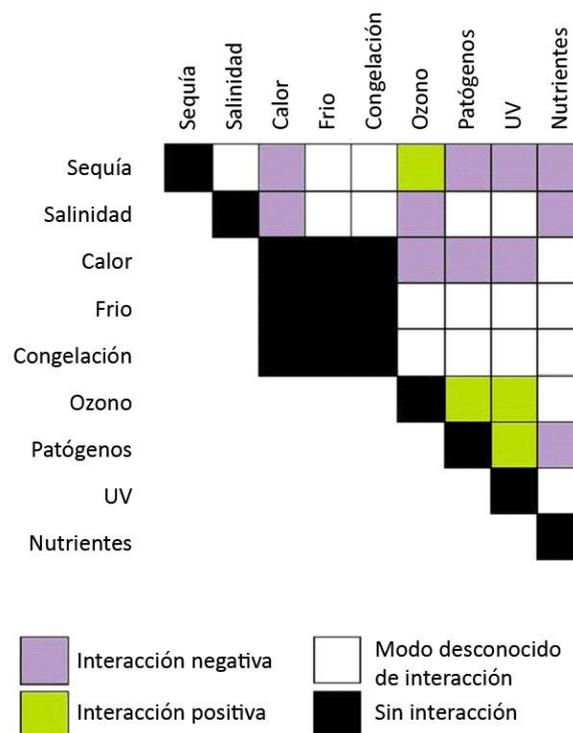


Figura 1.4.5.a.- Matriz de los modos de interacción de los principales estreses que afectan a las plantas (Basado en Mittler, 2006).

Durante calor extremo combinado con alta luminosidad, la primera diana en sufrir consecuencias es la enzima super-óxido-dismutasa Cu/Zn, seguido de la inactivación de PSI por acción de ROS (Choi y col., 2002).

En los suelos sobre los que crece *B. bituminosa*, como en la zona del SE español, se dan condiciones climáticas que pueden llegar a ser extremas para varios factores abióticos de manera simultánea, como puede ser una sequía prolongada, altas temperaturas, y altas intensidades lumínicas ($\text{PAR} > 2000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en verano). Además, en la antigua zona minera de La Unión, el propio suelo, por lo general, pobre en nutrientes, puede suponer para las plantas una fuente de elementos tóxicos, como factores desfavorables adicionales. Considerando la combinación de calor y MPs, Cahoy y Kao (2010), descubrieron que un choque de calor (45°C) mejoró la tolerancia de *Oryza sativa* L. al Cd, por activación del sistema antioxidante.

La tolerancia de *B. bituminosa* también ha sido estudiada frente a la combinación de otros estreses, como la salinidad y el anegamiento (Teakle y Real, 2010), problemas comunes de suelos australianos donde dicha especie se estudia para su utilización como fuente de alimento para ganado.

1.5. Fitotecnologías para la protección de tierras marginales

1.5.1. Contra la erosión y desertificación

Según FAO-PNUMA (1983), la degradación del suelo se define como todo proceso que rebaja la capacidad actual y potencial del suelo para producir, cuantitativa y cualitativamente, bienes y servicios. La degradación del suelo es fundamentalmente la consecuencia directa de su utilización por el hombre, bien por actividades agrícolas, forestales, ganaderas, y agroquímicas, o por acciones indirectas, como son las actividades industriales, eliminación de residuos, transporte, etc.

En las regiones donde se alternan periodos con escasas precipitaciones (P) y elevado potencial de evapotranspiración (PET), con periodos de lluvias torrenciales, la pérdida de suelo supone la manera más importante de degradación y erosión. Los suelos áridos ($P = 100\text{-}400 \text{ mm}$, $P:\text{PET} = 0,06\text{-}0,28$), y semiáridos ($P = 400\text{-}600 \text{ mm}$, $P:\text{PET} = 0,28\text{-}0,45$) (Le Houérou, 1992) con clima mediterráneo ocupan actualmente 3,2 millones de Km^2 , de los cuales 64mil Km^2 de zonas áridas se encuentran en el territorio

español. Especialmente en la Región de Murcia, cada vez existen más terrenos agrícolas abandonados, desprovistos de cobertura vegetal, bajo contenido de MO, y pobre infiltración y retención de agua, lo que propicia que se altere la estructura del suelo, se formen cárcavas y grietas, y se produzcan movimientos de suelo tras la caída de lluvia de manera torrencial (Marques y col., 2007).

La utilización de la vegetación como herramienta para evitar la erosión por la lluvia es una de las alternativas más realistas para frenar la pérdida de suelo en este tipo de clima (Moreno-de las Heras y col., 2009). Las raíces ayudan a formar un entramado en el que el suelo queda retenido, suponiendo además las plantas una barrera física para las aguas de escorrentía en laderas con inclinación. Además, el aporte de MO tanto desde las raíces como de las partes aéreas, ayuda a la formación de compuestos maduros que favorecen la evolución del suelo a estructuras más estables y una mayor retención de agua, que a su vez propicia la aparición de más vegetación.



Fotografías 1.5.1.- *Atriplex halimus* creciendo sobre un “esteril” de suelo contaminado por MPs (izquierda) en la Sierra Minera de La Unión, resultado de actividades mineras en La Esperanza (derecha).

Dentro de la flora murciana existen especies bien adaptadas a estas condiciones edáficas y climáticas que pueden ser utilizadas para ralentizar el proceso erosivo sin la necesidad de la utilización de especies foráneas. Una elevada tolerancia a sequía, altas temperaturas y salinidad, en especies como *Atriplex halimus*, ha permitido que dichas especies vegetales resulten una de las vías más efectivas para la rehabilitación de paisajes áridos y semiáridos (Le Houérou, 1992). Marqués y col. (2005), describieron

cómo el cultivo de *A. halimus* y/o la aplicación de lodos de vertidos descendieron tanto la escorrentía como la pérdida de sedimentos tras un evento de lluvia simulada. También se han realizado estudios para evaluar la aplicabilidad de *B. bituminosa* como vegetación arbustiva natural que participa en la reducción de la erosión del suelo, como por ejemplo tras incendios espontáneos (Andreu y col., 1995), jugando además un papel importante debido a su capacidad fijadora de N₂.

1.5.2. Suelos contaminados por MPs

Los suelos antropogénicos están caracterizados por una gran heterogeneidad, valores extremos de densidad, basta textura, alta permeabilidad al agua, generalmente alto pH, escasez de nutrientes, y presencia de contaminantes (Cardinale y col., 2010). La contaminación del suelo consiste en la acumulación de sustancias tóxicas en concentraciones que modifican negativamente sus propiedades, causando la pérdida parcial o total de la productividad del suelo.

Las propiedades físicas, químicas, y biológicas del suelo actúan como un reactor protector de otros medios más sensibles frente a elementos contaminantes, a través de su poder de amortiguación o capacidad natural de depuración de la contaminación. Desafortunadamente, el poder de amortiguación del suelo no es ilimitado, y cuando se rebasa, el suelo deja de actuar como sumidero eficaz de la contaminación, llegando incluso a convertirse en una fuente de contaminación para los organismos del suelo y para el medio circundante.

Tabla 1.5.2.- Valor límite de concentración de MPs en los suelos ($\mu\text{g g}^{-1}$ de PS) según el Real Decreto 1310/1990, de 29 de octubre (BOE núm. 262 de 01-11-1990), y la Ley Europea Nº L 181/6 Council Directive del 12 Junio 1986; BOE 2005).

	Real Decreto 1310/1990.		Ley Europea Nº L 181/6 Council Directive. (pH 6-7)
	Suelos pH <7	Suelos pH >7	
Cd	1	3	1-3
Cu	50	210	50-140
Ni	30	112	30-75
Pb	50	300	50-300
Zn	150	450	150-300
Hg	1	1,5	1-1,5
Cr	100	150	-

El grado de contaminación de un suelo no puede ser estimado exclusivamente a partir de los valores totales de los contaminantes frente a determinados valores de referencia. Al hablar de contaminación por MPs hay que tener en cuenta su especiación (Mulligan y col., 2001; Bernal y col., 2007), la cual determina decisivamente su distribución, movilidad en el suelo y agua, y su biodisponibilidad y toxicidad. La biodisponibilidad de un metal está determinada por la competencia entre el sistema radicular de la planta, la solución del suelo y la fase sólida del suelo (Sposito, 1989). En términos prácticos, la biodisponibilidad se expresa como las concentraciones obtenidas mediante el uso de diversos extractantes capaces de adquirir las distintas fracciones en función de su grado de disponibilidad para las plantas (McGrath y Cegarra, 1992), como son el agua (extracción del agua de poro), diluciones de sales neutras (CaCl_2 , NaNO_3), EDTA, DTPA, etc. La determinación de las distintas fracciones de MPs en el suelo se ve muy influenciada por las condiciones físico-químicas del suelo, como el pH y el potencial redox. A alto pH, la solubilidad e los MPs es baja, pero la de As es mayor. Por otro lado, los constituyentes orgánicos e inorgánicos del suelo condicionan los mecanismos de retención de MPs por adsorción, complejación y precipitación. Por ejemplo, el Cu muestra una elevada asociación con la MO, y el P y los óxidos y oxihidróxidos de Fe y Mn influyen sobre el As disponible (Bernal y col., 2007; 2009).

1.5.2.1. La antigua zona minera de La Unión

En las zonas semiáridas, además de las dificultades que presentan las plantas para desarrollarse en este tipo de ambientes, la presencia de elementos contaminantes en concentraciones que puedan ser perjudiciales supone un factor que afecta de forma directa a la vegetación, induciendo su degradación, reducción del número de especies presentes en ese suelo, y más frecuentemente la acumulación de contaminantes en las plantas. Un ejemplo de este tipo de situación es la que se da en la Sierra Minera de Cartagena-La Unión en la Región de Murcia.

Se trata de una formación montañosa que se extiende a lo largo de 25 km de costa desde Cartagena hasta el Cabo de Palos, pasando por el término municipal de La Unión. Forma parte de la Cordillera Bética, surgida en el Terciario durante la denominada orogenia alpina por subducción de la placa tectónica africana bajo la europea. Hace unos siete millones de años, numerosas erupciones volcánicas (que crearon las islas del Mar Menor y la Isla Grosa) generaron potentes procesos hidrotermales en los que el agua, con minerales disueltos procedente del interior de la tierra, precipitó estos minerales en las fallas y cavidades de la sierra creando ricos filones minerales. De la transformación estos minerales, como la galena, la blenda, la pirita, la calcopirita y la magnetita, se han producido en diferentes épocas la extracción de grandes cantidades de hierro, plata, plomo, y zinc.

El control sobre estos recursos mineros fue una de las principales causas del establecimiento de los cartagineses en el sur de España y de la posterior ocupación romana (ciudad de Carthago Nova, actual Cartagena) hasta que a finales del siglo I dejara de ser productiva. En el siglo XIX comenzó de nuevo la explotación intensiva de las minas de Cartagena y, con ella, empezó a desaparecer la antigua cubierta vegetal. Este problema se agravó especialmente cuando, a partir de 1952, la empresa Peñarroya generalizó la apertura de explotaciones a cielo abierto provocando graves problemas medioambientales por la pérdida de suelo y la generación de ingentes cantidades de estériles. Dichos residuos eran vertidos en forma de fangos por la empresa directamente al mar en la bahía de Portmán (<http://www.portman.org.es/minfo.html> 22/02/2012). Cuando se produjo el cese

definitivo de la explotación de las minas en 1990, habían desaparecido 50 Km² de terreno convertidos en un estéril paisaje lunar, una bahía completamente colmatada por 33 millones de m³ de residuos tóxicos, una línea de costa que había avanzado 700 metros sobre el mar, y un fondo marino en el que los sedimentos cargados de MPs llegaban hasta 12 kilómetros mar adentro.



Fotografía 1.5.2.1.- Paisaje de la Sierra Minera de La Unión desde El Llano del Beal (izquierda) y zona boscosa afectada por un incendio (Agosto 2011) cerca de El Gorguel (izquierda).

Por sus valores geológicos e histórico-industriales, así como por la intensa transformación del paisaje generada por la actividad minera, la sierra ha sido declarada Bien de interés cultural (BIC) por Decreto de 30 de abril de 2009 del Consejo de Gobierno de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia, con categoría de sitio histórico. A pesar del tremendo impacto ecológico generado por las labores mineras, la sierra conserva aún importantes valores naturales, por lo que fue protegida con las categorías de Parque Natural y LIC (Lugar de Importancia Comunitaria), ha sido propuesta su declaración como reserva de la biosfera por la Unesco, y contiene a una Zona de Especial Protección para las Aves (ZEPA). En ella confluyen especies de diferentes procedencias que conforman uno de los patrimonios vegetales más importantes de la Península Ibérica, incluyendo:

- Iberoaffricanismos como *Tetraclinis articulata* (ciprés de Cartagena), *Maytenus senegalensis* (arto), *Withania frutescens* (oroval), *Ziziphus lotus* (azufaifo), *Periploca angustifolia* (cornical), *Caralluma europaea* (chumberillo de lobo), etc.

- Endemismos como la *Narcissus tortifolius* (varica de San José), *Helianthemum almeriense* (jarilla) o *Limonium insigne* (siempreviva morada), y endemismos exclusivos del Campo de Cartagena, como *Cistus heterophyllus* sp. *carthaginensis* (jara de Cartagena), *Limonium carthaginense* (siempreviva de Cartagena), *Sideritis marmironensis* (rabogato), y *Teucrium carthaginense* (zamarrilla de Cartagena).
- Especies típicas del bosque mediterráneo, como *Pinus halepensis* (pino carrasco), *Pistacia lentiscus* (lentisco), *Quercus coccifera* (chaparra), *Quercus ilex* (carrasca) o *Chamaerops humilis* (palmito).

1.5.2.2. Remediación de suelos contaminados por MPs

La “fitorremediación/fitorrecuperación” de suelos contaminados es un tratamiento natural, limpio y económico, basado en el uso conjunto de plantas, enmiendas del suelo y técnicas agronómicas, para eliminar, retener, o disminuir la toxicidad de los contaminantes de suelo (Chaney y col., 1997). Se basa principalmente en la reducción de la biodisponibilidad de contaminantes en el suelo (Salt y col., 1998). De acuerdo con Wenzel y col. (1999), se pueden distinguir seis procesos básicos por los que las plantas pueden ser empleadas en la recuperación de suelos y aguas contaminadas, clasificadas como de *contención* (fitoestabilización y fitoimmobilización) o *eliminación* (fitoextracción, fitodegradación, fitotransformación y rizofiltración) de contaminantes. Por otro lado, las propias plantas realizan una retención del suelo por sus raíces, ya que evitan la erosión del suelo y la dispersión de los contaminantes. A este tipo de retención física se le denomina fitoestabilización (Wenzel y col., 1999). La fitoimmobilización, definida como retención química, es la reducción de la “disponibilidad” de los metales en el suelo, mediante adsorción o absorción, precipitación o quelación en las raíces o en la rizosfera (Bernal y col., 2007 página web revistaecosistemas). Para fomentar este proceso se utilizan plantas y enmiendas para alterar el estado **fisicoquímico** de los MPs en el suelo, reduciendo su movilidad y disponibilidad para animales y plantas.

Tabla 1.5.2.2.a.- Definiciones de las principales técnicas usadas en fitorremediación. En marrón aparecen las técnicas de contención, en azuladas las de eliminación, y en verde la atenuación natural asistida (basado en Wenzel y col., 1997; Bernal y col., 2007).

Principales tecnologías utilizadas en fitorecuperación de suelos	
Fitoimmobilización	Uso de plantas para reducir la biodisponibilidad de los contaminantes por absorción o adsorción, precipitación o quelación en la raíz o rizosfera.
Fitoestabilización	Estabilización física del suelo, para disminuir el riesgo de la transferencia del contaminante vía erosión o lavado.
Fitoextracción	Uso de plantas acumuladoras de contaminantes para retirarlos del suelo al absorberlos y concentrarlos en la parte cosechable.
Fitotransformación	Conversión de un compuesto tóxico en formas que no lo sean, en ciertos casos formas volátiles (Fitovolatilización).
Fitodegradación	Uso de plantas y microorganismos asociados para degradar contaminantes orgánicos.
Rizofiltración	Uso de raíces para absorber y adsorber contaminantes del agua y de otros afluentes acuosos.
Atenuación natural asistida	Aceleración del proceso natural de colonización de la flora endémica mediante el uso de enmiendas.

La recuperación de antiguos suelos mineros es a menudo muy complicada debido a los desniveles del terreno, empeorado por una pobre retención del agua, o controversialmente, inundación (Schnoor, 1997). Además, la heterogeneidad temporal y espacial de factores como solubilidad de MPs y pH pueden inhibir fuertemente el establecimiento de una cobertura vegetal (Clemente y col., 2003). La ausencia de una gran biomasa y de especies acumuladoras de MPs adaptadas a condiciones semiáridas hace que la fitoextracción de MPs y As desde el suelo sea una opción inviable para regiones mediterráneas. Debido a su capacidad para fijar N₂ atmosférico y mejorar la fertilidad del lugar, las especies de la familia Fabaceae son particularmente de interés para la revegetación de sitios contaminados, los cuales son normalmente muy pobres en nutrientes (Tordoff y col., 2000; Frérot y col., 2006; Reichman, 2007).

Estas técnicas “biológicas” o “phyto” suelen ser más limpias que las técnicas “in situ” o “ex situ” físicas (modificación de la topografía superficial, incineración, tratamiento termal, electromigración, lavado, vitrificación) y químicas (neutralización, precipitación, intercambio de iones, lavado del suelo (Bernal y col., 2007)), ya que no usan ningún reactivo químico peligroso, no alteran negativamente el suelo, y son bastante más económicas, además de crear una superficie verde que da lugar a un impacto visual positivo del paisaje. Sin embargo a veces la revegetación es lenta y los contaminantes del suelo quedan en el suelo (excepto en el caso de fitoextracción).

Para llevar a cabo tareas fitoremediadoras “in situ”, es aconsejable utilizar enmiendas orgánicas para mejorar las propiedades del suelo, principalmente debido a que aunque estas no disminuyan la concentración de MPs en el suelo, reducen su biodisponibilidad por su secuestro a fracciones asociadas a la MO (Clemente y col., 2006a), carbonatos u óxidos metálicos, y por el efecto sobre el pH, potencial redox, etc. (Bernal y col., 2007), además de mejorar las propiedades físicas del suelo. Para ello se pueden usar residuos orgánicos procedentes de agricultura o ganadería, cuya utilización y reciclado representa un problema a gran escala, dadas las grandes cantidades producidas mundialmente, y cuya utilización supone un sistema de revalorización de dichos productos. De manera aproximada, sólo en los EEUU se generan diariamente 45,4 Mt de abono de vaca y 27 Mt de residuos a partir de explotaciones porcinas (Walker y col., 1997). En la Región de Murcia, unas 2100

explotaciones ganaderas generan 9 millones de $\text{m}^3 \text{año}^{-1}$ de purín líquido (según “Estudio del aprovechamiento energético de la biomasa utilizando los resultados de los proyectos SIOSE de la Región de Murcia 2011) (SIOSE= Sistema de Información de Ocupación del Suelo de España).



Fotografías 1.5.2.2.- Compost de alperujo añadido a un suelo contaminado en San Ginés de la Jara (izquierda) y purín líquido de cerdo (derecha).

Otro residuo es el alperujo, residuo producido durante la extracción de aceite por sistemas de centrifugación de dos fases, altamente rico en nutrientes, especialmente K (Alburquerque y col., 2004, 2011). Este es generado en enormes cantidades, especialmente en el área Mediterránea, con una producción anual en España de 4 Mt (Probiogas Project 1 de agosto 2011). Sólo se producen 5,7 Mt de compost a partir de los residuos que se generan en la UE, habiéndose calculado que se podrían generar 24 Mt cada año (EC DG Environment, 2004). Debido a su altos niveles de polifenoles potencialmente fitotóxicos, el alperujo necesita ser tratado, como puede ser mediante compostaje, antes de su aplicación en el suelo (Bernal y col., 2007). Este tipo de compost está incluido en el grupo de enmiendas de mayor calidad según la legislación española ($\text{Cd}<0,7$, $\text{Cu}<70$, $\text{Pb}<45$ y $\text{Zn}<200 \text{ mg Kg}^{-1}$)(BOE 2005) en relación a las concentraciones de MPs de compost y fertilizantes a partir de residuos.

A pesar de que las cantidades de MPs aportadas por ciertas enmiendas pudieran ser elevadas para uso agrícola, hay que tener en cuenta que estos pueden ser válidos en suelos cuyo problema es la altísima concentración de estos MPs. Según la siguiente tabla, el compost y el purín utilizados en el Capítulo IV, podrían incluirse en la clase A de productos fertilizantes para ser utilizables en la agricultura y jardinería española.

Tabla 1.5.2.2.b.- Límites de concentración de MPs aplicables, según la Orden PRE/630/2011, de 23 de marzo, por la que se modifican los Anexos I, II, III, IV, V y VI del Real Decreto 824/2005, de 8 de julio, sobre productos fertilizantes elaborados con residuos y otros componentes orgánicos.

	Sólidos: mg kg ⁻¹ de materia seca		
	Líquidos: mg kg ⁻¹		
	Clase A	Clase B	Clase C
Cadmio	0,7	2	3
Cobre	70	300	400
Níquel	25	90	100
Plomo	45	150	200
Zinc	200	500	1000
Mercurio	0,4	1,5	2,5
Cromo (total)	70	250	300
Cromo (VI)	No detectable según el método oficial		

Los principales efectos de la MO aportada por enmiendas de este tipo en el suelo son la formación de agregados, aumento de la capacidad de campo (Water holding capacity, WHC), incremento de la capacidad de cambio de cationes (CCC), formación de quelatos, oscurecimiento y calentamiento, reducción de la densidad, aumento de la capacidad tamponante, y aporte de nutrientes (Bernal y col., 2007). Pero el factor clave de la utilización de enmiendas es que su aplicación se ve reflejada positivamente en la producción de biomasa por parte de la flora, tanto por disminuir la biodisponibilidad de contaminantes, como por el propio aporte de nutrientes y MO (Bernal y col., 2007, 2009). Por lo tanto, la aplicación de enmiendas mejora la retención de suelo y evita la erosión de manera indirecta. En suelos contaminados, las sustancias húmicas del compost maduro forman complejos insolubles con los MPs, reduciendo su biodisponibilidad para las plantas, mientras que la fracción de ácidos fulvicos, proteínas, ácidos orgánicos y carbohidratos del purín de cerdo mantienen a los MPs en la solución mediante la formación de compuestos órgano-metálicos de bajo peso molecular (Bernal y col., 2009).

La atenuación natural, también llamada recuperación pasiva o intrínseca, se trata de un método de recuperación de suelos y aguas contaminadas de bajo coste (Mulligan y Yong, 2004), pero es un tratamiento mucho más lento que los que utilizan tecnologías ingenieriles (Mulligan y col., 2001). De acuerdo con la US EPA (1998), la

atenuación natural consiste en utilizar procesos naturales para contener la propagación de la contaminación procedente de los vertidos químicos y reducir la concentración y la cantidad de los agentes tóxicos en las zonas contaminadas.

A pesar de sus numerosas ventajas, conviene ser consciente de los posibles problemas asociados al uso de enmiendas (orgánicas o inorgánicas) en suelos contaminados:

- a) La adición de nutrientes minerales puede afectar significativamente a la disponibilidad de MPs y As del suelo (Lorenz y col., 1994): la adición de N, P y K aumenta la disponibilidad de As (Woolson, 1972).
- b) Movilización de contaminantes a corto (materia fresca de bajo grado de humificación) o largo plazo (descomposición de complejos metalo-orgánicos).
- c) Aumento de la salinidad (CE) debido al empleo de altas dosis de enmiendas.

En la rizosfera, las raíces y la actividad microbiana pueden influir en la movilidad de iones metálicos y su captura por plantas como consecuencia de alteraciones del pH del suelo (Hinsinger y Courchesne, 2008). Este es un ejemplo del papel fundamental de los microorganismos en la recuperación de los suelos contaminados. Por otro lado, la inoculación de plantas leguminosas con una cepa de bacteria fijadora tolerante a los contaminantes del suelo podría ser necesaria, ya que en algunos suelos contaminados se ha visto que los rizobios son incapaces de formar nódulos efectivos (McGrath y col., 1988) como sucede en suelos con alta concentración de As en los que se la infección de la raíz por la bacteria (Pajuelo y col., 2008; Lafuente y col., 2010). Sin embargo, existen cepas de *Rhizobium* encontradas en suelos contaminados y resistentes a MPs y/o As (Delorme y col., 2003; Carrasco y col., 2005). También hay que tener en cuenta que los suelos contaminados son con frecuencia pobres en P, por lo que la fijación de N₂ podría estar limitada por un suministro inadecuado de este elemento a los nódulos (Rotorn y Sindair, 2009).

2. OBJETIVOS

El objetivo fundamental de esta tesis doctoral es el estudio y comparación del comportamiento de diferentes poblaciones y variedades de la especie *Bituminaria bituminosa* frente a distintos estreses abióticos, especialmente sequía y altas concentraciones de MPs. Se trata de una planta leguminosa de zonas con clima Mediterráneo, con usos tanto tradicionales como potenciales, y su aparición natural en suelos contaminados por MPs y pobres en nutrientes justifica su estudio.

Todos los análisis llevados a cabo están relacionados con la fisiología vegetal, habiéndose estudiado mecanismos fisiológicos, anatómicos y morfológicos de la adaptación (tolerancia/resistencia) de *B. bituminosa* a los estreses ambientales a los que está expuesta en su entorno natural, en singular y simultáneamente. Para esto, se estudiaron las respuestas de las plantas a sequía y MPs en ensayos a tres niveles distintos de experimentación: en disolución nutritiva (cultivo hidropónico), en macetas con suelo, y en el campo a mayor escala. El cultivo hidropónico permite el estudio de los parámetros fisiológicos en condiciones controladas (estreses individualizados que afectan a las raíces), mientras que los ensayos en maceta en cámara de cultivo pueden considerarse como una escala piloto antes proceder al campo, donde las plantas están expuestas a la interacción de distintos estreses abióticos (por ejemplo, MPs y/o sequía con calor y alta intensidad lumínica).

Para ello se llevarán a cabo en los siguientes objetivos:

a) Analizar las principales respuestas fisiológicas para el mantenimiento del crecimiento durante condiciones de **sequía**, con el fin de comprender a qué se deben las diferencias entre cuatro poblaciones de *B. bituminosa* (variedades *albomarginata* y *crassiuscula* procedentes de las Islas Canarias, y dos poblaciones peninsulares de la variedad *bituminosa*) que previsiblemente muestren distinto comportamiento frente a sequía por su distinto lugar de procedencia, con respecto a plantas control. Estos ensayos se describen en Capítulos I, II, y III.

b) Estudiar la capacidad de supervivencia, desarrollo de biomasa radicular y foliar, y absorción y acumulación de **metales pesados** por parte de plantas de *B. bituminosa* en medios contaminados por dichos elementos (disolución nutritiva y suelos) para su potencial utilización en tareas fitorremediadoras, comparando poblaciones procedentes de suelos limpio y contaminado por MPs. Estos ensayos se describen en Capítulos IV, V y VI. Ya se ha estudiado el empleo de plantas arbustivas de leguminosas propias de suelos mediterráneos para la rehabilitación de suelos degradados por la acción humana (Cardinale y col. 2010), ya que esta familia aporta la ventaja adicional de poseer la capacidad de fijar N₂ atmosférico mediante relaciones simbióticas con bacterias del suelo, lo que contribuiría al aumento de nutrientes disponibles para otras especies, uno de los principales problemas de este tipo de suelos (Tordoff y col., 2000; Walker y col. 2007). El compost y el purín son buenos agentes para mejorar la estructura del suelo, situándose en un nivel de aplicabilidad mayor que otras enmiendas (Clarke y Stephen, 2011), por lo que también será fruto de estudio el efecto de dichas enmiendas del suelo sobre el crecimiento de *B. bituminaria* en suelos contaminados por MPs.

c) Comprobar cómo se ven afectadas las concentraciones de FCs en distintos órganos de *B. bituminosa* en función del estrés al que las plantas estén sometidas, buscando aquellos que permitan estimular su acumulación.

d) Considerar la posible mejora de la aplicabilidad de *B. bituminosa* mediante la inoculación con cepas de **rizobios** que le confieran ventajas frente a los dos anteriores estreses. Este aspecto es especialmente novedoso, porque a pesar del interés en *B. bituminosa* por distintos motivos, existe muy poca información en relación con las bacterias fijadoras del nitrógeno que forman nódulos en sus raíces. Estos ensayos se describen en el Capítulo VII.

Los resultados obtenidos no sólo serán de interés estrictamente fisiológico, sino que se pretende que todos ellos puedan ampliar en parte el conocimiento de su biología, para su posterior aplicación en tareas ambientales (la revegetación de suelos contaminados, en zonas de clima semiárido), agrícolas (producción de forraje en estaciones de escasez) y comerciales (producción de FCs).



OBJETIVOS

73

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral, se utilizaron plantas de diferentes poblaciones y de distintas variedades de la especie *Bituminaria bituminosa*. Esta terminología resulta en ocasiones confusa, y distorsiona la identidad de cada intrataxón, por lo que conviene recordar que existen tres variedades dentro de la especie, con múltiples poblaciones para cada una de ellas, habiéndose estudiado aquí únicamente una población para las variedades *albomarginata* y *crassiuscula*, y diferentes poblaciones para la variedad *bituminosa*.

Tabla 3.- Poblaciones de *B. bituminosa* estudiadas en esta tesis doctoral.

Variedad	Plantas origen de semillas		Origen				Tª media meses más fríos y calurosos (°C)
	(Posición en parcela experimental IMIDA)	Población	Localidad	Co-ordenadas (N, O)	Precipitación Anual (mm)	Altitud (msnm)	
<i>ENSAYOS SEQUÍA</i>							
<i>albomarginata</i>	Fila 52-planta 4	Famara	Lanzarote	29°07',13°31'	150-350	600	11,1/22,8
<i>crassiuscula</i>	Fila33-planta 11	Boca de Tauce	Mt. Teide, Tenerife	28°14',16°34'	165-500	2200	4,0/17,4
<i>bituminosa</i>	Fila7-planta 8	Llano del Beal	Llano del Beal, Murcia	37°36',00°47'	200-400	300	9,7/26,1
<i>bituminosa</i>	Fila9-planta 14	La Perdiz	Sierra Espuña, Murcia	37°52',01°35'	200-350	850	5,9/25,8
<i>ENSAYOS METALES PESADOS</i>							
<i>bituminosa</i>	Semilla silvestre	Mijas LA	Mijas, Málaga	36°35',04°38'	400-600	1000	6,1/28,1
<i>bituminosa</i>	Semilla silvestre	C2	La Esperanza, Murcia	37°37',00°50'	200-400	200	9,7/26,1

El material vegetal utilizado en todos los ensayos de esta tesis procedía de semillas, recolectadas directamente de plantas localizadas en las propias poblaciones estudiadas, o bien a partir de plantas cultivadas en la estación experimental del IMIDA. Estas últimas fueron seleccionadas por su buen comportamiento frente a la sequía estival y procedían de un cribado selectivo realizado anteriormente por el equipo de Cultivos Alternativos, según su distinto potencial para el forraje (biomasa producida por planta entre mayo y septiembre 2005) (Correal y col., 2008).

Todas crecen vegetativamente en el otoño-invierno y florecen en la primavera, excepto la variedad *crassiuscula*, que se comporta como un hemicriptófito con las yemas de reemplazo a ras de suelo, que pierde las hojas en los inviernos fríos (a 2200 m de altitud) y crece y florece durante primavera-verano.

3.1. Condiciones para los ensayos

Los suelos que fueron seleccionados para este trabajo fueron recogidos a partir de tres lugares diferentes. El primero se trata de un suelo limpio de MPs, procedente de la finca experimental de IMIDA, denominado como La Alberca (LA). Los otros son dos suelos contaminados por MPs. El suelo Llano del Beal (LB) presenta mayores concentraciones de MPs que el otro suelo contaminado San Ginés de la Jara (SG) (ver tabla 3.1.a.).

Las enmiendas empleadas en la sección de MPs se corresponden con un compost de alperujo, un purín líquido de cerdo, cal y fertilizante inorgánico (ver Tabla 3.1.b.).

Tabla 3.1.a.- Características de los **suelos** empleados en los ensayos y su concentración de MPs totales (AST= American Soil Taxonomy (Soil Survey Staff, 2010); CCC= Capacidad de cambio de cationes; CE= Conductividad Eléctrica).

Parámetro	Suelo		
	La Alberca (LA)	Llano del Beal (LB)	San Ginés (SG)
Clasificación (AST)	Haplocalcid Xérico	Torriorthent Xérico	Petrocalcic Xérico
WHC (%)	34,9	32,7	40,8
Textura:	Franco-arenosa	Arenoso-franca	Franco-arenosa
arena (> 0,02 mm) (%)	62,9	79,4	56,7
limo (0,002-0,02 mm) (%)	22,3	15,4	23,6
arcilla (< 0,002 mm) (%)	14,8	5,2	19,7
CCC (cmol Kg ⁻¹)	8,45	6,90	14,1
pH (pasta saturada)	7,46	6,94	7,60
CE (1:5) (dS m ⁻¹)	1,72	2,70	0,15
CaCO ₃ (%)	23,7	2,12	19,51
N Total (µg g ⁻¹)	1,85	0,40	0,90
C Orgánico (µg g ⁻¹)	14,1	1,30	22,5
As (µg g ⁻¹)	15	664	65,4
Cd (µg g ⁻¹)	-	19	<0,01
Cu (µg g ⁻¹)	33	193	28
Fe (mg g ⁻¹)	17	108	36
Mn (µg g ⁻¹)	334	4073	6774
Pb (µg g ⁻¹)	52	10188	651
Zn (µg g ⁻¹)	69	9686	632
P disponible (µg g ⁻¹)	6,76		
K disponible (µg g ⁻¹)	250,2		
Na disponible (µg g ⁻¹)	29,9		
Ca disponible (µg g ⁻¹)	1460		
Mg disponible (µg g ⁻¹)	263		

Tabla 3.2.b.- Características de las **enmiendas** usadas en los ensayos con suelos contaminados por MPs. El purín se analizó en estado fresco. MO = Materia Orgánica; COT = Carbono Orgánico Total; NT = Nitrógeno Total.

Parámetro	Enmiendas			
	Compost	Purín	Cal	Fertilizante
pH	8,83 (1:10 extracto acuoso)	7,76	-	-
CE (dS m ⁻¹)	6,12 (1:10 extracto acuoso)	24,3	-	-
Humedad (%)	11	97,37	0	-
CaCO ₃ (%)	7	-	-	-
MO (%)	73,09	1,05	-	-
Lignina (%)	38,72	-	-	-
COT	438,6(g Kg ⁻¹)	11,21 (g l ⁻¹)	-	-
C hidrosoluble	-	4,26 (g l ⁻¹)	-	-
C extraíble	-	4,36 (g l ⁻¹)	-	-
NT	31,7 (g Kg ⁻¹)	3,98 (g l ⁻¹)	-	-
N-NH ₄ ⁺	119 (g Kg ⁻¹)	3,15 (g l ⁻¹)	-	-
P total	4,95 (g Kg ⁻¹)	0,541 (g l ⁻¹)	-	57,9 (g Kg ⁻¹)
CaO+ MgO (%)	-	-	>95	-
MgO (%)	-	-	<2,5	-
Finura (%)				
>0,09 mm	-	-	<1	-
>0,2 mm	-	-	<0,1	-
K	43,4 (mg g ⁻¹)	3,51 (g l ⁻¹)	-	71,4 (mg g ⁻¹)
Ca	38,9 (mg g ⁻¹)	0,69 (g l ⁻¹)	-	5,49 (mg g ⁻¹)
Mg	7954 (μg g ⁻¹)	382 (mg l ⁻¹)	-	2800 (μg g ⁻¹)
Na	4998 (μg g ⁻¹)	1067 (mg l ⁻¹)	-	3770 (μg g ⁻¹)
S	6160 (μg g ⁻¹)	342 (mg l ⁻¹)	-	-
Fe	1620 (μg g ⁻¹)	45,0 (mg l ⁻¹)	-	991,6 (μg g ⁻¹)
Cu	48 (μg g ⁻¹)	12,1 (mg l ⁻¹)	-	47,3 (μg g ⁻¹)
Mn	92 (μg g ⁻¹)	11,3 (mg l ⁻¹)	-	13,73 (μg g ⁻¹)
Zn	141 (μg g ⁻¹)	116 (mg l ⁻¹)	-	120,2 (μg g ⁻¹)
Pb	36 (μg g ⁻¹)	0,941 (mg l ⁻¹)	-	0,78 (μg g ⁻¹)
Cd	nd	<0,001 (mg l ⁻¹)	-	6,74 (μg g ⁻¹)
Al	1286 (μg g ⁻¹)	15,0 (mg l ⁻¹)	-	-
As	1,7 (μg g ⁻¹)	<0,01 (mg l ⁻¹)	-	3,14 (μg g ⁻¹)

3.2. Determinaciones analíticas referentes a plantas

3.2.1. Biomasa

Tras un lavado con agua destilada, con el material vegetal se midió el Peso Fresco (PF) de toda la parte aérea. A continuación, se deshidrataron en una estufa a 65°C (2 días) para posterior medida del Peso Seco (PS) y análisis de compuestos inorgánicos. Para muestras que iban a ser analizadas respecto compuestos orgánicos, se optó por la utilización de un liofilizador. Una vez que las muestras estuvieron totalmente deshidratadas, se molieron mediante un molinillo refrigerado, y se almacenaron en tubos de 10 ml en el congelador hasta su posterior análisis. Las muestras que fueron expuestas a MPs, tanto hojas, como frutos o raíces, fueron lavadas 1 minuto en agitación con 0,1% Tritón X100 y enjuagadas cuatro veces con agua destilada. Además, en el caso de las raíces, se sumergieron 30 s en 0,1 mM SrCl₂ para desplazar los MPs del apoplasto (Lutts y col., 2004).

3.2.2. Tasa de Crecimiento Relativa (TCR)

La Tasa de Crecimiento Relativa (RGR = Relative Growth Rate) fue calculada teniendo en cuenta el PS de la parte aérea en dos fechas diferentes, de modo que se pudo calcular la cantidad de biomasa que cada planta es capaz de producir a partir de un gramo de PS cada día ($\text{g g}^{-1}\text{PS día}^{-1}$).

3.2.3. CCC (Capacidad de Cambio de Cationes)

Se lavan las raíces en agua destilada y se incuban 1,0-1,2 g de raíz fresca en 1 M NH₄OAc 2 veces durante 3 minutos (10 ml por cada g de PF). A continuación se lavan de nuevo 3 veces con agua destilada y se incuban 2 veces en 1 M KCl (10 ml por g PF), dando un volumen final del extracto de 20 ml por g PF. Se lavan con otros 4 ml de KCl y se enrasa en un matraz aforado de 25 ml. La CCC ($\text{mmol g}^{-1}\text{PF raíz}$) se estimó tras la determinación del NH₄ (Chamuah y Dey, 1982; Bräutigam y col., 2007).

3.2.4. Relaciones hídricas

3.2.4.1. Potencial hídrico del xilema de la hoja a mediodía (Ψ_w)

Para la determinación del Ψ_w en bares se siguió el procedimiento descrito por Walker y col. (2010), utilizando una cámara de presión Scholander "PMS instrument 06 Corvallis, Oregon USA MODEL 600". Este expresa la fuerza con la que la planta retiene el agua. Una hoja elegida al azar de cada réplica de cada variedad y tratamiento, fue aislada de la luz durante al menos dos horas antes de la medida (y al menos 2 h después del alba) con bolsitas opacas para que el Ψ_w de la hoja fuera el mismo que el de la planta (McCuthen y Shackel, 1992). Dichas hojas fueron cortadas e introducidas en la cámara una a una con el peciolo hacia fuera ajustado herméticamente. Los datos obtenidos en bares, registrados a la presión dada por el manómetro justo cuando aparece la primera gota de agua en el peciolo al administrar presión, fueron transformados posteriormente a MPa (1bar = -0,1 MPa).

3.2.4.2. Potencial osmótico (Ψ_s)

Una vez medido el Ψ_w , las mismas hojas usadas para la medida del Ψ_w se mantuvieron en el congelador hasta que fueron utilizadas en la determinación de la presión osmótica, en moles Kg^{-1} , con el osmómetro VAPRO 5520 (Wescor Inc., South Logan, Utah, USA). Para la conversión de los datos desde moles Kg^{-1} en MPa se utilizó la ecuación de Van't Hoff:

$$\text{Potencial osmótico: } \Psi_s = -RTC$$

$$\text{donde } R = 8,32 \cdot 10^{-6} \text{ (MPa m}^3\text{/mol K)} = 8,32 \cdot 10^{-3} \text{ (MPa l/mol K)}$$

$$T = 293\text{K (20}^\circ\text{C)}$$

$$C = \text{mo}/V ; \text{mo} = \text{medida en mmol Kg}^{-1} \text{ del osmómetro ; } V = \text{volumen.}$$

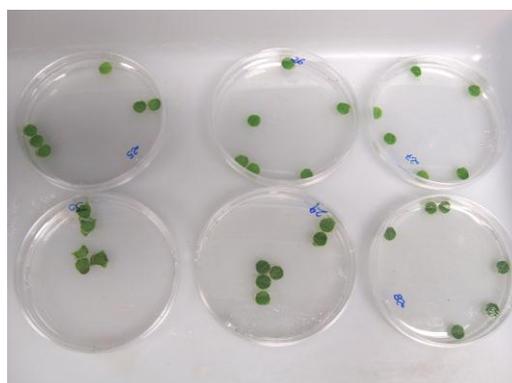
$$\rightarrow \Psi_s = -(8,32 \cdot 10^{-3}) \cdot 293 \cdot (\text{ns}/1000) = -0,002438 \cdot (\text{osmómetro en mmol Kg}^{-1})$$

3.2.4.3. Potencial de turgor (Ψ_p)

El potencial de Turgor (Ψ_p) se obtuvo por diferencia entre el Ψ_w y Ψ_s (ver introducción sección 1.4.1.): $\Psi_p = \Psi_w - \Psi_s$.

3.2.4.4. Contenido Relativo de Agua (CRA)

Tal y como se describe en Walker y col. 2010, para el cálculo del CRA, se cortaron discos de hoja de 8 mm de diámetro. Seis discos de superficie foliar fueron cortados y pesados (PF) para cada una de las réplicas por tratamiento y población. Estos se introdujeron en agua MiliQ en placas Petri de 90 mm \varnothing a 20°C con el haz hacia arriba y el envés en contacto con el agua. Una vez transcurridas 24h, se midió el peso turgente (PT) de los discos eliminando previamente el exceso de agua, y se introdujeron en una estufa en tubos de vidrio de peso conocido a 60°C (24h) para la posterior determinación del PS. Una vez obtenidos estos tres pesos, se calcula el CRA con la siguiente fórmula (Turner, 1981): $CRA = [(PF-PS) / (PT-PS)] * 100$



Fotografía 3.2.5.1.a.- Hojas de plantas de *B. bituminosa* aisladas de la luz durante 2h antes de la determinación del Ψ_w . (izquierda). Discos de hoja en agua Mili Q para la determinación del CRA (derecha).

Utilizando los valores de CRA y Ψ_s , se pudo calcular el Ajuste Osmótico (AO) mediante la siguiente ecuación (Ludlow y col., 1983):

$$AO = [\Psi_s * (CRA/100)]_{\text{Tratamiento}} - [\Psi_s * (CRA/100)]_{\text{Control}}$$

La contribución a dicho ajuste osmótico de los cationes y principales osmolitos se calculó a partir de sus concentraciones, teniendo en cuenta de nuevo la ecuación de Van't Hoff, y asumiendo que los solutos tienen un comportamiento osmótico ideal (Alarcón y col., 1993).

3.2.4.5. Área Foliar Específica (AFE)

Se calculó usando el PS de los mismos discos de hoja del CRA de superficie conocida (área disco = $\pi (4\text{mm})^2 = 50,3 \text{ mm}^2$). Así el AFE se expresará en $\text{m}^2 \text{ Kg}^{-1} \text{ PS}$.

3.2.5. Nitrógeno y compuestos nitrogenados

3.2.5.1. Aminoácidos

Los AAs totales y el aminoácido prolina fueron extraídos según Tiefert (1988), mediante una extracción con 10ml de agua destilada a 100°C (1hora) en agitación con 90-100 mg de materia liofilizada y molida en un tubo de vidrio de 25ml. Se dejaron enfriar unos minutos y se coló por papel de filtro Whatman n° 2, a un tubo de plástico de 10 ml apuntando el volumen para posterior cálculo de concentración. Para la determinación de AAs totales (Lee y Takahashi, 1966) se agita 150 μl del extracto (o patrón) con 2,850 ml del reactivo (ninhidrina – glicerol – citrato): (NGC):

Reactivo NGC por muestra = + 0,75 ml de 1% ninhidrina (en TC)

+1,8 ml de glicerol

+ 0,3 ml de TC (por muestra/patrón)

→ pH = 6,0.

TC= Tampón citrato = + 5 ml de 0,5 M ácido cítrico

+ 45 ml de 0,5 M citrato sódico

+ enrasar a 100 ml con agua

→ pH a 5,60 con 0,5 M ácido cítrico.

Tras 12 min a 100°C, se deja enfriar y se mide directamente la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro de doble haz (Helios UV Visible Spectrophotometer; Thermo Electron Corporation, Cambridge, Reino Unido). Los patrones fueron 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 y 1,0 mM de glicina.

Para la prolina, se continuó con el protocolo de determinación de Bates y col., (1973): Para ello, 2 ml de extracto o de patrón (0-200 μ M prolina) fueron introducidos en un tubo de cristal de 25 ml, junto con 2 ml de ninhidrina ácida y 2 ml de ácido acético glacial.

Ninhidrina ácida = + 1,25 g de ninhidrina

+ 30 ml de ácido acético glacial

+ 20 ml de 6M ácido fosfórico

Se agitan y se mantienen a 100°C durante 1 hora tapados con embudos y canicas. Los tubos se meten en hielo y se añaden 4ml de tolueno, y se agitan 10 segundos. La fase superior (tolueno) se transfiere a una cubeta de cuarzo de espectrofotómetro. Se mide la absorbancia a 520 nm.

Para la determinación de AAs en savia, esta se recolectó durante la determinación de L_o , y fue congelada en nitrógeno líquido para la determinación de la concentración de AAs en savia mediante cromatografía líquida (AccQ-Tag-ultra ultra-performance liquid chromatography (UPLC), Acquity system (Waters, Milford, MA, USA), equipado con un detector de fluorescencia (FLR).

3.2.5.2. Nitrógeno total

La concentración de N se determinó en un analizador elemental (EA Euro-Vector S.a.P., Milán, Italy) tras calibración con patrones de atropina, pesando 2-3 mg de material vegetal en cápsulas de estaño.

3.2.5.3. Amonio

Para la extracción y determinación del NH_4^+ se siguió el protocolo expuesto en Bräutigam y col. (2007). Se agitan 25 mg de material liofilizada en 2 ml de 100 mM HCl,

durante 3 h. Se añade 1 ml de cloroformo, se agita y centrifuga a 3000 *g* durante 10 min a 8°C. El sobrenadante se traspasa a un tubo Falcón de plástico de 15 ml con 50 mg de carbón activo lavado con ácido. Agitar rápidamente (10 s) y centrifugar a 18000 *g* durante 5 min a 8°C. Añadir 100 µl del sobrenadante (o 100 µl de patrón (NH₄)₂SO₄ en 100 mM HCl) en un tubo de cristal de 6 ml. Añadir 400 µl del reactivo A (0,7813 g de salicilato sódico, 2 mg nitroprusiato sódico, y agua destilada hasta 10 ml). Echar 200 µl del reactivo C (citrato sódico 9,33 g en 100 ml H₂O). Agregar 1,6 ml de H₂O. Por último, echar 200 µl del reactivo B (0,5 g dicloroisocianurato sódico, 4 g NaOH, y agua destilada hasta 100 ml) y agitar. Incubar 45 minutos en oscuridad. Medir absorbancia a 660 nm. El NH₄⁺ es de interés por su importancia en la tolerancia a sequía (Sánchez-Rodríguez y col., 2011). También hay que restar su concentración de la de los AAs, por su interacción en la determinación de los mismos (Lee y Takahashi, 1996).

3.2.6. Carbohidratos

3.2.6.1. Azúcares libres

Para la extracción y determinación de azúcares y almidón se recurrió al protocolo descrito por Buysse y Merckx (1993). Para ello, a partir de 35-40 mg de material vegetal (lío-filizado y molido), se realizan dos extracciones con 5 ml de 60% etanol en un tubo Falcón de 15ml (2 x 20min a 40°C en agitación y centrifuga a 4500 x *g* 10 min a 20°C), transfiriendo el sobrenadante a un tubo de cristal de 25 ml para la determinación de los azúcares libres. A los 10 ml de extracto en el tubo de cristal, se añade 5 ml de cloroformo, se agita bien y se centrifuga a 2700 x *g* durante 10 min, a 20°C. A 1 ml de la capa superior de cada muestra diluida 1:4 en etanol o 1 ml de patrón (0-160 ppm glucosa - en 80% etanol) se traspasan a tubos de cristal de 25 ml. Se echan entonces 0,69 ml de agua, 0,31 ml de 90% fenol y (por último) 5 ml de ácido sulfúrico 95-97%. Se agita bien y se deja enfriar por lo menos 15 minutos antes de medir la absorbancia a 490 nm.

3.2.6.2. Almidón

El residuo final tras la extracción de azúcares solubles se usa para la determinación del almidón. Hay que transferirlo con 20 ml de 3% HCl a un tubo de digestión, tapar con un embudo y una canica. Calentar a 125°C durante 3 horas, enfriar, filtrar (papel Whatman n° 2) y enrasar a 20 ml con agua. Se añade a un tubo de cristal de 25 ml: 1 ml de patrón (0-160 ppm glucosa - en 3% HCl) o del extracto en 3% HCl diluido x 5 (200 µl + 800 µl 3% HCl), 0,80 ml de agua, 0,20 ml de 90% fenol y (por último) 5 ml de ácido sulfúrico (95-97%) – dirigiendo el ácido directamente a la superficie de la mezcla. Se agita bien y se deja enfriar por lo menos 15 minutos antes de medir la absorbancia a 490 nm.

3.2.7. Ácidos orgánicos

Para la determinación de ácidos orgánicos en material vegetal se realizó una digestión acuosa con agua mili-Q (30 minutos en 4 ml), pesando cantidades conocidas de material vegetal (40 mg PS) y sus concentraciones fueron calculadas tras realizar rectas de calibrado con patrones conocidos en cromatografía líquida a alta presión (Hernández y col., 2009). Los extractos fueron centrifugados y pasados a través de cartuchos Sep-pak C18 antes de ser analizados por HPLC asociado a espectrofotómetro masas (HPLC-MS/MS). La separación de ácidos orgánicos se realizó usando un HPLC (Agilent Series 1100, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU) equipado con una columna analítica Prontosil C18 de 250 mm x 3 mm y 3 µm de tamaño de partícula (Bischoff, Leonberg, Germany). La fase móvil fue ácido fórmico al 0,1% (v/v) a un flujo de 0,4 ml min⁻¹. El análisis espectral fue llevado a cabo en un espectrómetro de masas (G6410A de Agilent) equipado con una interfaz ESI operando en modo ión negativo: voltaje capilar de 4000V; presión nebulizador de 60 psi; flujo de gas de 11 l min⁻¹ a 350 °C. Las transiciones MS/MS fueron (*m/z*) 133→115 para málico, 191→111 para cítrico, 173→71 para fumárico y 117→73 para succínico.

3.2.8. Furanocumarinas (FCs)

Para su determinación se cuenta con colaboradores de la Universidad de Murcia especializados en dicha actividad (Dr. J.A. del Río, Facultad de Biología, Departamento de Biología Vegetal (Fisiología Vegetal)). De manera resumida, el procedimiento consiste en digestiones con metanol y HCl. Se pesan 800 mg de MS triturada en tubos de 30 ml graduados, y se realiza una primera digestión a 100°C en agitación con 14 ml de metanol (MetOH) 50% en H₂O (+2 gotas de antiespumante) durante 30 min. Tras restituir el volumen evaporado a 15 ml con MetOH 100 %, se filtra a través de papel de filtro convencional. A continuación se separaban dos partes del extracto para determinar FCs no-hidrolizadas e hidrolizadas. Para las primeras, simplemente se pasa 2 ml del extracto a tubos nuevos con 2 ml de MetOH 50%, se agitan y se filtran a través de un filtro de polipropileno, antes de pinchar en HPLC. Las FCs hidrolizadas fueron determinadas pasando 5 ml de extracto en tubos de 20 ml con 1 ml de HCl 6N, 2h 100 °C en el baño. Se restituye el volumen con MetOH 100% hasta 6 ml, diluir con 5 ml de MetOH 50 %. Se agita y filtra por Cameo para cuantificar-identificar al psoraleno y angelicina mediante HPLC-MS, con un cromatógrafo Jasco con columna analítica LiChroCARTR C₁₈ (Agilent, Santa Clara, CA, EEUU), y con un tamaño de partícula medio de 5 µm (250 x 4-mm i.d.) a 30 °C. Como solvente se utilizó una mezcla de acetonitrilo y agua.

3.2.9. Conductividad hidráulica de las raíces (L_o)

De acuerdo con Carvajal y col. (2000), las raíces fueron introducidas dentro de la cámara Scholander (modelo 600; PMS instruments Co., Corcallis, OR, USA), tras eliminar la parte aérea de la planta, en medio líquido correspondiente para cada tratamiento, de manera que la base del tallo quedara sujeta por una goma asomando fuera de la cámara. Las mediciones fueron realizadas usando presiones comprendidas entre 0,1 – 0,5 MPa, a las cuales se generaba un rango de flujo de savia. Para facilitar la recolección de savia, se colocó un capilar del mismo diámetro que el tallo, y con una aguja y una jeringuilla, se obtenían las diferentes cantidades de savia por unidad de

tiempo. La savia fue pesada para cada presión en tubos Eppendorf de peso conocido. L_o fue calculado ($\text{mg g}^{-1}\text{PS h}^{-1} \text{MPa}^{-1}$) como la pendiente de la recta resultante de representar el flujo de savia (J_v) expresado en $\text{mg (g raíz PS)}^{-1} \text{h}^{-1}$ frente la presión.

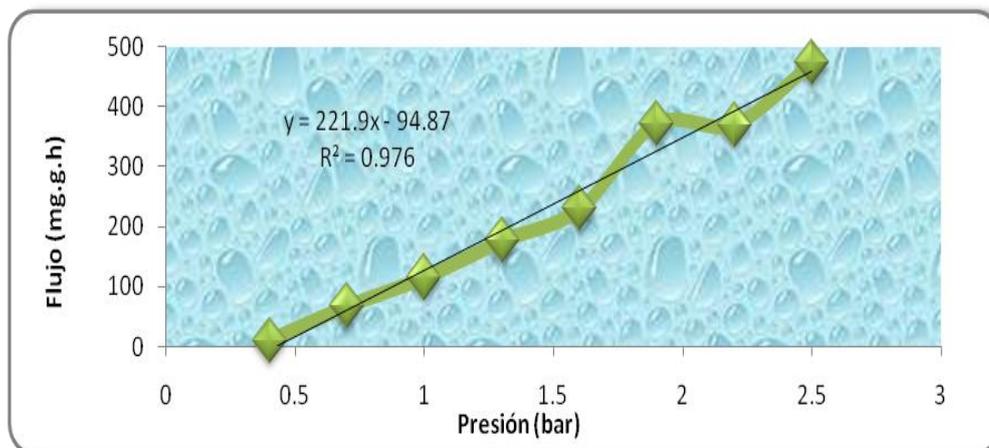


Figura 3.2.8.- Ejemplo en la determinación de L_o en la raíz de una planta.

3.2.10. Análisis elemental

La concentración en cationes y P, MPs y As se determinó por espectroscopía de emisión óptica plasma inducido (ICP-OES) (modelo Varian Vista-MPX; Varian Ltd., Murgreave, Australia), tras digestión ácida. Para ello se pesaron 100 mg (para Ca, Mg, K, Na y P) ó 250 mg (para Cd, Cu, Fe, Mn, Pb, Zn y As) de material vegetal (o de suelo) en un tubo de digestión de 50 ml. Se añaden 3 ml de mezcla (2:1, por volumen) de 60% ácido nítrico y 60% ácido perclórico. Se dejan reaccionar 2 horas. Posteriormente pasan 2 horas a 150°C y 1 hora a 210°C. Se enfrían y añaden 5 ml de 7% HCl hasta un volumen final de 10 ml. Se debe agitar bien y calentar a 60°C durante 30 minutos. Entonces se enfría y se añade agua MiliQ (10 ml para Ca, Mg, K, Na; 5 ml para MPs) y se agitan, se acidifican con 60% HNO₃ hasta una concentración final de 0,5%. Para comprobar la correcta medida mediante el ICP, se usaron patrones externos de concentraciones conocidas (Reagecon, Shannon, Irlanda). Para cada análisis, también fue digerido un material de referencia (Bowen's Kale; International Union of Pure and Applied Chemistry, 1979).

3.3. Suelos

3.3.1. Capacidad de campo o WHC (Water Holding Capacity)

La capacidad de campo expresa la cantidad de agua que puede llegar a retener el suelo (Israelson y West, 1922). Para ello se pesa una cantidad conocida de suelo, y se coloca en un recipiente con orificios para permitir el drenaje del agua que el suelo no pueda retener. Los suelos se saturan con agua destilada por capilaridad, y se dejan drenar durante 12h evitando el secado superficial. Tras ese tiempo, se pesa para comprobar la humedad retenida por gramo de suelo (pérdida de peso de 10 g de muestra húmeda a 105°C durante 12 horas). El intervalo comprendido entre la capacidad de campo y el punto de marchitez permanente (15 atm.) lo conocemos como agua disponible. Más allá del punto de marchitez el agua no está accesible a las plantas.

Fue calculado según:

$$\%WHC = (\text{Contenido Real de H}_2\text{O en el suelo}) / (\text{Contenido Teórico a WHC}) \times 100$$

El contenido de agua se determinó gravimétricamente por diferencia de peso tras introducir el suelo de cada maceta a 105°C hasta peso constante.

3.3.2. pH del suelo

Es suelo seco se satura en agua destilada hasta crear una pasta saturada, y a las dos horas se mide el pH directamente utilizando el electrodo de un pH-metro (US Salinity Laboratory Staff, 1954).

3.3.3. Elementos disponibles /asimilables en el suelo

Para la extracción y determinación del P se siguió el protocolo descrito por Watanabe y Olsen (1965). Para ellos, se pesan 5 g de suelo seco y tamizado en una botella de 1 l. Se añade entonces carbón activo (una cucharada) y 100 ml de NaHCO₃ 0,5M y se agita durante 45 minutos. Tras filtrar, se toman 5 ml y se mezclan en un

matraz de 25 ml con otros 5 ml de molibdato amónico en HCl (15g de $\text{Mo}_7\text{O}_{24}(\text{NH}_4)_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ + 300 ml de agua destilada + 342 ml de HCl 35%). Se agita hasta eliminar el exceso de CO_2 , se añade un trozo de papel de estaño. Se forma entonces fosfomolibdato amónico, de color azul, por lo que tras enrasar a 25 ml con agua destilada, se mide en el espectrofotómetro a 660 nm tras calibrar con patrones de concentraciones de P conocidas.

Para determinar el K disponible en el suelo, se pesan 3 g suelo en 15 ml NaNO_3 10 mM, 1 h. Se debe entonces centrifugar (12000 g) durante 5 minutos y se filtra por papel lavado al ácido: 7 ml del filtrado se acidificarán en un nuevo tubo con 54 μl de ácido nítrico 65%, y se mide en ICP-MS.

Todos los parámetros se refieren a suelo secado a 105°C.

3.3.4. MPs asimilables (Extracción con DTPA)

Extracción de los metales con DTPA y determinación por espectrofotometría de absorción atómica (Lindsay y Norvell, 1978).

El As disponible se extractó con NaHCO_3 0,5 M (pH 8,5) (5 g suelo en 100 ml, 30 min.) (Lindsay y Norvell, 1969).

3.3.5. MPs disponibles (Extracción con CaCl_2)

Los MPs considerados como “disponibles” fueron extraídos con 0,1 M CaCl_2 (3 g suelo en 20 ml, durante 16 h) y con ácido diethylenetriaminepentaacético 5 mM + 0,1 M CaCl_2 + 100 mM triethanolamina (pH 7,3; DTPA; 10 g suelo en 20 ml, 2 h). Los elementos extraídos fueron medidos por ICP-OES y determinación por espectrofotometría de absorción atómica.

3.3.6. Nitrógeno total en suelo

Se analiza tras quemar la muestra a 1020°C y medir el CO₂ producido en un analizador elemental, previa destrucción de carbonatos con ácido clorhídrico (Navarro y col., 1991).

3.4. Disoluciones nutritivas

3.4.1. Disolución nutritiva completa

Para lograr las concentraciones deseadas de Macronutrientes: (mM) 16 N, 6 K, 4 Ca, 2 P, 1 S, 1 Mg; y de Micronutrientes: (μM) 50 Cl, 25 B, 20 Fe, 2,0 Mn, 2,0 Zn, 0,5 Cu, 0,5 Mo, se preparó para conseguir las siguientes concentraciones:

4,0 mM Ca(NO₃)₂; 4,0 mM KNO₃; 2,0 mM NH₄NO₃; 2,0 mM KH₂PO₄; 1,0 mM MgSO₄; 25 μM H₃BO₃; 2,0 μM MnSO₄; 2,0 μM ZnSO₄; 0,5 μM CuSO₄; 0,1 μM (NH₄)₆Mo₇O₂₄; 50 μM NaCl; 20 μM FeEDDHA. El pH se ajustó a 6,5 con 1M KOH (= 0,65 mM K⁺) (basado en Hoagland y Arnon, 1938).

3.4.2. Disolución nutritiva para ensayos con MPs

Para evitar posibles interacciones no deseadas entre algunos elementos de la disolución nutritiva y los MPs añadidos a esta en altas cantidades, se recurrió a una disolución modificada, con un tampón. Las concentraciones de los elementos utilizados fueron las siguientes:

1,5 mM MES C₆H₁₃NO₄S; 0,45mM KOH; 0,4 mM Ca(NO₃)₂; 0,2 mM MgSO₄; 1 mM NH₄NO₃; 50 μM NaCl; 2 mM KNO₃; 20 μM H₃BO₃; 20 μM KH₂PO₄; 10 μM FeEDDHA; 2 μM MnSO₄; 2 μM ZnSO₄; 0,2 μM CuSO₄; 0,1 μM (NH₄)₆Mo₇O₂₄. El pH se ajustó a 5,8 con 1M KOH.

Para comprobar que durante un tratamiento de exposición a un determinado MP, este no formara compuestos que redujeran su disponibilidad por debajo del 98% en la disolución, se utilizó el software informático Visual-Minteq versión 2.53 (CEAM, EPA, US).

3.4.3. Disolución nutritiva para ensayos con rizobios

Debido a que en los ensayos realizados con las bacterias fijadoras, se pretendía evaluar el aporte de N por parte de las cepas nodulantes a la planta, fue necesario utilizar medios con los que fertilizar el sustrato inerte que permitiera el aporte de todos los elementos necesarios para el desarrollo de las plantas, y con o sin aporte de N. Para ello, se utilizaron las dos disoluciones (-N y +N) con las concentraciones detalladas en la siguiente tabla.

Tabla 3.4.3.- Concentraciones de las disoluciones empleadas en los ensayos con cepas nodulantes.

Reactivo	-N	+N
CaSO ₄	2,0 mM	2,0 mM
KH ₂ PO ₄	6,0 mM	6,0 mM
MgSO ₄	1,0 mM	1,0 mM
Ca(NO ₃) ₂	-	5,0 mM
NH ₄ NO ₃	-	1,0 mM
H ₃ BO ₃	25 μM	25 μM
MnSO ₄	2,0 μM	2,0 μM
ZnSO ₄	2,0 μM	2,0 μM
CuSO ₄	0,5 μM	0,5 μM
Na ₂ MoO ₄	0,7 μM	0,7 μM
NaCl	50 μM	50 μM
FeEDDHA	20 μM	20 μM

3.5. Técnicas relacionadas con cepas nodulantes

3.5.1. Composición medio YEM

La composición del medio completo YEM (Yeast-extract-mannitol) es la siguiente:

1 g extracto de levadura; 10 g de manitol; 0,2 g MgSO₄; 0,5 g K₂HPO₄; 0,1 g de NaCl; 15 g de agar microbiológico; y hasta 1 l con H₂O destilada, ajustando pH a 6,8-7,2 (Vincent, 1970).

3.5.2. Composición medio LA

La composición del medio LA se basó en la de un medio Lupin Agar (LA) modificado según Yates y col. (2007), conteniendo la siguiente composición por litro:

5 g manitol; 5 g D-glucosa; 1,25 g extracto de levadura; 3,2 mM MgSO₄; 1,7 mM NaCl; 1,4 mM CaCl₂; 15 g l⁻¹ agar; 100 μM K₂HPO₄; 100 μM KH₂PO₄; 18 μM FeSO₄; 6 μM Na₂B₄O₇; 12 μM MnSO₄; 0,76 μM ZnSO₄; 0,32 μM CuSO₄; y 0,54 μM Na₂MoO₄. El pH fue ajustado a 6,8 con 0,1 M KOH.

3.5.3. REP-PCR

La extracción del ADN total se realizó según Sambrook y col. (1989). Los *primers* usados fueron REP1R-I (5'-IIIICGICGICATCIGGC-3') y REP2-I (5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3') (Roche Diagnostics S.L.) tal y como se detalla en el protocolo de Versalovic y col. (1991). La reacción de amplificación se realizó tal y como se detalla en Rejili y col. (2009), con 5 μl de muestra de ADN (aproximadamente 20 ng), 3 μl de Polimerasa (Taq), tampón (10x), 3 μl de DMSO (100%), 3 μl de deoxinucleótidos trifosfato (1,25 mM), 4 U de Taq ADN polimerasa (Sigma, España), 5 μl de MgCl₂ (7 mM), 1 μl de cada primer (50 pmol), y 4,2 μl de agua milliQ. Las fases de la PCR fueron desnaturalización inicial a 95°C durante 6 min; 30 ciclos a 94°C / 1 min, 40°C / 1 min y 65°C / 8 min; y extensión final a 65°C / 16 min. El ADN amplificado fue separado en un gel de agarosa 1,2% (p/v), con bromuro de etidio (10 mg ml⁻¹) y fotografiado usando luz UV (260 nm). El análisis del patrón de bandas del Rep-PCR comparativo se realizó mediante el software InfoQuest FP (Bio-Rad).

3.5.4. ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis)

Para la amplificación previa del 16S, se usaron los primers 41f (5'-GCTCAGATTGAACGCTGGCG-3') y 1488r (5'-CGGTTACCTTGTTACGACTTCACC-3') tal y como se describe en Herrera-Cervera y col. (1999). Los fragmentos fueron observados en un gel de agarosa 3% (p/v) (Pronadisa, España) tras correrlo durante 2 h a 80 V. El

análisis comparativo del patrón de bandas de electroforesis de cada cepa y la creación de los árboles fueron llevados a cabo con usando el método UPGMA del programa GelCompar InfoQuest FP de Biorad tras un análisis de correlación de Pearson's (Sneath y Sokal, 1973; Rademaker y col., 1998).

3.5.5. Preparación de suspensión inoculante

Para la preparación de los inóculos, a partir de los aislados en cultivo fresco, incubados 3 días en una estufa a 28°C en medio sólido YEM, se pasó una colonia de cada aislado a un tubo Falcon de 15 ml con 3 ml de medio YEM líquido. Tras una nueva incubación en agitación 3 días en una estufa a 28°C, se comprobó que la densidad óptica (DO600; $\lambda = 600$ nm) fuera aproximadamente 1 (entre 0,9-1,4), sacando 1 ml a una cubeta de espectrofotómetro, ya que una DO600 = 0,5 corresponde teóricamente con 10^8 bacterias ml^{-1} (Maâtallah y col., 2002). Para lavar el medio líquido, se centrifugó, se eliminó el sobrenadante, y se resuspendió el *pellet* con 3 ml de suero salino estéril (MgCl_2 10 mM). Entonces se hizo una dilución 1:10 con más suero salino para crear la suspensión inoculante. Para la inoculación de las semillas, estas fueron escarificadas por cocción a 100°C, se esterilizaron en cámara de flujo laminar con lejía al 30% durante 5 minutos y sucesivos lavados con agua estéril. Las semillas se mantuvieron en oscuridad en placas Petri estériles a 25°C en cámara controlada hasta comienzo de germinación (3 días).

3.5.6. Identificación de bacterias mediante 16S

3.5.6.1. Amplificación de la región 16S

Las bacterias identificadas siempre procedieron de cultivos frescos crecidos durante 4 días en medio LA (Yates y col., 2007) (ver sección 5.3.2. de Materiales y Métodos). Usando una espátula esterilizada a la llama en el interior de la cámara de flujo laminar, se resuspendió al menos la mitad de la biomasa de una placa Petri en 1 ml de suero salino (0,89% NaCl) en tubos eppendorf estériles. Tras vortex, se

centrifugaron a máxima velocidad durante 2 minutos. A continuación se eliminó por completo el sobrenadante, utilizando una micropipeta, se resuspendieron las bacterias con 500 μ l de agua esteril y se mantuvieron en frío. Se prepararon muestras sin bacterias como control negativo en las reacciones de amplificación. Como se partió de un desarrollo bacteriano considerable, se obvió la comprobación de la DO.

La mezcla de reacción o MasterMIX de la PCR contenía por muestra: 1 μ l 5xPolymersiation Buffer (Batch290803(Fisher)); 1,75 ml de $MgCl_2$ (50 mM) (Invitrogen); 0,5 μ l de F *primer* (50 mM), FGPS1509 (20mer) Reeve 738488 (Gene Works): 5'-AAGGAGGGGATCCAGCCGCA-3'; 0,5 μ l de R *primer* (50 mM), FGPS6 (21mer) Reeve738489 (Gene Works): 5'-GGAGAGTTAGATCTTGCTCA-3'; 6 unidades de Taq DNA Polimerasa 500u (5u/ μ L) (Invitrogen); y H_2O PCR (hasta 49 μ l).

Siempre trabajando en una cabina de flujo laminar, a cada 49 μ l de reacción se le añadió 1 μ l de muestra. Se les dio un vortex para mezclar y se corrió la PCR en un termociclador (iCycler Thermal Cycler 170-8720 (Bio-Rad)) con las siguientes fases: 94°C/5 minutos; 94°C/30 segundos; 55°C/30 segundos x 35 ciclos; 72°C/30 segundos; 72°C/7 minutos; 14°C hasta procesamiento. La comprobación de la amplificación se realizó en gel de agarosa 1%. Para ello se preparan 100 ml de tampón de electroforesis TEx1 con 1 g de agarosa (Bio-Rad Laboratories Inc., España), y se añaden 8,3 μ l de revelador SYBR®Safer (Sybrsafer DNA gel stain 10000x concentrado en DMSO; Invitrogen) (2,5 μ l 30 ml⁻¹ TE). El tampón para correr el gel TEx1 se preparó a partir de TAE 50x (20 ml TAE50x + 980 ml agua destilada). La composición del Tampón TAE50x (por litro) es Tris base 242 g, ácido acético glacial 57,1 ml, EDTA 18,612 g (pH 8,0). Para su preparación se disuelve el Tris en 600 ml de agua destilada, se añaden los demás componentes y entonces el pH se ajusta a 8,0 con ácido acético glacial. Entonces se enrasa a 1l y se autoclava.

Para escalar el tamaño, se utilizó un GeneRuler™ 1000 pbs DNA Ladder (Fermentas) a cada lado del gel. Para las muestras se añaden entre 2 y 4 μ l de tampón de carga (6x LoadingDye Blue/Orange (Promega)) mezclado sobre un papel de parafilm con 10 μ l de producto de PCR. El gel se corre a 100 V durante 40 minutos.

3.5.6.2. Preparación para secuenciación

Para ello se utilizaron sobre la zona amplificada (ver sección anterior), además de dos *primers* externos (18F y 1492R), dos *primers* internos (800F y 820F):

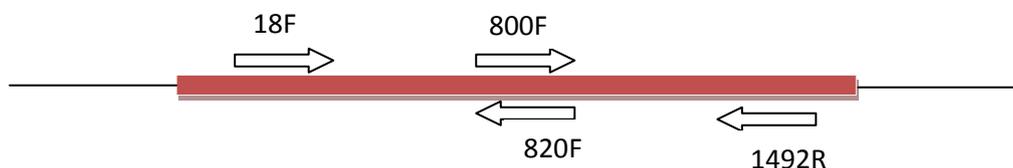


Figura 3.5.6.2.- Diagrama de *primers* utilizados para la amplificación por separado de fragmentos del 16S de 1500 pb.

Estos *primers* fueron elegidos por su eficacia para amplificar fragmentos con buena calidad. 18F y 1492R son dos primers que están situados unas cuantas pares de bases hacia el interior del fragmento de 1500 pb, para que así la amplificación comience en el propio fragmento y no en posibles residuos de la amplificación con los 16S Universal. Para esta amplificación individual para cada primer, se usó una MasterMix (1/2) con 4 μ l Big Dye Terminator (DT); 1 μ l Primer (3,2 μ m); 1 μ l H₂O PCR; 4 μ l muestra DNA purificado. Las condiciones de la PCR fueron: 96°C/2 minutos; 96°C/10 segundos; 50°C/10 segundos x25 ciclos; 60°C/4 minutos; 14°C infinito.

Después de la amplificación, se podría haber comprobado la amplificación en un gel, pero la propia secuenciación serviría para comprobarlo. Así que se procedió a la precipitación con etanol antes de mandar a secuenciar. Para ello, para cada media reacción, se preparan tubos de 0,5 ml con 25 μ l de etanol 100%. Se puede usar el propio etanol para recoger del tubo de amplificación 10 μ l del producto de amplificación y se añade al tubo de 0,5 ml. Se añade 1 μ l de 3M acetato sódico pH 5,2. Se echa 1 μ l de EDTA 125 mM. Se mezcla pipeteando arriba y abajo y dejar reposar a temperatura ambiente 20 minutos. Tras centrifugar a la máxima velocidad durante 30 minutos, se descarta inmediatamente el sobrenadante usando una punta amarilla sin que quede exceso de líquido. Entonces se resuspende en 125 μ l de etanol 70%, se vuelve a centrifugar a máxima velocidad durante 5 minutos a temperatura ambiente, y

se descarta el sobrenadante y se deja boca abajo para secar. Entonces los tubos estaban listos para ser enviados a al servicio de secuenciación.

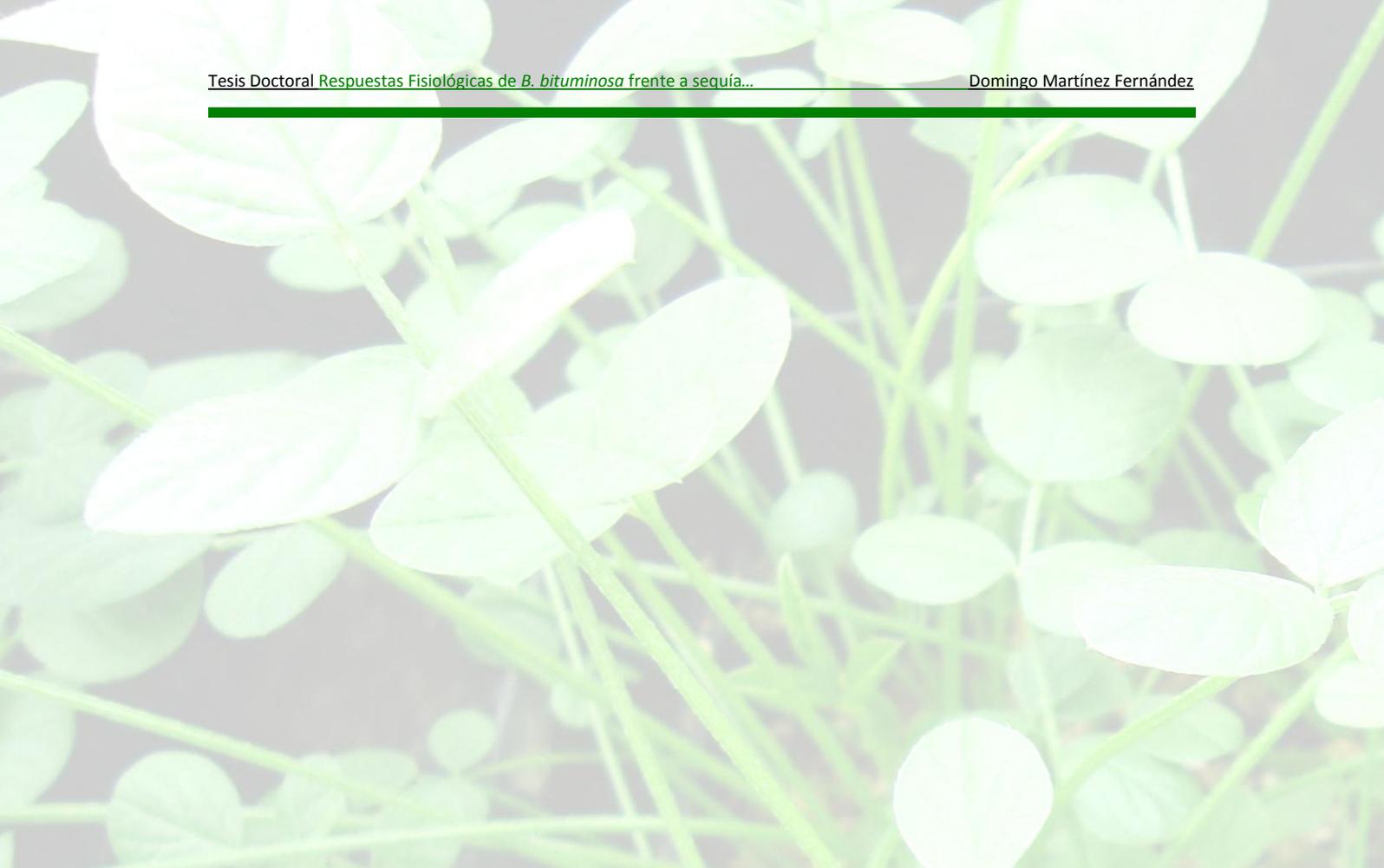
Las secuencias obtenidas tras la secuenciación fueron procesadas con el software Geneious Basic 5.4.2 (Biomatters Ltd.) para conseguir el alineamiento de las cuatro secuencias por cepa, y poder comparar la secuencia con la base de datos del NCBI mediante BLAST.

3.6. Análisis estadístico

El tratamiento estadístico para las comparaciones se realizó mediante el programa informático SPSS para Windows (Versión 11.5.1), por análisis de varianza (ANOVA). Como prueba post hoc, se recurrió al Test de Tukey para clasificar los datos en grupos estadísticos significativamente diferentes mediante letras. Donde hacía falta satisfacer las condiciones de homogeneidad de varianzas y de normalidad, se realizó una transformación arcseno ($\sqrt{x/100}$) para los datos expresados en forma de porcentaje excepto en los casos donde todos los valores fueron entre 40 y 70%. Se usó la transformación a logaritmo $\log(x)$ para las variables que no superaban el test de normalidad de Kolmogorov-Sminorof. Se determinó la homogeneidad de las varianzas mediante la prueba de Levene ($P > 0,05 =$ no significativo y por tanto homogeneidad de varianzas). El análisis factorial, para determinar los efectos de los tratamientos/parámetros (tiempo, población, etc.) y sus interacciones (ver anexo), se hizo con el modelo lineal general (GLM) univariante (suma de cuadrados: tipo III).

Para toda la parte experimental, se considera que existen diferencias significativas siempre y cuando $P < 0,05$. Sin embargo, donde es posible, se especifican los valores absolutos de la probabilidad P , con respecto a los efectos de los distintos tratamientos, parámetros y su iteración.





98 SECCIÓN SEQUÍA

100 **CAPÍTULO I:** Sequía en maceta

118 **CAPÍTULO II:** Sequía en parcela

136 **CAPÍTULO III:** Sequía en hidropónico

148 **DISCUSIÓN GENERAL SEQUÍA**

SECCIÓN SEQUÍA

Justificación del estudio de *B. bituminosa* frente a sequía

El déficit hídrico es el principal factor ambiental adverso que afecta a la flora de la zona mediterránea. *B. bituminosa* es capaz de desarrollarse de manera adecuada en ambientes afectados por sequía, pero poco se sabe acerca de los mecanismos y procesos fisiológicos que le permiten tolerar dicho factor ambiental. La existencia de diferentes variedades y poblaciones sometidas a distintos grados de estrés hídrico permite comparar las diferentes estrategias llevadas a cabo por cada una de ellas. Todo ello ayudará a la selección de aquellas variedades en función del propósito con el que se pretenda cultivar en ambientes afectados por sequía.

La información más relevante referente a la sección de sequía (Capítulo I, II y III) aparece en el artículo científico "The response of the leguminous fodder plant *Bituminaria bituminosa* to water stress" (Martínez-Fernández, D., Walker, D.J., Romero-Espinar, Martínez-Ballesta, M.C., Correal, E.), en *Journal of Agronomy and Crop Science* (online: 9, Abril, 2012. DOI: 10.1111/j.1439-037X.2012.00515.x).

4. CAPITULO I: Ensayo de sequía en maceta

4.1. Objetivos específicos

- Exponer poblaciones de diferentes variedades de *B. bituminosa* a estrés hídrico en un ensayo de maceta, bajo condiciones controladas.
- Determinar la tolerancia relativa de dichas poblaciones, y la producción de biomasa aérea en relación con plantas control (regadas).
- Comprobar qué mecanismos fisiológicos demuestran la adaptación de las plantas al estrés hídrico y que podrían explicar diferencias entre poblaciones.
- Estudiar los efectos de la sequía sobre la síntesis y acumulación de FCs en plantas.

4.2. Procedimientos ensayo sequía en maceta

Las plantas usadas incluyen las 3 variedades descritas para esta especie: var. *bituminosa* (poblaciones *Llano del Beal* y *La Perdiz*, ambas de la Región de Murcia), var. *albomarginata* (pob. *Famara*) y var. *crassiuscula* (pob. *Boca de Tauce*). Todas las plántulas fueron generadas a partir de semillas cosechadas a partir de las plantas madre cultivadas en el IMIDA (ver Tabla 3. en Materiales y Métodos).

El suelo utilizado en el ensayo en maceta provenía de la finca experimental del IMIDA en La Alberca, descrito por Walker y col. 2007, y en la Tabla 3.1.a., donde posteriormente se llevaría a cabo el ensayo de campo. El suelo fue recogido 17 días antes de la siembra (18/09/2007) a partir de tres puntos diferentes de la parcela, mezclado y tamizado a través de un tamiz de 2 mm. Se repartió entonces en macetas rectangulares de 1,5 l de volumen.

Las semillas fueron escarificadas mecánicamente por frotación usando un papel de lija, para conseguir deteriorar la cubierta y por lo tanto una mejor hidratación de la semilla alojada en su interior una vez realizada la siembra. El porcentaje de germinación mediante este procedimiento ronda el 30-40%. Fueron sembradas (5/10/2007) a 2 cm de la superficie, repartiéndose 20 semillas por maceta, para asegurar conseguir finalmente 8 plantas por recipiente justo antes de iniciar el "tratamiento" (regar o no regar). Las macetas se introdujeron entonces en bandejas en la cámara de cultivo bajo condiciones controladas, con un foto-periodo de 11h luz y una temperatura día/noche inicial de 21/12°C respectivamente. Posteriormente, se modificó el régimen de temperaturas a 23/19°C (25-10-2007). La densidad de flujo de fotones (PAR) fue aproximadamente $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a nivel de planta. La humedad relativa se mantuvo en torno a 60% día, y 70% noche. Las macetas fueron regadas con agua destilada cada vez que fue necesario hasta el comienzo del tratamiento.



Fotografías 4.2.a.- Macetas durante el ensayo de maceta (izquierda). Comparación de plantas de una maceta control con una no regada al final del ensayo (derecha).

Se distribuyeron las plantas en 20 macetas por población, para conseguir diez réplicas de cada población por tratamiento. Es decir, cada maceta supuso una réplica, con 8 plantas en cada una de ellas. Además, se recolectaron muestras a dos edades diferentes (5 réplicas por población).

A partir del día 17 de noviembre de 2007 (42 días desde la siembra), se comenzó con el tratamiento de sequía. A partir de ese día, únicamente se regaron con agua destilada las macetas control cuando fue preciso. El noveno día de tratamiento supuso el primer día de análisis, realizándose el segundo análisis al día 16 desde el inicio de la sequía. En ambos días de análisis se realizó la determinación del Ψ_w , Ψ_s y Ψ_p , CRA, PF y PS de la biomasa de la parte aérea, y recolectándose el material vegetal de cada maceta para su posterior análisis. La cosecha del material vegetal se realizó cortando a nivel de superficie, determinando el PF de las plantas de cada maceta. Seguidamente, el material fue liofilizado, para la posterior determinación de otros parámetros: contenido en azúcares solubles y almidón, prolina y aminoácidos totales, NH_4^+ , N, P, y los principales cationes.

4.3. Resultados ensayo sequía en maceta

4.3.1. Suelo

La cantidad de agua presente en el suelo de cada maceta expresado como %WHC, gravimétricamente y como el porcentaje del agua disponible para las plantas, disminuyó drásticamente con el tratamiento de sequía, tanto a los 9 como a los 16 días desde el inicio del tratamiento, alcanzando todas los mismos niveles de sequía. El valor más bajo fue alcanzado en el suelo de las macetas de *Llano del Beal* (8,31% del WHC).

Tabla 4.3.1.- Contenido de agua del suelo de las macetas en el ensayo de sequía los días 9 y 16 desde el último riego para las plantas del tratamiento “sequía” (42 días después de la siembra). Los valores del %WHC fueron transformados previamente para el análisis estadístico (aseno $(v(x/100))$).

Población	Día	Tratamiento	%WHC	gH ₂ O g ⁻¹ PS Suelo	%H ₂ O disponible
<i>Famara</i>	9	Control	51,83 b	0,18 ± 0,00 b	89
	9	Sequía	24,04 e	0,08 ± 0,01 e	14
	16	Control	35,36 cd	0,12 ± 0,00 cd	44
	16	Sequía	10,61 f	0,04 ± 0,00 f	0
<i>Llano del Beal</i>	9	Control	64,18 a	0,22 ± 0,02 a	100
	9	Sequía	35,64 cd	0,12 ± 0,01 cd	45
	16	Control	23,37 e	0,08 ± 0,01 e	12
	16	Sequía	8,31 f	0,03 ± 0,00 f	0
<i>Boca de Tauce</i>	9	Control	68,84 a	0,24 ± 0,01 a	100
	9	Sequía	34,46 cd	0,12 ± 0,01 cd	42
	16	Control	25,15 e	0,09 ± 0,01 e	17
	16	Sequía	12,71 f	0,04 ± 0,01 f	0
<i>La Perdiz</i>	9	Control	70,57 a	0,25 ± 0,01 a	100
	9	Sequía	42,74 bc	0,15 ± 0,00 c	64
	16	Control	31,02 de	0,11 ± 0,01 de	33
	16	Sequía	9,93 f	0,03 ± 0,01 f	0
Sig.			<0,01	<0,01	

Para ver el análisis factorial, ver Tabla A.1. en Anexo.

4.3.2. Crecimiento de la parte aérea

Las diferencias entre plantas expuestas a sequía y las controles siempre fueron más acusadas en el segundo día de análisis (Tabla y Figura 4.3.2.). Para la producción de biomasa fresca, ninguna población experimentó una reducción significativa ($P < 0,05$) con respecto a sus controles (g planta^{-1}) al noveno día de tratamiento, pero todas debieron frenar su crecimiento para el día 16. Comparando únicamente la producción de biomasa en condiciones control a día 16, las accesiones canarias mostraron valores mayores ($12,41\text{-}10,87 \text{ gPF planta}^{-1}$) que los alcanzados por las poblaciones murcianas ($9,98\text{-}6,34 \text{ gPF planta}^{-1}$), siguiendo el orden *Famara*>*Boca de Tauce*>*Llano del Beal*> *La Perdiz* (diferencias significativas para *La Perdiz*). Exactamente el mismo orden aparece bajo condiciones con sequía.

Tabla 4.3.2.a.- Biomasa fresca (g planta^{-1}) de las plantas del ensayo en maceta. Los valores de % de MS fueron transformados ($\text{aseno}(\sqrt{x/100})$) para que cumplieran una distribución normal.

Población	Día	Tratamiento	PF	%MS
<i>Famara</i>	9	Control	7,83 ± 0,95 cde	16,01 cd
	9	Sequía	8,44 ± 0,31 bcd	15,48 cde
	16	Control	12,41 ± 0,56 a	16,56 c
	16	Sequía	6,58 ± 0,50 defg	24,56 a
<i>Llano del Beal</i>	9	Control	6,72 ± 0,86 defg	12,50 def
	9	Sequía	6,73 ± 0,53 defg	11,79 f
	16	Control	9,98 ± 0,21 abc	13,94 cdef
	16	Sequía	4,80 ± 0,33 g	24,74 a
<i>Boca de Tauce</i>	9	Control	8,92 ± 0,42 bcd	11,52 f
	9	Sequía	9,64 ± 1,01 bc	11,48 f
	16	Control	10,87 ± 0,58 ab	12,86 def
	16	Sequía	7,57 ± 0,53 cdef	17,53 bc
<i>Perdiz</i>	9	Control	4,95 ± 0,21 fg	11,17 f
	9	Sequía	5,66 ± 0,22 efg	11,38 f
	16	Control	6,34 ± 0,25 defg	12,07 ef
	16	Sequía	4,36 ± 0,13 g	21,51 ab
Sig.			<0,01	<0,01

Para ver el análisis factorial, ver Tabla A.2. en Anexo.

Si se expresa el peso de la materia seca (datos no mostrados) como porcentaje de las plantas control el día 16, las poblaciones siguen el orden *La Perdiz* (122%) > *Boca de Tauce* (96%) > *Llano del Beal* (86%) > *Famara* (79%), siendo *La Perdiz* la accesión que mejor mantuvo su PS en condiciones estresantes, incluso por encima de los controles. Se verá en la siguiente sección que este orden fue prácticamente opuesto en el ensayo de campo. La única que sufrió un descenso significativo en su PS en relación con sus controles fue *Famara*, aunque con valores absolutos más elevados que cualquier otra población. Todas las variedades mostraron un incremento de %MS como resultado de la exposición a sequía.

Para la tasa de crecimiento relativa (TCR), hay una disminución entre los días 9 y 16 sin riego en todas las variedades excepto *La Perdiz* (expresado como porcentaje del TCR de las plantas control: reducción del 64%, 28% y 34% en *Famara*, *Llano del Beal* y *Boca de Tauce*, respectivamente, y un incremento del 16% en *La Perdiz* (ver Figura 4.3.2.).

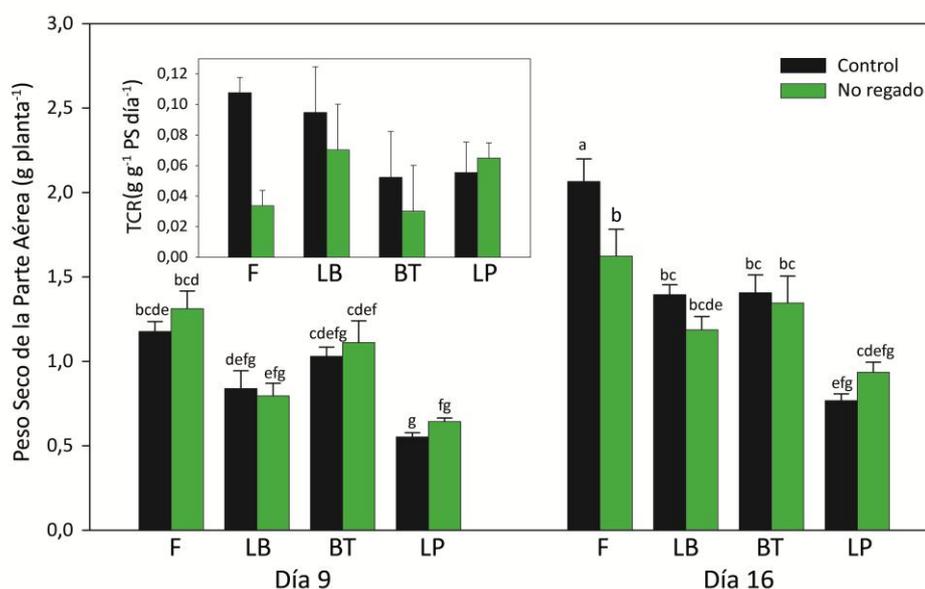


Figura 4.3.2.- Peso seco de la biomasa de las plantas ($P \leq 0,01$) de cada población de *B. bituminosa* (F= *Famara*; LB= *Llano del Beal*; BT= *Boca de Tauce*; LP= *La Perdiz*) tras 9 y 16 días con (Control) o sin riego en el ensayo en maceta. La figura interior representa el TCR de las cuatro poblaciones entre ambos días. Para ver datos originales, consultar Tabla A.3. en Anexo.

4.3.3. Área foliar específica (AFE)

El AFE (expresado en PS) disminuyó en el orden: *Famara* > *Llano del Beal* > *Boca de Tauce* > *La Perdiz*, en cuanto al valor neto, sin relación con la edad ni el tratamiento. El AFE experimentó una disminución frente a sequía, incluso en el primer día de análisis a los 9 días, a excepción de *Llano del Beal* que lo aumentó a los 16 días. Así que el mayor descenso del porcentaje del AFE coincidió con la mayor tolerancia a sequía, con un 20% para la accesión *La Perdiz*.

4.3.4. Azúcar y solutos

El día 9 en las plantas sin riego, no hubo cambios en la concentración de azúcares solubles en el material vegetal por exposición a sequía, pero en el día 16, *Llano del Beal*, *La Perdiz* y *Boca de Tauce* mostraron incrementos en relación a las plantas regadas, y *Famara* un descenso. Para las cuatro poblaciones, la concentración de almidón disminuyó desde el día 9 al 16, especialmente para plantas control, de modo que el día 16 la concentración de almidón fue ligeramente superior en las plantas estresadas. La proporción de los carbohidratos (% residuos de glucosa) presente como azúcares solubles no se vio afectada significativamente por el estrés hídrico, aunque podría destacarse que el día 16 *La Perdiz* (la más tolerante) mostró el mayor aumento de este parámetro, y *Famara* (la más sensible) fue la única que manifestó una reducción. Todos los valores fueron más altos el día 16, debido a la disminución en el almidón.

Tabla 4.3.4.- Valores de AFE (m² Kg⁻¹PS) y concentraciones de azúcares y almidón (g Kg⁻¹PS) para los dos días de análisis del ensayo en maceta. La última columna representa el % de azúcar respecto a la suma de azúcar y almidón (residuos de glucosa): estos valores fueron transformados (aseno (V(x/100))) antes del análisis estadístico.

Población	Día	Tratamiento	AFE	Azúcar	Almidón	% de azúcar
<i>Fomara</i>	9	Control	73,8 ± 3,0 a	19,9 ± 2,3 cd	69,9 ± 4,1 ab	22 ab
	9	Sequía	63,8 ± 3,3 bcd	22,3 ± 3,5 bcd	61,5 ± 6,2 ab	27 ab
	16	Control	72,4 ± 3,0 ab	39,3 ± 1,5 a	50,0 ± 4,5 ab	44 a
	16	Sequía	65,3 ± 0,9 abc	27,5 ± 4,1 abcd	52,7 ± 9,5 ab	34 ab
<i>Llano del Beal</i>	9	Control	65,6 ± 1,4 abc	21,5 ± 0,5 bc	82,4 ± 5,5 a	21 ab
	9	Sequía	54,4 ± 1,4 def	20,3 ± 1,9 cd	81,3 ± 5,7 a	20 ab
	16	Control	54,8 ± 1,2 def	21,4 ± 3,5 cd	51,9 ± 15,1 ab	29 ab
	16	Sequía	61,1 ± 1,8 cde	37,9 ± 3,8 ab	71,6 ± 4,7 ab	35 ab
<i>Boca de Tauce</i>	9	Control	61,7 ± 1,8 cde	15,3 ± 1,9 cd	74,7 ± 8,0 ab	17 b
	9	Sequía	53,5 ± 1,7 ef	17,7 ± 1,1 cd	65,0 ± 4,4 ab	21 ab
	16	Control	62,5 ± 0,7 cde	12,8 ± 2,9 d	38,3 ± 3,9 b	25 ab
	16	Sequía	54,3 ± 2,6 def	20,6 ± 4,8 cd	44,9 ± 8,5 ab	31 ab
<i>La Perdiz</i>	9	Control	54,0 ± 0,9 ef	16,0 ± 1,5 cd	74,4 ± 6,5 ab	18 b
	9	Sequía	37,0 ± 1,6 g	17,1 ± 1,3 cd	73,6 ± 9,1 ab	19 ab
	16	Control	50,2 ± 1,2 f	12,7 ± 2,6 d	43,5 ± 12,1 ab	27 ab
	16	Sequía	40,1 ± 1,6 g	30,4 ± 6,8 abc	57,6 ± 9,7 ab	35 ab
		Sig.	<0,01	<0,01	<0,01	0,04

Para ver el análisis factorial, ver tabla A.4. en Anexos.

4.3.5. Compuestos nitrogenados

Al tratarse *B. bituminosa* de una leguminosa, su contenido en nitrógeno puede darnos información de su capacidad para incorporar nitrógeno atmosférico. Tras la cosecha, se comprobó la presencia de numerosos nódulos con apariencia activa (ver Fotografías 1.3.2. en Introducción): esféricos, de color blanco-marrón con lenticelas exteriormente, y color rojo-rosado en su interior. Sólo en *La Perdiz* hubo un descenso significativo en la concentración de N en parte aérea tras 16 días sin riego, pero el contenido de N (concentración x biomasa) no se vio afectado significativamente. En ningún caso hubo efecto significativo de la sequía en la concentración tisular de NH_4^+ .

El día 16 sin riego, todas las poblaciones aumentaron su contenido de prolina unas 9-43 veces (*Llano del Beal* > *La Perdiz* > *Famara* > *Boca de Tauce*), alcanzando valores en una de las réplicas de $60,3 \mu\text{mol g}^{-1}\text{PS}$ (20,9 mM en H_2O de tejido) en la población del *Llano del Beal*.

Tabla 4.3.5.- Concentración (%) y cantidad de N (mg planta⁻¹), y concentración (μmol g⁻¹PS) de NH₄⁺ y aminoácidos (excluyendo Pro) y contenido de Prolina, en la parte aérea de las plantas del ensayo en maceta.

Población	Día	Tratamiento	N (%)	Cantidad N [N]*PS	NH ₄ ⁺	AAs	Pro	Sig.
<i>Fomara</i>	9	Control	3,36 e f g h	39,6 ± 3,2 abcd	12,4 ± 0,6 b	29,7 ± 2,6	1,02 ± 0,13 e	
	9	Sequía	3,35 e f g	44,0 ± 3,5 abc	15,1 ± 1,0 ab	37,8 ± 3,1	2,15 ± 0,79 cde	
	16	Control	2,69 h	55,5 ± 3,7 a	17,0 ± 2,7 ab	30,5 ± 5,3	4,08 ± 1,35 c	
	16	Sequía	2,86 g h	46,5 ± 4,7 abc	20,6 ± 3,6 ab	20,4 ± 11,1	21,58 ± 2,88 ab	
<i>Llano del Beal</i>	9	Control	3,80 c d e f	31,9 ± 5,3 cd	15,3 ± 0,6 ab	31,1 ± 6,1	1,14 ± 0,08 de	
	9	Sequía	4,39 abc	35,0 ± 3,0 bcd	20,8 ± 2,1 ab	60,9 ± 23,2	1,54 ± 0,24 cde	
	16	Control	3,27 f g h	45,7 ± 1,8 abc	23,0 ± 6,6 ab	18,4 ± 8,9	1,41 ± 0,10 cde	
	16	Sequía	3,47 d e f g	41,2 ± 2,6 abcd	23,5 ± 0,6 ab	19,2 ± 6,8	49,05 ± 5,79 a	
<i>Boca de Touce</i>	9	Control	3,87 b c d e	39,9 ± 1,0 abcd	14,7 ± 0,3 ab	38,2 ± 7,2	1,05 ± 0,04 e	
	9	Sequía	3,80 c d e f	42,3 ± 5,3 abcd	16,6 ± 0,8 ab	47,9 ± 9,6	1,45 ± 0,16 cde	
	16	Control	3,62 d e f	50,9 ± 4,5 ab	13,8 ± 0,7 b	35,9 ± 4,6	1,65 ± 0,24 cde	
	16	Sequía	3,15 f g h	42,4 ± 5,3 abcd	17,3 ± 0,8 ab	53,8 ± 13,3	9,61 ± 1,83 b	
<i>La Perdiz</i>	9	Control	4,73 abc	26,1 ± 1,4 d	20,8 ± 0,9 ab	41,6 ± 7,6	1,68 ± 0,28 cde	
	9	Sequía	4,91 a	31,6 ± 1,3 cd	22,3 ± 2,0 ab	67,3 ± 19,5	3,26 ± 0,91 cd	
	16	Control	4,97 a	38,2 ± 1,5 abcd	22,0 ± 0,7 ab	43,8 ± 5,3	1,68 ± 0,14 cde	
	16	Sequía	4,00 b c d	37,5 ± 1,6 bcd	25,8 ± 2,0 a	53,7 ± 20,7	31,69 ± 7,68 a	
			< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,09	< 0,01	

Para ver el análisis factorial, ver tabla A.6. en Anexos.

4.3.6. Relaciones hídricas

En maceta, *Famara* fue la única población que ya había disminuido su contenido relativo de agua (CRA) a los 9 días tras el cese del riego. El día 16, todas manifestaron una disminución significativa del CRA, por debajo del 69%. El Ψ_w no se modificó significativamente el día 9, pero se vio fuertemente reducido a los 16 días para todas las poblaciones. *Llano del Beal* alcanzó el menor Ψ_w (-1,64 MPa), tanto en valor neto como en relación a su control. *Famara* fue la que presentó los valores más altos y más cercanos a su control. De nuevo, *Llano del Beal* fue la que modificó más su Ψ_s , aunque todas las demás también lo hicieran para el segundo día de análisis. El Ψ_p no disminuyó en ningún caso por debajo de los niveles de los controles. El Ψ_p el día 9 fue significativamente mayor para *Famara*, y el día 16 para *Famara* y *La Perdiz*, las dos accesiones con el mayor AO (valores negativos). Destaca que *Famara* sea menos capaz de modificar su Ψ_w , mientras *Llano del Beal* es la que más variación experimenta. Por esta razón se eligieron estas dos poblaciones para el posterior ensayo en hidropónico.

En la medida de solutos, las mayores contribuciones al Ψ_s (ver Tabla 4.3.6.b.) fueron de los cationes inorgánicos, especialmente Ca y K, pero en plantas expuestas a sequía su contribución fue algo menor, mientras que la de azúcares y AAs incrementara. Frente a sequía, la contribución al Ψ_s por parte del K y del Mg aumentó en *Boca Tauce*, disminuyó en *Llano del Beal* para los elementos Mg y Na, y en *Famara* para K y Mg. De todos los elementos que pudieron participar en el AO analizados (ver tabla 4.3.6.b.), la prolina presentó modificaciones en su concentración por la acción del estrés más severo, el segundo día de ensayo. Participó con un bajo % sobre el potencial osmótico, con respecto a otros cationes orgánicos. Dicho cambio ocurrió en todas las poblaciones, aunque el análisis de efectos intersujetos indica que cada población también respondió de manera diferente (ver tabla A.5 del Anexo), con *Llano del Beal* con el más elevado % de participación, *La Perdiz* y *Famara* con % intermedios (1,2 y 1,07, respectivamente), y *Boca de Tauce* con la menor participación de la Pro en el AO (0,42%). El hecho de que este efecto no se aprecie en la participación de los AAs totales, indica que el aumento de la participación de la prolina no depende de un aumento generalizado de la liberación de AAs hasta el citoplasma, sino de una activación en concreto para la prolina.

Tabla 4.3.6.a.- Relaciones hídricas de las plantas del ensayo en maceta. Los valores de %CRA fueron transformados (aseno ($\sqrt{(x/100)}$)), mientras que los ψ_w y ψ_s fueron transformados ($\log(-x)$) para cumplir normalidad y homogeneidad de varianzas.

Población	Día	Tratamiento	CRA %	ψ_w MPa	ψ_s MPa	ψ_p MPa	AO	
<i>Fomara</i>	9	Control	92,0 a	-0,28 ± 0,03 cd	-0,71 ± 0,05 c	0,43 ± 0,07 cd		
	9	Sequía	82,8 c	-0,21 ± 0,01 d	-0,92 ± 0,08 c	0,71 ± 0,07 bc	-0,096 ab	
	16	Control	91,5 ab	-0,20 ± 0,02 d	-0,86 ± 0,08 c	0,66 ± 0,09 bcd		
	16	Sequía	60,1 d	-0,39 ± 0,07 cd	-1,63 ± 0,06 a	1,24 ± 0,04 a	-0,194 ab	
	9	Control	85,8 abc	-0,33 ± 0,03 cd	-0,78 ± 0,03 c	0,46 ± 0,02 cd		
	9	Sequía	83,7 c	-0,35 ± 0,04 cd	-0,77 ± 0,03 c	0,42 ± 0,05 cd	0,029 a	
<i>Llano del Beal</i>	16	Control	87,5 abc	-0,47 ± 0,06 bc	-0,90 ± 0,06 c	0,43 ± 0,05 cd		
	16	Sequía	46,3 e	-1,64 ± 0,11 a	-1,97 ± 0,05 a	0,33 ± 0,14 d	-0,132 ab	
	9	Control	89,4 abc	-0,24 ± 0,02 d	-0,75 ± 0,02 c	0,51 ± 0,03 cd		
	9	Sequía	91,0 ab	-0,27 ± 0,06 d	-0,75 ± 0,03 c	0,49 ± 0,03 cd	-0,015 a	
	16	Control	85,9 abc	-0,33 ± 0,04 cd	-0,87 ± 0,05 c	0,55 ± 0,09 cd		
	16	Sequía	68,5 d	-0,74 ± 0,09 b	-1,23 ± 0,09 b	0,49 ± 0,11 cd	-0,075 a	
<i>La Perdiz</i>	9	Control	84,4 bc	-0,30 ± 0,04 cd	-0,73 ± 0,04 c	0,43 ± 0,06 cd		
	9	Sequía	83,2 c	-0,29 ± 0,03 cd	-0,77 ± 0,02 c	0,48 ± 0,04 cd	-0,018 a	
	16	Control	86,7 abc	-0,31 ± 0,03 cd	-0,87 ± 0,04 c	0,57 ± 0,04 cd		
	16	Sequía	59,3 d	-0,82 ± 0,07 b	-1,82 ± 0,11 a	1,00 ± 0,08 ab	-0,307 b	
			Sig.	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

Para ver el análisis factorial, ver tabla A.7. en Anexos.

Tabla 4.3.6.b.- Contribución de los azúcares, Pro, AA, NH₄ y cationes principales al potencial osmótico. Los valores fueron transformados (aseno (V(x/100))) antes del análisis estadístico.

Población	Día	Tratamiento	% Potencial Osmótico									
			Azúcar	Prolina	NH ₄ ⁺	AAs	Ca	K	Mg	Na	P	
<i>Famara</i>	9	Control	7,01 bcd	0,08 d	0,88	2,22	29,36	40,12 a	11,31 abcde	0,86 bcde	5,63	
	9	Sequía	6,12 bcde	0,1 cd	0,75	2	23,41	30,92 ab	8,35 def	0,67 cdef	4,59	
	16	Control	12,85 a	0,26 cd	1,02	1,99	23,33	25,46 ab	8,48 def	0,87 bcde	3,84	
<i>Llano del Beal</i>	16	Sequía	7,59 bc	1,07 b	1,02	2,1	21,62	22,87 b	7,34 ef	0,7 cdef	3,76	
	9	Control	5,46 bcde	0,05 d	0,7	1,49	22,28	30,76 ab	8,43 def	0,75 bcdef	4,46	
	9	Sequía	4,86 bcde	0,07 d	0,9	2,76	20,23	26,95 ab	7,71 def	0,46 def	4,36	
<i>Boca de Tauce</i>	16	Control	5,28 bcde	0,07 d	1,07	0,93	23,44	27,51 ab	9,54 bcdef	0,65 cdef	4,29	
	16	Sequía	8,74 ab	2,05 a	0,97	2,87	18,01	24,26 b	6,39 f	0,32 f	3,75	
	9	Control	3,65 de	0,05 d	0,64	1,72	22,88	25,42 ab	14,49 ab	1,68 a	5,76	
<i>La Perdiz</i>	9	Sequía	4,21 cde	0,06 d	0,71	2,08	20,41	24,25 b	13,56 abc	1,49 ab	5,38	
	16	Control	3,06 e	0,07 d	0,58	1,62	17,94	19,04 b	12,35 abcd	1,19 abc	4,24	
	16	Sequía	4,87 bcde	0,42 c	0,75	2,73	23,92	29,06 ab	15,85 a	0,93 abcde	5,74	
<i>La Perdiz</i>	9	Control	3,75 cde	0,07 d	0,89	1,94	19,99	25,41 ab	9,18 cdef	0,91 abcd	4,09	
	9	Sequía	3,94 cde	0,14 cd	0,92	2,95	22,01	22,88 b	10,3 abcdef	1,52 ab	4,68	
	16	Control	2,79 e	0,07 d	0,87	1,79	20,63	30,49 ab	9,61 bcdef	0,34 ef	4,86	
16	Sequía	6,27 bcde	1,2 b	0,97	3,24	16,98	19,94 b	8,16 def	0,32 f	4,3		
Sig.			<0,01	<0,01	0,11	0,39	0,10	<0,01	<0,01	<0,01	0,01	

Para ver el análisis factorial, ver tabla A.5. en Anexos.

4.3.7. Nutrientes minerales

Cabe destacar del ensayo en maceta que *Boca de Tauce* experimentó un ascenso significativo en la concentración de Ca, K y P el día 16 sin riego, y que *Llano del Beal* también pero el día 9 para Ca, Mg, Na y P. Estos aumentos no pudieron haber ocurrido únicamente como consecuencia directa de la inhibición del crecimiento en función de la cantidad/biomasa, lo que supondría que al bajar la biomasa, aumentara la concentración, ya que dicho efecto hubiera afectado a todos los elementos de la misma manera. La concentración de K no cambió por acción del tratamiento con sequía en las poblaciones *Famara* y *La Perdiz*. Cuando se expresan las concentraciones de cationes en $\text{mmol l}^{-1}\text{H}_2\text{O}$ tisular (datos mostrados en tabla A.9. del Anexo), se aprecia un aumento en todos los cationes en todas las variedades el día 16, quizás aún más exagerado por la propia deshidratación de las hojas (CRA). Para el P, en *Famara* y *La Perdiz*, la concentración bajó con el tiempo.

Tabla 4.3.7.- Concentraciones ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{PS}$) de cationes y P en plantas de *B. bituminosa* en el ensayo en maceta.

Población	Día	Tratamiento	Ca	K	Mg	Na	P
<i>Famara</i>	9	Control	411 ± 16 def	577 ± 11 bcdefg	158 ± 7 ef	13,1 ± 1,2 cd	80 ± 4 efg
	9	Sequía	467 ± 15 bcde	619 ± 17 bcdef	167 ± 4 ef	13,1 ± 2,1 cd	92 ± 2 cdef
	16	Control	382 ± 8,1 ef	420 ± 4 fg	139 ± 6 f	14,4 ± 0,7 cd	63 ± 1 g
	16	Sequía	436 ± 18 cdef	461 ± 7defg	148 ± 4 f	14,2 ± 1,0 cd	76 ± 2 fg
<i>Llano del Beal</i>	9	Control	458 ± 26 bcdef	585 ± 40 bcdefg	211 ± 17 bcde	20,9 ± 3,0 bcd	94 ± 3 cdef
	9	Sequía	531 ± 30 bc	554 ± 58 bcdefg	249 ± 12 bc	36,6 ± 3,7 a	113 ± 6 bc
	16	Control	506 ± 2,6 bcd	752 ± 19 ab	236 ± 3 bcd	8,6 ± 1,7 d	119 ± 2 ab
	16	Sequía	458 ± 10 bcdef	533 ± 53 cdefg	220 ± 8 bcd	8,3 ± 1,5 d	116 ± 3 abc
<i>Boca de Tauce</i>	9	Control	533 ± 27 bc	734 ± 25 abc	202 ± 13 cde	18,1 ± 1,7 cd	106 ± 5 bcd
	9	Sequía	481 ± 15 bcde	635 ± 61 bcde	184 ± 9 def	11,1 ± 5,1 cd	103 ± 4 bcde
	16	Control	559 ± 8,2 b	665 ± 23 bcd	227 ± 8 bcd	15,1 ± 2,0 cd	102 ± 4 bcde
	16	Sequía	678 ± 34 a	911 ± 30 a	241 ± 11 bc	13,0 ± 3,6 cd	139 ± 9 a
<i>La Perdiz</i>	9	Control	481 ± 34 bcde	536 ± 55 cdefg	305 ± 14 a	35,6 ± 1,2 a	121 ± 9 ab
	9	Sequía	459 ± 34 bcdef	545 ± 38 bcdefg	304 ± 11 a	33,4 ± 1,3 ab	120 ± 2 ab
	16	Control	374 ± 25 ef	390 ± 89 g	258 ± 10 ab	25,2 ± 2,6 abc	88 ± 4 def
	16	Sequía	348 ± 28 f	430 ± 28 efg	233 ± 11 bcd	13,7 ± 5,6 cd	83 ± 3 defg
Sig.			<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

Para ver el análisis factorial, ver tabla A.8. en Anexo.

4.3.8. Furanocumarinas (FCs)

Aunque la tendencia general de la concentración de psoraleno en la parte aérea de las plantas fuera la de aumentar como resultado del estrés hídrico, no se detectaron diferencias significativas por acción del tratamiento. Comparando las poblaciones canarias con las peninsulares, la concentración de psoraleno fue más elevada en las poblaciones canarias y más baja en cuanto a la angelicina.

Tabla 4.3.8.- Contenido de las principales FCs ($\mu\text{g g}^{-1}\text{PS}$) el día 16 desde el comienzo del tratamiento de sequía, y el % de cada uno respecto el total de FCs. Los valores de % fueron transformados (aseno ($\sqrt{x/100}$)) para asegurar normalidad.

Población	Tratamiento	Psoraleno	Angelicina	%Psoraleno	%Angelicina
<i>Famara</i>	Control	2703 \pm 438 ab	2162 \pm 372 ab	56 \pm 2 a	44 \pm 2 c
	Sequía	2834 \pm 241 a	1830 \pm 497 ab	62 \pm 7 a	38 \pm 6 c
<i>Llano de Beal</i>	Control	1375 \pm 32 c	2975 \pm 106 a	32 \pm 1 c	68 \pm 1 a
	Sequía	1672 \pm 216 c	3052 \pm 216 a	35 \pm 1 c	65 \pm 2 a
<i>Boca de Tauce</i>	Control	1827 \pm 181 bc	1488 \pm 158 b	55 \pm 4 ab	45 \pm 4 bc
	Sequía	2170 \pm 60 abc	1714 \pm 158 ab	56 \pm 3 a	44 \pm 3 c
<i>La Perdiz</i>	Control	1199 \pm 126 c	2827 \pm 121 ab	29 \pm 2 c	71 \pm 2 a
	Sequía	1309 \pm 89 c	2397 \pm 453 ab	37 \pm 7 bc	63 \pm 7 ab
Sig.		<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

Para ver el análisis factorial, ver Tabla A.10. en Anexo.

5. CAPITULO II: Ensayo de sequía en parcela

5.1. Objetivos específicos

- Cultivar las mismas cuatro poblaciones de *B. bituminosa* del ensayo en maceta en un ensayo de campo, donde estén expuestas no sólo al estrés hídrico, sino a condiciones estivales reales, incluyendo altas temperaturas y alta intensidad lumínica.
- Determinar la tolerancia relativa de dichas poblaciones, como la producción de biomasa aérea en relación con plantas control (regadas).
- Determinar los mecanismos fisiológicos que demuestran la adaptación de las plantas al estrés hídrico y que expliquen posibles diferencias entre poblaciones.
- Comparar el comportamiento de las plantas entre condiciones controladas y de campo.

5.2. Procedimientos ensayo sequía en parcela

Semillas de las mismas cuatro poblaciones del ensayo en maceta (ver Tabla 3. en Materiales y Métodos) fueron sembradas el 28/02/2008 en macetas con suelo tamizado (2 mm) procedente de la parcela (ver características en Tabla 3.1.a.), donde serían trasplantadas el 8/04/2008. Las macetas se mantuvieron en cámara de cultivo (11h luz/13h oscuridad, 23/19°C respectivamente, densidad de flujo de fotones fue aproximadamente $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, humedad relativa a 60%) hasta dos semanas antes de su trasplante, para someter a las plantas a un proceso de aclimatación en umbráculo.

El suelo de la parcela fue preparado mediante adición de fertilizante sólido N:P:K 15:15:15 ($130 \text{ Kg ha}^{-1} = 23,4 \text{ g subparcela}^{-1}$) y de sustrato universal tipo turba (Kekkilä Iberia S.L., Almería, España; N=120 mg l⁻¹, P=90 mg l⁻¹, K=50 mg l⁻¹, pH 5,5) con una dosis de 16 g PS de sustrato planta⁻¹. Las plantas fueron trasplantadas en cuatro hileras según población, creado ocho subparcelas o bloques de $1,8 \text{ m}^2$ (1m x 1,80m) cada uno, de los cuales, cuatro serían controles con aporte de riego (en azul en el diagrama), y los otros cuatro serían los bloques sin riego expuestos a la sequía natural propia del verano (ver Figura 5.2.a.). Cada hilera estaba constituida por 8 plantas con 20 cm entre planta y planta, situada a 25 cm de la siguiente, y con 50 cm entre cada bloque. Se regó a mano con agua convencional del grifo cada dos días.

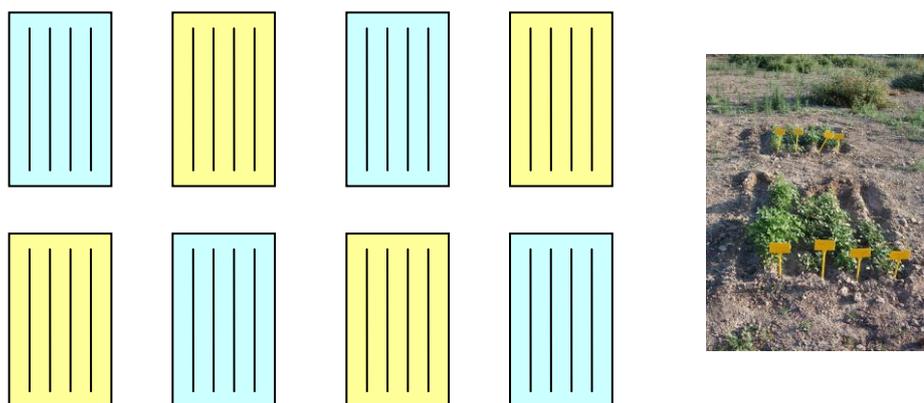


Figura 5.2.a.- Esquema de la disposición y estructura del ensayo de campo. En azul los bloques regados, y amarillos los no regados. Fotografía de uno de los bloques (izquierda).

Tabla 5.2.a.- Análisis por ICP del agua del grifo con el que se regaron las macetas (LD = límite de detección).

Elemento	Agua del grifo
pH	8,8
CE	0,88 dS m ⁻¹
Ca	2,75 mM
K	0,06 mM
Mg	3,37 mM
Na	2,99 mM
P	<LD
Cu	<LD
Otros MPs	<LD

Sesenta y cuatro días desde el trasplante a suelo, el 11/6/08, se produjo un evento de lluvia que supuso el último aporte de agua para los bloques que se someterían a estrés hídrico. El 16/6/2008 se midió la biomasa por peso fresco/seco de la mitad de las plantas por hilera para utilizar ese valor como biomasa de partida de las plantas, para la posterior comparación del crecimiento de cada una de ellas respecto de sí misma mediante la medida del TCR entre los días 5 y 35 desde el comienzo del tratamiento de sequía. Para asegurar un correcto almacenamiento hasta la determinación del PF de la masa foliar, se transportaron las plantas al laboratorio lo más rápido posible en una nevera utilizando capas de papel húmedo para mantener la humedad (Ryser y col., 2008).

En los bloques con tratamiento control, se prosiguió con el riego de manera rutinaria usando 4 l de agua por caballón de plantas. Se tomaron tres muestras del suelo por bloque antes de cada riego para determinar su contenido en agua (ver Figura 5.2.b.).

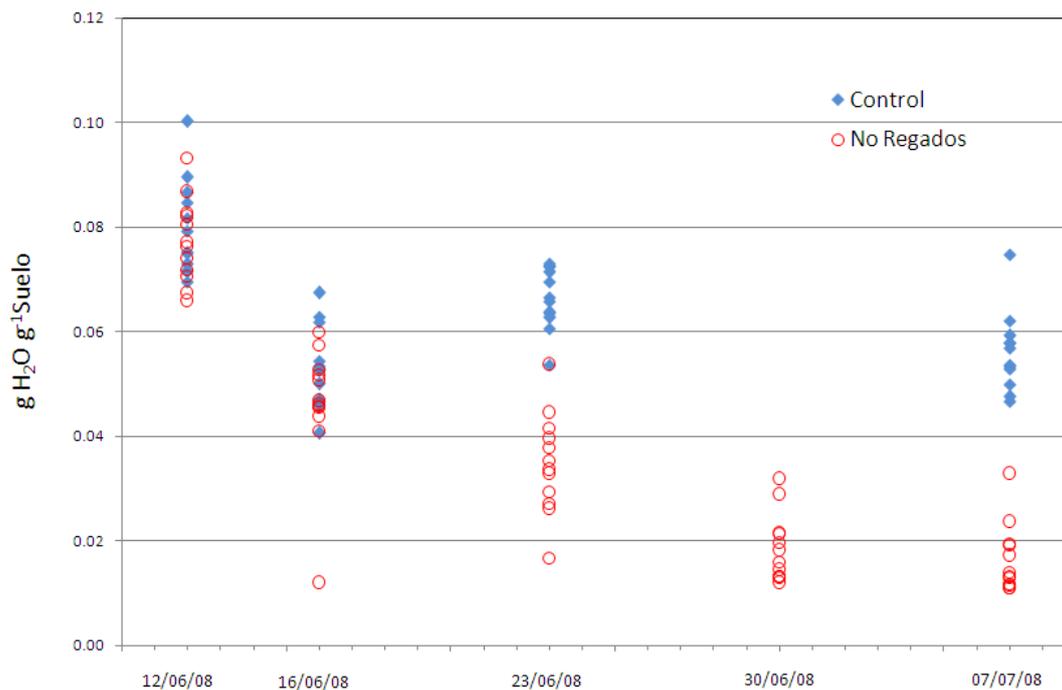


Figura 5.2.b.- Contenido de agua en el suelo de las parcelas regadas (azul) y no regadas (rojo).

Tabla 5.2.a.- Resumen de datos de la estación meteorológica del IMIDA MU62 de la red meteorológica del SIAM (situada a 30 m del ensayo) durante el desarrollo del ensayo en parcela, medidas entre el 08/04/2008 (trasplante a campo) y el 16/07/2008 (última cosecha de plantas).

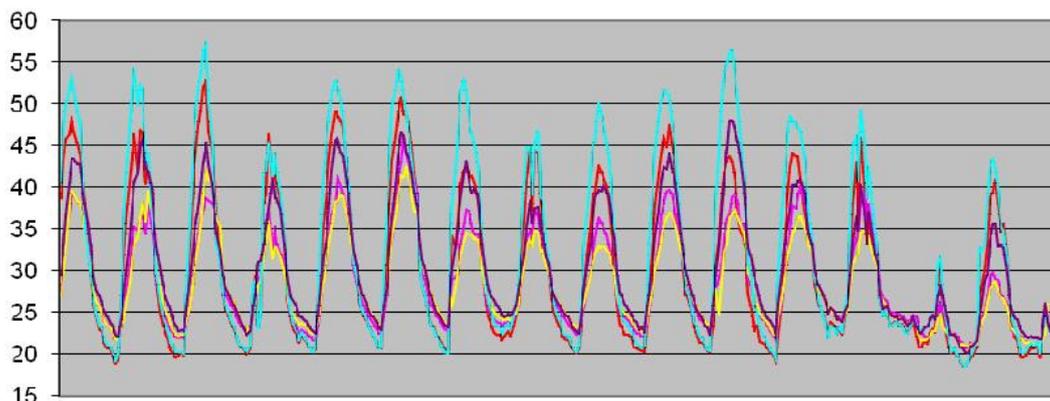
Estación: MU62

MUNICIPIO: Murcia PARAJE: La Alberca

Periodo: 08/04/2008 al 16/07/2008

ETO (mm) FAO		487
Horas de Sol (h) día ⁻¹		10,9
Precipitación (mm)		103,6
Radiación Neta (W m ⁻²) día ⁻¹		374,4
Velocidad Viento Media (m s ⁻¹)		1,3
Temperatura	Máxima (°C)	27,2
	Media (°C)	21,7
	Mínima (°C)	16,2
Humedad Relativa	Máxima (%)	75,4
	Media (%)	52,5
	Mínima (%)	30,7

De manera simultánea, se colocaron cuatro data-logger para registrar las temperaturas a nivel de las plantas, colocándolo dos junto a plantas control y dos junto a plantas no regadas. Los detectores registraron temperaturas máximas de 57,4°C, y mínimas de 18,4°C (ver Figura 5.2.c.). Además, uno de cada tipo se colocó a la sombra de la planta, para comprobar cuánto disipa la temperatura la propia planta sobre el suelo donde crecen sus raíces, lo que reducirá la tasa de evaporación de agua.



	Control			
	Control Luz	Sombra	No Reg Luz	No Reg Sombra
Tª Media Mediodía (12-15h)	41,7	28,7	46,7	38,4
Tª Media Más Frías (4-7h)	20,9	23,6	21,1	23,2

Figura 5.2.c.- Ciclos de temperatura a los que estuvieron expuestas las plantas los 15 días antes de la cosecha. Las temperaturas medias de cada data-logger aparecen en la tabla.

A los 23 días desde la última lluvia se midió el Ψ_w y el CRA, pero al no detectarse potenciales muy negativos, se decidió esperar 12 días más para la cosecha de las plantas. Finalmente, transcurridos 35 días desde el último evento de lluvia, se midió el Ψ_w , CRA y se procedió a la determinación de la biomasa por PF y PS. Todos los parámetros evaluados en el ensayo en campo (aminoácidos y azúcares, relaciones hídricas, cationes y P, y AFE) siguieron el mismo procedimiento que en el ensayo en maceta. Además, se determinó el P y K disponible para las plantas en el suelo (extractables con 0,5 M NaHCO₃ y 10 mM NaNO₃ respectivamente, ver sección 3.3.3. en Materiales y Métodos).

Tabla 5.2.b.- Resumen cronológico de las actuaciones que se realizaron para la ejecución del ensayo de sequía en parcela.

Día	Fecha	Operación
	28/02/2008	Siembra semillas de las 4 poblaciones en maceta con suelo tamizado 2mm. 25 semillas por maceta X 4 macetas X 4 poblaciones.
	24/03/2008	Traspaso al umbráculo de las macetas.
	08/04/2008	Trasplantación al campo de las 4 poblaciones en parcela IMIDA.
	16/04/2008	Adición de 16 g Ps planta ⁻¹ de sustrato universal Kekkilä Fertilización N:P:K (15:15:15). Riego con agua de riego cada 2 días.
Día 0	11/06/2008	Llueve por última vez.
Día 1	12/06/2008	Retirada de malas hierbas a mano. Primera toma de muestras de suelo para determinar contenido de H ₂ O.
Día 5	16/06/2008	Segunda toma de muestras de suelo. Cosecha de plantas de cada población determinación PF y PS → TCR Riego de las parcelas Control con 4L por caballón = 20 L/parcela. Desde entonces se riega 3 veces por semana las plantas control.
Día 12	23/06/2008	Tercera recogida de muestras de suelo.
Día 19	30/6/2008	Cuarta recogida de muestras de suelo, sólo de las no regadas.
Día 23	04/07/2008	Medida del P _w y CRA → AFE
Día 34	15/07/2008	Medida del P _w y CRA → AFE
Día 35	16/07/2008	Cosecha de las plantas → TCR

5.3. Resultados

5.3.1. Condiciones edáficas

Para comprobar que no aparecieran diferencias respecto a otros parámetros al haber aportado agua a los controles y no a los no regados, se analizaron parámetros como CE o la disponibilidad de N, P y K, sin que aparecieran diferencias al final del ensayo a pesar de las sales añadidas en el agua de riego. Después de 30 días, en las subparcelas no regadas, el contenido gravimétrico de agua se redujo significativamente ($0,02 \text{ g H}_2\text{O g suelo}^{-1}$) comparado con el suelo control ($0,06 \text{ g H}_2\text{O g suelo}^{-1}$) (ver tabla a continuación).

Tabla 5.3.1.- Características del suelo (primeros 20 cm) al final del ensayo de campo en parcela. Para cada bloque, tres submuestras fueron combinadas antes del análisis.

Tratamiento	g H ₂ O g suelo ⁻¹	%WHC	% agua disponible	CE (dS m ⁻¹)	N total (%)	K Disponible (μg g ⁻¹ soil)	P Disponible (μg g ⁻¹ soil)
Control	0,06	17,39	30,7	3,08	0,12	48,1	37,3
Sequía	0,02	5,79	10,2	3,26	0,13	51,6	39,1
Sig.	<0,01	<0,01	<0,01	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

5.3.2. Crecimiento de la parte aérea

La producción de biomasa se vio reducida por la sequía en cada población. Aunque la producción de PS tras 35 días sin regar se redujo un 35-53% respecto las plantas regadas, los efectos no fueron significativos ($P = 0,13$) debido a la alta variación. Como en el ensayo de maceta, *La Perdiz* fue la población con la menor biomasa. Al ordenar el PS de las plantas sometidas a sequía en términos absolutos, de importancia desde el punto de vista forrajero, este orden fue el mismo que en el ensayo en maceta; *Famara* > *Boca de Tauce* = *Llano del Beal* > *La Perdiz* (ver Figura 5.3.2.).

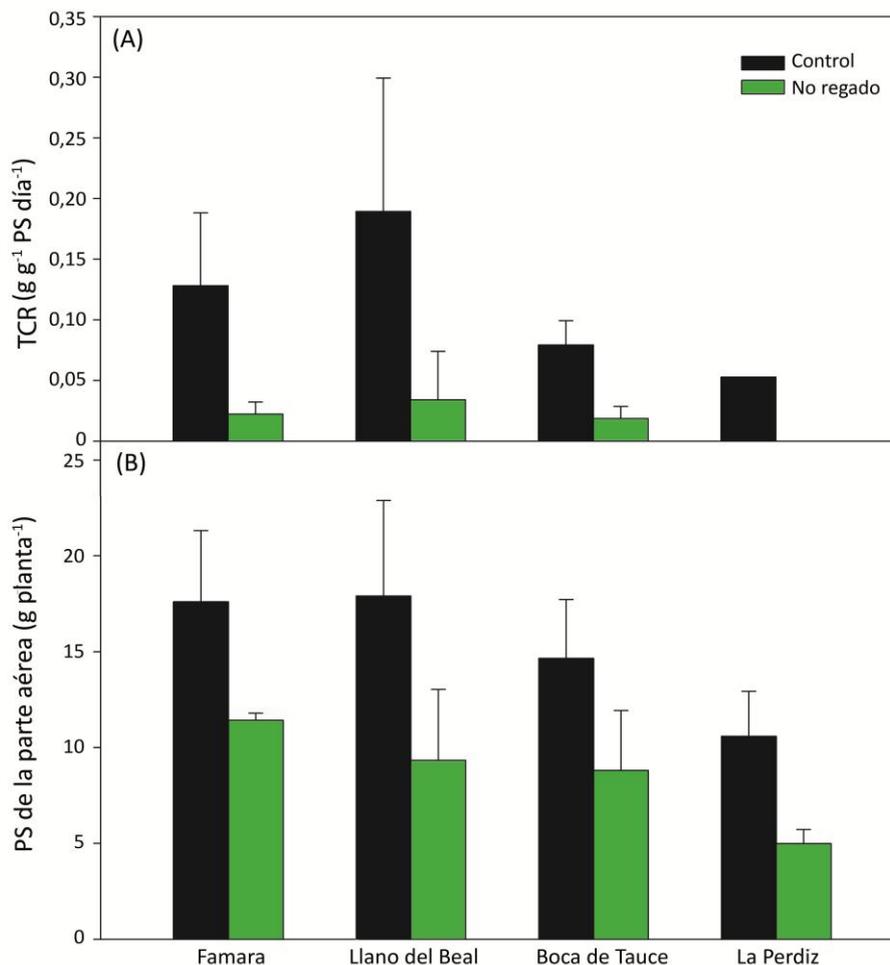


Figura 5.3.2.- (A) Tasa de crecimiento relativa (TCR) de la parte aérea entre los días 5 y 35 del ensayo en la estación experimental de IMIDA durante el verano de 2008. **(B)** Peso seco de la parte aérea de las plantas a los 35 días del comienzo del tratamiento.

Sin embargo, al expresar el PS de cada población como % de sus control, encontramos que *Famara* (65%) > *Boca de Tauce* (60%) > *Llano del Beal* (52%) > *La Perdiz* (47%), con un orden prácticamente opuesto al que apareció en el ensayo de maceta, de modo que aquí, las poblaciones de mayor biomasa redujeron menos su producción de PS que las más pequeñas.

Hubo una disminución de la tasa de crecimiento relativo (Figura 5.3.2.A.) entre los días 5 y 35 (crecimiento) con el tratamiento, de 86, 84 y 75% para *Famara*, *Llano del Beal* y *Boca de Tauce*, respectivamente, en comparación con las plantas regadas. Sin embargo, al determinar la TCR de las plantas expuestas a sequía de *La Perdiz*, dicho parámetro resultó ser negativo (-0,01), debido a la pérdida de hojas, un mecanismo de

esta población para reducir la pérdida de agua por transpiración. Se pudo apreciar también que las plantas de cada población realizaban movimientos de sus hojas durante las horas de mayor intensidad lumínica para reducir la superficie foliar expuesta, y reducir de este modo la pérdida de agua por evapotranspiración (ver Fotografía 5.3.2.). Este efecto fue mucho más aparente en las plantas que no recibían aporte hídrico.

Tabla 5.3.2.- Peso fresco (g PF) y %MS planta⁻¹ al final del ensayo en parcela tras 35 días desde el comienzo del tratamiento (regar o no regar).

Población	Tratamiento	PF(g) planta ⁻¹	%MS
<i>Famara</i>	Control	86,55 ± 16,84 ab	20,34 ab
	Sequía	42,87 ± 3,58 ab	26,65 a
<i>Llano del Beal</i>	Control	98,48 ± 20,04 a	18,19 b
	Sequía	37,11 ± 12,76 b	25,17 ab
<i>Boca de Tauce</i>	Control	83,36 ± 14,50 ab	17,58 b
	Sequía	40,03 ± 10,23 ab	22,00 ab
<i>La Perdiz</i>	Control	66,65 ± 11,09 ab	15,89 b
	Sequía	27,88 ± 2,42 b	17,92 b
Sig.		0,004	0,001

Para ver el análisis factorial, ver tabla A.11. en Anexos.

5.3.3. Área Foliar Específica (AFE)

La sequía redujo la AFE en todas las poblaciones (no significativamente en *La Perdiz*), de modo que el mayor porcentaje de reducción encontrado (30%) coincide con el mayor grado de tolerancia de *Famara*. Además, la reducción debido al estrés hídrico fue más pronunciada que en maceta.

Las plantas presentaron hojas más gruesas que las de maceta, con un AFE cuatro o cinco veces más bajo que las del ensayo de maceta. Para ambos ensayos, y comparando el valor del AFE en las situaciones estresantes, el orden de las poblaciones es el mismo: *Famara* > *Llano del Beal* > *Boca de Tauce* > *La Perdiz*, lo se correlaciona bien con el orden de tolerancia en campo.

Tabla 5.3.3.- Área foliar específica de las plantas del ensayo de campo para los días 23 y 34 desde el comienzo del tratamiento.

Población	Día	Tratamiento	AFE m ² Kg ⁻¹ PS
<i>Famara</i>	23	Control	13,6 ± 0,2 abc
	23	Sequía	11,2 ± 0,2 cde
	34	Control	15,5 ± 0,7 a
	34	Sequía	10,6 ± 0,1 def
<i>Llano del Beal</i>	23	Control	11,2 ± 0,6 cde
	23	Sequía	10,6 ± 0,5 de
	34	Control	14,3 ± 0,7 ab
	34	Sequía	9,8 ± 0,4 def
<i>Boca de Tauce</i>	23	Control	10,7 ± 0,7 de
	23	Sequía	8,8 ± 0,1 ef
	34	Control	12,4 ± 0,7 bcd
	34	Sequía	9,5 ± 0,5 ef
<i>La Perdiz</i>	23	Control	7,9 ± 0,5 f
	23	Sequía	8,7 ± 0,5 ef
	34	Control	10,5 ± 0,3 def
	34	Sequía	8,7 ± 0,2 ef
Sig.			<0,01

Para ver el análisis factorial, ver tabla A.12. en anexos.

5.3.4. Azúcares y almidón

La sequía no modificó significativamente la concentración de azúcar expresado en PS ($29-46 \text{ g Kg}^{-1}$), disminuyendo dicha concentración en el orden *Famara* > *Llano del Beal* > *Boca de Tauce* > *La Perdiz*, y con valores superiores que los observados en el ensayo en maceta. En lugar de lo que pasó en las macetas, el porcentaje de la glucosa presente como azúcares solubles bajó frente a sequía en todas las poblaciones a excepción de *La Perdiz*. Aparecen incrementos significativos para concentraciones de azúcares y almidón en el agua de los tejidos (mmol l^{-1}), lo cual es más relevante para el AO. El orden de acuerdo al incremento en la concentración de azúcar fue: *Llano del Beal* (78%) > *Famara* (77%) > *Boca de Tauce* (55%) > *La Perdiz* (41%) (datos no mostrados). La deshidratación del tejido (%MS) debido a la sequía siguió el mismo orden, con *Famara* y *Llano del Beal* (32%) > *Boca de Tauce* (21%) > *La Perdiz* (13%). La concentración de almidón en la materia seca fue más alta que en maceta y aumentó con la sequía para *Boca de Tauce*.

Tabla 5.3.4.- Azúcar y almidón, en parte aérea de cuatro poblaciones de *B. bituminosa* crecidas en el campo durante 35 días con o sin riego. La última columna representa el % de azúcar respecto a la suma de azúcar y almidón (residuos de glucosa): estos valores fueron transformados (aseno ($\sqrt{x/100}$)) antes del análisis estadístico.

Población	Tratamiento	Azúcar $\text{g Kg}^{-1}\text{PS}$	Almidón $\text{g Kg}^{-1}\text{PS}$	%Azúcar
<i>Famara</i>	Control	$42,8 \pm 2,3 \text{ ab}$	$86,4 \pm 8,1 \text{ b}$	33,1 a
	Sequía	$46,6 \pm 1,8 \text{ a}$	$112,7 \pm 9,4 \text{ b}$	29,3 a
<i>Llano del Beal</i>	Control	$39,8 \pm 0,5 \text{ ab}$	$73,1 \pm 4,3 \text{ b}$	35,3 a
	Sequía	$40,7 \pm 2,1 \text{ ab}$	$111,6 \pm 4,7 \text{ ab}$	26,7 ab
<i>Boca de Tauce</i>	Control	$32,8 \pm 3,1 \text{ ab}$	$97,0 \pm 4,1 \text{ b}$	25,3 ab
	Sequía	$34,6 \pm 3,8 \text{ ab}$	$154,0 \pm 14,0 \text{ a}$	18,4 b
<i>La Perdiz</i>	Control	$28,7 \pm 4,1 \text{ b}$	$86,2 \pm 14,9 \text{ b}$	24,9 ab
	Sequía	$28,9 \pm 3,6 \text{ ab}$	$91,3 \pm 14,1 \text{ b}$	24,0 ab
Sig.		<0,01	<0,01	<0,01

Para ver el análisis factorial, ver tabla A.13. en Anexos.

5.3.5. Compuestos nitrogenados

En parcela, las plantas alcanzaron %N más bajos que durante el ensayo en maceta, pero sin diferencias entre sí ni entre tratamientos (una media global de 2,98%). La ausencia de un cambio en los niveles de N demuestra que para *Famara* y *Llano del Beal*, la inhibición del crecimiento provocada por la sequía no fue debido a una deficiencia del N. *La Perdiz* es la población que consiguió mayores concentraciones en ambos ensayos. El tratamiento causó sólo en *Boca de Tauce* una reducción de la concentración de N, y en todas una disminución en la cantidad de N en la parte aérea por planta, siendo esta más acusada en campo que en maceta. Para *Famara* y *Llano del Beal*, las disminuciones en la cantidad del N fueron debidas a la reducción en el crecimiento mientras para *Boca del Tauce* y *La Perdiz*, fueron debidas a una combinación de disminuciones en la concentración del N y en el crecimiento (58% para *La Perdiz*, 49% para *Boca de Tauce*, 45% para *Llano del Beal* y 30% para *Famara*), ya que *Boca de Tauce* y *La Perdiz* sí que redujeron su %N.



Fotografía 5.3.5.- Cambio de la inclinación foliar en plantas de *B. bituminosa* como respuesta morfológica durante la exposición a sequía-calor. La fotografía muestra una de las plantas de la variedad *crassiuscula* (población *Boca de Tauce*) a medio día durante el ensayo en parcela de sequía (izquierda). Como en el ensayo en maceta, se encontraron numerosos nódulos en las raíces durante la cosecha, con aparente estado activo. Los nódulos eran determinados esféricos, marrón blanquecinos con lenticelas externamente, y rojo-rosados en su interior (derecha).

Tabla 5.3.5.- Compuestos nitrogenados de las plantas (%N; cantidad en mg planta⁻¹) de las cuatro poblaciones al final del ensayo de sequía en parcela. Los valores de % de contenido de N fueron transformados (aseno ($\sqrt{(x/100)}$)) para asegurar normalidad.

Población	Tratamiento	N %	N []*PS	NH ₄ ⁺ μmol g ⁻¹ PS	AA's μmol g ⁻¹ PS	Pro μmol g ⁻¹ PS
<i>Famara</i>	Control	2,27 ± 0,04 e	399,8 ± 90,0	10,57 ± 1,18 ab	24,75 ± 4,25 bc	2,21 ± 0,47 b
	Sequía	2,46 ± 0,04 e	281,5 ± 4,8	8,79 ± 0,33 b	19,66 ± 7,02 c	8,09 ± 3,15 a
<i>Llano del Beal</i>	Control	3,01 ± 0,13 cd	539,5 ± 160,6	13,83 ± 0,96 a	45,15 ± 7,45 a	2,68 ± 0,54 b
	Sequía	3,15 ± 0,14 bc	294,5 ± 122,6	9,64 ± 0,45 b	26,48 ± 9,95 bc	7,74 ± 2,87 ab
<i>Boca de Tauce</i>	Control	3,12 ± 0,08 bc	457,0 ± 97,7	11,69 ± 0,76 ab	36,45 ± 8,75 ab	2,75 ± 0,48 b
	Sequía	2,62 ± 0,08 de	231,0 ± 85,8	9,75 ± 0,63 b	18,50 ± 3,81 c	3,31 ± 0,84 ab
<i>La Perdiz</i>	Control	3,71 ± 0,09 a	406,6 ± 79,6	13,62 ± 0,15 a	54,69 ± 6,71 a	2,24 ± 0,14 b
	Sequía	3,47 ± 0,09 ab	169,9 ± 28,1	11,15 ± 0,94 ab	26,92 ± 3,77 bc	5,23 ± 2,22 ab
Sig.		<0,01	0,15	<0,01	0,01	<0,01

Para ver el análisis factorial, consultar tabla A.14. en Anexos.

Las concentraciones de NH_4^+ fueron más bajas que en maceta, con una tendencia general a disminuir frente a sequía, apareciendo diferencias significativas para dicho descenso en *Llano del Beal* (Tabla 5.3.5.) debidas al tratamiento (Tabla A.13). La sequía redujo la concentración de AAs en todas las poblaciones, en relación con sus respectivos controles, excepto en *Famara*, siendo *La Perdiz* la población que modifica su contenido de AAs significativamente, disminuyendo desde 54,7 a 26,9 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{PS}$. *Famara* fue la única que aumentó sus niveles de prolina con el tratamiento por sequía, aunque los valores alcanzados estuvieron muy por debajo de los alcanzados en maceta.

5.3.6. Relaciones hídricas

En términos absolutos, el descenso del CRA fue mucho menor que en el ensayo en maceta, reflejando una menos severa imposición de la sequía a pesar de que los Ψ_w fueron bastante más bajos. El CRA se midió a los 23 y 35 días desde el último evento de lluvia.

Las dos poblaciones canarias (*Famara* y *Boca de Tauce*) fueron más tolerantes a la sequía en términos de crecimiento, en relación a sus controles, y mostraron los menores descensos en sus Ψ_w . Sólo las dos poblaciones murcianas sufrieron reducciones en sus Ψ_w , con valores muy negativos. *Llano del Beal* fue la única que experimentó una reducción del Ψ_w el día 23 desde el comienzo del tratamiento en relación a su control. Esta población también presentó una inhibición del crecimiento coincidiendo con una reducción de su Ψ_p ($P > 0,05$). Todas sufrieron modificaciones en su Ψ_s , tanto para el día 18 como 30. No se detectaron diferencias significativas ($P = 0,06$) en los valores de AO, aunque, como en el ensayo en maceta, *Famara* y *La Perdiz* mostraron el mayor AO (Tabla 5.3.6.). La caída en el Ψ_s fue similar en todas las accesiones, y consecuentemente Ψ_p no se vio modificado por sequía para las poblaciones murcianas (*Llano del Beal* y *La Perdiz*), pero incrementó para las dos poblaciones canarias (Tabla 5.3.6.).

Tabla 5.3.6.- Estado hídrico de las plantas durante el ensayo en campo medido mediante parámetros fisiológicos a los 23 y 25 días desde el comienzo del tratamiento.

Población	Día	Tratamiento	CRA %	Ψ_w MPa	Ψ_s MPa	Ψ_p MPa	AO
<i>Famara</i>	23	Control	75,9 cde	-0,64 ± 0,19 ab	-1,57 ± 0,04 ab	1,20 ± 0,12 ab	
	23	Sequía	73,2 cde	-0,57 ± 0,25 abc	-2,08 ± 0,04 d	1,38 ± 0,42 ab	-0,333
	35	Control	81,3 bc	-0,53 ± 0,08 a	-1,25 ± 0,09 a	0,72 ± 0,16 ab	
	35	Sequía	77,3 bcde	-1,03 ± 0,33 abc	-2,16 ± 0,10 d	1,16 ± 0,44 ab	-0,654
<i>Llano del Beal</i>	23	Control	81,2 bc	-0,73 ± 0,10 ab	-1,56 ± 0,04 ab	0,83 ± 0,07 ab	
	23	Sequía	72,8 cde	-1,92 ± 0,29 c	-2,13 ± 0,08 d	0,21 ± 0,21 b	-0,152
	35	Control	89,8 a	-0,75 ± 0,06 ab	-1,27 ± 0,02 a	0,52 ± 0,08 ab	
	35	Sequía	71,2 de	-1,72 ± 0,21 abc	-2,23 ± 0,13 d	0,51 ± 0,09 ab	-0,277
<i>Boca de Tauce</i>	23	Control	76,6 cde	-0,38 ± 0,07 a	-1,52 ± 0,01 ab	1,14 ± 0,07 ab	
	23	Sequía	70,0 e	-0,52 ± 0,08 a	-1,95 ± 0,01 cd	1,44 ± 0,09 a	-0,195
	35	Control	80,3 bcd	-0,73 ± 0,10 ab	-1,19 ± 0,08 a	0,45 ± 0,13 ab	
	35	Sequía	73,0 cde	-0,80 ± 0,22 ab	-1,97 ± 0,06 cd	1,17 ± 0,15 ab	-0,361
<i>La Perdiz</i>	23	Control	80,2 bcd	-1,04 ± 0,15 abc	-1,68 ± 0,07 bc	0,64 ± 0,21 ab	
	23	Sequía	77,5 bcde	-1,53 ± 0,38 bc	-1,99 ± 0,04 cd	0,46 ± 0,36 ab	-0,224
	35	Control	85,8 ab	-0,86 ± 0,08 abc	-1,21 ± 0,07 a	0,35 ± 0,06 ab	
	35	Sequía	78,2 bcde	-1,71 ± 0,34 bc	-2,03 ± 0,21 cd	0,32 ± 0,14 b	-0,564
			Sig.	<0,01	<0,01	<0,01	0,06

Para ver el análisis factorial, ver tabla A.15. en Anexos.

5.3.7. Nutrientes minerales

En campo, al contrario que en maceta, la sequía provocó reducciones significativas (40-60%) en las concentraciones tisulares de P para todas las poblaciones, elemento que precisamente también disminuye significativamente su contribución al Ψ_s (% del Ψ_s) en todas las poblaciones. La sequía causó una disminución de la concentración tisular de K en *Llano de Beal* y *Boca de Tauce*, mientras que no se ve modificada significativamente en las poblaciones *Famara* y *La Perdiz*, las dos que tampoco modificaron su concentración de K en el ensayo en maceta. El Ca sólo disminuyó en *La Perdiz*, y el Mg en *Llano del Beal*. Los niveles de Na fueron muy bajos, lo que refleja el carácter no salino de este suelo (CE 3,08-3,26 dS m⁻¹; se considera salino si su CE ≥ 4).

Tabla 5.3.7.- Concentraciones en $\mu\text{mol g}^{-1}\text{PS}$ de los cationes más relevantes y de P para plantas crecidas durante 35 días con o sin riego en parcela.

Población	Tratamiento	Ca	K	Mg	Na	P
<i>Famara</i>	Control	438 ± 26	305 ± 42 bcd	149 ± 4 b	14,5 ± 6,3	50,4 ± 3,4 ab
	Sequía	515 ± 13	220 ± 7 cd	131 ± 4 b	6,1 ± 1,1	27,6 ± 0,1 b
<i>Llano del Beal</i>	Control	393 ± 3	389 ± 33 ab	228 ± 20 ab	6,8 ± 2,7	59,8 ± 3,5 a
	Sequía	414 ± 45	215 ± 14 d	189 ± 16 bc	< 1	29,8 ± 2,5 b
<i>Boca de Tauce</i>	Control	425 ± 23	409 ± 3 ab	172 ± 5 bc	15,3 ± 7,4	54,6 ± 2,8 a
	Sequía	417 ± 15	262 ± 5 cd	139 ± 16 b	< 1	33,8 ± 3,6 bc
<i>La Perdiz</i>	Control	384 ± 9	437 ± 26 a	230 ± 9 ab	15,5 ± 2,8	61,5 ± 6,0 a
	Sequía	482 ± 55	328 ± 15 abc	267 ± 14 a	2,9 ± 6,0	35,1 ± 3,2 bc
Sig.		0,08	<0,01	<0,01	0,20	<0,01

Para ver el análisis factorial, ver tabla A.16. en Anexos.

5.3.8. Furanocumarinas (FCs)

No aparecen diferencias significativas por la acción del tratamiento ni entre poblaciones. La proporción entre ambas FCs es diferente entre poblaciones, de modo que se observó una mayor tendencia de altos contenidos de angelicina que de psoraleno en *Famara*.

Tabla 5.3.8.- El contenido de FCs ($\mu\text{g g}^{-1}\text{PS}$) al final del ensayo de campo tras 35 días con o sin sequía.

Población	Tratamiento	Psoraleno	Angelicina
<i>Famara</i>	Control	2694 ± 337	3112 ± 569
	Sequía	1594 ± 198	2065 ± 528
<i>Llano del Beal</i>	Control	3644 ± 645	1923 ± 939
	Sequía	2495 ± 229	2275 ± 307
<i>Boca de Tauce</i>	Control	2239 ± 841	2141 ± 435
	Sequía	3828 ± 51	3650 ± 161
<i>La Perdiz</i>	Control	1930 ± 360	2395 ± 367
	Sequía	3648 ± 1179	2744 ± 528
Sig.		0,12	0,35

6. CAPITULO III: Ensayos de sequía en hidropónico

6.1. Objetivos específicos

- Cultivar plantas de las dos poblaciones con comportamientos más diferentes de los anteriores ensayos en disolución nutritiva, imponiendo estrés hídrico mediante la adición de polietilenglicol (PEG) al medio líquido.
- Investigar el papel de las raíces de *B. bituminosa* en la respuesta de las plantas al estrés hídrico.
- Usar los resultados para explicar las respuestas de las plantas a sequía al nivel de maceta y campo.

Se llevaron a cabo dos ensayos en hidropónico, en los que se evaluó dos poblaciones, *Famara* y *Llano del Beal*. Se seleccionaron estas dos poblaciones por su comportamiento más extremo entre sí en los ensayos de maceta y parcela, y de acuerdo a los potenciales hídricos y niveles de prolina alcanzados. Primero se realizó un ensayo con el que se adquirieron las habilidades necesarias para la determinación de la conductividad hidráulica de las raíces, L_o . A continuación, básicamente se repitió el mismo ensayo, donde se midieron más parámetros fisiológicos que ayudaran a entender el comportamiento de L_o del anterior estudio.

6.2. Primer ensayo en hidropónico

El primer ensayo se llevó a cabo en el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS), instituto del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en Murcia. El trabajo se realizó en el Departamento de Nutrición Vegetal, con la ayuda del grupo de investigación de la Profesora de investigación, Dra. Micaela Carvajal Alcaraz.

Semillas de ambas poblaciones (ver Tabla 3.) fueron repartidas en macetas con perlita, y 20 días después se procedió a su traspaso a cultivo hidropónico con medio nutritivo líquido. En tres barreños de 15 l se colocaron 12 plantas de cada variedad, con oxigenación mediante bombeo de burbujas de aire al medio líquido. Se utilizó disolución completa (ver sección 3.4.1. en Materiales y Métodos), refrescándola una vez a la semana. Las plantas fueron colocadas en una cámara de cultivo del CEBAS-CSIC con ambiente controlado, con una temperatura de 25/20°C día/noche, una humedad relativa día/noche de 65/85% y un fotoperiodo de 16h. La densidad de flujo de fotones (PAR) fue $400 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La luz fue aportada por combinación de tubos fluorescentes (Philips TLD 36 W/83, Sylvania F36 W/GRO) y lámparas (metal halide lamps Osram HQL. T 400 W).

Se recurrió al polietilenglicol (PEG) para la imposición del estrés hídrico. Dicho compuesto es un polímetro inerte no iónico, producido en un rango de peso molecular, de cadena larga, $\text{HOCH}_2-(\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2)_x-\text{CH}_2\text{OH}$, que ha sido ampliamente

utilizado para el mantenimiento experimental de medios líquidos a unos valores determinados de Ψ_w (Steuter, 1981). Se asume que el PEG de gran peso molecular no penetra en las plantas, y de ahí su idoneidad como compuesto osmótico para el uso en medio hidropónico con raíces (Michel y Kaufmann, 1973; Michel, 1983; Money, 1989). Para este ensayo se utilizó concretamente PEG 8000 (pm 8000, Sigma-Aldrich, Madrid).

Tabla 6.2.a.- Análisis por ICP de PEG disuelto en agua. LD= límite de detección.

Elemento (μM)	%PEG	
	4,5	9
Ca	<LD	<LD
K	24	46
Mg	<LD	<LD
Na	263	404
P	<LD	<LD
Cu	<LD	<LD
Otros MPs	<LD	<LD

Las disoluciones nutritivas (DNs) estaban bien aireadas para evitar posibles efectos adversos sobre la disponibilidad de oxígeno, aunque dichos efectos se observarían a concentraciones de PEG más altas que las empleadas en este ensayo (Verslues y col., 1998). Sólo se observaron algunos posibles síntomas de toxicidad por absorción de PEG en algunas plantas (presuntamente las que ya tenían daños en las raíces y por tanto habían perdido la selectividad de la membrana plasmática). Los resultados obtenidos a partir de dichas plantas dañadas no fueron incluidos en esta tesis.

Tabla 6.2.b.- Determinación de CE (μS) en las DNs usadas en los ensayos en hidropónico, en los días tras su preparación.

Día	DN 100%		
	Control	+ 4,5 % PEG	+ 9 % PEG
1	1780	1508	1277
2	1874	1504	1271
3	1776	1498	1259
6	1725	1455	1186
7	1722	1453	1185
8	1728	1459	1187

La reducción de la CE en función de la concentración de PEG se debe a la adsorción de cationes por el PEG, lo que podría suponer un problema en cuanto a los nutrientes (Burnett y col., 2005), pero este efecto se compensó gracias a que la disolución nutritiva al 100% contiene nutrientes en exceso. Para otros nutrientes, el único efecto significativo fue un descenso de la concentración de N en las raíces de *Llano del Beal* a 9% PEG (ver tabla 6.4.1.c.) pero sin que llegara a niveles de deficiencia, y sin que se apreciara disminución en el crecimiento (PS) (sólo sobre PF, indicando únicamente efectos sobre la absorción de agua).

A los 20 días tras el trasplante, se comenzó a añadir PEG 8000 a los barreños con medio nutritivo, de modo que la concentración aumentara un 0,75% y 1,5%/día durante 6 días, hasta alcanzar su concentración definitiva, de modo que se midió la conductividad hídrica de las raíces (L_0) de las plantas a 4,5%, y 9% PEG. Se decidió por una imposición gradual del estrés hídrico para simular las condiciones con las que la sequía se impone de manera natural en campo. Las concentraciones elegidas fueron 0% PEG ($\Psi = -0,07$ MPa), 4,5% PEG ($\Psi = -0,13$ MPa) y 9% PEG ($\Psi = -0,25$ MPa, equivalente a un potencial creado por 40 mM NaCl). A las 24h tras alcanzar las concentraciones deseadas de 4,5% y 9%, se procedió a la cosecha y determinación de L_0 . El análisis de la L_0 se determinó en todas las plantas, en varias tandas de tres plantas cada una, constituyendo cada tanda una réplica. El material vegetal de cada réplica se conservó para el posterior análisis de PF, PS, y compuestos nitrogenados tras liofilización y molido, tanto de parte aérea como de raíz.



Fotografía 6.2.- Plantas durante el primer ensayo en hidropónico con PEG.

6.3. Segundo ensayo en hidropónico

Semillas de las dos mismas poblaciones usadas en el anterior ensayo fueron sembradas en macetas con perlita, y de nuevo, tras 20 días, se pasaron a cultivo hidropónico en barreños de 1,5 l (6 barreños por tratamiento), con 5 plantas en cada uno. El ensayo se llevó a cabo en cámara de cultivo del IMIDA, con 11 h luz a 23/19°C. La densidad de flujo de fotones fue aproximadamente $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La humedad relativa se mantuvo en torno al 60%.

El tratamiento con PEG comenzó a instaurarse tras 16 días en cultivo hidropónico, aumentando un 0,75% y 1,5% cada día hasta alcanzar la concentración definitiva de 4,5 y 9%PEG respectivamente. Se analizaron las relaciones hídricas de las plantas para comprobar el efecto del tratamiento a las 24 h de alcanzar la concentración deseada, y se cosecharon las plantas para determinar el PF, PS tras liofilización de la parte aérea y raíces. Posteriormente se realizaron las extracciones y determinaciones de compuestos nitrogenados, azúcares y almidón.

6.4. Resultados ensayos de sequía en hidropónico

6.4.1. Crecimiento

Tanto la población *Famara* como *Llano del Beal* redujeron su biomasa aérea en peso fresco tras exposición a PEG, de modo que a medida que aumentó la concentración de PEG en el medio líquido, menor fue la biomasa, presentando *Famara* siempre valores más altos y más cercanos a su control (a 9% PEG, *Famara* tuvo un 58%, y *Llano del Beal* un 46% de biomasa fresca respecto a sus controles). Para la biomasa en PS, no aparecieron diferencias respecto al control, indicando el efecto del PEG únicamente sobre la absorción de agua (Tabla 6.4.1.b.).

Al comparar el PF de las plantas control de ambas poblaciones, *Llano del Beal* siempre presentó un sistema radicular mayor. Sin embargo, durante el tratamiento con PEG, las raíces de la población *Llano del Beal* presentaron menor PF que sus controles en comparación con *Famara*. Frecuentemente frente al estrés hídrico hay un aumento en la relación R:PA, una adaptación para maximizar la tasa de captura de agua, mostrando de nuevo *Llano del Beal* valores superiores en dicha relación. Fue posible comprobar que *Llano del Beal* siempre tuvo más raíz por unidad de parte aérea que *Famara*, aunque *Famara* alcanzó una mayor biomasa. Hubo distinto efecto del tratamiento para el PS. Las plantas de la población *Famara* a 9% PEG aumentaron más su proporción de raíz (un incremento del 52%) que *Llano del Beal* (incremento del 28%).

El tratamiento con PEG en el medio nutritivo provocó un descenso en la L_0 en ambas poblaciones. En situaciones control y estrés intermedio (4,5% PEG), la población *Famara* presentó mayor L_0 que *Llano del Beal* ($P > 0,05$), pero bajo condiciones más estresantes, esta diferencia desapareció por completo. La sensibilidad de la L_0 a valores más bajos del Ψ_w externo fue muy parecida en las dos poblaciones.

Tablas 6.4.1.a.- Crecimiento y compuestos nitrogenados de la parte aérea (arriba) y de las raíces (abajo) de las poblaciones que fueron usadas en el ensayo de estrés hídrico en hidropónico en el CEBAS-CSIC. Los valores de Pro tuvieron que ser transformados (Log(x)) para superar el test de homogeneidad de varianzas.

Parte aérea		PF g planta ⁻¹	PS g planta ⁻¹	R : PA PS	NH ₄ ⁺ μmol g ⁻¹ PS	AAs μmol g ⁻¹ PS	Pro μmol g ⁻¹ PS
<i>Población</i>	<i>Tratamiento</i>						
<i>Famara</i>	Control	8,85 ± 1,56	1,46 ± 0,31 ab	0,25 ± 0,01 e	13,5 ± 1,3 c	27,9 ± 4,8	1,22 ± 0,07 c
	4,5% PEG	10,86 ± 0,84	1,71 ± 0,14 a	0,29 ± 0,01 de	14,7 ± 0,3 bc	30,1 ± 2,9	1,05 ± 0,04 c
	9% PEG	8,28 ± 1,57	1,64 ± 0,22 a	0,38 ± 0,01 cd	16,0 ± 1,6 bc	20,6 ± 10,6	12,48 ± 7,63 ab
<i>Llano del Beal</i>	Control	5,46 ± 0,30	0,69 ± 0,04 b	0,46 ± 0,01 bc	22,3 ± 0,6 b	35,2 ± 7,2	1,70 ± 0,41 bc
	4,5% PEG	8,66 ± 1,57	1,21 ± 0,15 ab	0,50 ± 0,05 ab	20,7 ± 2,7 ab	44,4 ± 7,1	15,03 ± 7,29 ab
	9% PEG	8,91 ± 4,44	0,89 ± 0,08 ab	0,59 ± 0,01 a	30,5 ± 2,3 a	46,3 ± 4,9	34,08 ± 4,06 a
		0,66	<0,01	<0,01	<0,01	0,12	<0,01
		Sig.					

Raíz		PF g planta ⁻¹	PS g planta ⁻¹	L _o mg g ⁻¹ PS h ⁻¹ MPa ⁻¹	NH ₄ ⁺ μmol g ⁻¹ PS	AAs μmol g ⁻¹ PS	Pro μmol g ⁻¹ PS
<i>Población</i>	<i>Tratamiento</i>						
<i>Famara</i>	Control	5,03 ± 1,02 b	0,36 ± 0,07 bc	32,52 ± 3,50 a	34,3 ± 1,9 c	57,2 ± 10,8	1,20 ± 0,16 b
	4,5% PEG	5,88 ± 0,45 ab	0,50 ± 0,04 abc	18,59 ± 2,95 bc	24,2 ± 2,2 d	61,8 ± 7,3 ab	1,01 ± 0,07 b
	9% PEG	5,73 ± 0,76 ab	0,63 ± 0,08 a	5,45 ± 0,83 d	33,1 ± 0,7 c	43,1 ± 6,7 b	1,91 ± 0,68 b
<i>Llano del Beal</i>	Control	6,26 ± 0,45 ab	0,32 ± 0,01 c	27,03 ± 3,35 ab	43,4 ± 1,1 ab	84,5 ± 6,3 a	1,99 ± 0,19 b
	4,5% PEG	8,41 ± 0,63 a	0,59 ± 0,05 ab	16,11 ± 1,34 c	38,7 ± 2,3 bc	64,1 ± 3,0 ab	2,76 ± 1,12 ab
	9% PEG	5,97 ± 0,38 ab	0,54 ± 0,05 abc	5,82 ± 0,52 d	50,5 ± 1,4 a	90,7 ± 7,3 a	6,82 ± 0,92 a
		0,04	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
		Sig.					

Para ver el análisis factorial, consultar tabla A.17. en Anexo.

Tabla 6.4.1.b.- Crecimiento, azúcares y almidón de la parte aérea y de las raíces de las plantas de las dos poblaciones que fueron usadas en el ensayo de estrés hídrico en hidropónico llevado a cabo en el IMIDA.

Parte Aérea		g PF planta ⁻¹	g PS planta ⁻¹	Azúcar	Almidón
Población	Tratamiento			g Kg ⁻¹ PS	g Kg ⁻¹ PS
<i>Famara</i>	Control	1,76 ± 0,24 a	0,26 ± 0,03 a	22,0 ± 1,7 bc	75,0 ± 5,2 a
	4,5%PEG	1,73 ± 0,16 a	0,28 ± 0,03 a	29,6 ± 3,0 ab	70,6 ± 6,5 ab
	9%PEG	1,03 ± 0,06 bc	0,21 ± 0,01 ab	33,8 ± 2,9 a	62,8 ± 4,6 abc
<i>Llano del Beal</i>	Control	1,36 ± 0,24 ab	0,18 ± 0,03 ab	19,9 ± 1,7 c	55,4 ± 3,2 abc
	4,5%PEG	0,87 ± 0,06 bc	0,15 ± 0,01 b	23,6 ± 1,7 bc	47,9 ± 6,5 c
	9%PEG	0,64 ± 0,11 c	0,16 ± 0,02 b	20,9 ± 1,2 bc	48,9 ± 4,0 bc
Sig.		<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

Raíz		g PF planta ⁻¹	g PS planta ⁻¹	Azúcar	Almidón
Población	Tratamiento			g Kg ⁻¹ PS	g Kg ⁻¹ PS
<i>Famara</i>	Control	0,95 ± 0,09	0,13 ± 0,01	20,2 ± 2,2 b	53,7 ± 3,5
	4,5%PEG	0,92 ± 0,06	0,14 ± 0,01	33,4 ± 3,1 a	49,5 ± 2,8
	9%PEG	0,78 ± 0,06	0,14 ± 0,01	22,3 ± 1,6 abc	45,5 ± 4,0
<i>Llano del Beal</i>	Control	1,26 ± 0,21	0,13 ± 0,01	11,9 ± 0,8 c	54,1 ± 5,8
	4,5%PEG	0,87 ± 0,08	0,12 ± 0,01	25,9 ± 5,1 ab	48,7 ± 5,6
	9%PEG	0,81 ± 0,11	0,13 ± 0,01	11,4 ± 2,5 c	40,8 ± 2,8
Sig.		0,07	0,68	<0,01	0,26

Para ver el análisis factorial, consultar tabla A.18. en Anexo.

Tabla 6.4.1.c.- Compuestos nitrogenados de la parte aérea y de las raíces de las plantas usadas en el ensayo de estrés hídrico en hidropónico llevado a cabo en el IMIDA. El %N fue transformado (aseno ($\sqrt{x/100}$)). En esta tabla, los valores de AAs incluyen los de NH_4^+ .

Parte Aérea		N	NH_4^+	AAs	Pro
Población	Tratamiento	%	$\mu\text{mol g}^{-1}\text{PS}$	$\mu\text{mol g}^{-1}\text{PS}$	$\mu\text{mol g}^{-1}\text{PS}$
<i>Famara</i>	Control	3,14 ± 0,06 b	18,8 ± 1,4 c	30,5 ± 2,1 bcd	2,18 ± 1,00 b
	4,5%PEG	2,99 ± 0,11 b	21,2 ± 2,0 c	25,9 ± 4,6 cd	10,98 ± 4,15 b
	9%PEG	3,25 ± 0,07 b	33,3 ± 3,7 bc	17,1 ± 2,1 d	33,01 ± 2,19 a
<i>Llano del Beal</i>	Control	4,86 ± 0,30 a	33,1 ± 3,5 bc	60,9 ± 7,3 ab	3,02 ± 0,60 b
	4,5%PEG	4,61 ± 0,13 a	43,5 ± 4,9 b	56,1 ± 7,7 abc	30,62 ± 4,12 a
	9%PEG	4,74 ± 0,16 a	63,4 ± 0,8 a	74,2 ± 12,5 a	39,96 ± 5,09 a
Sig.		<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

Raíz		N	NH_4^+	AAs	Pro
Población	Tratamiento	%	$\mu\text{mol g}^{-1}\text{PS}$	$\mu\text{mol g}^{-1}\text{PS}$	$\mu\text{mol g}^{-1}\text{PS}$
<i>Famara</i>	Control	3,86 ± 0,12 bc	38,1 ± 2,2 c	78,0 ± 2,7 b	1,05 ± 0,06 c
	4,5%PEG	3,77 ± 0,07 bc	48,5 ± 3,6 bc	92,2 ± 7,0 ab	3,83 ± 1,01 bc
	9%PEG	3,74 ± 0,11 bc	65,9 ± 5,4 a	102,3 ± 8,4 ab	9,95 ± 2,13 a
<i>Llano del Beal</i>	Control	4,56 ± 0,12 a	52,5 ± 2,3 abc	99,3 ± 6,4 ab	1,51 ± 0,20 bc
	4,5%PEG	4,29 ± 0,15 ab	62,9 ± 1,9 ab	115,3 ± 6,5 a	6,17 ± 0,58 ab
	9%PEG	3,71 ± 0,16 c	65,8 ± 4,9 a	93,9 ± 9,5 ab	6,24 ± 1,17 ab
Sig.		<0,01	<0,01	0,02	<0,01

Para ver el análisis factorial, consultar tabla A.19. en Anexo.

6.4.2. Azúcar y almidón

Un aumento del azúcar en la parte aérea de *Famara* apareció con el tratamiento con PEG en el segundo ensayo en hidropónico. El aumento del azúcar en las raíces fue significativo para ambas variedades, aunque sólo a 4,5% PEG. La concentración del almidón disminuyó en todos los casos debido a la exposición al PEG, pero nunca significativamente.

6.4.3. Compuestos nitrogenados

Durante los ensayos en hidropónico, no se observó la aparición de nódulos en las raíces de las plantas, de modo que el nitrógeno de las plantas procedía únicamente de las DN. Las concentraciones de N en PA y en raíces resultaron ser diferentes entre las raíces de *Llano del Beal* expuestas a 9% PEG (3,71% N) y la de los controles (4,56% N). Dada la alta concentración del N en la disolución nutritiva (16 mM), hay que suponer estos niveles en las plantas representan una acumulación de lujo, es decir por encima de sus necesidades.

La concentración de NH_4^+ en el primer ensayo aumentó en la parte aérea de *Llano del Beal* tras la exposición a PEG, y también aumentó en raíz durante el estrés más severo. En el segundo ensayo, la concentración fue proporcional al estrés hídrico. Mientras que *Famara* tiende a bajar su concentración de AAs, (en ambos ensayos), *Llano del Beal* tiende a aumentar sus niveles de AAs. *Famara* aumentó sus niveles de prolina en parte aérea (significativo) en las condiciones más extremas (los resultados del CEBAS parecen más esclarecedores), pero mantuvo los niveles del control en estrés intermedio. *Llano del Beal* por el contrario, aumentó su concentración de prolina significativamente con la concentración de PEG en el medio de cultivo. A 4,5% PEG, *Llano del Beal* ya había comenzado a acumular prolina en su parte aérea. Esto puede significar que, para un mismo potencial hídrico en el medio externo, *Llano del Beal* padece más estrés que *Famara*. La exposición a PEG provocó acumulación significativa de Pro en las raíces de ambas variedades, aunque fue mucho más modesta que en la PA.

6.4.4. Relaciones hídricas

La población *Llano del Beal* redujo su CRA a 9% PEG, desde 85 a 69%, mientras que *Famara* mostró descensos más suaves. En los tres ensayos de sequía en maceta, parcela e hidropónico, *Llano del Beal* fue la población que alcanzó los menores porcentajes del CRA. En campo y en hidropónico, *Famara* fue la que menos modificó su CRA.

Ni *Famara* ni *Llano del Beal* modificaron su Ψ_w . Los valores alcanzados fueron mucho menos negativos que en maceta para *Llano del Beal*, y mucho menos negativos que en el ensayo en campo para ambas especies. En hidropónico, aparecen modificaciones del Ψ_s , realizando *Llano del Beal* una mayor modificación. Sus Ψ_p siempre fueron iguales o superiores a los de los controles, lo que implica AO.

Tabla 6.4.4.- Relaciones hídricas de las plantas cultivadas en el ensayo en hidropónico llevado a cabo en el IMIDA.

IMIDA		CRA	Ψ_w	Ψ_s	Ψ_p
Población	Tratamiento	%	MPa	MPa	MPa
<i>Famara</i>	Control	86,4 ± 4,07	-0,29 ± 0,03	-1,03 ± 0,06 ab	0,74 ± 0,05 bc
	4,5%PEG	84,2 ± 2,73	-0,27 ± 0,01	-0,98 ± 0,03 a	0,71 ± 0,02 c
	9%PEG	73,9 ± 7,41	-0,29 ± 0,03	-1,35 ± 0,09 bc	1,06 ± 0,09 ab
<i>Llano de Beal</i>	Control	84,8 ± 2,23	-0,29 ± 0,04	-0,92 ± 0,02 a	0,64 ± 0,03 c
	4,5%PEG	82,5 ± 5,57	-0,23 ± 0,03	-1,04 ± 0,05 ab	0,82 ± 0,03 bc
	9%PEG	69,4 ± 4,72	-0,31 ± 0,04	-1,60 ± 0,16 c	1,29 ± 0,13 a
	Sig.	0,08	0,54	<0,01	<0,01

Para ver el análisis factorial, consultar tabla A.20. en Anexo.

7. DISCUSIÓN SEQUÍA

La interpretación conjunta de los resultados procedentes de los tres niveles de experimentación otorga una visión globalizadora del comportamiento de *B. bituminosa* frente a sequía. Cada ensayo permite aislar factores, o a combinarlos, favoreciendo el análisis de la respuesta frente a sequía desde diferentes puntos de vista. Algunos resultados pudieron llegar a ser incluso contradictorios, lo que refleja la necesidad de analizar e interpretar cómo la especie estudiada es capaz de combatir el déficit hídrico en condiciones reales.

Hay algunos factores que pudieron haber contribuido a las diferencias en el orden de tolerancia (% de biomasa aérea respecto del control y TCR) entre el ensayo en maceta (*La Perdiz* > *Boca de Tauce* > *Llano del Beal* > *Famara*) y el de campo (*Famara* > *Boca de Tauce* > *Llano del Beal* > *La Perdiz*), los cuales dificultaron la separación de los efectos causados por deprivación de agua de manera individualizada. El ensayo de campo implica la exposición simultánea de las plantas no sólo frente al tratamiento con sequía, sino también a altas temperaturas y altas intensidades lumínicas. Esto, junto a la mayor duración del ensayo de campo (30 días sin riego alguno), propició un mayor descenso del crecimiento, aunque la velocidad de la imposición de sequía fue mayor en maceta debido al volumen limitado donde se desarrollan las raíces.

7.1. Crecimiento y cambios morfológicos

Cuando una planta está expuesta a sequía, se ponen en marcha mecanismos que aceleran su ciclo de crecimiento (evasión de la sequía) e/o intentan maximizar la absorción de agua por las raíces y minimizar su pérdida por la parte aérea, a través de modificaciones anatómicas y morfológicas (evitar el estrés interno).

7.1.1. Crecimiento relativo de las raíces y la parte aérea

En los dos ensayos en hidropónico la relación R:PA aumentó en ambas variedades a medida que la concentración externa de PEG aumentaba. Esta es una respuesta común a la escasez de agua (Chaves y col., 2002; Sánchez-Blanco y col., 2009; Erice y col., 2010) y ayuda a minimizar la relación pérdida:captura de agua, a través de expansión del sistema radicular para alcanzar zonas más húmedas en profundidad (Khan y col., 2010), permitiendo la evitación del estrés hídrico interno. Yousfi y col. (2010), comparando *Medicago truncatula* Gaertn. y *M. laciniata* (L.) Miller, demostraron que las dos poblaciones de *M. laciniata* fueron más tolerantes a la sequía, coincidiendo con su mayor relación R:PA y mejor mantenimiento del CRA. Cuando el sistema radicular aumenta para un mismo desarrollo de la parte aérea, el aprovechamiento del agua con relación a la evapotranspiración se ve incrementado, junto al cierre de los estomas tras sequía mediante señalización con ABA. Este fenómeno ocurre también frente a sequía en otras especies de leguminosas como *Vicia faba* L. (Khan y col., 2010) o *Cicer arietinum* L. (Kashiwagi y col., 2008). La población *Famara*, con mayor biomasa que *Llano del Beal*, consiguió un mejor mantenimiento del crecimiento frente a estrés hídrico en los ensayos en hidropónico, gracias en parte, a que fue la que más aumentó su relación R:PA, como mecanismo de adaptación morfológica. Se podría concluir que las poblaciones de *B. bituminosa* con mayor tamaño son potencialmente más tolerantes cuando el crecimiento radicular no está limitado, por disponer de más sistema radicular que les permita captar más agua (Whitmore y Whalley, 2009).

La pérdida de biomasa aérea (valores negativos de TCR) para las plantas de *La Perdiz* en campo fue probablemente un medio para reducir la pérdida de agua (Erice y col., 2010), o simplemente un síntoma de estrés.

7.1.2. Área foliar específica (AFE)

Un reducido AFE ha sido relacionado con una elevada tolerancia a sequía por parte de otros investigadores (Ericé y col., 2010). Este parámetro depende del grosor de la hoja y de la densidad tisular (Meziane y Shipley, 2001), de manera que una mayor densidad (como por un descenso del CRA) y un aumento del grosor (por ejemplo debido a la acumulación de almidón) causan una reducción del AFE. En ambos ensayos, las reducciones del AFE vinieron acompañadas por disminuciones en el CRA (excepto en *Llano de Beal* en el ensayo en maceta), lo que aumenta la densidad de la hoja. El AFE de las plantas de *B. bituminosa* que fueron expuestas a sequía, fue menor que el de las correspondientes plantas regadas.

Según McMillen y McClendon (1983), en las hojas durante estrés hídrico sucede un aumento del contenido energético de la célula, expresado como contenido en moléculas con carbono. Esto se debe a que la reducción del crecimiento sucede antes que la inhibición de la fotosíntesis (McDowell, 2011), permitiendo la acumulación de fotoasimilados (azúcares y almidón). Este efecto pudo apreciarse en el ensayo en parcela, pero quizás no se aprecie en maceta porque la concentración de almidón fue más baja. Igualmente, nuestros resultados están de acuerdo con Meziane y Shipley (2001), que exponen que la tasa fotosintética y el contenido en N aumentan con el AFE (hojas más finas).

Un mayor grosor de la hoja (Rhizopoulou y Psaras, 2003) y menor AFE (Bell y col., 2007; Ericé y col., 2010) reducen la pérdida de agua, pero podrían también disminuir la conductancia interna de CO₂ (Syvertsen y col., 1995) y reducir la tasa fotosintética neta por g de PS de hoja (Meziane y Shipley, 2001). Existen sin embargo numerosos estudios de los efectos positivos sobre la fotosíntesis (Sims y col., 1998; Pätsikkä y col., 2002), probablemente relacionados con un aumento en la densidad de cloroplastos debido a una disminución en el tamaño de las células (Munns y Tester, 2008). En el ensayo de maceta, las plantas que experimentaron un mejor mantenimiento del crecimiento presentaron los menores valores de AFE, lo que corrobora que la tolerancia está relacionada con menores valores de AFE (hojas más gruesas). La exposición a altas intensidades lumínicas y altas temperaturas fueron los factores que

más condicionaron el AFE, teniendo las plantas del ensayo en campo valores de al menos 4 veces por debajo de las crecidas en el ensayo de maceta, a pesar de su mayor CRA. Las hojas gruesas protegen frente a fotoinhibición (Pätsikkä y col., 2002), mostrando la adaptación de *B. bituminosa* a las altas intensidades lumínicas (Méndez y col., 2000), aunque podría ser más susceptible a incrementos excesivos de la temperatura interna (Chaves y col., 2002). En maceta, las concentraciones más altas de fósforo, potasio y nitrógeno podrían haber contribuido a que el AFE llegue a valores más elevados (Meziane y Shipley, 2001).

En la literatura relacionada se ha podido comprobar que el AFE medio de 579 especies de herbáceas dicotiledóneas silvestres es de $26 \text{ m}^2\text{kg}^{-1}\text{PS}$ (Vile y col., 2005). Las plantas de *B. bituminosa* utilizadas en el ensayo de campo tuvieron valores más bajos, entre 7,9 y 15,5, (mayor grosor), lo que la destaca como planta altamente tolerante a sequía. Otras plantas de zonas áridas-desérticas del suroeste australiano tienen valores entre $0,98\text{-}4,24 \text{ m}^2\text{kg}^{-1}\text{PS}$ (Mitchell y col., 2008), mientras Medrano y col. (2009), encontraron valores de entre $4 \text{ y } 18 \text{ m}^2 \text{ Kg}^{-1}$ para distintas especies arbustivas Mediterráneas.

7.2. Compuestos nitrogenados

7.2.1. Nitrógeno y NH_4^+

Se pudo comprobar la presencia de numerosos nódulos con apariencia activa (ver Fotografía 1.3.2.) tanto en el ensayo en maceta como en parcela, pero no en los ensayos en hidropónico. Los nódulos eran determinados esféricos, marrón blanquecinos con lenticelas externamente, y rojo-rosados en su interior. En un ensayo de campo por García-Camarero y col. (1998), la mayoría de la longitud y biomasa del sistema radicular de *B. bituminosa* se encontró en los primeros 30 cm del suelo bajo condiciones de baja pluviometría ($<300 \text{ mm año}^{-1}$), mientras que la biomasa de los nódulos aparecía de manera uniforme entre las tres capas estudiadas (0-15, 15-30 y 30-45 cm).

La sequía es un factor que inhibe de manera importante la fijación de N en las raíces. Dicho estrés causa la disminución de la tasa de infección por bacterias fijadoras de N, disminución de la permeabilidad por oxígeno de los nódulos, descenso del aporte de sustancias procedentes de la fotosíntesis, y reducción del aporte de agua al floema de la planta hospedadora (Sánchez-Díaz y Aguirreolea, 1991; Serraj y col., 1999). Un ejemplo concreto sería el de Kim y col. (2004), donde la sequía produjo una reducción en el N₂ incorporado (además de un aumento de Pro y NH₄⁺), obteniendo un 30-40% menos en el contenido de N₂ en hojas en plantas de soja estresadas por sequía (Streeter, 2003).

La concentración de N (y de NH₄⁺, AAs y Pro) en las plantas crecidas en campo fueron menores que las del ensayo en maceta. Esto no pudo deberse a un posible descenso del aporte de fotoasimilados a los nódulos radiculares porque las concentraciones de TNCs (azúcares y almidón) fueron más altas en campo que en maceta (ni en el ensayo en hidropónico), tal vez porque en la cámara del ensayo en maceta, la intensidad lumínica estuvo por debajo del óptimo para la fotosíntesis de *B. bituminosa* (1500 μmol m⁻² s⁻¹; Méndez y col., 2000). Sin embargo, la cantidad total de carbohidratos disminuyó en el orden: *Famara* > *Boca de Tauce* > *Llano del Beal* >> *La Perdiz*, el mismo orden de tolerancia en cuanto crecimiento y en cantidad de N por planta.

Aunque la disminución de la fijación de N₂ no sea el principal responsable de la inhibición del crecimiento durante sequía (Serraj y col., 1999), y Walker y col. (2007), mostraron que una concentración del 3,4-4% fue suficiente para el máximo crecimiento de otras poblaciones de *B. bituminosa*, por lo que parece que *La Perdiz* presenta un mayor requerimiento de N y eso pudo haber contribuido a su mayor sensibilidad a la sequía en campo.

Las poblaciones estudiadas mostraron diferencias en la acumulación de N y cómo se vio afectada dicha acumulación por la sequía. En campo, la cantidad de N acumulada en las partes aéreas estuvo relacionada proporcionalmente con el crecimiento, siendo *La Perdiz* la más sensible y *Famara* la más tolerante. La cantidad de N acumulada en la parte aérea de las plantas cultivadas en campo disminuyó en paralelo al Ψ_w para plantas estresadas tras 35 días (excepto para *Boca de Tauce*, donde N bajó, pero no su Ψ_w), lo que sugiere una reducción del movimiento de agua a través

de los nódulos de las plantas. La población *Famara* sufrió menor disminución de la cantidad de N durante sequía, debido quizás a su mejor mantenimiento de su Ψ_w , permitiendo el movimiento de agua desde la planta al nódulo por más tiempo. Este efecto pudo apreciarse mejor en el ensayo de campo.

En especies no fijadoras del N_2 , la acumulación del NH_4^+ deriva de la fotorrespiración (que aumenta bajo sequía) y de la reducción del nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-) seguido por la reducción del NO_2^- a NH_4^+ (Sánchez-Rodríguez y col., 2011). La concentración del NH_4^+ aumentó (especialmente en *Llano del Beal*) en presencia del PEG en hidropónico (estrés hídrico y asimilación del NO_3^-). En maceta también se detectó un aumento, pero dicho aumento no fue tan alto (estrés hídrico más intenso según los valores del CRA y la concentración de Pro, pero con fijación del N_2). Sin embargo, en el campo (estrés hídrico menos intenso y fijación de N_2) la concentración del NH_4^+ disminuyó frente a sequía. Según Kim y col. (2004), la concentración de NH_4^+ aumentó en *Trifolium repens* L. (cultivada sin *Rhizobium*) bajo condiciones de estrés hídrico, lo que respalda el aumento de NH_4^+ en el ensayo en maceta, aunque sin diferencias significativas. Sánchez-Rodríguez y col. (2011), encontraron un ascenso en las concentraciones de NH_4^+ y N en la PA frente a sequía en la variedad más tolerante de la especie no fijadora *Solanum lycopersicon* L. (debido a mayor reducción del NO_3^- y mayor fotorrespiración), y un ascenso en las actividades de las enzimas para detoxificar el NH_4^+ . Para *B. bituminosa*, la presencia de nódulos de apariencia sana indica que en los ensayos de maceta y de campo, la acumulación del NH_4^+ en las hojas se derivó de la fotorrespiración, mientras en hidropónico, en ausencia de nódulos, la asimilación del NO_3^- (mayoritariamente en raíces, cuando la concentración externa de N es elevada; Andrews, 1986) tuvo que contribuir también a la mayor acumulación del NH_4^+ en las plantas cultivadas en disolución nutritiva. Se ha demostrado que la concentración de NH_4^+ es proporcional a la de AAs, como por ejemplo, la de Pro en *T. repens* (Lee y col., 2009). Como en campo no hubo un aumento tan exagerado de la acumulación de Pro ni una disminución de los AAs totales frente a sequía, sólo se pudo apreciar una ligera disminución del NH_4^+ .

7.2.2. Aminoácidos

Siempre que se habla de la concentración de AAs, este valor se refiere a la concentración de AAs excluyendo la prolina (AAs-Pro). En relación a la imposición de la sequía, la concentración de AAs disminuye en el de campo, aunque no lo hace significativamente para *Famara*. En el ensayo en hidropónico tampoco, puede que debido al alto suministro de N a la DN.

El aumento de la prolina en las plantas en maceta pudo entrañar para *Boca de Tauce* y *La Perdiz*, un mejor mantenimiento del crecimiento, ya que, como en otras especies durante falta de agua, la concentración de AAs es más elevada (Girousse y col., 1996; Silva y col., 2010), para contribuir al AO en los distintos compartimientos intracelulares (Büsis y Heineke, 1998). Walker y col. (2010), también encontraron aumentos significativos en la concentración tisular de AAs en *B. bituminosa* expuesta a temperaturas por debajo de cero. En campo se puede apreciar un descenso en la concentración de AAs, a excepción de en *Famara*, la población más tolerante.

Se puede considerar la Pro como indicador del estado de las plantas frente a estrés hídrico (Vendruscolo y col., 2007; Seki y col., 2007; Verbruggen y Hermans, 2008). Aunque la acumulación de Pro sea una respuesta metabólica común en plantas superiores durante déficit hídrico y salinidad (Barnett y Naylor, 1966; Boggess y col., 1976; Jones y col., 1980), y a pesar de las numerosas funciones que se le otorgan a la Pro (Stewart, 1981; Delauney y Verma, 1993; Verbruggen y Hermans, 2008), no está claro si es un mero síntoma o un respuesta activa para mantener el crecimiento durante sequía. En los ensayos descritos en esta tesis, no había relación entre tolerancia (biomasa) y concentración de Pro, sino que la Pro sirvió como un indicador de la perturbación de las relaciones hídricas (CRA, Ψ_w y Ψ_s) tal como hicieron Lazcano-Ferrat y Lovatt (1999), Iannucci y col. (2000), y Lee y col. (2008). Se han demostrado numerosas funciones intracelulares para la Pro (Ashraf y Foolad, 2007; Szabados y Saviouré, 2009). Sin embargo, una mayor acumulación de Pro no está siempre correlacionada con la aclimatación a sequía (mantenimiento de crecimiento). La oxidación de la Pro, por ejemplo, podría permitir una buena manera de recuperación después del res-establecimiento del riego tras sequía (Szabados y Saviouré, 2009),

mientras que Maggio y col. (2002), sugieren que esto podría formar parte del metabolismo de regulación que frena el crecimiento en plantas expuestas a sequía.

El hecho de que apareciera una concentración tisular de Pro más elevada en la plantas del ensayo en maceta que en las crecidas en campo, podría explicarse de dos maneras. Una posible explicación se basa en los niveles de CRA alcanzados en ambos ensayos. En maceta, el CRA disminuyó hasta un 46-68% (relacionado con el limitado suministro de agua dentro de la maceta y por tanto la más rápida imposición de estrés), mientras que en el campo, los valores de CRA no pasaron por debajo de 71-78%, como se puede observar en la Figura 7.2.2., por lo que puede que el nivel de deshidratación en el ensayo de campo sea insuficiente para estimular la acumulación de Pro. En otras especies de la misma familia y adaptadas a regiones semiáridas (como *B. bituminosa*), como *Phaseolus vulgaris* L. y *P. acutifolius* A. Gray (Lazcano-Ferrat y Lovatt, 1999), o como *Trifolium alexandrinum* L. (Ianucci y col., 2000), el umbral para el rápido ascenso en la concentración de Pro también se encuentra entre 70-75% del CRA.

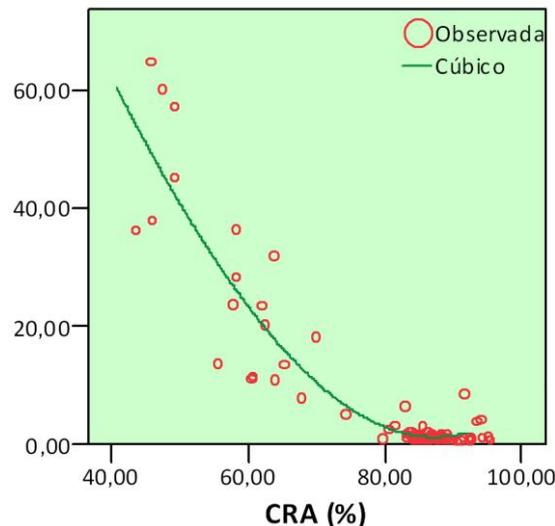


Figura 7.2.2.- La concentración de prolina como función del CRA. La síntesis de prolina no se ve incrementada hasta que se alcanzan unos valores de CRA por debajo de un determinado umbral, en torno al 75% (datos procedentes del ensayo en maceta).

También se pudo apreciar este distinto comportamiento entre ensayos al hacer la regresión lineal entre Pro y CRA, y obteniendo las ecuaciones de las rectas que permiten predecir los valores teóricos de Pro para un determinado valor del CRA.

Usando tales ecuaciones se pudo estimar que para un mismo valor de CRA, los valores teóricos de Pro deberían haber sido menores en campo que en maceta.

Tabla 7.2.2.- Cálculo de la concentración teórica de Pro a partir de la ecuación de la recta de la regresión lineal.

Pro $\mu\text{mol g}^{-1}\text{PS}$ - CRA	CRA = 85%	CRA = 70%	CRA = 55%
Maceta Pro = $82,62 + (-0,93 \cdot \text{CRA})$	3,5	17,5	31,5
Parcela Pro = $28,22 + (-0,3 \cdot \text{CRA})$	2,7	7,2	11,7

Otra posible explicación para que en campo no se alcancen valores tan elevados de Pro como en el ensayo de maceta, es que durante la exposición a varios estreses, como altas temperaturas y altas intensidades lumínicas, no se alcanzan tan elevadas concentraciones de prolina e incluso similares a las de los controles (Dobra y col., 2010). Durante estas circunstancias las rutas de síntesis de prolina son desviadas hacia otras rutas metabólicas, como la síntesis de sacarosa (Rizhsky y col., 2004; Mittler, 2006; Shulaev y col., 2008), ya que en esta situación la prolina puede presentar fitotoxicidad al acumularse en las células (Nanjo y col., 2003). Esto se debe, según defienden Lv y col. (2011), a que la acumulación de Pro bajo estrés por calor disminuye la termotolerancia, probablemente por incremento en la producción de ROS (vía el ciclo Pro/P5C e inhibición de la síntesis de ABA y etileno). Así, bajo condiciones de combinación de estreses como calor y sequía, la acumulación de prolina no es un indicador apropiado de la tolerancia a estrés por sequía. Para el ensayo de campo, no se apreció un aumento de la concentración de sacarosa en campo porque la concentración de azúcares ya era elevada incluso en los controles (ver sección azúcares). La acumulación de Pro en el segundo ensayo en hidropónico con PEG apoya esta explicación (accesión *Famara*: $33 \mu\text{mol g}^{-1}$ Pro a un CRA=73,9%, *Llano del Beal*: $31 \mu\text{mol g}^{-1}$ Pro a un CRA=82,5%). Además, hay que considerar que, si la síntesis de Pro ocurre para prevenir la acumulación intracelular de NH_4^+ por encima de niveles tóxicos durante la falta de agua (Lazcano-Ferrat y Lovatt, 1999; Kim y col., 2004), las concentraciones más bajas de NH_4^+ en plantas del ensayo de campo podrían haber disminuido la necesidad de activar la síntesis y acumulación de Pro.

7.3. Azúcares y almidón

El resultado final de una larga exposición a sequía puede ser la muerte de la planta por la utilización del C durante la respiración, un proceso que resulta acelerado a temperaturas altas (McDowell, 2011). En nuestros ensayos, se estudió la respuesta a corto-medio plazo a sequía (horas-semanas-primer mes). De acuerdo con McDowell (2011), durante estas primeras fases (2-6 semanas), la inhibición del crecimiento sucede antes de la caída de la tasa fotosintética, lo que permite la acumulación de carbohidratos no estructurales (NSC), como azúcares y almidón, al disminuir su demanda y continuar su síntesis. La sequía provocó que la concentración de (azúcares + almidón) aumentara el día 16 en maceta y el día 35 en campo. Sin embargo no apareció tal efecto en las poblaciones *Famara* en maceta, ni en *La Perdiz* en campo, lo que indica que debieron ocurrir efectos sobre la fotosíntesis en dichas poblaciones.

Inicialmente, el cierre estomático durante sequía causa una inhibición de la tasa de fotosíntesis neta (A) al limitar la entrada de CO₂ y su difusión a través del mesófilo, aunque posteriormente esta se ve afectada directamente por efectos sobre el aparato fotosintético (Chaves y col., 2002; Medrano y col., 2009). Ha sido documentado que dicho cierre estomático también sucede en otras especies de leguminosas mediterráneas cuando el Ψ_w se encuentra entre -1,0 y -1,5 MPa (Bell y col., 2007), lo que pudo haber sido el factor responsable para la mayor sensibilidad en campo de las poblaciones *Llano del Beal* y *La Perdiz*. Méndez y col. (2000), mostraron que se necesita un PAR de al menos 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para la saturación de A en plantas de *B. bituminosa*, lo que indicaría que A pudo haber estado saturada en campo (2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) pero no en el experimento en maceta (200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Estos autores también encontraron que A fue máxima entre 25-30°C, así que A pudo haber sido mayor en la cámara de cultivo que en el campo donde la temperatura media más elevada a nivel de hoja fue de 30°C.

En el campo, tras 35 días sin aporte de agua a las plantas no regadas, la sequía no afectó a la concentración de azúcares solubles en la parte aérea, aunque esta fue más elevada que en el ensayo de maceta, seguramente como mecanismo de protección contra las elevadas temperaturas (Guy y col., 2008). En el ensayo en maceta, las cuatro variedades modificaron su contenido en azúcares libres de distinta manera por la

acción de la sequía, siendo *La Perdiz* la que mayor aumento experimentó con un 2,4 veces la cantidad del control, luego *Llano del Beal* con 1,7, *Tauce* con 1,6, y *Famara* que fue la única que disminuyó su contenido en azúcares. Los azúcares solubles libres incrementaron su concentración en hojas durante estrés hídrico en plantas de muchas especies, como por ejemplo *Medicago sativa* L. (Irigoyen y col., 1992), *Lupinus albus* L. (Pinheiro y col., 2001) y *Phaseolus vulgaris* L. (Cuellar- Ortiz y col., 2008). Durante estrés hídrico, los azúcares participan en el AO, señalización y protección de la membrana celular y macromoléculas (Bartels y Sunkar, 2005), y actúan como fuente de carbono durante recuperación (Chaves y col., 2002).

En cuanto al almidón, la literatura establece que el déficit hídrico, como casi cualquier otro estrés, tiende a disminuir el estado energético de las células consumiendo el almidón de las vacuolas (Bartels y Sunkar, 2005), de modo que los azúcares que se liberan al citoplasma proceden de su degradación y no de la síntesis *de novo* (Lee y col., 2008). Sin embargo, la disminución de almidón y el aumento de azúcares únicamente pudo percibirse en la población *Boca de Tauce* en el ensayo de maceta, donde la luz estuvo por debajo del óptimo para la fotosíntesis (Méndez y col., 2000). En parcela, donde la intensidad lumínica estaba más cerca del óptimo, hubo un aumento significativo del almidón con la imposición de sequía, sin que se apreciaran cambios en los niveles de azúcares, siendo *La Perdiz* la población más sensible, y la que menos aumentó su contenido de almidón.

7.4. Nutrientes minerales

En este trabajo, todos los análisis de elementos se refieren a nivel de tejido vegetal aéreo (hojas y tallos). En el ensayo de maceta, a pesar del volumen de suelo restringido, el descenso del crecimiento no pudo estar inducido por deficiencias de Ca, K o P, ya que los valores estuvieron siempre por encima del rango de deficiencia descrito de manera general por Marschner (1995), y para *B. bituminosa* por Walker y col., (2007), Pang y col., (2010), con rangos de 214-282 (Ca), 82-103 (P), 680-852 (K), y 104-130 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{PS}$ (Na).

En el campo, la sequía probablemente causó deficiencia de K (en poblaciones *Boca de Tauce* y *La Perdiz*) o la empeoró (*Famara* y *Llano del Beal*) (Marschner, 1995; Walker y col., 2007). El K disponible ($48\text{-}52 \mu\text{g g}^{-1}$ suelo) pudo haber sido deficiente (Cooke, 1975; Sardans y col., 2008) pero no fue más bajo en el suelo más seco. La población *Llano del Beal* presentó en ambos ensayos una menor concentración de K en las plantas no regadas que en las control, por lo que fue la población cuya nutrición se vio más perturbada por sequía.

En el estudio de Pang y col. (2010), 11 especies de leguminosas necesitaron una concentración de P total en el suelo de $12 \mu\text{g g}^{-1}$ para alcanzar su máximo crecimiento, de entre las cuales *B. bituminosa* resultó ser la especie con el menor requerimiento de aporte de P externo, mientras que otras especies requieren concentraciones por encima de $24 \mu\text{g P g}^{-1}$ suelo.

Para *B. bituminosa*, se requiere una concentración de P en la parte aérea de $60\text{-}100 \mu\text{mol g}^{-1}$ para un crecimiento máximo (Walker y col., 2007; Pang y col., 2010), de modo que la sequía causó o intensificó la deficiencia de P en todas las poblaciones.

Las concentraciones teóricas de P disponible para las plantas en el suelo con o sin riego (37 vs. $39 \mu\text{g g}^{-1}$ suelo) fueron adecuadas para el crecimiento (Sardans y col., 2008), aunque la movilidad del P se vea disminuida en suelos secos (Sánchez-Díaz y Aguirreolea, 1991). Para el K y P se encontraron resultados similares para *Globularia alypum* y *Erica multiflora* crecidas también en condiciones de sequía en climas mediterráneos (Sardans y col., 2008) por reducción del contenido de agua en el suelo, capacidad fotosintética y fosfatasa de las raíces – que redujeron la captura por parte de la planta. La mayor reducción en los niveles de P y K en las plantas de campo frente a sequía pudo estar debido a una mayor reducción en la transpiración y por lo tanto de nutrientes en campo (Marschner, 1995; Sardans y col., 2008) debido a la mayor reducción del Ψ_w .

Dada la relación entre L_o y transpiración (Maurel y col., 2010), se comprobó en los ensayos en hidropónico que como *Famara* tenía mayor L_o (y $L_o \cdot$ biomasa raíces), este mayor transporte de agua pudo haber ayudado a mantener su concentración de K, en comparación con *Llano del Beal*. Yousfi y col. (2010), defienden sin embargo que

la concentración de K en MS aumenta frente a sequía en un ensayo en maceta al comparar dos poblaciones de *Medicago* sp., hecho que sólo ocurrió en *Boca de Tauce* en maceta.

Las células necesitan Ca en concentraciones cercanas a $380 \mu\text{mol g}^{-1}$, distribuido en el citoplasma, pared celular y membrana plasmática (apoplasto). Lo que sobra se guarda en la vacuola y retículo endoplasmático. Con los valores presentes en plantas de ambos ensayos, los niveles no suponen deficiencia en ningún caso (por encima de 1,6%) (Mengel y Kirkby, 2001). Para Mg, a pesar de una disminución de su concentración en parcela en plantas en sequía, todos los valores ($\sim 0,3\% = 130 \mu\text{mol g}^{-1}$) estaban por encima del límite de deficiencia (0,1-0,2%; Mengel y Kirkby, 2001). Probablemente el Na no tenga papel como nutriente en *B. bituminosa*, y sólo actúa como posible osmolito, aunque no alcanzó grandes concentraciones. Las diferencias en parcela en la concentración de Na, aunque no fueron significativas, se pudieron deber a que el riego de los controles se realizó con agua del grifo.

7.5. Relaciones hídricas

Cuando las plantas detectan una reducción en el suministro de agua (descenso del Ψ_w del suelo), suceden en ellas una serie de mecanismos que intentan amortiguar los efectos perjudiciales que la sequía puede causar a largo plazo. Durante las primeras fases, se estimula inmediatamente la síntesis de ABA, para mediar la primera respuesta señalizadora, lo que ordena el cierre de los estomas. Entonces puede que comience a realizarse AO, y toda una serie de mecanismos (ver Introducción 1.4.1.) que dependen de la intensidad y duración del estrés hídrico. Entre todos los parámetros determinados para evaluar los mecanismos relacionados con las relaciones hídricas, el CRA, Ψ_w , Ψ_s , Ψ_p y AO, AFE, R:PA concierne respuestas de **evitación**.

Comparando los porcentajes del CRA de los ensayos, se ve que en parcela no se alcanzaron porcentajes tan bajos como en maceta. El estrés hídrico se impuso más fuertemente (y más rápidamente) en maceta, aunque hubo ajuste osmótico, ya que el Ψ_p no disminuyó.

La disminución del L_o de las raíces durante estrés hídrico tiene repercusiones en otros procesos fisiológicos, como una disminución del CRA de una planta (Parent y col., 2009) por su acción en parte sobre las acuoporinas de las raíces (Vandeleur y col., 2009; Parent y col., 2009). La reducción de L_o puede ser considerada como una ayuda para restringir la pérdida de agua durante la noche en suelos secos, y como mecanismo para proteger la funcionalidad de las raíces, y de ahí facilitar la reactivación del crecimiento una vez que el suelo vuelva a estar húmedo (Maurel y col., 2010). La L_o es una función lineal del gradiente entre Ψ_s de la savia del xilema y el medio externo, en condiciones fisiológicas (Carvajal y col., 2000). *Famara* transportó el agua desde el suelo a la planta con mayor velocidad, pero dicho rendimiento se ve más inhibido por la sequía que en *Llano del Beal*, la cual consigue mantener una tasa de transporte más cercana a la de sus controles. *Llano del Beal*, aunque siempre con valores más bajos, consigue mantener su L_o sin inhibirlo tanto como *Famara*, para absorber todo el agua posible sin intentar evitar la sequía (resistencia). La mayor capacidad de la accesión *Famara* para evitar el estrés interno causado por sequía (mejor mantenimiento de las relaciones hídrica: CRA y Ψ_w) y el mantenimiento del crecimiento, debió estar favorecido, además de por un mayor desarrollo radicular con el que alcanzar zonas más profundas del suelo (en comparación con *Llano del Beal*), por su mayor L_o a mayores Ψ_w externos (Maurel y col., 2010). Además, las plantas capaces de mantener su L_o y por lo tanto su transpiración (Maurel y col., 2010) consiguen también evitar mejor los efectos inhibidores sobre el aparato fotosintético (Reynolds-Henne y col., 2010).

Al comparar los valores de Ψ_w de las plantas de ambos ensayos, se observa incluso que los de los controles en campo ya son más negativos que algunos de los alcanzados en maceta, con potenciales muy negativos en campo (cerca de -2 MPa en las plantas tratadas). Se podría decir entonces que las hojas de *B. bituminosa* pudieron resistir unas condiciones más adversas en campo, gracias en parte a la más lenta imposición del estrés hídrico.

Cuando los mecanismos de evitación no consiguen contrarrestar los efectos perjudiciales que supone la sequía, se ponen en marcha otros que consigan tolerarla. Por eso, cuando se alcanza un cierto nivel de reducción en el Ψ_w , el AO intenta

disminuir el Ψ_s para mantener el Ψ_p . *B. bituminosa* es una planta glicófita, y como tal, su AO implica la síntesis y acumulación de osmolitos orgánicos a expensas del crecimiento, como Pro, otros AAs, ácidos orgánicos y azúcares solubles (Büsis y Heineke, 1998; Lazcano-Ferrat y Lovatt, 1999; Bartels y Sunkar, 2005). Su capacidad para el AO se refleja en el hecho de que en ningún ensayo se produjo una caída del Ψ_p . Que todos los valores en el AO fueran negativos, implica que se realizó un activo AO, y es por esto por lo que el Ψ_p se mantuvo siempre por encima de niveles que permitieran el crecimiento (Nonami, 1998).

La literatura relaciona los azúcares libres con el AO, como en Sánchez y col. (1998), donde la estimulación de los niveles de azúcares inducidos por sequía fue proporcional al AO en otra especie de la misma familia, *Pisum sativum* L. Esto puede comprobarse por ejemplo con *La Perdiz*, la población que más AO realizó en maceta el último día, siendo por lo tanto la que más aumentó sus niveles de azúcares libres respecto su control. Podría pensarse que la prolina participa como osmolito ($R^2 = 0,80$ regresión Pro- Ψ_s), activamente en la regulación del potencial osmótico. En el campo, la contribución de Pro al AO fue mayor en las plantas expuestas a sequía que en plantas regadas (control), con una contribución al Ψ_s de 0,36% y 0,14% respectivamente. Estos valores son bastante bajos, pero si se asume que su acumulación se realiza casi exclusivamente en citoplasma (2-5% del volumen total celular (Büsis y Heineke, 1998)) actuando como osmolito compatible que no interfiere en procesos bioquímicos a concentraciones muy elevadas (Ashraf y Foolad, 2007), puede haber una contribución significativa en el AO para mantener el equilibrio osmótico a través de la membrana de la vacuola, dando concentraciones citoplasmáticas de Pro de hasta 142, 326, 184 y 43 mM para las plantas en maceta de *Famara*, *Llano del Beal*, *La Perdiz* y *Boca de Tauce*, respectivamente.

Las concentraciones en el citoplasma de elementos minerales son controladas dentro de rangos óptimos (por ejemplo el K^+ entre 100-150 mM, según Walker y col., (1996), pero sus concentraciones en la vacuola son proporcionales al suministro externo. Walker y col. (2010) encontraron que, durante la aclimatación a bajas temperaturas, *B. bituminosa* acumuló predominantemente azúcares solubles y cationes (y de ahí que también acumule osmolitos aniónicos) para disminuir su Ψ_s . Los

ácidos orgánicos, hexosas y AAs, se encuentran principalmente en vacuola, mientras que la sacarosa también puede encontrarse, aunque en menor medida, en el citoplasma (Büßis y Heineke, 1998; Nadwodnik y Lohaus, 2008). Los principales ácidos orgánicos acumulados por *B. bituminosa* son cítrico, fumárico, málico y succínico (Martínez-Fernández y Walker, 2011). Siempre hay que tener en cuenta que el Ψ_s se determinó para la savia total del tejido, y por lo tanto las contribuciones de los distintos osmolitos no tienen en cuenta ni los volúmenes relativos de la vacuola y el citoplasma, ni sus distribuciones entre los diferentes compartimentos intracelulares (vacuola= 90%, citoplasma= 2-5% del volumen total).

En el ensayo en maceta, las principales contribuciones al Ψ_s fueron debidas a cationes inorgánicos (especialmente Ca y K) pero en plantas expuestas a sequía, sus contribuciones se vieron reemplazadas por las de azúcares y AAs. Este hecho también fue encontrado por Silva y col. (2010), cuando expusieron plantas de *Jatropha curcas* L. a situaciones de sequía, encontrando que la contribución del K y Na disminuye, y aumenta para azúcares solubles. En la generación del Ψ_s de las plantas crecidas en campo, hubo más implicación de azúcares que de cationes inorgánicos, pero la sequía disminuyó significativamente la contribución del K al Ψ_s , siendo además la Pro el único soluto que muestra un incremento de concentración.

Las células podrán seguir creciendo (expansión por la acumulación de agua y minerales), hasta que la sequía provoque un descenso en el Ψ_p por debajo de un determinado límite, tras el cual la célula no pueda mantener su crecimiento (Nonami, 1998). Maurel y col. (2010), encontraron que la disminución de L_o en plantas de *Zea mays* L., también coincidía con una caída del Ψ_p y por tanto del crecimiento. En el primer ensayo en hidropónico, la exposición a PEG causó un descenso agudo de L_o mientras se conseguía mantener el crecimiento. En el otro ensayo se comprobó que a 9% PEG no se produce alteración del Ψ_w , pero si un descenso del Ψ_s , por lo que también un aumento en el Ψ_p , indicando que *B. bituminosa* consigue tolerar el estrés interno.

En relación con las plantas control, Ψ_p aumentó significativamente para las accesiones *Famara* y *La Perdiz* en maceta y para *Famara* y *Boca de Tauce* en el ensayo

de campo. Kusaka y col. (2005) también encontró este efecto en dos cultivares de *Pennisetum glaucum* (L.) Leeke tolerantes a sequía. Sin embargo, pueden ocurrir otros sucesos que enmascaren dicho efecto, como cambios en la pared celular, disminución del tamaño celular, o pérdida del gradiente de Ψ_w entre las células a pleno crecimiento y células estomáticas (Henson y col., 1983; Nonami, 1998; Sánchez-Blanco y col., 2009). Podría pensarse que no se detectó un descenso del Ψ_p pero si del crecimiento debido a que la inhibición del crecimiento no está relacionada con la pérdida de turgor durante las primeras fases de exposición a la sequía, sino al propio colapso del gradiente de potencial hídrico necesario para el crecimiento (Nonami y Boyer, 1989).

Al analizar entonces el crecimiento en función de las relaciones hídricas, resulta lógico pensar que cuanto mayor sea una planta, más cantidad de agua necesita, por lo que las variedades con mayor biomasa deberían haberse visto obligadas a realizar una mayor extracción de agua a partir del suelo. En el ensayo en maceta, a los 9 días desde el inicio del tratamiento, *Famara* (de mayor biomasa aérea) ya presentaba aproximadamente la mitad de contenido de agua en el suelo que *La Perdiz* (0,08 y 0,15 gH₂O g⁻¹ suelo respectivamente), teniendo *Llano del Beal* y *Boca de Tauce* valores intermedios. Este hecho transmite una idea de la velocidad de extracción de cada población y su efecto sobre el crecimiento. Además, en el ensayo en hidropónico, *Famara* presentó una conductividad hidráulica de las raíces (L_o) más elevada que *Llano del Beal*, donde la absorción de agua por plantas ($L_o \cdot PS$ raíz) fue mayor para *Famara* que para *Llano del Beal* (11,7 frente a 8,6 mg planta⁻¹h⁻¹MPa⁻¹, lo que supone un 36% más elevada) en DN control (en ausencia de estrés hídrico). Su más rápido consumo del agua de la maceta (de volumen cerrado), la sometería entonces a un mayor déficit hídrico antes que a las demás poblaciones, y por eso disminuyó más su crecimiento (TCR) en la última fase del ensayo. En los 2 ensayos en hidropónico, el PF y PS de la PA fueron mayores para *Famara* que para *Llano del Beal* (para la misma biomasa radical, dando R:PA más baja), por lo que la misma cantidad de raíces (limitada por el volumen de suelo ó de DN) tuvo que suministrar agua a una biomasa aérea mayor. En campo, también pudieron desarrollar raíces más largas con una arquitectura más compleja, con mayor superficie y hasta zonas más profundas del suelo, lo que supone otra vía de evitación del estrés hídrico (Khan y col., 2010; Maurel y col., 2010).

En el campo, plantas que disponen de un mayor sistema radicular en las zonas del suelo más profundas y húmedas podrían obtener más eficientemente el agua (Draye y col., 2010). Que *Famara* presentara raíces más profundas también explicaría fácilmente por qué extrae más eficientemente el agua del suelo e inhibe menos su crecimiento en campo (donde fue la más tolerante en cuanto a crecimiento). Entonces *Famara* transporta el agua desde el suelo a la planta con mayor velocidad (comparando su L_o *PS raíz con el de Llano del Beal en la DN control). Cuando se comparan *Llano del Beal* y *Boca de Tauce*, las dos poblaciones con la misma cantidad de agua disponible en maceta el día 9, se comprueba que *Boca de Tauce* mantiene mejor su crecimiento, porque parece evitar mejor el estrés interno. Este orden de tolerancia también se mantiene en campo.

7.6. Furanocumarinas (FCs)

Al comparar las poblaciones procedentes de las Islas Canarias con las poblaciones murcianas en el ensayo de maceta, se aprecia que los niveles de angelicina son más elevados en las peninsulares, los niveles de psoraleno más elevados en las poblaciones canarias y, en consecuencia, que la relación psoraleno:angelicina fue más alta en las canarias (Tabla 4.3.8.). Sin embargo, en el ensayo de parcela, la distribución de las FCs no fue tan clara. Los niveles de FCs fueron entonces más elevados debido a que el estrés impuesto fue más extremo, a pesar de que los niveles de Pro no fueran tan elevados como los de las plantas del ensayo en maceta. En ningún caso, no se pudo apreciar un efecto significativo de estimulación en la síntesis de FCs debido a la variedad, pero se aprecia dicha tendencia en las poblaciones *Boca de Tauce* y *La Perdiz* en el ensayo de campo.

El estrés hídrico supone una estimulación de la síntesis de FCs (Bourgaud y col., 2001). Dicho incremento de FCs puede colaborar en la defensa de la planta frente a la infección de hongos vía lesiones tisulares inducidas por deshidratación (Santana y col., 2004).

7.7. Conclusiones

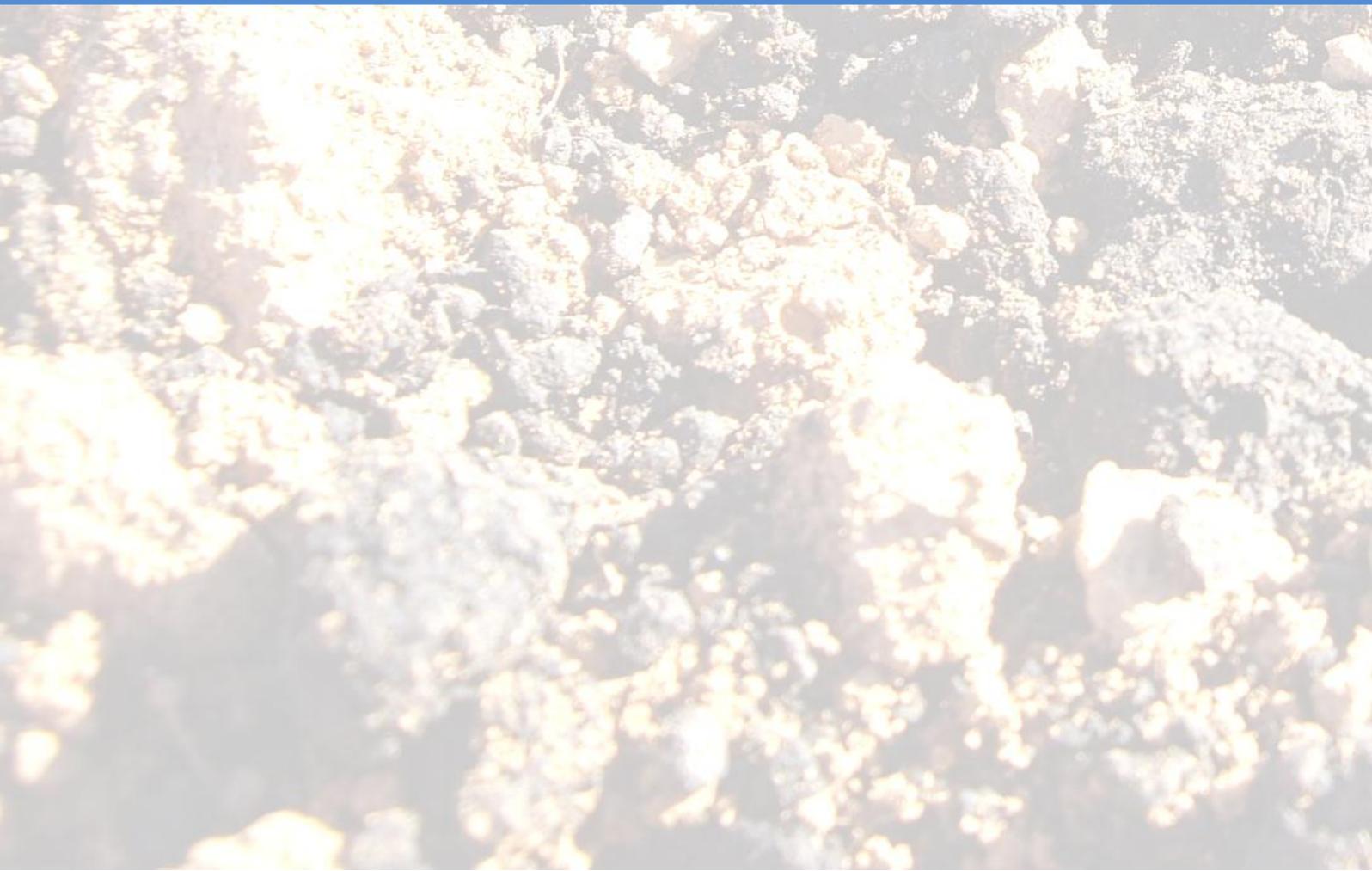
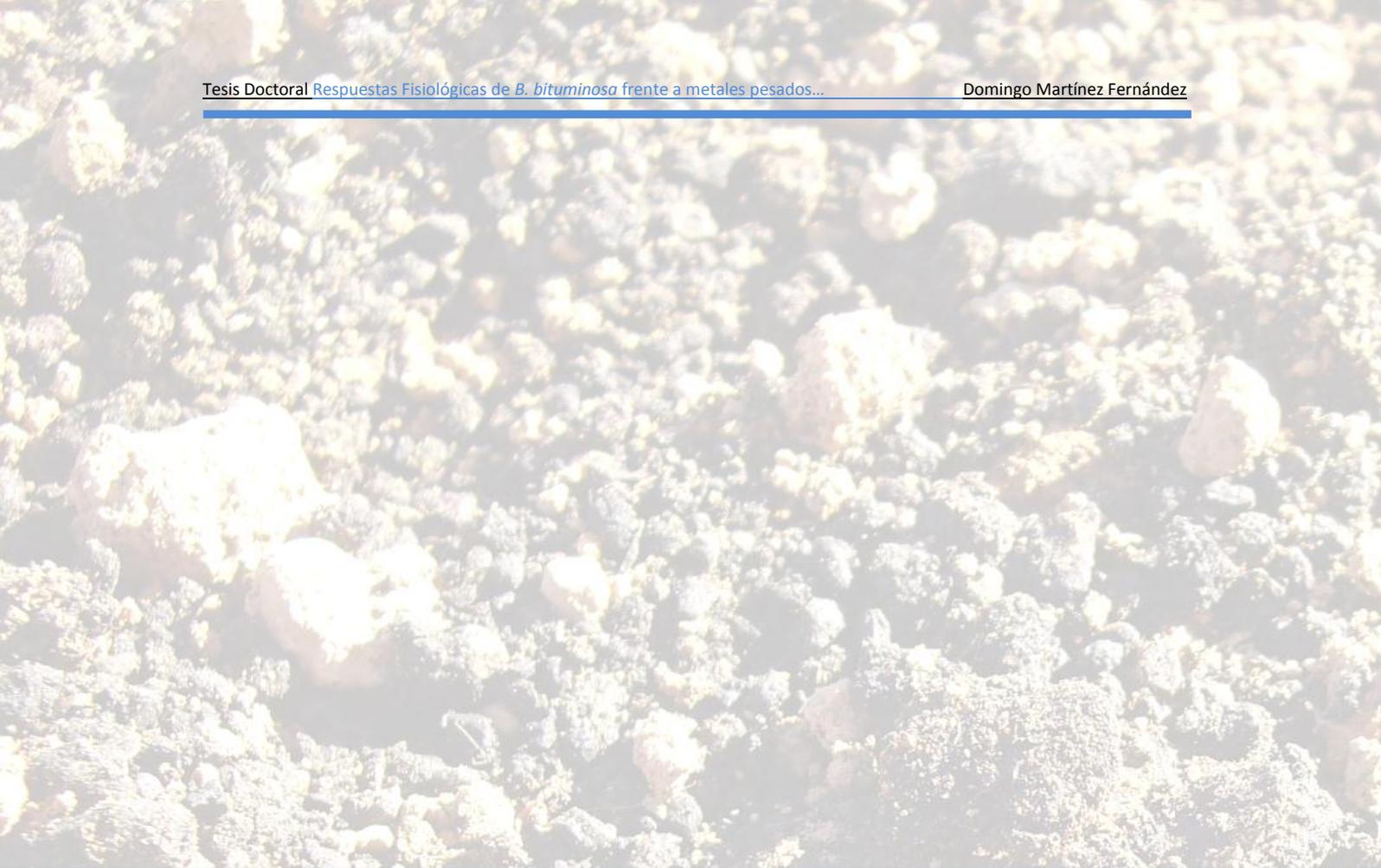
Teniendo en cuenta todo lo anterior, los resultados de estos tres ensayos indican que *Bituminaria bituminosa* presenta características que la catalogan como una especie que posee una elevada resistencia constitutiva a la sequía, a través de comparaciones cuantitativas de ciertos parámetros con otras especies. Aunque *B. bituminosa* tiende a **escapar** de la sequía estival mediante la pérdida de casi todas sus hojas, las poblaciones más tolerantes estarán mejor adaptadas para soportar periodos secos, tanto en verano como durante el resto del año, a través del mantenimiento de sus relaciones hídricas – es decir, la **evitación** del estrés interno.

Las cuatro poblaciones presentan distinto grado de tolerancia a la sequía, aunque todas son capaces de habitar zonas con escaso régimen de precipitaciones (150-600 mm año⁻¹). Los resultados sugieren que *La Perdiz* y *Llano del Beal*, procedentes de Murcia (Sureste español), a pesar de las escasas lluvias de esta zona (<400 mm año⁻¹), fueron las más sensibles a sequía, e intentan **tolerar** el estrés interno (según la disminución en su Ψ_w) o, considerando su mayor sensibilidad del crecimiento en el campo, podrían ser simplemente menos eficientes para evitar el estrés interno. Las dos accesiones canarias mostraron similar comportamiento cuando fueron expuestas a sequía, aunque tengan lugares de procedencia muy diferentes (*Famara* - var. *albomarginata* – la cual escapa de la sequía durante veranos muy secos y calurosos; y *Boca de Tauce* - var. *crassiuscula* – que se comporta como hemicriptofito, escapando de inviernos fríos creciendo durante veranos templados y más húmedos). Estas parecieron más adaptadas para evitar o posponer el estrés interno bajo sequía al mantener mejor sus relaciones hídricas. *Famara*, de áreas con pocas precipitaciones de Lanzarote (<150 mm año⁻¹), alcanzó la mayor tasa de producción de biomasa bajo condiciones deficitarias de agua, y la menor inhibición del crecimiento, comparado con las de condiciones regadas, quizás debido a su AO y mayor L_o , logrando mantener mejor su CRA y Ψ_w , lo que le permitió **evitar** así el estrés interno.

Comparando resultados en maceta (T^a máx. 26-28°C) con las de campo (T^a máx. >35-50°C), destacan los cambios relativos al metabolismo nitrogenado y el metabolismo de hidratos de carbono. Pareció ser que la combinación de sequía y altas

temperaturas inhibe la acumulación de AAs, NH_4^+ y prolina, favoreciendo la de azúcares solubles. Este fenómeno fue particularmente acusado en las poblaciones más tolerantes en campo.

En la sección 12 (Conclusiones Generales) de esta Tesis se recogen implicaciones de las conclusiones de esta sección de sequía, y su relevancia en sus posibles usos agro-industriales.



170 SECCIÓN METALES PESADOS

172 **CAPÍTULO IV:** Metales pesados en maceta

194 **CAPÍTULO V:** Metales pesados en parcela

224 **CAPÍTULO VI:** Metales pesados en hidropónico

SECCIÓN METALES PESADOS (MPs)

Justificación del estudio de *B. bituminosa* frente a MPs

Los suelos contaminados por MPs de la antigua zona minera de La Unión (Murcia) han generado una presión ecológica sobre las especies vegetales de la zona durante miles de años, lo que conlleva a la selección natural de aquellas capaces de tolerar elevadas concentraciones de estos elementos perjudiciales. Para el establecimiento de una cobertura vegetal en sitios contaminados de zonas semiáridas, con el fin de estabilizar físicamente el suelo (Fitoestabilización) y minimizar su erosión y diseminación de los contaminantes (Méndez y Maier, 2008), es necesario contar con especies tolerantes a las pobres condiciones del suelo (MPs, mala estructura, falta de nutrientes, salinidad, etc.), y que además estén adaptadas a sequía y altas temperaturas. Recurrir a las propias especies de la zona no sólo resulta ser la manera más evidente de encontrar las más apropiadas para dicho fin, sino que permite conservar intacta la estructura del ecosistema sin introducir ninguna nueva especie que pueda alterar las comunidades florísticas y faunísticas de la zona. Es por eso por lo que se decidió experimentar con dos especies presentes en los suelos contaminados estudiados. Entre la flora natural de la zona se encuentra *B. bituminosa*, capaz de completar su ciclo biológico con un porte similar al que desarrolla en suelos limpios (Walker y col., 2007). Sin embargo, hasta la fecha no existen estudios exhaustivos a cerca de los mecanismos de tolerancia que dicha especie desarrolla frente a MPs. Por otro lado, resulta interesante e innovador comprobar el posible efecto potenciador por parte de los MPs sobre la síntesis de FCs, ya que como otros estreses, estos podrían promover una sobre-acumulación en las plantas de estos compuestos de interés farmacológico. La elección de las especies vegetales está respaldada además por ensayos anteriores (Correal y col., 2000), en los que se evaluó la germinación, crecimiento, persistencia y reproducción de un total de 98 especies diferentes en una balsa de estériles restaurada en La Unión, de entre las cuales, *B. bituminosa* y *A. halimus* fueron las únicas que alcanzaron los máximos valores en todos los parámetros evaluados. Otras especies del género *Atriplex* también han sido investigadas recientemente en fitoremediación (Méndez y Maier, 2008), con resultados prometedores.

8. CAPITULO IV: Ensayo en maceta con suelos contaminados por MPs

8.1. Objetivos específicos

- Valorar la aplicabilidad de *B. bituminosa* para llevar a cabo tareas fitorremediadoras en suelos contaminados, evaluando su germinación, supervivencia y crecimiento.
- Comprobar qué procedimiento (siembra o trasplante) resultaría más efectivo para el establecimiento de plantas en campo.
- Comparar el comportamiento de *B. bituminosa* frente a suelos contaminados por MPs, con el de *Atriplex halimus*.
- Determinar la capacidad de enmiendas del suelo para promover la supervivencia y el crecimiento de las especies estudiadas.

Los resultados más relevantes de este Capítulo IV dieron como resultado el artículo científico “The effects of soil amendments on the growth of *Atriplex halimus* and *Bituminaria bituminosa* in heavy metal-contaminated soils” (Martínez-Fernández, D., Walker, D.J.), publicado en la revista *Water, Air, and Soil Pollution* 223, 63-72 (2012).

8.2. Procedimientos del ensayo en maceta con MPs

Durante el año 2009 se realizó un ensayo en macetas en cámara de cultivo. Los suelos seleccionados fueron recogidos a partir de tres sitios de la Región de Murcia (Tabla 3.1. y Fotografía 9.2.). Dos de ellos de la zona contaminada por MPs de la Sierra Minera en La Unión, específicamente en las localidades de El Llano del Beal (LB) (37°37'12,5" N, 0°50'13,5" O) y San Ginés de la Jara (SG) (37°38'22,3" N, 0°50'1,9" O), y otro suelo considerado control, a partir de una zona de cultivo limpia de MPs y con altos niveles de N, P y K, en La Alberca (LA) (37°56'25,0" N, 1°08'5,1" O). El suelo fue recogido de cinco puntos diferentes (primeros 30 cm), homogeneizado y tamizado a 4 mm para su distribución en macetas de 250 ml. Las posteriores caracterizaciones fueron realizadas tras un nuevo tamizado a 2 mm.

Además de analizar el efecto de las enmiendas sobre la supervivencia y crecimiento de *B. bituminosa*, se empleó otra especie, *Atriplex halimus*. Las semillas de *B. bituminosa* (Walker y col., 2007) y *A. halimus* (Lutts y col., 2004) para este ensayo fueron recolectadas a partir de plantas silvestres que crecen en la Sierra Minera, sobre suelos contaminados por MPs. Dichas plantas de *B. bituminosa* pertenecen a la variedad *bituminosa* (ver Tabla 3. en Materiales y Métodos).

Para cada especie, se establecieron cuatro tratamientos con el suelo LB: control, compost (23,08 mg g⁻¹ suelo secado al aire; equivalente a 60 t ha⁻¹), purín fresco de cerdo (23,07 µl g⁻¹suelo; 60 m³ ha⁻¹) y cal (0,91 mg g⁻¹ suelo; 2,4 t ha⁻¹). El suelo SG recibió tres tratamientos: control, compost (11,54 mg g⁻¹ suelo, equivalente a 30 t ha⁻¹), y fertilizante mineral NPKS (0,5 mg g⁻¹ suelo; = 1,3 t ha⁻¹). El suelo LA no fue tratado con ninguna enmienda, sino que fue usado como control para comparar el crecimiento y concentración elemental.

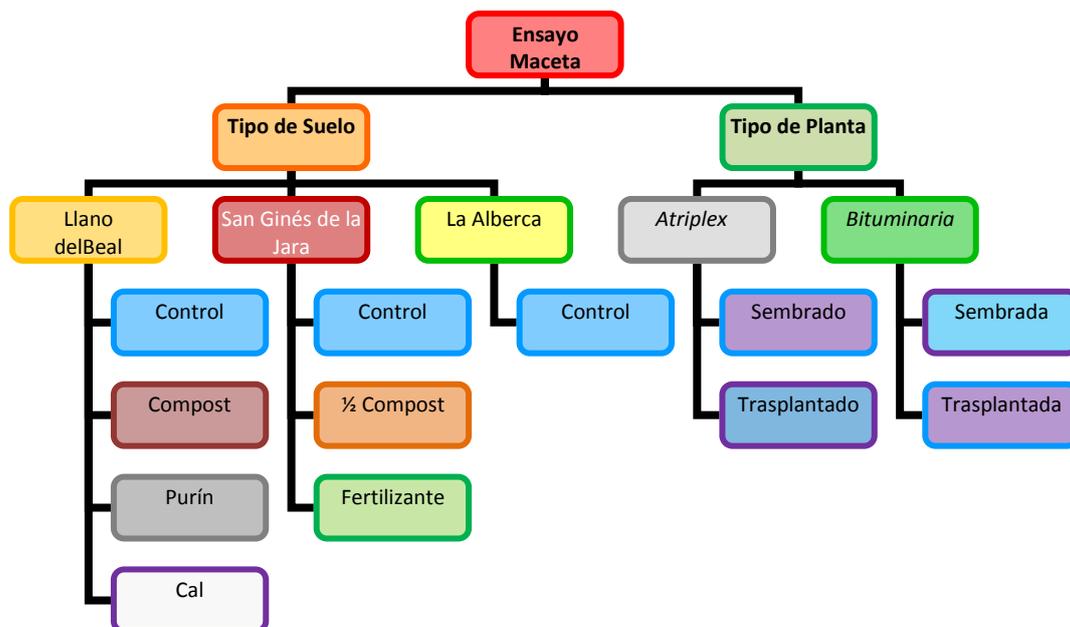


Figura 8.2.- Esquema del experimento en macetas con las especies *A. halimus* y *B. bituminosa* en dos suelos contaminados y un suelo control.

Las dosis de compost y purín fueron elegidas con la intención de añadir una cantidad equivalente de N disponible para las plantas (inorgánico y potencialmente-mineralizable, calculado según Bernal y col. (1998) ($150\text{mg N inorgánico kg}^{-1}$ compost), añadiendo 76 y $79 \mu\text{g N g}^{-1}\text{suelo}$ a LB y SG respectivamente. La dosis de compost añadida al suelo SG fue menor debido a que este suelo presenta mayor contenido en C orgánico (tabla 3.1.). La cal contiene $> 95\%$ CaO + MgO, y fue usada con la intención de aumentar el pH sin la adición de MO en el suelo LB hasta valores similares a los de SG. La adición de fertilizante supuso un aporte por m^{-2} de $6,15 \text{ mg Cu}$, $0,41 \text{ mg As}$, $0,88 \text{ mg Cd}$, 129 mg Fe , $1,78 \text{ mg Mn}$, $0,10 \text{ mg Pb}$ y $15,6 \text{ mg Zn}$. Para el compost, la adición de 6 kg m^{-2} supuso un aporte por m^{-2} de 288 mg Cu , $10,2 \text{ mg As}$, 9720 mg Fe , 552 mg Mn , 216 mg Pb y 846 mg Zn .

Todas las enmiendas utilizadas en este ensayo fueron aportadas por el Grupo de Sostenibilidad de Sistemas Suelo-Planta del CEBAS-CSIC, elaboradas a partir de residuos que son producidos en grandes cantidades en España (ver Introducción Sección 1.5.2.1.). El compost fue elaborado tras maduración a partir de residuos de almazara, usando como base el alperujo mezclado con estiércol de vaca (Alburquerque col., 2004). El purín de cerdo fue añadido a las macetas directamente después de su

colección en una granja porcina murciana. El fertilizante fue del tipo sólido genérico N-P-K-S 15:15:15:5 (5,7% NO_3^- , 9,3% NH_4^+ ; 15% P_2O_5 ; 15% K_2O ; 5% SO_3) para añadir nutrientes minerales sin MO. Según la composición del fertilizante, la adición de esta enmienda supuso un aumento de 0,023 mg Ca, 0,001 mg As, 0,003 mg Cd, 0,496 mg Fe, 0,006 mg Mn, <0,001 mg Pb y 0,060mg Zn por cada Kg de suelo. Tras mezclar y devolver el suelo con su enmienda a las macetas (250 ml), estas se mantuvieron un mes en la misma cámara de cultivo donde se continuaría con el ensayo (fotoperiodo 11 h, PAR $200 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, día/noche 26/20°C, HR 60%), realizando riegos periódicos con agua destilada, para que se produjeran interacciones suelo-enmienda hasta la estabilización del suelo. El fertilizante y la cal se añadirían el mismo día de la siembra/trasplante. Las macetas fueron distribuidas en cinco bloques (bandejas), conteniendo cada uno una réplica (maceta) de cada tratamiento, distribuidas arbitrariamente. Las semillas que fueron utilizadas habían sido recolectadas en la Sierra Minera de la Unión en Murcia, a partir de plantas silvestres en El Llano de Beal (Walker y col., 2007) para *B. bituminosa* (variedad *bituminosa* población *Llano del Beal*, ver Tabla 3. en Materiales y Métodos), y de la Peña del Águila para *A. halimus* (Lutts y col., 2004). Hay que tener en cuenta que si se pretende llevar a cabo tareas fitorremediadoras, las plantas empleadas permanecerán en el ambiente tratado durante tiempo más que suficiente como para permitir su reproducción y su cruce e intercambio genético con otras plantas de la zona, por lo que al usar semillas de la zona, no se invade con material foráneo que pueda desequilibrar el ecosistema que ya exista.

175



Fotografía 8.2.- Uno de los cinco bloques durante el ensayo en maceta, con las plantas de *A. halimus* en la bandeja de la izquierda y de *B. bituminosa* a la derecha.

Se llevaron a cabo dos procedimientos para establecer las plantas de *A. halimus* y *B. bituminosa*: siembra directa y trasplante desde semillero. Para las plantas que serían sembradas directamente en las macetas con suelo, fueron sembradas 100 semillas (0,5 g) de *A. halimus* o 50 de *B. bituminosa* por maceta. Tras determinar el porcentaje de germinación de las semillas en cada suelo, se eliminaron plantas hasta dejar 15 por maceta. Para el trasplante, las semillas fueron crecidas en perlita durante 60 (*A. halimus*) o 30 días (*B. bituminosa*) en cámara de cultivo, y transcurrido ese tiempo se trasplantaron 6 plantas de *A. halimus* o 15 de *B. bituminosa* a cada maceta correspondiente. El riego se realizó con agua destilada, con la misma cantidad para todas las macetas (40 ml por maceta cada 4-5 días).

Las plantas de cada maceta fueron contadas, para determinar la supervivencia, y cosechadas en un mismo evento de recolección, 51 (*A. halimus*) y 37 días (*B. bituminosa*) después de la siembra directa, o lo que es lo mismo, 30 (*A. halimus*) y 33 días (*B. bituminosa*) tras el trasplante. La parte aérea fue lavada tres veces con agua MiliQ, para eliminar posibles restos de suelo, antes de ser secada en un horno a 65°C durante dos días, para posteriormente molerla y determinar PS de la parte aérea y concentración de N, MPs y cationes (ver 3.2. Materiales y Métodos).

Por falta de material suficiente como para poder llevar a cabo los análisis, no se analizaron las plantas de *A. halimus* sembradas (ver Figura 8.3.1.). Los análisis de cationes, P, MPs y As en plantas y suelo de *B. bituminosa* trasplantadas no han sido presentados en esta tesis porque (según los valores de Fe, Pb etc.), sus hojas debieron estar contaminadas con restos de suelo que hicieron que los valores encontrados tras el análisis sean excesivamente elevados.

Tras la cosecha de las plantas, el suelo de cada maceta fue limpiado de raíces, homogeneizado y secado a temperatura ambiente. Se determinó el pH de la pasta saturada del suelo de cada maceta. Los MPs extraídos considerados como “disponibles” fueron medidos por ICP-OES (ver 3.3.3. Materiales y Métodos).

8.3. Resultados y discusión ensayo de maceta

8.3.1. Germinación, supervivencia y crecimiento

Considerando únicamente el tratamiento control de los tres suelos, a pesar de que el suelo LA se trataba de un suelo no contaminado, el % de semillas germinadas de *B. bituminosa* (17%) fue menor ($P < 0,05$) que en los otros dos suelos contaminados (sin enmienda): 49% en LB y 76% en SG. De manera similar, su supervivencia también fue menor en LA (63%), con un 89% en LB y 70% en SG. Esto indica que esta especie tiene cualidades suficientes como para autopropagarse en suelos contaminados. Sin embargo, no pudo detectarse efecto significativo de los tratamientos con enmiendas sobre la germinación y supervivencia de *B. bituminosa*.

En el caso de *A. halimus* en los tres suelos sin aporte de enmienda, la germinación fue muy baja en suelo LB (2,1%), y algo mayor (sin diferencias significativas) en LA (8,4%). Sin embargo, las condiciones físico-químicas del suelo moderadamente contaminado SG (menor CE) permitieron que la tasa de germinación fuera significativamente más elevada (57%), por lo que en este suelo no sería imprescindible llevar a cabo tareas de trasplante para instalar esta especie. Tras la germinación, la supervivencia fue muy elevada en los tres suelos, con un 86% en LA, 100% en LB y 92% en SG, lo que indica que resulta una especie bastante tolerante a suelos con MPs.

Los resultados no indican una relación entre el nivel de contaminación y el porcentaje de germinación. Se ha comprobado que la germinación y emergencia de las semillas no están tan inhibidas por la presencia de MPs en el suelo como su posterior crecimiento (Jeliazkova y Craker, 2002; Wang y Zhou, 2005). Parece ser que otras características de los tres suelos, como podría ser la textura o presencia de macroagregados, pudieron influir más en la germinación. El 90-100% de las plantas de *A. halimus* que habían sido trasplantadas lograron sobrevivir hasta el momento final del ensayo, mientras que para *B. bituminosa*, un 50-79% lo consiguieron, lo que muestra la robustez de *A. halimus*, un factor a tener en cuenta para la manipulación de las plantas en futuros ensayos de campo.

Tabla 8.3.1.a.- Parámetros relacionados con el crecimiento y la supervivencia de la plantas de *B. bituminosa* sembradas y trasplantadas a macetas en el ensayo de MPs. El análisis estadístico de los valores de germinación tuvo que ser realizado con valores transformados ($\sqrt{x/100}$) para que cumplieran con la normalidad.

Suelo	Tratamiento	%Germinación	%Supervivencia
Sembradas			
LA	Control	16,6 ±8,2 b	62,5 ±23,9
LB	Control	48,6 ±10,0 ab	89,4 ±5,0
	Cal	48,6 ±5,4 ab	89,8 ±3,0
	Compost	44,6 ±5,1 ab	79,4 ±10,8
	Purín	44,6 ±4,6 ab	80,1 ±12,8
SG	Control	76,0 ±5,0 a	70,2 ±17,8
	Compost	64,0 ±7,5 a	100,0 ±0,0
	Fertilizante	58,9 ±15,4 ab	53,3 ±27,1
Sig.		0,005	0,37
Trasplantadas			
LA	Control		62,6 ±6,1
LB	Control		71,1 ±11,5
	Cal		78,9 ±4,4
	Compost		50,1 ±12,8
	Purín		63,2 ±13,8
SG	Control		60,7 ±19,8
	Compost		63,1 ±16,8
	Fertilizante		59,0 ±15,5
Sig.			0,90

Para ver el análisis factorial, consultar tabla A.23. en Anexos.

Tabla 8.3.1.b.- Parámetros relacionados con el crecimiento y la supervivencia de la plantas de *A. halimus* sembradas y trasplantadas a macetas en el ensayo de MPs. El análisis estadístico de los valores de germinación tuvo que ser realizado con valores transformados (aseno ($\sqrt{x/100}$)) para que cumplieran con la normalidad.

Suelo	Tratamiento	%Germinación	%Supervivencia
Sembradas			
Alberca	Control	8,4 ±4,0 b	85,6 ±9,9
LB	Control	2,1 ±1,6 b	100,0 ±0,0
	Cal	0,8 ±0,5 b	53,3 ±29,1
	Compost	1,2 ±0,5 b	90,0 ±10,0
	Purín	0,4 ±0,1 b	66,7 ±33,3
SG	Control	57,5 ±11,8 a	92,5 ±4,6
	Compost	72,9 ±8,3 a	88,0 ±8,0
	Fertilizante	51,9 ±10,4 a	69,0 ±10,8
Sig.		<0,001	0,37
Trasplantadas			
Alberca	Control		90,0 ±6,7
LB	Control		100,0 ±0,0
	Cal		100,0 ±0,0
	Compost		100,0 ±0,0
	Purín		100,0 ±0,0
SG	Control		100,0 ±0,0
	Compost		100,0 ±0,0
	Fertilizante		92,7 ±4,5
Sig.			0,08

Para ver el análisis factorial, consultar tabla A.24. en Anexos.

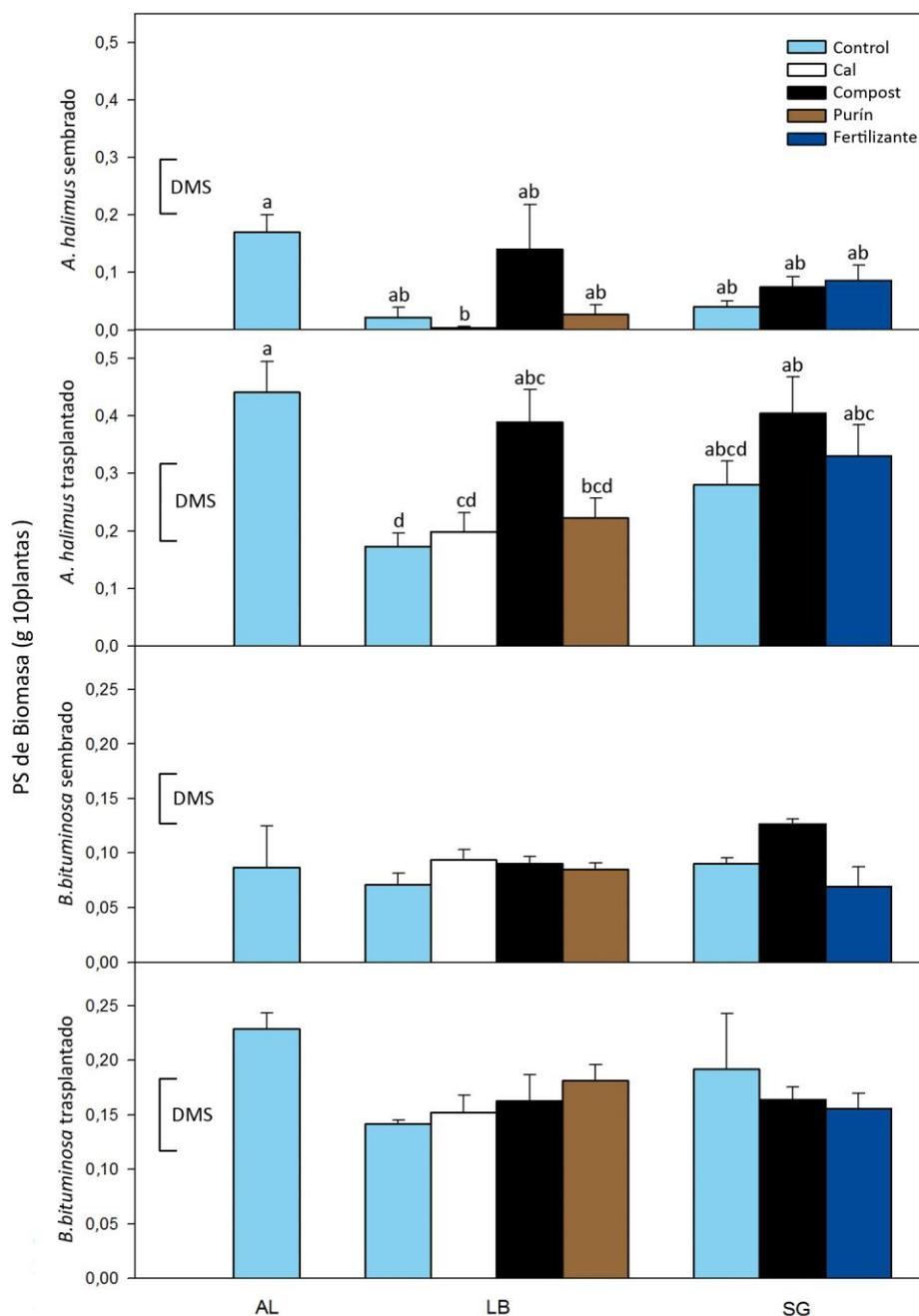


Figura 8.3.1.- Biomasa de la parte aérea (g 10 plantas⁻¹) de *Atriplex halimus*, 51 días después de la siembra directa y 30 días después del trasplante (después de 60 días en perlita), y de plantas de *B. bituminosa*, 37 días tras la siembra directa y 33 días tras el trasplante (después de 30 días creciendo en perlita), en los tres suelos: el suelo no contaminado LA, el altamente contaminado LB, y moderadamente contaminado SG. La cal fue añadida al suelo el mismo día de la siembra o trasplante mientras que el compost y el purín se añadieron con un mes de antelación. DMS=Diferencia Menos Significativa (LSD). Los datos originales pueden consultarse en Tabla A.21 y A.22. en Anexos.

El crecimiento de *B. bituminosa* tras la siembra directa en los suelos contaminados no fue diferente al del suelo limpio LA. Sin embargo, en las plantas trasplantadas en el suelo LB el crecimiento se redujo comparado con el del suelo LA, sin que las enmiendas causaran incremento significativo en el crecimiento (Figura 8.2.1.). Esto indicaba que la siembra directa es preferible al trasplante en el caso de semillas de *B. bituminosa*, alcanzándose mayor % (no significativo) de supervivencia para las sembradas.

Las plantas de *A. halimus* trasplantadas alcanzaron un mayor PS que las sembradas en todos los casos (hay que tener en cuenta la diferencia de edad entre las plantas sembradas y las trasplantadas). Su crecimiento fue más pobre en los suelos no enmendados que en el suelo limpio LA (con más nutrientes), pero experimentó un aumento significativo ($P < 0,05$) por la acción del compost en el suelo LB (Figura 8.3.1.), destacando el compost como la enmienda más efectiva que permitió alcanzar valores similares de crecimiento que en el suelo limpio. Esta es la causa por la cual, además de por su baja tasa de germinación en este suelo, el trasplantarte y la adición de compost suponen para *A. halimus* la mejor opción para trabajos a mayor escala en campo (ver capítulo V).

Los valores elevados de CE del suelo LB (2,3 y 2,5 dS m⁻¹ para extractos 1:5 de suelo control y enmendado con compost, respectivamente) podrían haber explicado la falta de respuesta por parte de *B. bituminosa* a la aplicación de compost en comparación con la mejor respuesta por parte del halófito *A. halimus*, la cual es más común en suelos salinos. En la siguiente sección se discuten el papel de los niveles de nutrientes minerales y de As y los MPs en las plantas.

8.3.2. Efecto de las enmiendas del suelo sobre la disponibilidad de nutrientes minerales en suelo y su incorporación por las plantas

Las tablas 8.3.2.3. y 8.3.2.6. muestran que mientras ambos suelos contaminados presentaron niveles de P y K que pudieron suponer deficiencia para las plantas (Sardans y col., 2008), el compost incrementó marcadamente la disponibilidad de K en ambos suelos, mientras que el purín y el fertilizante no lo hicieron tanto. Esto se tradujo un aumento considerable del K en la parte aérea de las plantas tras la aplicación del compost en ambos suelos contaminados. En el suelo SG, el compost permitió entonces sólo un crecimiento ligeramente mayor, por la deficiencia de P ($<70 \mu\text{mol g}^{-1}$) (Walker y col., 2007; Pang y col., 2009) mientras que para LB, a pesar de que el compost también aumentó la disponibilidad de P significativamente, el crecimiento estuvo restringido probablemente por los elevados niveles de As y Pb en hoja. El N en hojas de *B. bituminosa* en todos los suelos estuvo en el rango de suficiencia para esta especie (Walker y col., 2007).

Las concentraciones de N, P y K en parte aérea de *A. halimus* fueron menores en suelos contaminados, y mayores en suelo limpio, en orden LB < SG < LA (Tabla 8.3.3.3.). Únicamente el aporte de purín al suelo LB produjo un incremento (no significativo) de la concentración de N en parte aérea. La concentración de N pudo haber sido limitante del crecimiento en el suelo LB (Marschner, 1995). La concentración de P y K en la parte aérea mostraron un comportamiento similar, incrementándose sólo por la acción del compost en ambos suelos contaminados, especialmente en LB. Una concentración foliar de K de $400\text{-}500 \mu\text{mol g}^{-1}$ es suficiente para un crecimiento máximo de especies de *Atriplex* (Ramos y col., 2004), necesitándose concentraciones superiores a $70 \mu\text{mol g}^{-1}$ de P (Marschner, 1995). Por lo tanto, los niveles de P y K en hoja en las plantas de los suelos LB y SG representaron deficiencia, de modo que la adición del compost fue la responsable de la estimulación del crecimiento de *A. halimus* debido directamente a la mejora de su estado nutritivo. Únicamente *A. halimus* transplantado creciendo en suelo LB enmendado con compost fue no deficiente en P, aunque su crecimiento pudo haber sido inhibido por la disponibilidad de N.

El mayor efecto del compost en los niveles de P y K en plantas y suelo LB, en relación al purín, es debido a la mayor cantidad de nutrientes aportada (compost= 102 y 891; purín= 13 y 80, $\mu\text{g g}^{-1}$ suelo de P y K respectivamente): esto refleja la selección de las dosis de las enmiendas según su contenido en N disponible, una práctica agrícola estándar para minimizar el riesgo de la lixiviación del nitrato.

La razón por la cual, en el suelo LB, el compost aumenta considerablemente la concentración de P en hojas de *A. halimus* sin aumentar demasiado su disponibilidad en el suelo, pudo haber sido gracias a que el P es un elemento relativamente inmóvil en el suelo (no como K, que es muy móvil) y por eso, para su captura resulta más importante la masa radicular que la cantidad de P en la solución del suelo (Wild, 1988). Farrell y Jones (2010), encontraron que la aplicación de composts ricos en P (P total = 2,8-5,9 $\mu\text{g g}^{-1}$) a suelos deficientes en P (P extraíble con 0,5 M NaHCO_3 = 3 $\mu\text{g g}^{-1}$) no sirvió para aumentar la concentración de P en la solución soluble del suelo.

Tabla 8.3.2.a.- Concentración de As, MPs ($\mu\text{g g}^{-1}$) y macronutrientes (%N, y $\mu\text{mol g}^{-1}$ de P y K) en PS de la parte de *B. bituminosa* sembrada directamente en suelo. El análisis estadístico se refiere a valores transformados para Pb, Zn ($\log(x)$), y N (aseno ($\sqrt{(x/100)}$)). (“-” = por debajo del límite de detección del ICP ($< 0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ en la MS para As y $< 0,02 \mu\text{g g}^{-1}$ para Cd).

Suelo	Tratamiento	As	Cd	Cu	Fe	Mn	Pb	Zn	N	P	K
LB	Control	4,73±0,79a	1,70±0,27	7,9±1,83ab	129±10b	57±0a	304±27a	192±14a	3,46±0,06	63±6a	129±14c
	Cal	6,19±1,04a	2,02±0,10	10,2±1,31a	205±38ab	61±4a	364±58a	215±25a	3,46±0,06	47±4bc	148±12c
	Compost	3,84±0,79a	1,78±0,38	9,0a±1,37b	123±21b	50±6ab	222±17a	191±25a	3,46±0,06	58±6ab	346±37a
	Purín	4,95±1,39a	1,62±0,24	8,8±1,35ab	162±30ab	55±6ab	332±57a	199±27a	3,67±0,07	57±6ab	150±11c
SG	Control	-	-	5,2±0,66bc	271±72a	56±5a	12±2b	43±3b	3,66±0,15	39±2cd	157±15c
	Compost	-	-	3,9±0,45c	234±39ab	42±2b	11±1b	34±2bc	3,43±0,07	39±5cd	239±41b
	Fertilizante	-	-	4,63±0,70c	263±61a	53±4a	11±2b	39±4bc	3,37±0,06	40±2cd	197±10c
LA	Control	0,86±0,09b	-	6,7±1,92abc	237±24ab	28±1c	10±2b	27±3c	3,37±0,09	32±1d	304±24ab
	Sig.	0,012	0,752	0,018	0,049	0,001	< 0,001	< 0,001	0,109	< 0,001	< 0,001

Tabla 8.3.2.b.- Concentración de MPs ($\mu\text{g g}^{-1}$) y macronutrientes (%N, y $\mu\text{mol g}^{-1}$ de P y K) en PS de plantas de *A. halimifolius* trasplantadas. Para Cd y Zn, se usaron valores transformados ($\log(x)$) y (aseno ($\sqrt{(x/100)}$)) para el N. Las concentraciones de As estuvieron por debajo del límite de detección del ICP (equivalente a $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ PS). Para Cd, “-” = no detectable ($< 0,02 \mu\text{g g}^{-1}$ PS).

Suelo	Tratamiento	Cd	Cu	Fe	Mn	Pb	Zn	N	P	K
LB	Control	2,37a	8,7±0,7ab	483±90ab	72±12a	118±23ab	244±32a	2,64±0,22c	6±1d	300±26c
	Cal	1,67a	8,0±0,9bcd	622±73a	60±9a	149±18a	213±23a	2,66±0,22c	8±3d	298±34c
	Compost	2,35a	8,5±0,9bc	231±21c	61±10a	58±8c	221±24a	2,60±0,46c	79±6a	430±50ab
	Purín	2,44a	8,6±0,1ab	438±95b	73±13a	108±25b	236±30a	3,08±0,12bc	8±2d	339±50bc
SG	Control	-	6,4±0,9cd	188±43c	54±3a	10±3d	56±4b	3,64±0,31b	26±4c	360±33abc
	Compost	-	6,1±0,5d	95±26c	52±1a	4±0d	46±3b	3,70±0,46b	53±6b	419±45ab
	Fertilizante	-	5,2±0,4	137±22c	49±3a	8±2d	50±2b	4,00±0,35b	42±8b	353±41abc
LA	Control	0,02b	10,7±0,7a	98±12c	26±1b	4±0d	23±2c	5,42±0,15a	72±a	466±21a
	Sig.	< 0,001	0,002	< 0,001	0,016	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,044

8.3.3. Efecto de las enmiendas del suelo sobre la disponibilidad de As y MPs en suelo y su captura por las plantas

La aplicación de cal tenía la intención de aumentar el pH del suelo LB y permitir la separación de cualquier otro efecto por parte de enmiendas de tipo orgánico sobre el pH (y consecuentemente la especiación de metales) por su contenido en MO (Bernal y col., 2007). Sin embargo, no se causó un cambio significativo sobre el pH del suelo, lo que explica la ausencia de efecto de la cal sobre las plantas, disponibilidad de MPs, ni sobre P o K en el suelo LB. Es más, tampoco hubo efecto significativo sobre el pH con cualquier otro tratamiento en el momento de la cosecha (7,5-7,6 para suelo LB, 7,6-7,7 para suelo SG, y 7,8-7,9 para suelo LA).

Tabla 8.3.3.a.- Valores de pH de cada una de las combinaciones del ensayo en maceta de MPs. No se detectaron diferencias significativas causadas por el tratamiento.

		Control	Compost	Cal	Purín	Fertilizante
<i>Bituminaria sembrada</i>	LB	7,47	7,47	7,54	7,49	
	SG	7,60	7,66			7,54
	LA	7,81				
<i>Bituminaria trasplantada</i>	LB	7,50	7,43	7,50	7,48	
	SG	7,54	7,61			7,48
	LA	7,86				
<i>Atriplex sembrado</i>	LB	7,46	7,47	7,56	7,52	
	SG	7,66	7,60			7,57
	LA	7,92				
<i>Atriplex trasplantado</i>	LB	7,60	7,55	7,51	7,54	
	SG	7,76	7,77			7,72
	LA	7,99				

Las concentraciones de MPs extractadas con 0,1 M CaCl₂ o DTPA y de As extraíble con 0,5 M NaHCO₃, han sido usadas para indicar la disponibilidad de esos elementos para las plantas, estrechamente relacionadas con las concentraciones en sus tejidos (McLaughlin y col., 2000; Walker y col., 2003, 2004; Clemente y col., 2005).

La MO altamente humificada del compost, como los ácidos húmicos, tiene una gran afinidad por los MPs, particularmente por Cu, Cd, Fe y Pb, pudiendo formar compuestos estables insolubles. Por otro lado, los abonos animales y purines son ricos en compuestos orgánicos de bajo peso molecular que pueden formar complejos organometálicos con los MPs, incrementando de ese modo su disponibilidad para las plantas y extractabilidad con soluciones salinas como el CaCl_2 (Bernal y col., 2007; 2009). Se esperaba un mayor efecto del compost debido a que la adición de MO fue 15 mg g^{-1} para compost y $0,25 \text{ mg g}^{-1}$ para purín. Puesto que los niveles de Cu extractable con $0,1 \text{ M CaCl}_2$ estuvo siempre por debajo del límite de detección del ICP (aproximadamente $0,4 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ suelo), las tablas muestran los valores de la fracción de Cu extractable con DTPA.

Los niveles de MPs y del As total y disponible descendieron en el orden $\text{LB} > \text{SG} > \text{LA}$, siendo el contrario que para N, P y K. Las enmiendas orgánicas tuvieron poco efecto en su disponibilidad en suelo (Tabla 8.3.3.b.). Un extracto acuoso podría haber sido otra manera de determinar la disponibilidad de los metales, pero de la Fuente y col. (2010), encontraron que el purín apenas afecta a la concentración de metales extractables con agua. Los únicos efectos estadísticamente significativos ($P < 0,05$), comparados con los suelos no enmendados, fueron:

- un incremento del Cu extractable con DTPA en el suelo LB, debido al purín para *A. halimus* trasplantado.
- un descenso del Fe extractable con $0,1 \text{ M CaCl}_2$ tanto por acción del compost como del purín para *A. halimus* trasplantado en el suelo LB, y un descenso no significativo por acción del purín con *B. bituminosa* trasplantada.
- un incremento en el As extractable con $0,5 \text{ M NaHCO}_3$ en compost para *B. bituminosa* sembrada en suelo LB.
- un incremento del Mn extractable con $0,1 \text{ M CaCl}_2$ de las macetas con *B. bituminosa* sembrada en el suelo LB.

En cuanto al As, especialmente perjudicial para la familia de las leguminosas (Walsh y col., 1977), la concentración en hoja de *B. bituminosa* sembrada y cultivada en suelo LB ($> 3,5 \mu\text{g g}^{-1}$) (Tabla 8.3.2.a.) fue probablemente fitotóxica (Chaney, 1989). Este fue seguramente otro factor que limitó su crecimiento en este suelo. El compost causó un aumento del P y As disponible, debido probablemente al desplazamiento del As, de similitud química, desde sitios de absorción en el suelo por los fosfatos relacionados con el compost (Fitz y Wenzel, 2002). Cox (1995) sugiere que el As puede sustituir al P en plantas, pero como no puede participar en el proceso de transferencia de energía, desencadena en las plantas deficiencia y aumenta la captura de P. De hecho existió correlación positiva ($R = 0,619$; $P = 0,004$) entre las concentraciones de As y P en hojas de *B. bituminosa*. Esto no sucedió en *A. halimus* debido a su mayor capacidad para excluir As de sus partes aéreas, por lo que hubo una correlación positiva entre el crecimiento y la concentración de P (Coeficiente Pearson, $R = 0,567$; $P = 0,001$). En *B. bituminosa*, dicha correlación fue negativa ($R = -0,622$; $P < 0,001$), tal y como sucedió con *Brassica napus* L. en Carbonell-Barrachina y col. (1999). El mayor tiempo de exposición (37 días) de *B. bituminosa* sembrada a los suelos contaminados, en comparación con las plantas trasplantadas de *A. halimus* (30 días, después de crecer 60 días en perlita), no fue la razón para su mayor acumulación de As, ya que en ninguna de las cinco réplicas de *A. halimus* sembrado (crecido 51 días en el suelo) el As estuvo por encima del límite de detección (aproximadamente $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$). Igualmente, los niveles en *A. halimus* sembrado fueron similares o menores que los valores correspondientes para *A. halimus* trasplantado. El compost usado en este ensayo, rico en P y Fe, es capaz de inmovilizar Pb en el suelo (Bernal y col., 2007). Aunque no hubo un efecto significativo del compost sobre el Pb disponible en el suelo LB, la transferencia de Pb desde las raíces a las partes altas pudo haberse visto reducida por su precipitación como $\text{Pb}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$ en la superficie de las raíces (Cao y col., 2002). Las concentraciones de Pb en hoja de plantas control de *B. bituminosa* ($304 \mu\text{g g}^{-1}$) y *A. halimus* ($118 \mu\text{g g}^{-1}$) representaban toxicidad (Kabata-Pendias, 2001). Como la aplicación de compost redujo dichos valores hasta $58 \mu\text{g g}^{-1}$ en *A. halimus*, dicho tratamiento ayudó a paliar la toxicidad causada por el Pb. En *B. bituminosa*, sin embargo, ningún tratamiento redujo la concentración de Pb por debajo de $220 \mu\text{g g}^{-1}$.

Tabla 8.3.3.a.- Concentraciones de MPs disponibles en suelo ($\mu\text{g g}^{-1}$) (extracción realizada con 0,1 M CaCl_2 para Cd, Fe, Mn, Pb y Zn; con DTPA para el Cu), P y As (con 0,5 M NaHCO_3) y K (con 10 mM NaN_3), en el momento de la cosecha de las plantas de *B. bituminosa* sembradas directamente en el suelo. Los valores de Fe, Pb, Zn, P y K, fueron transformados ($\log(X)$). Para Cd y P, “-” indica valores por debajo del límite de detección del ICP (0,1 y 0,02 $\mu\text{g g}^{-1}$ suelo, respectivamente).

Suelo	Tratamiento	As	Cd	Cu	Fe	Mn	Pb	Zn	P	K
LB	Control	0,75±0,21b	0,79±0,08	4,05±0,22a	9,92±1,44a	1,48±0,16ab	3,33±0,38a	9,34±1,03a	-	27±3d
	Cal	0,61±0,11b	0,70±0,05	3,94±0,22a	9,98±1,70a	1,36±0,12b	3,28±0,51a	8,52±0,78a	-	28±7d
	Compost	2,60±0,39a	0,70±0,04	3,80±0,13a	8,47±1,01a	1,75±0,12a	2,84±0,21a	8,71±0,33a	1,4±0,5c	320±41a
SG	Purín	0,58±0,12b	0,66±0,04	3,70±0,12a	7,03±1,83a	1,36±0,08b	2,73±0,47a	7,78±0,67a	-	41±4c
	Control	0,36±0,06b	-	0,88±0,04c	1,40±0,06 b	0,44±0,03c	0,03±0,00b	0,11±0,03b	2,6±0,4bc	18±2d
	Compost	0,34±0,06b	-	0,91±0,05c	1,27±0,16b	0,45±0,05c	0,05±0,01b	0,07±0,01b	4,9±0,6b	85±8b
LA	Fertilizante	0,26±0,09b	-	0,90±0,04c	1,47±0,30b	0,46±0,07c	0,05±0,02b	0,07±0,00b	6,8±0,8b	25±3b
	Control	-	-	1,41±0,05b	0,75±0,16c	0,35±0,03c	0,03±0,01b	0,02±0,00c	64,6±6,6a	390±32a
Sig.		< 0,001	0,450	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Tabla 8.3.3.b.- Concentraciones de MPs disponibles en suelo ($\mu\text{g g}^{-1}$) (extracción realizada con 0,1 M CaCl_2 para Cd, Fe, Mn, Pb y Zn; con DTPA para el Cu), P y As (con 0,5 M NaHCO_3) y K (con 10 mM NaNO_3), en el momento de la cosecha de las plantas de *A. halimifolius* trasplantadas. Los valores de Cu, Mn, Pb, P y K fueron transformados ($\log(X)$). Para Cd y P, “-” indica valores por debajo del límite de detección del ICP (0,1 y 0,02 $\mu\text{g g}^{-1}$ suelo, respectivamente).

Suelo	Tratamiento	As	Cd	Cu	Fe	Mn	Pb	Zn	P	K
LB	Control	1,23±0,16ab	0,46±0,04	3,46±0,08b	4,83±0,55a	0,76±0,08a	1,06±0,30a	4,48±0,35a	-	21±2e
	Cal	1,18±0,06ab	0,47±0,05	3,53±0,11b	3,46±0,75ab	0,72±0,06a	1,09±0,29a	4,43±0,39a	-	26±3e
	Compost	1,39±0,18a	0,48±0,07	3,80±0,18ab	2,52±1,45b	1,04±0,13a	0,97±0,29a	4,69±0,63a	0,9c	383±34b
	Purín	0,93±0,09b	0,42±0,04	4,03±0,11a	3,17±0,85b	0,80±0,11a	0,91±0,28a	4,18±0,54a	-	46±4d
SG	Control	0,33±0,04c	-	0,68±0,03d	0,49±0,06c	0,30±0,01b	0,04±0,02b	0,09±0,00b	4,1b	20±2e
	Compost	0,35±0,06c	-	0,73±0,02d	0,47±0,00c	0,34±0,02b	0,04±0,02b	0,10±0,00b	4,6b	93±4c
	Fertilizante	0,49±0,10c	-	0,71±0,02d	0,58±0,03c	0,35±0,01b	0,07±0,03b	0,10±0,02b	-	25±1e
LA	Control	0,04±0,01d	-	1,23±0,07c	0,61±0,05c	0,29±0,01b	0,10±0,03b	0,03±0,01b	78,6a	523±38a
	Sig.	< 0,001	0,887	< 0,001	0,002	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

La adición del compost al suelo LB causó una reducción significativa del Fe disponible y de la concentración de Fe en hojas de *A. halimus*, desde 483 (control) a 231 $\mu\text{g g}^{-1}$, lo que ayudó a promover el crecimiento (Marschner, 1995). El purín de cerdo también redujo la disponibilidad de Fe (Tabla 8.3.3.4.), pero no tanto como el compost, de modo que sólo pudo evidenciarse una pequeña reducción del Fe en *A. halimus*.

Para ambas especies, las concentraciones de Mn en parte aérea de plantas crecidas sobre suelo contaminado estuvieron dentro del rango de suficiencia, y podían haber llegado a la deficiencia ($< 30 \mu\text{g g}^{-1}$) en el suelo LA (Kabata-Pendias, 2001). A pesar de la elevadísima concentración de Zn total en el suelo LB, ambas especies fueron capaces de excluir Zn de sus partes aéreas, manteniendo su concentración por debajo de niveles tóxicos (Davis y Beckett, 1978; Lutts y col., 2004).

Tanto para *B. bituminosa* como *A. halimus*, no hubo efecto de las enmiendas sobre las concentraciones de Cd y Cu, las cuales permanecieron por debajo de 11 y 2,5 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente, indicando una ausencia de fitotoxicidad (Davis y Beckett, 1978; Balsberg Pålsson, 1989; Lutts y col., 2004; Méndez y col., 2007; Manousaki y Kalogerakis, 2009). La formación de especies CdCl_n^{2-n} en el suelo salino LB pudo haber restringido la captura de Cd por parte de las plantas (Lefèvre y col., 2009). De nuevo, la capacidad de *A. halimus* para excluir el As y MPs en sus partes aéreas, visto aquí y en Manousaki y Kalogerakis (2009), confirma su alto potencial para fitoestabilización.

Marqués y col. (2005), describen cómo la aplicación de lodos de depuradora y/o el cultivo de *A. halimus* disminuye la erosión inducida por la lluvia y por lo tanto la propagación de contaminantes. En el suelo SG, la capacidad del compost para incrementar el crecimiento de *A. halimus* sin alterar significativamente la concentración de MPs, indica que los valores medidos de Mn, Pb y Zn en hoja no fueron fitotóxicos. De este modo, la cantidad de nutrientes del suelo es lo que limita el crecimiento de *A. halimus* tanto o más que la toxicidad de MPs, aunque la concentración total de Pb y Zn esté por encima de los límites establecidos por la Unión Europea para suelos agrícolas: 50/300 y 150/300 (pH 6/7) para Pb y Zn, respectivamente (Council of the European Communities, 1986).

8.4. Conclusiones ensayo maceta MPs

Este ensayo demuestra el potencial del uso conjunto de compost y *A. halimus* para estrategias fitorremediadoras (fitoestabilización). Su crecimiento estaba inhibido en los suelos contaminados sin enmienda, debido aparentemente a la deficiencia de N, P y K, y empeorado en suelo LB por la toxicidad de Pb. Es por eso por lo que el aporte de compost favoreció su crecimiento, ya que éste no sólo aportó gran cantidad de K y P, sino que hizo disminuir la concentración de Pb en sus hojas. No se pudo detectar un efecto significativo de los tratamientos del suelo sobre el crecimiento de *B. bituminosa*, ni siquiera con el gran aporte de K por parte del compost, debido quizás a los altos niveles de As y Pb en sus tejidos y a la elevada salinidad del suelo LB, un estrés que la especie halófila *A. halimus* tolera. La siembra directa permite una mayor supervivencia y producción de biomasa tras el establecimiento de plantas de *B. bituminosa* en suelos contaminados, mientras que el trasplante resultó ser más adecuado para *A. halimus*. Por lo tanto, es importante tener en cuenta dichas consideraciones durante futuros ensayos y posibles técnicas para la fitoestabilización de suelos contaminados.

9. CAPITULO V: Ensayos en parcela con suelos contaminados por MPs

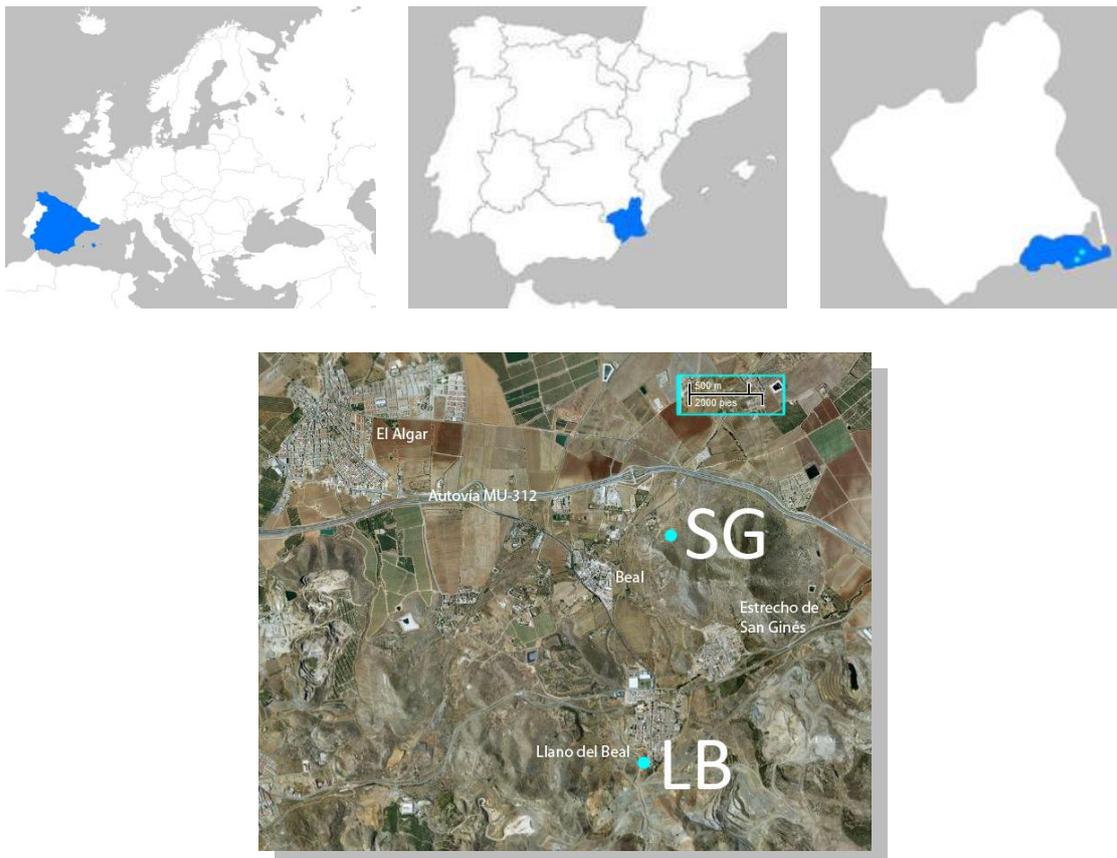
9.1. Objetivos específicos

- Comprobar la supervivencia y crecimiento de *B. bituminosa* frente a los mismos suelos contaminados que en el anterior capítulo, pero en condiciones climatológicas reales, donde se dan otros estreses abióticos como la sequía, las altas y bajas temperaturas, o interacción con otras especies, etc. Para ello también se evaluará otra especie tolerante a MPs y propia de zonas semiáridas, *Atriplex halimus*.
- Realizar un ensayo a largo plazo, con el que se pueda comprobar la evolución y perennidad de las plantas establecidas en suelo contaminado, así como su capacidad para producir semillas y permitir una autopropagación de la especie.
- Comprobar el efecto que tiene la presencia de las plantas sobre la biodisponibilidad de MPs en el suelo a corto-medio y largo plazo.
- Estudiar el efecto de enmiendas del suelo sobre el crecimiento de las plantas crecidas *in situ* en suelos contaminados.

Parte de los resultados de este Capítulo V han sido recogidos en los artículos “The use of a halophytic plant species and organic amendments for the remediation of a trace elements-contaminated soil under semi-arid conditions” (Clemente, R., Walker, D.J., Pardo, T., Martínez-Fernández, D., Bernal, M.P.) en *Journal of Hazardous Materials* 223-224, 63-71 (2012); y “Phytostabilisation with native plants of a heavy metal-contaminated soil and natural attenuation by vegetation succession” (Pardo, T., Martínez-Fernández, D., Clemente, R., Bernal, M.P., Walker, D.J.), actualmente en redacción.

9.2. Procedimientos de los ensayos

Para la realización de los ensayos de campo, como en el anterior capítulo y en vista de los resultados, se empleó además de *B. bituminosa*, a la especie *Atriplex halimus*, capaz de crecer de manera natural en la zona de estudio. Se llevaron a cabo dos ensayos de campo en la Sierra Minera de la Unión, directamente sobre las zonas a partir de las cuales se obtuvo el suelo empleado en el anterior ensayo en maceta (ver Capítulo IV): uno con altos niveles de MPs en el Llano del Beal (LB), y otro con un nivel de contaminación más moderado en San Ginés de la Jara (SG). Para la parte experimental de este capítulo se contó con la colaboración de la Profesora de Investigación, Dra. M. Pilar Bernal, y el Dr. Rafael Clemente, del equipo *PhytoRec-Tecnologías Ambientales* del Grupo de Sostenibilidad del sistema Suelo-Planta del CEBAS-CSIC, encargándose del efecto que las enmiendas y la rizosfera de dichas plantas ejercieron sobre el suelo y la biodisponibilidad de MPs.



Fotografías 9.2.- Mapas que ilustran la situación de los ensayos a nivel europeo, español, y en la Región de Murcia. El mapa inferior muestra la ubicación de los dos ensayos en las localidades de San Ginés de la Jara (SG) y en El Llano del Beal (LB)(a partir de GoogleMap).

Tabla 9.2.- Informe agro-meteorológico de tres años recogidos por la estación meteorológica de Roche, la más próxima a las parcelas (37° 37' 41,35"N; 0° 4' 8,73"O).

Estación: CA72 Roche, MUNICIPIO: La Unión PARAJE: La Torreta					
Del 28-08-2008 al 28-08-2011		Otoño	Invierno	Primavera	Verano
ETO (mm) mes ⁻¹ FAO		58,1	51,7	135,4	159,9
Horas de Sol (h) día ⁻¹		7,2	7,7	10,8	11,3
Precipitación (mm) mes ⁻¹		46,1	47,2	13,9	36,2
Velocidad Viento Media (m/s)		2,0	1,9	2,2	2,3
Temperatura	Máxima (°C)	23,3	17,9	28,7	32,8
	Media (°C)	14,8	9,8	18,6	24,8
	Mínima (°C)	5,9	2,4	10,7	17,9
Humedad	Máxima (%)	96,3	82,0	94,5	95,1
	Media (%)	71,5	61,4	67,4	69,5
	Mínima (%)	27,1	23,3	21,5	27,1
		2008	2009	2010	2011
ETO (mm) año ⁻¹ FAO		1283	1313	1195	1201
Precipitación (mm) año ⁻¹		337,2	525,4	351,6	242,0
Radiación Neta (w m ⁻²) día ⁻¹		210,2	214,1	200,6	202,6

La estructura del cuadro de cultivo fue el mismo en ambos ensayos (ver Figuras 9.2. 1. para SG y 9.3.2.1. para LB). Los tratamientos se distribuían en 12 parcelas de 3 m x 1 m, subdivididas en tres subparcelas de 1 m² cada una. Entre cada parcela se dejó un pasillo de 0,5 m. Se establecieron 3 tratamientos por ensayo, con 4 réplicas cada uno.

Las semillas que fueron utilizadas habían sido recolectadas en la Sierra Minera de la Unión en Murcia, a partir de plantas silvestres en El Llano de Beal (Walker y col., 2007) para *B. bituminosa* (variedad *bituminosa* población *Llano del Beal*, ver Tabla 3. en Materiales y Métodos), y de la Peña del Águila para *A. halimus* (Lutts y col., 2004).

9.2.1. En San Ginés de la Jara (SG)

El suelo de la localidad de San Ginés de la Jara (SG), dentro de la zona de influencia y próximo a la Sierra Minera de La Unión (Murcia), no ha estado directamente afectado por la actividad minera, pero sus concentraciones de metales (ver Tabla 3.1.) imposibilitan que en él se realicen actividades agrícolas (pH=7,6; Zn= 632; Pb= 651 mg kg⁻¹) (Council of the European Communities, 1986; BOE 2005b). El ensayo estaba localizado específicamente en las coordenadas 37°38'22,3" N, 0°50'1,9" O.

Las 12 parcelas se dividieron en tres zonas, una "Sin Planta" (S), otra con plantas de *B. bituminosa* (B) y la tercera con *A. halimus* (A) (ver Figura 9.2.). Se aplicaron los tratamientos control, compost maduro y fertilizante mineral (ver características en Tabla 3.2.). El compost se añadió a las parcelas correspondientes el 30/10/2008, con la misma dosis empleada en el ensayo de maceta, 9 Kg de compost seco por parcela (18 Kg de compost fresco) (equivalente a 30 t ha⁻¹) (contiene 150 mg N inorgánico Kg⁻¹ de compost). El fertilizante N:P:K (15:15:15) se añadió el 10/12/2008 echando 390 g por parcela (equivalente a 1,3 t ha⁻¹), para igualar la dosis de N inorgánico aportado por el compost (ambos aportaron 195 Kg ha⁻¹ N inorgánico disponible).

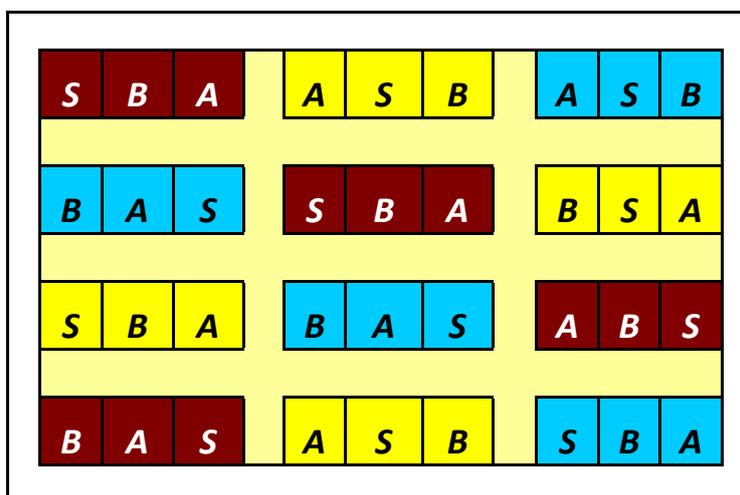


Figura 9.2.1.- Diagrama de la estructura del ensayo de campo en San Ginés de la Jara. Los colores representan los tratamientos de suelo, y las letras a la especie establecida en cada subparcela (Control, Compost, Fertilizante, A= *A. halimus*, B= *B. bituminosa*, S= Sin Planta).



Fotografías 9.2.1.- Parcela donde se llevó a cabo el ensayo de MPs en San Ginés de la Jara (La Unión, Murcia) (izquierda). A la derecha se muestra un detalle de plantas de *B. bituminosa* durante el ensayo.

A. halimus se sembró en alveolos el 25/08/2008 en una mezcla de suelo SG y perlita (10%-90%) mientras *B. bituminosa* se sembró el 15/10/2008 en turba:perlita 3:1. Se mantuvieron en cámara de cultivo (12-h de luz a 27°C y 22°C en oscuridad) hasta que se pasaron a umbráculo para endurecerlas y mejorar su resistencia a las condiciones climáticas reales 3 semanas antes del trasplante para *A. halimus*, y 15 días para *B. bituminosa*. El 25/11/2008, en cada subparcela en campo se establecieron inicialmente 16 plantas de *A. halimus* y 18 de *B. bituminosa* por subparcela. Todas las parcelas (con o sin plantas) fueron regadas (4 l m^{-2}) tres veces con agua del grifo (pH 8,8; 2,75 mM Ca, 0,06 mM K, 3,37 mM Mg, 2,99 mM Na; CE= $0,88 \text{ dS m}^{-1}$) en el momento del trasplante y al primer y segundo mes.

La producción de biomasa superficial fue determinada cortando 3 plantas típicas por subparcela. Las muestras de hoja fueron recogidas en varios eventos. En mayo del 2010, frutos maduros también fueron recolectados de las plantas. El material siempre fue enjuagado con agua destilada, lavado con 0,1% Tritón durante 1 min para eliminar la posible deposición de suelo, y entonces enjuagados cuatro veces más con agua destilada. El material fue secado en horno (65°C, 3 días) y molido hasta polvo fino. El análisis elemental fue realizado tal y como se describe en la sección 3.2. en Materiales y Métodos Los eventos de cosecha se realizaron a distintas fechas (14/04/2009 = 4 meses, 26/03/2010 = 16 meses, y 2/12/2010 = 24 meses).

9.2.2. En Llano del Beal (LB)

Este suelo se encuentra cerca de la localidad El Llano del Beal (LB), junto a una escombrera de residuos mineros de La Unión (Murcia), concretamente en las coordenadas 37° 37' 12,40'' N, 0° 50' 13,51'' O. Es una zona más dramáticamente afectada por la actividad minera, por lo que el suelo está muy alterado y se puede considerar más bien una mezcla de suelo con residuos mineros sin desarrollo edáfico (ver Tabla 3.1.). Su concentración de MPs es muy elevada (pH=6,2; Zn= 9686; Pb= 10188 $\mu\text{g g}^{-1}$), y la CE es unas 10 veces superior a la de San Ginés de la Jara, lo que condicionó el desarrollo de las plantas.

Se aplicaron dos enmiendas orgánicas (30/10/2008): un compost maduro con una dosis de 18 Kg de compost seco por parcela (36 Kg de compost fresco por parcela) equivalente a 60 t ha⁻¹, y purín fresco de cerdo (18 l por parcela = 60 m³ ha⁻¹), manteniendo el resto de parcelas como control sin enmienda. Todas las parcelas control se enmendaron con cal previamente (2,3 t ha⁻¹ = 700 g por parcela) (11/11/2008) a fin de ajustar los valores de pH a los adecuados para el crecimiento vegetal.

Se sembró *A. halimus* el 25/08/2008 en 90% perlita, 10% suelo SG. Para *B. bituminosa*, la siembra se realizó el 29/10/2008 en macetas con suelo La Alberca recogido del IMIDA (detalles de ambos suelos en Tabla 3.1.). Se mantuvieron en la cámara de cultivo (12-h de luz a 27°C y 22°C en oscuridad) hasta el 7/11/2008, cuando se sacó las plantas al umbráculo y 20 días después, se trasplantaron en las subparcelas correspondientes en El Llano del Beal. Se establecieron inicialmente 16 plantas de *A. halimus* por subparcela, con (AB) y sin (A) 20 plantas iniciales de *B. bituminosa*. El propósito fue determinar la interacción entre las dos especies resultado de la fijación de nitrógeno por parte de *B. bituminosa* y el transporte de agua desde capas húmedas a la superficie ("hydraulic lift") por parte de *A. halimus*.

En este ensayo se realizaron los eventos de cosecha a la misma fecha que en el anterior ensayo en SG (4 meses (16/04/2009: *A. halimus* + *B. bituminosa*), 16 meses (12/04/2010: *A. halimus* + *B. bituminosa*), 24 meses (16/12/2010: hojas y frutos de *A. halimus*).

9.2.3. Determinación de la cobertura vegetal

En ambos ensayos de campo, la estimación de la cobertura sirvió como medida no destructiva e indirecta de la biomasa en sistemas áridos (Flombaum y Sala 2009). Para ello, se fotografió cada subparcela de 1m² desde una vista sagital. Cada imagen fue tratada con Adobe Photoshop CS3 (v10.0) para convertir las partes correspondientes de las plantas en manchas de color negro, y el suelo en un fondo blanco. Entonces, las imágenes fueron procesadas mediante el software de dominio público ImageJ 1.42q (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA) para determinar los cm² de plantas por m², lo que sirvió para estimar la cobertura en % que suponían las manchas negras sobre el fondo blanco.

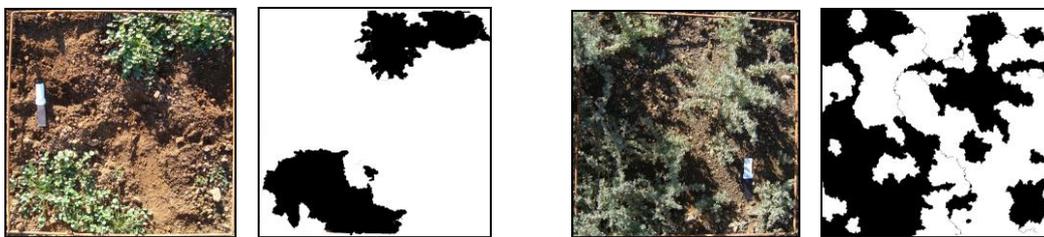


Figura 9.2.3.- Imágenes de fotografías originales de subparcelas con *B. bituminosa* (izquierda) y *A. halimus* (derecha) y su correspondientes resultados tras la manipulación para la medida de la cobertura mediante ImageJ.

9.3. Resultados y discusión de los ensayos en parcela

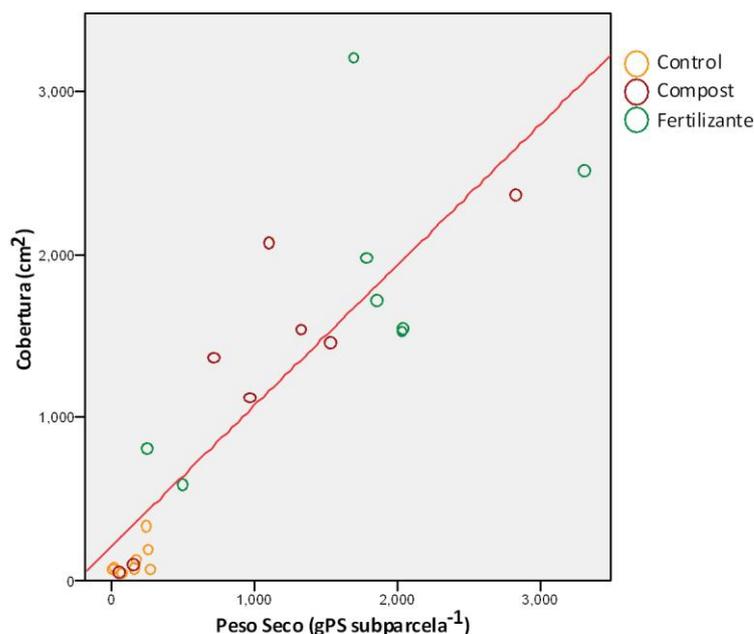
El crecimiento resultó ser diferencial en ambos suelos. En el suelo de SG, la especie *B. bituminosa* se desarrolló con normalidad, mientras que *A. halimus* no llegó a alcanzar un porte relevante. Sin embargo, para el suelo de LB, sólo algunas plantas de *B. bituminosa* alcanzaron una biomasa considerable mientras que las de *A. halimus* sí que crecieron adecuadamente. Por eso, los resultados de ambos ensayos proceden básicamente de los estudios realizados con una especie, con *B. bituminosa* en SG, y *A. halimus* en LB.

9.3.1. Ensayo en San Ginés de la Jara (SG)

9.3.1.1. Crecimiento de las plantas

De manera general, las enmiendas consiguieron mejorar la respuesta por parte de las plantas. Una vez pasado un tiempo para no tener en cuenta aquellas plantas que murieron como consecuencia del trasplante, la supervivencia de *B. bituminosa*, expresada como porcentaje de las plantas iniciales, fue del 86% para las establecidas en las parcelas control, 94% con compost, y 84% con fertilizante (periodo entre el 2/12/2009 y el 26/03/2010). Sin embargo, apenas unas cuantas plantas de *A. halimus* lograron crecer y desarrollarse adecuadamente, quizás debido a la orientación y la proximidad de una colina que pudo limitar las horas de luz necesarias para *A. halimus* durante el otoño e invierno. Aunque según Le Houérou (1992), el crecimiento de *A. halimus* (subsp. *halimus*) es pobre en suelos arenosos, en este ensayo creció mejor en el suelo LB (arenoso-franca, 79% arena) que en SG (franco-arenosa, 57% arena). La salinidad del suelo LB pudo favorecer el crecimiento de esta especie halófila. Aunque apareció una estimulación del crecimiento por el efecto del compost (Tabla 9.3.1.), la falta de réplicas con plantas de *A. halimus* impidió un análisis estadístico con esta especie.

Para *B. bituminosa*, la producción de biomasa (PS por parcela) y la cobertura fueron mayores con compost (aunque $P = 0,14$; Tabla 9.3.1.1.). La cobertura es importante desde el punto de vista de la erosión (Marqués y col., 2007; Andreu y col., 1995) y retención del suelo, lo que ayuda a frenar la diseminación de los MPs desde el suelo.



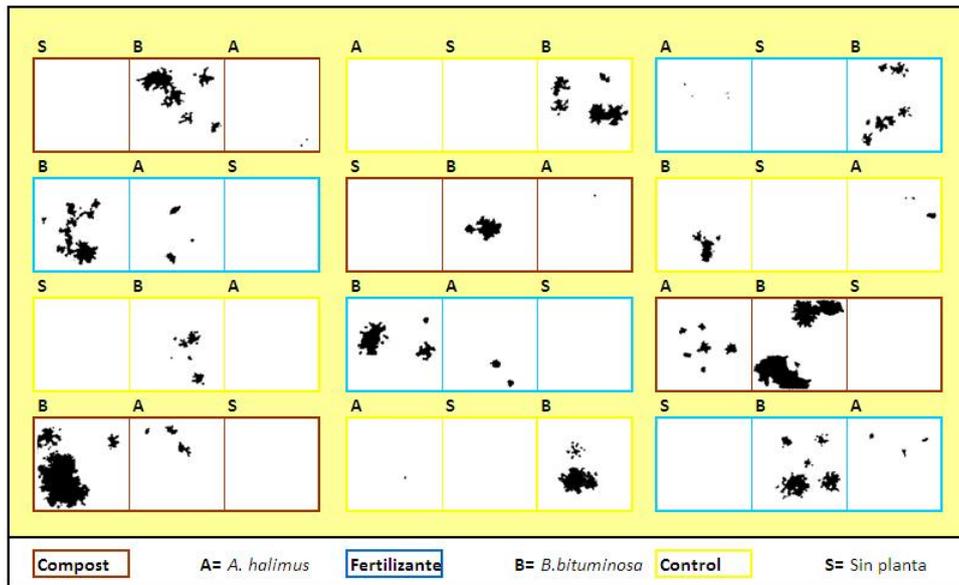


Figura 9.3.1.1.- Diagrama representando las 12 parcelas del ensayo en SG. En cada una de las 36 subparcelas, aparece la imagen con la que fue estimada la cobertura de las plantas que crecían en ella a los 12 meses tras el trasplante, en diciembre 2009. En este ensayo únicamente se determinó la biomasa de manera indirecta mediante la estimación de la cobertura en una ocasión, ya que a partir de esa fecha, el crecimiento de las plantas consistió básicamente en un endurecimiento de las partes verdes y formación de tallos verticales portadores de inflorescencias, lo que no se tradujo en un aumento considerable de la cobertura.

Tabla 9.3.1.1.- Cobertura (12 meses desde el trasplante) y PS de parte aérea (16 meses) de las plantas de *B. bituminosa* y *A. halimus*, para los tres tratamientos ($n = 4$). Los valores de cobertura total fueron transformados ($\log(x)$) para que cumplieran con la normalidad. Los valores de *A. halimus* no muestran error ni estadística alguna porque en muchos casos únicamente existía una réplica analizable. Los valores de cada columna con diferentes letras son significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acuerdo al test de Tukey.

	Tratamiento	Cobertura		PS	PS total
		%	cm ² planta ⁻¹	g planta ⁻¹	g subparcela ⁻¹
<i>B. bituminosa</i>	Control	6,2±1,8	117,7±54,8	7,5±2,8	39,0±13,9b
	Compost	16,6±0,5	219,5±76,0	19,0±5,6	135,7± 37,4a
	Fertilizante	8,7±1,0	105,3±30,6	8,6±3,1	52,5±5,3ab
	Sig.	0,14	0,31	0,14	0,03
<i>A. halimus</i>	Control	0,16	17,2	0,83	1,67
	Compost	1,35	52,0	4,44	21,77
	Fertilizante	0,81	40,9	1,86	4,46

9.3.1.2. Composición mineral de los tejidos vegetales de *B. bituminosa*

Para los primeros análisis de los minerales tisulares en hojas de las plantas a los 4 meses desde el trasplante, los efectos significativos ($P < 0,05$) de las enmiendas consistieron únicamente en un aumento del P tisular y un descenso del Ca, debido a la aplicación del compost (Tabla 9.3.2.). La caída en los niveles de Na en el segundo año podrían haberse relacionado con el aumento del K en suelo, teniendo en cuenta el antagonismo entre estos dos elementos con respecto a su absorción y transporte (Marschner, 1995).

Una deficiencia de P, que en *B. bituminosa* se manifiesta a partir de un P tisular por debajo de 80-100 $\mu\text{mol g}^{-1}$ (Walker y col., 2007; Pang y col., 2010) se traduce como un descenso del área foliar, tanto por el número de hojas como por la superficie (Marschner, 1995). La relación N:P (ambas concentraciones expresadas en $\mu\text{g g}^{-1}$) (a los 4 meses desde el trasplante) fue 15,5, 12,7 y 17,6 para plantas de los tratamientos control, compost y fertilizante, respectivamente, indicando que el compost suministró relativamente más P que N. Los recientes trabajos que Pang y col. (2010) han realizado con la var. *albomarginata* de *B. bituminosa*, indican que valores N:P por encima de 20 están asociados con una deficiencia de P e inhibición del crecimiento, mientras valores inferiores a 15 ($P > 80-100 \mu\text{mol g}^{-1}$ en las hojas) se dan durante crecimiento máximo. Todos estos datos indican que el suministro de P por el compost estimuló el crecimiento de *B. bituminosa* en suelo SG en comparación con el control, y que la incorporación desde esta enmienda rica en P al suelo y de allí a las plantas ocurrió principalmente durante el primer año. La dosis de compost empleada ayudaría por lo tanto a la estimulación inicial del crecimiento cuando la planta se encuentra más indefensa en el suelo, consumiéndose sus nutrientes para el segundo año, pero para cuando la planta ya dispondrá de un sistema radicular más amplio con el que abarcar un mayor volumen de suelo en busca de agua y nutrientes.

Tras el análisis factorial, la concentración de la mayoría de elementos minerales parece depender más del tiempo que del tratamiento, a excepción del P, que no depende del tiempo y sí del tratamiento, lo que lo destaca como principal responsable de la estimulación del crecimiento tras la adición de compost.

Tabla 9.3.1.2.a.- Concentraciones de cationes principales y P ($\mu\text{mol g}^{-1}$ PS), N (%), MPs y As ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS) en las hojas de *B. bituminosa* crecida en el ensayo de campo en el suelo de SG durante tres eventos de cosecha (14-4-2009 a los 4 meses, 26-3-2010 a los 16 meses, y el 2-12-2010 a los 24 meses desde el trasplante). Los valores de Fe a los 4 meses tuvieron que ser transformados para que se cumpliera la homocedasticidad de varianzas durante el análisis de ANOVA. “-” significa que las concentraciones tisulares imposibilitaron superar el límite de detección del ICP ($< 0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ PS para As; $< 0,01 \mu\text{g g}^{-1}$ PS para Cd). Los valores de cada columna y cada fecha con diferentes letras son significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acuerdo al test de Tukey. Se muestra el análisis factorial en las últimas 3 filas para los factores tiempo y tratamiento.

	Ca	K	Mg	Na	P	As	Cd	Cu	Fe	Mn	Pb	Zn	%N
4 meses													
Control	295±15 b	159±6	130±1	13,4±1,3	58,8±4,7 b	0,38±0,1	0,01±0,0	6,84±0,43	320±1	75,0±4,4	3,55±0,7	38,1±2,	3,83±0,4
Compost	252±7 a	159±2	125±9	11,4±0,6	76,6±4,1 a	0,31±0,1	0,03±0,0	8,65±0,59	232±2	82,6±9,2	3,49±1,3	43,6±4,	4,14±0,4
Fertilizante	320±10 ab	162±9	137±9	12,2±0,6	62,8±4,0 ab	0,41±0,0	0,03±0,0	7,65±0,34	320±9	76,6±6,2	3,28±1,0	38,9±2,	4,70±0,2
	Sig.	0,95	0,74	0,38	0,04	0,86	0,66	0,07	0,49	0,72	0,98	0,41	0,33
16 meses													
Control	187±8 ab	241±17	85±3	1,6±0,1 b	67,2±3,9	-	-	13,28±0,64	195±1	89,7±5,2	2,13±0,1	40,5±3,	5,10±0,0
Compost	160±11 b	246±29	82±5	1,7±0,4a	83,1±4,2	-	-	14,40±1,31 a	158±6	87,3±6,9	2,10±0,4	36,9±1,	4,73±0,2
Fertilizante	222±17 a	239±11	85±5	2,5±0,1 a	67,3±4,7	-	-	11,10±0,50 b	232±4	95,9±10,	2,03±0,9	38,9±4,	5,40±0,2
	Sig.	0,98	0,88	0,05	0,04			0,04	0,27	0,73	0,99	0,75	0,11
24 meses													
Control	357±36	245±16	135±1	2,9±0,2	64,1±13,5	0,55±0,3	0,12±0,0	6,06±0,51 b	179±1	90,7±11,	2,45±0,3	43,2±2,	4,15±0,2
Compost	262±12	325±11	140±8	7,0±2,4	77,1±7,0	1,51±0,6	0,13±0,0	7,28±0,11 ab	191±1	87,9±5,3	3,21±1,4	42,9±5,	4,36±0,1
Fertilizante	331±26	287±9	139±1	3,2±0,3	74,8±4,7	1,31±0,6	0,13±0,0	7,65±0,46 a	167±1	94,8±1,1	1,90±0,5	47,3±3,	4,33±0,0
	Sig.	0,08	0,00	0,97	0,12	0,59	0,48	0,93	0,57	0,79	0,59	0,70	0,57
	Sig.	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,17	0,23	<0,01	0,03	0,44	0,74	0,52	0,01
	Tiempo	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,40	0,05	<0,01	<0,01	0,06	0,17	0,14	<0,01
	Tiempo*Tratamiento	<0,01	0,08	0,87	0,56	0,02	0,52	0,68	0,31	0,78	0,75	0,93	0,10
	Tratamiento	0,35	0,07	0,97	0,03	0,83	0,48	0,93	0,55	0,85	0,96	0,59	0,45

Al arrancar plantas el 22/02/2011, no había nódulos visibles en las raíces (mientras que en el otro suelo LB sí que se encontraron). Para *B. bituminosa*, el rango de N tisular de suficiencia está entre 2,5 y 3,7% (Walker y col., 2007; Pang y col., 2010). Como en el Capítulo IV, en el ensayo en maceta con los dos mismos suelos (LB y SG), niveles de K por encima de 300 $\mu\text{mol g}^{-1}$ en la hoja satisfacen las demandas de crecimiento, por lo que no debió ocurrir en ningún caso deficiencia de N ni K en plantas en SG. Estos resultados demuestran que esta especie es capaz de vivir en este tipo de suelos pobres en nutrientes sin que estos elementos actúen como factores limitantes deficitarios. Los valores obtenidos del %N en las plantas de *A. halimus* fueron de 3,35, 4,84 y 3,75 para los tratamientos Control, Compost y Fertilizante respectivamente (datos no mostrados).

Cuando se calcula la cantidad de K que las plantas han absorbido desde el suelo (biomasa x concentración) dependiendo de cada tratamiento, se observa que aunque el compost no cambió mucho las concentraciones de K, si que aumentó la cantidad absorbida (1808, 4674, 2055 $\mu\text{mol K planta}^{-1}$ para control, compost y fertilizante respectivamente), lo que permitió que las plantas localizadas en las subparcelas tratadas con compost alcanzaran una mayor biomasa, pudiendo estar limitada su disponibilidad en los otros dos tratamientos.

Se comprobó que para los elementos minerales, su concentración no resultó ser una mera consecuencia del efecto de dilución de cada elemento en la parte aérea de las plantas, apareciendo mayores concentraciones en las plantas con menor PS y menor en las de mayor biomasa. Aunque sí que se pudo observar una reducción de la concentración en algunos elementos como por ejemplo el Fe para las plantas con mayor biomasa, si este efecto se debiera a la dilución del elemento en una mayor biomasa, el resto de minerales también deberían comportarse de la misma manera en función del PS, pero no fue así, por lo que debió haber inhibición de su absorción total. Como ese efecto no ocurre con otros elementos como el Zn, debe de haber otro factor aparte del efecto dilución.

Los niveles del As estuvieron por debajo de las concentraciones fitotóxicas ($> 3,5 \mu\text{g g}^{-1}$; Chaney, 1989). De acuerdo con los resultados de Walker y col. (2007), los niveles de Cu, Mn y Zn que representan suficiencia para *B. bituminosa*, MPs que actúan como micronutrientes, son 6-10, 30-60 y 30-60 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Para otros miembros de la familia Fabaceae de climas templados, el crecimiento se ve inhibido a partir de unas ciertas concentraciones de Cd, Cu, Mn y Pb en hoja, a partir de valores que rondan los 3-10, 15-30, 100-800 y 100-200 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente (Davis y Beckett, 1978; MacNicol y Beckett, 1985; Balsberg Pålsson, 1989; Meers y col., 2005), por lo que el único elemento que pudo suponer cierta fitotoxicidad según los valores encontrados en hojas de *B. bituminaria* es el Mn. A pesar de que este suelo contiene altos niveles de Zn, esta especie consigue crecer sin que aparezcan concentraciones fitotóxicas en sus hojas, por lo que debe disponer de mecanismos para inhibir su incorporación, tal y como defiende Walker y col. (2007). De manera general, se establece que una concentración de Zn tisular por encima de 100-600 $\mu\text{g g}^{-1}$, según la especie, repercute negativamente en el crecimiento (Balsberg Pålsson, 1989; Sagardoy y col., 2009; Shi y Cai, 2009; Disante y col., 2010; Lefèvre y col., 2010). En el siguiente capítulo referente a ensayos en hidropónico (Capítulo VI), se podrá ver que el crecimiento de *B. bituminosa* no estuvo inhibido por una concentración de Zn en la parte aérea de 730 $\mu\text{g g}^{-1}$. Para un correcto crecimiento de *B. bituminosa* se requieren concentraciones de Fe de la parte aérea en torno al 50-100 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Walker y col., 2007), apareciendo síntomas de toxicidad por encima de 500 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Marschner, 1995), por lo que aunque cerca del límite fitotóxico, los valores tisulares no debieron afectar negativamente al crecimiento de *B. bituminosa* en el suelo SG.

El hecho de que el compost mejorara el crecimiento sin afectar las concentraciones tisulares de los demás MPs, sugiere que sus concentraciones no fueron tóxicas en ninguno de los tres tratamientos, aunque las concentraciones de Pb y Zn en este suelo están por encima de los límites para suelos agrícolas a pH 7 (Zn= 632; Pb= 651 $\mu\text{g g}^{-1}$) (Council of the European Communities, 1986; BOE 2005b).

Tabla 9.3.1.2.b.- Los pesos secos (g) de 100 semillas (incluyendo el pico) y las concentraciones ($\mu\text{g g}^{-1}$) de Cu, Fe, Mn, Pb y Zn en MS de semillas de *B. bituminosa*, cosechadas en plantas del ensayo en suelo SG a los 18 meses tras el trasplante (Mayo 2010). Las concentraciones de As y Cd estuvieron por debajo del límite de detección del ICP (equivalente a $0,08 \mu\text{g g}^{-1}$ en las semillas).

	g 100semillas	Cu	Fe	Mn	Pb	Zn
Control	1,24±0,10	6,39±0,3	112,5±88	22,4±2	0,9±0,19	21±1
Compost	1,42±0,07	5,85±0,1	61,4±30	19,4±2	0,54 ±0,23	18,9±1
Fertilizante	1,16±0,03	5,11±0,5	40,6 ±6	18,5±3	0,89±0,19	18,5±1
Sig.	0,20	0,12	0,46	0,39	0,31	0,19

Un hecho importante a destacar fue el hecho de que las plantas de *B. bituminosa* fueron capaces de completar su ciclo biológico durante el ensayo, produciendo flores con semilla fértil. El peso de las semillas no fue diferente dependiendo del tratamiento. Con respecto a los niveles de MPs en semilla, la disminución en el Fe producido por el compost, aunque no significativo estadísticamente, refleja el efecto del compost sobre este elemento en las hojas (Tabla 9.3.1.2.a.). La restricción del transporte de MPs a los frutos también limita sus movimientos a través de la cadena trófica, ya que las semillas de *B. bituminosa* son una fuente de alimento para algunos insectos como las hormigas *Messor barbarus* L. (Oliveras y col., 2008). Conesa y col., (2009), encontraron que las plantas de *Cicer arietinum* L. (Fabaceae) crecidas en suelo con residuos mineros en La Unión (concentraciones totales: $8 \mu\text{g g}^{-1}$ Cd, $26 \mu\text{g g}^{-1}$ Cu, $1310 \mu\text{g g}^{-1}$ Pb y $2160 \mu\text{g g}^{-1}$ Zn), presentaban en las semillas $0,5-0,9 \mu\text{g g}^{-1}$ Cd, $6-9 \mu\text{g g}^{-1}$ Cu, $< 1,3 \mu\text{g g}^{-1}$ Pb, y $80-90 \mu\text{g g}^{-1}$ Zn. La comparación de estos resultados con los de *B. bituminosa* (Tabla 9.3.1.2.b.) crecida en el suelo SG (concentraciones totales: $28 \mu\text{g g}^{-1}$ Cu, $<0,01 \mu\text{g g}^{-1}$ Cd, $632 \mu\text{g g}^{-1}$ Zn y $651 \mu\text{g g}^{-1}$ Pb) indica que ambas especies realizan una transferencia similar de Cu y Pb a sus semillas.

Tabla 9.3.1.2.c.- Concentraciones de cationes principales y P ($\mu\text{mol g}^{-1}$ PS), N (%), As y MPs ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS) en las hojas de *A. halimifolius* crecidas en el ensayo de campo en el suelo de SG durante dos eventos de cosecha (14-4-2009 a los 4 meses, 26-3-2010 a los 16 meses). "nd" significa *no determinado* porque no había material suficiente en dichas subparcelas. "-" significa que las concentraciones de As y Cu tisulares impidieron que aparecieran valores por encima de límite de detección del ICP. No se pudo realizar análisis ANOVA ya que en muchos casos, no se consiguieron tres réplicas.

2009	Ca	K	Mg	Na	P	N	As	Cd	Cu	Fe	Mn	Pb	Zn
Control	nd	nd	nd	nd	nd	3,35	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Compost	479	862	649	2426	273	4,84	0,58	0,18	12,3	511	214	8,15	132
Fertilizante	583	552	736	2239	136	3,75	0,48	0,24	10,3	585	249	5,47	171
2010													
Control	580	983	526	1159	68	nd	-	-	10,1	659	243	7,65	124
Compost	414	942	605	1410	190	nd	-	-	12,1	385	190	4,45	130
Fertilizante	639	849	677	1307	105	nd	-	-	8,7	611	220	5,09	134

9.3.1.3. Composición mineral de *A. halimus*

Las altas concentraciones de los cationes principales (Ca, Mg, K y Na) en sus hojas demuestran el carácter halófito de *A. halimus*, a pesar de la más baja salinidad (CE) de este suelo con respecto al suelo LB. En las plantas control, la concentración de P en la segunda cosecha sugiere una deficiencia de este elemento (Marschner, 1995). El mal rendimiento de *A. halimus* en este suelo no pudo deberse a concentraciones fitotóxicas de MPs ya que esta especie consiguió crecer favorablemente en el suelo LB, contaminado con mayores concentraciones de dichos elementos. Las únicas excepciones podrían ser el Fe y el Mn, ya que sus valores eran parecidos en ambos suelos, y los rangos considerados fitotóxicos se encuentran por encima de 500 (Fe) y 100-1000 (Mn) $\mu\text{g g}^{-1}$ (Marschner, 1995), aunque es poco probable teniendo en cuenta la alta tolerancia de *A. halimus* a los MPs.

9.3.1.4. El efecto de la presencia de plantas y de los tratamientos sobre las propiedades del suelo

Durante el primer evento de muestreo, las parcelas tratadas con compost fueron las que alcanzaron un mayor pH, lo que afectaría a la disponibilidad de MPs y As en el suelo. Sin embargo, dicho efecto no volvió a detectarse en ninguno de los posteriores muestreos. El aumento en la CE tras la incorporación de las enmiendas, sobre todo el compost (Tabla 9.3.1.4.), fue una mera consecuencia de su alto contenido sales (ver características en Tabla 3.2. en Capítulo III). Un posible aumento en la salinidad del suelo debido a la aplicación excesiva de enmiendas es un factor que considerar en la recuperación de suelos degradados (Bernal y col., 1992). El análisis factorial desvela que el efecto sobre el N por parte de los tratamientos depende del tiempo (Tiempo*Tratamiento sig. <0,01), de modo que sus máximos valores se alcanzaron a los 12 meses, y a partir de entonces, sus niveles se igualaron con los encontrados en los suelos control. Sin embargo, el efecto del compost sobre el %MO fue disminuyendo más paulatinamente, existiendo aún diferencias tras los 2 años de ensayo, directamente relacionado con la alta estabilidad contra la mineralización microbiana de la MO añadida con el compost (Bernal y col., 1998). La presencia de *B. bituminosa* aumentó el %MO, presuntamente debido a la incorporación de hojas caídas y raíces muertas.

Tabla 9.3.1.4.- Características del suelo de San Ginés de la Jara para los tres tratamientos a 4, 12, 16 y 24 meses desde el trasplante. El K ($\mu\text{g g}^{-1}$) fue extraído con NaNO_3 10 mM. Los MPs ($\mu\text{g g}^{-1}$) fueron extraídos con DTPA. Los demás parámetros fueron analizados por el equipo Sostenibilidad Sistema Suelo Planta del CEBAS-CSIC siguiendo procedimientos equivalentes a los que aparecen en Alburquerque y col. (2011), y Pardo y col. (2011).

Fecha	Tratamiento	Planta	pH	CEIUS (cm)	NT (%)	MD (%)	BC (mg kg^{-1})	BN (mg kg^{-1})	BC/BN	K	As	Cd	Cu	Mn	Pb	Zn		
4 meses	Control	Sin Planta	7,76	112,38	0,18	1,23	256,10	49,20	5,52	9,30	0,52	0,10	1,26	20,55	32,82	17,28		
		B. bituminosa	7,89	72,88	0,14	1,52	208,55	41,75	5,07	7,55	0,56	0,09	1,15	20,68	34,19	15,17		
		Sin Planta	8,08	197,23	0,25	5,47	639,15	107,50	5,95	253,50	0,60	0,09	1,25	36,26	41,44	20,31		
	Compost	B. bituminosa	8,08	213,10	0,23	6,85	553,10	95,90	5,76	251,70	0,69	0,13	1,34	34,71	44,59	26,68		
		Sin Planta	7,76	113,88	0,07	1,37	163,40	20,10	8,10	29,53	0,76	0,10	1,10	24,12	31,73	12,73		
		B. bituminosa	7,77	132,03	0,08	1,67	209,15	23,75	8,67	38,55	0,77	0,11	1,20	26,33	29,89	14,15		
	12 meses	Control	Sin Planta	8,00	121,53	0,17	1,85	239,25	31,01	7,78	23,58	0,47	0,09	0,93	14,14	31,76	12,11	
			B. bituminosa	7,98	126,58	0,10	1,43	222,85	29,31	7,60	27,44	0,56	0,10	0,94	15,67	38,05	12,77	
			Sin Planta	8,05	167,93	0,19	3,35	587,40	69,42	8,35	411,83	0,55	0,09	0,97	17,55	31,48	15,55	
Compost		B. bituminosa	8,01	188,25	0,24	6,09	638,20	78,67	7,95	457,75	0,62	0,13	1,14	21,71	38,46	23,19		
		Sin Planta	8,04	110,73	0,09	1,29	134,00	14,41	9,05	67,96	0,66	0,09	0,94	16,96	25,88	10,77		
		B. bituminosa	8,01	119,53	0,10	1,33	238,25	24,30	9,95	77,69	0,64	0,09	0,96	16,47	26,31	11,32		
16 meses		Control	Sin Planta	8,04	101,15	0,13	0,95	222,03	31,26	7,13	15,75	0,52	0,12	0,78	11,57	31,45	12,29	
			B. bituminosa	8,02	101,55	0,14	1,22	218,58	30,58	7,16	15,94	0,56	0,11	0,80	12,55	37,95	12,61	
			Sin Planta	7,99	165,15	0,20	2,69	462,73	58,40	8,12	311,50	0,57	0,13	0,90	16,81	36,30	15,21	
	Compost	B. bituminosa	8,01	155,20	0,24	2,97	469,39	59,63	8,05	313,05	0,59	0,15	0,97	16,58	38,29	18,62		
		Sin Planta	8,00	103,23	0,23	1,16	148,12	24,41	5,74	59,38	0,54	0,10	0,84	12,24	25,61	9,88		
		B. bituminosa	7,99	106,43	0,26	1,36	209,71	32,17	6,52	61,67	0,55	0,11	0,88	12,24	30,19	10,17		
	24 meses	Control	Sin Planta	7,95	139,28	0,14	2,22	160,39	22,21	7,28	9,82	0,60	0,08	0,83	6,16	24,76	6,98	
			B. bituminosa	7,93	124,98	0,13	2,17	188,78	26,85	7,19	9,40	0,68	0,10	0,88	6,79	35,31	9,03	
			Sin Planta	7,97	150,08	0,17	3,05	382,66	53,28	7,19	109,43	0,76	0,08	0,65	5,21	29,03	12,14	
Compost		B. bituminosa	7,92	158,55	0,17	3,54	383,69	62,70	6,32	111,03	0,80	0,12	0,76	5,76	34,61	18,02		
		Sin Planta	7,95	107,65	0,07	1,16	114,48	16,54	6,88	20,59	0,61	0,05	0,64	4,57	17,74	5,27		
		B. bituminosa	7,91	110,08	0,11	1,69	236,80	33,80	6,98	19,57	0,69	0,08	0,69	4,71	25,28	9,04		
Tratamiento * Planta		Tratamiento * Planta	Sin Planta	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,01	<0,01	0,47	0,61	0,39	<0,01	0,41	0,06	
			Fecha	0,79	0,69	0,77	0,04	0,56	0,50	0,50	0,97	<0,01	0,50	0,40	0,35	0,45	0,49	0,40
			Fecha	<0,01	0,01	0,01	<0,01	0,23	0,04	<0,01	<0,01	<0,01	0,50	0,69	<0,01	<0,01	0,84	0,34
	Tratamiento * Fecha	Sin Planta	0,55	0,06	0,34	0,11	0,62	0,67	0,19	0,92	0,97	0,86	0,65	0,99	0,97	0,72	1,00	
		Fecha	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,53	0,16	<0,01	<0,01	0,92	1,00	1,00	0,70	<0,01	1,00	1,00	
		Fecha	0,17	0,56	0,74	0,83	0,87	0,75	0,85	0,92	0,92	1,00	0,98	0,99	0,92	0,98	0,99	
	Tratamiento * Fecha * Planta	Sin Planta	0,76	0,24	0,96	0,52	1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,92	1,00	1,00	
		Fecha																
		Fecha																

Mientras que la enmienda inorgánica no causó efecto sobre el carbono de la biomasa microbiana (BC), ni el nitrógeno de la masa microbiana del suelo (BN), el tratamiento con compost aumentó dichos parámetros. El mismo efecto fue encontrado por Albuquerque y col. (2011), al comparar el efecto del compost de alperujo con un fertilizante mineral. Su relación da un índice ecológico que expresa la proporción de hongos y bacterias que crecen en el suelo (Anderson y Domsch, 1980; Coyne, 2000; Pérez de Mora y col., 2006). Lo ideal, es que al añadir una enmienda al suelo, este factor no se vea alterado para no interferir en los sistemas ecológicos del suelo. Si dicho factor se ve aumentado durante la aplicación de algún tratamiento, se debe a un favorecimiento de la población fúngica del suelo, mientras que si este disminuye, se habrá visto estimulado el crecimiento bacteriano. De manera general, se aprecia que la incorporación de compost en este ensayo no afectó a las poblaciones microbianas del suelo, mientras que el fertilizante sí que causa cierto desequilibrio, potenciando el crecimiento de hongos en relación al de bacterias, principalmente en la primera etapa del ensayo. Dicho efecto se reduce, e incluso se invierte transcurridos dos años desde el comienzo del ensayo. En este sentido, las poblaciones fúngicas parecen ser menos sensibles a los metales que las bacterias y su proliferación pueden ser favorecidas bajo estrés por MPs (Khan y Scullion, 2002; Rajapaksha y col., 2004).

9.3.2. Ensayo en Llano del Beal (LB)

9.3.2.1. Crecimiento de las plantas



Fotografías 9.3.2.1.- Vista general del ensayo al principio del ensayo, sin vegetación alrededor de la zona estudiada (izquierda). Manchas de contaminación en el suelo (centro). Entre algunas plantas de *A. halimus*, fue capaz de desarrollarse *B. bituminosa* (derecha).

A pesar de que en el ensayo en maceta ambas especies crecieron en el suelo LB, *B. bituminosa* no creció lo suficiente en todas las subparcelas (sólo en algunas con compost), mientras que *A. halimus* fue capaz de desarrollar una gran biomasa en este ensayo de campo. Esto imposibilitó que se pudiera realizar el análisis estadístico pertinente para *B. bituminosa*. Por ejemplo, 12 meses desde el trasplante, la supervivencia media de *B. bituminosa* fue de 6, 19 y 13% en subparcelas control, con compost, y con purín, respectivamente. Tras 6 meses de su establecimiento, las plantas de *A. halimus* mostraron un crecimiento rápido en la zona donde se había aplicado purín de cerdo, con una cobertura vegetal del 17,5 % del área replantada (media de subparcelas AB y A), y una de 12,6% en las tratadas con compost, muy superior al 1,3 % de cobertura existente en el suelo sin enmienda (Figura 9.3.2.1. y Tabla 9.3.2.1.a.). Entre abril y diciembre de 2009, se produjo la muerte de algunas plantas de *B. bituminosa*, particularmente en suelo control, debido posiblemente a su escaso tamaño durante la fuerte sequía estival. A los 12 meses desde el trasplante (Diciembre 2009), las plantas de *A. halimus* ya cubrían más de la mitad de la superficie de cada subparcela (una media (A+AB) de 67,9% para el purín y de 55,4% para el compost). En estas subparcelas, *A. halimus* fue capaz producir semillas en el los inviernos de 2009-10 y 2010-11, que germinaron en las propias subparcelas. En cambio las plantas crecidas en el suelo sin tratar tuvieron un crecimiento escaso, con síntomas de toxicidad y deficiencia nutricional (Figura 9.3.2.1. y Tabla 9.3.2.1.).

En el tercer año del ensayo (2011), algunas plantas de *B. bituminosa* crecían entre densos *A. halimus* en algunas subparcelas, a la vez que otras especies habían colonizado el suelo entre las subparcelas, tal vez debido a una mejora en las condiciones físico-químicas del suelo (presencia de raíces y/o caída de hojas). También pudo haber sucedido el fenómeno de “*hydraulic lift*” (Horton y Hart, 1998; Muñoz y col., 2008), por el que agua podría haber ascendido desde capas húmedas a través de las raíces de *A. halimus*.

Tabla 9.3.2.1.a.- Resumen de supervivencia y cobertura en las subparcelas A (*A. halimus*) y AB (*A. halimus* con *B. bituminosa*) en LB. Los valores de cobertura fueron transformados (aseno ($\sqrt{x/100}$)) para asegurar normalidad. La supervivencia está calculada en función del número de plantas iniciales que se establecieron (20 para A y 16 para AB). En la parte inferior de cada tabla se muestra el análisis factorial. Los valores de cada columna con diferentes letras son significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acuerdo al test de Tukey.

<i>A. halimus</i> (A)		Cobertura			
Día	Tratamiento	nºplantas	Supervivencia	%	cm ² planta ⁻¹
16/04/2009	Control	13,5	67,5	1,43 b	14 b
	Compost	15,7	78,7	10,05 ab	77 b
	Purín	17,7	88,7	14,16 ab	103 b
02/12/2009	Control	11,7	58,7	14,00 ab	138 b
	Compost	15,7	78,7	35,29 ab	252 ab
	Purín	17,7	88,7	79,35 a	586 a
	Sig.			0,01	0,00
	Tiempo			0,01	0,00
	Tratamiento			0,01	0,00
	Tiempo*Tratamiento			0,51	0,21
<i>A.halimus+B. bituminosa</i> (AB)		Cobertura			
Día	Tratamiento	nºplantas	Supervivencia	%	cm ² planta ⁻¹
16/04/2009	Control	13,0	81,2	1,18 b	12 b
	Compost	15,2	95,3	15,23 ab	116 ab
	Purín	14,5	90,6	20,66 ab	177 ab
02/12/2009	Control	10,7	67,2	13,19 ab	129 ab
	Compost	14,7	92,2	75,47 a	575 a
	Purín	14,5	90,6	56,37 a	466 a
	Sig.			0,01	0,01
	Tiempo			0,02	0,00
	Tratamiento			0,01	0,02
	Tiempo*Tratamiento			0,35	0,59

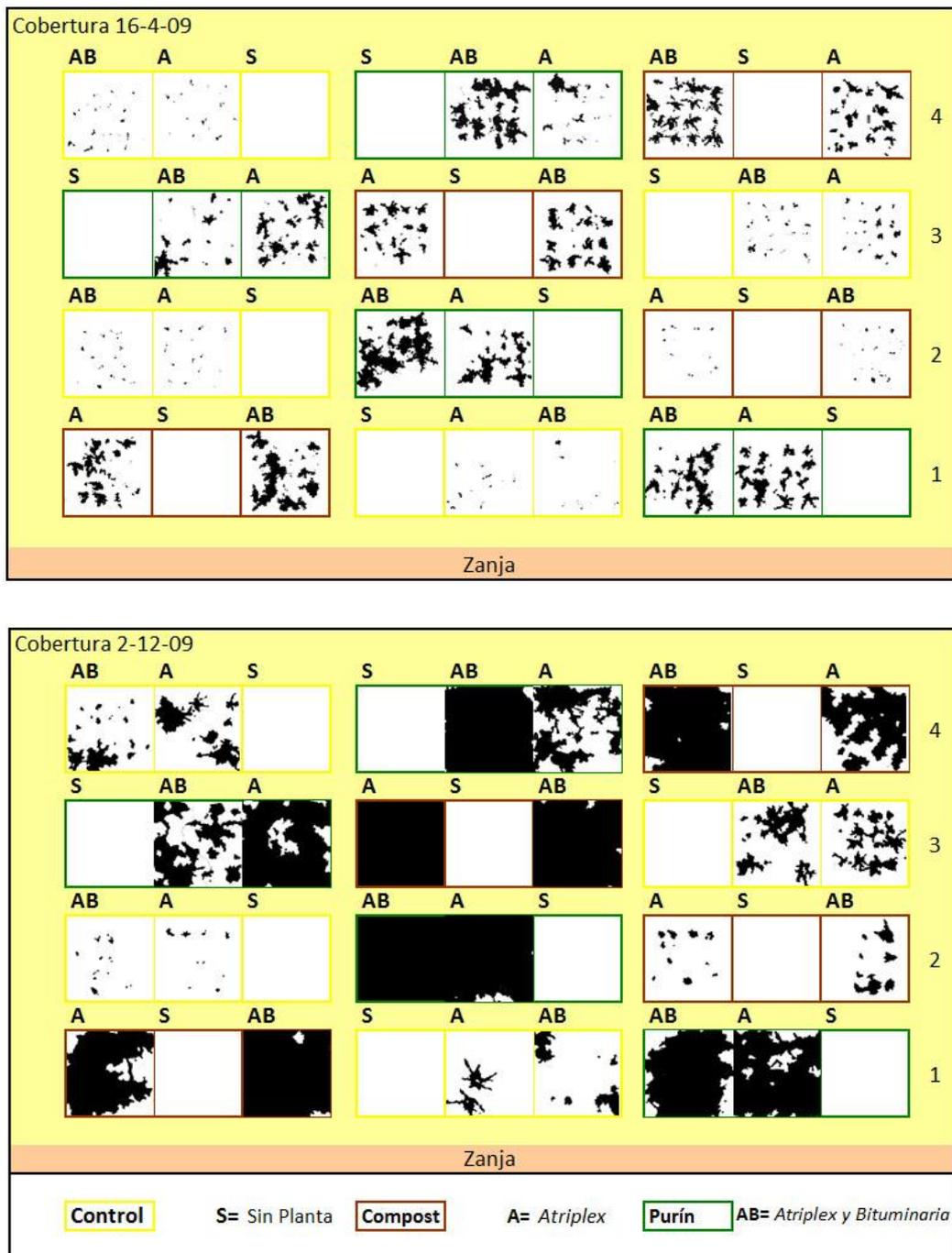


Figura 9.3.2.1.- Distribución de la parcela establecida en El Llano del Beal (La Unión, Murcia) y cobertura (totalmente blanco = 0% cobertura; totalmente negro = 100%) estimada en cada una de las subparcelas a los 4 meses (16/04/2009) y a los 12 meses (02/12/2009) desde el transplante de *B. bituminosa* y *A. halimus*. Como se ve, debido a la heterogeneidad del pH en el terreno, y por lo tanto variación en la solubilidad de MPs, existen diferencias en el desarrollo de las plantas incluso dentro de un mismo tratamiento.

Tabla 9.3.2.1.b.- Producción de biomasa por parte de las plantas de *A. halimus* en las subparcelas de El Llano del Beal a los 12 meses desde el trasplante (A= *A. halimus*; AB= *A. halimus* + *B. bituminosa*).

02/12/2009		Peso	Peso total
Tratamiento	Plantas	Planta ⁻¹ (g)	por sub-parcela (g)
Control	A	17,1	165,5
Control	AB	11,2	123,5
Compost	A	63,5	843,8
Compost	AB	105,6	1380,5
Purín	A	115,9	1579,8
Purín	AB	148,1	1768,7
	Sig.	>0,05	>0,05

9.3.2.2. Composición mineral de *A. halimus*

Al comparar el comportamiento de *A. halimus* crecido en este suelo, y los datos del ensayo en maceta del capítulo anterior, y a pesar de que ambos ensayos no se realizaron bajo las mismas condiciones, se observa que los niveles de MPs son de manera general más elevados en las hojas de *A. halimus* en campo, excepto para el Fe y Pb. Esto indica que el ensayo de maceta, las plantas podían haber seguido acumulando metales, a excepción del Fe y Pb para los que ya alcanzaron el máximo de acumulación. En el campo, la exposición más prolongada de las plantas al suelo contaminado podría permitir llegar a niveles más altos que en plantas cultivadas bajo condiciones controladas, debido a un mejor mantenimiento del equilibrio interno y limitación de la absorción de contaminantes y nutrientes que en solución nutritiva, donde se fuerza al transporte de ciertos elementos disueltos en el medio.

El principal efecto de las enmiendas fue un aumento de la concentración de P y disminución del Pb tisular en las hojas de aquellas plantas que habían recibido compost, sin que se detectaran incrementos en las concentraciones de N, K, Mg, Na o elementos traza. Las concentraciones de N y P de las plantas con compost fueron disminuyendo significativamente con el transcurso del tiempo ($P < 0,001$) hasta los 2 años de ensayo, desde 44,3 hasta 22,4 g N Kg⁻¹PS, y desde 125 hasta 48 g P Kg⁻¹PS,

respectivamente. La concentración de Mn tisular de las plantas con compost fue mayor que la del resto de plantas. La concentración de Zn en hoja aumentó con el tiempo, mientras que las de Fe ($P < 0,01$), As y Pb ($P < 0,001$) disminuyeron con el transcurso del ensayo.

Aunque la cal no produjera un efecto significativo sobre el pH, se aprecia que los niveles de As más altos se dieron en el muestreo más cercano a la incorporación de enmiendas, y especialmente para la cal. Dicho elemento presenta una movilidad inversa a la mayoría del resto de MPs, apareciendo en formas más biodisponibles durante pH alcalino (Clemente y col., 2005).

Tabla 9.3.2.2.a.- Concentraciones de nutrientes ($\mu\text{mol g}^{-1}$ PS), MPs ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS) y N (%) en las hojas de las plantas de *A. halimus* a los 4, 16 y 24 meses desde el trasplante. Las tres últimas filas muestran la significación del análisis factorial.

Tratamiento		Ca	K	Mg	Na	P	As	Cd	Cu	Fe	Mn	Pb	Zn	N
4 meses	Cal	208	258	900	1183	43b	7,6	3,9	17,9	835	125	160	531	3,58
	Compost	305	253	875	1059	125a	11	7,6	26,7	614	173	137	636	4,43
	Purín	236	274	808	1239	87ab	5,6	4,5	17,5	695	134	131	579	4,25
	Sig.	0,10	0,76	0,68	0,62	<0,01	0,27	0,52	0,36	0,61	0,65	0,75	0,93	0,50
16 meses	Cal	210b	423	1191	859	44b	nd	4,8	14,2	454	54	95	750	2,80
	Compost	269a	452	1009	678	83a	nd	4,6	14,8	307	111	52	678	2,89
	Purín	211b	432	853	727	64ab	nd	4,1	13,8	274	65	33	658	3,03
	Sig.	0,01	0,77	0,74	0,50	0,01	nd	0,86	0,86	0,71	0,27	0,42	0,89	0,84
24 meses	Cal	295	331	542	752	30b	1,9	5,8	13,3	523	89b	84	888	2,23
	Compost	474	311	544	616	48a	1,7	9	14,6	328	208a	62	1253	2,24
	Purín	350	308	607	700	32ab	1,4	7,2	13,5	260	130ab	42	959	1,92
	Sig.	0,08	0,70	0,19	0,36	0,03	0,81	0,24	0,77	0,17	0,04	0,21	0,11	
Tratamiento		<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,02	0,14	0,02	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Tiempo		<0,01	1,00	0,67	0,24	<0,01	0,52	0,33	0,28	0,16	0,01	0,11	0,48	0,46
Tratamiento*Tiempo		0,58	0,76	0,75	0,92	0,03	0,26	0,86	0,81	0,98	0,62	0,96	0,67	0,74

Tabla 9.3.2.2.b.- Concentraciones de As y MPs en frutos ($\mu\text{g g}^{-1}\text{PS}$) de *A. halimius*. Los datos de Pb tuvieron que ser transformados ($\log(x)$) para cumplir con la homocedasticidad antes de la prueba de ANOVA. ("nd" = no determinado). Los frutos fueron recogidos a los 12, 15, 24 y 36 meses desde el trasplante.

Fecha	Tratamiento	As	Cd	Cu	Fe	Mn	Pb	Zn
12 meses	Control	21,82 a	3,35 b	23,14	3221	126	662	743 bcd
	Compost	8,44 b	3,26 b	12,62	1246	103	221	519 cd
	Purín	6,92 b	4,14 b	14,10	1192	112	193	465 d
15 meses	Control	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Compost	32,76	6,66	28,97	6720	240	1253	1232
	Purín	31,72	7,00	43,81	5222	225	1032	1303
24 meses	Control	3,80 b	8,82 ab	31,19	2104	138	277	1301 abc
	Compost	5,50 b	16,28 a	24,48	2440	337	331	1729 a
	Purín	5,38 b	9,00 ab	15,28	2262	263	265	1376 ab
36 meses	Control	7,09	8,05	10,46	3402	178	373	889
	Compost	4,75	19,69	8,69	2346	405	260	1643
	Purín	7,07	9,44	10,21	3455	240	341	1058
12 y 24 meses	Sig.	0,20	0,04	0,65	0,14	0,43	0,05	0,14
	Sig. Día	<0,01	0,01	0,07	0,08	0,10	0,28	<0,01
	Sig. Tratamiento	<0,01	<0,01	0,07	0,34	0,03	0,99	<0,01
Día* Tratamiento	Sig.	0,04	0,26	0,04	0,18	0,47	0,21	0,46
	Sig.	0,01	0,17	0,40	0,08	0,31	0,23	0,25

9.3.2.3. Composición mineral de *B. bituminosa*

El 15/05/2009 se arrancó 5 plantas de *B. bituminosa* para comprobar la presencia de nódulos en las raíces, y conocer si es posible el crecimiento de bacterias nodulantes en suelos tan contaminados como el estudiado. Efectivamente, aparecieron nódulos en todas las plantas extraídas, a partir de los cuales, fueron aisladas las cepas E descritas en el Capítulo VII. Sin embargo, el análisis del material vegetal de dos subparcelas tratadas con compost cosechada en abril 2009 a los 4 meses del trasplante (en las demás subparcelas no hubo material suficiente para analizar) demostró que la concentración de N en MS fue tan sólo de 2,71%. Como la concentración de P fue de $42 \mu\text{mol g}^{-1}$, los resultados del ensayo en maceta con los suelos contaminados (Capítulo IV), los de Walker y col. (2007), y Pang y col. (2010), indican que estos dos nutrientes fueron deficientes en el suelo LB.

Las concentraciones de As ($7,7 \mu\text{g g}^{-1}$), Cd ($3,3 \mu\text{g g}^{-1}$), Fe ($1253 \mu\text{g g}^{-1}$), y Pb ($285 \mu\text{g g}^{-1}$) probablemente fueron fitotóxicas (Chaney, 1989; Marschner, 1995; Kabata-Pendias, 2001). Sin embargo, los niveles de Cu ($11,9 \mu\text{g g}^{-1}$) y Mn ($84 \mu\text{g g}^{-1}$) no sugieren toxicidad (Marschner, 1995; Kabata-Pendias, 2001) y tampoco los del Zn ($448 \mu\text{g g}^{-1}$), según los resultados del siguiente ensayo en hidropónico (Capítulo VI), demostrando una vez más la habilidad de *B. bituminosa* para excluir/tolerar Zn frente a altas concentraciones en el medio externo.

9.4. Conclusiones de los ensayos en parcela

Los resultados de este capítulo confirman que la población de *B. bituminosa* estudiada en este capítulo es capaz de minimizar la acumulación de Zn en sus hojas. Sin embargo, se comporta como una planta bienal o perenne de corta vida, floreciendo sólo una o dos veces antes de morir. Así, podría considerarse esta población como apropiada para una etapa inicial en la revegetación de suelos moderadamente contaminados y con pH en el intervalo neutro-alcalino (pH 6,5-8,0), como por ejemplo, el suelo de San Ginés de la Jara (SG). Se trata de una especie capaz de formar nódulos con bacterias simbiotes que le permiten fijar nitrógeno atmosférico, tal y como se comprobó que sucedía en el suelo del LB. No se encontraron nódulos en el suelo SG, quizás por la escasez de otras plantas de *B. bituminosa* que sirvieran como inoculadoras del ambiente que rodeaba las plantas cercanas.

El establecimiento de esta población en el suelo de El Llano del Beal no fue satisfactorio, debido presumiblemente a la alta contaminación de este suelo, la heterogeneidad del pH (rango 5,5-7,8) y la salinidad (CE (extractos 1:5) = 2,36-3,84 dS m⁻¹). Los resultados obtenidos con *Atriplex halimus* indican que esta especie es más apropiada para la fitoestabilización de suelos altamente contaminados en un medio-largo plazo, especialmente en condiciones semiáridas como en Murcia, gracias a su tolerancia a la salinidad y sequía. Su habilidad de crecer a pesar de acumular concentraciones más altas de MPs en sus tejidos demuestra su tolerancia interna, aunque, dicha acumulación pueda considerarse un atributo negativo en cuanto la fitoestabilización.

En el suelo SG, el compost mejoró el crecimiento de *B. bituminosa* debido a un aumento en el P de las hojas y posiblemente una disminución en el Fe. Pudieron darse otros efectos positivos en el suelo por el aporte de la MO (en relación con el fertilizante mineral), como la formación de agregados que permitieran una mejor aireación y retención de agua (Díaz y col., 1994), una fuente de C para microorganismos con consecuente incremento de la biomasa microbiana y actividad enzimática (Medejón y col., 2001), o la capacidad tamponante de la MO para minimizar las variaciones de pH del suelo (Bernal y col., 2007). De todas formas, hay

que tener en cuenta posibles efectos negativos de la aplicación de ciertas enmiendas como las usadas en este ensayo, en relación a la movilidad y biodisponibilidad de los MPs (Wenzel y col., 1999), o la presencia de alta concentración de polifenoles fitotóxicos que podrían movilizar ciertos metales (Clemente y col., 2006).

Los efectos de las enmiendas en el suelo LB (altamente contaminado y salino) sólo pudieron ser aparentes en el crecimiento de plantas capaces de aguantar las condiciones hostiles, en cuanto alta temperatura, sequía y salinidad de manera simultánea, como es en el caso de *A. halimus*, lo que la destaca como una especie prometedora para estrategias para la recuperación de suelos degradados mediante el uso de plantas y enmiendas.

10. CAPITULO VI: Ensayos en hidropónico con MPs

10.1. Objetivos específicos de los ensayos en hidropónico con MPs

- Estudiar cómo afecta la presencia de MPs a la germinación y desarrollo radicular de *B. bituminosa* en relación a la parte aérea de dos poblaciones procedentes de suelos contaminado y limpio de MPs.
- Determinar la eficiencia de exclusión de Zn frente a altas concentraciones externas de este elemento.
- Estudiar los mecanismos de tolerancia que desarrollan las plantas de esta especie frente a la exposición de MPs a corto y a largo plazo.
- Comprobar los mecanismos fisiológicos que demuestren la adaptación de las plantas a suelos contaminados y que podrían explicar diferencias entre poblaciones.
- Comprobar la potencialidad de la especie en tareas fitoremediadoras de suelos contaminados.
- Individualizar los efectos causados por MPs sobre la acumulación de FCs.

La información más relevante de este Capítulo VI fue publicada en el artículo "Physiological responses of *Bituminaria bituminosa* to heavy metals" (Martínez-Fernández, D., Walker, D.J., Romero-Espinar, P., Flores Fernández-Villamil, M.P., del Río, J.A.) en la revista *Journal of Plant Physiology*, 168, 2206– 2211 (2011).

10.2. Ensayo de germinación: procedimiento y resultados

Para la comparación de la respuesta frente a MPs se seleccionaron dos poblaciones que pertenecen a la variedad *bituminosa*, más común en la Península Ibérica y la cuenca Mediterránea, pero de dos lugares con distinto nivel de MPs en suelo, nombradas como C2 para la de suelo contaminado, y LA para el limpio. Las semillas de C2 fueron recolectadas a partir de plantas silvestres que crecían en un suelo contaminado por MPs cercano a la antigua zona minera de La Unión (coordenadas 37°37'12,5" N, 0°50'13,5" O). Las semillas de la población LA procedían de plantas que crecían en un suelo no contaminado en Mijas (Málaga; coordenadas 36°35'44"N, 4°38'14"O), con concentraciones totales ($\mu\text{g g}^{-1}$) de MPs de 0,3 Cd, 29 Cu, 35 Pb, 82 Zn (ver Tabla 3.1. en Materiales y Métodos). Estas semillas se usaron en todos los ensayos descritos en este capítulo.

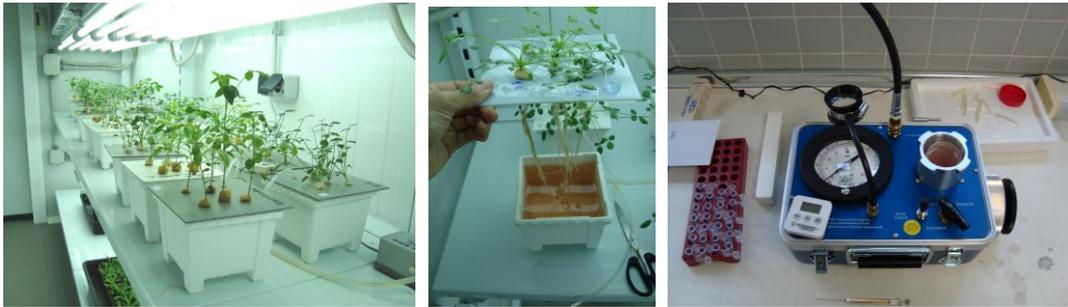
Para comprobar si la germinación ya es una fase sensible a la concentración externa de MPs en el medio, se decidió realizar un test de germinación con concentraciones crecientes de Zn. Para ello, se colocaron semillas entre una doble capa de papel de filtro en placa Petri, humedecidas con 4,5 ml de agua destilada que contenían 0, 1,5, 15 o 150 μM de ZnSO_4 . Se utilizaron 5 placas por tratamiento, con 20 semillas en cada una de ellas, y fueron mantenidas en oscuridad en una cámara a 25°C. Se realizó el recuento cada día hasta llegar a un número constante de semillas germinadas (el 9° día). No se utilizó una solución con Ca^{2+} (lo normal en ensayos de germinación) para evitar problemas de interferencia de dicho catión con el Zn, es decir, para maximizar cualquier efecto del Zn.

Ningún tratamiento de las semillas con Zn en el agua afectó significativamente respecto a los controles a la velocidad de germinación (días hasta la mitad del % final de germinación) ni al % final de germinación. Este fue del 34-37% para C2 y 84-88% para LA. La elevada germinación de LA indica que la ausencia de Ca^{2+} en la solución no fue la responsable de la baja germinación de C2.

10.3. Ensayo en hidropónico con tratamiento con Zn

10.3.1. Procedimientos

10.3.1.1. Procedencia de las semillas y obtención de plántulas



Fotografías 10.3.1.- Recipientes en los que se llevó a cabo los ensayos en hidropónico con las dos poblaciones de *B. bituminosa* en la cámara de cultivo del IMIDA. A la derecha aparece la cámara Scholander con disolución nutritiva en la cámara de presión lista para la determinación de L_0 .

Para mejorar la germinación de las semillas, no se recurrió al escarificado mecánico ya que Luna y col. (2008), demostraron que calor aumenta significativamente la tasa de germinación de *B. bituminosa* mejor que otras técnicas, por lo que se decidió utilizar esta técnica a partir de entonces. Las semillas fueron sometidas a escarificación mediante cocción, echando las semillas en agua a 100°C y dejándolas en ella hasta enfriar. Al día siguiente, se colocaron 20-25 semillas por maceta con perlita. Para compensar las deferencias en la velocidad inicial del crecimiento entre las poblaciones C2 y LA, este proceso se realizó con 12 días de diferencia entre ambas, ya que LA presenta semillas de mayor tamaño que se desarrollan mucho más rápido que las de C2. Las plántulas se mantuvieron 14 días en perlita hasta que ambas poblaciones tuvieron el mismo aspecto y tamaño antes de trasplantarlas a cultivo hidropónico.

10.3.1.2. Condiciones de cultivo

Todo el ensayo se realizó en cámara de cultivo bajo condiciones controladas (25/20°C y HR= 65/85% día/noche; 16 h de luz a 400 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Se utilizaron recipientes de 1,7 l con disolución completa (ver sección 3.4.1. en Materiales y Métodos). Tras una semana, se comenzó a utilizar disolución completa modificada y diluida al 50%, pH=6,0 (tamponado con 2 mM MES-KOH), con 100 $\mu\text{M KH}_2\text{PO}_4$ (ver sección 3.4.2. de Materiales y Métodos). La solución fue aireada durante todo el ensayo y remplazada cada tres días. Al mes desde que las plantas fueron trasplantadas a hidropónico, se comenzó con el tratamiento con Zn, añadiendo ZnSO_4 para conseguir concentraciones externas ($[\text{Zn}]_{\text{ext}}$) de 12 y 61 μM (0,8 y 4 mg l^{-1}) en el medio líquido, respectivamente. Dichas concentraciones fueron elegidas teniendo en cuenta el Zn extractable con agua a partir de un suelo de una zona contaminada llamada C2 localizada en La Unión (Walker y col., 2007). La disolución control presentó la concentración propia de la disolución completa 50% (1 $\mu\text{M Zn}$). Se establecieron 6 recipientes para cada combinación población/tratamiento consideradas como réplicas, con 5 plántulas cada uno.

A pesar de que a una disolución se añadan grandes cantidades de una sustancia, puede que este compuesto no se encuentre disponible, como sucede también en el suelo, ya que este puede precipitar, o formar compuestos al reaccionar con otros formando complejos que reduzcan su biodisponibilidad. Por eso, para comprobar que en la disolución el Zn añadido como sal se encontraba disponible para las plantas, se empleó el software gratuito Visual MINTEQ 2.53 (CEAM, EPA, USA), que permite conocer la especiación teórica de compuestos que se generan en una disolución. A pH de 6,0, el Zn se encontraba en un porcentaje de 87,33, 87,29 y 87,08% en forma libre Zn^{2+} para el control, 12 y 61 μM , respectivamente.

10.3.1.3. Determinación de parámetros vegetales relacionados con la exposición a altas concentraciones externas de Zn

De las 5 plántulas de cada recipiente, una se utilizó para medir parámetros a la hora, otra plántula a la semana, y las 3 restantes a los 14 días del inicio del tratamiento.

Para comprobar el efecto sobre el crecimiento radicular, se realizó un test para determinar el Índice de Tolerancia (TI). Tras el comienzo del tratamiento, se determinó su efecto a corto (1 h) y largo plazo (7 días), realizando medidas de la tasa de elongación de la raíz principal. Para esta tarea se pintó una señal a 30 mm del ápice con un rotulador permanente, y se comprobó la variación de la longitud como consecuencia del crecimiento a las 24 h midiendo la distancia al ápice. Sus unidades son mm h^{-1} (Walker y col., 1998).

La conductividad hidráulica del sistema radicular (L_o) fue determinada para una planta por recipiente usando una cámara Scholander tal y como se describe en la sección 3.2.7. de Materiales y Métodos (ver también Fotografía 10.3.1.). La savia que se iba recolectando durante la determinación de L_o , fue congelada en nitrógeno líquido para la determinación de la concentración de AAs en savia (ver sección 3.2.5.1. en Materiales y Métodos). Esto resulta de interés debido a que algunos AAs participan en la movilización y transporte de los metales a través del xilema (White y col., 1981). Tras la determinación de L_o , el mismo sistema radicular se utilizó para medir el CCC, según Chamuah y Dey (1982), tal como se describe en la sección 3.2.3. de Materiales y Métodos.

El CRA, AFE, y el PF y PS de la biomasa aérea y radicular, fueron obtenidos utilizando tres plantas de cada recipiente a los 14 días desde el comienzo del tratamiento, el día de la cosecha final. Estos y otros parámetros como concentraciones de cationes, P y MPs, fueron determinados tal y como se describe en Materiales y Métodos. El Zn extraíble con agua, el P total y la concentración de ácidos orgánicos se determinaron con el fin de obtener información sobre las formas de Zn existentes en las plantas. Para el Zn soluble en agua de la parte aérea (no hubo materia seca radicular suficiente), se pesaron 100 mg PS y se mantuvieron en agitación durante

2 h con 10 ml de agua Mili-Q, antes de su posterior medición por ICP-OES (ver en Materiales y Métodos). Como los ensayos en hidropónico se enfocan en el nivel fisiológico, las concentraciones de los distintos elementos minerales en las plantas se expresan en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PS, y no en $\mu\text{g g}^{-1}$ PS como en los ensayos relacionados con fitorremediación.

La determinación de la concentración de ácidos orgánicos se llevó a cabo tal y como se describe en la sección 3.2.7. en Materiales y Métodos.

10.3.2. Resultados

No hubo efecto significativo ($P > 0,05$) en el crecimiento de la parte aérea en la población C2 (Figura 10.3.2.a.) con el aumento de $[Zn]_{ext}$, pero la exposición de LA a $61 \mu M$ Zn sí que redujo significativamente su crecimiento (un 50%) en relación a las plantas control. A $61 \mu M$ Zn, el PS de las raíces (Figura 10.3.2.a.) fue menor para LA, con una reducción del 31%, mientras que para C2 no se detectó ninguna alteración significativa. Para la tasa de elongación de la raíz durante periodos de 24-h tras 1 h y una semana del comienzo del tratamiento con diferentes tratamientos con Zn, se detectó un efecto significativo por el tratamiento ($P = 0,023$) (Fig. 10.3.2.b.).

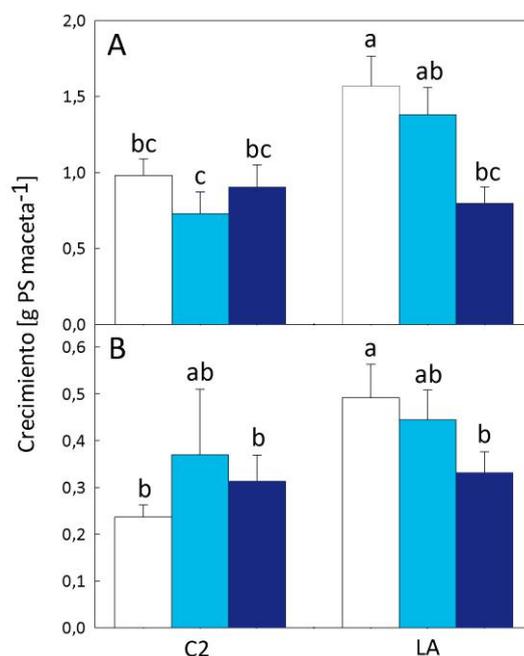


Figura 10.3.2.a.- Valores medios de 6 réplicas para el desarrollo de la parte aérea (A) y de las raíces (B) de las poblaciones C2 (izquierda) y LA (derecha) de *B. bituminosa* tratadas 14 días con 12 y 61 μM de Zn respecto su control (blanco, 1 μM de Zn). Las letras muestran los grupos significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acuerdo con el test te Tukey. En la tabla A.21 de los anexos se pueden ver los datos de PF y PS.

La reducción de la tasa de elongación a $61 \mu M$ en relación a el control fue mayor para LA (disminución del 37% tras 1 h y 53% tras 1 semana) que para C2 (24% y 31%), de acuerdo con los resultados de biomasa (ver Figura 10.3.2.b.).

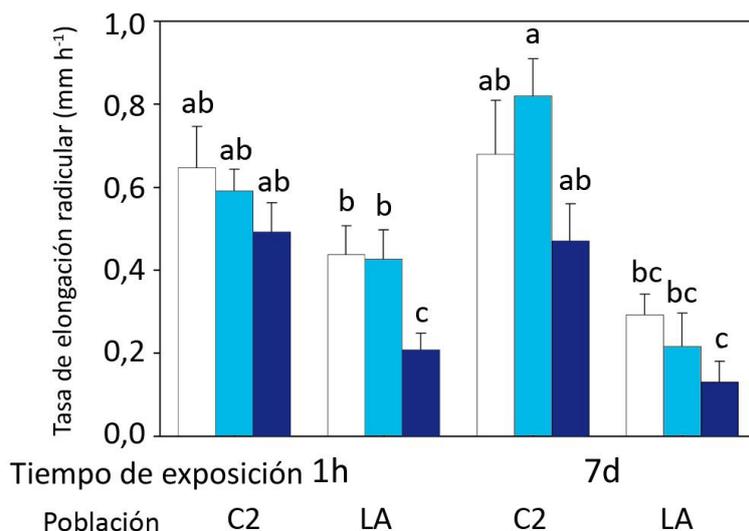


Figura 10.3.2.b.- Tasa de elongación de las raíces para las poblaciones C2 y LA medida durante 24 h tras 1 h y 7 d desde el comienzo del tratamiento con 1 (control), 12 y 61 μM de Zn en el medio líquido. Las letras muestran los grupos significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acuerdo con el test te Tukey.

Tabla 10.3.2.a.- Valores medios de seis réplicas para la conductividad hidráulica de las raíces (L_0) ($\text{mg savia g}^{-1} \text{ PS raíz h}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$) y del CCC ($\text{mmol (NH}_4)_2\text{SO}_4 \text{ g}^{-1} \text{ PF raíz}$), tras 7 días desde el comienzo del tratamiento con Zn, y de CRA y AFE ($\text{m}^2 \text{ Kg PS}^{-1}$) tras 14 días en el momento de la cosecha de las plantas. Las tres últimas filas muestran la significación del análisis factorial.

Población	Tratamiento	L_0	CCC	% CRA	AFE
C2	1	47,98±7,37 a	4,71±2,35	91,33±3,44	63,31±3,47 a
	12	25,19±6,42 abc	3,49±1,17	85,31±3,90	51,45±3,76 abc
	61	20,65±4,18 bc	7,38±5,06	81,09±4,67	43,16±1,85 c
LA	1	38,55±5,60 ab	4,34±0,54	93,63±2,15	59,71±3,65 a
	12	20,07±5,25 bc	3,10±0,98	78,42±8,51	56,62±2,51 ab
	61	10,16±3,34 c	2,99±0,40	87,75±2,20	43,69±2,69 bc
	Sig.	<0,01	0,79	0,20	<0,01
	Población	0,07	0,38	0,86	0,78
	Tratamiento	<0,01	0,73	0,08	<0,01
	Población*Tratamiento	0,88	0,63	0,35	0,37

La $[Zn]_{ext}$ provocó una reducción ($P = 0,01$) del L_0 similar para la población C2 (47% a 12 μM Zn y 57% a 61 μM Zn) y LA (48% y 74%), aunque los valores fueron siempre más altos en C2 (Tabla 10.3.2.a.). Una elevada $[Zn]_{ext}$ redujo el CRA en cierta medida ($P = 0,08$) (Tabla 10.3.2.a.). El AFE se redujo significativamente a 61 μM Zn, para ambas poblaciones (Tabla 10.3.2.a.). Las concentraciones de Zn en parte aérea y raíces incrementaron con $[Zn]_{ext}$, aunque sin diferencias significativas entre poblaciones. Tampoco hubo diferencias en los valores del Zn extraíble con agua entre las dos poblaciones (Tabla 10.3.2.b.). A la elevada $[Zn]_{ext}$, la concentración de P en hoja fue mayor en la población C2 que con 1 μM de $[Zn]_{ext}$.

Tabla 10.3.2.b.- Concentraciones en parte aérea y raíz ($\mu mol g^{-1}$ PS) de Zn (total y extraíble con agua), Cu, Fe y Mn a la cosecha de *B. bituminosa*, tras 14 días desde el comienzo del tratamiento con Zn (1 μM Zn = Control).

Población	$[Zn]_{ext}$ (μM)	Parte aérea					Raíz			
		Zn _{total}	Zn _{H₂O}	Cu	Fe	Mn	Zn	Cu	Fe	Mn
C2	1	2,79c	1,17c	0,22c	1,31b	3,02b	34,0d	1,81bc	6,97a	19,72a
	12	7,14b	3,50a	0,36a	1,13b	4,77a	90,7bc	2,38ab	6,79a	12,00b
	61	11,30	4,70a	0,27b	0,73c	3,69a	141,0a	2,50a	6,17a	3,89c
LA	1	3,13c	1,51c	0,26b	1,82a	3,21b	26,2d	1,71c	3,87c	14,24a
	12	6,46b	3,14b	0,29b	1,24b	4,50a	70,3c	2,15ab	4,06c	8,69b
	61	9,76a	5,27a	0,26b	0,83c	4,48a	103,1a	2,23ab	4,57b	2,03d
	Sig.	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,01	<0,01	<0,01

Tabla 10.3.2.c.- Concentraciones de los principales ácidos orgánicos ($\mu mol g^{-1}$ PS) en la parte aérea de *B. bituminosa*, tras 14 días desde el comienzo del tratamiento con Zn (1 μM Zn = Control).

Población	$[Zn]_{ext}$ (μM)	Cítrico	Fumárico	Málico	Succínico
C2	1	78,65cd	35,82c	47,43ab	16,71a
	12	94,04bcd	39,23c	56,19a	15,41ab
	61	73,53d	21,43d	59,65a	13,22ab
LA	1	104,29abc	48,13ab	33,97c	15,81ab
	12	141,14a	51,92a	37,70bc	13,69ab
	61	111,42ab	42,35bc	60,44a	11,90b
	Sig.	<0,01	<0,01	<0,01	0,01

Tabla 10.3.2.d.- Concentraciones de cationes ($\mu\text{mol g}^{-1}$ PS) en parte aérea y raíz de *B. bituminosa*, tras 14 días desde el comienzo del tratamiento con Zn ($1 \mu\text{M Zn} = \text{Control}$).

Población	[Zn] _{ext} (μM)	Parte aérea					Raíz				
		Ca	K	Mg	Na	P	Ca	K	Mg	Na	P
C2	1	463	449	227b	13,2abc	290ab	258b	484	69cd	23,9a	312c
	12	530	428	280a	19,0a	302a	218bc	490	73cd	24,1a	333bc
	61	486	448	222b	16,1ab	316a	158d	403	60d	18,0ab	424ab
LA	1	482	458	174b	2,4d	261abc	325a	469	148a	22,2ab	471a
	12	545	445	184b	4,2cd	221c	251b	477	101b	16,8ab	457a
	61	482	514	179b	8,0bcd	237bc	174cd	439	83c	12,4b	509a
	Sig.	0,41	0,47	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,65	<0,01	0,02	<0,01

En cuanto al comportamiento de los ácidos orgánicos, el más abundante en las hojas de *B. bituminosa* fue el ácido cítrico, y su concentración fue más alta en LA que en C2 durante sobreexposición a Zn. La concentración de ácido málico fue mayor ($P < 0,05$) en las hojas de los tratamiento control y $12 \mu\text{M}$ para la población C2, pero dicho efecto no se aprecia a la concentración más elevada (Tabla 10.3.2.c.). Los niveles de ácido fumárico fueron siempre más elevados en la población LA, mientras que los de succínico no mostraron cambios ni entre poblaciones ni para tratamientos. Con respecto a las concentraciones de los AAs en la savia del xilema frente a elevadas niveles externos del Zn, no bajó la concentración de ninguno con respecto al control, indicando que los aumentos se deben (por lo menos en parte) a la bajada del L_0 . Sin embargo, destacan los aumentos en HIS, ARG, ASP, GLU y LEU (población C2) y ASP, GLU, ALA y PRO (población LA). White y col. (1981), encontraron en la savia (recogida a presión natural) del xilema de soja ($[\text{Zn}]_{\text{ext}}$ de $0,52 \text{ mg l}^{-1}$) y tomate ($[\text{Zn}]_{\text{ext}}$ de $5,2 \text{ mg l}^{-1}$) concentraciones de AAs de hasta $917 \mu\text{M}$ (ASP). En comparación, las concentraciones de AAs en savia de *B. bituminosa* recogidas bajo presión fueron más bajas ($\leq 27 \mu\text{M}$), indicando una posible dilución por la entrada de la DN y/o la ausencia de un papel para AAs en este proceso, por lo que sólo se pueden interpretar los resultados como “semi-cuantitativos”. Los compuestos orgánicos más relacionados con el transporte de Zn en el xilema son los ácidos cítrico y málico, al menos en soja y tomate (White y col., 1981; Mullins y col., 1986).

10.4. Ensayo en hidropónico con MPs y su efecto en la síntesis de FCs

10.4.1. Procedimientos

Doce días tras la siembra en macetas con perlita, plántulas de las mismas dos poblaciones C2 y LA fueron transferidas a cultivo hidropónico en contenedores de 1,7 l (5 plantas por contenedor), con las mismas condiciones de cultivo que en el anterior ensayo. La solución nutritiva (pH 6,0, con 2mM MES-KOH) contenía 0,4 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 3,5 mM KNO_3 , 1,5 mM NH_4NO_3 , 5 μM KH_2PO_4 , 0,4 mM MgSO_4 , 20 μM H_3BO_3 , 2 μM MnSO_4 , **2 μM ZnSO_4** , 0,5 μM CuSO_4 , 0,1 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 50 μM NaCl y 10 μM FeEDDHA. La disolución fue aireada continuamente y remplazada cada 3-6 d. Un mes después del trasplante, se instauraron los siguientes tratamientos: Control (con 0,2 μM Cu y **2 μM Zn**), 4,4 μM **Cd**, 7,8 μM **Cu**, o 76 μM **Zn**. La especiación realizada con el software informático Visual-Minteq versión 2.53 mostró que el 99, 96 y 98% del Cd, Cu y Zn, respectivamente, estaban presentes como iones de forma libre en la disolución nutritiva.

Los contenedores se distribuyeron en cuatro bloques con las distintas combinaciones según cada población y tratamiento. Una vez que transcurrieron 11 días tras el comienzo del tratamiento, se determinaron relaciones hídricas Ψ_w , Ψ_s , y Ψ_p , AO y CRA de una planta por contenedor, según sección 3.2.4. en Materiales y Métodos. Las plantas fueron cosechadas 21 días desde el comienzo del tratamiento, separando entre raíces y parte aérea, y secando durante 2 días a 60 °C, antes de pesar. La determinación de prolina se realizó según Bates y col. (1973), tal como se describe en detalle en la sección 3.2.5. de Materiales y Métodos. Para la determinación de FCs, las hojas no fueron lavadas, así que la concentración total incluye las FCs de la superficie. Para ello se extractaron a partir de material molido mediante el protocolo especificado en la sección 3.2.8. de Materiales y Métodos.

10.4.2. Resultados

Tal y como muestra la Figura 10.4.2., las poblaciones respondieron de diferente manera a cada uno de los MPs en el medio. El crecimiento de la parte aérea se vio reducido significativamente para la población C2 únicamente para el tratamiento con 4,4 μM Cd, mientras que LA lo redujo sólo para el tratamiento con 76 μM Zn. En cuanto al desarrollo radicular, mientras que C2 resultó ser insensible, el crecimiento de la biomasa radicular de LA estuvo inhibida aproximadamente un 40% respecto su control por el tratamiento con cada MPs (4,4 μM Cd, 7,8 μM Cu y 76 μM Zn).

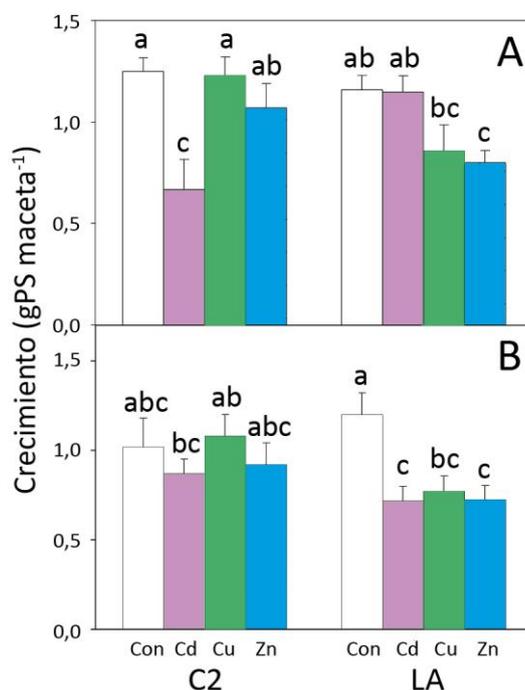


Figura 10.4.2.- Crecimiento de la parte aérea (A) y raíz (B) en las poblaciones C2 y LA de *B. bituminosa* tras 21 días de cultivo en hidroponía en las cuatro disoluciones: Con= Control (0,2 μM Cu y 2 μM Zn), Cd (4,4 μM Cd), Cu (7,8 μM Cu) y Zn (76 μM Zn). Los valores corresponden a la media de 4 réplicas. Las letras muestran los subconjuntos significativamente diferentes ($P < 0,05$) según el test de Tukey.

Tabla 10.4.2.a.- Relaciones hídricas tras 11 días desde el establecimiento del tratamiento con cada uno de los tres MPs. Los valores negativos del AO indican que se realizó ajuste osmótico. Las letras muestran los subconjuntos significativamente diferentes ($P < 0,05$) según el test de Tukey.

Población	Tratamiento	Ψ_w (MPa)	Ψ_s (MPa)	Ψ_p (MPa)	AO (MPa)	CRA (%)
C2	Control	-0,128 a	-0,953 a	0,825 abc		94,1 a
	Cd	-0,378 ab	-1,356 b	0,978 abc	-0,206	81,3 c
	Cu	-0,394 ab	-1,278 b	0,884 abc	-0,299	93,6 a
	Zn	-0,539 b	-1,300 b	0,761 bc	-0,305	92,5 a
LA	Control	-0,205 a	-1,180 b	0,975 abc		91,0 ab
	Cd	-0,151 a	-1,288 b	1,137 a	-0,085	90,0 abc
	Cu	-0,579 b	-1,264 b	0,685 c	0,018	83,5 bc
	Zn	-0,155 a	-1,212 b	1,057 ab	-0,019	90,2 abc
	Sig.	<0,01	<0,01	<0,01	0,09	<0,01

Tabla 10.4.2.b.- Concentración en parte aérea y en raíz de Pro y FCs, tras 21 días desde el comienzo del tratamiento con los tres MPs en la solución nutritiva. Las letras muestran los subconjuntos significativamente diferentes ($P < 0,05$) según el test de Tukey.

Población	Tratamiento	Pro ($\mu\text{mol g}^{-1}$)		Psoraleno ($\mu\text{g g}^{-1}$)		Angelicina ($\mu\text{g g}^{-1}$)	
		Parte Aérea	Raíz	Parte Aérea	Raíz	Parte Aérea	Raíz
C2	Control	9,9 d	4,2 b	1838 bcd	1080 b	281 c	171 c
	Cd	40,9 ab	16,9 a	3123 a	1671 a	662 bc	348 c
	Cu	33,1 b	7,9 ab	2311 b	1778 a	525 c	475 c
	Zn	49,0 a	15,1 a	2175 bc	2154 a	237 c	350 c
LA	Control	7,6 d	4,4 b	1336 d	657 c	1328 ab	1658 b
	Cd	34,5d	10,4 ab	1372 d	642 c	1960 a	1932 ab
	Cu	15,1 d	16,3 a	1676 cd	997 b	1870 a	2522 a
	Zn	24,5 c	5,5 b	1330 d	666 c	1912 a	1963 ab
	Sig.	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

La Tabla 10.4.2.a. muestra que para la población C2, los tres MPs causan AO, pero que en el caso del Cd, no evitó un descenso del CRA. Para LA, si hubo AO, fue muy pequeño (lo que pudo haber contribuido a la inhibición del crecimiento como sucede en el experimento anterior con Zn) y Cu disminuyó Ψ_w , Ψ_p y CRA.

El tratamiento con Cd o Zn causó un incremento significativo en la concentración de prolina en parte aérea en ambas poblaciones (Tabla 10.4.2.b.), pero el Cu sólo disparó la síntesis de prolina en C2. Respecto la concentración de prolina en raíz, esta se vio incrementada durante la presencia de Cd y Zn en la población C2, y bajo la acción de Cu para LA. El efecto de la exposición a altas concentraciones de MPs en la solución nutritiva sobre la acumulación de FCs (Tabla 10.4.2.b.) depende de la población y metal. Así en la parte aérea, sólo la exposición a Cd provocó un aumento (del 70%) de la concentración de psoraleno en la población C2, mientras que para la población LA, no se detectaron efectos significativos con ningún MPs. La concentración de angelicina en parte aérea no se vio afectada en ningún caso por la presencia de MPs en la solución nutritiva. Otro comportamiento bien distinto se observó en raíz, ya que la acumulación de psoraleno se vio estimulada por los tres MPs en la población C2 (Tabla 10.4.2.b.), pero únicamente Cu tuvo un efecto significativo sobre la población LA ($P < 0,05$). La angelicina radicular fue generalmente incrementada por MPs, pero con diferencias significativas sólo para LA con Cu.

10.5. Discusión ensayos

10.5.1. Germinación: el efecto del Zn

El test de germinación demuestra que las semillas de *B. bituminosa* son capaces de germinar incluso en suelos altamente contaminados con Zn, ya que no hubo ningún efecto sobre la velocidad ni porcentaje de germinación. Hay que tener en cuenta que en estos suelos las concentraciones de Zn extraíble con agua rara vez superan 150 μM . Aunque el posterior crecimiento de las plántulas no sea tan sensible como la primera fase de germinación (Kranner y Colville, 2011), se ha encontrado que otras especies reducen drásticamente su tasa de germinación en presencia de concentraciones de Zn similares a las usadas en este test. Según Kranner y Colville (2011), la quelación de los MPs de la disolución de suelo mediante ferritinas, metaloproteínas o ácido fítico podrían ser los responsables de la protección de las semillas frente a MPs. La población C2 presentó un menor porcentaje de germinación que LA, a pesar de que procedían de suelo contaminado, debido seguramente a que este tipo de suelo es normalmente escaso en nutrientes, ya que las concentraciones de MPs en las semillas fueron muy bajas ($\text{Cd} \leq 0,11$, $\text{Cu} \leq 7,5$, $\text{Fe} \leq 71$, $\text{Mn} \leq 13$, $\text{Pb} \leq 1,3$, $\text{Zn} \leq 41 \mu\text{g g}^{-1}$).

10.5.2. Crecimiento: el efecto del Zn

Mientras que una concentración de Zn de 9,76 $\mu\text{mol g}^{-1}$ en los tejidos se pudo asociar a una inhibición del crecimiento de la parte aérea de LA, para C2 no hubo efecto en el crecimiento a 11,29 $\mu\text{mol g}^{-1}$. Generalmente, la inhibición del crecimiento de la parte aérea sucede a partir de concentraciones de Zn por encima de 1,5-10 $\mu\text{mol g}^{-1}$ según las especies, tiempo de exposición y otros factores (Balsberg Pålsson, 1989; Sagardoy y col., 2009; Shi y Cai, 2009; Disante y col., 2010; Lefèvre y col., 2010). Respecto a la biomasa radicular (PS), aunque en las raíces de C2 se alcanzara una concentración de Zn en raíz por encima de 141 $\mu\text{mol g}^{-1}$, su crecimiento radicular no se vio afectado. En la población LA, sin embargo, una concentración menor (103 $\mu\text{mol g}^{-1}$) bastó para reducir un 31% su crecimiento radicular. Otros autores establecen que el crecimiento radicular (biomasa) se ve afectado cuando la concentración tisular de Zn sobrepasa los 4-45 $\mu\text{mol g}^{-1}$ (Sagardoy y col., 2009; Disante y col., 2010; Lefèvre y col., 2010).

En el ensayo en hidropónico con Zn, sólo la población LA experimentó una frenada de su tasa de elongación radicular a 61 μM Zn. De acuerdo con Disante y col. (2010), la tasa de elongación radicular de diferentes especies mediterráneas se ve afectada con concentraciones $[\text{Zn}]_{\text{ext}} \geq 10 \mu\text{M}$, mientras que Lefèvre y col. (2010), encontraron que una exposición de 10 μM Zn durante 14 d sobre plantas de *Zygophyllum fabago* L., originario de sitios contaminados de Murcia, no afecta a la velocidad de crecimiento de la raíz (100 μM Zn supusieron una reducción del 60-80%). Los resultados de ambos ensayos actuales junto con los de trabajos anteriores sugieren una resistencia constitutiva de *B. bituminosa* al Zn externo, especialmente para la población del sitio contaminado C2, la cual posee un alto grado de tolerancia a Zn interno sin presentar una gran capacidad para excluir Zn. De manera similar, para *Silene vulgaris* (Moench) Garcke, la tolerancia a Zn no estuvo asociada con su exclusión (Harmens y col., 1993). Lefèvre y col. (2010), encontraron que la capacidad de *Z. fabago* para excluir Zn en un ensayo en hidropónico no estuvo relacionado con los niveles naturales de Zn en suelo.

10.5.3. Cambios fisiológicos causados por exposición a Zn

La explicación de las diferencias en el crecimiento de ambas poblaciones *B. bituminosa* se podría encontrar en la distinta capacidad para acumular o secuestrar Zn en el interior de la planta en formas insolubles con P, como el fitato, el almacén natural de P (Broadley y col., 2007; Alloway, 2008). A elevadas $[\text{Zn}]_{\text{ext}}$, la concentración de P en la parte aérea fue mayor en la población C2 (Tabla 10.3.2.d.), pero no hubo una relación obvia entre el P y el Zn insoluble en agua. No hubo diferencias entre las poblaciones estudiadas con respecto al Zn extraíble con agua (Zn^{2+} libre y unido a complejos orgánicos de bajo peso molecular), la fracción más fisiológicamente activa en el tejido de plantas (Alloway, 2008). Otro mecanismo de detoxificación de Zn es la quelación en el interior de la vacuola, con iones orgánicos como el malato, oxalato y citrato (Broadley y col., 2007). Aunque el ácido cítrico fue el ácido orgánico más abundante en las hojas de *B. bituminosa*, su concentración fue mayor en la población más sensible LA. Para ambas poblaciones, no parece estar relacionado con tolerancia ya que su concentración a 61 μM Zn en el medio no fue mayor que en los controles. Las concentraciones de ácido fumárico y de los ácidos orgánicos totales también

fueron más elevadas en las hojas de la población LA, especialmente a la mayor $[Zn]_{ext}$. Harmens y col. (1994), también encontraron el mismo efecto en una población sensible de *S. vulgaris* en comparación con otra más tolerante. Teniendo en cuenta el papel de los ácidos orgánicos en el transporte de Zn hacia el interior de la vacuola (Harmens y col., 1993), esto sugiere que los genotipos más tolerantes pueden ser capaces de restringir mejor la liberación del exceso de Zn hacia el citoplasma, y de ahí la reducción de la síntesis de los ácidos orgánicos necesarios, o que poseen otros mecanismos de transporte del Zn. La ausencia de mayores contrastes en las concentraciones de Zn y ácidos orgánicos en los tejidos, sugiere que la diferencia entre las dos poblaciones de *B. bituminosa* puede tener que ver con las células/tejidos en los que se acumula Zn (Küpper y col., 2000), y radicar en lugares de acción externos para el Zn, como pueda ser la superficie de las raíces o la pared celular, interfiriendo en la captura y transporte de nutrientes minerales y agua (Balsberg Pålsson, 1989; Barceló y Poschieder, 1990; Broadley y col., 2007; Shi y Cai, 2009). Sin embargo, para *B. bituminosa*, no hubo una relación clara entre el CCC radicular y la $[Zn]_{ext}$.

Los niveles de Fe en hoja cayeron proporcionalmente con el aumento de la $[Zn]_{ext}$ (Tabla 10.3.2.b.). Aunque las concentraciones a 1 y 12 μM Zn representen suficiencia (Walker y col., 2007), a 61 μM Zn el Fe pudo haber sido deficiente en ambas poblaciones, un efecto común a elevadas $[Zn]_{ext}$ (Broadley y col., 2007). La falta de efecto del $[Zn]_{ext}$ sobre la concentración de Fe de las raíces sugiere una inhibición del transporte de Fe desde la raíz al tallo y hojas. La elevada $[Zn]_{ext}$ redujo los niveles de Mn en raíz (Tabla 10.3.2.b.), algo que sucede frecuentemente (Broadley y col., 2007; Sagardoy y col., 2009) pero sin embargo aumentó la concentración de Mn en hojas. Para ambas poblaciones, no hubo una relación obvia entre la inhibición del crecimiento y la concentración de Mn en hoja. De acuerdo con los resultados de Walker y col. (2007), 1,0-1,6 $\mu mol Mn g^{-1}$ representan suficiencia para *B. bituminosa*, y para otras especies de las fabáceas, la toxicidad ocurre a partir de $[Mn] \geq 1,8-15 \mu mol g^{-1}$ (MacNicol y Beckett, 1985). Los descensos de la concentración de Ca en raíz (Tabla 10.3.2.b.) pueden haber sido debidos a un desplazamiento debido al Zn, mientras que el incremento del P en raíz en la población C2 pudo representar un mecanismo de inmovilización del Zn (Alloway, 2008).

Durante periodos de exposición prolongados (≥ 3 días) al estrés, las plantas pueden experimentar cambios en su morfología o crecimiento que afectan significativamente a su transporte de agua (Javot y Maurel, 2002). Por ejemplo, el Zn puede estimular la lignificación de las raíces y reducir el diámetro de los vasos del xilema (Barceló y Poschieder, 1990). A los 7 días de tratamiento, la $[Zn]_{ext}$ provocó una reducción del L_0 similar para la población C2 (47% a 12 μM Zn y 57% a 61 μM Zn) y LA (48% y 74%), aunque sus valores fueron siempre más altos en C2 (Tabla 10.3.2.a.). Esto debió de contribuir a la reducción del crecimiento, ya que existe una relación positiva entre L_0 y turgor celular en la zona de elongación de la hoja, CRA, conductancia estomática y PS de la parte aérea (Maurel y col., 2010), así que la mayor L_0 de C2 a 61 μM Zn pudo haber contribuido a su mejor mantenimiento del crecimiento. Tazawa y col. (1996), encontraron que la exposición de *Chara corallina* Klein ex Willd. a 5 mM Zn, hace disminuir la L_0 a través de la membrana plasmática un 80%, lo que algunos autores atribuyen a una posible interacción entre Zn y grupos tiol de las acuoporinas. La ausencia de un efecto significativo sobre L_0 tras 1h de exposición a la concentración elevada (datos no mostrados) (antes de detectar cambios morfológicos) sugiere que para *B. bituminosa*, las acuoporinas sensibles al Zn no contribuyen demasiado sobre L_0 , o que las concentraciones usadas en el ensayo (más realistas en función de los extractos acuosos del suelo contaminado C2) fueron inefectivas.

El AFE se redujo significativamente a 61 μM Zn, para ambas poblaciones (Tabla 10.3.2.a.). Resultados similares fueron demostrados para *Arachis hypogea* (Shi y Cai, 2009) y *Populus x euramericana* (Dode) Guinier (Di Baccio y col., 2010). Valores más bajos de AFE representan una adaptación al estrés hídrico, provocado aquí por Zn, el cual bajó también el CRA y L_0 , aunque esta reducción del AFE pueda causar también una reducción de la tasa fotosintética neta (Meziane y Shipley, 2001).

10.5.4. Efectos de MPs sobre relaciones hídricas y la acumulación de FCs

Existen numerosas referencias en las que se habla de la estimulación de la síntesis de prolina por la presencia de concentraciones elevadas de MPs, como casi cualquier otro estrés (Sharma y Dietz, 2006). En este ensayo en hidropónico, aunque la población C2 manifestó un incremento de Pro tisular coincidente con el AO, lo que indica que su acumulación en el citosol debió contribuir al mantenimiento del equilibrio osmótico a través del tonoplasto, su acumulación en raíces y hojas no parece tener demasiada relación con el mantenimiento del crecimiento de *B. bituminaria*, como se discutió en la sección de sequía. Esto sugiere un papel en metabolismo y crecimiento durante la recuperación tras un estrés (Hare y Cress, 1997).

Trabajos previos han mostrado que el Zn causa disrupción de las relaciones hídricas, como también lo hacen el Cd y Cu (Barceló y Poschieder, 1990; Lefèvre y col., 2010) y de manera general, dicha disrupción a su vez estimula la acumulación de FCs (Bourgand y col., 1992, 2001). Los incrementos de los niveles de FCs bajo tratamientos con MPs, particularmente si estas perturban las relaciones hídricas y el crecimiento, podrían fortalecer la defensa química de *B. bituminosa* contra invasiones por hongos o herbívoros de las plantas estresadas, ya que las FCs actúan como toxinas que se activan en presencia de luz UV (Lee y Berenbaum, 1990; Berdegué y col., 1997; Calcagno y col., 2002; Ciangroga y col., 2002; Larbat y col., 2007). Para la población C2, el único efecto significativo en la concentración tisular de psoraleno fue provocado por la exposición a 4,4 μM Cd, la cual también afectó al PS de la parte aérea, al Ψ_w y al CRA. La exposición a elevadas niveles de Cu y Zn también afectó a las relaciones hídricas y aumentaron la concentración de psoraleno en raíz. Para la población LA, un descenso significativo en el Ψ_w causado por 7,8 μM Cu causó un aumento de los niveles de psoraleno y angelicina en raíz. La relación psoraleno:angelicina en las dos poblaciones de *B. bituminosa* fue bastante diferente, lo que está causado por la presión de insectos herbívoros a la que haya estado sometida cada población (Calcagno y col., 2002), pero no estuvo afectada por la presencia de MPs. Para la población C2, dicha relación en parte aérea y raíces fue de 3,7-6,3 y 4,4-9,2 respectivamente, y de 0,3-0,4- y 0,7-1,0 para LA.

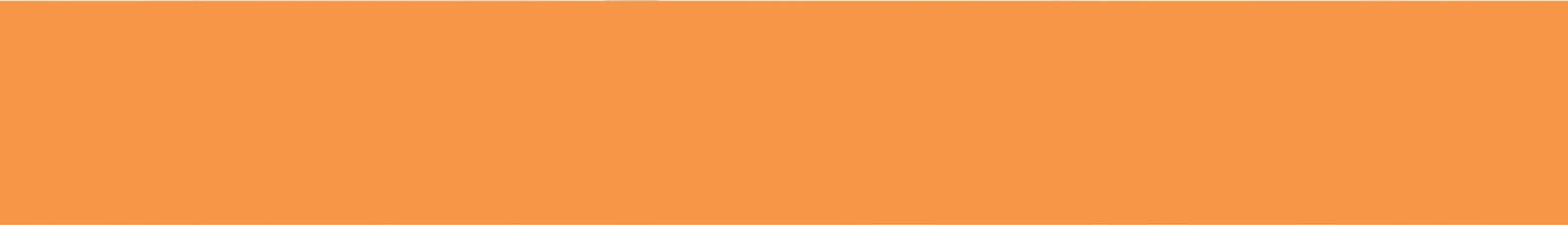
10.6. Conclusiones ensayos en hidropónico con MPs

Los resultados obtenidos *in vitro*, empleando altas concentraciones de Zn soluble, demuestran que *B. bituminosa* es capaz de germinar en suelos altamente contaminados con Zn disuelto sin que se vea afectada ni su velocidad ni porcentaje de germinación, lo que permite el establecimiento de esta especie en este tipo de suelos.

B. bituminosa posee una alta **tolerancia** al Zn, en comparación con otras especies, sobre todo la población C2 (menos sensible a altos niveles de Zn, tanto en la solución nutritiva como en sus tejidos), procedente de un suelo contaminado por MPs cercano a la antigua zona minera de La Unión, de la cual podría decirse que posee **resistencia**.

De los parámetros fisiológicos investigados (Zn total y extraíble con agua, micro y macronutrientes, ácidos orgánicos, CCC radicular y relaciones hídricas), ninguno puede explicar totalmente la mayor tolerancia de la población C2.

La presencia de distintos MPs en el medio afecta de diferente manera a las relaciones hídricas, y a su vez a la acumulación de FCs. Sin embargo, en las dos poblaciones estudiadas, la relación psoraleno:angelicina no se ve afectada por la exposición a MPs indicando que es un carácter constitutivo.





246 SECCIÓN RIZOBIOS

248 CAPÍTULO VII: Cepas nodulantes de *B. bituminosa*



SECCIÓN RIZOBIOS

Justificación del estudio de las cepas nodulantes de *B. bituminosa*.

Durante el transcurso de los trabajos experimentales de esta tesis, surgió la necesidad de conocer en qué medida el crecimiento de *B. bituminosa* se ve afectado por la fijación de nitrógeno atmosférico a través de los nódulos que aparecen en sus raíces. Además, encontrar alguna(s) cepa(s) que posea(n) tolerancia a los MPs y pudiera(n) favorecer la tolerancia de las plantas huéspedes se convirtió en una nueva meta fundamental.

Las experiencias para este fin se pueden separar en varias etapas relacionadas con su aislamiento, caracterización, e identificación. La mayoría de los procedimientos iniciales de aislamiento fueron llevados a cabo en la Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC) en Granada, en el equipo Interacciones Planta-Bacteria del departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, junto a la Dra. María José Lorite Ortega y el Dr. Juan Sanjuán Pinilla. En el IMIDA se realizaron los ensayos de infectividad y caracterización. Finalmente, la identificación de cada cepa fue realizada en el *Center for Rhizobium Studies* (CRS) de la Universidad de Murdoch, en Perth, Australia, durante la realización de una estancia de tres meses en colaboración con Dr. Ron Yates.

11. CAPITULO VII: Cepas nodulantes de *B. bituminosa*

11.1. Objetivos específicos

- Obtener a partir de los propios nódulos de las raíces de *B. bituminaria*, tanto de suelo limpio como contaminado por MPs, una colección de cepas nodulantes fijadoras de N.
- Caracterizar dicha colección, en cuanto a tipo, capacidad para infectar raíces, actividad, fijación de nitrógeno, y tolerancia a MPs, para poder llevar a cabo una selección de las cepas más convenientes para cada tipo de suelo.
- Identificar las cepas para su comparación con otras de diferente procedencia o tipo.
- Almacenar la colección de cepas para posterior uso en futuros cultivos de *B. bituminosa*, herramienta muy útil tanto en suelos agrícolas como en suelos degradados por actividad antrópica.

11.2. Aislamiento a partir de nódulos de raíces de *B. bituminosa*

Para conseguir aislar diferentes tipos de bacterias nodulantes, se decidió tomar muestras de raíces con nódulos procedentes de distintos lugares de Murcia. Además, se solicitó a colaboradores Australianos que nos proveyeran de cepas existentes en las raíces de *B. bituminosa* con las que ellos trabajan, para su estudio simultáneo. Las plantas en las que se logró encontrar nódulos activos fueron:

- Plantas que crecían sobre suelo contaminado, en El Llano del Beal, en la zona minera de La Esperanza, La Unión, Murcia (descrito en Tabla 3.1. de Materiales y Métodos) de modo que las cepas que se aislaron de estas plantas fueron denominadas como **LB**.
- Plantas cultivadas en la estación experimental del IMIDA en La Alberca (descrito en Tabla 3.1. de Materiales y Métodos). Las cepas aisladas desde este suelo limpio de MPs se denominaron como **A**.
- Plantas del ensayo de MPs en parcela de El Llano del Beal (ver Capítulo V), las que se denominarían como **E**.



Fotografías 11.2.a. Nódulos en las raíces de *B. bituminosa* procedentes de la estación experimental del IMIDA (izquierda) y de plantas crecidas en el ensayo de MPs en parcela con suelo contaminado (derecha). Las plantas fueron transportadas en bolsas herméticas (centro) para mantener la humedad y asegurar la supervivencia de las bacterias en el interior de los nódulos hasta su posterior aislamiento.

Las plantas fueron recogidas completas con la mayor cantidad de sistema radicular posible (19/05/2009) y conservadas en bolsas para mantener la humedad. Se eligieron plantas sin flores, para aumentar la posibilidad de encontrar nódulos activos, ya que una vez que las plantas florecen, interrumpen el suministro de azúcares a los nódulos y estos se aletargan. Las plantas se llevaron a la EEZ-CSIC, donde se aislaron diferentes cepas en cultivo puro. Para ello, pequeñas porciones de raíz de cada población fueron cortadas con sus nódulos, eligiendo preferentemente los determinados (esféricos), metidos en tubos Eppendorf y esterilizados en superficie por inmersión en HgCl 0,25% (900 μ l H₂O + 100 μ l HgCl 2,5%) durante 5 minutos en agitación. Dentro de la cámara de flujo, se realizaron 7-8 lavados con agua estéril. En la tapa de una placa Petri, cada nódulo se trituró con una varilla de vidrio individual previamente esterilizada, sembrándose una porción del triturado con la misma varilla sobre medio completo YEM (Vincent, 1970) (ver sección 3.5.1. de Materiales y Métodos) en placa Petri. Se dejaron entonces crecer en una estufa a 28°C.



Fotografías 11.2.b.- Detalle de nódulos (izquierda), siembra (centro) y colección de cultivos puros de cepas nodulantes en medio YEM tras 4-5 días a 28°C (derecha).

A partir de los nódulos iniciales, se aislaron un total de 33 cepas (LB1-8; A1-12; E1-13), capaces de crecer en medio sólido YEM, de las cuales 13 fueron fenotípicamente diferentes. Las cepas mostraban un crecimiento moderado, formando colonias blanquecinas a partir del tercer día de cultivo a 28°C. Tras realizar individualizaciones sucesivas hasta cultivo puro de cada cepa, se realizó un análisis de estas 13 cepas mediante amplificación por PCR de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos (REP-PCR), un tipo de PCR que emplea oligonucleótidos cebadores (“*primers*”) diseñados para hibridar con secuencias repetidas intercaladas en diferentes regiones del genoma, lo que genera un patrón de bandas exclusivo de cada cepa. El objetivo de los marcadores moleculares fue definir la relación existente

entre los aislamientos obtenidos, creando grupos relacionados por el hecho de descender de la misma bacteria ancestral común. Se incluyó en este análisis una cepa nodulante de *B. bituminosa* conocida (Yates y col., 2009) originaria de las islas canarias, y cedida por los colaboradores del CRS, un *Mesorhizobium ciceri* identificada como WSM4083 (Pang y col., 2009). Los detalles para la realización del REP-PCR se especifican en la sección 3.5.2. de Materiales y Métodos.

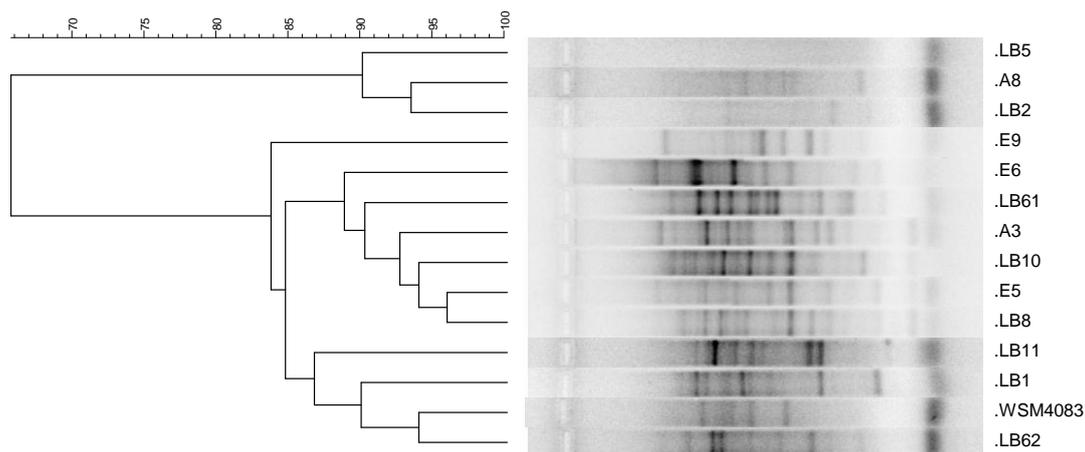


Figura 11.2.a.- Resultado del REP-PCR, en el que se aprecia el patrón de bandas identificativo de cada cepa. Las cepas relacionadas poseen un nivel de similitud entre sus genotipos y fenotipos significativamente superior al que se encontraría entre aislamientos no relacionados de la misma especie seleccionados arbitrariamente. La escala muestra el porcentaje de similitud de las bacterias.

Tras esto, se realizó un análisis de los fragmentos de restricción de genes ARN ribosomal 16S (ARDRA = Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) con las enzimas endonucleasas *HinfI* y *MspI* (Fermentas) (ver sección 3.5.3. de Materiales y Métodos). Se excluyeron de este análisis las cepas LB8 y A8 por resultar similares a E5 y LB2, respectivamente, según el REP-PCR (ver Figura 11.2.2.).

Como era de esperar, la cepa aportada por los colaboradores australianos (*Mesorhizobium ciceri* WSM4083) apareció muy relacionada con una bacteria del mismo género (*Mesorhizobium loti* NZP2311), lo que sirvió como control. La mayoría de los aislados de *B. bituminosa* formaron un grupo homogéneo, del que quedaban excluidas las cepas LB62, E6 y LB11, que además eran diferentes entre sí.

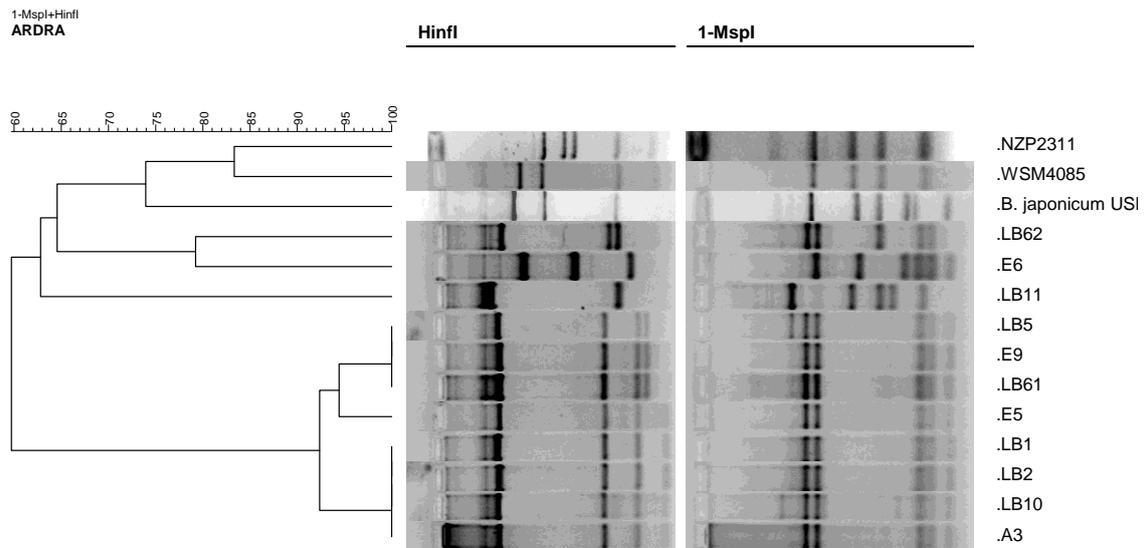


Figura 11.2.b.- ARDRA de las cepas aisladas de *B. bituminosa*. Se incluyeron dos cepas de referencia control (*Mesorhizobium loti* NZP2311 y *Bradyrhizobium japonicum* USDA 100), además de la cepa australiana *M. ciceri* WSM4083. La escala muestra el porcentaje de similitud entre los perfiles obtenidos.

Tras los estudios genéticos, las cepas fueron reactivadas en medio líquido y pasadas a criotubos con glicerol para su posterior almacenamiento a -80°C . Así, la colección de cepas donde se buscarían los candidatos más efectivos para nuestros fines estuvo formada por:

- LB1, LB2, LB5, LB8, LB10, LB11, LB6.1, LB6.2 aislados a partir de plantas del Llano del Beal.
- A3 y A8 a partir de plantas de la estación experimental del IMIDA, en La Alberca.
- E5, E6 y E9 obtenidas desde raíces de plantas del Ensayo de MPs en parcela (ver Capítulo V).
- *Mesorhizobium ciceri* WSM4083 aportada por los colaboradores australianos del CRS de la Universidad de Murdoch (Yates y col., 2009).

11.3. Caracterización inicial tras inoculación de plantas

Existen numerosas referencias bibliográficas acerca de la inoculación de leguminosas con bacterias formadoras de nódulos fijadores de N, valoradas satisfactoriamente por su aplicabilidad en suelos degradados por acción antrópica, consiguiendo mejorar el crecimiento de las plantas con un reducido coste (Cardinale y col., 2010). Para evaluar el papel de la simbiosis entre las bacterias nodulantes y *B. bituminosa*, se llevaron a cabo varios ensayos. Dos ensayos previos permitieron desarrollar protocolos eficientes para la inoculación de plantas de *B. bituminosa*, así como la correcta selección de los medios físicos para realizar un tercer y definitivo ensayo. La dinámica en todos ellos fue la misma, pero modificando en cada uno las condiciones para favorecer la formación de nódulos. Se establecían siempre tres tratamientos generales:

- Plantas no inoculadas (-R) y sin aporte de nitrógeno (-N) = (-R-N)
- Plantas no inoculadas (-R) con aporte de nitrógeno (+N) = (-R+N)
- Plantas inoculadas (+R) y sin aporte de nitrógeno(-N) = (+R-N)

Los parámetros que sirvieron para estimar la participación de las cepas bacterianas simbiotes fueron el número de nódulos, el aporte de nitrógeno a la planta, y su consecuente desarrollo de la biomasa.

11.3.1. Ensayo de infectividad y eficiencia en perlita

Se analizó la capacidad de infectividad y nodulación de las cepas aisladas. Para ello se utilizaron semillas de la población del Llano del Beal de *B. bituminosa* recogidas desde plantas silvestres en 2010 (ver Tabla 3. en Materiales y Métodos), procedentes del mismo lugar que las cepas LB. Se utilizaron diez cepas diferentes, seleccionadas entre las 14 totales tras la eliminación de las cepas que no mostraron una gran capacidad para infectar y nodular en dos ensayos preliminares. Se establecieron 4 réplicas por combinación de tratamiento con macetas de 250 ml.

-N-R	+N-R	-N+R			
1	1	LB1	LB1	LB1	LB1
2	2	LB2	LB2	LB2	LB2
3	3	LB10	LB10	LB10	LB10
4	4	LB11	LB11	LB11	LB11
		LB62	LB62	LB62	LB62
		A8	A8	A8	A8
		E5	E5	E5	E5
		E6	E6	E6	E6
		E9	E9	E9	E9
		WSM4083	WSM4083	WSM4083	WSM4083

Figura 11.3.1.- Diagrama del ensayo de infectividad y efectividad de las cepas aisladas en raíces de *B. bituminaria*. Las macetas fueron recolocadas al azar durante el experimento.

La inoculación se realizó sumergiendo la radícula de las semillas germinadas (plántulas o brotes) directamente en la suspensión de bacterias (ver sección 3.5.4. en Materiales y Métodos). Las plántulas que no fueron inoculadas, fueron procesadas de la misma manera utilizando solución salina estéril en lugar de la suspensión bacteriana. A continuación, 6 semillas fueron trasplantadas por maceta cerca de un mechero de llama. Las macetas donde se realizaron los ensayos habían sido autoclavadas, con perlita lavada intensamente con agua destilada para eliminar el N, ya que este inhibe la nodulación (Goergen y col., 2009). Las plantas fueron cultivadas en cámara de cultivo, efectuando riegos con disolución nutritiva (ver en Tabla 3.5. Materiales y Métodos) suplementada con nitrógeno (+N) (5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ + 1 mM NH_4NO_3) o sin él (-N) según tratamiento.



Fotografías 11.3.1.- Semillas germinadas en la suspensión inoculante antes de ser trasplantadas a las macetas con perlita lavada (izquierda). Comparación de crecimiento visual de las plantas inoculadas con la cepa LB11 colocadas entre los dos controles (+N-R, a la izquierda de las cuatro macetas inoculadas, y -N-R a la derecha). Nódulo cosechado y cortado por la mitad para comprobar que se trataba de nódulos activos, con color rojo en su interior.

Transcurridos 60 días en cámara de cultivo (25/20°C y HR = 65/85% día/noche; 16 h de luz a 400 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), se determinó el PF y PS de la parte aérea por planta, número de nódulos por maceta, y %N. Al final del ensayo, el contenido en N de la perlita fue de 0,181 mg N g^{-1} para las +N-R, y de 0,003 mg N g^{-1} para el resto. Los nódulos fueron recolectados y procesados como los nódulos iniciales, hasta conseguir cultivos puros a partir de cada uno de ellos.

Tabla 11.3.1.- Biomasa aérea (PS planta⁻¹) de las plantas cultivadas 60 días en cámara de cultivo tras inoculación con aislados, su producción de nódulos y aporte de nitrógeno a la planta (%N en el PS). La última columna muestra la **cantidad** de N por planta, calculada a partir de los datos anteriores. Los valores del %N tuvieron que ser transformados (aseno ($\sqrt{x/100}$)) para que cumplieran con la normalidad. Las letras muestran los subconjuntos significativamente diferentes ($P < 0,05$) según el test de Tukey.

Tratamiento	g PS planta ⁻¹	N° nódulos	%N	N*PS (mg)
LB1	0,13±0,03 bcd	19	2,62±0,61 ab	3,4
LB2	0,20±0,10 bcd	27	2,85±0,37 a	5,7
LB10	0,15±0,04 bcd	24	3,41±0,25 a	5,1
LB11	0,53±0,16 bc	73	4,27±0,16 a	22,6
LB62	0,18±0,05 bcd	27	3,24±0,40 a	5,8
A8	0,15±0,03 bcd	34	3,28±0,25 a	4,9
E5	0,10±0,03 cd	26	2,67±0,42 a	2,7
E6	0,12±0,06 bcd	22	3,22±0,44 a	3,9
E9	0,15±0,06 bcd	36	3,27±0,29 a	4,9
WSM4083	0,56±0,13 b	68	4,30±0,12 a	24,1
+N-R	1,46±0,17 a	0	4,10±0,35 a	59,9
-N-R	0,05±0,02 d	0	1,54±0,06 b	0,8
Sig.	<0,01		<0,01	

Todos los aislados fueron capaces de infectar las raíces y formar nódulos, sin que apareciera ningún nódulo en las macetas control, lo que demuestra que se mantuvieron condiciones axénicas para no causar contaminaciones. Aunque la presencia de nódulos no permitió que se alcanzaron los niveles de N de los controles fertilizados, estos aportaron N a la planta hasta valores de %N similares, lo que permitió una estimulación del crecimiento respecto a los controles no fertilizados con N (-N-R). Estas diferencias sólo fueron evidentes significativamente en el caso de LB11 y WSM4083. Para hacer más evidente el efecto de los nódulos en el aporte de N, se

calculó la cantidad total de N existente en el peso final, lo que muestra que dicha cantidad es proporcional al número de nódulos.

Un paso imprescindible para concluir este ensayo fue el de asegurar que las cepas reisladas fueran las mismas que con las que se inocularon las semillas, mediante un nuevo REP-PCR simultáneo junto con los aislados originales. Este fue el fin por el cual se reislaron las cepas a partir de los nódulos obtenidos del ensayo. Sin embargo, al realizar dicho análisis en la EEZ, se observaron patrones de bandas diferentes que imposibilitaron confirmar dicho hecho. Desafortunadamente, debieron ocurrir contaminaciones durante el reislado de las bacterias, o durante su purificación hasta cultivo puro, o incluso durante el traslado a la EEZ desde el IMIDA, algo sospechable debido a que la velocidad de crecimiento de las cepas se vio incrementado a medida que se recultivaban para conseguir cultivo puro. Aunque las cepas originales tardaban unos 3 días en formar colonias, tras el reislamiento y purificación a partir de los nódulos del ensayo de infectividad, se seleccionaron otras cepas capaces de desarrollar colonias en 24 h, pudiéndose haber perdido las verdaderas cepas durante el proceso de reislamiento y purificación. Más detalles se comentan en la siguiente sección.

11.4. Identificación mediante secuenciación de genes rRNA 16S

El siguiente paso lógico fue el de llevar a cabo la identificación de cada cepa original. Para ello se recurrió, mediante tecnología BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul y col., 1990), a la comparación por homología de la secuencia del gen 16S del ARNr, gracias a que se trata de una región con sitios de unión a primers altamente conservados, y con secuencias génicas que contienen zonas hipervariables que pueden ser usadas como firma específica de cada especie para la identificación de bacterias. Toda esta fase se realizó en el *Center for Rhizobium Studies* (CRS) de la Universidad de Murdoch, con la colaboración de todo su equipo y bajo la supervisión

del Dr. Ron Yates (Australia). Las bacterias analizadas procedían de una doble copia de los Criotubos de las cepas, que fueron introducidos en Australia gracias a un Permiso de Importación de Material de Cuarentena específico de material biológico (Quarentine Act 1908 Section 13 2AA).

Como referencia y testigo de que la amplificación e identificación fue realizada correctamente, se empleó en todas las fases la muestra control conocida WSM4083 cedida por los colaboradores del CRS, *Mesorhizobium ciceri* (Yates y col., 2007). De manera adicional, y sólo para este último paso, se realizó la identificación de dos cepas procedentes de Italia, también obtenidas a partir de nódulos de raíces de *B. bituminosa*, nombradas como H y 17, cedidas por un colaborador del CRS.

Tras intentar la amplificación con varias parejas de oligonucleótidos (FGPS1509 y FGPS6; 1540R y 20F; 16S UniversalR y 16S UniversalF), la mejor amplificación de fragmentos de aproximadamente 1500 pb fue la alcanzada con los *primers* 16S Universal (Figura 11.4.a.).

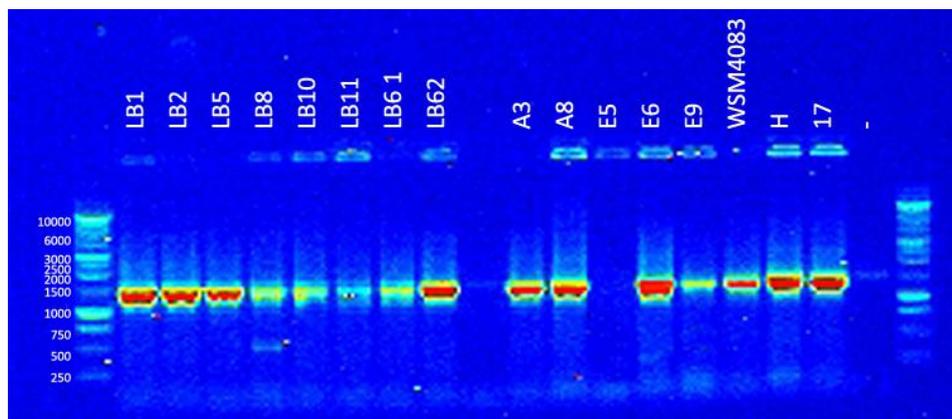


Figura 11.4.a.- Revelado del gel de la amplificación mediante los *primers* 16SUniversal. Se consiguió amplificación de un fragmento de aproximadamente 1500 pb usando 16S Universal en todas las cepas excepto en E5.

Para LB8, como aparecieron dos bandas, se procedió a la purificación del gel a partir únicamente del fragmento de 1500 pb. Para el resto se procedió a la purificación usando directamente los productos de la amplificación por PCR, usando en ambos casos el QIAquick Spin Handbook kit, siguiendo las instrucciones detalladas en el protocolo del fabricante. Una vez purificado el fragmento de 1500 pb, tanto a partir de la banda del gel como del producto de PCR, se procedió a volver a amplificar, pero

usando un sólo primer por separado, para mandar a secuenciar (ver sección 3.5.6.2.). En los resultados de la secuenciación se pudo comprobar que los *primers* funcionaron satisfactoriamente. Los cuatro negativos que fueron incluidos desde el principio del proceso resultaron negativos, lo que confirmó la ausencia de posible contaminación.



Figura 11.4.b.- Secuencia tratada con el programa Geneious (izquierda) para su posterior alineamiento y creación de secuencia (derecha) para la comparación por BLAST.

La comparación de la similitud de secuencias 16S entre 2 bacterias es **indicativa** de que pertenecen al mismo género (incluso cuando la secuencia 16S obtenida sea 100% idéntica a las de otras cepas, esta no tienen por qué pertenecer a la misma especie). Por lo tanto, la comparación dio como resultado la identificación de las cepas a nivel de género, detallándose a continuación las cepas que presentaron la mayor similitud con la región del 16S amplificada (homología con dicha cepa mostrada entre paréntesis). Tras esto, las cepas fueron introducidas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (ver enlace), incluyendo información en cuanto a su procedencia, tipo de suelo, planta huésped, etc.

Tabla 11.4.a.- Identificación de cada aislado junto a la cepa del NCBI con la que mostró mayor homología de la secuencia 16S.

Aislado	Cepa con mayor similitud de secuencia 16S (% homología)
LB5	= <i>Rhizobium sp.</i> UMR7378 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (100%) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JN378712.1
LB8	= <i>Rhizobium sp.</i> UMR7378 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (99,2%); http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JN378713.1
LB10	= <i>Rhizobium sp.</i> UMR7378 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (99%); http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JN378714.1
LB11	= <i>Rhizobium sp.</i> QT7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (100%); http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JN378715.1
A8	= <i>Rhizobium sp.</i> UMR7378 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (99,1%); http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JN378709.1
E5	= <i>Rhizobium sp.</i> UMR7378 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (100%); http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JN378710.1
E6	= <i>Rhizobium sp.</i> OS-B19 partial 16S rRNA gene, strain OS-B19 (100%); http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JF927718.1
WSM4083	= <i>Mesorhizobium sp.</i> S658 16S ribosomal RNA gene, (96%) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/GQ500625.1
H	= <i>Rhizobium sp.</i> UMR7378 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (99,2%); http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JN378711.1
17	= <i>Phyllobacterium trifolii</i> strain ZY16-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (100%); http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/343200074

Las muestras que fueron identificadas fueron almacenadas e incluidas en la colección de bacterias nodulantes de la Universidad de Murdoch.



Fotografías 11.4.a.- Criotubos a partir de los cuales se reactivaron las cepas estudiadas (izquierda). Liofilizador (centro) y almacén de tubos con los aislados en el CRS (derecha).

Las cepas obtenidas a partir de los nódulos del ensayo de infectividad también fueron analizadas, únicamente para comprobar si se trataba de una contaminación o de si se habían seleccionado algunas cepas diferentes. La secuenciación se realizó siguiendo los mismos pasos descritos anteriormente, y los resultados de la secuenciación desvelaron que se trataba de una contaminación por los siguientes aislados.

Tabla 11.4.b.- Identificación de cada aislado con la cepa del NCBI con la que mostró mayor homología de la secuencia 16S.

Cepa origen	Cepa con mayor similitud de secuencia 16S (% homología)
LB1	= <i>Pseudomonas putida</i> strain GM6 16S ribosomal RNA gene, (100%)
LB2	= <i>Pseudomonas fluorescens</i> strain BIT-18 16S ribosomal RNA gene, (99%)
LB5	= <i>Pseudomonas koreensis</i> strain MS200 16S ribosomal RNA gene, (100%)
LB8	= <i>Pseudomonas sp.</i> H9zhy partial 16S rRNA gene, strain H9zhy 100%
LB10	= <i>Pseudomonas koreensis</i> strain MS200 16S ribosomal RNA gene, (99%)
LB11	= <i>Pseudomonas putida</i> strain MK12S6 16S ribosomal RNA gene, (99%)
LB61	= <i>Pseudomonas putida</i> strain MK12S6 16S ribosomal RNA gene, (100%)
LB62	= <i>Microbacterium foliorum</i> strain 327 16S ribosomal RNA gene, (99%)
A3	= <i>Pseudomonas koreensis</i> strain MS200 16S ribosomal RNA gene, (100%)
A8	= <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain QT24 16S ribosomal RNA gene, (100%)
E6	= <i>Rhizobium sp.</i> OS-B19 partial 16S rRNA gene, strain OS-B19 100%
E9	= <i>Pseudomonas fluorescens</i> strain MS300 16S ribosomal RNA gene, (99%)

11.5. Conclusiones

La nodulación es un proceso afectado por sequía (Antolín y col., 2010) y las altas concentraciones de MPs en el suelo (Gadd y Griffiths, 1978; Obbard y Jones, 2001; Saeki y col., 2002). La presencia de MPs en el suelo actúa como una presión selectiva sobre las poblaciones de microorganismos que viven en él, lo que conduce a la selección de microbios con una elevada tolerancia a metales, y normalmente también a una baja diversidad en comparación con lugares no contaminados (Bååth y col., 1998). Las leguminosas son una de las familias pioneras capaces de colonizar suelos altamente contaminados por MPs (Carrasco y col., 2005), gracias en parte a su fuente adicional de N procedente de la simbiosis con sus bacterias nodulantes, lo que les permite sobrevivir en estos suelos pobres en nutrientes. Las bacterias también participan en la biodisponibilidad de los MPs en la rizosfera (Gadd, 2004). Por todo esto, resultó necesario identificar y caracterizar algunas bacterias capaces de aportar N a plantas de *B. bituminosa*, lo que resulta muy relevante en las emergentes técnicas que emplean la asociación microbio-leguminosa para la fitorremediación de suelos degradados (Carrasco y col., 2005; Teng y col., 2011).

La comparación de la secuencia 16S indica que las bacterias aisladas en los trabajos de esta tesis pertenecen al género *Rhizobium sp.*, por lo que se tratarían de bacterias gram-negativas, de crecimiento intermedio-rápido, habiéndose detectado ciertas diferencias dependiendo de la procedencia y tipo de suelo (contaminado o no). La identificación se relaciona perfectamente con el ARDRA, ya que todas las cepas cuya mayor homología se encontró con *Rhizobium sp.* UMR7378, aparecen en el ARDRA con un patrón de bandas similar, y por lo tanto en el mismo conjunto, por lo que podría decirse que proceden de un progenitor ancestral común. Fuera de ese grupo aparecen justamente LB11 y E6, cepas que presentan su mayor homología con *Rhizobium sp.* QT7 16S y *Rhizobium sp.* OS-B19, respectivamente, por lo que podrían tratarse de especies distintas.

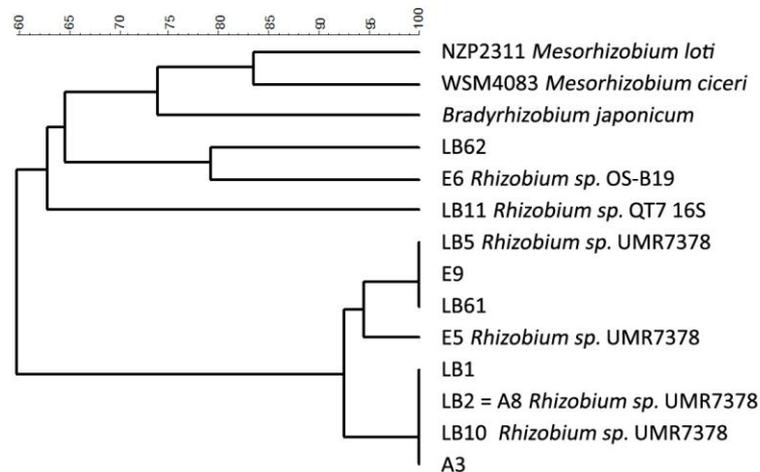


Figura 11.5.- Clasificación de los aislados usando el árbol resultante del ARDRA y la identificación realizada con la secuenciación del 16s. La escala muestra el porcentaje de similitud de las bacterias.

Las cepas que pertenecen al mismo grupo en el ARDRA, seguramente pertenecen al mismo género y especie, pero esta hipótesis necesitaría ser confirmada con estudios más avanzados. Aunque la homología de secuencia sea del 100%, resulta prácticamente imposible aislar la misma cepa a partir de dos lugares diferentes bajo condiciones distintas, por lo que para una correcta identificación serían necesarias pruebas más exhaustivas relacionadas con otros marcadores moleculares y cualidades de las bacterias.

La información acerca de las cepas homólogas en el NCBI es escueta. La cepa *Rhizobium sp. UMR7378* se trata de una bacteria aislada a partir de raíces de *Dalea purpurea*, una leguminosa que crece en el interior de EEUU. Tampoco aparece información acerca de si el *Rhizobium sp. QT7 16S* o *Rhizobium sp. OS-B19*, correspondidos con LB11 y E6 respectivamente, fueron aislados a partir de suelos contaminados. En cuanto a las dos cepas italianas, H presentó gran homología con el tipo *Rhizobium sp. UMR7378*, por lo que el hecho de que un mismo tipo de bacteria, al menos a nivel de género, sea aislado a partir de raíces de *B. bituminosa* de distintas partes del mundo, hace pensar que existe estrecha relación entre esa bacteria y la planta hospedadora. Respecto a 17, esta presentó la mayor homología de secuencia con *Phyllobacterium trifolii*, especie que ha sido descrita por Valverde y col. (2005),

como una especie bacteriana capaz de formar nódulos fijadores de N en plantas de varios géneros de leguminosas (*Trifolium* y *Lupinus*), por lo que podría ser que dicha especie también pueda hacerlo en raíces de *B. bituminosa* y no fuera tan estricta para lograr una simbiosis efectiva como otras especies de plantas hospedadoras.

La cepa originaria de canarias *Mesorhizobium ciceri* WSM4083, y el aislado LB11 (con gran homología a *Rhizobium sp.* QT7 16S) fueron las más eficientes fijando N en el ensayo de infectividad, seguidas por las demás en el orden LB62, LB10, LB2, LB1, E6, A8, E9 y E5, por lo que podría decirse que las cepas procedentes del suelo contaminado en El Llano del Beal no son menos eficientes que las de suelo limpio (A8), y que, todas las cepas que presentan gran homología con la cepa *Rhizobium sp.* UMR7378, y *Rhizobium sp.* OS-B19 (E6), parecen ser menos eficaces en la infectividad e incorporación de N que las dos primeras cepas. El aislado LB11 podría ser una cepa aplicable en estos suelos, en el caso de que *Mesorhizobium ciceri* WSM4083 no fuera tolerante a altas concentraciones de MPs.

Podría decirse entonces que en los suelos estudiados existe diversidad genética de cepas que nodulan *B. bituminosa*, y que además existen diferencias en su comportamiento simbiótico. Esto sugiere que podría hacerse una selección de las mejores cepas para su uso como inoculantes en el futuro. Podría pensarse entonces que *B. bituminosa* puede ser nodulada por bacterias pertenecientes a al menos 3 géneros diferentes dentro de la familia Rhizobiaceae: *Mesorhizobium*, *Phyllobacterium* y *Rhizobium*, y que basado en los datos del ARDRA, podrían ser incluso más géneros.

La identificación de las bacterias reaisladas a partir del ensayo de infectividad (ver Tabla 11.4.b.) permitió saber que no se trataba de una contaminación genérica, sino de una selección hasta cultivo puro de otras bacterias de más rápido crecimiento a partir de cada una de ellas, sin que pudiera tratarse de una contaminación generalizada. Es por esto por lo que se encontró diferente patrón de bandas durante el Rep-PCR en el EEZ al comparar las cepas iniciales y las reaisladas. Resulta muy habitual la aparición de bacterias del género *Pseudomonas* en los nódulos de las raíces de leguminosas, debido a que pueden actuar como promotoras de la nodulación (Rejili y col., 2012; Bolton y col., 1990). Algunas especies de *Pseudomonas* han sido

demostradas como endofíticas de leguminosas (Elvira-Recuenco y Van Vuurde, 2000). Existen estudios que demuestran que especies de *Pseudomonas* fueron aisladas a partir de nódulos formados por otras bacterias nodulantes (Benhizia y col., 2004; Muresu y col., 2008). Por otro lado, algunas pueden llegar a fijar nitrógeno (Desnoues y col., 2003), e incluso formar nódulos (Shiraishi y col., 2010). Desde el punto de vista evolutivo, la explicación radica en que la relación resultante de la coevolución de las leguminosas y sus correspondientes rizobios, no siempre es óptima (Howieson y col., 2008) pudiéndose encontrar bacterias inefectivas para la incorporación de N. La cepa E6 pudo ser reaislada a partir de los nódulos, siendo la única que podría confirmarse como inóculo formador de los nódulos, ya que su identificación fue la misma a partir de los nódulos originales y a partir de los nódulos del ensayo.

12. CONCLUSIONES GENERALES

Bituminaria bituminosa (L.) C.H. Stirton es una especie leguminosa (Fabaceae), que puede colonizar un amplio rango de bioclimas. La especie *B. bituminosa* tiene tres intrataxones. El más común es la variedad *bituminosa*, que aparece en toda la Cuenca mediterránea e Islas Canarias (precipitación anual de 200-800 mm), mientras que las variedades *albomarginata* (120-180 mm) y *crassiuscula* (zonas de alta montaña y fríos inviernos) únicamente crecen de manera natural en las Islas Canarias.

El interés de su estudio nace en sus múltiples aplicaciones potenciales. Se ha utilizado de manera tradicional para la producción de alimento para ganado en las Islas Canarias, y existe un creciente interés internacional por el uso forrajero de *B. bituminosa*. Gracias a su capacidad para rebrotar tras el pastoreo y para permanecer verde durante periodos secos, esta especie se utiliza actualmente como planta modelo en programas de producción de forraje en Australia. Los frutos y hojas de *B. bituminosa* pueden llegar a acumular cerca de $6000 \mu\text{g g}^{-1}$ de psoraleno, y $11000 \mu\text{g g}^{-1}$ de angelicina (Walker y col., 2012), compuestos de aplicación farmacéutica muy amplia. *B. bituminosa* también crece de manera natural en suelos contaminados con elevadas concentraciones de metales pesados (MPs), como en la Sierra Minera de La Unión, por lo que resulta muy relevante evaluar su uso potencial en la fitorremediación de suelo en este tipo de suelos con clima semiárido.

Los resultados de los ensayos de sequía indican que *B. bituminosa* presenta características que la catalogan como una especie que posee una elevada resistencia constitutiva a la sequía, a través de comparaciones cuantitativas de ciertos parámetros con otras especies. Los valores del AFE la destacan como planta altamente tolerante a sequía. Es más eficiente respecto al uso de agua que *Medicago sativa*.

Aunque *B. bituminosa* tiende a escapar de la sequía estival mediante la pérdida de casi todas sus hojas, las poblaciones más tolerantes estarán mejor adaptadas para soportar periodos secos, tanto en verano como durante el resto del año, evitando el estrés interno a través del mantenimiento de sus relaciones hídricas. La selección de cada variedad dependerá del uso en el que se pretendan utilizar, habiéndose detectado diferencias en sus respuestas fisiológicas frente a sequía.

La variedad *albomarginata* (población *Famara*) consiguió que sus plantas estresadas alcanzaran la mayor biomasa de la parte aérea, por lo que sería la más adecuada para la producción de forraje, manteniendo su CRA, con incremento de su relación R: PA, y gran L_0 . Podría decirse que esta variedad se enfrenta a la sequía por evitación, ya que esta le causa desajustes considerables. La variedad *crassiuscula* (población *Boca de Tauce*) se comporta de manera similar frente a sequía que *albomarginata*, pero con menor biomasa y menor AFE (hojas más gruesas), y demuestra la resistencia constitutiva de la especie frente a sequía por no tratarse de una variedad expuesta a sequía en su ciclo de vida normal.

La variedad *bituminosa* (*La Perdiz* y *Llano del Beal*) es más sensible a sequía por ser menos eficiente para evitar el estrés interno. Su estrategia frente a la sequía sería el sometimiento o tolerancia al estrés interno, con grandes cambios osmóticos, pero sin que estos provoquen grandes efectos en el crecimiento. *Llano del Beal* sería una buena candidata para la obtención de angelicina, ya que alcanza gran biomasa sin frenar demasiado su crecimiento bajo condiciones de sequía extremos. *La Perdiz* es la población de menor biomasa aérea, y resultó ser la más sensible en cuanto a crecimiento, por lo que sería poco recomendable para uso forrajero.

B. bituminosa es capaz de germinar en suelos altamente contaminados con Zn, y posee una alta tolerancia al Zn, en comparación con otras especies, sobre todo la población C2, procedente de un suelo contaminado por MPs cercano a la antigua zona minera de La Unión, de la cual podría decirse que posee resistencia. La población C2 es menos sensible a altos niveles tisulares de Zn que LA, de suelo limpio, inhibiendo menos su crecimiento, tanto en parte aérea como en raíz.

Los resultados expuestos, y de acuerdo con otros autores, indican que *B. bituminosa* es capaz de restringir el transporte de MPs a las partes aéreas, tanto en suelo como en disolución nutritiva con elevadas concentraciones de MPs. Esto la hace relevante en el campo de la fitoestabilización (fijación química de los contaminantes a través del uso de plantas), lo que permite su uso para prevenir la diseminación de contaminantes por la fijación física del propio suelo. Por otro lado, la materia fresca de las partes aéreas de *B. bituminosa* no resulta apetecible para los animales, debido probablemente a su desagradable olor, lo que ayuda a frenar la incorporación de parte de los MPs hasta las cadenas tróficas.

Podría considerarse que *B. bituminosa* es una especie apropiada para una etapa inicial en la revegetación de suelos no salinos, moderadamente contaminados por MPs, y con pH en el intervalo neutro-alcalino (pH 6,5-8,0). Se trata de una especie capaz de formar nódulos con bacterias simbiotas que le permiten fijar N₂ atmosférico y mejorar la fertilidad del lugar, algo especialmente de interés para la revegetación de sitios contaminados, normalmente muy pobres en nutrientes. Por otro lado, desde una perspectiva fitorremediadora, una escasa biomasa podría suponer una ventaja por disminuir la posibilidad de que los metales contaminantes se incorporen a las cadenas tróficas desde la parte aérea de las plantas.

A pesar de que pudo apreciarse cierta tendencia, y que el estrés hídrico debía haber supuesto una estimulación de la síntesis, no se detectó efecto significativo en los ensayos de sequía sobre la concentración de FCs en *B. bituminosa*. Para la extracción de FCs para aplicaciones farmacéuticas, resultaría interesante seleccionar plantas con mayor retención de hojas durante los periodos secos, cuando precisamente su concentración es más elevada. Las poblaciones canarias presentaron mayor proporción de psoraleno mientras que las poblaciones peninsulares presentaron mayor proporción de angelicina. La presencia de distintos MPs en el medio afecta de diferente manera a las relaciones hídricas, y a su vez a la acumulación de FCs, sin que la relación psoraleno:angelicina se vea afectada por la exposición a MPs.

La alta acumulación de FCs, y su mantenimiento de las relaciones hídricas, hacen de *B. bituminosa* una candidata adecuada para la producción de estos compuestos a escala de campo. Para este propósito, la población C2 podría ser muy adecuada y rentable debido a su alta acumulación de psoraleno, producto de alto valor comercial. Asumiendo los niveles de psoraleno obtenidos por Walker y col. (2012), para una producción en campo de *B. bituminosa* de 20-40 toneladas de materia verde $\text{ha}^{-1}\text{año}^{-1}$, podrían obtenerse entre 12 y 24 Kg de psoraleno $\text{ha}^{-1}\text{año}^{-1}$.

En los suelos estudiados existe diversidad genética de cepas que nodulan con *B. bituminosa*, con diferencias en su comportamiento simbiótico. Puede ser nodulada por bacterias de los géneros *Phylobacterium* y *Rhizobium*, y por la especie *Mesorhizobium ciceri*. El aislado LB11, procedente de suelos contaminados por MPs, podría ser una cepa aplicable en estos suelos, en el caso de que *Mesorhizobium ciceri* WSM4083 (aislada en Australia a partir de material de *B. bituminosa* canario) no fuera tolerante a altas concentraciones de MPs.

La interpretación conjunta de los resultados procedentes de los tres niveles de experimentación (hidropónico, maceta, campo) otorga una visión globalizadora del comportamiento de *B. bituminosa* frente a estrés. Cada ensayo permite aislar factores, o a combinarlos, favoreciendo el análisis de su respuesta desde diferentes puntos de vista. Algunos resultados pudieron llegar a ser incluso contradictorios, lo que refleja la necesidad de analizar e interpretar cómo la especie estudiada es capaz de combatir el estrés en condiciones lo más reales posibles.

Estas son las conclusiones que han podido deducirse a partir de los trabajos realizados durante la parte experimental. Obviamente, al final de los estudios, aparecen planteamientos alternativos que podrían haber ayudado a eliminar ciertos errores. Procedimientos tales como la medida de la tasa fotosintética, estudio del sistema antioxidante, cuantificación de la transpiración, caracterización de acuaporinas, estudio de la recuperación tras estrés (re-riego, o cambio de disolución sin PEG), caracterización del sistema radicular, etc., podrían haber ayudado a obtener en ocasiones resultados más esclarecedores. Hubiera sido muy recomendable el empleo de alguna planta modelo, como la alfalfa, para haber podido establecer cierto

margen comparativo, ya que existen escasas referencias acerca de *B. bituminosa*, lo que dificultó la interpretación de ciertos resultados. Por otro lado, si el análisis de los rizobios se hubiera realizado como una fase inicial, se hubiera podido analizar su implicación en la tolerancia a estreses por parte de la planta y metabolismo nitrogenado.

Una línea de investigación imprescindible para ampliar la utilización de esta especie será la optimización de la relación planta:rizobios, junto con la selección de líneas más tolerantes a factores abióticos (en programas de mejora) que limitan su distribución y/o crecimiento, como la sequía, frío, salinidad, contaminación, etc. Por otro lado, el valor comercial de las FCs y su gran aplicabilidad farmacéutica motivan a continuar con el estudio de sus patrones de síntesis y acumulación en plantas de *B. bituminosa*, lo que supone un uso novedoso de esta especie. Simultáneamente, continúan realizándose estudios sobre su aplicabilidad a gran escala para la obtención de alimento para ganado, como en Australia.

CONCLUSIONES GENERALES

271

13. BIBLIOGRAFÍA

- Adriano, D.C. 2001. Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability and risks of metals, 2nd edition. Springer: New York, NY.
- Ain-Lhout, F., Zunzunegui, M., Diaz-Barradas, M.C., Tirado, R., Clavijo, A., Garcia-Novo, F. 2001. Comparison of proline accumulation in two mediterranean shrubs subjected to natural and experimental water deficit. *Plant and Soil* 230, 175-183.
- Alarcón, J.J., Sánchez-Blanco, M.J., Bolarín, M.C., Torrecillas, A. 1993. Water relations and osmotic adjustment in *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii* during short-term salt exposure and recovery. *Physiologia Plantarum* 89, 441-447.
- Alburquerque, J.A., de la Fuente, C., Bernal, M.P. 2011. Improvement of soil quality after "alperujo" compost application to two contaminated soils characterised by differing heavy metal solubility. *Journal of Environmental Management* 92, 733-741.
- Alburquerque, J.A., Gonzalez, J., García, D., Cegarra, J. 2004. Agrochemical characterization of "alperujo", a solid by-product of the two phase centrifugation method for olive oil extraction. *Biosearch Technologies* 91, 195-200.
- Alegre, J., Alonso-Blázquez, N., de Andrés, F., Tenorio, J.L., Ayerbe, L. 2004. Revegetation and reclamation of soils using wild leguminous shrubs in cold semiarid Mediterranean conditions: litterfall and carbon and nitrogen returns under two aridity regimes. *Plant and Soil* 263, 203-212.
- Alloway, B.J. 2008. Zinc in soils and crop nutrition, 2nd edn. International Zinc Association, Brussels.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403-410.
- Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. 1980. Quantities of plant nutrients in the microbial biomass of selected soils. *Soil Science* 130, 211-216.
- Andreu, V., Rubio, J.L., Cerní, R. 1995. Effect of Mediterranean shrub on water erosion control. *Environmental Monitoring and Assessment* 37, 5-15.
- Andrews, M. 1986. The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. *Plant, Cell, and Environment* 9, 511-519.

- Antolín, M.C., Muro, I., Sánchez-Díaz, M. 2010. Application of sewage sludge improves growth, photosynthesis and antioxidant activities of nodulated alfalfa plants under drought conditions. *Environmental and Experimental Botany* 68, 75-82.
- Appel, H.M. 1993. Phenolics in ecological interactions: the importance of oxidation. *Journal of Chemical Ecology* 19, 1521-1552.
- Arrese-Igor, C., González, E.M., Marino, D., Ladrera, R., Larrainzar, E., Gil-Quintana, E. 2011. Physiological responses of legume nodules to drought. *Plant Stress Global Science Books*.
- Aryamanesh, N.; Al-Subhi, A. M.; Snowball, R.; Yan, G.; Siddique, K. H. M. 2011. First report of *Bituminaria* witches-broom in Australia caused by a 16SrII Phytoplasma. *Plant Disease* 95, 226.
- Ashraf, M., Foolad, M.R. 2007. Roles of glycinebetaine and proline in improving plant abiotic stress tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 59, 206-216.
- Bååth, E., Díaz-Raviña, M., Frostegård, Å, Campbell, C.D. 1998. Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. *Applied Environmental Microbiology* 64, 238-245.
- Ballantyne, J.S., Chamberlin, M.E. 1994. Regulation of cellular amino acid levels in Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation. K Strange ed, CRC Press, Boca Raton, pp.111-122.
- Balsberg Pålsson, A.-M. 1989. Toxicity of heavy metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to vascular plants. *Water, Air, and Soil Pollution* 47, 287-319.
- Bandurska, H. 2001. Does proline accumulated in leaves of water deficit stressed barley plants confine cell membrane injuries? II. Proline accumulation during hardening and its involvement in reducing membrane injuries in leaves subjected to severe osmotic stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 23, 4-483-490.
- Barber, S.A. 1995. *Soil Nutrient Bioavailability: A Mechanistic Approach*. John Wiley, New York.
- Barceló, J., Poschenrieder, C. 1990. Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. *Journal of Plant Nutrition* 13, 1-37.
- Barnett, N.M., Naylor, A.W. 1966. Amino acid and protein metabolism in Bermuda grass during water stress. *Plant Physiology* 41, 1222-1230.
- Bartels, D., Sunkar, R. 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 24, 23-58.

- Baskin, J.M., Ludlow, C.J., Harris, T.M., Wolf, F.T. 1967. Psoralen, an inhibitor in the seeds of *Psoralea subacaulis* (Leguminosae). *Phytochemistry* 6, 1209-1213.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil* 39, 205-208.
- Behrens-Williams, S.C., Leiter, U., Schiener, R., Weidmann, M., Peter, R.U., Kersch, M. 2001. The PUVA-turban as a new option of applying a dilute psoralen solution selectively to the scalp of patients with alopecia areata. *Journal of American Academy of Dermatology* 44, 248-52.
- Beier, R.C., Oertli, E.H. 1983. Psoralen and other linear furocoumarins as phytoalexins in celery. *Phytochemistry* 22, 2595–2597.
- Bell, L.W., Williams, A.H., Ryan, M.H., Ewing, M.A. 2007. Water relations and adaptations to increasing water deficits in three perennial legumes, *Medicago sativa*, *Dorycnium hirsutum* and *Dorycnium rectum*. *Plant and Soil* 290, 231-243.
- Benavides, M.P., Gallego, S.M., Tomaro, M.L. 2005. Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17, 131-136.
- Benhizia, Y., Benhizia, H., Benguedouar, A., Muresu, R., Giacomini, A., Squartini, A. 2004. Gammaproteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *Systemic and Applied Microbiology* 27, 462–468.
- Berdegue, M., White, K.K., Trumble, J.T. 1997. Feeding deterrence of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae by low concentrations of linear furanocoumarins. *Journal of Economic Entomology* 90, 912-919.
- Bergmann, W. 1988. Ernährungsstörungen bei Kulturpflanzen. Entstehung, visuelle and analytische Diagnose. Gustav Fischer Verlag, Jena, Germany. 762 p.
- Bernal, M.P., Clemente, R., Walker, D.J. 2007. The role of organic amendments in the bioremediation of heavy metal-polluted soils. *Environmental Research at the Leading Edge*. Ed.: Robert W. Gore, 1-57.
- Bernal, M.P., Clemente, R., Walker, D.J. 2009. Interactions of heavy metals with soil organic matter in relation to phytoremediation. En: *Phytoremediation: The Green Salvation of the World*, Ed. J.P. Navarro-Aviño, 109-129. Trivandrum, India: Research Signpost.
- Bernal, M.P., Navarro, A.F., Sánchez-Monedero, M.A., Roig A., Cegarra, J. 1998. Influence of sewage sludge compost stability and maturity on carbon and nitrogen mineralization in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 305-313.

- Bernal, M.P., Roig A., Madrid, R., Navarro, A.F. 1992. Salinity risks on calcareous soils following pig slurry application. *Soil Use and Management* 8, 125-130.
- Bertoli, A., Menichini, F., Noccioli, C., Morelli, I., Pistelli, L. 2004. Volatile constituents of different organs of *Psoralea bituminosa* L. *Flavour and Fragrance Journal* 19, 166–171.
- BOE. 2005a. Real Decreto 824/2005, de 8 de julio, sobre productos fertilizantes. *Boletín Oficial del Estado* 171, 25592-25669.
- BOE. 2005b. Real Decreto 9/2005, de 14 de enero, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados. *BOE* 15, de 18 de enero de 2005.
- Bogges, S.F., Aspinall, D., Paleg, L.G. 1976. Stress metabolism. IX. The significance of end-product inhibition of proline biosynthesis and of compartmentation in relation to stress-induced proline accumulation. *Australian Journal of Plant Physiology* 3, 513-525.
- Bohlmann, J., Gibraltarskaya, E., Eilert, U. 1995. Elicitor induction of furanocoumarin biosynthetic pathway in cell cultures of *Ruta graveolens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 43, 155-161.
- Bolton, H., Elliott, L.F., Turco, R.F., Kennedy, A.C. 1990. Rhizoplane colonization of pea seedlings by *Rhizobium leguminosarum* and a deleterious root colonizing *Pseudomonas* sp. and effects on plant growth. *Plant Soil* 123, 121–124.
- Bourgaud, F., Brunel, M.C., Guckert, A., Forlot, P. 1992. Effect of nitrogen nutrition and environmental conditions on the production of pharmaceutically useful metabolites by *Psoralea cinerea*. *European Journal of Agronomy* 1, 37-43.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161, 839-851.
- Bourgaud, F., Hehn, A., Larbat, R., Doerper, S., Gontier, E., Kellner, S., Matern, U. 2006. Biosynthesis of coumarins in plants: major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. *Phytochemical Reviews* 5, 293-308.
- Bräutigam, A., Gagneul, D., Weber, A.P.M. 2007. High-throughput colorimetric method for the parallel assay of glyoxylic acid and ammonium in single extract. *Analytical Biochemistry* 362, 151-153.
- Briat, J.F., Duc, C., Ravet, K., Gaymard, F. 2009. Ferritins and iron storage in plants. *Biochimica Biophysica Acta*.

- Broadley, M., White, P.J., Hammond, J.P., Zelko, I., Lux, A. 2007. Zinc in plants. *New Phytologist* 173, 677-702.
- Brown, J.C., Jolley, V.D. 1988. Strategy I and strategy II mechanisms affecting iron availability to plants may be established too narrow or limited. *Journal of Plant Nutrition* 11, 1077–1098.
- Brown, P.H., I. Cakmak, Q. Zhang. 1993. Form and function of zinc in plants. Capítulo 7 en Robson, A.D. (ed.) *Zinc in Soils and Plants*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp 90-106.
- Brownell, P.F., Crossland, C.J. 1972. The requirement for sodium as a micronutrient by species having the C4 dicarboxylic photosynthetic pathway. *Plant Physiology* 49, 794-7.
- Burnett, S.E., Thomas, P.A, Van Iersel, M.W. 2005. Postgermination drenches with PEG–8000 reduce growth of salvia and marigolds. *Horticultural Science* 40, 675–679.
- Büssis, D., Heineke, D. 1998. Acclimation of potato plants to polyethylene glycol-induced water deficit II. Contents and subcellular distribution of organic solutes. *Journal of Experimental Botany* 49, 1361-1370.
- Buyse, J., Merckx, R. 1993. An improved colorimetric method to quantify sugar content of plant tissue. *Journal of Experimental Botany* 44, 1627-1629.
- Calcagno, M.P., Coll, J., Lloria, J., Faini, F., Alonso-Amelot, M. 2002. Evaluation of synergism in the feeding deterrence of some furanocoumarins on *Spodoptera littoralis*. *Journal of Chemical Ecology* 1, 175-191.
- Calcagno, M.P., Coll, J., Lloria, J., Faini, F., and Alonso-Amelot, M.E. 2002. Evaluation of synergism in the feeding deterrence of some furanocoumarins on *Spodoptera littoralis*. *Journal of Chemical Ecology* 28, 175-191.
- Calkin, H.W., Pearcy, R.W. 1984. Seasonal progressions of tissue and cell water relations parameters in evergreen and deciduous perennials. *Plant, Cell and Environment* 7, 347-352.
- Cao, X., Ma, L.Q., Chen, M., Singh, S.P., Harris, W.G. 2002. Impacts of phosphate amendments on lead biogeochemistry at a contaminated site. *Environmental Science and Technology* 36, 5296-5304.
- Carbonell-Barrachina, A.A., Burló, F., López, E., Martínez-Sánchez, F. 1999. Arsenic toxicity and accumulation in radish as affected by arsenic chemical speciation. *Journal of Environmental Science and Health* 34, 661–679.

- Carbonell-Barrachina, A.A., Burló, F., Valero, D., López, E., Martínez-Romero, D., Martínez-Sánchez, F. 1999. Arsenic toxicity and accumulation in turnip as affected by arsenic chemical speciation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 2288-2294.
- Cardin, L., Moury, B. 2009. First report of *Passiflora chlorosis* virus in *Bituminaria bituminosa* in Europe. *Plant Disease* 93, 196.
- Cardinale, M., Brusetti, L., Lanza, A., Orlando, S., Daffonchio, D., Puglia, A.M., Quatrini, P. 2010. Rehabilitation of Mediterranean anthropogenic soils using symbiotic wild legume shrubs: Plant establishment and impact on the soil bacterial community structure. *Applied Soil Ecology* 46, 1-8.
- Carpena, R., Esteban, E., Lucena, J.J., Peñalosa, J., Vázquez, S., Zornoza, P., Gárate, A. 2006. Simbiosis y fitorrecuperación de suelos. En: Fijación de Nitrógeno. Fundamentos y Aplicaciones. 255-268/E. Bedmar, J. González, C. Lluch, B. Rodelas Eds. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN)/ 2006.
- Carrasco, J.A., Armario, P., Pajuelo, E., Burgos, A., Caviedes, M.A., López, R., Chamber, M.A., Palomares, A.J. 2005. Isolation and characterisation of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcóllar pyrite mine. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 1131-1140.
- Carvajal, M., Cerdá, A., Martínez, V. 2000. Does calcium ameliorate the negative effect of NaCl on melon root water transport by regulating aquaporin activity? *New Phytologist* 145, 439-447.
- Chamuah, G.S., Dey, S.K. 1982. Determination of cation exchange capacity of woody plant roots using ammonium acetate extractant. *Plant and Soil* 68, 135-138.
- Chan, D.Y., Hale, B.A. 2004. Differential accumulation of Cd in durum wheat cultivars: uptake and retranslocation as sources of variation. *Journal of Experimental Botany* 55, 2571-2579.
- Chaney, R.L. 1989. Toxic element accumulation in soils and crops: protecting soil fertility and agricultural food chains. In *Inorganic contaminants in the vadose zone*, eds. B. Bar-Yosef, N.J. Barrow, J. Goldshmid, 140-158. Berlin: Springer-Verlag.
- Chaney, R.L., Malik, M., Li, Y.M., Brown, S.L., Brewer, E.P., Angel, J.S., Baker, A.J. 1997. Phytoremediation of soil metals. *Current Opinion in Biotechnology* 8, 279-283.
- Chao, Y.Y., Kao, C.H. 2010. Heat shock-induced ascorbic acid accumulation in leaves increases cadmium tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant and Soil* 336, 39-48.

- Chaves, M.M., Flexas, J., Pinheiro, C. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* 103, 551-560.
- Chaves, M.M., Pereira, J.S., Maroco, J., Rodrigues, M.L., Ricardo, C.P.P., Osório, M.L., Carvalho, I., Faria, T., Pinheiro, C. 2002. How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and growth. *Annals of Botany* 89, 907-916.
- Choi, S.M., Jeong, S.W., Jeong, W.J., Kwon, S.Y., Chow, W.S., Park, Y.I. 2002. Chloroplast Cu/Zn-superoxide dismutase is a highly sensitive site in cucumber leaves chilled in the light. *Planta* 216, 315–324.
- Cianfrogna, J.A., Zangerl, A.R., Berenbaum, M.R. 2002. Effects of furanocoumarins on feeding behaviour of parsnip webworms *Depressaria pastinacella*. *Journal of Chemical Ecology* 28, 1365-1375.
- Clarke, B.O., Stephen, R.S. 2011. Review of 'emerging' organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. *Environment International* 37, 226-247.
- Clarkson, D.T., Carvajal, M.A., Henzler, T., Waterhouse, R.N. Smyth, A.J., Cooke, D.T., Steudle, E. 2000. Root hydraulic conductance: diurnal aquaporin expression and the effects of nutrient stress. *Journal of Experimental Botany* 51, 61-70.
- Clemens, S. 2001. Molecular mechanisms of plant metal homeostasis and tolerance. *Planta* 212, 475–486.
- Clemens, S. 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanism of tolerance in plants. *Biochimie* 88, 1707-1719.
- Clemens, S., Palmgren, M.G., Krämer, U. 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science* 7, 309-315.
- Clemente, R., Almela, C., Bernal, M.P. 2006a. A remediation strategy based on active phytoremediation followed by natural attenuation in a soil contaminated by pyrite waste. *Environmental Pollution* 143, 397-406.
- Clemente, R., Walker, D.J., Bernal, M.P. 2005. Uptake of heavy metals and As by *Brassica juncea* grown in a contaminated soil in Aznalcóllar (Spain): The effect of soil amendments. *Environmental Pollution* 138, 46-58.
- Clemente, R., Paredes, C., Bernal, M.P. 2006b. A field experiment investigating the effects of olive husk and cow manure on heavy metal availability in a contaminated calcareous soil. *Agriculture, Ecosystems and Environment*.

- Clemente, R., Walker, D.J., Roig, A., Bernal, M.P. 2003. Heavy metal bioavailability in a soil affected by mineral sulphides contamination following the mine spillage at Aznalcóllar (Spain). *Biodegradation* 14, 199-205.
- Conesa, H.M., Moradi, A.B., Robinson, B.H., Kuhne, G., Lehmann, E., Schulin, R. 2009. Response of native grasses and *Cicer arietinum* to soil polluted with mining wastes: Implications for the management of land adjacent to mine sites. *Environmental and Experimental Botany* 65, 198–204.
- Cooke, G.W. 1975. *Fertilizing for maximum yield*, 2nd edn. London: Granada.
- Cooper, W.E., Pérez-Mellado, V., 2001. Omnivorous lacertid lizard (*Gallotia*) from El Hierro, Canary Islands, can identify prey and plant food using only chemicals cues. *Canadian Journal of Zoology* 79, 881-887.
- Correal, E., Hoyos, A., Ríos, S., Méndez, S., Real, D., Snowball, R., Costa, J. 2008. Seed production of *Bituminaria bituminosa*: Size, production, retention and germination capacity of the legumes. *Cahier Options Méditerranéennes. Sustainable Mediterranean Grasslands and their Multi-Functions. Series A. No. 79*, 379-383.
- Correal, E., Moñino, I., Méndez, P., Ríos, S. 2003. Valoración agronómica de siete poblaciones de *Bituminaria bituminosa*: efecto de la sequía estival y siega sobre su persistencia y producción de hoja. pp. 35-40. *Pastos, Desarrollo y Conservación (SEEP)*. Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca. 816 pp. Editores: A.B. Robles et al.
- Correal, E., Pascual-Villalobos, M.J., Sotomayor, J.A., Robledo, A. 2000. Nuevas aplicaciones agroforestales e industriales de la biodiversidad vegetal. *Biodiversidad Contribución a su conocimiento y conservación en la Región de Murcia*. Servicio de Publicaciones Universidad de Murcia 2000.
- Council of the European Communities. 1986. Directive of 12 of June on the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture. *Official Journal of the European Community* L181: 6-12.
- Cox, M.C. 1995. Arsenic characterization in soil and arsenic effects on canola growth. Ph.D. dissertation. Baton Rouge, Louisiana: Louisiana State University.
- Coyne, M. 2000. Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio. En: Rasskin, M., Coyne, M. (Eds.) *Editorial Paraninfo* pp. 440.

- Crafts-Brandner, S.J., Salvucci, M.E. 2002. Sensitivity of the C4 plant maize to heat stress. *Plant Physiology* 129, 1773-1780.
- Cuellar-Ortiz, S.M., De La Paz Arrieta-Montiel, M., Acosta-Gallegos, J., Covarrubias, A.A. 2008. Relationship between carbohydrate partitioning and drought resistance in common bean. *Plant, Cell, and Environment* 31, 1399-409.
- Davis, R.D., Beckett, P.H.T. 1978. Upper critical levels of toxic elements in plants. II. Critical levels of copper in young barley, wheat, rape, lettuce and ryegrass, and of nickel and zinc in young barley and ryegrass. *New Phytologist* 80, 23-32.
- de la Fuente, C., Clemente, R. Martínez, J., Bernal, M.P. 2010. Optimization of pig slurry application to heavy metal polluted soils monitoring nitrification processes. *Chemosphere* 81, 603-610.
- del Río, J.A., Ortuño, A., Pérez, I., Bennett, R.G., Real, D., Correal, E. 2010. Furanocoumarin content in *Bituminaria bituminosa* varieties and Cullen species. Options méditerranéennes. The contributions of grasslands to the conservation of Mediterranean biodiversity. Series A: Mediterranean Seminars, Number 92, 67-70.
- del Río, M., Font, R., Almela, C., Vélez, D., Montoro, R., De Haro Bailón, A., 2002. Heavy metals and arsenic uptake by wild vegetation in the Guadiamar river area after the toxic spill of the Aznalcóllar mine. *Journal of Biotechnology* 98, 125-137.
- Delauney, A.J., Verma, D.P.S. 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.* 4, 215-223.
- Delorme, T.A., Gagliardi, J.V., Angle, J.S., Van Berkum, P.B., Chaney, R.L. 2003. Phenotypic and genetic diversity of rhizobia isolated from nodules of clover grown in a zinc and cadmium contaminated soil. *Soil Science Society of America Journal* 67, 1746-1754.
- Desnoues, N., Lin, M., Guo, X., Ma, L., Carreño-López, R., Elmerich, C., 2003. Nitrogen fixation genetics and regulation in a *Pseudomonas stutzeri* strain associated with rice. *Microbiology* 149, 2251-2262.
- Di Baccio, D., Minnocci, A., Sebastiani, L. 2010. Leaf structural modifications in *Populus x euramericana* subjected to Zn excess. *Biologia Plantarum* 54, 502-508.
- Diawara, M., Kulkosky, P. J. 2003. Reproductive toxicity of the psoralens. *Pediatric Pathology and Molecular Medicine* 22, 247-258.

- Díaz, E., Roldán, A., Lax, J., Albadalejo, J. 1994. Formation of stable aggregates in degraded soil by amendment with urban refuse and peat. *Geoderma* 63, 277–288.
- Dietz, K.-J., Jäger, R., Kaiser, G., Martinoia, E. 1990. Amino acid transport across the tonoplast of vacuoles isolated from barley mesophyll protoplasts. *Plant Physiology* 92, 132-129.
- Disante, K.B., Fuentes, D., Cortina, J. 2010. Sensitivity to zinc of Mediterranean woody species important for restoration. *Science of the Total Environment* 408, 2216-2225.
- Dobra, J., Motyka, V., Dobrev, P., Malbeck, J., Prasil, I.T., Haisel, D., Gaudinova, A., Havlova, M., Gubis, J., Vankova, R. 2010. Comparison of hormonal responses to heat, drought and combined stress in tobacco plants with elevated proline content. *Journal of Plant Physiology* 167, 1360-1370.
- Draye, X., Kim, Y., Lobet, G., Javaux, M. 2010. Model-assisted integration of physiological and environmental constraints affecting the dynamic and spatial patterns of root water uptake from soils. *Journal of Experimental Botany* 61, 2145– 2155.
- Duan, Y., Zhang, W., Li, B., Wang, Y., Li, K., Sodmergen, Han, C., Zhang, Y., Li, X. 2010. An endoplasmic reticulum response pathway mediates programmed cell death of root tip induced by water stress in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 186, 681-695.
- EEA. 2005. European Environment Agency. The European environment – State and Outlook 2005. Office for Official Publications of the European Communities: Luxembourg.
- Elvira-Recuenco, M., Van Vuurde, J.W.L., 2000. Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. *Canadian Journal of Microbiology* 46, 1036–1041
- Erice, G., Louahlia, S., Irigoyen, J.J., Sanchez-Diaz, M., Avice, J.-C. 2010. Biomass partitioning, morphology and water status of four alfalfa genotypes submitted to progressive drought and subsequent recovery. *Journal of Plant Physiology* 167, 114-120.
- Facelli, J.M., Temby, A.M. 2002. Multiple effects of shrubs on the annual plant community in arid lands of South Australia. *Austral Ecology* 27, 422- 432.
- FAO-PNUMA. 1984. Metodología provisional para la evaluación y la representación cartográfica de la desertización. Roma, FAO-PNUMA. p.74.
- Farrell, M., Jones, D.L. 2010. Use of composts in the remediation of heavy metal contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials* 175, 575-582.

- Fitz, W.J., Wenzel, W.W. 2002. Arsenic transformations in the soil-rhizosphere-plant system: fundamentals and potential application to phytoremediation. *Journal of Biotechnology* 9, 259-278.
- Flombaum, P., Sala, O.E. 2009. Cover is a good predictor of aboveground biomass in arid systems. *Journal of Arid Environments*. 73, 597-598.
- Flora ibérica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Vol VII(I) Leguminosae (partim). Real Jardín Botánico, CSIC.
- Frérot, H., Faucon, M-P., Willems, G., Gode, C., Courseaux, A., Darracq, A., Verbruggen, N., Saumitou-Laprade, P. 2010. Genetic architecture of zinc hyperaccumulation in *Arabidopsis halleri*: the essential role of QTL and environment interactions. *New Phytologist* 187, 355–367.
- Gadd, G.M. 2004. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma* 122, 109-119.
- Gadd, G.M., Griffiths, A.J., 1978. Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microbial Ecology* 4, 303–317.
- García-Camarero, J., Martí, C.M., López-García, D., Sanchis, E., Ingelmo, F. 2004. Morfología y desarrollo de diez especies mediterráneas resistentes a la sequía y de uso pascícola, ornamental y aromático. Actas del III Congreso de la Sociedad Española de Agricultura Ecológica SEAE.
- Gaspar, T., Franck, T., Bisbis, B., Kevers, C., Jouve, L., Hausman, J.F., Dommes, J. 2002. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation*. 37, 263-285.
- Gehlot, H.S., Panwar, D., Tak, N., Tak, A., Sankhla, I.S., Poonar, N., Parihar, R., Shekhawat, N.S., Kumar, M., Tiwari, R., Ardley, J., James, E.K., Sprent, J.I. 2012. Nodulation of legumes from the Thar desert of India and molecular characterization of their rhizobia. *Plant and Soil*, DOI: 10.1007/s11104-012-1143-5.
- Gibson, T.S., Speirs, J., Brady, C.J. 1984. Salt-tolerance in plants. II. In vitro translation of m-RNAs from salt-tolerant and salt-sensitive plants on wheat germ ribosomes. Responses to ions and compatible organic solutes. *Plant, Cell, and Environment* 7, 579-587.
- Girousse, G., Bournoville, R., Bonnemain, J-L. 1996. Water deficit-induced changes in concentrations in proline and some other amino acids in the phloem sap of alfalfa. *Plant Physiology* 111, 109-113.

- Goergen, E., Chambers, J.C., Blank, R. 2009. Effects of water and nitrogen availability on nitrogen contribution by the legume, *Lupinus argenteus* Pursh. *Applied Soil Ecology* 42, 200-208.
- Goldbol, D.L., Hutterman, A. 1985. Effect of zinc, cadmium and mercury on root elongation on *Picea abies* (Karst.) seedlings and the significance of these metals to forest die-back. *Environmental Pollution* 38, 375-381.
- Gulumser, E., Basaran, U., Acar, Z., Ayan, I., Mut, H. 2010. Determination of some agronomic traits of *Bituminaria bituminosa* accessions collected from Middle Black Sea Region. *Option Méditerranéennes* 92, 105-108.
- Gutman, M., Perevolotsky, A., Sternberg, M. 2000. Grazing effects on a perennial legume, *Bituminaria bituminosa* (L.) Stirton, in a Mediterranean rangeland. *Options Méditerranéennes, Series Cahiers*, 45, p. 299-303.
- Guy, C., Kaplan, F., Kopka, J., Selbig, J., Hinch, D.K. 2008. Metabolomics of temperature stress. *Physiologia Plantarum* 132, 220-235.
- Hänsch, R., Mendel, R.R. 2009. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 259-266.
- Hare, P.D., Cress, W.A. 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* 21, 79-102.
- Hare, P.D., Cress, W.A., Staden, J.V. 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell, and Environment* 21, 535-553.
- Harmens, H., Gusmão, N.G.C.P.B., Den Hartog, P.R., Verkleij, J.A.C., Ernst, W.H.O. 1993. Uptake and transport of zinc in zinc-sensitive and zinc-tolerant *Silene vulgaris*. *Journal of Plant Physiology* 141, 309-315.
- Henson, E., Mahalakshmi, V., Alagarswamy, G., Bidinger, F.R. 1983. The effect of flowering on stomatal response to water stress in pearl millet (*Pennisetum americanum* (L.) Leeke). *Journal of Experimental Botany* 35, 219-226.
- Hernández, Y., Lobo, M.G., González, M. 2009. Factors affecting sample extraction in the liquid chromatographic determination of organic acids in papaya and pineapple. *Food Chemistry*, 114, 734-741.
- Herranz, J.M., Ferrandis, P., Martínez-Sánchez, J. 1998. Influence of heat on seed germination of seven Mediterranean Leguminosa species. *Plant Ecology* 136, 95-103.

- Herrera-Cervera, J. A., J. Caballero-Mellado, G. Laguerre, T. Hans-Volker, N. Requena, N. Amarger, E. Martínez-Romero, J. Olivares, J. Sanjuan. 1999. At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *FEMS Microbiology Ecology* 30, 87–97.
- Hilbold, A.E. 1975. Behaviour of organoarsenicals in plants and soils. *Arsenical Pesticides* (E.A. Woolson (ed.)). American Chemical Society Symposium, Vol. 7, ACS, Washington, D.C. pp 53-69.
- Hinsinger, P., Courchesne, F. 2008. En: Violante, A., Huang, P.M., Gadd, G.M. (eds.) *Biophysico-chemical processes of heavy metals and metalloids in soil environments*. Vol. 1 Wiley-IUPAC Series Biophysico-Chemical Processes in Environmental Systems. Chichester, UK.
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I. 1938. The water-culture method for growing plants without soil. pp. 1-39, Berkeley : UC Agric. Exp.Sta. Circ. No 347.
- Horton, J.L., Hart, S.C. 1998. Hydraulic lift: a potentially important ecosystem process. *Trends in Ecology and Evolution* 13, 232-235.
- Howieson, J.G., O’Hara, G.W., Loi, A. 2008. The legume-rhizobia relationship in the Mediterranean Basin. *Options Méditerranéennes. Sustainable Mediterranean Grasslands and their Multi-Functions*. Series A. No. 79, 305-314.
- Howieson, J.G., Yates, R.J., Foster, K.J., Real, D., Besier, B. 2008. Prospects for the future use of legumes. *Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses*, M.D. Dilworth y col (eds.), 363-393.
- Hu, Y., Schmidhalter, H. 2005. Drought and salinity: A comparison of their effects on the mineral nutrition of plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 168, 541-549.
- Huang, B., Xu, C. 2008. Identification and characterization of proteins associated with plant tolerance to heat stress. *Journal of Integrative Plant Biology* 50, 1230-1237.
- Iannucci, A, Rascio, A., Russo, M., Di Fonzo, N., Martiniello, P. 2000. Physiological responses to water stress following a conditioning period in berseem clover. *Plant and Soil* 223, 219-229.
- Illing, W.S. 1957. Drought resistance in plants and physiological processes. *Annual Review of Plant Physiology* 3, 341-363.
- Innocenti, G., Dall’acqua, I., Guiotto, A., Caporale, G. 1984. Investigation on skin photosensitizing activity of various kinds of *Psoralea*. *Planta Medica*, 31, 151-155.

- Irigoyen, J.J., Emerich, D.W., 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.
- Israelson, O.W., West, F.L. 1922. Water holding capacity of irrigated soils. Utah State Agricultural Experiment Station Bull 183, 1-24.
- Javot, H., Maurel, C. 2002. The role of aquaporins in root water uptake. *Annals of Botany* 90, 301-313.
- Jeliazkova, E., Craker, L.E., Xing, B.S. 2003. Seed germination of anise, caraway, and fennel in heavy metal contaminated solutions. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* 10, 83-93.
- Jones, M.M., Osmond, C.B., Turner, N.C. 1980. Accumulation of solutes in leaves of sorghum and sunflower in response to water deficits. *Australian Journal of Plant Physiology* 7, 193-205.
- Juan, A., Coca, B., Crespo, M.B., Ríos, S., Correal, E. 2005. Datos preliminares sobre variedad molecular poblacional en el agregado de *Bituminaria bituminosa* (Leguminosae). pp. 971-977. En: Producciones agroganaderas: gestión eficiente y conservación del medio natural. (Vol.II). Sociedad Española para el Estudio de los Pastos. XLV Reunión Científica. Gijón (Asturias). 998 pp. Editores: B. de la Roza y col.
- Kabata-Pendias, A. 2001. Trace elements in soils and plants, 3rd edn. Boca Raton, Florida: CRC Press LLC.
- Kanayama, Y., Watanabe, I., Yamamoto, Y. 1990. Inhibition of nitrogen fixation in soybean plants supplied with nitrate I. Nitrite accumulation and formation of nitrosylhemoglobin in nodules. *Plant and Cell Physiology* 31, 341-346.
- Karamanos, A.J., Drossopoulos, J.B., Niaves, C.A. 1983. Free proline accumulation during development of two wheat cultivars with water stress. *Journal of Agricultural Science*, 100, 429-439.
- Kashiwagi, J., Krishnamurthy, L., Gaur, P.M., Chandra, S., Upadhyaya, H.D. 2008. Estimation of gene effects of the drought avoidance root characteristics in chickpea (*C. arietinum* L.). *Field Crops Research* 105, 64-69.
- Khan, H.R., Paull, J.G., Siddique, K.H.M., Stoddard, F.L. 2010. Faba bean breeding for drought-affected environments: A physiological agronomic perspective. *Field Crops Research* 115, 279-286.

- Khan, M., Scullion, J. 2002. Effects of metal (Cd, Cu, Ni, Pb or Zn) enrichment of sewage-sludge on soil micro-organisms and their activities. *Applied Soil Ecology* 20, 145–155.
- Kim, T.H., Lee, B.R., Jung, W.J., Kim, K.Y., Avice, J.C., Ourry, A. 2004. De novo protein synthesis in relation to ammonia and proline accumulation in water stressed white clover. *Functional Plant Biology* 31, 847–855.
- Klighan, A.M., Forlot, P. 1989. Comparative photochemoprotection in humans by tans induced either by solar simulating radiation or after a psoralen-containing sunscreen. Fitzpatrick T.B., Forlot, P., Pathak, M.A., Urbach, F. (eds). Past, present and future of photochemoprotection and other biological activities. Libbey J. Eurotext, Montrouge, pp 407-420.
- Knobler, R., Barr, M.L., Couriel, D.R., Ferrara, J.L.M., French, L.E., Jaksch, P., Reinisch, W., Rook, A.H., Schwarz, T., Greinix, H. 2009. Extracorporeal photopheresis: past, present, and future. *Journal of the American Academy of Dermatology* 61, 652-665.
- Kotak, S., Larkindale, J., Lee, U., von Koskull-Döring, P., Vierling, E., Scharf, K-D. 2007. Complexity of the heat stress response in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 10, 310-316.
- Kranner, I., Colville, L.E. 2011. Metals and seeds: biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. *Environmental and Experimental Botany* 72, 93-105.
- Krizek, D.T. 1985. Methods of inducing water stress in plants. *Horticultural Science* 20, 1028–38.
- Küpper, H., Lombi, E., Zhao, F.J., McGrath, S.P. 2000. Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Planta* 212, 75–84.
- Kusaka, M., García, A., Fujimura, T. 2005. The maintenance of growth and turgor in pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.) cultivars with different root structures and osmo-regulation under drought stress. *Plant Science* 168, 1-14.
- Lafuente, A., Pajuelo, E., Caviedes, M.A., Rodríguez-Llorente, I.D. 2010. Reduced nodulation in alfalfa induced by arsenic correlates with altered expression of early nodulins. *Journal of Plant Physiology* 167, 286-291.
- Lane-Brown, M.M. 1981. Australian field trials with bergamot oil containing sun tan products. Cahn, J., Forlot, P., Grupper, C., Meybeck, A., Urbach, A. (eds). Psoralens in cosmetics and dermatology. Pergamon Press, Paris, pp 399-409.

- Larbat, R., Kellner, S., Specker, S., Hehn, A., Gontier, E., Hans, J., Bourgaud, F., Matern, U. 2007. Molecular cloning and functional characterization of psoralen synthase, the first committed monooxygenase of furanocoumarin biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 282, 542-554.
- Lazcano-Ferrat, I., Lovatt, C.J. 1999. Relationship between Relative Water Content, nitrogen pools, and growth of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. acutifolius* A. gray during water deficit. *Crop Science* 39, 467-475.
- Le Houérou, H.N. 1992. The role of saltbushes (*Atriplex spp.*) in arid land rehabilitation in the Mediterranean Basin: a review. *Agroforestry Systems* 18, 107-148.
- Lee, B.R., Jin, Y.L., Jung, W.J., Avice, J.C., Morvan-Bertrand, A., Ourry, A., Park, C.W., Kim, T.H. 2008. Water-deficit accumulates sugars by starch degradation-not by novo synthesis- in white clover leaves (*Trifolium repens*). *Physiologia Plantarum* 134, 403-411.
- Lee, B.R., Li, L.S., Jung, W.J., Jin, Y.L., Avice, J.C., Ourry, A., Kim, T.H. 2009. Water deficit-induced oxidative stress and the activation of antioxidant enzymes in white clover leaves. *Biologia Plantarum* 53, 505-510.
- Lee, K., Berenbaum, M.R. 1990. Defense of parsnip webworm against phototoxic furanocoumarins: the role of antioxidant enzymes. *Journal of Chemical Ecology* 16, 2451-2460.
- Lee, Y.P., Takahashi, T. 1966. An improved colorimetric determination of amino acids with the use of ninhydrin. *Analytical Biochemistry* 14, 71-77.
- Lefèvre, I., Correal, E., Lutts, S. 2010. Impact of cadmium and zinc on growth and water status of *Zygophyllum fabago* in two contrasting metalicolous populations from SE Spain: comparison at whole plant and tissue level. *Plant Biology* 12, 883-894.
- Lefèvre, I., Marcha, G., Meerts, P., Correal, E., S. Lutts. 2009. Chloride salinity reduces cadmium accumulation by the Mediterranean halophyte species *Atriplex halimus* L. *Environmental and Experimental Botany* 65, 142-152.
- Leigh, R.A., Wyn-Jones, R.G. 1984. A hypothesis relating critical potassium concentration for growth to the distribution and functions of this ion in the plant cell. *New Phytologist* 97, 1-13.
- Ley Europea Nº L 181/6 Council Directive del 12 Junio 10986 para la protección del medio ambiente, y en particular del suelo, cuando lodos residuales son utilizados en agricultura.

- Lindsay, W.L., Norvell, W.A. 1969. Equilibrium relationship of Zn^{2+} , Fe^{3+} , Ca^{2+} , and H^+ with EDTA and DTPA in soils. *Soil Science Society of America* 33, 62-68.
- Liste, H-H., White, J.C. 2008. Plant hydraulic lift of soil water: implications for crop production and land restoration. *Plant and Soil* 313, 1-17.
- Loneragan, J.F., Webb, M.J. 1993. Interactions between Zinc and Other Nutrients Affecting the Growth of Plants. Chap 9 in Robson, A.D. (ed.) *Zinc in Soils and Plants*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp 119-134.
- Lorenz, S.E., Hamon, H.E., Mc Grath, S.P., Holm, P.E., Christensen, T.H. 1994. Applications of fertilizer cations affect cadmium and zinc concentrations in soil solutions and uptake by plants. *European Journal of Soil Science* 45, 159-165.
- Ludlow, M.M., Chu, A.C.P., Clements, R.J., Kerslake, R.G. 1983. Adaptation of species of *Centrosema* to water stress. *Australian Journal of Plant Physiology* 10, 119-130.
- Luna, B., Moreno, J.M., Cruz, A., Fernández-González, F. 2007. Heat-shock and seed germination of a Group of Mediterranean plant species growing in a burned area: An approach based on plant functional types. *Environmental and Experimental Botany* 60, 324-333.
- Luna, B., Pérez, B., Céspedes, B., Moreno, J.M. 2008. Effect of cold exposure on seed germination of 58 plant species comparing several functional groups from a mid-mountain Mediterranean area. *Écoscience* 15, 478-484.
- Lutts, S., Lefèvre, I., Delpèrèe, C., Kivits, S., Deschamps, C., Robledo, A., Correal, E. 2004. Heavy metal accumulation by the halophyte species Mediterranean saltbush. *Journal of Environmental Quality* 33, 1271-1279.
- Lv, W.T., Lin, B., Zhang, M., Hua, X.J. 2011. Proline accumulation is inhibitory to *Arabidopsis* seedlings during heat stress. *Plant Physiology* 156, 1921-1933.
- Maâtallah, J., Berraho, E.B., Muñoz, S., Sanjuan, J., Lluch, C. 2002. Phenotypic and molecular characterization of chickpea rhizobia isolated from different areas of Morocco. *Journal of Applied Microbiology* 93, 531-540.
- Maathuis, F.J.M. 2009. Physiological functions of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology*. 12, 250-258.
- MacNicol, R. D., Beckett, P.H.T. 1985. Critical tissue concentrations of potentially toxic elements. *Plant and Soil* 85, 107-129.

- MacRobbie, E.A.C. 1981. Effects of ABA in "isolated" guard cells of *Commelina communis* L. *Journal of Experimental Botany* 32, 563-572.
- Maggio, A., Miyazaki, S., Veronese, P., Fujita, T., Ibeas, J.I., Damsz, B., Narasiman, M.L., Hasegawa, P.M., Joly, R.J., Bressan, R.A. 2002. Does proline accumulation play an active role in stress induced growth reduction? *Plant Journal* 31, 699-712.
- Magnuson, J.A., Magnuson, N.S., Hendrix, D.L., Higinbotham, N. 1973. Nuclear magnetic resonance studies of sodium and potassium in etiolated pea stem. *Biophysical Journal* 13, 763-771.
- Manousaki, E., Kalogerakis, N. 2009. Phytoextraction of Pb and Cd by the Mediterranean saltbush (*Atriplex halimus* L.): metal uptake in relation to salinity. *Environmental Science & Pollution Research* 16, 844-854.
- Mariano, T.M., Vetrano, A.M., Gentile, S.L., Heck, D.E., Whittemore, M.S., Jabin, I., Rapp, R.D. Heindel, N.D., Laskin, J.D. 2002. Cell-impermeant pyridinium derivatives of psoralens as inhibitors of growth. *Biochemical Pharmacology* 63, 31-9.
- Marqués, M.J., Bienes, R., Jiménez, L., Pérez-Rodríguez, R. 2007. Effect of vegetal cover on runoff and soil erosion under light intensity events. Rainfall simulation over USLE plots. *Science of the Total Environment*. 378, 161-165.
- Marqués, M.J., Jiménez, L., Pérez-Rodríguez, R., García-Ormaechea, S., Bienes, R. 2005. Reducing water erosion in a gypsic soil by combined use of organic amendment and shrub revegetation. *Land Degradation & Development* 16, 339-350.
- Marschner, H. 1993. Zinc Uptake from Soils, Capítulo 5 en Robson, A.D. (ed.) *Zinc in Soils and Plants*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp 59-78.
- Marschner, H. 1995. *Mineral nutrition of higher plants*, 2nd edn. London: Academic Press.
- Marschner, H., Romheld, V., Kissel, M. 1986. Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron. *Journal of Plant Nutrition* 9, 695-713.
- Martínez, S., Correal, E., Real, D., Ortuño, A., del Río J.A. 2010. *Bituminaria bituminosa*: a source of furanocoumarins of pharmaceutical interest. In: A.S. Awaad, J.N. Govil & V.K. Singh (Eds). *Recent Progress in Medicinal Plants*. Vol 27. *Drug Plants I*. Studium Press LLC, Houston: 310-322.
- Martínez-Fernández, D., Walker, D.J., Romero, P., Correal, E. 2010. The physiology of drought tolerance in *Tedera (Bituminaria bituminosa)*. *Options Méditerranéennes*. The

- contributions of grasslands to the conservation of Mediterranean biodiversity. Series A: Mediterranean Seminars, Number 92, 155-159.
- Martínez-Fernández, D., Walker, D.J., Romero-Espinar, P., Flores, P., del Río, J.A. 2011. Physiological responses of *Bituminaria bituminosa* to heavy metals. *Journal of Plant Physiology* 168, 2206-2211.
- Marur, C.J., Sodek, L., Magalhes, A.C. 1994. Free amino acids in leaves of cotton plants under water deficit. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 6, 103-108.
- Massot, B., Milesi, S., Gontier, E., Bourgaud, F., Guckert, A. 2000. Optimized culture conditions for the production of furanocoumarins by micropropagated shoots of *Ruta graveolens* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 62, 11-19.
- Maurel, C., Simonneau, T., Sutka, M. 2010. The significance of roots as hydraulic rheostats. *Journal of Experimental Botany* 61, 3191-3198.
- Maurich, T., Iorio, M., Chimenti, D., Turchi, G. 2006. Erybraedin C and bitucarpin A, two structurally related pterocarpan purified from *Bituminaria bituminosa*, induced apoptosis in human colon adenocarcinoma cell lines MMR- and p53-proficient and -deficient in a dose-, time-, and structure-dependent fashion. *Chemico-Biological Interactions* 159, 104-116.
- Maurich, T., Pistelli, L., Turchi, G. 2004. Anti-clastogenic activity of two structurally related pterocarpan purified from *Bituminaria bituminosa* in cultured human lymphocytes. *Mutation Research - Genetic Toxicology* 561, 75-81.
- McCutchan, H., Shackel, K.A. 1992. Stem-water potential as a sensitive indicator of water stress in prune trees (*Prunus domestica* L.) cv. French. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 117, 607-11.
- McDowell, N.G. 2011. Mechanisms linking drought, hydraulics, carbon metabolism, and vegetation mortality. *Plant Physiology* 155, 1051-9.
- McGrath, S.P., Brookes, P.C., Giller, K.E. 1988. Effects of potentially toxic metals in soil derived from past applications of sewage sludge on nitrogen fixation by *Trifolium repens*. *Soil Biology and Biochemistry*, 20, 415-424.
- McGrath, S.P., Cegarra, J. 1992. Chemical extractability of heavy metals during and after long-term applications of sewage sludge to soil. *Journal of Soil Science* 43, 313-321.
- McKey, D. 1979. The distribution of secondary compounds within plants. En: Rosenthal, G.A., Janzen, D.H. (eds) *Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites*. Academic Press, New York, pp 55-133.

- McLaughlin, M.J., Zarcinas, B.A., Stevens, D.P., Cook, N. 2000. Soil testing for heavy metals. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 31, 1661-1700.
- McMillen, G.G., McClendon, J.H. 1983. Dependence of photosynthetic rates on leaf density thickness in deciduous woody plants grown in sun and shade. *Plant Physiology* 72, 674-678.
- Medejón, E., Burgos, P., López, R., Cabrera, F. 2001. Soil enzymatic response to addition of heavy metals with organic residues. *Biology and Fertility of Soils* 34, 144-150.
- Medrano, H., Flexas, J., Galmés, J. 2009. Variability in water use efficiency at the leaf level among Mediterranean plants with different growth forms. *Plant and Soil* 317, 17-29.
- Meers, E., Ruttens, A., Hopgood, M.J., Samson, D., Tack, F.M.G. 2005. Comparison of EDTA and EDDS as potential soil amendments for enhanced phytoextraction of heavy metals. *Chemosphere* 58, 1011-1022.
- Méndez, M.O., Glenn, E.P., Maier, R. 2007. Phytostabilization potential of quailbush for mine tailings: growth, metal accumulation, and microbial community changes. *Journal of Environmental Quality* 36, 245-253.
- Méndez, M.O., Maier, R. 2008. Phytostabilization of mine tailings in arid and semiarid environments – an emerging remediation technology. *Environmental Health Perspectives* 116, 278-283.
- Méndez, P. 2000. El heno de tедера (*Bituminaria bituminosa*): un forraje apetecible para el caprino. III Reunión Ibérica de Pastos y Forrajes. 7-13 mayo 2000, Lugo.
- Méndez, P., Díaz, E., Rivero, R. 2001. Contenido en cumarinas del forraje verde de tедера (*Bituminaria bituminosa*). En Crespo, M.B., Juan, A., Ríos, S. (Eds.). *Biodiversidad en Pastos*. Compobell S.L. Murcia, 335-339.
- Méndez, P., Peters, J., Morales, D., Jiménez, M.S. 2000. Características del intercambio gaseoso de las tederas (*Bituminaria bituminosa*) de Canarias. III Reunión Ibérica de Pastos y Forrajes. 7-13 mayo 2000, Lugo.
- Mengel, K., Kirkby, E.A. 1987. *Principles of Plant Nutrition*. 4th Ed. Bern: International Potash Institute 687p.
- Meziane, D., Shipley, B. 2001. Direct and Indirect Relationships Between Specific Leaf Area, Leaf Nitrogen and Leaf Gas Exchange. Effects of Irradiance and Nutrient Supply. *Annals of Botany* 88, 915-927.

- Michel, B.E. 1983. Evaluation of the water potentials of solutions of polyethylene glycol 8000. *Plant Physiology* 72, 66–70.
- Michel, B.E., Kaufmann, M.R. 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology* 51, 914-917.
- Milesi, S., Massot, B., Gontier, E., Bourgaud, F., Guckert, A. 2001. *Ruta graveolens* L.: a promising species for the production of furanocoumarins. *Plant Science* 161, 189-199.
- Millán, R., Gamarra, R., Schmid, T., Sierra, M.J., Quejido, A., Sánchez, D.M., Cardona, A.I., Fernández, M., Vera, R. 2006. Mercury content in vegetation and soils of the Almaden mining area (Spain). *Science of the Total Environment* 368, 79-87.
- Mitchell, P.J., Veneklaas, E.J., Lambers, H., Burgess, S.S.O. 2008. Leaf water relation during summer water deficit: differential responses in turgor maintenance and variation in leaf structure among different plant communities in south-western Australia. *Plant, Cell, and Environment* 31, 1791-1802.
- Mittler, R. 2006. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science*. 11, 15-19.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9, 490-498.
- Money, N.P. 1989. Osmotic pressure of aqueous polyethylene glycols. Relationship between molecular weight and vapor pressure deficits. *Plant Physiology* 91, 766–9.
- Moore, J.P., Vitré-Gibouin, M., Farrant, J.M., Driouich, A. 2008. Adaptations of higher plant cell walls to water loss: drought vs desiccation. *Physiologia Plantarum* 134, 237-245.
- Morales, C., Esteve, F. 1975. Estudio Fitosociológico y Florístico de La provincia de Granada. *Trabajos Del Departamento de Botânica*, 3 (1). Universidad de Granada.
- Moreno-de las Heras, M., Merino-Martín, L., Nicolau, J.M. 2009. Effect of vegetation cover on the hydrology of reclaimed mining soils under Mediterranean–Continental climate. *Catena* 77, 39–47.
- Mulligan, C.N., Yong, R.N, Gibbs, B.F. 2001. An evaluation of technologies for the heavy metal remediation of dredged sediments. *Journal of Hazardous Materials* 85, 145–163.
- Mullins, G.L., Sommers, L.E., Barber, S.A. 1986. Modelling the plant uptake of Cd and Zn from soils treated with sewage sludge. *Soil Science Society of America Journal*. 50, 1245-1250.

- Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell, and Environment* 25, 239–250.
- Munns, Tester. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59, 651-681.
- Muñoz, A., Correal, E. 1998. *Bituminaria bituminosa* L. Stirton, leguminosa de interés forrajero en la Cuenca Mediterránea: I. Situación taxonómica, distribución y autoecología. Actas XXXVIII Reunión Científica de la SEEP. Soria. Ed. Universidad de Valladolid. Secretaría Publicaciones; pp: 87-91.
- Muñoz, A., Correal, E. 1999. *Bituminaria bituminosa* (L.) Stirton, leguminosa de interés forrajero en la Cuenca Mediterránea: II: Comportamiento frente a frío y selección de material tolerante. Actas XXXIX Reunión Científica de la S.E.E.P. Almería, Junio 1999; pp: 257-262.
- Muñoz, A., Ortiz-Dorda, J., Correal, E. 2000. Morphological and molecular characterization of *Bituminaria bituminosa* accessions from south-east Spain and the Canary Islands. *Cahiers Options Méditerranéennes*. Vol. 45, pp.103-107. Ed. CIHEAM.
- Muñoz, M.R., Squeo, F.A., León, M.F., Tracol, Y., Gutiérrez, J.R. 2008. Hydraulic lift in three shrub species from the Chilean coastal desert. *Journal of Arid Environments* 72, 624-632.
- Muresu, R., Polone, E., Sulas, L., Baldan, B., Tondello, A., Delogu, G., Cappuccinelli, P., Alberghini, S., Benhizia, Y., Benhizia, H., Benguedouar, A., Mori, B., Calamassi, R., Dazzo, F.B., Squartini, A. 2008. Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. *FEMS Microbiology Ecology* 63, 383–400.
- Nadwodnik, J., Lohaus, G. 2008. Subcellular concentrations of sugar alcohols and sugars in relation to phloem translocation in *Plantago major*, *Plantago maritima*, *Prunus persica*, and *Apium graveolens*. *Planta* 227, 1079–1089.
- Nambiar, E.K.S. 1977. The effects of water content of the topsoil on micronutrient availability and uptake in a siliceous sandy soil. *Plant and Soil* 46, 175-183.
- Nanjo, T., Fujita, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K. 2003. Toxicity of free proline revealed in an *Arabidopsis* T-DNA-tagged mutant deficient in proline dehydrogenase. *Plant and Cell Physiology* 44, 541-548.

- Navarro, A.F., Cegarra, J., Roig, A., Bernal, M.P. 1991. An automatic microanalysis method for the determination of organic carbon in wastes. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 22, 2137–2144.
- Nonami, H. 1998. Plant water relations and control of cell elongation at low water potentials. *Journal of Plant Research* 111, 373-382.
- Nonami, H., Boyer, J.S. 1989. Turgor and growth at low water potentials. *Plant Physiology* 89, 798-804.
- Obbard, J.P., Jones, K.C. 2001. Measurement of symbiotic nitrogen-fixation in leguminous host-plant grown in heavy metal-contaminated soils amended with sewage sludge. *Environmental Pollution* 111, 311-320.
- Oliveras, J., Gómez, C., Bas, J.M., Espadaler, X. 2008. Mechanical defence in seeds to avoid predation by a granivorous ant. *Naturwissenschaften* 95, 501-506.
- Olsen, R.A., Brown, J.C. 1980. Factors related to iron uptake by dicotyledonous and monocotyledonous plants: I. pH and reductant. *Journal of Plant Nutrition* 2, 629–645.
- Osava, M. 2005. Mercury, another threat to the Amazon. URL <http://www.tierramerica.net/2005/0806/iacentos.shtml>.
- Pajuelo, E., Rodríguez-Llorente, I.D., Dary, M., Palomares, A.J. 2008. Toxic effects of arsenic on *Sinorhizobium-Medicago sativa* symbiotic interaction. *Environmental Pollution* 154, 203–211.
- Palmer, C.M., Guerinot, M.L. 2009. Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Nature Chemical Biology* 5, 333–340.
- Pang, J., Tibbett, M., Denton, M.D., Lambers, H., Siddique, K.H.M., Bolland, M.D.A., Revell, C.K., Ryan, M.H. 2009. Variation in seedling growth of 11 perennial legumes in response to phosphorus supply. *Plant and Soil* 328: 133–143.
- Parent, B., Hachez, C., Redondo, E., Simonneau, T., Chaumont, F., Tardieu, F. 2009. Drought and abscisic acid effects on aquaporins content translate into changes in hydraulic conductivity and leaf growth rate: A trans-scale approach. *Plant Physiology* 149, 2000-2012.
- Parry, M.A.J., Flexas, J., Medrano, H. 2005. Prospects for crop production under drought: research priorities and future directions. *Annals of Applied Biology* 147, 211-226.

- Patsikka, E., Kairavuo, M., Šeršen, F., Aro, E-M., Tyystjarvi, E., 2002. Excess copper predisposes photosystem II to photoinhibition in vivo by outcompeting iron and causing decrease in leaf chlorophyll. *Plant Physiology* 129, 1359–1367.
- Pazos-Navarro, M., Dabauza, M., Correal, E., Hanson, K., Teakle, N., Real, D., Nelson, M.N. 2011. Next generation DNA sequencing technology delivers valuable genetic markers for the genomic orphan legume species, *Bituminaria bituminosa*. *BMC Genetics* 12, 104.
- Perdigó, M.T. 1979. Observación sobre La vegetación de la Falda de Malpás. *Butlletí de la Institució Catalana d'Historia Natural*, 44. Barcelona.
- Pérez de Mora, A., Burgos, P., Medejón, E., Cabrera, F., Jaeckel, P., Schloter, M. 2006. Microbial community structure and function in a soil contaminated by heavy metals: effects of plant growth and different amendments. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 327-341.
- Pinheiro, C., Chaves, M.M., Ricardo, P.C. 2001. Alterations in carbon and nitrogen metabolism induced by water deficit in the stems and leaves of *Lupinus albus* L. *Journal of Experimental Botany* 52, 1063-1070.
- Pissarek, H.P. 1973. The development of potassium deficiency symptoms in spring rape. *Zeitschrift fur Pflanzenernahrung und Bodenkunde* 136, 1-96.
- Pistelli, I., Noccioli, C., Appendino, G., Bianchi, F., Stenter, O., Ballero, M. 2003. Pterocarpanes from *Bituminaria morisiana* and *Bituminaria bituminosa*. *Phytochemistry* 64, 595-598.
- Poschenrieder, C., Bech, J., LLugany, M., Pace, A., Fenés, E., Barceló, J. 2001. Copper in plant species in a copper gradient in Catalonia (NE Spain) and their potential for phytoremediation. *Plant and Soil* 230, 247-256.
- Poschenrieder, C., Gunsé, B., Barceló, J. 1989. Influence of cadmium on water relations, stomatal resistance and abscisic acid content in expanding bean leaves. *Plant Physiology* 90, 1365-1371.
- Prieto, I., Kikvidze, Z. y Pugnaire F. 2010. Hydraulic lift: soil processes and transpiration in the Mediterranean leguminous shrub *Retama sphaerocarpa* (L.) Boiss. *Plant and Soil* 329, 447-456.
- Probiogas project. 27 de abril, 2011. <http://www.probiogas.es>.
- Racca, R., Pollino, D., Dardanelli, J., Basigalup, D., González, N., Brenzoni, E., Hein, N., Balzarini, M. 2001. Contribución de la fijación biológica de nitrógeno a la nutrición nitrogenada de la alfalfa en la región pampeana. Proyecto Pronalfa. Ediciones INTA. 56 p.

- Rademaker, J.L.W., Louws. F.J., de Bruijn, F.J. 1998. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR fingerprinting. Akkermans ADL, van Elsas JD, de Bruijn FJ, editors. Molecular microbial ecology manual, Suppl. 3. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1–26.
- Rajapaksha, R.M.C.P., Tobor-Kapłon, M.A., Bååth, E. 2004. Metal toxicity affects fungal and bacterial activities in soil differently. Applied Environmental Microbiology, 70, 2966–2973.
- Ramos, J., López, M.J., Benlloch, M. 2004. Effect of NaCl and KCl salts on the growth and solute accumulation of the halophyte *Atriplex nummularia*. Plant and Soil 259, 163-168.
- Real Decreto 1310/1990, de 29 de octubre, por el que se regula la utilización de los lodos de depuración en el sector agrario (BOE núm. 262 de 01-11-1990).
- Real, D., Verbyla, A. 2010. Maximizing genetic gains using a “plant” model in the Tederia (*Bituminaria bituminosa* var. *albomarginata* and var. *crassiuscula*) breeding program in Australia. Options Méditerranéennes. The contributions of grasslands to the conservation of Mediterranean biodiversity. Series A: Mediterranean Seminars, Number 92, 87-95.
- Reichman, S.M. 2007. The potential use of the legume-rhizobium symbiosis for the remediation of arsenic contaminated sites. Soil Biology and Biochemistry 39, 2587-2593.
- Rejili, M., Lorite, M.J., Mahdhi, M., Sanjuan, J., Ferchichi, A., Mars, M. 2009. Genetic diversity of rhizobial populations recovered from three *Lotus* species cultivated in the infra-arid Tunisian soils. Progress in Natural Science 19, 1079–1087.
- Rejili, M., Mahdhi, M., Fterich, A., Dhaoui, S., Guefrachi, I., Abdeddayem, R., Mars, M. 2012. Symbiotic nitrogen fixation of wild legumes in Tunisia: Soil fertility dynamics, field nodulation and nodules effectiveness. Agriculture, Ecosystems and Environment (en prensa).
- Reynolds-Henne, C.E., Langenegger, A., Mani, J., Schenk, N., Zumsteg, A., Feller, U. 2010. Interactions between temperature, drought and stomatal opening in legumes. Environmental and Experimental Botany 68, 37–43.
- Rezanka, K. Sigler. 2008. Biologically active compounds of semi-metals. Phytochemistry 69, 585–606.

- Rhizopoulou, S., Psaras, G.K. 2003. Development and Structure of drought-tolerant leaves of Mediterranean shrub *Capparis spinosa* L. *Annals of Botany* 92, 377-383.
- Rivas-Martínez, S. 1999. Clasificación Bioclimática de la Tierra. Phytosociological Research Center, Departamento de Biología Vegetal II (Botánica). Facultad Farmacia, Universidad Complutense. Madrid.
- Rivera, D., Obón, C. 1995. The ethnopharmacology of Madeira and Porto Santo Islands, a review. *Journal of Ethnopharmacology* 46, 73-93.
- Rivero, R.M., Ruiz, J.M., Romero, L.M. 2004. Importance of N source on heat stress tolerance due to the accumulation of proline and quaternary ammonium compounds in tomato plants. *Plant Biology* 6, 702-707.
- Rizhsky, L., Hongjian, L., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S., Mittler, R. 2004. When defense pathways collide. The response of arabidopsis to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiology* 134, 1683-1696.
- Rizhsky, L., Liang, H., Mittler, R. 2002. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiology* 130, 1143-1151.
- Rotaru, V., Sinclair, T.R. 2009. Interactive influence of phosphorus and iron on nitrogen fixation by soybean. *Environmental and Experimental Botany* 66, 94-99.
- Ryser, P., Bernardi, J., Merla, A. 2008. Determination of fresh mass after storage between moist paper towels: constraints and reliability of the method. *Journal of Experimental Botany* 59, 2461-2467.
- Saeki, K., Kunito, T., Oyaizu, H., Matsumoto, S., 2002. Relationships between bacterial tolerance levels and forms of copper and zinc in soils. *Journal of Environmental Quality* 31, 1570-1575.
- Sagardoy, R., Morales, F., López-Millán, A.-F., Abadía, A., Abadía, J. 2009. Effects of zinc toxicity on sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants grown in hydroponics. *Plant Biology*, 11, 339-350.
- Salt, D.E., Smith, R.D., Raskin, I. 1998. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49, 643-668.
- Salt, D.E., Wagner, G.J. 1993. Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots. *Journal of Biological Chemistry* 268, 12297-12302.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 1659.
- Sánchez, F.J., Manzanares, M., de Andres, E.F., Tenorio, J.L., Ayerbe, L. 1998. Turgor maintenance, osmotic adjustment and soluble sugar and proline accumulation in 49 pea cultivars in response to water stress. *Field Crops Research* 59, 225-235.
- Sánchez-Blanco, M.J., Álvarez, S., Navarro, A., Bañón, S. 2009. Changes in leaf water relations, gas exchange, growth and flowering quality in potted geranium plants irrigated with different water regimes. *Journal of Plant Physiology* 160, 1016-1025.
- Sánchez-Díaz, M., Aguirreolea, J. 1993. Relaciones hídricas. En: *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. (Azcón-Bieto, J., Talón, M., Coord.), Interamericana. McGraw Hill. p. 49-90.
- Sánchez-Rodríguez, E., Rubio-Wilhelmi, M.M., Ríos, J.J., Blasco, B., Rosales, M.Á. Melgarejo, R., Romero, L., Ruiz, J.M. 2011. Ammonia production and assimilation: its importance as a tolerance mechanism during moderate water deficit in tomato plants. *Journal of Plant Physiology* 168, 816-823.
- Sandalio, L.M., Dalurzo, H.C., Gómez, M., Romero-Puertas, M.C., del Río, L.A. 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany* 52, 2115-2126.
- Santana, L., Uriade, E., Roleira, F., Milhazes, N., Borges, F. 2004. Furocoumarins in medical chemistry. Synthesis, natural occurrence and biological activity. *Current Medicinal Chemistry* 11, 3239-3261.
- Sardans, J., Peñuelas, J., Prieto, P., Estiarte, M. 2008. Drought and warming induced changes in P and K concentration and accumulation in plant biomass and soil in a Mediterranean shrubland. *Plant and Soil* 306, 261-271.
- Schachtman, D.P., Goodger, J.Q. 2008. Chemical root to shoot signaling under drought. *Trends in Plant Science* 13,281-287.
- Schnoor, J.L. 1997. Phytoremediation. Technology Evaluation Report TE-98-01; Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center: Pittsburg, PA, USA.
- Seki, M., Umezawa, T., Urano, K., Shinozaki, K. 2007. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 10, 296-302.
- Serraj, R., Sinclair, T., Purcell, L. 1999. Symbiotic N₂ fixation response to drought. *Journal of Experimental Botany* 143-155.

- Sharma, S.S., Dietz, K.J. 2006. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of Experimental Botany* 57, 711-726.
- Shi, G., Cai, Q. 2009. Leaf plasticity in peanut (*Arachis hypogaea* L.) in response to heavy metal stress. *Environmental and Experimental Botany* 67, 112-117.
- Shiraishi, A., Matsushita, N., Hougetsu, T. 2010. Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Betaproteobacteria *Burkholderia* sp. *Systematic and Applied Microbiology* 33, 269-274.
- Shulaev, V., Cortes, D., Miller, G., Mittler, R. 2008. Metabolomics for plant stress response. *Physiologia Plantarum* 132, 199-208.
- Silva, N.E., Ferreira-Silva, S.L., de Vasconcelos-Fontenele, A., Vasconcelos-Ribeiro, R., Almeida-Viégas, R., Gomes-Silveira, J.A. 2010. Photosynthetic changes and protective mechanisms against oxidative damage subjected to isolated and combined drought and heat stresses in *Jatropha curcas* plants. *Journal of Plant Physiology* 167, 1157-1164.
- Sims, J.T., Simard, R.R., Joern, B.C. 1998. Phosphorus loss in agricultural drainage: Historical perspective and current research. *Journal of Environmental Quality* 27, 277-293.
- Singh, P.K., Tewari, R.K. 2003. Cadmium toxicity induced changes in plant water relations and oxidative metabolism of *Brassica juncea* L. plants. *Journal of Environmental Biology* 24, 107-112.
- Smith, G.S., Lauren, D.R., Cornforth, I.S., Agnew, M.P. 1982. Evaluation of putrescine as a biochemical indicator of potassium requirement of lucerne. *New Phytologist* 91, 419-428.
- Sneath, P.H.A., Sokal, R.B. 1973. Numerical taxonomy. The principles and practices of numerical classification. San Francisco: Freeman WH and Company.
- Socias, X., Correia, M.J., Chaves, M., Medrano, H. 1997. The role of abscisic acid and water relations in drought responses of subterranean clover. *Journal of Experimental Botany* 48, 1281-1288.
- Sodek, L., Moura Silva, D. 1996. Nitrate inhibits soybean nodulation and nodule activity when applied to root regions distant from the nodulation sites. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 8, 187-191.
- Soil Survey Staff Keys to Soil Taxonomy (11th ed.) USDA-Natural Resources Conservation Service, Washington (2010).

- Sposito, G., Lund, L.J., Chang, A.C. 1989. Trace metal chemistry in arid zone field soil amended with sewage sludge. I. Fractionation of Ni, Cu, Zn, Cd and Pb in solid phases. Soil Science Society of America. J. 46, 260-264.
- Steudle, E., Oren, R., Schulze, E.D. 1987. Water transport in maize roots. Plant Physiology 84, 1220–1232.
- Steuter, A.A. 1981. Water potential of aqueous Polyethylene Glycol. Plant Physiology 67, 64-67.
- Stewart, C.R. 1981. Proline accumulation: Biochemical aspects in physiology and biochemistry of drought resistance in plants, (LG Paleg, D Aspinall eds) Academic Press, Sydney, pp 243-259.
- Streeter, J.G. 2003. Effect of drought on nitrogen fixation in soybean root nodules. Plant, Cell, and Environment 26, 1199-1204.
- Suleiman, S., Schulze, J. 2010. The efficiency of nitrogen fixation of the model legume *Medicago truncata* (Jemalong A17) in low compared to *Medicago sativa*. Journal of Plant Physiology 167, 683-692.
- Suzuki, N., Mittler, R. 2006. Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. Physiologia Plantarum 126, 45–51.
- Syvetsen. J.R., Lloyd. J., McConchie, C. Kriedemann, P.E., Farquhar, G.D. 1995. On the relationship between leaf anatomy and CO₂ diffusion through the mesophyll of hypostomatous leaves. Plant, Cell, and Environment 18, 149–157.
- Szabados, L., Savouré, A. 2009. Proline: a multifunctional amino acid. Trends in Plant Science. 15, 89-96.
- Tava, A., Pecetti, L., Ricci, M., Pagnotta, M.A., Russi, L. 2007. Volatile compounds from leaves and flowers of *Bituminaria bituminosa* (L.) Stirt. (Fabaceae) from Italy. Flavour and Fragrance Journal 22, 363-370.
- Taylor, G.J., Foy, C.D. 1985. Mechanisms of aluminum tolerance in *Triticum aestivum* L. (Wheat). I. Differential pH induced by winter cultivars in nutrient solutions. American Journal of Botany 72, 695-701.
- Tazawa, M., Asai, K., Iwasaki, N. 1996. Characteristics of Hg- and Zn-sensitive water channels in the plasma membrane of Chara cells. Botanica Acta 109, 388-396.
- Teakle, N.L., Real, D. 2010. Preliminary assessment reveals tolerance to salinity and waterlogging (and these stresses combined) in Tecera (*Bituminaria bituminosa* var. *albomarginata*). Cahier Options Méditerranéennes. The contributions of grasslands to

the conservation of Mediterranean biodiversity. Series A: Mediterranean Seminars 92, 151-154.

Teng, Y., Shen, Y., Luo, Y., Sun, X., Sun, M., Fu, D., Li, Z., Christie, P. 2011. Influence of *Rhizobium meliloti* on phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by alfalfa in an aged contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials* 186, 1271–1276.

Thornton, I. 1981. Geochemical aspect of the distribution and form of heavy metals in soils. Effect of heavy metal pollution on plant. Volume 2. Metals in the Environment; Lepp, N.W.; Ed.; Applied Science Publishers Ltd.: Barking, UK, 1-33.

Tordoff, G.M., Baker, A.J.M., Willis, A.J. 2000. Current approaches to the revegetation and reclamation of metalliferous wastes. *Chemosphere* 41, 219-228.

Turner, N.C. 1981. Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. *Plant and Soil* 58, 339-366.

Tyree, M.T., Jarvis, P.G. 1982. Water in tissues and cells. *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series*, 12B, 35-77.

US EPA. 1998. An analysis of composting as an environmental remediation technology. Solid Waste Emergency Response (5306W) EPAA530-R-98-008.

US Salinity Laboratory Staff. 1954. Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. U.S. Department of Agriculture. Handbook 60. Washington DC., USA. 160.

Valladares, F., Vilagrosa, A., Peñuelas, J., Ogaya, R., Camarero, J.J., Corcuera, L., Sisó, S., Gil-Pelegrín, E. 2004. Estrés hídrico: ecofisiología y escalas de la sequía. *Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante*, 163-190. Ministerio de Medio Ambiente, EGRAF, S. A., Madrid. ISBN: 84-8014-552-8.

Valverde, A., Velázquez, E., Fernández-Santos, F., Vizcaíno, N., Rivas, R., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., Igual, J.M., Willems, A. 2005. *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 1985–1989.

Vandeleur, R.K., Mayo, G., Shelden, M.C., Gilliam, M., Kaiser, B.N., Tyerman, S.D. 2009. The role of plasma membrane intrinsic protein aquaporins in water transport through roots: diurnal and drought stress response reveal different strategies between isohydric and anisohydric cultivars of grapevine. *Plant Physiology* 149, 445-460.

- Vendruscolo, E.C.G., Schuster, I., Pileggi, M., Scapim, C.A., Molinari, H.B.C., Marur, C.J., Vieira, L.G.E. 2007. Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. *Journal of Plant Physiology* 164, 1367-1376.
- Ventura, M.R., Castañón, J.I.R., Pieltain, M.C., Flores, M.P. 2004. Nutritive value of forage shrubs: *Bituminaria bituminosa*, *Rumex lunaria*, *Acacia salicina*, *Cassia sturtii* and *Adenocarpus foliosus*. *Small Ruminant Research* 52, 13–18.
- Ventura, M.R., Méndez, P., Flores, M.P., Rodríguez, R., Castañón, J.I.R. 2004. Energy and protein content of Tедера (*Bituminaria bituminosa*). *Cahier Options Méditerranéennes*. Vol. 45. Legumes for Mediterranean forage crops, pastures and alternative uses, pp. 219-221.
- Verbruggen, N., Hermans, C. 2008. Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* 35, 753-759.
- Verbruggen, N., Hermans, C., Schat, H. 2009. Mechanism to cope with arsenic or cadmium excess in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 12, 364-372.
- Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J.R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 19, 6823–31.
- Verslues, P.E., Ober, E.S., Sharp, R.E. 1998. Root growth and oxygen relations at low water potentials. Impact of oxygen availability in polyethylene glycol solutions. *Plant Physiology* 116, 1403-1412.
- Vile, D., Garnier, E., Shipley, B., Laurent, G., Navas, M.L., Roumet, C., Lavorel, S., Díaz, S., Hodgson, J.G., Lloret, F., Midgley, G.F., Poorter, H., Rutherford, M.C., Wilson, P.J., Wright, I.J. 2005. Specific leaf area and dry matter content estimate thickness in laminar leaves. *Annals of Botany* 96, 1129-1136.
- Vincent, J.M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria, I.B.P. Handbook no 15, p. 44. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Volaire, F., Norton, T. 2006. Summer dormancy in perennial temperate grasses. *Annals of Botany* 98, 927–933.
- Walker, D.J., Bernal, M.P., Correal, E. 2007. The influence of heavy metals and mineral nutrient supply on *Bituminaria bituminosa*. *Water, Air, and Soil Pollution* 184, 335-345.

- Walker, D.J., Black, C.R, Miller, A.J. 1998. The role of cytosolic potassium and pH in the growth of barley roots. *Plant Physiology* 118, 957-964.
- Walker, D.J., Clemente, R., Bernal, M.P. 2004. Contrasting effects of compost and manure on the growth and uptake of heavy metals by *Chenopodium album* L. in a soil contaminated by pyritic mine waste. *Chemosphere* 57, 215-224.
- Walker, D.J., Clemente, R., Roig, A., Bernal, M.P. 2003. The effects of soil amendments on heavy metal bioavailability in two contaminated Mediterranean soils. *Environmental Pollution* 122, 303-312.
- Walker, D.J., Leigh, R.A., Miller, A.J. 1996. Potassium homeostasis in vacuolate plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93: 10510-10514.
- Walker, D.J., Martínez-Fernández, D., Correal, E., Romero-Espinar, P., del Río J.A. 2012. Accumulation of furanocoumarins by *Bituminaria bituminosa* in relation to plant development and environmental stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 54, 133-9.
- Walker, D.J., Moñino, I., Correal, E. 2006. Genome size in *Bituminaria bituminosa* (L.) C.H. Stirton (Fabaceae) populations: separation of "true" differences from environmental effects on DNA determination. *Environmental and Experimental Botany* 55, 258-265.
- Walker, D.J., Moñino, I., González, E., Frayssinet, N., Correal, E. 2005. Determination of ploidy and nuclear DNA content in populations of *Atriplex halimus* (Chenopodiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 147, 441-448.
- Walker, D.J., Romero, P., Aouissat, M., Correal, E. 2010. Cold tolerance, water relations and accumulation of osmolytes in *Bituminaria bituminosa*. *Biologia Plantarum* 54, 293-298.
- Walker, J.M., Southworth, R.M., Rubin, A.B. 1997. US Environmental protection agency regulation and other stake holders activities affecting agricultural use of by-products and wastes. In *Agricultural uses of by-products and wastes*; Recheigl, J.E.; MacKinnon, H.C.; Eds.; ACS: Washington, DC, 28-47.
- Walsh, L.M., Sumner, M.E., Keeley, D.R. 1977. Occurrence and distribution of arsenic in soils and plants. *Environmental Health Perspectives* 19, 67-71.
- Wang, L.X., Yang, D.C.H., Lu, Y.Y., Takagi, Y., Taira, K., Li, T., Zhang, L.H. 1995. *Drug Design and Discovery* 13, 109.
- Wang, X.F., Zhou, Q.X. 2005. Ecotoxicological effects of cadmium on three ornamental plants. *Chemosphere* 60, 16-21.

- Watanabe, F.S., Olsen, S.R. 1965. Test of an ascorbic acid method for determining phosphorus in water and NaHCO₃ extracts from soil. Soil Science Society of America Proceedings 29, 677- 678.
- Wenzel, W.W., Adriano, C.D., Salt, D., Smith, R. 1999. Phytoremediation: a plant-microbe-based remediation system. En: Bioremediation of Contaminated Soils; ASA Monolog. Nº. 37; Adriano, D.C., Bollag, J.M., Frankenber, W.T., Sims, R.C. Eds.: American Society of Agronomy: Madison, W.I., 457-508.
- West, C.P., Mallarino, A.P. 1996. Nitrogen transfer from legumes to grasses. En: Proceeding of Symposium "Nutrient cycling in forage systems". Ed. Joost, R.E: and Roberts, C.A. Columbia, Missouri. p. 167-176. PPI-FAR.
- White, M.C., Decker, A.M., Chaney, R.L. 1981. Metal complexation in xylem fluid. I. Chemical composition of tomato and soybean stem exudate. Plant Physiology 67, 292–300.
- Whitmore, A.P., Whalley, W.R. 2009. Physical effects of soil drying on roots and crop growth. Journal of Experimental Botany 60, 2845-2857.
- Wolfe-Simon, F., Switzer Blum, J., Kulp, T.R., Gordon, G.W., Hoeft, S.E., Pett-Ridge, J., Stolz, J.F., Webb, S.M., Weber, P.K., Davies, P.C.W, Anbar, A.D., Oremland, R.S. 2011. A bacterium that can grow by using arsenic instead of phosphorus. *Science*. 332, 1149.
- Woolson, E.A. 1972. Effects of fertiliser materials and combinations on the phytotoxicity, availability and content of arsenic in corn (maize). Journal of the Science of Food and Agriculture 23, 1477–1481.
- Woolson, E.A., Axley, J.H., Kearney, P.C. 1971. Correlation between available soil arsenic, estimated by six methods and response to corn (*Zea mays* L.). Soil Science Society of America Proceedings 35, 101-105.
- Xu, Q., Pan, Y., Yi, L.T., Li, Y.C., Mo, S.F., Jiang, F.X., Qiao, C.F., Xu, H.X., Lu, X.B., Kong, L.D., Kung, H.F. 2008. Antidepressant-like effects of psoralen isolated from the seeds of *Psoralea corylifolia* in the mouse forced swimming test. Biological and Pharmaceutical Bulletin 31, 1109-14.
- Yates, R.J., Howieson, J.G., Reeve, W.G., Nandasena, K.G., Law, I.J., Braü, L., Ardley, J.K., Nistelberger, H., Real, D., O'Hara, G.W., 2007. *Lotononis angolensis* forms nitrogen fixing, lupinoid nodules with phylogenetically unique, fast-growing, pink-pigmented bacteria, which do not nodulate *L. bainesii* or *L. listii*. Soil Biology and Biochemistry 39, 1680-1688.

- Yates, R.J., Real, D., Revel, C., Hill, Y., Howieson, J.G. 2009. Developing inoculant quality root-nodule bacteria for *Bituminaria bituminosa*: a perennial pasture legume with potential for dryland agriculture. In 'The 16th International Congress on nitrogen fixation'. Montana, USA.
- Yates, R.J., Real, D., Revell, C., Howieson, J.G. 2009. Developing inoculant quality root-nodule bacteria for *Bituminaria bituminosa*: a perennial pasture legume with potential for dryland agriculture. En: The 16th International Congress on Nitrogen Fixation, Montana (USA).
- Yousfi, S., Serret, M.D., Voltas, J., Araus, J.L. 2010. Effect of salinity and water stress during the reproductive stage on growth, ion concentrations, $\Delta^{13}C$, and $\delta^{15}N$ of durum wheat and related amphiploids. *Journal of Experimental Botany* 61, 3529–3542.
- Yruela, I. 2009. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Functional Plant Biology* 36, 409–430.
- Zhang, J.Y., Broeckling, C.D., Blancaflor, E.B., Sledge, M.K., Sumner, L.W., Wang, Z.Y. 2005. Overexpression of WXP1, a putative *Medicago truncatula* AP2 domain-containing transcription factor gene, increases cuticular wax accumulation and enhances drought tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa*). *Plant Journal* 42, 689-707.
- Zhao, F.J., Ma, J.F., Meharg, A.A., McGrath, S.P. 2009. Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytologist* 181, 777–794.
- Zobel, A.M., Wang, J., March, R.E., Brown, S.A. 1991. *Journal of Chemical Ecology* 17, 1859-1868.
- Zohary, M. 1972. *Flora Palestina II: Text*. Jerusalém: The Israel Academy of Sciences and Humanities. 489.

<http://herbarivirtual.uib.es/cas-med/especie/4179.html>

<http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=BIBI4>

<http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=BIBI4> 15-06-2011

<http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/ge19/19a.gif>

<http://www.forest.ula.ve/~rubenhg/nutricionmineral/>

<http://www.globimed.net/ficheros/libros/Ecologia/Cap06%20-%20Estres%20hidrico%20ecofisiologia%20y%20escalas%20de%20la%20sequia.pdf>

<http://www.soils.wisc.edu/~barak/soilscience326/macronut.htm>

<http://www.uky.edu/~dhild/biochem/24/lect24.html>

http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/GBASE/new_species/tedera/bitbit.htm

<http://aob.oxfordjournals.org/cgi/reprint/mci264v1>

BIBLIOGRAFÍA

14. ANEXOS

Tabla A.1.- Análisis de efectos intersujetos de los parámetros del contenido de agua del suelo utilizado en el ensayo en maceta de sequía. Población corresponde a las cuatro poblaciones, edad a los días 9 y 16 desde el comienzo de la sequía, y tratamiento a si las plantas fueron regadas (controles) o impuestas a déficit hídrico. El análisis corresponde a los datos presentados en Tabla 4.3.1.

	%WHC		gH ₂ O g ⁻¹ PS Suelo	
	F	Sig.	F	Sig.
POBLACIÓN	14,91	0,00	16,18	0,00
EDAD	1191,37	0,00	1173,60	0,00
TRATAMIENTO	804,41	0,00	776,95	0,00
POBLACIÓN * EDAD	30,55	0,00	32,37	0,00
POBLACIÓN * TRATAMIENTO	1,28	0,29	1,19	0,32
EDAD * TRATAMIENTO	12,96	0,00	43,07	0,00
POBLACIÓN * EDAD * TRATAMIENTO	5,69	0,00	5,83	0,00

Tabla A.2.- Análisis de efectos intersujetos del %MS de las plantas del ensayo en maceta. POBLACIÓN corresponde a las cuatro poblaciones, edad a los días 9 y 16 desde el comienzo de la sequía, y tratamiento a si las plantas fueron regadas (controles) o impuestas a déficit hídrico. El análisis corresponde a los datos presentados en Tabla 4.3.2.

	%MS	
	F	Sig.
POBLACIÓN	32,58	0,00
EDAD	195,90	0,00
TRATAMIENTO	102,52	0,00
POBLACIÓN * EDAD	3,27	0,03
POBLACIÓN * TRATAMIENTO	2,30	0,09
EDAD * TRATAMIENTO	116,26	0,00
POBLACIÓN * EDAD * TRATAMIENTO	2,97	0,04

Tabla A.3.- Biomasa de las plantas del ensayo en maceta y TCR. La tabla corresponde a los datos presentados en Figura 4.3.2.

Población	Día	Tratamiento	g PS Planta ⁻¹	TCR
<i>Famara</i>	9	Control	1,18 ± 0,06	
	9	Sequía	1,31 ± 0,10	
	16	Control	2,06 ± 0,13 a	0,108
	16	Sequía	1,62 ± 0,16 b	0,034
<i>Llano del Beal</i>	9	Control	0,84 ± 0,11	
	9	Sequía	0,80 ± 0,07	
	16	Control	1,39 ± 0,06	0,095
	16	Sequía	1,19 ± 0,08	0,070
<i>Boca de Tauce</i>	9	Control	1,03 ± 0,06	
	9	Sequía	1,11 ± 0,13	
	16	Control	1,41 ± 0,11	0,052
	16	Sequía	1,35 ± 0,16	0,030
<i>La Perdiz</i>	9	Control	0,55 ± 0,02	
	9	Sequía	0,64 ± 0,02	
	16	Control	0,77 ± 0,04	0,055
	16	Sequía	0,94 ± 0,06	0,065
Sig.			0,001	

Tabla A.4.- Análisis de efectos intersujetos de los valores de AFE y concentraciones de azúcares y almidón para los dos días de análisis del ensayo en maceta. El análisis corresponde a los datos presentados en Tabla 4.3.4.

	AFE		Azúcar		Almidón		% de azúcar	
	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.
POBLACIÓN	101,33	0,00	0,01	0,00	0,00	0,03	2,46	0,07
EDAD	0,17	0,68	0,02	0,00	0,03	0,00	26,28	0,00
TRATAMIENTO	73,37	0,00	0,01	0,01	0,00	0,47	0,74	0,39
POBLACIÓN * EDAD	0,40	0,75	0,00	0,05	0,00	0,66	0,34	0,80
POBLACIÓN * TRATAMIENTO	5,60	0,00	0,00	0,01	0,00	0,64	0,54	0,66
EDAD * TRATAMIENTO	12,45	0,00	0,00	0,05	0,00	0,05	0,05	0,83
POBLACIÓN * EDAD * TRATAMIENTO	4,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,98	0,62	0,61

Tabla A.5.- Análisis de efectos intersujetos de la contribución al % de potencial osmótico por diferentes compuestos. El análisis corresponde a los datos presentados en Tabla 4.3.6.b..

	Azucar	Prolina	NH4	AAs	Ca	K	Mg	Na	P
POBLACIÓN	0,000	0,000	0,005	0,645	0,047	0,036	0,000	0,000	0,011
EDAD	0,004	0,000	0,088	0,843	0,110	0,020	0,145	0,000	0,020
TRATAMIENTO	0,158	0,000	0,288	0,003	0,167	0,055	0,114	0,010	0,809
POBLACIÓN * EDAD	0,027	0,000	0,486	0,961	0,819	0,022	0,462	0,000	0,115
POBLACIÓN * TRATAMIENTO	0,000	0,001	0,711	0,257	0,334	0,036	0,069	0,044	0,445
EDAD * TRATAMIENTO	0,070	0,000	0,935	0,332	0,752	0,407	0,949	0,254	0,809
POBLACIÓN * EDAD * TRATAMIENTO	0,008	0,000	0,649	0,973	0,104	0,108	0,037	0,425	0,088

Tabla A.6.- Análisis de efectos intersujetos de la concentración y cantidad de N, concentración de aminoácidos, y del contenido de prolina (Pro) en la parte aérea de las plantas del ensayo en maceta. El análisis corresponde a los datos presentados en Tabla 4.3.5.

	%N		[N]*PS		NH ₄ ⁺		AAs		Pro	
	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.
POBLACIÓN	95,12	0,00	11,52	0,00	9,24	0,00	3,18	0,03	7,4	0,00
EDAD	60,89	0,00	23,13	0,00	7,62	0,01	2,95	0,09	254	0,00
TRATAMIENTO	0,00	1,00	0,34	0,56	6,60	0,01	3,99	0,05	246	0,00
POBLACIÓN * EDAD	2,33	0,08	0,27	0,85	1,22	0,31	1,16	0,33	4,7	0,01
POBLACIÓN * TRATAMIENTO	7,51	0,00	0,44	0,72	0,01	1,00	0,54	0,65	5,0	0,00
EDAD * TRATAMIENTO	7,77	0,01	7,34	0,01	0,00	0,97	1,42	0,24	121	0,00
POBLACIÓN * EDAD * TRATAMIENTO	2,95	0,04	0,26	0,86	0,53	0,66	0,46	0,71	6,1	0,00

Tabla A.7.- Análisis de efectos intersujetos de los parámetros de las relaciones hídricas. El análisis corresponde a los datos presentados en Tabla 4.3.6.a.

	%CRA		Ψ_w		Ψ_s		Ψ_p		OA	
	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.
POBLACIÓN	15,62	0,00	24,56	0,00	4,77	0,00	18,23	0,00	8,75	0,00
EDAD	193,81	0,00	87,10	0,00	245,90	0,00	22,67	0,00	175,08	0,00
TRATAMIENTO	305,17	0,00	50,58	0,00	156,99	0,00	16,19	0,00	159,97	0,00
POBLACIÓN * EDAD	2,19	0,10	8,42	0,00	3,76	0,01	9,70	0,00	7,04	0,00
POBLACIÓN * TRATAMIENTO	13,36	0,00	2,60	0,06	4,90	0,00	11,37	0,00	8,06	0,00
EDAD * TRATAMIENTO	191,16	0,00	63,56	0,00	99,58	0,00	4,51	0,04	121,98	0,00
POBLACIÓN * EDAD * TRATAMIENTO	4,38	0,01	0,59	0,62	4,07	0,01	2,70	0,05	8,14	0,00

Tabla A.8.- Análisis de efectos intersujetos de los cationes presentes en las hojas de *B. bituminosa* durante el ensayo de sequía en maceta. El análisis corresponde a los datos presentados en Tabla 4.3.7.

	Ca		K		Mg		Na		P	
	F	Sig.								
POBLACIÓN	33,82	0,00	30,54	0,00	94,13	0,00	18,97	0,00	46,23	0,00
EDAD	0,70	0,40	1,78	0,19	3,40	0,07	38,39	0,00	5,08	0,03
TRATAMIENTO	2,66	0,11	0,03	0,86	0,05	0,83	0,45	0,50	12,76	0,00
POBLACIÓN * EDAD	15,08	0,00	10,56	0,00	16,04	0,00	14,35	0,00	27,00	0,00
POBLACIÓN * TRATAMIENTO	2,08	0,11	4,44	0,01	1,13	0,34	5,21	0,00	3,13	0,03
EDAD * TRATAMIENTO	0,22	0,64	1,29	0,26	1,19	0,28	3,37	0,07	0,59	0,44
POBLACIÓN * EDAD * TRATAMIENTO	6,57	0,00	7,05	0,00	3,09	0,03	2,79	0,05	7,50	0,00

Tabla A.9.- Contenido de cationes expresado en mmol l⁻¹H₂O tisular, en el ensayo de sequía en maceta, con su correspondiente análisis factorial.

POBLACIÓN	Día	Tratamiento	Ca	K	Mg	Na	P					
<i>Famara</i>	9	Control	82 ± 18	113 ± 21	31 ± 7	2,4 ± 0,1	16 ± 3					
	9	Sequía	86 ± 6	114 ± 10	30 ± 2	2,3 ± 0,3	17 ± 1					
	16	Control	78 ± 3	86 ± 4	28 ± 1	2,9 ± 0,1	13 ± 0					
	16	Sequía	142 ± 8	150 ± 5	48 ± 3	4,6 ± 0,3	25 ± 1					
<i>Llano del Beal</i>	9	Control	58 ± 4	74 ± 6	26 ± 2	2,6 ± 0,4	12 ± 0					
	9	Sequía	68 ± 5	71 ± 7	32 ± 3	4,7 ± 0,5	14 ± 1					
	16	Control	73 ± 2	107 ± 6	34 ± 1	1,2 ± 0,2	17 ± 1					
	16	Sequía	124 ± 6	146 ± 15	60 ± 4	2,5 ± 0,6	31 ± 2					
<i>Boca deTauce</i>	9	Control	69 ± 4	96 ± 3	26 ± 2	2,4 ± 0,2	14 ± 1					
	9	Sequía	62 ± 2	82 ± 8	24 ± 1	1,4 ± 0,7	13 ± 1					
	16	Control	84 ± 3	100 ± 5	34 ± 2	2,2 ± 0,3	15 ± 1					
	16	Sequía	143 ± 6	193 ± 13	51 ± 3	2,5 ± 1,3	30 ± 3					
<i>La Perdiz</i>	9	Control	69 ± 5	77 ± 7	43 ± 2	5,1 ± 0,2	17 ± 1					
	9	Sequía	61 ± 4	73 ± 5	41 ± 1	4,5 ± 0,2	16 ± 0					
	16	Control	63 ± 5	67 ± 13	43 ± 1	4,1 ± 0,4	15 ± 1					
	16	Sequía	115 ± 7	140 ± 11	77 ± 2	4,5 ± 0,8	27 ± 2					
Sig.			0,001	0,001	0,001	0,001	0,001					
			F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.		
POBLACIÓN			7,48	0,00	7,7	0,00	33,92	0,00	16,11	0,00	0,64	0,59
EDAD			101,47	0,00	54,52	0,00	119,27	0,00	0,15	0,70	78,24	0,00
TRATAMIENTO			73,24	0,00	40,61	0,00	75,09	0,00	4,03	0,05	82,35	0,00
POBLACIÓN * EDAD			2,75	0,05	6,37	0,00	3,51	0,02	7,10	0,00	6,92	0,00
POBLACIÓN * TRATAMIENTO			0,61	0,61	0,88	0,46	2,32	0,08	3,37	0,02	0,53	0,66
EDAD * TRATAMIENTO			73,49	0,00	53,27	0,00	77,62	0,00	2,45	0,12	69,72	0,00
POBLACIÓN * EDAD * TRATAMIENTO			0,73	0,54	1,89	0,14	2,12	0,11	1,11	0,35	0,37	0,78

Tabla A.10.- Análisis de efectos intersujetos de FCs, en el ensayo de sequía en maceta. El análisis corresponde a los datos presentados en Tabla 4.3.8.

	Psoraleno		Angelicina		%Psoraleno		%Angelicina	
	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.
POBLACIÓN	19,71	0,00	8,88	0,00	26,4	0,000	26,35	0,00
TRATAMIENTO	2,16	0,15	0,29	0,59	3,09	0,091	3,09	0,09
POBLACIÓN*TRATAMIENTO	0,154	0,96	0,56	0,64	0,324	0,808	0,32	0,81

Tabla A.11.- Análisis factorial de parámetros referentes a biomasa del ensayo de sequía en parcela. El análisis corresponde a los datos presentados en Tabla 5.3.2.

	PF planta ⁻¹ (g)		PS planta ⁻¹		RGR g g ⁻¹ PS Día ⁻¹		MS %	
	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.
POBLACIÓN	1,15	0,35	2,31	0,10	1,86	0,16	7,68	0,00
TRATAMIENTO	27,93	0,00	9,81	0,00	11,96	0,00	14,99	0,00
POBLACIÓN*TRATAMIENTO	0,29	0,82	0,09	0,96	0,66	0,58	0,72	0,55

Tabla A.12.- Análisis de efectos intersujetos del AFE de las plantas del ensayo en parcela a los 23 y 34 días desde el comienzo de los tratamientos. El análisis corresponde a los datos presentados en Tabla 5.3.3.

	AFE	
	F	Sig.
POBLACIÓN	44,19	0,00
EDAD	16,75	0,00
TRATAMIENTO	80,14	0,00
POBLACIÓN * EDAD	0,41	0,75
POBLACIÓN * TRATAMIENTO	7,66	0,00
EDAD * TRATAMIENTO	23,51	0,00
POBLACIÓN * EDAD * TRATAMIENTO	1,14	0,34

Tabla A.13.- Análisis de efectos intersujetos de los azúcares y almidón de las plantas del ensayo en parcela al final del ensayo. El análisis corresponde a los datos presentados en Tabla 5.3.4.

	Azúcar		Almidón		%Azúcar	
	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.
POBLACIÓN	11,87	0,00	5,32	0,01	8,32	0,00
TRATAMIENTO	0,67	0,42	19,45	0,00	9,27	0,01
POBLACIÓN*TRATAMIENTO	0,15	0,92	2,29	0,12	1,16	0,35

Tabla A.14.- Análisis de efectos intersujetos de los compuestos nitrogenados de las plantas del ensayo de sequía en parcela. El análisis corresponde a los datos presentados en Tabla 5.3.5.

	%N		[N]*PS		NH ₄ ⁺		AAs-Pro		Pro	
	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.
POBLACIÓN	64,05	0,00	1,18	0,34	4,98	0,01	2,97	0,06	0,75	0,53
TRATAMIENTO	2,06	0,17	8,53	0,01	23,88	0,00	12,95	0,00	8,54	0,01
POBLACIÓN*TRATAMIENTO	6,82	0,00	0,20	0,89	1,08	0,38	0,93	0,44	0,92	0,45

Tabla A.15.- Análisis de efectos intersujetos de los parámetros que expresan el estado hídrico. El análisis corresponde a los datos presentados en Tabla 5.3.6.

	%CRA		Ψ _w		Ψ _s		Ψ _p		AO	
	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.
POBLACIÓN	44,19	0,00	10,18	0,00	2,06	0,12	8,47	0,00	3,01	0,06
EDAD	16,75	0,00	1,06	0,31	14,94	0,00	5,98	0,02	6,36	0,02
TRATAMIENTO	80,14	0,00	31,81	0,00	304,60	0,00	0,06	0,80		
POBLACIÓN * EDAD	0,40	0,74	0,61	0,61	0,28	0,84	0,78	0,51	0,23	0,87
POBLACIÓN * TRATAMIENTO	7,66	0,00	3,37	0,03	2,85	0,05	2,84	0,05		
EDAD * TRATAMIENTO	23,50	0,00	0,55	0,46	23,66	0,00	1,81	0,19		
POBLACIÓN * EDAD * TRATAMIENTO	1,14	0,35	0,91	0,45	0,26	0,85	0,47	0,71		

Tabla A.16.- Análisis de efectos intersujetos de los cationes principales de las plantas del ensayo de sequía en parcela. El análisis corresponde a los datos presentados en Tabla 5.3.7.

	Ca		K		Mg		Na		P	
	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.
POBLACIÓN	2,26	0,12	10,30	0,00	31,63	0,00	0,62	0,61	2,45	0,10
TRATAMIENTO	5,19	0,04	65,71	0,00	2,28	0,15	8,10	0,01	103,08	0,00
POBLACIÓN*TRATAMIENTO	1,39	0,28	1,56	0,24	3,77	0,03	0,43	0,73	0,67	0,58

Tabla A.17.- Análisis de efectos intersujetos de distintos parámetros fisiológicos de las plantas del ensayo en sequía en hidropónico llevado a cabo en el CEBAS-CSIC. El análisis corresponde a los datos presentados en Tabla 6.4.1.a.

CEBAS Parte aérea	PF		PS		R:PA		NH ₄ ⁺		AAs		Pro	
	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.
POBLACIÓN	0,89	0,37	21,20	0,00	129,61	0,00	50,85	0,00	8,31	0,01	16,05	0,00
TRATAMIENTO	0,74	0,50	2,28	0,15	18,48	0,00	6,95	0,01	0,38	0,69	20,12	0,00
POBLACIÓN*TRATAMIENTO	0,46	0,64	0,34	0,72	0,00	1,00	3,34	0,07	0,95	0,42	3,11	0,08
CEBAS Raíz	PF		PS		L _o		NH ₄ ⁺		AAs		Pro	
	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.
POBLACIÓN	6,31	0,03	0,08	0,78	1,65	0,20	97,51	0,00	18,83	0,00	25,30	0,00
TRATAMIENTO	3,13	0,08	12,64	0,00	51,55	0,00	19,60	0,00	0,59	0,57	8,33	0,01
POBLACIÓN*TRATAMIENTO	1,55	0,25	1,65	0,23	0,76	0,47	3,03	0,09	4,87	0,03	1,88	0,20

Tabla A.18.- Análisis de efectos intersujetos del PF, PS y carbohidratos de las plantas del ensayo de sequía en hidropónico en el IMIDA. El análisis corresponde a los datos presentados en Tabla 6.4.1.b.

IMIDA Parte Aérea	PF	PS	Azúcar	Almidón
	F Sig.	F Sig.	F Sig.	F Sig.
POBLACIÓN	16,99 0,00	21,63 0,00	15,62 0,00	19,68 0,00
TRATAMIENTO	10,31 0,00	2,14 0,14	5,20 0,01	1,67 0,21
POBLACIÓN*TRATAMIENTO	1,36 0,27	1,32 0,28	3,17 0,06	0,36 0,70

IMIDA Raíz	PF	PS	Azúcar	Almidón
	F Sig.	F Sig.	F Sig.	F Sig.
POBLACIÓN	1,02 0,32	1,40 0,25	14,84 0,00	0,23 0,63
TRATAMIENTO	3,84 0,03	0,31 0,74	13,61 0,00	3,12 0,06
POBLACIÓN*TRATAMIENTO	1,45 0,25	0,56 0,58	0,28 0,76	0,19 0,83

Tabla A.19.- Análisis de efectos intersujetos de los compuestos nitrogenados de las plantas crecidas en el ensayo de sequía en hidropónico en el IMIDA. El análisis corresponde a los datos presentados en Tabla 6.4.1.c.

IMIDA Parte Aérea	N	NH ₄ ⁺	AAs	Pro
	F Sig,	F Sig,	F Sig,	F Sig,
POBLACIÓN	162,31 0,00	48,83 0,00	46,35 0,00	11,36 0,00
TRATAMIENTO	1,20 0,32	17,50 0,00	0,295 0,74	52,07 0,00
POBLACIÓN*TRATAMIENTO	0,26 0,77	2,07 0,14	2,41 0,10	4,17 0,03

IMIDA Raíz	N	NH ₄ ⁺	AAs	Pro
	F Sig,	F Sig,	F Sig,	F Sig,
POBLACIÓN	13,85 0,00	10,27 0,00	4,33 0,04	0,11 0,74
TRATAMIENTO	7,08 0,00	15,71 0,00	2,32 0,11	19,09 0,00
POBLACIÓN*TRATAMIENTO	4,20 0,03	2,61 0,09	3,10 0,06	3,93 0,03

Tabla A.20.- Análisis de efectos intersujetos de las relaciones hídricas de las plantas de hidropónico en el IMIDA. El análisis corresponde a los datos presentados en Tabla 6.4.4.

IMIDA	CRA	Ψ_w	Ψ_s	Ψ_p
	F Sig.	F Sig.	F Sig.	F Sig.
POBLACIÓN	0,60 0,45	0,19 0,67	1,02 0,32	1,68 0,21
TRATAMIENTO	5,09 0,01	1,50 0,24	22,93 0,00	23,48 0,00
POBLACIÓN*TRATAMIENTO	0,09 0,92	0,50 0,61	2,46 0,10	2,50 0,10

Tabla A.21.- el crecimiento de la plantas de *B. bituminosa* sembradas y trasplantadas a macetas en el ensayo de MPs. Datos de Figura 8.3.1.

Suelo	Tratamiento	gPS 10plantas ⁻¹	Suelo	Tratamiento	gPS 10plantas ⁻¹
Sembradas			Trasplantadas		
LA	Control	0,087 ±0,038	LA	Control	0,229 ±0,014
LB	Control	0,071 ±0,010	LB	Control	0,141 ±0,003
	Cal	0,094 ±0,009		Cal	0,152 ±0,016
	Compost	0,090 ±0,007		Compost	0,163 ±0,024
	Purín	0,085 ±0,005		Purín	0,181 ±0,015
SG	Control	0,090 ±0,006	SG	Control	0,192 ±0,050
	Compost	0,127 ±0,005		Compost	0,164 ±0,012
	Fertilizante	0,069 ±0,018		Fertilizante	0,156 ±0,014
Sig.		0,330	Sig.		0,201

Tabla A.22.- el crecimiento de la plantas de *A. halimus* sembradas y trasplantadas a macetas en el ensayo de MPs. Datos de Figura 8.3.1.

Suelo	Tratamiento	gPS 10plantas ⁻¹	Suelo	Tratamiento	gPS 10plantas ⁻¹
Sembradas			Trasplantadas		
Alberca	Control	0,170 ±0,030 a	Alberca	Control	0,442 ±0,052 a
LB	Control	0,022 ±0,017 ab	LB	Control	0,173 ±0,023 c
	Cal	0,003 ±0,003 b		Cal	0,198 ±0,034 bc
	Compost	0,140 ±0,077 ab		Compost	0,389 ±0,056 ab
	Purín	0,027 ±0,017 ab		Purín	0,223 ±0,034 bc
SG	Control	0,040 ±0,010 ab	SG	Control	0,281 ±0,041 abc
	Compost	0,075 ±0,018 ab		Compost	0,405 ±0,064 ab
	Fertilizante	0,086 ±0,027 ab		Fertilizante	0,331 ±0,054 abc
Sig.		0,010	Sig.		0,001

Tabla A.23.- Análisis de efectos intersujetos de las plantas de *B. bituminosa* sembradas (arriba) y trasplantadas (abajo) del ensayo de MPs en maceta.

	BIOMASA		PS PLANTA ⁻¹		gPS 10plantas ⁻¹		N		Germinación		Supervivencia	
	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.
SUELO	6,99	0,00	1,567	0,224	1,564	0,225	1,64	0,21	12,18	0,00	0,45	0,64
TREATMEN	1,94	0,13	1,846	0,144	1,852	0,143	2,14	0,10	0,63	0,65	0,96	0,45
SUELO * TREATMEN	0,32	0,57	0,295	0,591	0,286	0,596	1,71	0,20	0,21	0,65	2,09	0,16
SUELO	1,33	0,28	3,137	0,057	3,122	0,058	21,98	0,00			0,03	0,98
TREATMEN	1,52	0,22	0,469	0,758	0,464	0,761	2,50	0,062			0,45	0,77
SUELO * TREATMEN	0,14	0,71	1,208	0,280	1,192	0,283	0,36	0,552			0,75	0,39

Tabla A.24.- Análisis de efectos intersujetos de las plantas de *A. halimus* sembradas (arriba) y trasplantadas (abajo) del ensayo de MPs en maceta.

	BIOMASA		PS PLANTA ⁻¹		gPS 10plantas ⁻¹		N		Germinación		Supervivencia	
	F	Sig,	F	Sig,	F	Sig,	F	Sig,	F	Sig,	F	Sig,
SUELO	8,99	0,00	6,224	0,005	6,238	0,005	4,84	0,01	58,58	0,00	0,26	0,77
TRATAMIENTO	0,76	0,56	2,547	0,058	2,552	0,058	3,17	0,03	1,02	0,41	1,91	0,14
SUELO * TRATAMIENTO	0,98	0,33	1,647	0,209	1,642	0,209	0,32	0,57	1,43	0,24	0,04	0,84
SUELO	7,86	0,00	7,998	0,002	7,991	0,002	5,36	0,01			4,11	0,03
TRATAMIENTO	3,20	0,03	3,975	0,010	3,964	0,010	0,50	0,736			1,11	0,37
SUELO * TRATAMIENTO	1,12	0,30	0,978	0,330	0,989	0,327	0,16	0,70			0,00	1,00

Tabla A. 25.- PF y PS de la biomasa de las plantas de *B. bituminosa* crecidas en el ensayo en hidropónico con Zn.

Población	TRATAMIENTO	PF PA	PS PA	PF Raíz	PS Raíz
<i>Llano del Beal</i>	Control	3,12 ± 0,31	0,33 ± 0,04	1,66 ± 0,17	0,08 ± 0,01
	12	2,45 ± 0,39	0,24 ± 0,05	1,52 ± 0,26	0,12 ± 0,05
	61	2,30 ± 0,41	0,30 ± 0,05	1,52 ± 0,28	0,11 ± 0,02
<i>Mijas</i>	Control	4,75 ± 0,57	0,52 ± 0,06	3,20 ± 0,45	0,16 ± 0,02
	12	3,88 ± 0,52	0,46 ± 0,06	2,58 ± 0,41	0,15 ± 0,02
	61	1,89 ± 0,29	0,26 ± 0,04	1,39 ± 0,23	0,11 ± 0,02
	Sig.	0,001	0,001	0,001	0,24
		F Sig.	F Sig.	F Sig.	F Sig.
	POBLACIÓN	6,435 0,02	9,459 0,00	10,15 0,00	3,28 0,08
	TRATAMEN	9,349 0,00	4,028 0,03	4,81 0,02	0,58 0,56
	POBLACIÓN * TRATAMIEN	3,458 0,04	3,956 0,03	3,68 0,04	1,37 0,27

Tesis Doctoral
Respuestas Fisiológicas de *Bituminaria bituminosa*
frente a sequía y metales pesados.

Domingo Martínez-Fernández
Director: Dr. David James Walker
Tutor: Dr. Rafael Domingo Miguel

Tesis Realizada en el Instituto Murciano de
Investigación y Desarrollo
Agrario y Alimentario (IMIDA)
Dpto. de Recursos Naturales
IMIDA - Estación Sericícola
Calle Mayor s/n
30150 La Alberca (Murcia)



Universidad
Politécnica
de Cartagena

Instituto Murciano de
Investigación y Desarrollo
Agrario y Alimentario

