

ESTRÉS HÍDRICO EN LEGUMINOSAS

Puesta a punto de un método para
imponer distintos niveles de estrés
hídrico en placas de Petri

Unai Pérez Igúzquiza

Grado en Ingeniería Agroalimentaria y del Medio Rural mención
Hortofruticultura, jardinería y paisajismo

Gradua Nekazaritzako Elikagaien eta Landa- Ingeniaritzan, baratzezaintza,
frutagintza, lorezaintza eta paisaiagintzan espezializazioa



Junio 2014



RESUMEN

Este trabajo final de grado pretende en primer lugar poner a punto un método para obtener plantas de *Medicago truncatula* expuestas a distintos niveles de estrés hídrico en placas de Petri creciendo bajo condiciones controladas. La puesta a punto de este método permitirá su posterior uso en futuras investigaciones llevadas al cabo en el ámbito del estrés hídrico en leguminosas y también en otras especies vegetales. En segundo lugar, este trabajo pretende realizar un análisis de algunas respuestas básicas al estrés hídrico como forma de verificación del método puesto a punto.

Se verificó el estado hídrico de las plantas de *Medicago truncatula* comprobando que mostraban diferentes potenciales hídricos entre los distintos tratamientos correspondiendo a un nivel de sequía leve y otro moderada. También se observaron respuestas a la sequía impuesta como menor biomasa, concentración de solutos y metabolismo reducido. De esta forma concluimos que el método puesto a punto era válido para imponer este tipo de estrés bajo condiciones controladas.

This final degree thesis aims to develop a method to expose *Medicago truncatula* plants to different levels of water stress growing under controlled conditions in Petri dishes. The development of this method will allow further use in future investigations carried out in the field of water stress in legumes and other species. Secondly, this study intended to analyse some basic water stress responses as a form of verification of the method developed.

Water status of the plant *Medicago truncatula* was determined as water potential (MPa) in the different treatments corresponding to a mild and moderate drought. Additionally, a reduction of biomass production and changes in the solute concentration was observed as a consequence of water stress and reduced metabolism were observed. In this way, the present method was validated to impose different levels of stress under controlled conditions.

PALABRAS CLAVE

Medicago truncatula, sequía, potencial hídrico, biomasa, condiciones controladas

Medicago truncatula, drought, water potential, biomass, controlled conditions

ÍNDICE

1- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1- Sequía y relaciones hídricas.....	1
1.2- Germinación.....	4
1.3- Antecedentes.....	5
2-OBJETIVOS.....	7
3- MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
3.1- Material vegetal utilizado.....	9
3.2- Diseño experimental.....	9
3.2.1- Germinación de las semillas.....	9
3.2.2- Medios de cultivo utilizados.....	10
3.2.3- Preparación de las placas.....	11
3.2.4- Condiciones de crecimiento.....	13
3.3- Determinación de la biomasa.....	14
3.4- Determinación del estado hídrico.....	14
3.4.1- Determinación del contenido hídrico.....	14
3.4.2- Determinación del potencial osmótico.....	14
3.4.3- Determinación del potencial hídrico.....	15
3.5- Extractos para la determinación de carbohidratos y almidón.....	17
3.5.1. Extracto específico carbohidratos solubles.....	17
3.5.2. Contenido en almidón (McRae, 1971).....	18
3.6- Determinación de azúcares y almidón.....	18
3.7- Análisis estadístico.....	19
4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
4.1- Puesta a punto método imposición sequía en condiciones controladas.....	21
4.1.1- Contenido hídrico del sustrato.....	21
4.1.2- Potencial hídrico de las plantas.....	22
4.2- Efecto del estrés hídrico en las plántulas de <i>Medicago truncatula</i>	23
4.2.1-Efecto sobre el estado hídrico de la planta.....	23
4.2.2-Efecto sobre la biomasa de las plantas.....	29
4.2.3- Efecto sobre el contenido en carbohidratos.....	31
4.2.4- Efecto sobre el contenido en almidón.....	35
5-CONCLUSIONES.....	39
6-BIBLIOGRAFÍA.....	41

1- INTRODUCCIÓN

1.1- Sequía y relaciones hídricas

Los distintos procesos fisiológicos de la planta se pueden ver afectados por estreses, bien abióticos o bióticos. El estrés hídrico sufrido por las plantas en períodos de escasez de agua es un factor determinante de la producción final obtenida afectando prácticamente a cada uno de los aspectos del desarrollo de la planta. La pérdida de agua en un tejido vegetal tiene diferentes efectos que pueden influir en el metabolismo de la planta. El efecto más importante de un estrés hídrico es la reducción del crecimiento, además de modificar el desarrollo y morfología vegetal y la formación de especies reactivas de oxígeno.

En condiciones naturales de cultivo, las plantas están expuestas constantemente a estreses ambientales las cuales suelen afectar a las plantas de forma simultánea. (Azcón-Bieto, y otros, 2008). Estos estreses pueden ser tanto abióticos (factores ambientales físicos, químicos que afectan negativamente a la planta) como biótico (causado por organismos que afectan a la planta). Al no poder escaparse del factor ambiental estas se adaptan desarrollando distintas estrategias de defensa de adaptación, evasión y tolerancia.

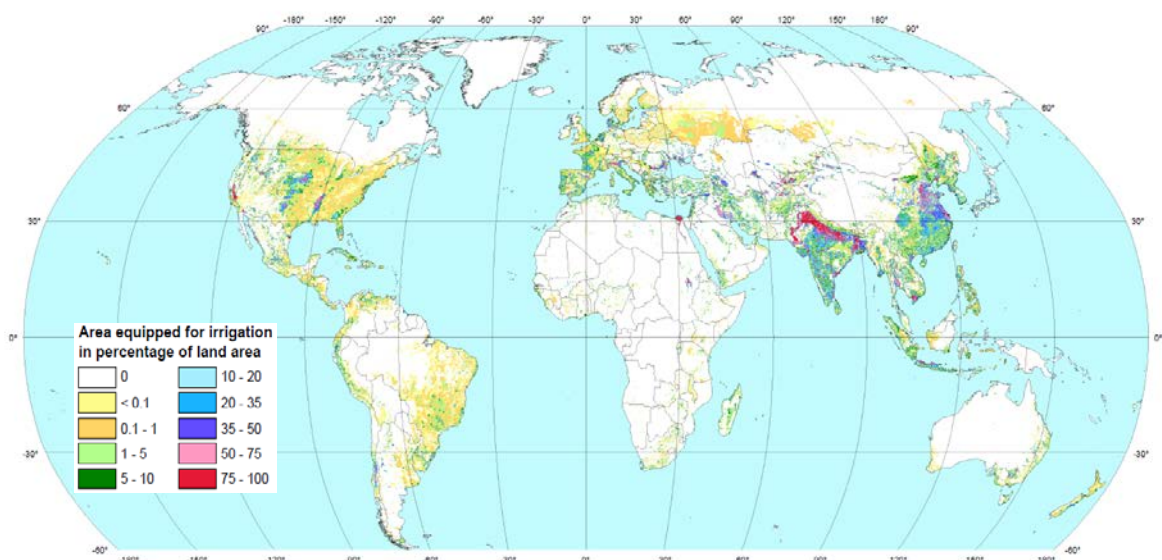


Figura 1: Mapa de superficies equipadas para el riego; (Siebert, y otros, 2013).

Uno de los estreses ambientales más importantes es el estrés hídrico. Aproximadamente el 30% del suelo mundial no es adecuado para la agricultura por el hecho de no disponer de agua suficiente y solamente el 18% de las tierras cultivables disponen de riego (Dent, 1981) y en un estudio realizado en estados unidos el 25,3% de la tierra estaba limitada por la sequía llevándose un 40,8 % de las indemnizaciones de los seguros (Boyer, 1982). A nivel mundial se puede ver en la figura 1 como la cobertura está lejos de ser del 100% Por esto es por lo que el estrés hídrico está considerado como un factor muy importante en la agricultura hoy en día.

La supervivencia de las plantas terrestres depende de que una cantidad suficiente de agua sea absorbida por el sistema radical y reemplazar la pérdida de agua debida a la transpiración en las hojas y la usada en la formación de nuevas células. La fracción absorbible del agua en el suelo está influenciada por diversas condiciones ambientales tales como el alto nivel de salinidad, la pluviometría y las altas o bajas temperaturas.

Si la cantidad de agua perdida por transpiración y en la formación de nuevas células supera a la absorbida por las raíces, se produce una situación de déficit hídrico en la planta. De este modo, cualquier limitación en la disponibilidad de agua, conocida como estrés o déficit hídrico, afecta en múltiples procesos de la planta produciendo cambios irreversibles en la planta comprometiendo gravemente la producción final y pudiendo llegar hasta su muerte (Hsiao, 1973)

El potencial hídrico define el estado hídrico de las plantas y se utiliza para analizar las relaciones hídricas de las mismas. Es un concepto que hace referencia a la energía libre que poseen las moléculas de agua para realizar trabajo. Cuantifica el potencial del agua permitiendo analizar la dirección en la que fluirá debido a la ósmosis, gravedad, presión mecánica, o efectos mátricos como la tensión superficial. Se han determinado el potencial hídrico total y potencial osmótico de la planta que junto con el de pared y el gravitatorio (solamente en árboles) son los que determinan las relaciones hídricas de las plantas (Azcón-Bieto, y otros, 2008).

Ecuación del potencial hídrico para las plantas es la siguiente:

$$\Psi_w = \Psi_s + \Psi_p + \Psi_g$$

Siendo:

Ψ_w =Potencial hídrico de la planta

Ψ_s =Potencial osmótico

Ψ_p =Potencial de presión.

Ψ_g =Potencial gravitatorio

El agua se mueve de un potencial hídrico más pequeño (menos negativo) a otro donde el valor de dicho potencial sea más negativo empezando en el suelo, moviéndose a través de la planta y llegando finalmente a las hojas donde se evapora en el proceso de transpiración hacia la atmosfera la cual tiene un contenido de vapor de agua mucho menor.

Otro parámetro utilizado para definir el estado hídrico de las plantas es el contenido hídrico. Este parámetro representa la cantidad de agua presente en un tejido expresado como porcentaje del peso seco de ese mismo tejido. Nos indica el porcentaje de agua del que está compuesta la planta y da una idea del estado de hidratación de la misma. Sin embargo, a diferencia del potencial hídrico es un concepto estático que no permite interpretar como será el movimiento del agua en el continuo suelo-planta-atmósfera y por ello es un parámetro más limitante a la hora de estudiar las relaciones hídricas. Además, el contenido hídrico puede sufrir variaciones en función del ambiente exterior y en este sentido es también más limitado

para definir el estado hídrico de la planta.

En la siguiente figura (figura 2) se representan como se ven afectados distintos procesos fisiológicos y metabólicos en función del nivel de estrés usando como parámetro indicador el potencial hídrico:

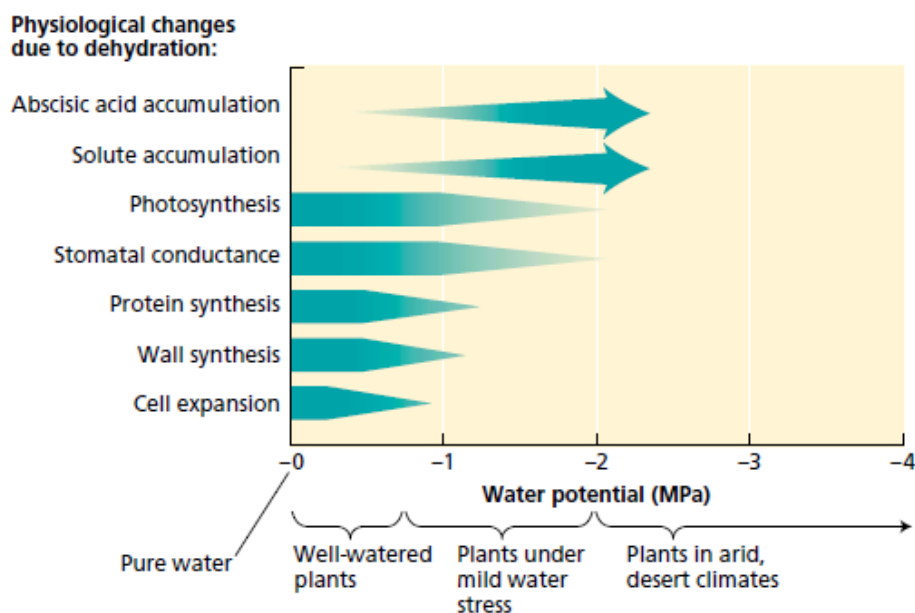


Figura 2: Efectos de distintos grados de estrés hídrico en la planta sobre los procesos fisiológicos y metabólicos básicos (Taiz, y otros, 1998)

El primer efecto de la sequía de las plantas es la reducción de la expansión celular y por tanto el crecimiento de las plantas aun siendo estrés leve. Un estrés hídrico moderado inhibe rápidamente el crecimiento de la parte aérea mientras que la elongación de la raíz se mantiene como un mecanismo de adaptación que posibilita la absorción de agua de capas más profundas del suelo (Sharp et al., 1988). Conforme el estrés se hace más acusado se van cerrando estomas y la planta comienza a reducir su fotosíntesis por la falta de CO_2 intercambiado en estos. Un estrés hídrico más severo comienza a ralentizar mucho el metabolismo normal de la planta produciendo un desequilibrio en el balance del carbono. La acumulación de ácido abscísico provoca el cierre de los estomas reduciendo la respiración de la planta al mínimo, la planta intenta equilibrarse con el potencial hídrico de la atmósfera y del suelo acumulando solutos en las vacuolas para mantener la turgencia y reduciendo su potencial hídrico. Si esta situación dura o se agrava las cantidades de ácido abscísico acumuladas provocan la caída gradual de las hojas y la planta se deshidrata poco a poco produciendo la senescencia hasta llegar a la muerte.

1.2- Germinación

Las sustancias de reserva en las semillas exalbuminadas como son las de las leguminosas como *Medicago truncatula* se acumulan en los cotiledones. Son las más evolucionadas, el embrión tiene una plúmula con epicótilo desarrollado y varios primordios foliares.

Durante el desarrollo del embrión, los cotiledones absorben las sustancias de reserva del endospermo siendo, en este tipo de plantas, la sustancia de reserva más abundante las proteínas.

Al conjunto de fenómenos por los que el embrión, en estado de vida latente en la semilla, reanuda su crecimiento y se desarrolla para formar una plántula se le denomina germinación. Esta necesita de unas condiciones determinadas de humedad, oxigenación, luz y temperatura que le son proporcionados por el medio de cultivo y condiciones de crecimiento descritos en materiales y métodos.

Los pasos de la germinación pueden observarse en la siguiente figura (figura 3):

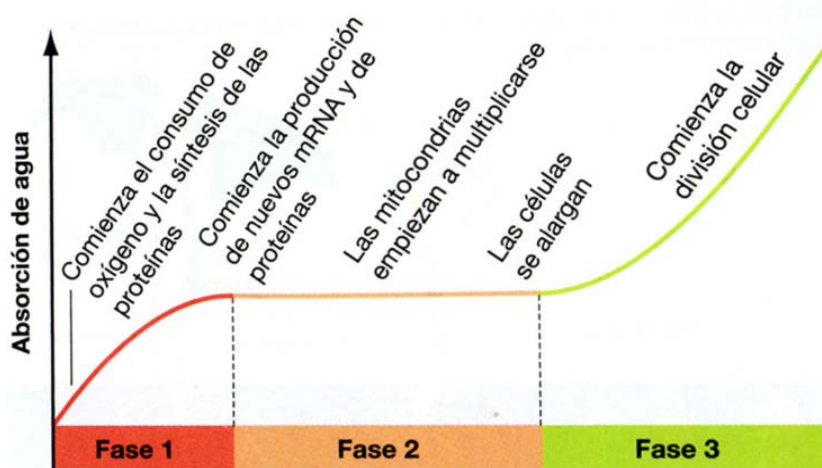


Figura 3: Fases de la germinación (Freeman, 2010)

Fase 1 o de hidratación: Se da una gran absorción de agua por parte de los diferentes tejidos que conforman la semilla. Esto se traduce en un incremento de volumen que a su vez está acompañado por el aumento en la actividad respiratoria.

Fase 2 o de germinación: La absorción de agua se reduce drásticamente y se dan las transformaciones metabólicas necesarias para el posterior crecimiento.

Fase 3 o de crecimiento: La absorción de agua se reanuda. La radícula aparece por el micrópilo para dar lugar a la raíz primaria. El hipocótilo eleva los cotiledones por encima del suelo conforme van cediendo sus reservas. Una vez el epispermo se rasga en los cotiledones se diferencian cloroplastos, transformándolos en órganos fotosintéticos y, actuando como si fueran hojas. Finalmente, comienza el desarrollo del epicótilo y la aparición de las primeras hojas.

1.3- Antecedentes

La especie *Medicago truncatula* es una leguminosa muy utilizada para estudios genéticos y moleculares ya que presenta una alta relación genética con leguminosas de importancia agronómica y es adecuada para la experimentación por lo que se la ha nombrado leguminosa modelo; Es una especie ampliamente estudiada, debido a que es fácil de mantener y reproducir en un entorno de laboratorio ya que es autógena, con una producción grande de semillas, tiene un corto tiempo de generación y tiene ventajas experimentales por ser muy dada a la transformación genética y ser diploide con un genoma pequeño. Los organismos modelos se utilizan para obtener información acerca de otras especies en este caso del ampliamente cultivado grupo de las leguminosas. Se han realizado estudios fisiológicos y bioquímicos para cerciorar que *M. truncatula* responde igual a la sequía que lo que lo hacen otras especies de *Medicago* como la alfalfa (Rubio et al., 2002).

El Consorcio de Secuenciación de *Medicago truncatula* es una asociación internacional de laboratorios de investigación que se dedica a la secuenciación del genoma de *Medicago truncatula*. Está formada por la University of Minnesota, the National Centre for Genome Resources (NCGR), Boyce Thompson Institute (BTI), J. Craig Venter Institute (JCVI) Hamline University, the University of Southern California, INRA-Montpellier, ENSAT-Toulouse y the Noble Foundation. Se espera que la secuenciación del genoma de *Medicago truncatula* facilite la investigación de la genómica en las legumbres, especialmente la biología de la simbiosis porque *Medicago truncatula* y su bacteria simbiótica, *Sinorhizobium meliloti*, son los modelos más populares para la investigación de la simbiosis.

Además se está investigando en estreses bióticos y abióticos como son la salinidad y lo que nos ocupa en este caso, la sequía. Establecer condiciones de salinidad y de exposición a distintos nutrientes o en condiciones de laboratorio resulta fácil y se ha estudiado ampliamente. Con una simple búsqueda en el ISI web of knowledge podemos observar que obtenemos 10 veces más resultados para salinidad que para sequía.

Esto es especialmente remarcable a la hora de buscar experimentos realizados en placas Petri en condición de sequía ya que no resulta fácil encontrar alguno por la dificultad que entraña someter a una plántula a condiciones de estrés en un medio de cultivo. Se han utilizado polímeros inertes de alto peso molecular como el polietilenglicol para simular condiciones de sequía reduciendo el potencial del medio de cultivo (Kaufmann et al., 1971) Sin embargo, estos polímeros, además del efecto deseado, han demostrado ejercer un efecto toxico al haber penetrado en la planta (Emmert, 1974; Mexal et al., 1975; Munns et al., 1979). Recientemente en la Universidad Pública de Navarra se estaba empezando a experimentar usando diferentes concentraciones de agar para establecer condiciones en la que la planta no tenga disponible el agua tan fácilmente en el medio de la placa Petri y crear así un estrés hídrico.

2-OBJETIVOS

Este trabajo final de grado tiene como primer objetivo la puesta a punto de un método para someter a un estrés hídrico controlado a las plantas de *Medicago truncatula* en condiciones de laboratorio utilizando placas de Petri. Este método permitirá realizar nuevas investigaciones en el campo de la sequía controlando los niveles de estrés a los cuales se ven expuestas las plantas y permitiendo normalizar los niveles de estrés hídrico aplicado de una forma similar a como se llevan a cabo los planteamientos de los estudios de salinidad.

En segundo lugar, este estudio se plantea como segundo objetivo, utilizar el método puesto a punto para verificar los principales efectos del estrés hídrico en plantas y por lo tanto consolidar el método para ser utilizado en estudios de estrés hídrico. Con este fin se determinará el estado hídrico de las plantas, el efecto sobre la biomasa y sobre los niveles de azúcares y almidón.

3- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1- Material vegetal utilizado.



Figura 4: Semillas, Fruto, Flores y planta de *Medicago truncatula* (foto panel izda.: Unai Perez, foto panel dcha.: [Wikipedia](#))

Todo el material vegetal utilizado corresponde a la especie *Medicago truncatula*.

Es una especie diploide y auto fértil de ciclo anual y que se ramifica desde la base. Tiene porte rastrero, hojas trifoliadas normalmente con una mancha negra y las flores amarillas sobre un pedúnculo las cuales dan un fruto enrollado en espiral. Viven en los claros de los matorrales márgenes de caminos y campos abandonados además de usarse como especie forrajera. Florece a finales de invierno y en primavera. Se ha utilizado el ecotipo Jemalong A17 de origen australiano de la cual tiene una mancha negra característica en las hojas

3.2- Diseño experimental.

El planteamiento experimental llevado a cabo consistió en utilizar distintas concentraciones de agar en las placas de Petri para obtener situaciones con distinta disponibilidad de agua para la planta a igualdad del resto de condiciones.

3.2.1- Germinación de las semillas.

La germinación se realizó siguiendo un protocolo de desinfección y posteriormente se pusieron en placas a germinar.

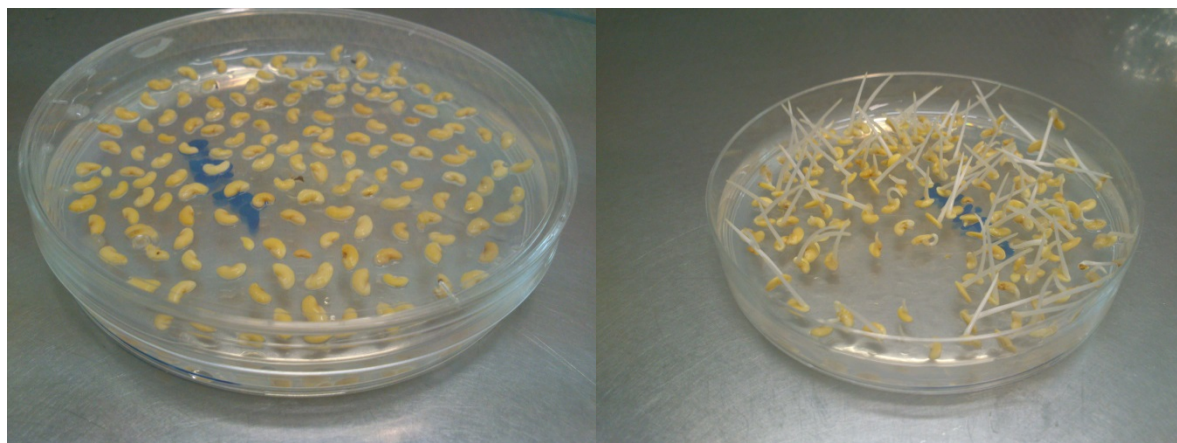


Figura 5: Siembra de semillas en agar y semillas germinadas 48 h después

El protocolo de desinfección seguido fue el siguiente:

- Extracción de las semillas de las vainas las cuales contenían de 8 a 11 semillas colocadas de dos a dos en una hélice.
- Escarificación acida: Inmersión de las semillas 7 minutos en ácido sulfúrico 96% y posterior lavado con agua destilada 10 veces
- Esterilización superficial: Inmersión en hipoclorito de sodio al 3,5% p/v durante 5 minutos y realización de lavados con agua desionizada 10 veces

Las semillas de los tres tratamientos se germinaron de manera idéntica:

- Inmersión en agua en tubos falcon con agua destilada agitándose durante 6 horas
- Tratamiento frío: Colocación de las semillas en placas de agar al 7 ‰ (p/v) (figura 8) en completa oscuridad durante 24 horas a 4º C
- Temperatura ambiente: Sacar placas a temperatura ambiente ($\approx 21^\circ$ C) durante 48 h

3.2.2- Medios de cultivo utilizados

Después de algunas preliminares, se decidió utilizar las concentraciones de agar de 1,5%, 3% y 5% disueltas en medio Fahræus (tabla 1) el cual es un medio sin nitrógeno apropiado para el cultivo de *M. truncatula* en placas de Petri. Es un medio ampliamente utilizado en este campo.

Se realizaron tres versiones del medio de cultivo Fahræus con concentraciones de 1,5% (15 g/l), 3% (30 g/l) y 5% (50 g/l) de agar para simular las condiciones de estrés deseadas. El 1,5% se trataría del medio de cultivo recomendado para las plantas de *Medicago truncatula* (control) (Barker, y otros, 2006) un 3% para la sequía leve y 5% para sequía moderada

Tabla 1: Composición del medio Fahræus utilizado para preparar los tres medios

Medio Fahræus (modificado de Vincent 1970)	
Macronutrientes	Concentracion final
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0.5 mM
KH ₂ PO ₄	0.7 mM
Na ₂ HPO ₄ , 2H ₂ O	0.8 mM
Fe-EDTA ₂	50 µM
CaCl ₂	1 mM
Micronutrientes	Concentracion final
MnSO ₄ , CuSO ₄ , ZnSO ₄ H ₃ BO ₃ , Na ₂ MoO ₄	0.1 µg / 1 c.u.

Se diluyó el agar (figura 6) (15 g/l, 30 g/l y 50 g/l para los tratamientos control, sequia leve y sequia moderada respectivamente) con agua y posteriormente se añadieron los volúmenes de los macronutrientes MgSO₄, 7H₂O; KH₂PO₄; Na₂HPO₄; 2H₂O; Fe-EDTA₂ y posteriormente los micronutrientes hasta alcanzar las concentraciones indicadas en la Tabla 1. Hecho esto se ajustó el pH a 6,5 y se autoclavó para esterilizar el medio. Finalmente se le añadió CaCl₂.

Una vez homogeneizado se repartió en placas Petri se le colocó un papel absorbente una vez había solidificado ligeramente y se dejó enfriar para que finalizase de solidificar.



Figura 6: Contenido de agar por 100 ml de los 3 tratamientos utilizados y de dos con los que no se consiguieron resultados funcionales. Empezando por la izquierda se observa la cantidad creciente de agar utilizada para los tratamientos de 1,5%, 3% y 5% y los dos experimentales de 12,5% y 25% que resultaron irrealizables.

3.2.3- Preparación de las placas

Se colocaron 8 semillas germinadas, de tamaño similar, equidistantemente (Figura 7) en condiciones de esterilidad en la cabina de flujo laminar en placas de 10 x 10 x 2 cm en las que se había preparado tres medios de cultivo una vez colocado papel absorbente para dirigir el

crecimiento de la raíz. En el caso de las placas de sequía moderada (5%) se le añadió una gota de agua para que quedase la semilla pegada. Se sellaron las placas con parafilm agujereado posibilitando el intercambio de gases y manteniendo las condiciones de esterilidad necesarias.

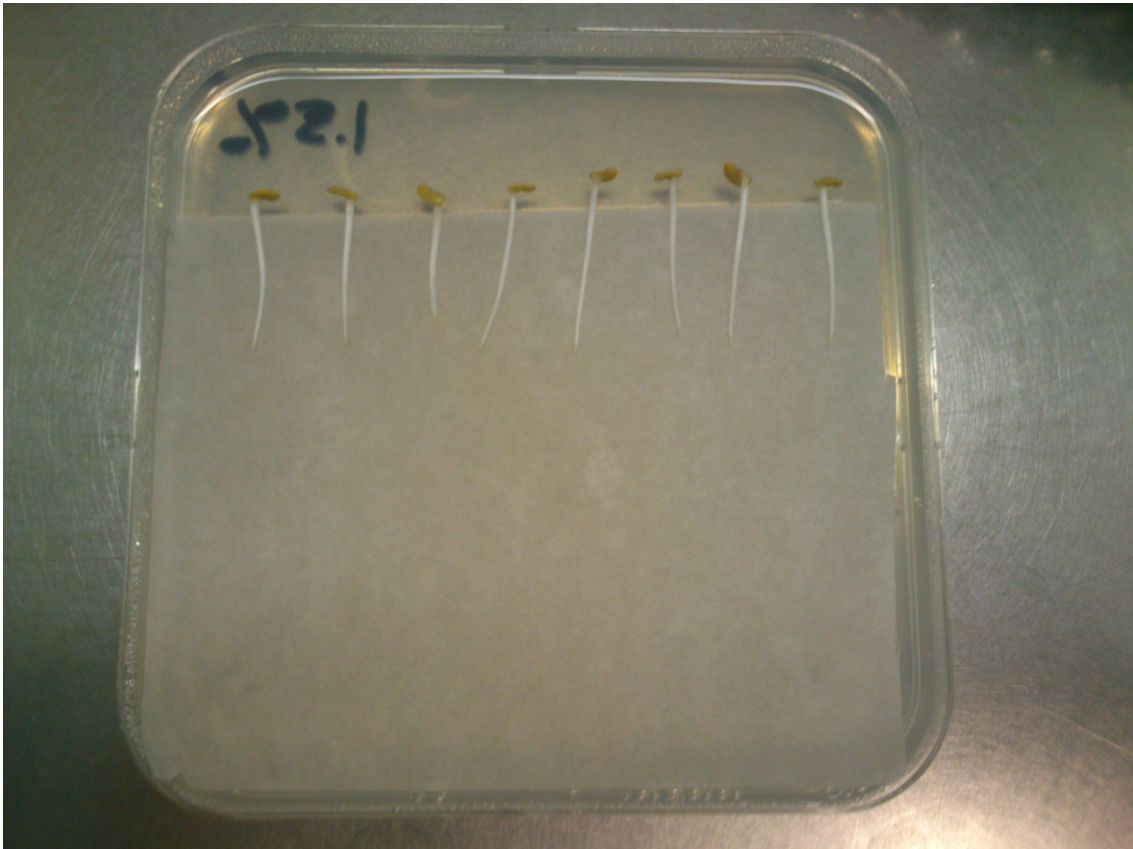


Figura 7: Placa preparada con semillas germinadas en condiciones normales de germinación. Los distintos tratamientos de disponibilidad hídrica comenzaban con las semillas en este estadio.

Se cubrió la parte inferior de las placas (la raíz de las plántulas) con papel de aluminio para simular las condiciones de crecimiento naturales de la raíz en oscuridad.

Se prepararon alrededor de 24 placas para cada tratamiento realizando alguna placa más para el tratamiento de 5%.

3.2.4- Condiciones de crecimiento



Figura 8: Plántulas dispuestas en las placas creciendo bajo en condiciones controladas en el fitotrón

Se colocaron las placas de manera oblicua para respetar el fototropismo y gravitropismo de las plántulas de manera que no afectase a los resultados obtenidos en un fitotrón (figura 8) en

condiciones de luz, fotoperiodo, temperatura y humedad controladas:

- Temperatura: 25 ° C
- Humedad relativa 70-80%
- Luz: 200 mol m⁻² s⁻¹
- Fotoperiodo 16 h luz

3.3- Determinación de la biomasa.

La determinación de la biomasa se realizó determinando el peso fresco y seco de la plántula.

Se secaron plantas de los tres tratamientos a 70 ° C en una estufa de secado por aire caliente durante 72 h y se pesaron para determinar el peso seco generado por estas. Se tomaron muestras de parte aérea y raíz por separado y de planta completa.

3.4- Determinación del estado hídrico.

Para determinar el estado hídrico de la planta se midieron el contenido hídrico, el potencial osmótico y el potencial hídrico.

3.4.1- Determinación del contenido hídrico

El contenido hídrico de la planta se calculó mediante la siguiente formula:

$$CH = \frac{PF - PS}{PF} * 100$$

Así se determinó el porcentaje de agua presente en el tejido de la planta. Se tomaron muestras de parte aérea y raíz por separado y de planta completa.

Se determinó el peso fresco de la planta pesándola en una báscula y después esta se secó 72 h en la estufa y se pesó nuevamente para determinar el peso seco de la misma y calcular el contenido hídrico de la parte aérea y de la raíz.

3.4.2- Determinación del potencial osmótico.

El agua pura, por convención, tiene potencial osmótico cero siendo el resto de potenciales osmóticos negativos. La relación entre la concentración de soluto (en molaridad) el potencial soluto se da por la ecuación de van't Hoff:

$$\Psi_{\pi} = -MiRT$$

Donde M es la concentración en molaridad del soluto, i es el factor de van't Hoff, la relación entre la cantidad de partículas en solución y la cantidad de unidades de fórmula disueltas, R es la constante de los gases ideales, y T es la temperatura absoluta.

El potencial osmótico tiene una implicación muy importante para muchos organismos vivos. Si

una célula viva con un potencial soluto se encuentra en medio de una solución más concentrada, la célula tenderá a perder agua hacia el potencial hídrico más negativo del ambiente que la rodea. En el caso de una célula vegetal, el flujo de agua hacia fuera de la misma ocasionará que la membrana citoplasmática se separe de la pared celular, lo cual resulta en plasmólisis. Esto se puede medir en plantas utilizando bombas de presión. Sin embargo, la mayoría de las plantas tienen la habilidad de aumentar el potencial soluto de sus células para promover el flujo de agua hacia dentro de las mismas, y así mantener la turgencia especialmente en condiciones de sequía.

Para la determinación del potencial osmótico se utilizó un Osmómetro (figura 9). Alícuotas de material congelado se hirvieron durante 5 minutos para romper las membranas y extraer posteriormente el jugo celular mediante centrifugación. La muestra hervida se centrifugo en un eppendorf al que se le realizó un pequeño agujero para recoger el jugo celular en otro eppendorf colocado debajo de este.

La muestra se colocó en discos de papel y se introdujo en el Osmómetro.



Figura 9: Osmómetro de presión de vapor (Vapro Mod. 5520; Wescor Inc., Logan, UT, EE.UU) en el que se realizaron las determinaciones de potencial osmótico.

3.4.3- Determinación del potencial hídrico.

Para la medida del potencial hídrico radical y de la parte aérea se empleó un microvoltímetro (figura 10) al que se conectaron 9 cámaras estancas en las que se introdujeron las muestras.

El funcionamiento del psicrómetro se basa en la relación existente entre la presión de vapor (e/e_0) de una muestra de material vegetal y su potencial hídrico según la ecuación:

$$\Psi = \frac{RT}{V} * \ln\left(\frac{e}{e_0}\right)$$

Siendo R la constante de los gases ideales ($8,31 \text{ J } ^\circ\text{K mol}^{-1}$), T la temperatura absoluta ($^\circ\text{K}$), e la Presión de vapor atmosférica y e_0 la presión de vapor de saturación.

Se introdujo una raíz o una hoja de una planta de cada replica en las cámaras y se dejaron estabilizar durante al menos una hora. Una vez la presión de vapor de la humedad de dentro de la cámara se estabilizó se seleccionó en el equipo el valor del coeficiente de enfriamiento (π_v) corregido para cada cámara en función de la temperatura de cada una de acuerdo a la ecuación:

$$\pi_{v, T_1} = 0,7 * (T_1 - T_0) + \pi_{v, T_0}$$

π_{v, T_1} es el valor de π_v a la temperatura de calibración (T1)

π_{v, T_0} es el valor de π_v a la temperatura de calibración (T0)

Una vez ajustado se tomó la medida en μV lo cual se transformó a unidades de presión MPa mediante la relación MPa/ μV obtenida mediante unas rectas de calibrado realizadas anteriormente midiendo los μV de respuesta que daba el microvoltímetro para concentraciones de sacarosa conocidas. Cada cámara tiene su recta de calibrado propia.

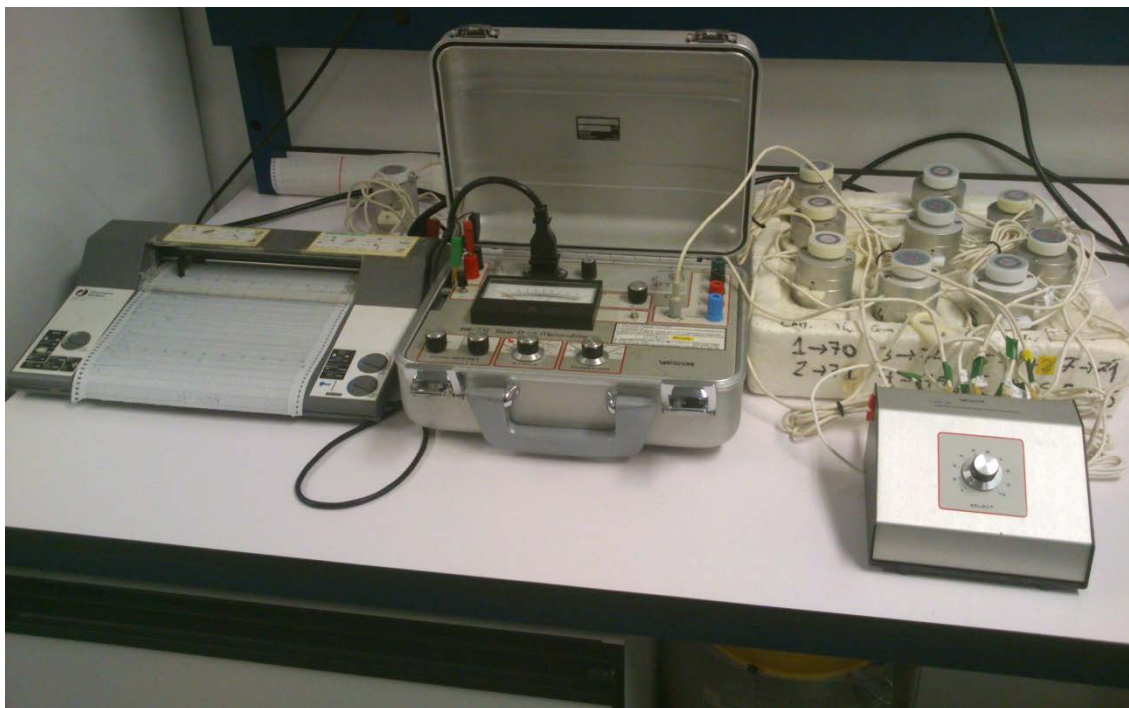


Figura 10: Microvoltímetro (Mod. HR-33T; Wescor Inc., Logan, UT, EE.UU) conectado a las 9 cámaras (Mod. C-52; Wescor Inc.) y un registrador que se utilizó para determinar el potencial hídrico.

3.5- Extractos para la determinación de carbohidratos y almidón.

El protocolo común a ambas seguido fue el siguiente:

1. Se tomaron alícuotas de 0,1 g de material machacado y congelado.
2. Se añadió a cada eppendorf 1,5 ml de etanol 80% tanto para raíces como para hojas.
3. Se hirvió durante 30 s. Tras esto se centrifugó (5.000 rpm, 4 ° C, 5 min) y se recogió el sobrenadante en un tubo 3 veces. El cuarto lavado fue con etanol en frío.
4. Se evaporó el etanol de los tubos en evaporador Turbo-Vap (40 ° C; 1-1,2 bar)
5. Se secó el resto de material insoluble en etanol en la estufa a 70 ° C durante 24 h y una vez seco se almaceno en un desecador

3.5.1. Extracto específico carbohidratos solubles

Después de los pasos comunes se siguieron unos específicos para la extracción de carbohidratos (Warren y Adams, 2000)

Se resuspendió la muestra seca obtenida desde el evaporador en 2 ml de agua desionizada, para ello se añadió 1 ml al tubo "turbo-vap" y se sonicó durante 10 min. A continuación se centrifugó y vertió el sobrenadante a un tubo de plástico el cual se centrifugó. Se volvió a añadir 1 ml al tubo y se agito en vortex y se recogió el sobrenadante después del centrifugado.

Se centrifugó (2.300 g, 4 ° C, 10 min) y se guardó en el eppendorf a -20 °C, para más tarde hacer las determinaciones de carbohidratos solubles mediante electroforesis capilar.

3.5.2. Contenido en almidón (McRae, 1971)

Para la determinación del contenido en almidón se siguió el siguiente protocolo.

1. Se resuspendió el material seco, y se homogeneizó la muestra se centrifugo y recogió en dos veces.
2. Se hirvió el volumen obtenido durante 1 hora a 100 ° C.
3. Se dejó enfriar las muestras y se le añadió a cada una 0,5 ml de solución de amiloglucosídasa. Dicho enzima cataliza la hidrólisis de almidón a glucosa. A continuación, se mantuvo en el baño a 50° C con agitación durante toda la noche.
4. Se agitó en el vórtex y se centrifugó a 4.450 rpm, 4° C, 15 min. Se recogió el sobrenadante y guardó en eppendorf a -20° C para determinar el contenido de glucosa procedente de la degradación del almidón presente en la muestra.

3.6- Determinación de azúcares y almidón.

Se empleó un medidor de electroforesis capilar Beckman PACE System 5500 (fig 11) El residuo insoluble en etanol se extrajo para la determinación de almidón como en (Macrae, 1971). Los hidratos de carbono se analizaron por electroforesis capilar de alto rendimiento (Warren y Adams, 2000) usando benzoato de 10 mM (pH 12) que contenía 0,5 mM de bromuro de miristiltrimetilamonio como un tampón en las siguientes condiciones: -15 potencial kV, 50 micras de diámetro interno y 30-/ tubo capilar 40,2 cm de largo. Se utilizó la detección UV indirecta a 225 nm.



Figura 11: Medidor de electroforesis capilar Beckman Coulter PACE System 5500, con el que se realizaron las determinaciones de azúcares y almidón.

3.7- Análisis estadístico.

Para las variables determinadas en este trabajo se ha calculado la media como estadístico de tendencia central y el error estándar como estadístico de dispersión. Los distintos parámetros analizados en este estudio se han examinado mediante un test t de student para la comparación de las medias muestrales que siguen una distribución normal.

Se han comparado los tratamientos dos a dos. Los resultados se han tomado como estadísticamente significativos para $p \leq 0,05$.

4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1- Puesta a punto método imposición sequía en condiciones controladas

4.1.1- Contenido hídrico del sustrato

La puesta a punto del método comenzó con la preparación de cinco medios de crecimiento con concentraciones de agar creciente. El quinto medio se descartó por ser imposible de manejar.

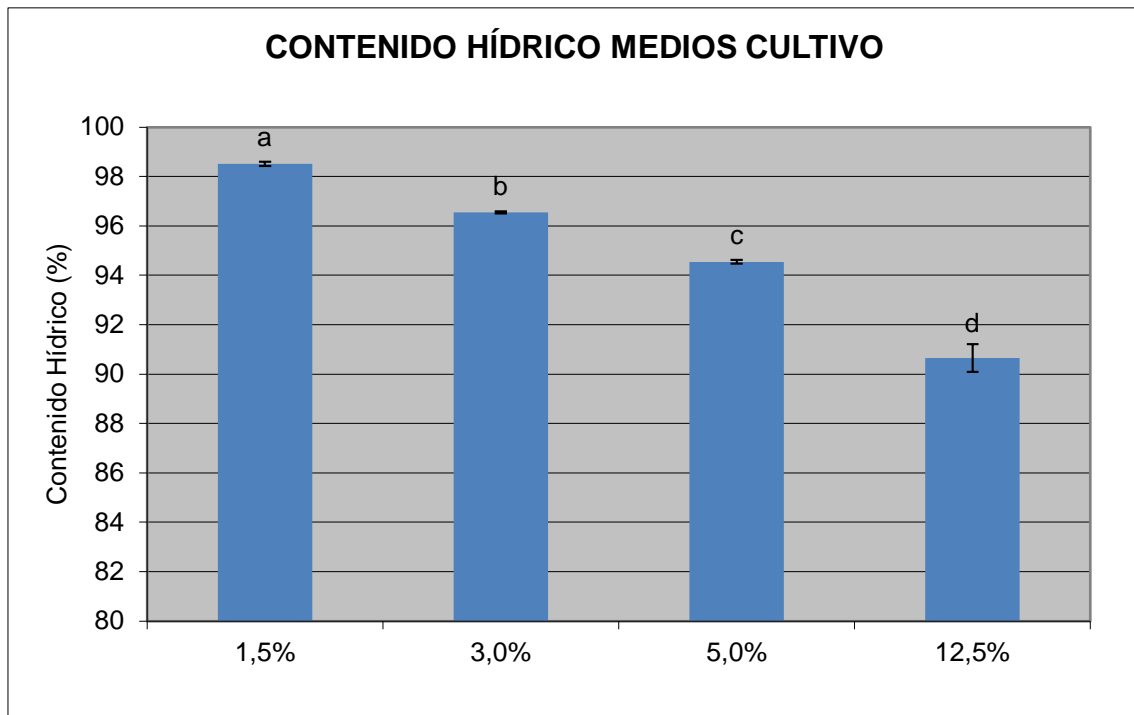


Figura 12: Contenido hídrico (%) de los diferentes medios de cultivo con contenidos de agar crecientes para los distintos tratamientos con contenidos distintos de agar tal y como están indicados bajo las columnas. Los valores representan las medias \pm error estándar ($n=3$). Letras diferentes sobre las distintas columnas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$)

Se determinó el contenido hídrico de los otros cuatro medios y se comprobó que se reducía de manera continua y proporcional. La mayor concentración de agar utilizada fue de un 12,5% que se descartó para estudios posteriores dada la complejidad del manejo de medios con alto contenidos de agar y la falta de homogeneidad en la placa resultante. En la Figura 12 se presenta el contenido hídrico de los medios de cultivo con las distintas concentraciones de agar utilizadas. Corresponderían al medio control (1,5%) sequía leve (3%) sequía moderada (5%) y el medio de 12,5% descartado por su difícil manejo.

Se puede observar como al aumentar la cantidad de agar en la placa el contenido hídrico tiende a reducirse de manera proporcional por lo que la cantidad de agua presente en cada medio disponible para las plantas será menor.

Las diferencias entre los distintos métodos son estadísticamente significativas y con un error muy leve por lo que estaríamos creando un medio muy homogéneo que varía su contenido hídrico de manera significativa pudiendo crear distintos niveles de estrés con pequeños cambios en el contenido de agar.

El medio menos homogéneo sería en el 12,5% por las dificultades de preparación que conlleva por su alta densidad y viscosidad. Como ya hemos indicado este medio se descartó para posteriores estudios.

4.1.2- Potencial hídrico de las plantas

El potencial hídrico de la parte aérea de la planta se midió para ver si se podía establecer una relación entre el contenido hídrico y cantidad de agar del medio de cultivo utilizado y el estrés representado por el potencial hídrico de la hoja.

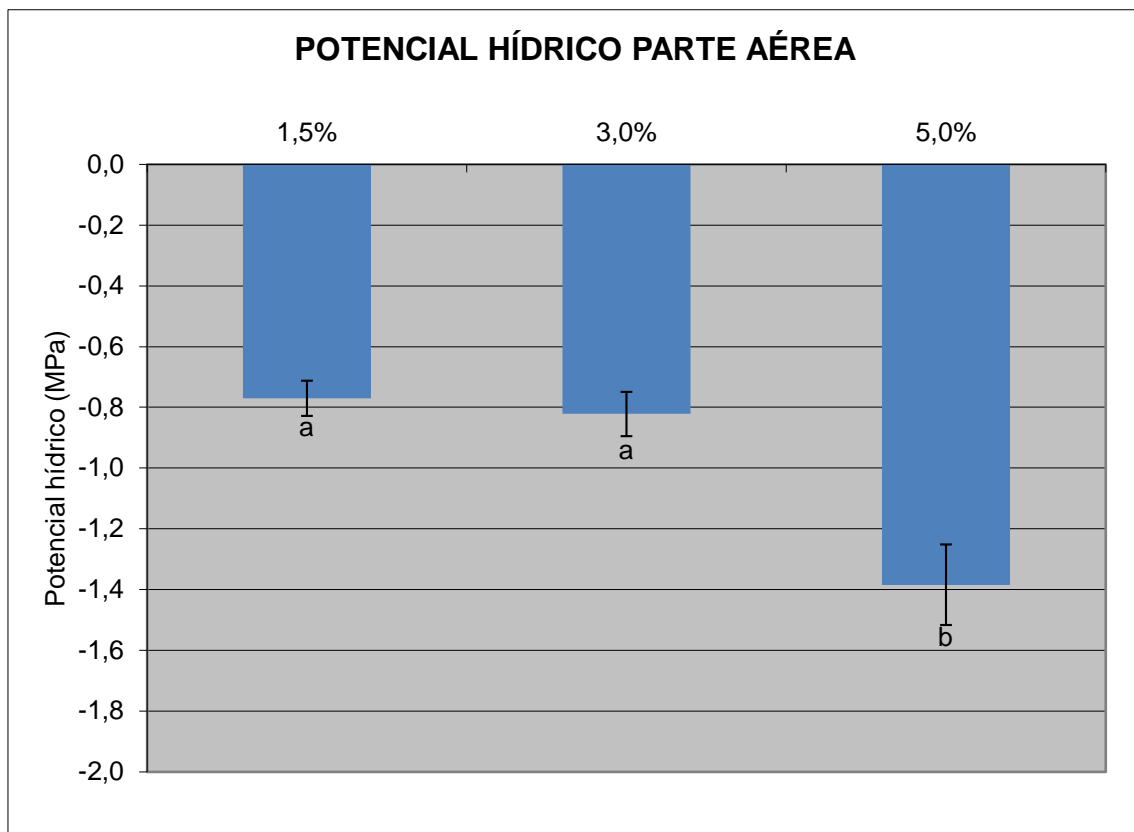


Figura 13: Potencial hídrico (MPa) de la parte aérea de los diferentes tratamientos con contenidos distintos de agar indicados sobre las columnas. Los valores representan las medias \pm error estándar ($n=3$). Letras diferentes sobre las distintas columnas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$)

La figura 13 muestra el potencial hídrico en MPa de la parte aérea de las plantas crecidas en los distintos medios de agar. Se puede observar una tendencia descendente del potencial hídrico cuanto mayor es el contenido de agar del medio utilizado y como se ha visto en la figura 12

menor es el contenido hídrico del medio.

Estas diferencias solo son estadísticamente significativas para el caso de la sequía moderada (5%) obteniendo una respuesta similar de los otros dos medios. Podemos afirmar que en el medio de (5%) la planta se encuentra bajo sequía ya que el potencial hídrico así lo refleja.

Una vez determinado el efecto sobre el potencial hídrico de las plantas se dio por finalizado la puesta a punto del método para imponer distintos niveles de estrés en plantas de *Medicago truncatula* creciendo bajo condiciones controladas. Con este método se procedió a determinar el efecto del estrés hídrico impuesto en estas condiciones tal y como se muestra en el siguiente apartado.

4.2- Efecto del estrés hídrico en las plántulas de *Medicago truncatula*

Además de la medida de potencial hídrico de la hoja se realizaron pruebas de potencial hídrico en la raíz, contenido hídrico en hoja y raíz y potencial osmótico en hoja y raíz. *M. truncatula* ha demostrado ser una planta ligeramente más resistente a la sequía que otras leguminosas como el guisante (González et al., 1998; Gálvez et al., 2005) y la soja (González et al., 1995).

4.2.1-Efecto sobre el estado hídrico de la planta

4.2.1.1- Potencial osmótico de las plantas

Se realizaron medidas de potencial osmótico de la parte aérea y la raíz para ver en qué grado afectaba la sequía al contenido de solutos en las distintas partes de la planta.

Se puede ver en la Figura 14 el potencial osmótico de la raíz en MPa para los diferentes tratamientos. Se ve una tendencia descendente del potencial osmótico a medida que aumenta la cantidad de agar en el medio. Esto indicaría una mayor concentración de los solutos presentes en la muestra y una mayor capacidad para absorber el agua en contacto con la raíz en un nivel energético mayor. Las diferencias son significativas para todos los tratamientos, tanto la sequía leve respecto al control como la sequía moderada respecto al tratamiento control y la sequía leve

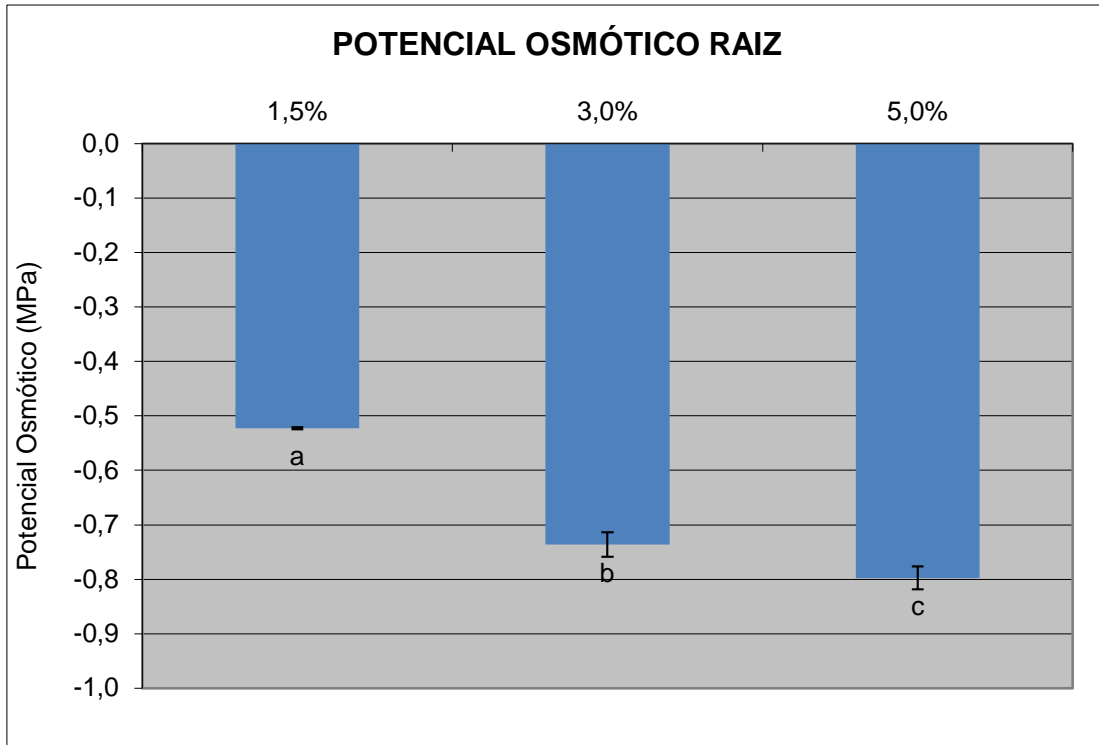


Figura 15: Potencial osmótico (MPa) de la raíz de los diferentes tratamientos con contenidos distintos de agar indicados sobre las columnas. Los valores representan las medias \pm error estándar ($n=3$). Letras diferentes sobre las distintas columnas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$)

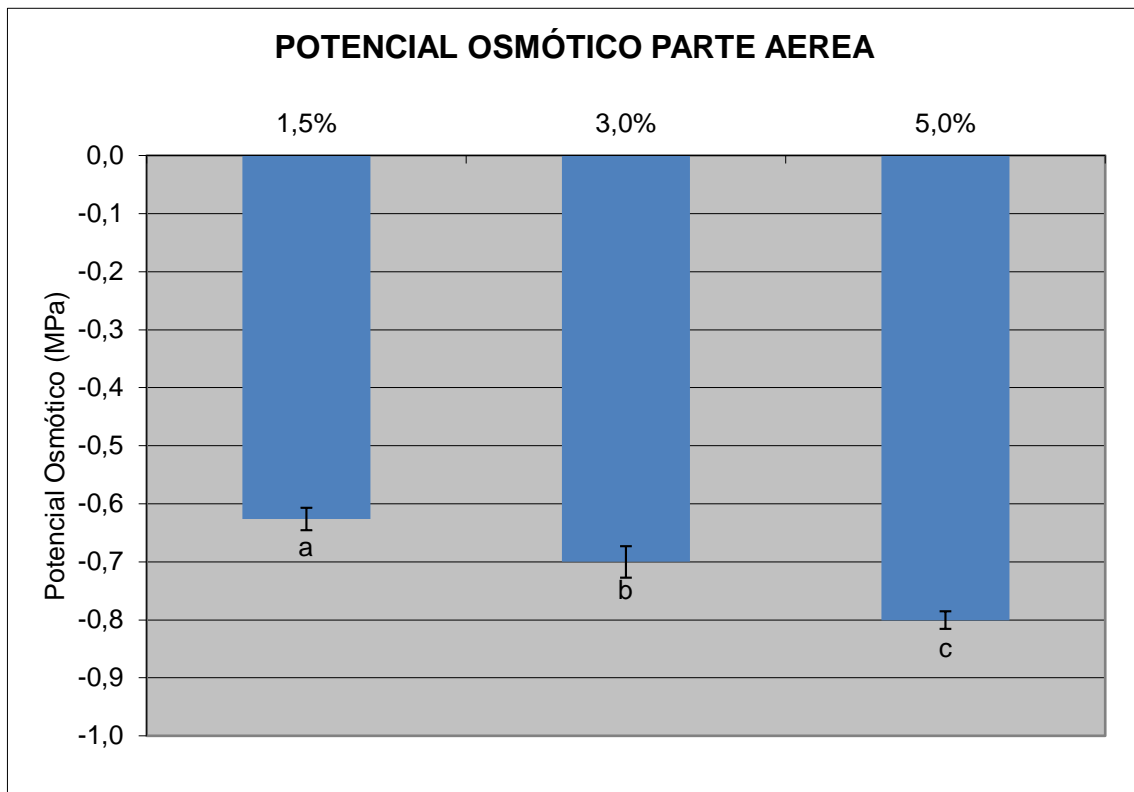


Figura 14: Potencial osmótico (MPa) de la parte aérea de los diferentes tratamientos con contenidos distintos de agar indicados sobre las columnas. Los valores representan las medias \pm error estándar ($n=3$). Letras diferentes sobre las distintas columnas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

La figura 15 muestra el potencial osmótico de la parte aérea en MPa para los distintos tratamientos. En ella se ve como el potencial osmótico decrece de manera paulatina en función del contenido hídrico de los medios utilizados. Los tres tratamientos muestran ser estadísticamente significativos y diferentes por lo que diferentes contenidos de agar en los medios provocan diferentes respuestas en el potencial hídrico de la parte aérea que aumenta en un 30%. Esto puede deberse a la falta de agua provocada por la deficiente captación de la misma por la raíz la cual marcaba un potencial mucho más bajo y que cambiaba de manera más brusca y notable para poder captar más agua y poder sobrevivir a la sequía.

4.2.1.2- Contenido hídrico de las plantas

El agua es el componente mayoritario de las plantas y en condiciones de buena disponibilidad hídrica este parámetro se encuentra alrededor del 90%, variando en función de las partes de la planta. Cuando la planta se ve expuesta a una limitación de agua, este parámetro desciende y los procesos fisiológicos se ven afectados.

Se midió el contenido hídrico de las plantas para determinar junto con el potencial el estado hídrico de la misma a pesar de ser un parámetro relativo y no determinante sin el soporte de otras medidas como el potencial osmótico y el potencial hídrico. Sin embargo, en las condiciones controladas en las cuales se realiza este estudio, el contenido hídrico no es probable que se vea modificado por el entorno y por lo tanto puede ser un buen indicador del estrés impuesto a la planta

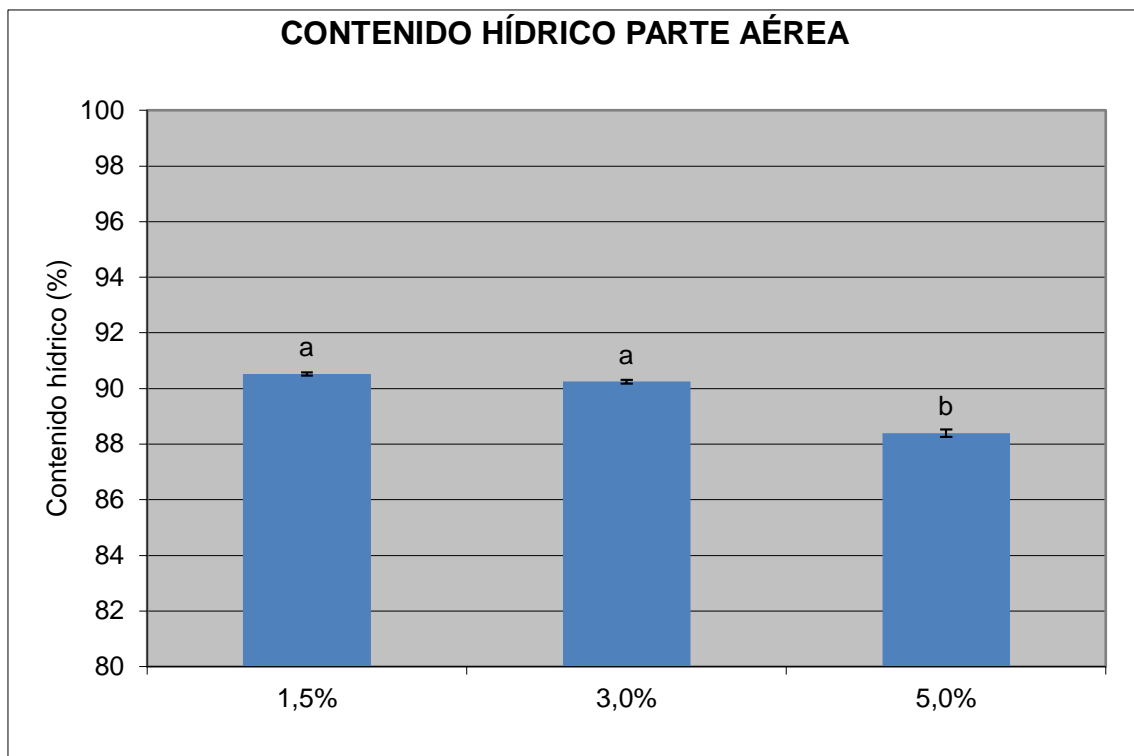


Figura 16: Contenido Hídrico de la parte aérea en % de agua de los diferentes tratamientos con contenidos distintos de agar indicados bajo las columnas. Los valores representan las medias \pm error estándar ($n=3$). Letras diferentes sobre las distintas columnas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

La figura 16 muestra el contenido hídrico de la parte aérea de las plantas bajo los tres tratamientos. Se ve una cierta tendencia no muy marcada a reducirse conforme aumenta el nivel de estrés siendo la de 5% significativamente diferente al tratamiento control y a la sequía leve.

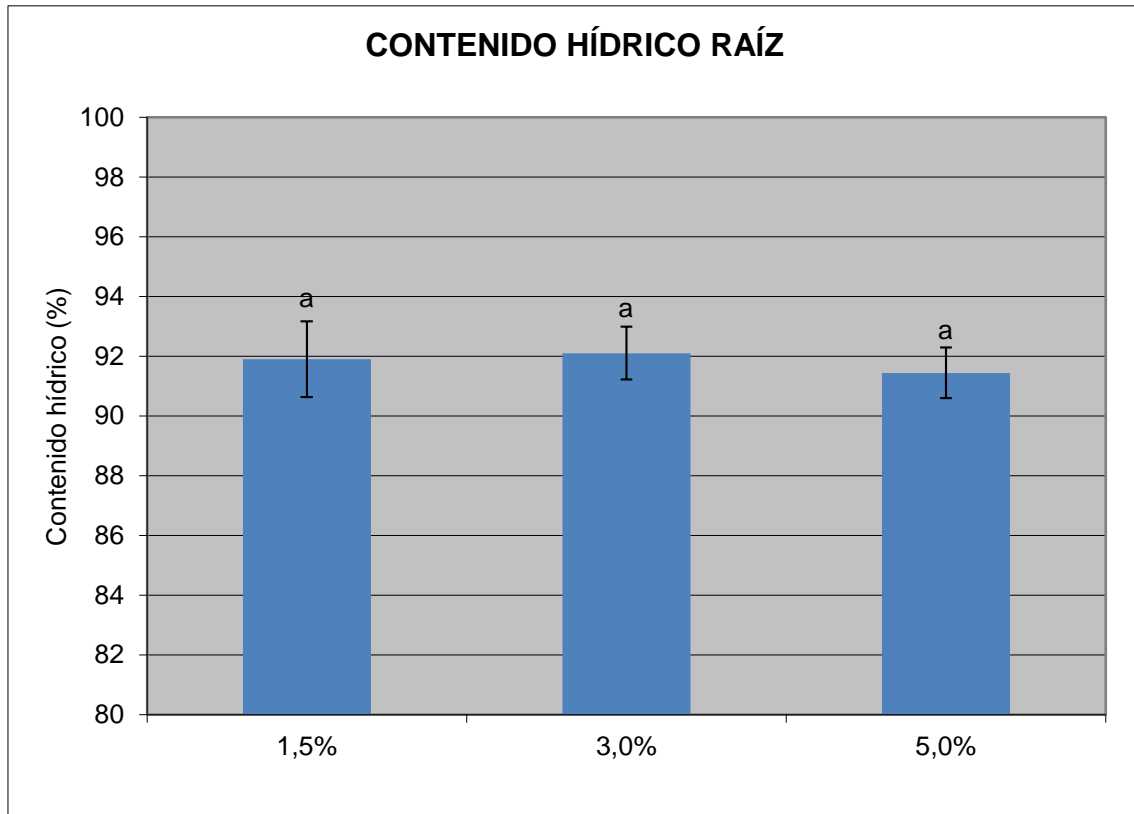


Figura 17: Contenido Hídrico de raíz en % de agua de los diferentes tratamientos con contenidos distintos de agar indicados bajo las columnas. Los valores representan las medias \pm error estándar ($n=3$). Letras diferentes sobre las distintas columnas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

La figura 17 muestra el contenido hídrico de la raíz de los 3 tratamientos en la cual no se aprecian diferencias estadísticamente relevantes entre los tres tratamientos. Esto nos podría indicar que el contenido de agua no se ve reducido en la raíz. El mantenimiento del contenido hídrico radical podría estar relacionado con la capacidad para acumular solutos de este órgano, que mostró un descenso de potencial osmótico incluso en condiciones de sequía leve (3%).

4.2.1.3- Potencial hídrico de las plantas

Finalmente se midió el potencial hídrico de las raíces y partes aéreas de las plantas por ser este el parámetro que con más fiabilidad nos va a dar el nivel de estrés en el que se encuentra la planta por ser el exponente de la cantidad de transpiración que está realizando.

En la figura 17 se muestra el potencial hídrico de la parte aérea para los distintos tratamientos. Este varía de -0,771 a -1,358 disminuyendo primero poco y luego de manera brusca del tratamiento del 3% al 5%. Las diferencias son significativas entre los tratamientos 5% y los

otros dos siendo los de 1,5 y 3% iguales a pesar de ser la media ligeramente superior. Esto puede deberse a que el tratamiento del 3% es una sequía leve la cual no provoca grandes cambios en esta planta a nivel de parte aérea. Los valores observados coinciden con los obtenidos en otros trabajos realizados en *Medicago truncatula* (Larrainzar et al., 2007; 2009; Naya et al., 2007) con plantas adultas en los cuales se alcanza un nivel de sequía moderado que se correspondería con el tratamiento 5% de agar de este trabajo.

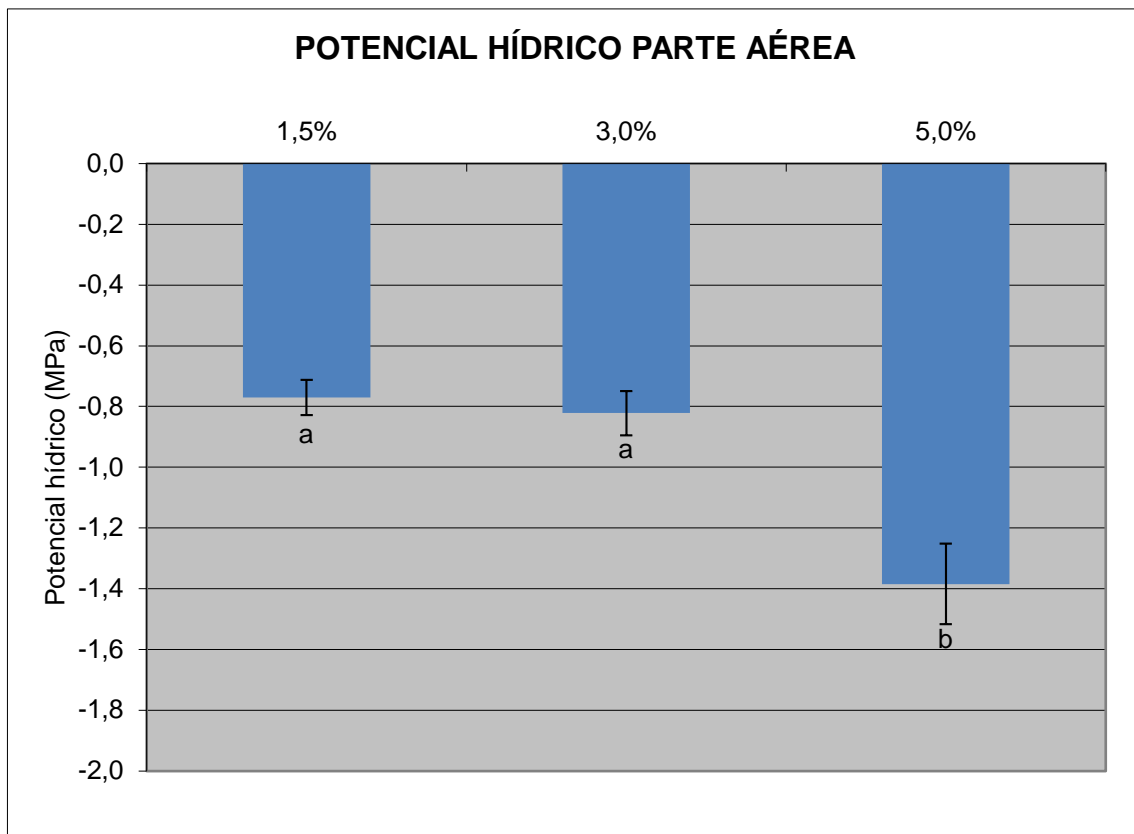


Figura 18: Potencial Hídrico de la parte aérea en MPa de los diferentes tratamientos con contenidos distintos de agar indicados sobre las columnas. Los valores representan las medias \pm error estándar ($n=3$). Letras diferentes sobre las distintas columnas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

En la figura 19 se muestra el potencial hídrico de la raíz en MPa que varía desde -1,181 Mpa en el caso de 1,5% hasta -1,54 MPa en el caso del 5%. Tiende a descender ligeramente de manera proporcional a como descende el contenido hídrico de los medios. El descenso del potencial hídrico de la raíz es significativo en el tratamiento de sequía leve y también en el de sequía moderada respecto al control, a diferencia de lo que se observa en la parte aérea donde la sequía leve no parece presentar diferencias significativas en su estado hídrico.

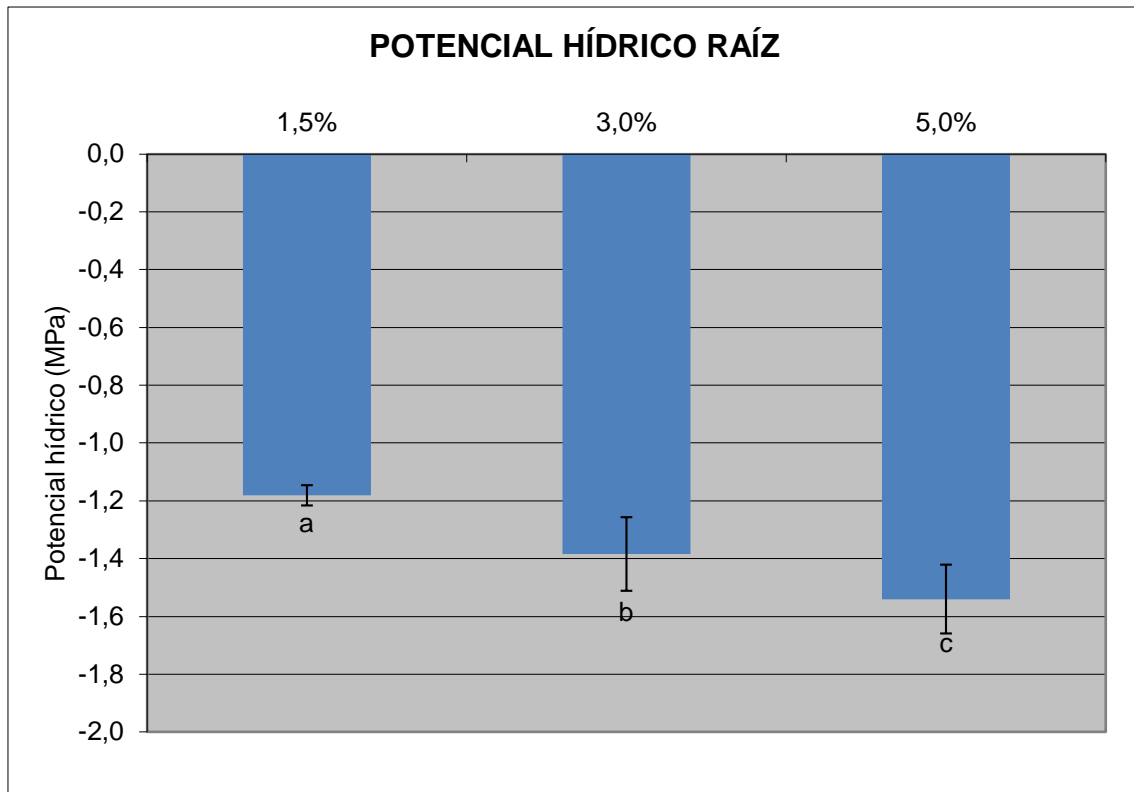


Figura 19: Potencial Hídrico de la raíz en MPa de los diferentes tratamientos con contenidos distintos de agua indicados sobre las columnas. Los valores representan las medias \pm error estándar ($n=3$). Letras diferentes sobre las distintas columnas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

La figura 19 muestra el potencial hídrico de la raíz en MPa se ve una tendencia clara de respuesta descendiendo en potencial hídrico de esta al ser sometida a un contenido hídrico menor en el medio. El potencial varía de forma significativa entre los tres tratamientos pero de manera más paulatina que en la parte aérea siendo una respuesta más o menos proporcional a la cantidad de agua disponible en el medio.

4.2.2-Efecto sobre la biomasa de las plantas

Cuando el agua en el suelo es un recurso limitante, el crecimiento vegetal se ve rápidamente afectado. Está ampliamente demostrado que el déficit hídrico, incluso en condiciones moderadas, afecta a la expansión celular y por lo tanto al crecimiento vegetal (Hsiao, 1973)



Figura 20: Placas Petri de los tres tratamientos con plántulas el día en el que se llevaron al cabo las distintas mediciones. De izquierda a derecha se ven las plántulas crecidas bajo los tratamientos 5%, 3% y 1,5%.

Se determinó la biomasa producida por la planta para ver en qué grado afecta el medio a la creación de nuevas células y expansión de estas. En la figura 20 se puede observar el aspecto general y el desarrollo de las plantas crecidas en los distintos tratamientos a día de su muestreo a simple vista se ve como el medio del 5% tiene unas plantas visiblemente más pequeñas y con peor aspecto que los otros dos. Además se ve que los cotiledones en muchas todavía no se han abierto debido a su escaso crecimiento.

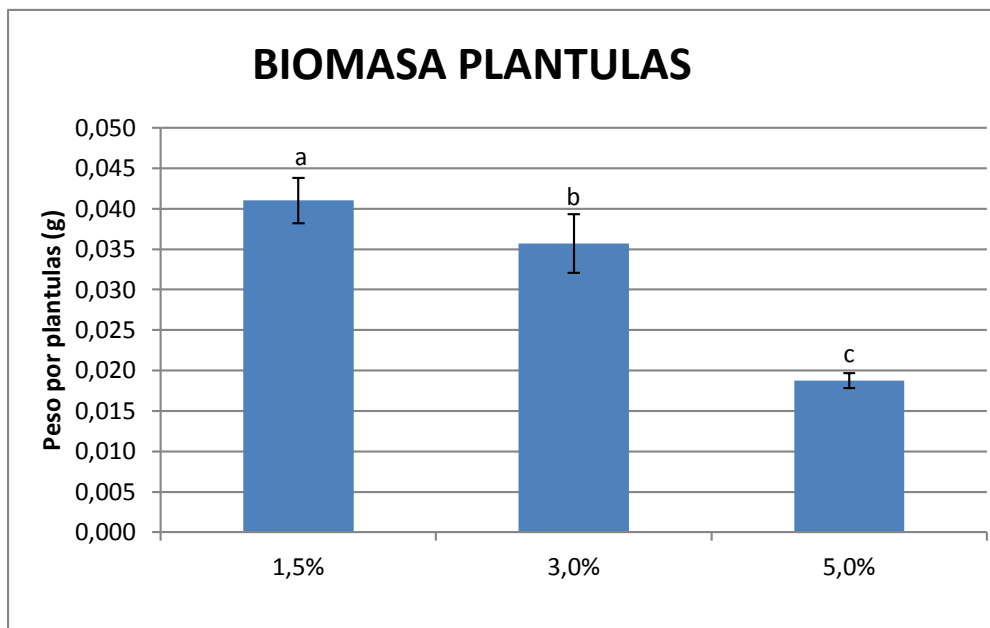


Figura 21: Biomasa por plántulas (g de los diferentes tratamientos con contenidos distintos de agar indicados bajo las columnas. Los valores representan las medias \pm error estándar (n=3). Letras diferentes sobre las distintas columnas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

Esto se ve evidenciado en la Figura 21 en la que se muestra el peso por plántula en gramos de las plantas de los tres tratamientos. La tendencia es a disminuir de manera drástica especialmente para aquellas del tratamiento de 5% que presentan un crecimiento que es la mitad que la de las plantas de tratamiento control.

Las diferencias fueron significativas para los tres tratamientos, ambos niveles de sequía respecto al control y también la sequía moderada respecto a la leve

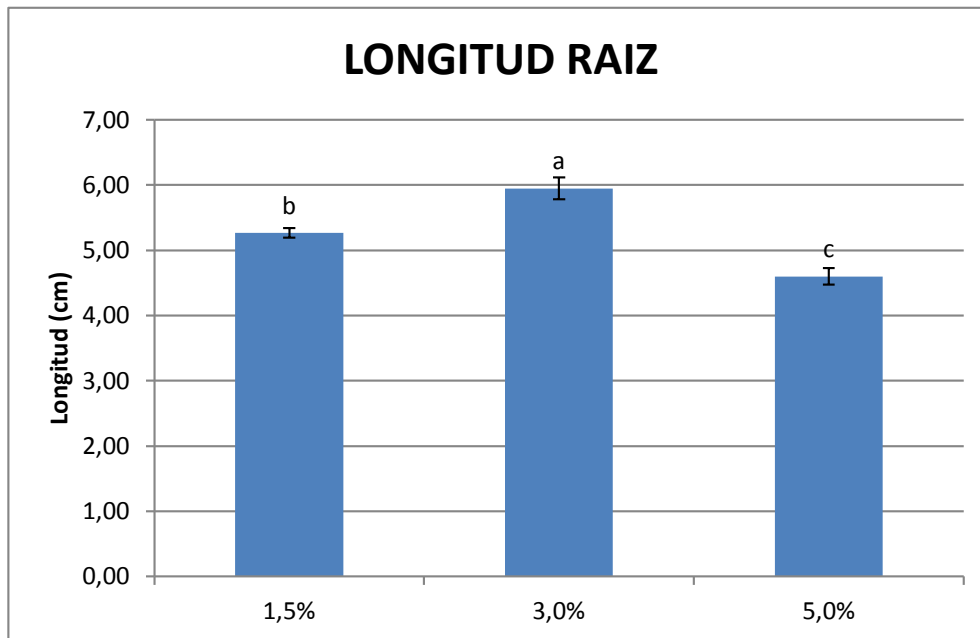


Figura 22: Longitud de la raíz (cm) de los diferentes tratamientos con contenidos distintos de agar indicados bajo las columnas. Los valores representan las medias \pm error estándar ($n=3$). Letras diferentes sobre las distintas columnas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

Como parámetro indicador de biomasa se determinó también la longitud de la raíz (figura 22). Las diferencias no fueron tan claras en este caso, observándose solo un descenso significativo en el tratamiento de sequía moderada. En el caso de la sequía leve, la longitud de la raíces fue superior al de las plantas controles, lo cual podría estar relacionado con la respuesta de la planta ya conocida, de intentar alcanzar capas más profundas en buscar de agua (Sharp et al., 1988).

El descenso de crecimiento de la parte aérea de la planta es una respuesta que junto con el cierre estomático, restringe las pérdidas de agua por evapotranspiración y contribuye a la economía hídrica de la planta en situaciones de estrés (Spollen et al., 1993). Esta respuesta diferencial en el crecimiento de la parte aérea y la raíz a diferentes potenciales hídricos parece ser una estrategia para evitar una excesiva deshidratación (Sharp y Davies, 1989). Se ha comprobado que esta respuesta es común en diferentes especies de plantas (Wu et al., 2008).

4.2.3- Efecto sobre el contenido en carbohidratos

Se determinaron los niveles de carbohidratos para la raíz y parte aérea para ver como se había desarrollado la movilización de las reservas y la respiración en las primeras etapas de la planta.

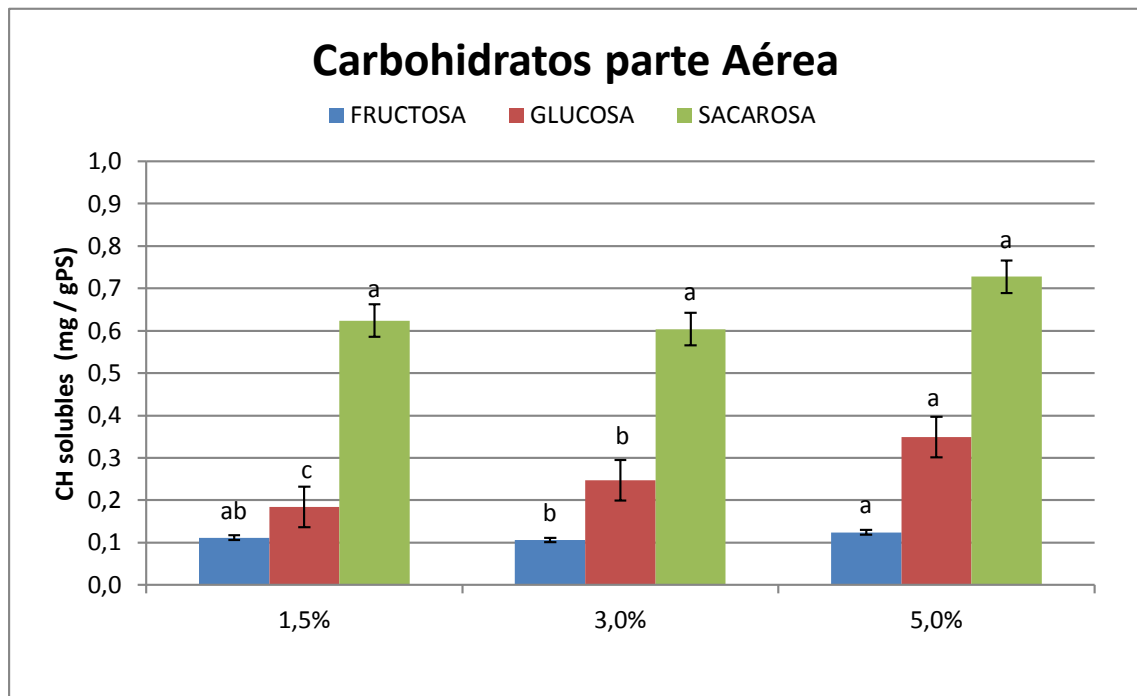


Figura 23: Carbohidratos solubles presentes en la parte aérea por plántulas en mg/g Peso Seco de los diferentes tratamientos con contenidos distintos de agar indicados bajo las columnas. Los valores representan las medias \pm error estándar (n=3). Letras diferentes sobre las distintas columnas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

En La figura 23 se muestran los niveles de fructosa glucosa y sacarosa de la parte aérea de las plantas de *Medicago truncatula*.

Los contenidos de sacarosa y fructosa son similares entre los tres tratamientos. Puede observarse que la sacarosa es el carbohidrato mayoritario en la parte aérea de la planta alcanzando valores 6 veces superiores a los de la fructosa en el tratamiento control. .

Se puede observar una tendencia creciente clara y estadísticamente significativa en el contenido de la glucosa de la parte aérea conforme se reduce el contenido hídrico del sustrato y la biomasa se reduce. Esta acumulación de glucosa, podría indicar una limitación en el crecimiento debido a la baja disponibilidad hídrica, no siendo necesario el suministro de energía que la metabolización de este carbohidrato a través de la respiración proporciona.

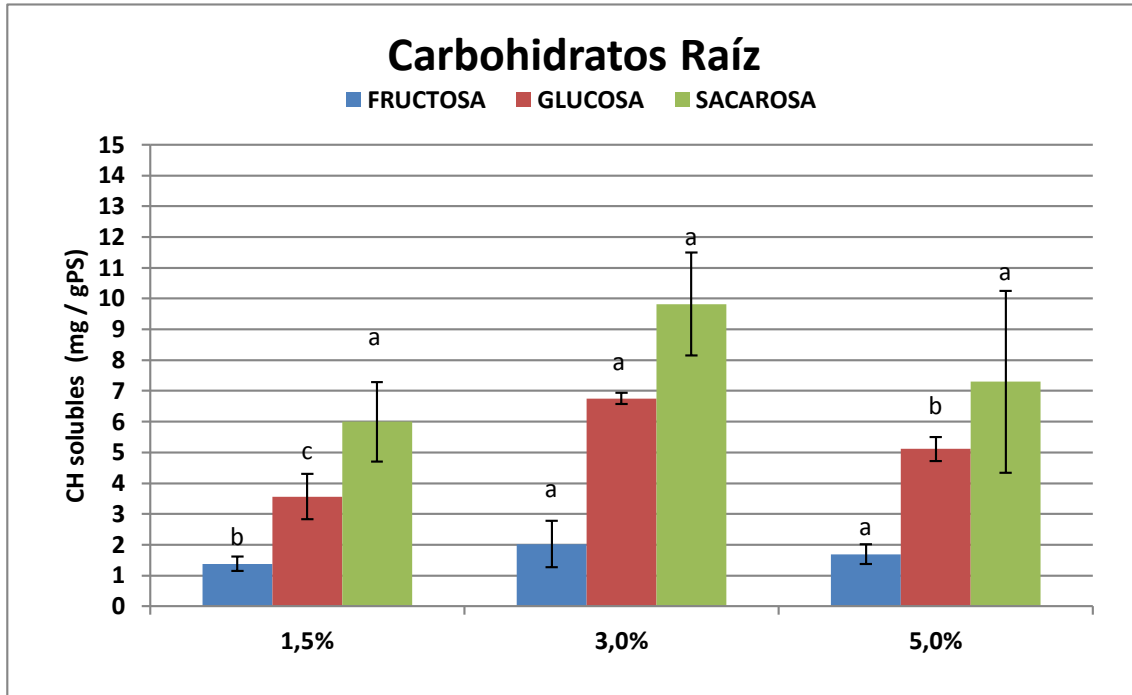


Figura 24: Carbohidratos solubles presentes en la raíz por plántulas en mg/g Peso Seco de los diferentes tratamientos con contenidos distintos de agar indicados bajo las columnas. Los valores representan las medias \pm error estándar ($n=3$). Letras diferentes sobre las distintas columnas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

En La figura 24 se muestran los niveles de fructosa glucosa y sacarosa de la raíz. Puede observarse que los niveles de carbohidratos solubles son mucho más altos en la raíz que en la parte aérea, reflejando la importancia que tiene el desarrollo de este órgano para la futura implantación de la planta. Los niveles de glucosa y sacarosa son bastante similares en este órgano. Al igual que en la parte aérea, los contenidos de sacarosa y fructosa son similares en los tres tratamientos de sequía y no se observan diferencias claras debidas al estrés hídrico. De forma similar a como hemos observado en la parte aérea, e puede observar una tendencia creciente clara y estadísticamente significativa en el contenido de la glucosa conforme se reduce el contenido hídrico del sustrato y la biomasa se reduce.

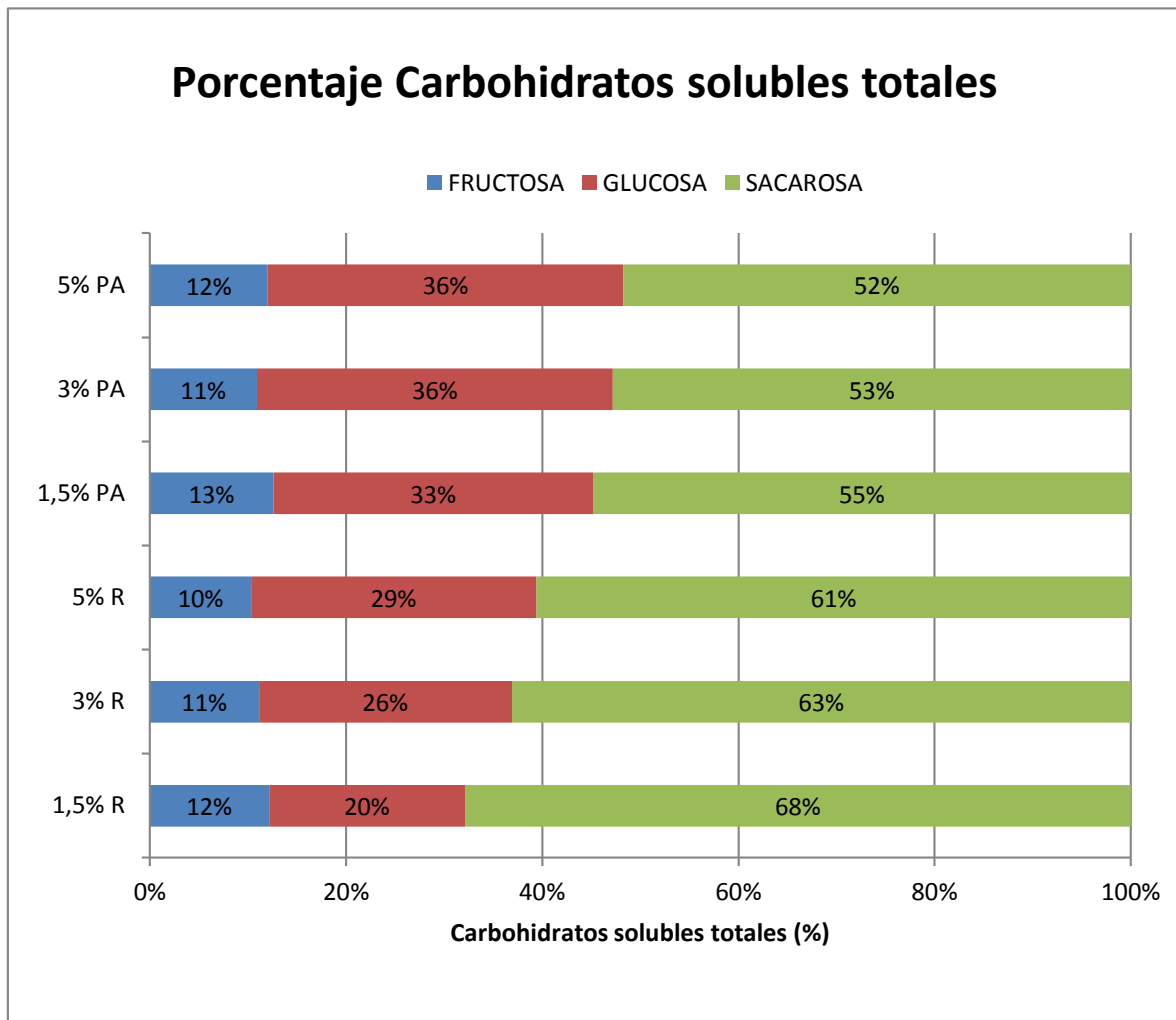


Figura 25: Distribución de los carbohidratos solubles presentes en la planta (%) para los diferentes tratamientos con contenidos distintos de agar y parte de la planta indicados a la izquierda de las columnas siendo (R) raíz y (PA) Parte aérea.

En la figura 25 se pueden ver los contenidos de los distintos carbohidratos en porcentaje en la parte aérea y la raíz de las plantas de los distintos tratamientos.

Puede observarse que el porcentaje de fructosa se mantiene constante y el de sacarosa tiende a descender o a mantenerse, sin embargo el de glucosa aumenta tanto en la raíz como en la parte aérea según se incrementa el nivel de estrés de las plantas.

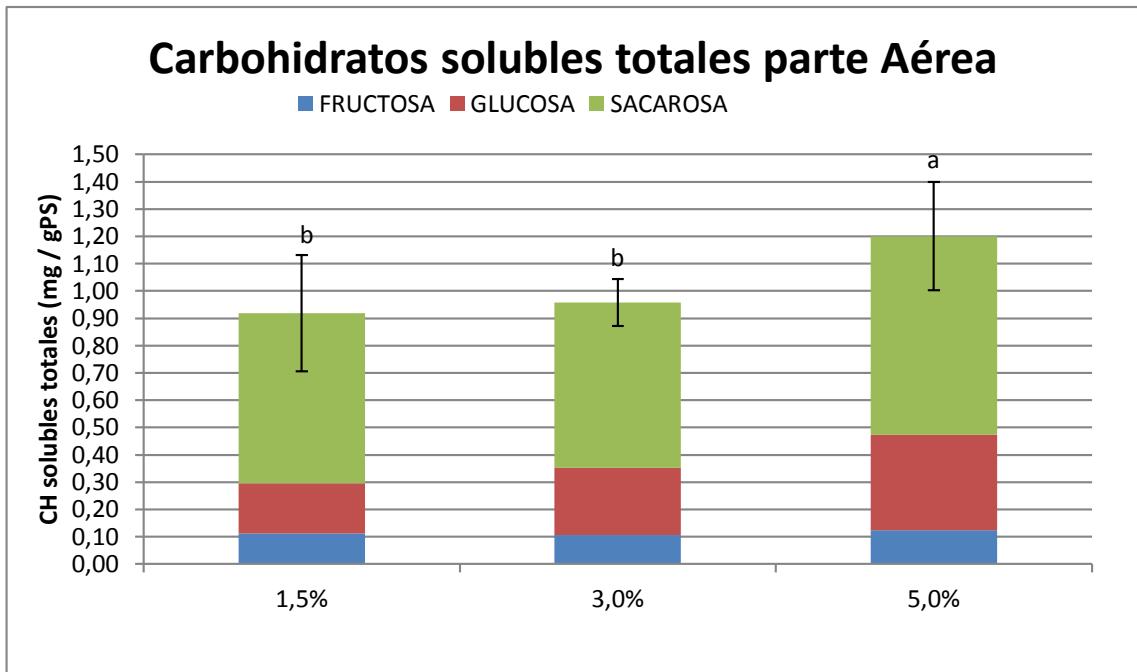


Figura 26: Carbohidratos solubles totales presentes en la raíz por plántulas en mg/g Peso Seco de los diferentes tratamientos con contenidos distintos de agar indicados bajo las columnas. Los valores representan las medias \pm error estándar ($n=3$). Letras diferentes sobre las distintas columnas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

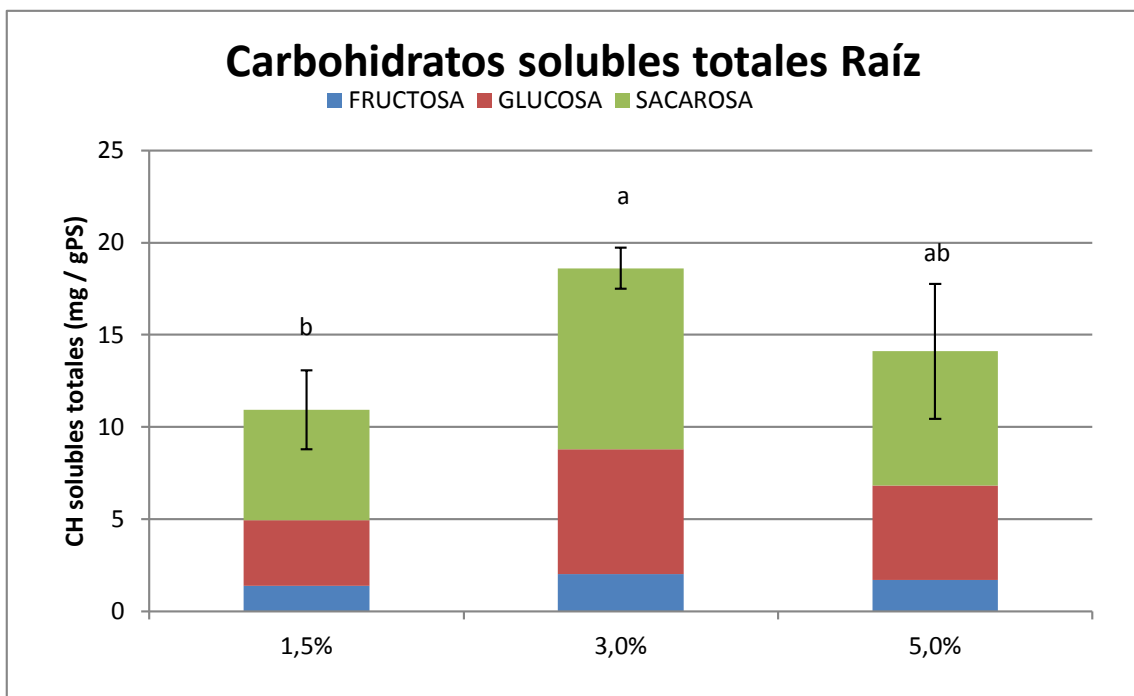


Figura 27: Carbohidratos solubles totales presentes en la raíz por plántulas en mg/g Peso Seco de los diferentes tratamientos con contenidos distintos de agar indicados bajo las columnas. Los valores representan las medias \pm error estándar ($n=3$). Letras diferentes sobre las distintas columnas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

Considerando la suma de los tres carbohidratos solubles analizados en la parte aérea y la raíz podemos observar que en la parte aérea se produce una acumulación en las condiciones de sequía moderada mientras que en la raíz el mayor aumento se observa en condiciones de sequía moderada (Figura 24 y 25). Este comportamiento se podría deber a que las distintas partes de la planta responden a distinto tiempo, siendo esta respuesta más temprana en la raíz que en la parte aérea. De hecho, el potencial osmótico se ve significante afectado en la raíz de las plantas expuestas a sequía leve mientras que no se observa ningún efecto en la parte aérea (Figuras 14 y 15).

4.2.4- Efecto sobre el contenido en almidón

En la figura 28 se muestran los contenidos de almidón de la parte aérea de los distintos tratamientos. Se puede observar una tendencia claramente creciente conforme el contenido de agar aumenta y por tanto el contenido hídrico del sustrato se reduce. Las diferencias son significativas entre los tres tratamientos, ambos niveles de sequía respecto al control y también la sequía moderada respecto a la leve. Estos resultados nos indican el uso que hace la planta de las reservas disponibles. La acumulación de glucosa indica un descenso de las necesidades energéticas al haberse detenido el crecimiento por efecto de la sequía (figura 20). Aunque en este trabajo no se ha determinado la biomasa de la parte aérea de forma específica, en plantas adultas expuestas a condiciones de estrés el crecimiento de la parte aérea se ve afectado antes que el de la raíz (González et al., 1995).

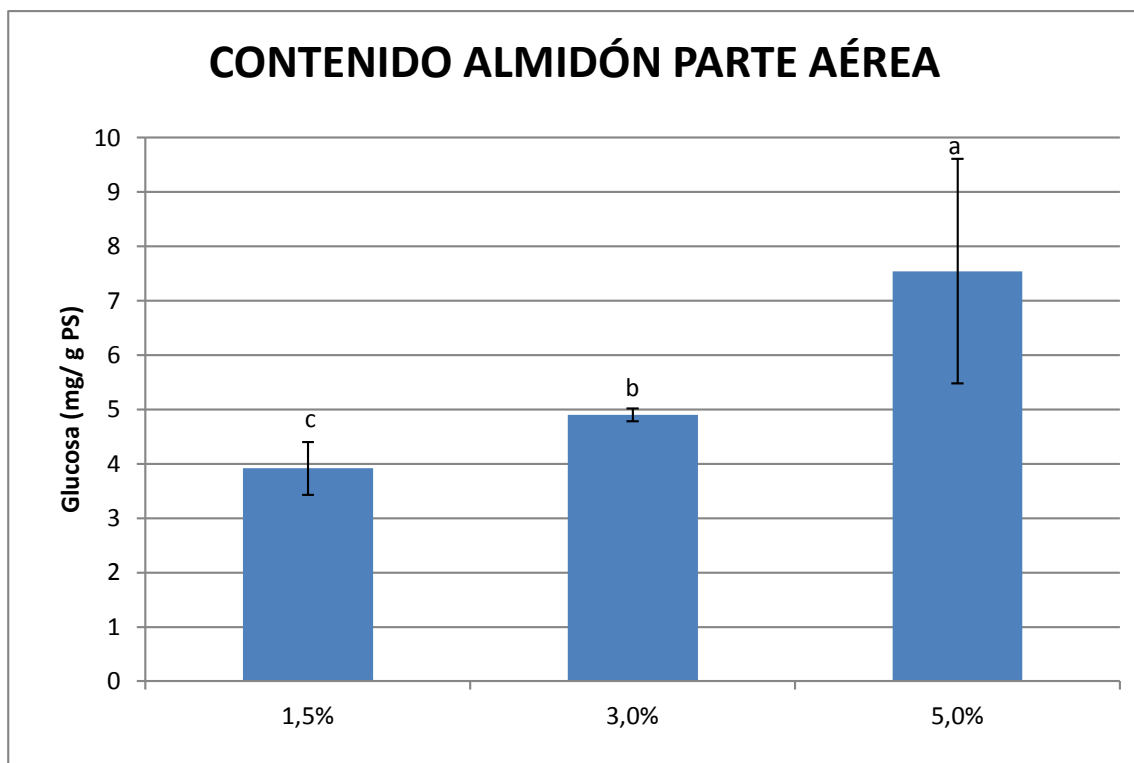


Figura 28: Contenido de almidón en la parte aérea representado como contenido en glucosa (mg/g Peso Seco) de los diferentes tratamientos con contenidos distintos de agar indicados bajo las columnas. Los valores representan las medias \pm error estándar ($n=3$). Letras diferentes sobre las distintas columnas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

Las diferencias nos indican el uso que ha hecho la planta del almidón presente en la semilla. La cantidad que ha pasado a ser glucosa para ser respirada viendo claramente que al haberse detenido el crecimiento por efecto de la sequía las reservas no han sido utilizadas en la creación de energía para la creación de biomasa etc... Siendo esta menor como se pudo observar en la figura 20

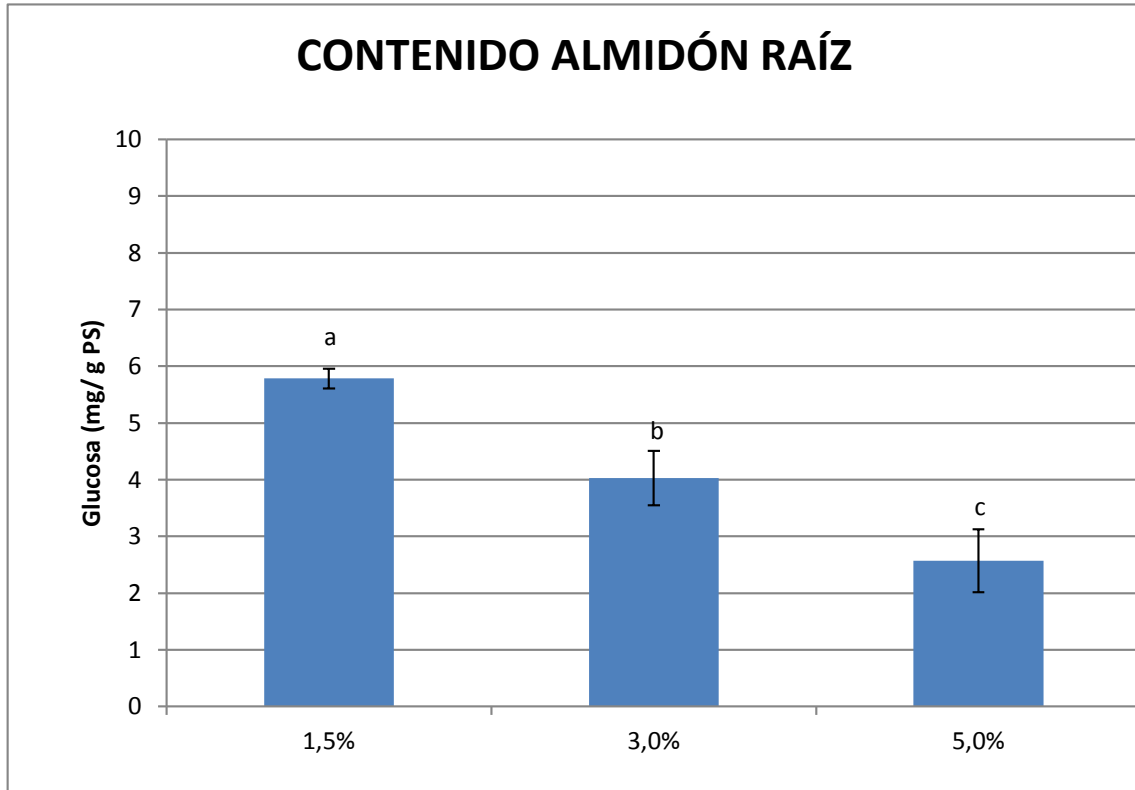


Figura 29: Contenido de almidón en la raíz representado como contenido en glucosa mg/g Peso Seco de los diferentes tratamientos con contenidos distintos de agar indicados bajo las columnas. Los valores representan las medias \pm error estándar ($n=3$). Letras diferentes sobre las distintas columnas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

La figura 29 muestra el contenido de almidón en la raíz. Se observa una tendencia decreciente conforme el contenido hídrico del sustrato se reduce. Estas diferencias son significativas entre sí, ambos niveles de sequía respecto al control y también la sequía moderada respecto a la leve.

Esta tendencia descendente en los contenidos de almidón, contraria a la observada para la parte aérea podría estar relacionada con la distinta estrategia de la raíz frente al estrés hídrico. De hecho como puede observarse en la figura 22 la longitud de la raíz aumento significativamente en el tratamiento de sequía leve, a pesar de que la biomasa total de la planta descendió respecto al control (figura 20). Esto puede deberse a que la movilización de las reservas ha sido mayor en la parte de la raíz con el objetivo de aumentar el crecimiento y

favorecer la absorción de agua para la planta.

Diversos autores (Lee et al., 2008; Regier et al., 2009) han observado que el contenido en almidón disminuye drásticamente en los tratamientos de sequía, datos que coinciden con los obtenidos en este trabajo. En los periodos de déficit, en los cuales se consume más de lo producido tiene lugar la degradación del almidón hasta sacarosa, que es la forma de transporte de carbono en las plantas (Dunford, 2008)

En plántulas como las que son utilizadas en este estudio la fotosíntesis no es todavía un proceso activo y las reservas que presentan los distintos órganos proceden en principio de las reservas acumuladas en la semilla. De hecho los niveles de almidón observados son muy inferiores a los determinados en plantas adultas de *Medicago truncatula* en otros estudios (Rodríguez, 2012 TFC) en los cuales los niveles de almidón en hojas llegaban a ser de 400-500 μ moles por g peso seco.

Cuando se produce un crecimiento activo la célula comienza a degradar almidón para disponer de sacarosa que transportan al resto de la planta y que utilizar en forma de glucosa y fructosa para el mantenimiento de las actividades metabólicas. La acumulación de glucosa en ambas partes de la planta podría estar relacionado con el descenso generalizado del crecimiento, sin embargo el metabolismo del almidón parece estar regulado de forma diferente en la raíz y en la parte aérea.

5-CONCLUSIONES

- EL uso de concentraciones crecientes de agar es útil para imponer distintos niveles de estrés en condiciones de cultivo controladas y permite regular el nivel de estrés que alcanzan las plantas. En este trabajo se han utilizado las concentraciones, 1,5% para el tratamiento control, 3% para imponer un estrés leve (-1 MPa) y un 5% para imponer niveles de sequía moderados (-1,5 MPa).
- Mediante el uso del método puesto a punto, se pudieron reproducir algunos de los efectos más conocidos del estrés hídrico y que han sido estudiado en plantas adultas.
- EL estrés hídrico provocó un descenso del potencial hídrico y osmótico que se detectó en condiciones de sequía leve en la raíz y solo en condiciones de sequía moderada en la parte aérea.
- En estas condiciones la biomasa de la planta se vio significativamente reducida en ambos niveles de estrés.
- El metabolismo de los azúcares solubles y almidón se vio afectado por el estrés, reflejando un descenso en la demanda energética a nivel de parte aérea y un metabolismo activo a nivel de la raíz en concordancia con un aumento en la longitud de este órgano como respuesta al estrés hídrico.

6-BIBLIOGRAFÍA

Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (2008) *Fundamentos de fisiología vegetal*. Barcelona: Ed. Interamericana-Mc Graw-Hill.

Barker, David G., y otros. (2006) *Growing M. truncatula: choice of substrates and growth conditions* In U Mathesius, ed, *The Medicago truncatula Handbook*. The Samuel Roberts Noble Foundation, Ardmore, OK, <http://www.noble.org/MedicagoHandbook/> *Medicago Truncatula Handbook*.

Boyer, J.S. (1982) *Plant productivity and the environment*. *Science*, 218:443-448.

Dent, D. y young, A. (1981) *Soil survey and land evaluation*. Londres : George Allen & Unwin.

Dunford S., (2010) *Translocation in the phloem*. En: Taiz, L., Zeiger, E. (Eds.), *Plant Physiology*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, pp 271-305.

Emmert FH (1974) *Inhibition of phosphorus and water passage across intact roots by polyethylene glycol and phenylmercuric acetate*. *Plant Physiol* 53: 663-665.

Freeman, S. (2010) *Fundamentos de Biología*. s.l. : ADDISON-WESLEY, 2010.

Gálvez L, González EM and Arrese-Igor C (2005) *Evidence for carbon flux shortage and strong carbon/nitrogen interactions in pea nodules at early stages of water stress*. *J Exp Bot* **56**, 2551-2561.

González E.M., A.J. Gordon, C.L. James and C. Arrese-Igor (1995) *The role of sucrose synthase in the response of soybean nodules to drought*, *Jl Exp Bot* 46:1515-1523

González EM, Aparicio-Tejo PM, Gordon AJ, Minchin FR, Royuela M y Arrese-Igor C (1998) *Water-deficit effects on carbon and nitrogen metabolism of pea nodules*. *J Exp Bot* **49**, 1705-1714.

Hsiao TC. (1973) *Plant response to water stress*. *Ann. Rev. Plant Physiol*. 24: 519-570.

Kaufmann MR y Eckard AN (1971) *Evaluation of water stress control with polyethylene glycols by analysis of guttation*. *Plant Physiol* 47: 453-456.

Larrainzar E., S. Wienkoop, W. Weckwerth, R. Ladrera, C. Arrese-Igor, y E. M. González (2007) *Medicago truncatula Root Nodule Proteome Analysis Reveals Differential Plant and Bacteroid Responses to Drought Stress*, *Plant Physiol* 144: 1495-1507

Larrainzar E., S. Wienkoop, C. Scherling, S. Kempa, R. Ladrera C. Arrese-Igor, W. Weckwerth y E. M. González (2009) *Carbon Metabolism and Bacteroid Functioning Are Involved in the Regulation of Nitrogen Fixation in Medicago truncatula Under Drought and Recovery*. *M.P.M.I.*

22:1565-1576

Lee, Y. N., Gao, Y. y Wang, H. Y. (2008). *Differential mediation of the Wnt canonical pathway by mammalian Dishevelleds-1, -2, and -3.* *Cell Signal.* 20, 443-452.

Limami A.M., C. Ricoult, E. Planchet, E.M. González, R. Ladrera, E. Larrainzar, C.Arrese-Igor, F. Merchan, M. Crespi, F. Frugier, K. Avia, I. Lejeune-Hénaut. (2007). *Response of Medicago truncatula to abiotic stress In U Mathesius, ed, The Medicago truncatula Handbook. The Samuel Roberts Noble Foundation, Ardmore, OK, <http://www.noble.org/MedicagoHandbook/>.*

MacRae JC. (1971). *Quantitative measurement of starch in very small amounts of leaf tissue.* *Planta* 96: 101-108.

Mexal J, Fisher JT, Osteryoung J y Reid CPP (1975) *Oxygen availability in polyethylene glycol solutions and its implications in plant water relations* *Plant Physiol* 55:20-24.

Munns R, Brady CJ y Barlow EWR (1979) *Solute accumulation in the apex and leaves of wheat during water-stress.* *Aust J Plant Physiol* 6: 379-389.

Naya L., R. Ladrera, J. Ramos, E. M. González, C. Arrese-Igor, F. R. Minchin, y M. Becana (2007) *The Response of Carbon Metabolism and Antioxidant Defenses of Alfalfa Nodules to Drought Stress and to the Subsequent Recovery of Plants.* *Plant Physiol* 144:1104-1114

Rodríguez M. (2012) *Trabajo fin de carrera: flujos de carbono-nitrógeno en plantas de medicago truncatula en condiciones de estrés hídrico.*

Regier N., Streb S., Coccozza C., Schaub M., Cherubini P., C. Zeeman S., Frey B. (2009) *Drought tolerance of two black poplar (Populus nigra L.) clones: contribution of carbohydrates and oxidative stress defense.* *Plant, Cell Environ* 32: 1724-1736.

Rubio MC, González EM, Minchin FR, Webb KJ, Arrese-Igor C, Ramos J y Becana M (2002) *Effects of water stress on antioxidant enzymes of leaves and nodules of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutases.* *Physiol Plant* 115, 531-540.

Sharp, R.E., Davies, W.J. (1989) *Regulation of growth and development of plants growing with a restricted supply of water. In: Plants under stress, pp. 72- 93, Jones, 1-1 .G., Flowers, T .L., Jones, M.B., eds. Cambridge University Press, London.*

Sharp R.E., Silk W.K., Hsiao T.C. (1988). *Growth of the maize primary root at low water potentials. Spatial distribution of expansive growth.* *Plant Physiol* 87: 50-57.

Siebert, S., V. Henrich, K. Frenken, J. Burke. (2013) *FAO. AQUASTAT. [En línea] 2013. <http://www.fao.org/nr/water/aquastat/irrigationmap/index.stm>.*

Spollen WG., Sharp RE., SAab IN., Wu Y., (1993). *Regulation of cell expansion in root and shoots at low water potentials. En: Water deficits: Plant responses from cell to community. Eds. Smith JAC and Griffiths H. p. 37-52. BIOS Scientific Publishers, Oxford.*

Taiz, L. y Zeiger, E. (1998) *Plant Physiology*. Sunderland : Ed. Sinauer Associates , 1998.

Warren CR, Adams MA. (2000) *Capillary electrophoresis for the determination of major amino acids and sugars in foliage: application to the nitrogen nutrition of sclerophyllous species*. *J. Exp. Bot.* 51: 1147-1157.

Wu, S., L. J. Mickley, E. M. Leibensperger, D. J. Jacob, D. Rind, and D. G. Streets (2008), *Effects of 2000–2050 global change on ozone air quality in the United States*, *J. Geophys. Res.*, 113, D06302, doi:10.1029/2007JD008917.