

VARIACIÓN EN LA TOLERANCIA AL ESTRÉS SALINO DE 30 CULTIVARES DE GARBANZO (*CICER ARIETINUM L.*) EN SIMBIOSIS CON *MESORHIZOBIUM CICERI*.

Luís A. Gómez¹, Vincent Vadez², Hélène Payre³, Catherine Purot³ y Jean Jacques Drevon³.

1. Departamento de Nutrición y Agrobiología. Instituto de Suelos. E-mail: gomezjo@minag.cu.

2. International Crops Research Institute for Semi-Arid Tropics (ICRISAT), India. E-mail: v.vadez@cgiar.org.

3. INRA-IRD-SUPAGRO, UMR1222, Montpellier, Francia. E mail: drevonji@supagro.inra.fr

Introducción.

El garbanzo (*Cicer arietinum L.*) es la tercera leguminosa más cultivada en todo el mundo, solamente superada en áreas de siembra por el frijol común y el chícharo (Graham y Vance, 2003). La importancia agronómica del garbanzo está relacionada con la alta concentración en proteínas que tienen sus granos ($\approx 27\%$), aspecto que lo hace atractivo para el consumo animal y humano, convirtiéndolo cada vez más en una fuente alternativa de suministro de proteínas (Tejera *et al.*, 2006).

Sin embargo diferentes reportes internacionales (Graham y Vance, 2003; Flowers *et al.*, 2009) han indicado que la salinidad es uno de los mayores estreses abióticos que afectan el crecimiento, la fijación de N_2 y la producción de granos en las leguminosas a nivel mundial. Estudios recientes (Instituto de Suelos, 2007) muestran que la situación en las áreas de siembra en Cuba no es muy diferente, pues cerca de un millón de hectáreas están afectadas por salinidad.

El garbanzo es una especie de planta muy sensible a la salinidad, reconociéndose también entre las simbiosis con rizobio más sensibles a la sal (Katerji *et al.*, 2003; Vadez *et al.* 2007; Flowers *et al.*, 2009). La adaptación del garbanzo a la salinidad dependerá de que se puedan identificar líneas y fuentes de tolerancia, así como del entendimiento de la base genética a la tolerancia a este estrés (Vadez *et al.*, 2007).

Los reportes relacionados con las diferencias entre genotipos de garbanzo a la tolerancia a la salinidad han sido relacionados con i) estabilidad en la conductancia nodular al oxígeno y la capacidad para formar nódulos bajo estrés salino (Sadiki y Rabi ; Garg y Singla, 2004, L'Taief *et al.*, 2006, 2007; Flowers *et al.*, 2009) y ii) los genotipos de tipo *desi* muestran más alta tolerancia que los de tipo *kabuli* (Vadez *et al.*, 2007, Flowers *et al.*, 2009).

Internacionalmente Vadez *et al.*, 2007 identificaron 15 líneas sensibles y 15 tolerantes entre 263 cultivares de garbanzo procedentes del banco de germoplasma del ICRISAT, pero no investigaron las diferencias fisiológicas en tolerancia relacionadas al proceso de fijación de N_2 . Por todo lo anteriormente comentado el presente trabajo tuvo como objetivo principal evaluar la tolerancia al estrés salino de 30 líneas de garbanzo provenientes del ICRISAT, estudiando parámetros relacionados con el proceso de fijación simbiótica del N_2 .

Materiales y Métodos.

Para el cultivo de las plantas, las semillas de garbanzo (*Cicer arietinum L.*) fueron previamente esterilizadas con una solución de hipoclorito de calcio al 2 % por espacio de 10 minutos y posteriormente se lavaron con H_2O destilada estéril. Las semillas fueron entonces germinadas en papel de filtro estéril e incubadas en laboratorio en la oscuridad a $28^{\circ}C$ durante 48 h, pasado este tiempo se transfirieron al invernadero Complejo de Investigaciones INRA – IRD – SupAgro de la ciudad de Montpellier en Francia.

A los cuatro días de germinadas, las plántulas fueron transferidas a cajas plásticas de 45 L de capacidad (20 plantas por caja) o frascos de cristal de 1 L de capacidad (1 planta por frasco) conteniendo solución nutritiva intensamente aireada (400 ml de aire L de solución $^{-1}$ min. $^{-1}$), de acuerdo a la metodología descrita por Drevon *et al.*, 1988.

La solución nutritiva fue remplazada cada semana excepto los primeros 15 días. El suministro de N a las plantas se garantizó por vía de la fijación simbiótica del N_2 , inoculando los frascos o

las cajas con 1 ml por L de solución de la cepa de *Mesorhizobium ciceri* **UPMCA 7**. Para garantizar el N necesario para el crecimiento de las plantas en los primeros 15 días cuando no tenían nódulos se añadió a la solución 1 mM de N en forma de urea. A partir del primer cambio la solución añadida a las cajas o los frascos estuvo libre de N.

Durante la experiencia realizada entre los meses de Enero y Marzo del 2008 se evaluaron **28 líneas** de garbanzo provenientes del Instituto Internacional de Investigaciones de los Cultivos para el Trópico Semiárido (ICRISAT, siglas en inglés), las que correspondieron a: 1) ICC 12 968 (ICCV2); 2) ICC 15 996 (ICCV10); 3) ICC 67; 4) ICC 867; 5) ICC 1431; 6) ICC 1915; 7) ICC 25 831; 8) ICC 3946; 9) ICC 4495; 10) ICC 4593; 11) ICC 5003; 12) ICC 5337; 13) ICC 6263; 14) ICC 6306; 15) ICC 8058; 16) ICC 8522; 17) ICC 8950; 18) ICC 9942; 19) ICC 10885; 20) ICC 11121; 21) ICC 12155; 22) ICC 13357; 23) ICC 15518; 24) ICC 15610; 25) ICC 17258 (ICC 96029); 26) JG 11; 27) CSG 8962; 28) ICC 4973(L550), además de las variedades *INRAT 93.1* y *Amdoun*, del INRA de Túnez. El esquema experimental quedó conformado por un factorial de **30 cultivares x 2 niveles de salinidad** con cuatro replicas organizados en bloques al azar.

A los 45 días de edad las plantas a los dos niveles de salinidad de ocho cultivares (ICCV 10, ICC 1915, ICC5337, ICC 11121, ICC 13357, ICC 4973, INRAT 93.1 y Amdoun) se transfirieron a frascos de cristal de 1L de capacidad para realizar los estudios del consumo de oxígeno de las raíces noduladas según el método descrito por Jebara y Drevon, 2001, adaptado para garbanzo por L'Taief *et al.*, 2007).

Las plantas se cortaron a los 70 días de edad, para determinar peso seco de la parte foliar, las raíces y los nódulos a partir de incubar los diferentes órganos a 70 °C durante tres días. Los datos fueron procesados por análisis de varianza para hallar diferencias entre genotipos, niveles de salinidad e interacción entre los factores empleando el paquete estadístico MSTATC versión 1.42 (CIAT, 1988).

Resultados y Discusión.

La salinidad ejerció un efecto depresivo diferencial sobre el crecimiento de las plantas de las 30 líneas de garbanzo provenientes del ICRISAT (Figura 1), independientemente del potencial de fijación simbiótica del N₂ exhibido por estas líneas. Pues por un lado genotipos con un alto potencial para fijar N₂ como ICC 8522 se mostraron muy sensibles, en cambio otros con más bajo potencial como ICC 4973 se manifestaron muy tolerantes (Figura 1), fenómeno que quedó más aclarado cuando se expresó la producción de biomasa foliar en condiciones de salinidad como por ciento de crecimiento con respecto al control (Figura 2).

Así la proporción de crecimiento en condiciones de salinidad con respecto al control (% de crecimiento) obtenida en la población de genotipos estudiados varió desde 12 a 99 % (Figura 2) mostrando que existió una alta variabilidad en la tolerancia a la salinidad entre los 30 cultivares estudiados.

La disminución en el crecimiento foliar provocado por el efecto del estrés salino en las plantas de los 30 genotipos evaluados (Figura 1), estuvo asociado al decrecimiento en la producción de biomasa nodular (Figura 3), fenómeno más relacionado con la baja en el número de nódulos producidos por plantas, que con la pérdida de peso individual de los mismos (Datos no mostrados), pues en condiciones de estrés salino las plantas produjeron menos nódulos, pero en compensación nódulos de mayor tamaño.

Lo anteriormente planteado quedó más claramente mostrado cuando se correlacionó el crecimiento foliar y nodular a los dos niveles de salinidad estudiados (Figura 4), en la cual se muestra que el crecimiento de las plantas de los 30 genotipos estudiados dependió en gran medida de la capacidad de las mismas de producir biomasa nodular, a los dos niveles de salinidad en que se cultivaron las plantas, observándose que en condiciones de salinidad esta dependencia se hizo más marcada.

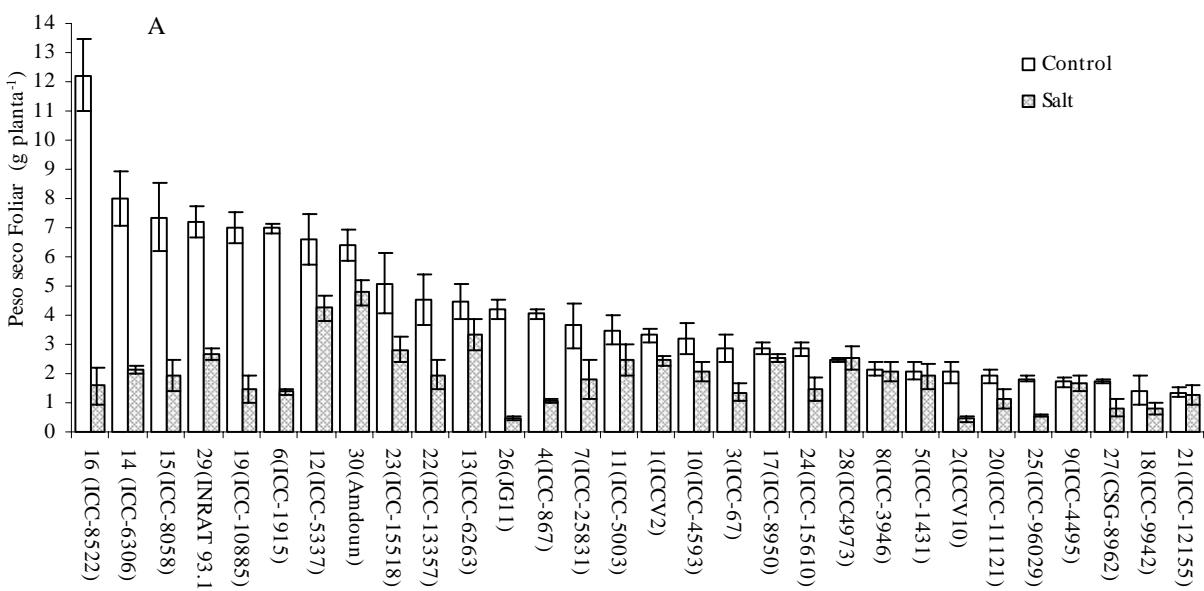


Figura 1. Producción de biomasa foliar en plantas de 30 líneas de garbanzo **inoculadas** con *Mesorhizobium* y cultivadas a dos niveles de salinidad 0 y 25 mM de NaCl. Los valores representan la media de cuatro réplicas.

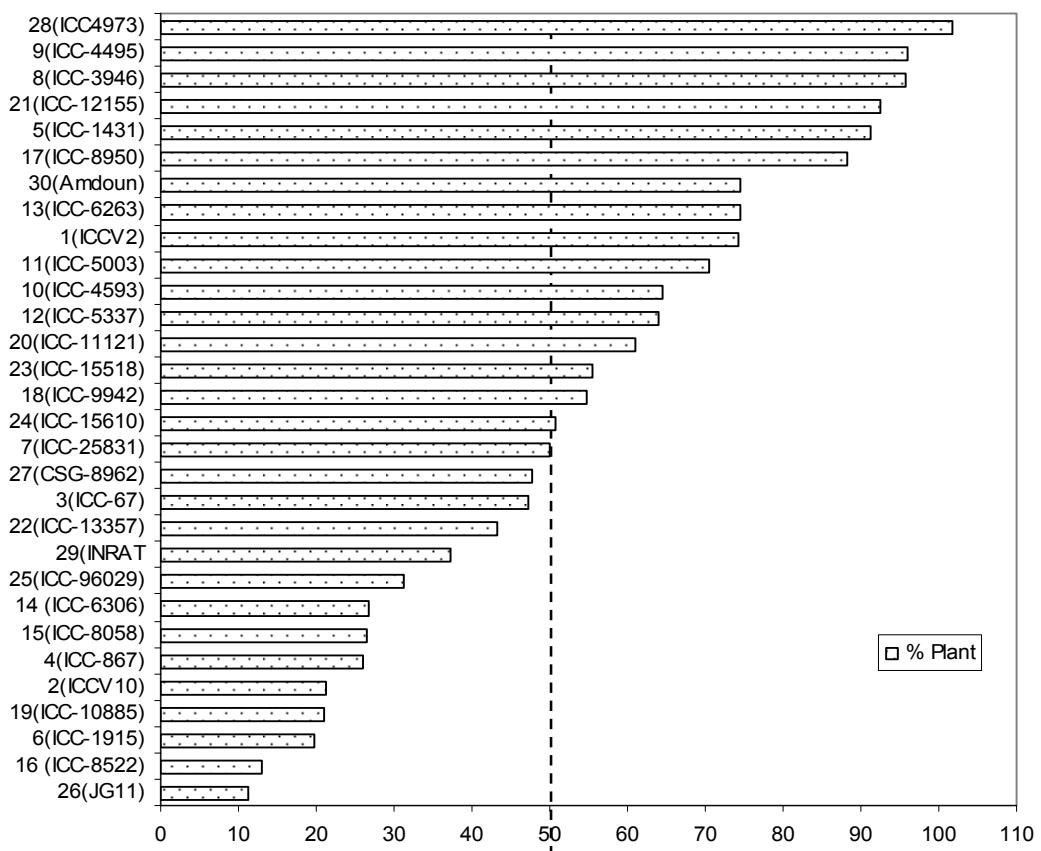


Figura 2. Efecto del estrés salino (25 mM NaCl) sobre el crecimiento foliar (expresado % con respecto al tratamiento Control) en plantas de 30 cultivares de garbanzo **inoculadas** con *Mesorhizobium*.

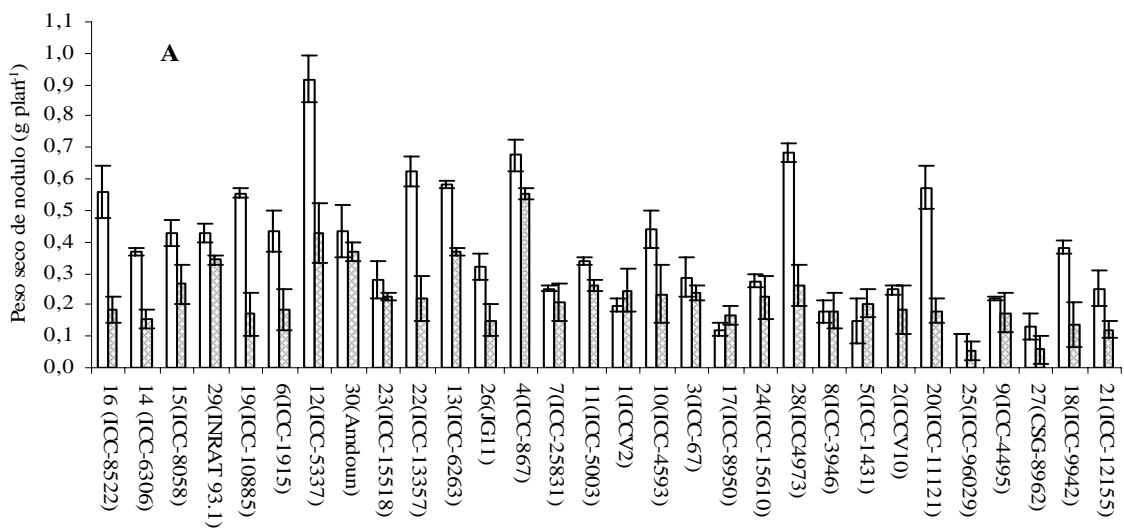


Figura 3. Producción de biomasa nodular en plantas de 30 líneas de garbanzo **inoculadas** con Mesorhizobium y cultivadas a dos niveles de salinidad 0 y 25 mM de NaCl. Los valores representan la media de cuatro replicas.

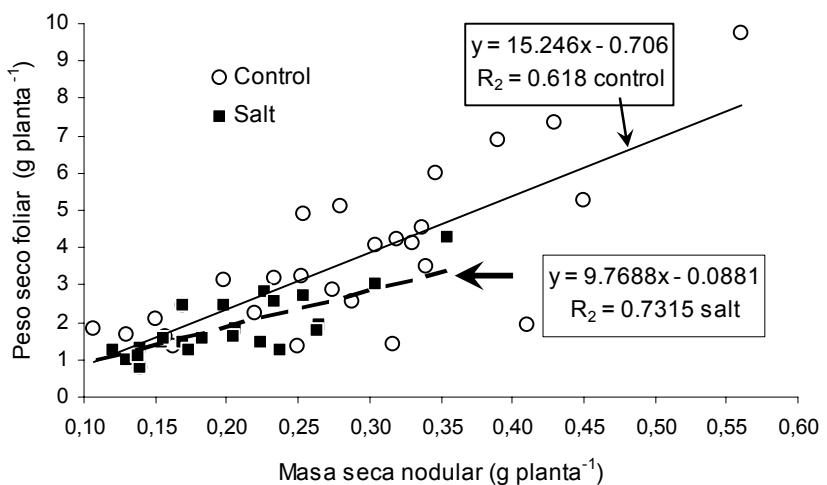


Figura 4. Correlación lineal entre la producción de unidades de peso foliar y unidades de nódulos producidas en plantas de 30 cultivares de garbanzos cultivados a dos niveles de salinidad 0 mM de NaCl (Control) y 25 mM de NaCl (SALT).

Por otro lado al analizar el número de unidades de parte foliar producidas por cada unidad de nódulo a los dos niveles de salinidad (valor de la pendiente en las dos ecuaciones) la que se considero como actividad nodular (Figura 4), se pudo comprobar que la *actividad nodular media* de los 30 cultivares evaluados se vio significativamente afectada por el estrés salino, pues las plantas controles mostraron una actividad de 15,25 g de biomasa foliar producida por unidad de nódulo; mientras las plantas cultivadas en condiciones de salinidad solo 9,77 g de biomasa foliar producida por unidad de nódulo es decir el estrés salino provocó un *decrecimiento medio de este parámetro del 36 %*.

Se debe destacar también en este ensayo tres aspectos importantes: i) la población de garbanzo evaluada exhibió una alta variabilidad para producir biomasa y número de nódulos a los dos niveles de salinidad estudiados (Figura 1 y 3) y ii) cuatro de los genotipos (ICC 8522, ICC 6306, ICC 8058, ICC 10885) que mas alto potencial de crecimiento exhibieron o potencial de fijación de N_2 teniendo en cuenta las condiciones de crecimiento (Figura 1), mostraron también un alto potencial para producir nódulos (Figura 3) y iii) por lo general los nódulos producidos por las plantas en condiciones de salinidad fueron de mayor tamaño que los que produjeron las plantas controles (dato no mostrado).

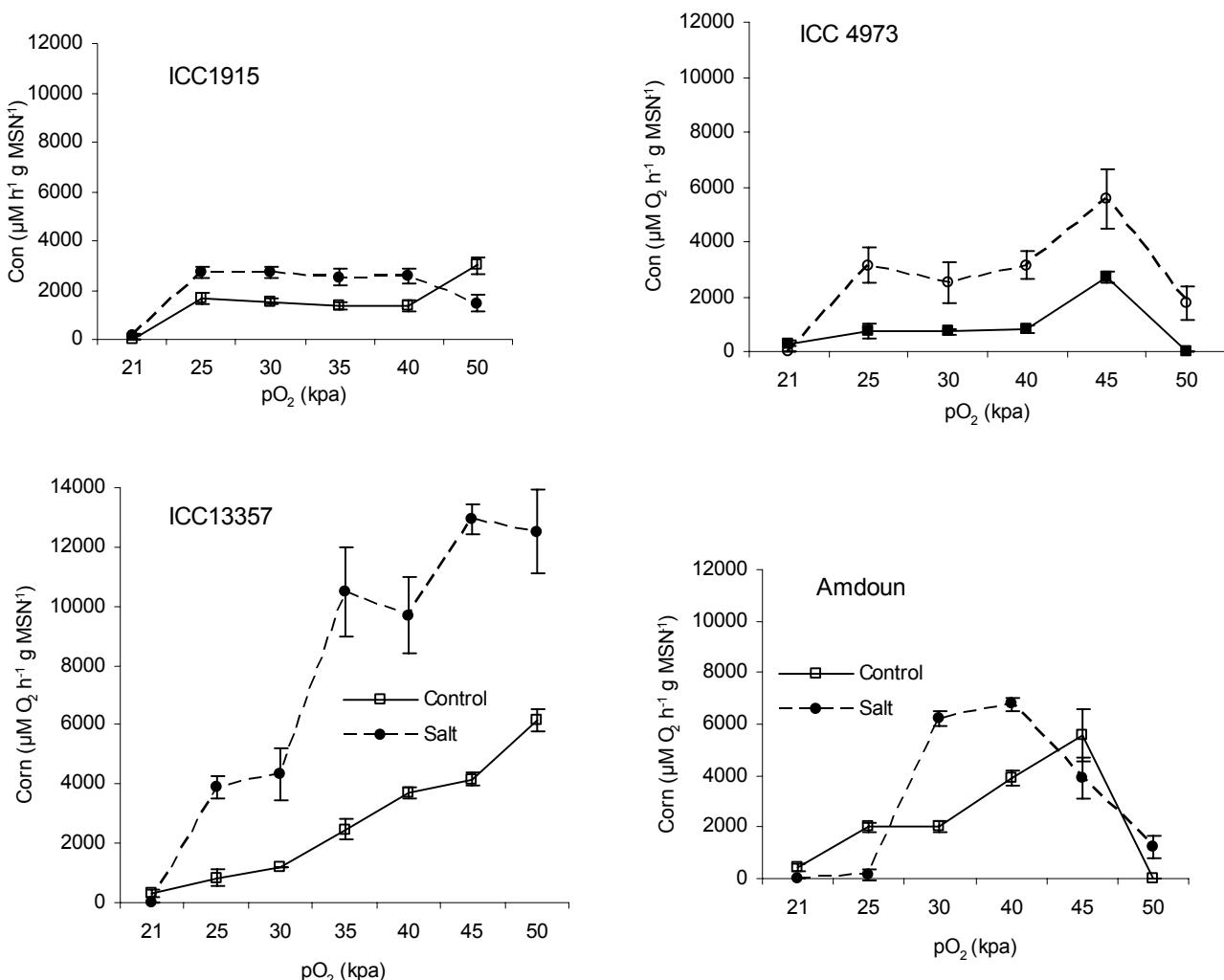


Figura 5. Consumo específico de oxígeno de las raíces noduladas (μM de $O_2 h^{-1} g$ de biomasa nodular $^{-1}$) en plantas de 45 días de edad de cuatro genotipos de garbanzo cultivados a dos niveles de salinidad (0 y 25 mM de $NaCl$) y siete presiones parciales de O_2 . Los valores provienen de la media de 6 replicas.

El parámetro **consumo específico de O_2** incrementó significativamente al aumentar la presión parcial de O_2 suministradas a las raíces noduladas (Figuras 5), tanto en las plantas controles como en las plantas cultivadas en condiciones de salinidad. El análisis del comportamiento de este parámetro en las plantas de los cuatro cultivares incluidos en el estudio arrojo que existieron tres tipos: i) nódulos que consumieron más O_2 en condiciones de estrés que en medio

nutritivo adecuado (*ICC 1915* e *ICC 13357*), ii) los nódulos de las plantas controles consumieron siempre más O₂ que los de las plantas cultivadas en condiciones de estrés (*ICC 4973*) y iii) un comportamiento alternativo (*Amdoun*).

Tabla 1. Consumo **específico** de O₂(**expresado en % con respecto al control**) de las raíces noduladas de plantas cultivadas 25mM de NaCl de ocho cultivares de garbanzo.

Cultivares	Tolerancia a la sal (<i>Vadez et al., 2007</i>) (<i>L Taeif et al., 2007</i>)	Tolerancia a la sal (En este ensayo)	Tipo	pO ₂ (21%)	pO ₂ (optima)
ICCV10	Tolerante	Sensible	<i>Desi</i>	33,6	111,1*
ICC1915	Sensible	Sensible	<i>Desi</i>	58	164
INRAT 93.1	Tolerante	Sensible	<i>Kabuli</i>	85,4	89,77
ICC5337	Sensible	Tolerante	<i>Kabuli</i>	102	145,2
Amdoun	Sensible	Tolerante	<i>desi</i>	31,4	174,2
ICC4973	Tolerante	Tolerante	<i>Kabuli</i>	88	205,5
ICC13357	Sensible	Sensible	<i>Kabuli</i>	19,23	311,5
ICC11121	Tolerante	Tolerante	<i>desi</i>	100	179,8
Media	-	-	-	64.70	172.6

La selección de los genotipos a estudiar en las pruebas de oximetria estuvieron asociados a los resultados alcanzados por L Taeif et al 2007 y Vadez et al., 2007, por ello se incluyeron en estos ensayos cuatro genotipos sensibles y cuatro tolerantes, así como también se tuvo en cuenta las diferencias en tipo de crecimiento y por tanto se consideraron cuatro genotipos de tipo *kabuli* y cuatro *desi* (Tabla 1).

De acuerdo a los resultados alcanzados en este ensayo, en el que se consideró la línea divisoria del 50 % del crecimiento en condiciones de estrés salino con respecto al control (Figura 2), como rasgo para definir la sensibilidad o la tolerancia de un genotipo (Flowers et al., 2009), así se observo coincidencia en los resultados alcanzados en solo cuatro (ICC 1915; ICC 4973; ICC 13357 e ICC 11121) de los ocho genotipos evaluados (Tabla 4), y por tanto la mayor parte de los comentario sobre el consumo de O₂ de los nódulos en las variedades sensibles y tolerantes se realizaron principalmente considerando este importante detalle.

La información mostrada en la Tabla 1 expone a manera de resumen que el consumo medio de O₂ de los nódulos de las plantas sometidas a estrés salino de los ocho cultivares estudiados a pO₂ similar a la de la atmósfera fue solo del 65 % del consumo de O₂ de los nódulos de las plantas controles, por el contrario a pO₂ optimas este consumo resulto ser del 168 %.

Al realizar la comparación entre cultivares teniendo en cuenta el funcionamiento de los nódulos se pudo comprobar que, por ejemplo los nódulos bajo estrés salino de dos **variedades sensibles** como *ICC 1915* e *ICC 13357* consumieron proporcionalmente diferentes cantidades de O₂ a pO₂ de 21 % (Tabla 1), en cambio en el caso de cultivares tolerantes como *ICC 4973* e *ICC 11121* las diferencias entre ellas no fueron tan marcadas, aunque se noto en los dos casos que los nódulos de las plantas de las variedades con granos de tipo *desi* consumieron mas O₂ que las de tipo *kabuli*, si bien este no fue un comportamiento realmente claro en todo el ensayo (Tabla 1).

Diferencias en tolerancia al estrés salino en la especie garbanzo relacionada a genotipo ha sido reportado con anterioridad (Sadiki y Rabit, 2001; Garg y Singla, 2004; Tejera et al., 2006; Vadez et al., 2007; L Taeif et al 2006, 2007; Flowers et al., 2009), sin embargo el presente trabajo muestra un resultado basado en una amplia diversidad, la cual es bien representativa de la especie, aspecto imprescindible cuando se quieren hacer conclusiones generales para una especie de leguminosa como el garbanzo (Flowers et al., 2009).

El estrés salino decreció la relación media de unidades de biomasa foliar producida por unidad de nódulo (actividad nodular) de los 30 cultivares evaluados (Figura 4), debido al impacto negativo que ejerció sobre el consumo de O_2 de los nódulos de las plantas bajo estrés (Tabla 4), ya que en estas condiciones el estrés salino incrementa la resistencia a la difusión del O_2 al interior de los nódulos (Roy, 1993; Serraj *et al.*, 1994; 1998; 2001).

En la literatura científica internacional (Katerji *et al.*, 2003; Tejera *et al.*, 2006; Vadez *et al.*, 2007; Flowers *et al.*, 2009) se reportan varios métodos y parámetros para la clasificación de la tolerancia a la salinidad del garbanzo, en los mismos se reconoce que el parámetro más factible y simple es la evaluación teniendo en cuenta el crecimiento foliar relativo (expresado en %) del tratamiento salino con respecto al tratamiento control, el cual fue empleado en este trabajo (Figura 2).

Por otro lado Flowers *et al.*, 2009 en su amplia revisión sobre el tema reconoce que, debido al uso de diferentes sistemas de cultivo, cultivares y niveles de salinidad empleados por los diferentes autores se hace difícil hacer una selección de una metodología única y de cultivares sensibles y tolerantes testigos necesario para el avance en la experimentación. Sin embargo a pesar de ello se halló que en gran parte de las investigaciones (Soussi *et al.*, 1999; Tejera *et al.*, 2006; Vadez *et al.*, 2007 y otras) el cultivar *ICC 4973* se reportó siempre como tolerante, lo cual coincide con el resultado alcanzado en la presente investigación (ver Figura 2).

En el presente trabajo se pudo demostrar que el cultivar *ICC 4973* fue más tolerante a la salinidad que *ICC 13357* (Figuras 1 y 2) porque tanto la nodulación (Figura 3) como la actividad nodular (Tabla 1) del primero fue menos afectada por este fenómeno que en el segundo. Igualmente el cultivar *ICC 11121* fue más tolerante que la línea *ICC 1915*, debido a que la actividad de los nódulos del primer genotípico en condiciones de estrés fueron proporcionalmente menos afectados que los del segundo, aspecto que coincide con lo reportado para la especie por L'Taief *et al.*, 2006 y 2007.

A modo de resumen se puede concluir que el estrés salino afectaron el crecimiento y la nodulación de los cultivares de garbanzo evaluados, observándose diferencias en la tolerancia al estrés salino entre los genotipos evaluados. Se identificaron como genotipos promisorios por su tolerancia a la salinidad *ICC 4973* e *ICC11121*.

Referencias.

1. Drevon, J.J ; V.C, Kalia ; M.O, Heckmann y P, Pedelahore . 1988. In situ open-flow assay of acetylene reduction activity by soybean root-nodule: influence of acetylene and oxygen . Plant ,Physiology and Biochemistry. 26 :73-78.
2. Flowers, T. J; P. M, Gaur: C. L. L, Gorda; L. Krishnamurthy; S. Samineni; K. H. M. Siddique; N. C. Turner; V. Vadez; R. K, Varshney y T. D. Colmer. 2009. Salt Sensitivity in Chickpea a review. Plant, Cell and Environment. 1365: 3040 – 3060.
3. Garg, N. y R. Singla. 2004. Growth, photosynthesis, nodule nitrogen and carbon fixation in the chickpea cultivars under salt stress. Brazilian Journal of Plant Physiology. 16: 137 – 146.
4. Graham, P.H., Vance, C.P. (2003). Legumes: Importance and constraints to greater use. Plant Physiol. 131: 872-877.
5. Jebara M y J. J Drevon. 2001. Genotype variation in nodule conductance to oxygen diffusion in common bean.. Agronomie. 21: 667 – 674.
6. L'Taief, B. L, B. Sifi, M. Lachaâl and J; J, Drevon. 2006. Nodulation of plant-bacteria interactions to enhance tolerance to water deficit for grain legumes in the Mediterranean dry lands. Report Final of Aquarhiz Project.
7. L'Taief B., Sifi B., Zaman-Allah M., Drevon J.J. & Lachaal M. (2007) Effect of salinity on root-nodule conductance to the oxygen diffusion in the *Cicer arietinum Mesorhizobium ciceri* symbiosis. *Journal of Plant Physiology* **164**, 1028–1036.

8. Roy, G. 1993. Respiration et diffusion de l'oxigen dans la symbiose fixatrice d'azote: Soya - Bradyrhizobium japonicum. Theses Universite de Montpellier II, Junio 1993, Montpellier, France, 121 pp
9. Sadiki M. and K. Rabit. 2001. Selection of chickpea (*Cicer arietinum*) for yield and symbiotic nitrogen fixation ability under salt stress. *Agronomie*. 21: 659 – 666.
10. Serraj, R, G. Roy, J. J, Drevon. 1994. Salt stress induces a decrease in the oxygene uptake of soybean nodules and their permeability to oxygen diffusion. *Physiologia Plantarum*. 91: 161 – 168.
11. Serraj, R, H, Vasquez-Diaz, J. J, Drevon. 1998. Effects of salt stress on nitrogen fixation, oxygen diffusion and ion distribution in soybean, common bean and alfalfa. *Journal of Plant Nutrition*. 21: 475 – 478.
12. Serraj, R., H. Vazquez-Diaz, G. Hernandez and J. J, Drevon. 2001. Genotype difference in the short – term response of nitrogenase activity (C_2H_2 reduction) to salinity and oxygene in the common bean. *Agronomie*. 21: 645 – 651.
13. Soussi M., Lluch C. & Ocana A. (1999) Comparative study of nitrogen fixation and carbon metabolism in two chick-pea (*Cicer arietinum L.*) cultivars under salt stress. *Journal of Experimental Botany* **50**, 1701–1708.
14. Tejera N.A., Soussi M. & Lluch C. (2006) Physiological and nutricional indicators of tolerance to salinity in chickpea plants growing under symbiotic conditions. *Environmental and Experimental Botany* **58**, 17–24.
15. Vadez V., Krishnamurthy L., Serraj R., Gaur P.M., Upadhyaya H.D., Hoisington D.A., Varshney R.K., Turner N.C. & Siddique K.H.M. (2007) Large variation in salinity tolerance in chickpea is explained by differences in sensitivity at the reproductive stage. *Field Crops Research* **104**, 123–129.
16. Vadez, V. 1996 b. Interacction Haricot - Microorganismes - Phosphates Naturel. Synthesis des resultats sur l'amelioration de la fixation symbiotique de l'azote chez le haricot te le niébé en sols carence en phosphore. Projet de recherche sur l'amerioration de la fixation symbiotique de l'azote et l'utilisation des phosphates naturels de Cuba. Rapport de mission a l'Intitute de Suelos. (La Havane - Cuba). Septiembre de 1996.