

Universidad Pública de Navarra
Publikoa

Nafarroako Unibertsitate

ESCUELA TECNICA SUPERIOR
INGENIARIEN
DE INGENIEROS AGRONOMOS
TEKNIKOA

NEKAZARITZAKO

GOI MAILAKO ESKOLA

**NITRATO, AMONIO Y UREA AFECTAN DIFERENCIALMENTE LAS VÍAS DE
UREIDOS Y EL CICLO DE LA UREA Y EVIDENCIAN LA IMPORTANCIA DE
POLIAMINAS EN LA RESPUESTA AL ESTRÉS POR AMONIO**

presentado por

DANIEL CERDÁN RUIZ

.....

GRADO EN INGENIERÍA AGROALIMENTARIA Y DEL MEDIO RURAL
GRADUA NEKAZARITZAKO ELIKAGAIEN ETA LANDA INGURUNEAREN
INGENIARITZAN

Septiembre,2017

Índice

1. RESUMEN.....	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. Uso de los fertilizantes en la agricultura actual.....	3
2.2. Nutrición nitrogenada.....	4
2.3. Mecanismos de tolerancia	5
3. OBJETIVOS	9
4. MATERIAL Y MÉTODOS	10
4.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento	10
4.1.1. Medicago truncatula.....	10
4.1.2. Condiciones de crecimiento	11
4.2. Medidas analíticas.....	13
4.2.1. Determinación del contenido en amonio.....	13
4.2.2. Determinación del contenido en ureidos	13
4.2.3. Determinación del contenido en aminoácidos.....	15
4.2.4. Determinación del contenido en poliaminas	15
4.3. Análisis estadístico de los datos	16
5. RESULTADOS.....	18
5.1. Contenido en amonio	18
5.2. Ureidos	18
5.2.1. Método capilaridad.....	18
5.2.2. Método colorimetría.....	20
5.3. Contenido en aminoácidos	21
5.4. Poliaminas.....	22
6. DISCUSIÓN	24
6.1. Efecto de la nutrición nitrogenada sobre M. truncatula	24
6.2. El papel de los ureidos en la tolerancia frente al estrés.....	27
6.3. El rol de las poliaminas en la respuesta al estrés.....	28
7. CONCLUSIONES	31
8. BIBLIOGRAFÍA.....	32
ANEXO 1: ÍNDICE DE ABREVIATURAS	37

1. RESUMEN

Ammonium, or ureic, exclusively nutrition is characterized by causing stress in most plants, causing a growing reduction. Besides, in the legumes family, there are some mechanisms which, apparently at least, have the capacity to alleviate that stress, like the sugars addition, the extracellular pH buffered, an increase of the irradiance or the addition of low amounts of nitrate acting as an indicator. In this research, we evaluated the ureides and polyamines production pathways under nitric, ammonium and ureic nutrition at low doses (1 mM of N) and high doses (25 mM of N), as the only nitrogen sources. The results of this research shown a differential accumulation of ureides and polyamines related to the nitrogen nutrition, and we observed a higher accumulation of ureides in the ammonium and urea fed plants and a block of the polyamines synthesis pathway from the urea cycle caused by the ammonium. These results are related with the amino acids involved in those pathways. This research demonstrates the tolerance of *Medicago truncatula* to the exclusively ammonium and ureic nutrition and the mechanisms of tolerance to stress. We must emphasize the innovative importance of the urea cycle in the polyamines synthesis in plants.

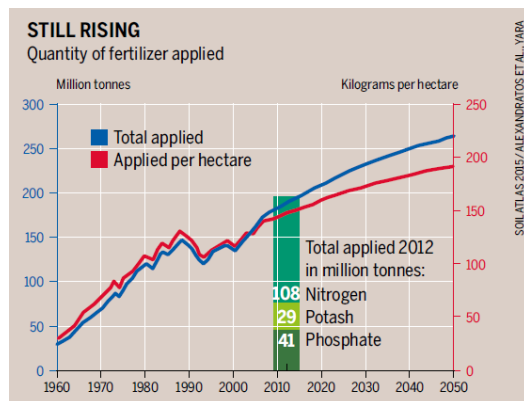
Las nutriciones exclusivamente amoniacaes o ureicas se caracterizan por causar un estrés en la mayoría de las plantas, dando lugar a disminuciones del crecimiento. Por otra parte, en la familia de las leguminosas, existen mecanismos que, aparentemente, poseen la capacidad de aliviar este estrés, como puede ser la adición de azúcares, el tamponado del pH del medio extracelular, el aumento de la irradiancia o la adición de pequeñas cantidades de nitrato como señalizador. En este estudio se evaluó la actuación de las vías de producción de ureidos y de poliaminas en condiciones de crecimiento con nitrato, amonio y urea como únicas fuentes de nitrógeno, a bajas (1 mM de N) y a altas concentraciones (25 mM de N). Los resultados de este trabajo demostraron una acumulación diferencial de ureidos y poliaminas según el tipo de nutrición nitrogenada, y se observó una mayor acumulación de ureidos con urea o amonio, y un bloqueo de la vía de síntesis de poliaminas desde el ciclo de la urea con amonio. Estos resultados son relacionados con los contenidos de aminoácidos implicados en las vías mencionadas. En este trabajo, se muestra la tolerancia de *Medicago truncatula* a las nutriciones amoniacaes o ureica, y evidencia los mecanismos de tolerancia al estrés por amonio y urea. Entre estos mecanismos es de destacar la novedosa importancia del ciclo de la urea en plantas en la síntesis de poliaminas.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Uso de los fertilizantes en la agricultura actual

El nitrógeno (N) es uno de los principales nutrientes que las plantas necesitan para su correcto crecimiento y desarrollo. Sin embargo, pese a que es el elemento más abundante en la atmósfera (78%) también se presenta como uno de los elementos limitantes para la nutrición vegetal. Para poder ser utilizado por las plantas, el N atmosférico debe ser convertido en formas de N más accesibles, por ejemplo, mediante la fijación biológica llevada a cabo por microorganismos. Esta conversión de N atmosférico no es suficiente para mantener la producción de alimentos necesaria para abastecer a la actual población humana y aún menos para satisfacer las necesidades previstas para el futuro (FAO, 2017).

A



B

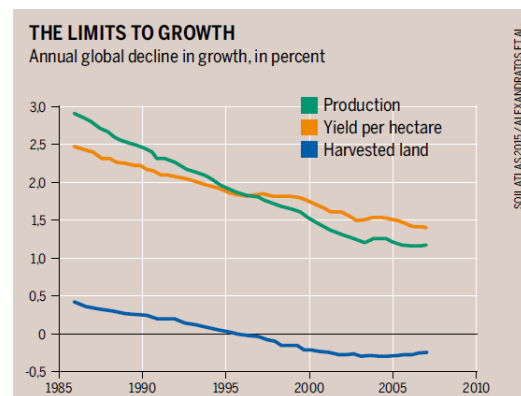


Figura 1: Evolución de la aplicación de fertilizantes y la producción de los cultivos. La productividad de los cultivos muestra una tendencia descendente pese a la creciente utilización de fertilizantes. (A) Cantidad de fertilizante aplicada y su previsión hasta 2050 (millones toneladas). Cantidad de N-P-K (kg por hectárea) utilizados en 2010. (B) Rendimiento de los cultivos (%). Imágenes tomadas de Soil Atlas (2015); Alexandratos y Bruinsma (2012).

Para hacer frente a esta falta de N, habitualmente se recurre a la fertilización mineral de los suelos, siendo ésta una de las técnicas más utilizadas en agricultura intensiva. Sin embargo, como puede verse en la Figura 1, se ha observado que el aumento creciente de fertilizantes aplicados no va acompañado de un aumento en la producción de los cultivos (Chemnitz y Weigelt, 2015). Así, como consecuencia del uso abusivo de los fertilizantes, se produce una sobrecarga de nutrientes en el suelo dando lugar a problemas medioambientales como la eutrofización, contaminación de acuíferos y polución atmosférica (Figura 2). En las dos últimas décadas, se han ido extendiendo métodos preventivos para tratar de evitar estos problemas, o al menos no agravarlos, como puede ser el uso de fertilizantes orgánicos. Además, las altas concentraciones de N que se acumulan en el suelo pueden llegar a ser tóxicas para las plantas suponiendo una causa de estrés nutricional para éstas.

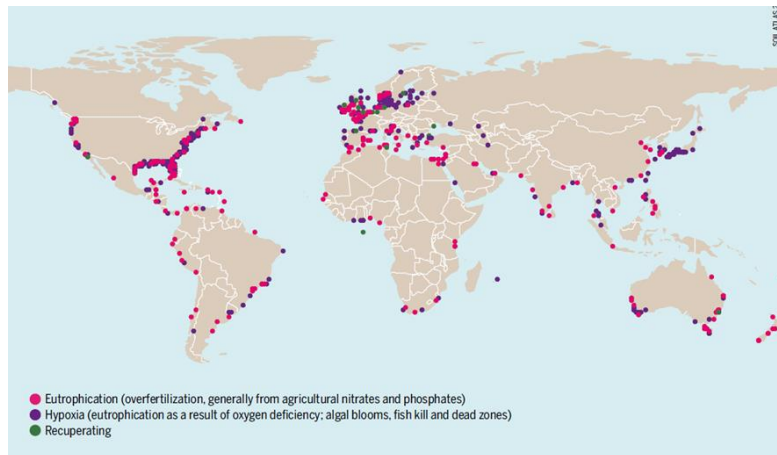


Figura 2: Alteración de los suelos. El uso abusivo de fertilizantes, así como algunas técnicas de cultivo, conllevan unos cambios en la estructura de los suelos que compromete la calidad de estos y, por ende, la disponibilidad y accesibilidad de los nutrientes para las plantas (UNEP, 2012). Ilustración de. SOIL ATLAS (2015).

2.2. Nutrición nitrogenada

Además de los estreses debidos a causas tanto biológicas como abióticas, las plantas pueden verse afectadas por los elementos de su nutrición. Las formas de N comúnmente usadas en agricultura, nitrato (NO_3^-), amonio (NH_4^+) y urea ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$), se presentan como la principal fuente de N para los cultivos; sin embargo, pueden afectar de forma diferente a las plantas llegándoles a causar ciertos niveles de estrés. Debido a su facilidad de absorción, el NO_3^- presenta un mayor beneficio para las plantas, pero, sin embargo, su asimilación requiere un mayor coste energético. Además, debido a la complejidad inherente a los suelos agrícolas, las plantas no son los únicos organismos que pueden utilizar nutrientes del suelo. Por ejemplo, la urea puede ser degradada fácilmente por la microbiota del suelo, dependiendo de las especies existentes en el suelo y las condiciones ambientales tales como la temperatura (Krogmeier *et al.*, 1989). De esta manera, debido a que las diferentes especies de microorganismos presentes en la rizosfera dificultan el estudio de la nutrición nitrogenada en suelos agronómicos, el cultivo de plantas en condiciones de esterilidad (mediante la utilización de cultivos axénicos) es de vital importancia ya que nos permite la evaluación de la capacidad de las plantas para utilizar las diferentes fuentes de N.

Indiferentemente de la fuente de N aportado, las plantas únicamente asimilan este N en forma de NH_4^+ a través de la vía de la glutamina sintasa (GS). De esta manera, una vez que el NO_3^- es asimilado, debe ser reducido a NH_4^+ para poder ser incorporado en forma de aminoácidos, lo que requiere un mayor gasto energético para las plantas. Por este motivo se podría pensar en el NH_4^+ como fuente favorable de N; sin embargo, cuando este NH_4^+ es utilizado como única fuente de N es tóxico para la mayoría de las especies vegetales. La nutrición exclusivamente amoniacal afecta a la biomasa y produce cambios fenotípicos, estando la respuesta de la planta condicionada tanto por aspectos ambientales, como la concentración de NH_4^+ aportado, como por la propia tolerancia de la especie (Esteban *et al.*, 2016a). La nutrición con NH_4^+ se ha estudiado en distintas especies y, aunque diversos mecanismos de tolerancia se han propuesto, la forma en la

que las plantas hacen frente a esta toxicidad permanece aún sin esclarecer (Britto y Kronzucker, 2002; Bittsánszky *et al.*, 2015).

Algunas especies vegetales, como el arroz y las leguminosas, presentan una tolerancia superior al NH_4^+ . Así, estudios realizados con las leguminosas *Pisum sativum* y *Medicago truncatula* sometidas a altas concentraciones de NH_4^+ , demostraron la relativa tolerancia de estas especies, ya que las plantas fueron capaces de crecer sin síntomas de estar sufriendo un gran estrés nutricional (Ariz *et al.*, 2013; Esteban *et al.*, 2016b). Por el contrario, especies como la espinaca, el trigo y la planta modelo, *Arabidopsis thaliana*, son conocidas por ser sensibles a la nutrición con NH_4^+ como fuente exclusiva de N (Lasa *et al.*, 2002; Domínguez-Valdivia *et al.*, 2008; Garnica *et al.*, 2010), aunque diferencias entre las distintas variedades pueden existir (Sarasketa *et al.*, 2014).

Por otro lado, para la urea se han descrito síntomas de toxicidad similares a los descritos para el NH_4^+ , pero con una menor intensidad, (Bittsánszky *et al.*, 2015); sin embargo, no se han llevado a cabo muchos estudios relacionados con esta nutrición en condiciones axénicas (Gerendás *et al.*, 1998; Mérigout *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2013). Así, pese a que en las últimas dos décadas se ha avanzado en el estudio de la nutrición con urea, la posible toxicidad de esta fuente de N no ha sido todavía dilucidada. La urea puede ser tomada por las plantas una vez hidrolizada por la actividad ureasa, como NO_3^- o NH_4^+ , o directamente por medio de transportadores (Witte, 2011; Yang *et al.*, 2015; Pinton *et al.*, 2016) de manera que es necesaria una hidrólisis previa a su asimilación en forma de NH_4^+ . Además, la urea es un metabolito de alta importancia para las plantas ya que participa en metabolismo de la arginina (Arg) y de los ureidos.

2.3. Mecanismos de tolerancia

Las plantas, como respuesta a las diversas situaciones de estrés han desarrollado diferentes estrategias adaptativas para poder sobrevivir. Así, para aliviar los posibles efectos negativos derivados de la acumulación de NH_4^+ dentro de las células, las plantas tienden a asimilarlo rápidamente cerca del sitio de entrada y/o producción, o bien lo almacenan en las vacuolas. La asimilación del NH_4^+ es llevada a cabo, principalmente, por el llamado ciclo GS-GOGAT (Glutamato-oxoglutarato aminotransferasa), en el que primero es introducido en una molécula de glutamato (Glu) para dar glutamina (Gln) y posteriormente entra un oxo-glutarato produciéndose dos moléculas de Glu. Tanto Gln como Glu actúan como precursores de las síntesis de otros compuestos de N como los ureidos, otros aminoácidos y por consecuencia, las proteínas.

Una vez asimilado el N, este es transportado a través de la planta bien para su uso o bien para ser almacenado. Los compuestos mediante los cuales el N es transportado a lo largo de la planta dependen de la familia de plantas, incluso difiere entre las distintas especies dentro de una misma familia, como es el caso de las leguminosas (Hawkesford *et al.*, 2011). En este caso esta diferencia viene marcada por la estructura del nódulo que cada leguminosa forma en simbiosis. De este modo, las especies consideradas como tropicales y que forman nódulos determinados preferiblemente transportan el N como ureidos; mientras que las especies con nódulos indeterminados y originarias de climas templados,

entre las que se encuentra *M. truncatula*, son definidas como transportadoras de amidas; principalmente Gln y asparagina (Asn). Así, se ha propuesto el transporte y almacenamiento del N en forma de tanto de ureidos como de amidas como un mecanismo esencial para una correcta tolerancia de las plantas al exceso de N (Marschner, 1995). Más aún, también ha sido propuesto el papel protector que juegan ureidos bajo condiciones de estrés abiótico (Sagi *et al.*, 1998; Watanabe *et al.*, 2014; Lescano *et al.*, 2016).

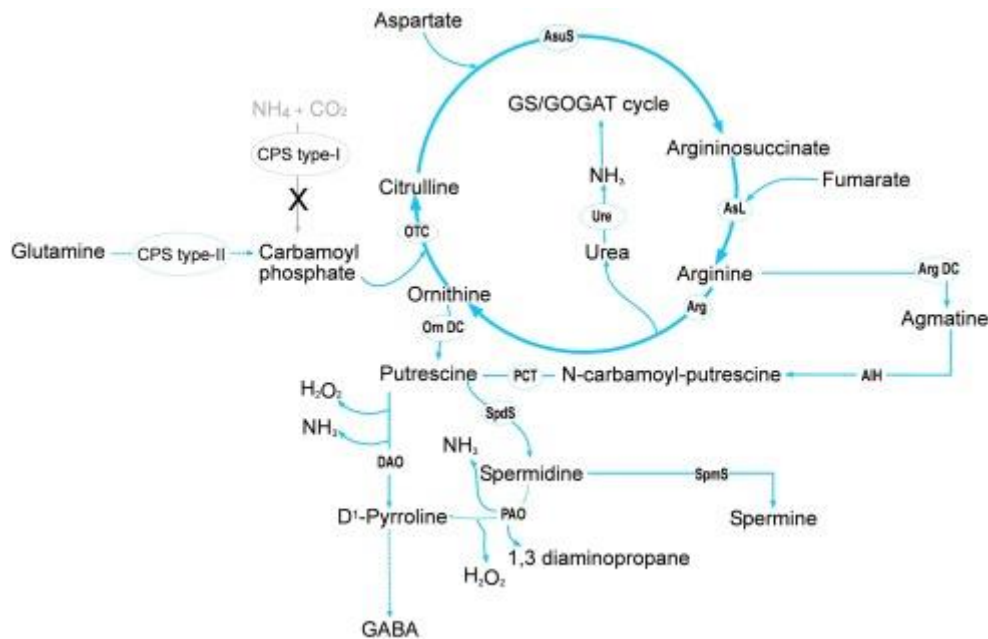


Figura 3: El “ciclo de la urea” en plantas. En plantas, el fosfato de carbamilo es sintetizado a partir de la glutamina en vez de usar como sustrato el NH_4^+ . Tanto la arginina como la ornitina pueden ser utilizados como precursores en la síntesis de las poliaminas. Las enzimas están representadas dentro de un círculo como: agmatina imidohidrolasa (AIH), argininosuccinato liasa (AsL), arginasa (Arg), arginina descarboxilasa (Arg DC), argininosuccinato sintasa (AsuS), diamino oxidasa (DAO), ornitina descarboxilasa (Orn DC), transcarbamilasa (OTC), poliamina oxidasa (PAO), putrescina carbomil transferasa (PCT), espermidina sintasa (SpdS), espermina sintasa (SpmS), ureasa (Ure). Ilustración tomada de Esteban *et al.*, (2016).

Junto con la asimilación del NH_4^+ también se ha propuesto la participación del “ciclo de la urea” en la optimización del uso del carbono, C, y el N inorgánico como respuesta a episodios de alta disponibilidad de N (Esteban *et al.*, 2016a). El “ciclo de la urea” que permite la producción de urea a partir de NH_4^+ está presente en algunos organismos fotosintéticos como las diatomeas Allen *et al.* (2011), sin embargo, en las plantas no se considera un ciclo completo porque éstas no son capaces de sintetizar la urea directamente de NH_4^+ . En el caso de las plantas se ha propuesto la existencia de un ciclo similar mediante el cual la síntesis de urea se produce a partir de Gln (Zhou *et al.*, 2000). Como se puede ver en la Figura 3, el “ciclo de la urea” produce Arg que a continuación puede ser bien degradado a urea y ornitina (Org) o bien servir de sustrato para formar agmatina. Tanto la Orn como la agmatina son precursores de la síntesis de las poliaminas (PA), siendo la putrescina (Put) la primera en ser producida. A su vez, la Put da origen a otras PA, espermidina (Spd) y la espermina (Spm), y en esta interconversión entre PA da lugar a la liberación de NH_4^+ y de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Más aún, la Put puede ser también oxidada a pirrolina para formar el ácido γ -aminobutírico (GABA). Por tanto, la

síntesis de la PA puede ser considerada tanto sumidero como fuente de NH_4^+ . Así, la importancia de esta vía en plantas está aún por determinar (Minocha *et al.*, 2014).

La acumulación de PA se ha relacionado con la tolerancia a diversos estreses desarrollando una función importante en su señalización, y en la respuesta desencadenada en la planta (Gill y Tuteja, 2010; Liu *et al.*, 2015). Como hemos citado anteriormente, las principales PA implicadas en la tolerancia son las alifáticas de bajo peso molecular Put, Spd y Spm. Más concretamente, las PA son un grupo de metabolitos nitrogenados de bajo peso molecular presentes en todas las células vegetales (Childs *et al.*, 2003), y que están involucrados en una amplia variedad de procesos fisiológicos. Así, se ha estudiado su implicación en el crecimiento, desarrollo vegetal y la senescencia, además de la ya citada protección contra situaciones de estrés abiótico (Gill y Tuteja, 2010; Luna-Esquivel *et al.*, 2014).

Por su carácter catiónico, las PA pueden unirse y formar complejos con moléculas aniónicas, como pueden ser algunas proteínas, fosfolípidos, pectinas, ADN y ARN (Galston, 1983). Pueden estar presentes en forma libre o conjugadas con aminas aromáticas (Luna-Esquivel *et al.*, 2014).

Debido a estas características, las PA pueden causar la estabilización de moléculas, gracias a la cual, se debe uno de los mecanismos de tolerancia propuestos. La acción anti senescente de las PA está relacionada con su capacidad para secuestrar radicales libres, con lo que éstas podrían unirse a proteínas y ácidos nucleicos, protegiéndolos de la degradación y manteniendo su configuración estable durante la situación de estrés. Así, las PA pueden inducir la expresión de genes de enzimas antioxidantes y utilizar el H_2O_2 como molécula señalizadora de estrés (Azcón-Bieto y Talón, 2013). Por otro lado, en un estudio bajo condiciones de salinidad elaborada con *Lotus glaber*, se propone la acumulación de PA en las raíces como medio para igualar el nivel osmótico de la solución del medio acuoso exterior (Sanchez *et al.*, 2005).

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio mostraron que la exposición de plantas de la leguminosa *M. truncatula* a bajas concentraciones de NH_4^+ y urea no afectó al correcto desarrollo de la planta y, lo que es más, no se observaron síntomas de estrés (Esteban *et al.*, 2016b). Además, el mismo estudio demuestra que la exposición a altas concentraciones de N tampoco tuvo efectos remarcables en el desarrollo de las plantas llegando incluso a ser las plantas crecidas con altas concentraciones de urea más eficientes fotosintéticamente que las plantas crecidas en NO_3^- . De esta manera, debido a que, bajo nuestras condiciones experimentales *M. truncatula* parece no verse afectado especialmente por la exposición a altas concentraciones de N, puede significar que dicha leguminosa se adapta metabólicamente de una forma eficaz tanto a la disponibilidad de distintas fuentes de N como a las altas concentraciones aportadas.

Así, con el fin de comprobar los mecanismos de tolerancia a estrés inducido por NH_4^+ y urea, en este trabajo se estudiará la implicación tanto de los compuestos de transporte y almacenamiento transitorio de N (ureidos y amidas), así como el papel que juegan el “ciclo de la urea” y la síntesis de PA. Así, la medida y evaluación de estos compuestos se

ha medido en plantas de *M. truncatula* crecidas utilizando como fuente de N NO_3^- , NH_4^+ o urea.

3. OBJETIVOS

El propósito general de este trabajo fue estudiar los mecanismos de tolerancia en *M. truncatula* frente a situaciones de estrés provocadas por NH_4^+ y urea en condiciones axénicas.

Para esto, se marcaron 3 objetivos concretos:

- 1. Estudiar de modo diferencial la nutrición nitrogenada con urea, amonio y nitrato en la leguminosa modelo *M. truncatula* y en concreto como afecta al metabolismo del nitrógeno, incluyendo aminoácidos y otras vías nitrogenadas:** Para esto se medirán los niveles de amonio en las plantas crecidas con las distintas fuentes de N y se compararán los diferentes niveles de las sustancias medidas en ambos casos.
- 2. Determinar cómo afecta la nutrición amoniacal a la síntesis de ureidos en comparación frente a nutrición con urea y con nitrato:** Esto se realizará midiendo y comparando los niveles de las distintas formas en las que las plantas transportan el N (amidas y ureidos).
- 3. Determinar como afecta la nutrición amoniacal al ciclo de la urea y poliaminas en comparación frente a la nutrición ureica y con nitrato:** Esto se realizará midiendo los niveles de PA en las plantas y observando la relación entre el contenido en estas y el resto de sustancias analizadas.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento

4.1.1. *Medicago truncatula*

Medicago truncatula Gaertn (Fabaceae) es una planta modelo perteneciente a la familia de las leguminosas. Esta amplia familia posee una gran importancia agronómica especialmente a su capacidad de formar relaciones simbióticas con bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico (N₂). La elección de *M. truncatula* como especie modelo viene dado principalmente por su corto ciclo de vida, su alta producción de semillas y encontrarse su genoma ya secuenciado (Tang *et al.*, 2014). Aunque por lo general, el uso de *M. truncatula* está dirigido al estudio de la fijación del N₂, debido a su relativa tolerancia a la nutrición amoniacal también es utilizada para el estudio de la nutrición nitrogenada. Así, en varios estudios realizados con espinaca, guisante y *M. truncatula* se ha visto que el cultivo bajo diferentes fuentes de N puede afectar de forma diferente el desarrollo de las plantas, especialmente a nivel fenotípico (Domínguez-Valdivia *et al.*, 2008; Ariz *et al.*, 2011; Esteban *et al.*, 2016b). De esta manera, con el fin de alcanzar el objetivo del presente trabajo, estudiar la implicación de los distintos compuestos nitrogenados, así como del “ciclo de la urea” y las PA en los mecanismos de tolerancias a fuentes y dosis de N, esta especie fue elegida por i) su tolerancia a la nutrición amoniacal y ii) su capacidad para ser cultivada en condiciones axénicas. Mediante esta técnica se consigue impedir el crecimiento de bacterias y otros microorganismos que pudieran interferir en el metabolismo propio de la planta, así como evitar la nodulación.

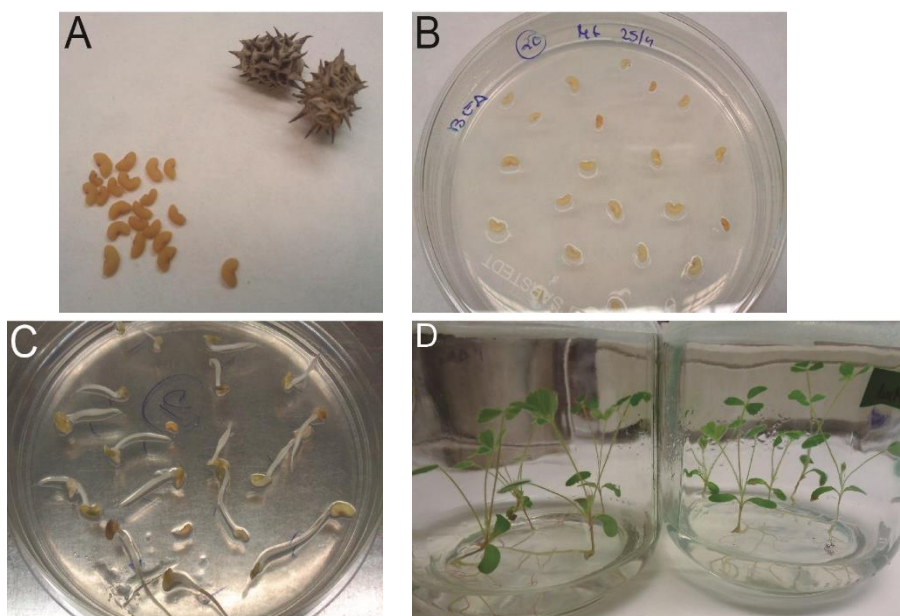


Figura 4. Esterilización, germinación y crecimiento de *Medicago truncatula*. Semillas de *Medicago truncatula* (A), esterilizadas (B) y germinadas (C); y plántulas crecidas en botes (D).

4.1.2. Condiciones de crecimiento

Semillas de *Medicago truncatula* Gaertn. ecotipo Jemalong (Figura 4A) fueron escarificadas, utilizando ácido sulfúrico 95% durante 8 minutos y lavadas con agua mQ. A continuación, bajo una cabina de flujo laminar, fueron esterilizadas utilizando una solución al 50% (v/v) de hipoclorito sódico durante 5 minutos, para luego ser lavadas con agua mQ esteril hasta que el pH alcanzó un lavado aproximado de 7. Las semillas fueron depositadas bajo condiciones de esterilidad en placas de Petri que contenían 0,4% (p/v) de agar para su germinación en oscuridad a 14 °C durante 4 días (Figura 4B). Una vez germinadas (Figura 4C), las semillas fueron transferidas a botes de cristal que contenían el medio de cultivo (Tabla 1) en la cabina de flujo laminar (Figura 4D). Cada bote contenía 100 ml del medio nutritivo Fahraeus suplementado con 5 g/l de Phytigel™ (Sigma-Aldrich).

Tabla 1: Solución nutritiva Fahraeus para el crecimiento de *M. truncatula* en condiciones axénicas. Composición y concentración de macro- y micronutrientes del medio Fahraeus. Phytigel™ fue añadido para una concentración final de agar de 5.5% (p/v).

Nutrientes	Concentración
Macronutrientes	mM
CaCl ₂	0,9
MgSO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄	0,7
Na ₂ HPO ₄	0,8
Citrato férrico	0,02
Micronutrientes	μM
MnCl ₂	0,8
CuSO ₄	0,6
ZnCl ₂	0,7
H ₃ BO ₃	1,6
Na ₂ MoO ₄	0,5

El N fue suministrado en forma de NO₃⁻ como nitrato cálcico (Ca(NO₃)₂), de NH₄⁺ usando sulfato amónico (NH₄)₂SO₄ o de urea (CO(NH₂)₂) como fuentes exclusivas de N (Tabla 2). Además, con el fin de compensar el contenido en Ca²⁺ de las plantas crecidas bajo nutrición nítrica, las plantas crecidas en NH₄⁺ como con urea fueron suplementadas con sulfato cálcico (CaSO₄).

Asimismo, se consideraron dos escenarios diferentes: 1 mM(bajo) y 25 mM (alto) de N (Tabla 2).

Tabla 2. Fuentes de N utilizadas para el crecimiento de *M. truncatula* en condiciones axénicas. El sulfato cálcico fue añadido a los medios que contenían NH_4^+ y urea como únicas fuentes de N para equilibrar el contenido del ion Ca respecto a los medios nítricos.

Fuente nitrógeno	Concentración	CaSO₄ · 2H₂O
Nitrato	mM	mM
Ca(NO ₃) ₂	1	-
	25	-
Amonio	mM	mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	0.5
	25	12.5
Urea	mM	mM
CO(NH ₂) ₂	1	0.5
	25	12.5

La preparación del medio de cultivo fue realizada siguiendo un estricto control del pH con el fin de que el valor de este a la hora de sembrar las semillas se mantuviese en torno a 6,5 en todas las condiciones diferenciales de nutrición.

Las plantas, fueron crecidas durante 15 días en una cámara de crecimiento cuyas condiciones ambientales fueron: temperatura día/noche 24,5/22 °C, humedad relativa del 80%, fotoperiodo de 16/8 horas día/noche y 70 $\mu\text{mol}^2 \text{s}^{-1}$ de radiación fotosintéticamente activa.

Tras el periodo de crecimiento, las plantas fueron cosechadas; separando raíz y parte aérea y posteriormente congeladas en N₂ líquido y almacenadas a 80 °C hasta su utilización en los posteriores análisis.

Con el fin de facilitar la comprensión del experimento se incluye la siguiente figura (Figura 5).

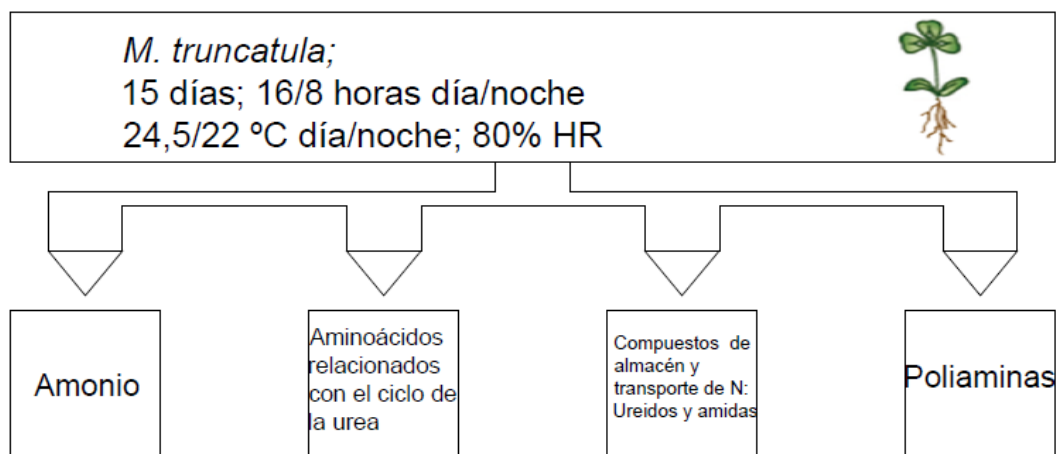


Figura 5: Diseño experimental. Esquema mostrando las condiciones de crecimiento del material vegetal y los parámetros analizados en *M. truncatula*.

4.2. Medidas analíticas

4.2.1. Determinación del contenido en amonio

El contenido interno de amonio en ambos tejidos, raíz y parte aérea, de las plántulas de *M. truncatula* fue medido mediante cromatografía iónica, mediante el cromatógrafo DIONEX-DX500 (Dionex Corporation, CA, USA). Brevemente, 0,2 g de tejido congelado de raíz o parte aérea fueron incubados en 1 ml de agua mili-Q a 80 °C durante 5 minutos (Ariz *et al.*, 2011), y la fracción soluble que contenía los distintos compuestos iónicos fue obtenida mediante centrifugación 16.000 g durante 30 minutos. El sobrenadante fue guardado a -20 °C hasta un uso, momento en el que fue diluido 1:10 para su inyección en el cromatógrafo mediante el inyector automático AS40 (Dionex) utilizando como solvente una solución al 30% de 100 mM NaOH con un flujo de 1,5 ml min⁻¹ durante 15 minutos.

El contenido en NH₄⁺ se determinó mediante elución isocrática con las columnas Ion Pac CG12A y e Ion Pac CS12A acopladas a un detector de conductividad suprimida (ED 40 Dionex) durante 13 minutos, y utilizando como eluyente una solución 20 mM de ácido metasulfónico.

4.2.2. Determinación del contenido en ureidos

4.2.2.1. Determinación de ureidos por capilaridad

A cada muestra se añadieron 1.5 ml de etanol 80% y se colocaron en un bloque calefactor hasta ebullición durante 30 segundos. Tras esto, las muestras se centrifugaron a 5000 rpm, 4 °C durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante, en tubos turbo-vap. Este proceso se repitió dos veces y por un último se realizó una cuarta repetición con etanol y en frío. Tras esto, los tubos fueron colocados en el evaporador Turbo-vap (40 °C, 1-1.2

bar) donde permanecieron hasta que todo el etanol se evaporó. Las muestras fueron re-suspendidas en 2ml de agua desionizada, añadiendo primero 1 ml y sonicándolas durante 10 minutos. Se vertió el sobrenadante en un tubo para centrifuga y se añadió el segundo mililitro de agua desionizada para agitarlo en el vortex. A continuación, se centrifugaron las muestras a 2300 g, durante 10 minutos y a 4 °C y se recogió el sobrenadante mediante pipetas Pasteur.

A partir de este punto se siguió el método descrito en (Sato *et al.*, 1998). Se usó una solución de 0,1 M borax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, pH 9,3) en 2,5% OFT-Anion BT Waters como electrolito en un tubo capilar de sílice fundida, MDQ de Beckman-Coulter con detector DAD, de 60 cm de largo y 75 micrómetros de diámetro interno. Las muestras fueron inyectadas durante 5 segundos, a 0,5 psi, mediante el método hidrostático y tratadas por electroforesis a 20 °C durante 30 minutos a 10 kV. La polaridad del electrodo de las muestras fue negativa, por lo que la del detector fue positiva. Los ureidos fueron detectados por densidad óptica a una longitud de onda de 185 nm.

4.2.2.2. Determinación colorimétrica de ureidos

El contenido de ureidos, mediante colorimetría, fue determinado siguiendo el método descrito por Vogels y Van Der Drift (1970). Este método se basa en la transformación química de cada ureido a glioxilato por separado, y la detección de este ureido a 520 nm (Figura 6). Después de esta transformación, el contenido de alantoina y alantoato fue medidos y la suma de ambos fue tomado como el contenido total de ureidos.

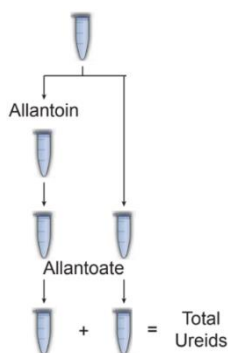


Figura 6: Proceso de cuantificación de ureidos. El esquema muestra el procedimiento seguido para la extracción, transformación de ureidos en tejidos de *M. truncatula* siguiendo el método descrito por Vogels y Van Der Drift (1970).

Brevemente, el sobrenadante previamente obtenido fue homogeneizado en 50 mM Tris-HCl pH 7.8, 100 mM MgSO_4 y 0.15% (p/v) ácido deoxicólico. La alantoina se transformó en alantoato incubándola en NaOH (0.5 M, 100 °C, 10 minutos) y enfriando en hielo. El alantoato, tanto el producido como el ya presente se transformó en glioxilato incubándolo en HCl (0.65 N, 100 °C, 10 minutos) y enfriando en hielo.

Finalmente, el glioxilato obtenido de la transformación de la alantoina y el alantoato fue medido mezclándolo con 0.4 M fosfato sódico, pH 7.0 y 0.33% (p/v). fenilhidrazina-HCl

Después de 10 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 12 N HCl y 1.6% (p/v) ferrocianuro potásico antes de volver a incubar 15 minutos a temperatura ambiente. El contenido en glioxilato en las mezclas fue estimado por medio de espectrofotometría a 520 nm y usando el coeficiente de extinción molar del producto final de la reacción glioxilato-difenilformazan ($\epsilon = 42.36 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

4.2.3. Determinación del contenido en aminoácidos

El contenido en aminoácidos de raíces y parte aérea fue medido mediante electroforesis capilar utilizando un aparato Beckman Coulter PA-800 (Beckman Coulter, Inc, Brea, CA) mediante la inducción de la fluorescencia con láser de argón (488 nm). Las muestras congeladas fueron pulverizadas en un mortero usando nitrógeno líquido, y homogeneizadas con 1.5 ml de 1 M HCl e incubadas en hielo durante 10 minutos. A continuación, se centrifugó el homogeneizado a 13.000 g durante 10 minutos y a 4 °C y el sobrenadante obtenido fue neutralizado con NaOH. Previamente a la separación de los aminoácidos para su cuantificación, las muestras fueron derivatizadas con isotiocianato de fluorescina (FITC) en 20 mM de acetona a pH 10 a temperatura ambiente durante 12-16 horas. La separación de los aminoácidos individuales se realizó a través de un capilar de sílice fundido de 50 μm i.d. x 43/53.2 cm a un voltaje 30 kV a 20 °C. La inyección de las muestras se realizó mediante presurización (5 s, 0.5 psi) utilizándose 80 mM borax y 45 mM alfa-ciclodextrina a pH 9.2 como solución de migración. Como control estándar interno se usaron la norvalina y el ácido homoglutamínico.

4.2.4. Determinación del contenido en poliaminas

El método utilizado para realizar este análisis se basó en el ya seguido y descrito en trabajos anteriores del mismo grupo (Ariz *et al.*, 2013), con algunas correcciones.

A 200 mg de muestra, se añadieron 20 μl 1-6 hexanodiamina, 1 $\mu\text{mol/ml}$, 0.1162 mg/ml como estándar interno y 1.7 ml de HClO_4 aq. (5 %) como extractante. La suspensión resultante se homogeneizó en un Ultra-Turrax T25 (IKA) durante 15 segundos a 24000 rpm y se incubó a 4 °C durante 1 hora. Pasado este tiempo las muestras se centrifugaron a 15.000 g durante 15 minutos a 4 °C y recuperándose 200 μl del sobrenadante. Los extractos fueron alcalinizados con Na_2CO_3 aq. (3.7 M, 400 μl) y posteriormente se añadió cloruro de dansilo (0.12 M en acetona, 400 μl). La disolución resultante se mantuvo a 60 °C durante una hora en oscuridad. Posteriormente, se paró la reacción con prolina aq. (0.87 M, 100 μl) para parar la reacción y se dejó durante 30 minutos y a continuación las poliaminas se extrajeron con acetato de etilo (5 ml). Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se separó la fase orgánica y se desecó mediante destilación a presión reducida a 40 °C. Las poliaminas se reconstituyeron en 0.5 ml de metanol y se filtraron (Microfiltro de Nylon 0.45 μm) previamente a su inyección. En cada análisis se inyectaron 25 μl de extracto.

Las muestras se analizaron mediante cromatografía líquida (HPLC) empleando bombas Waters 575 controladas con un Waters Pump Control Module y el detector de fluorescencia Waters 474 que empleó una longitud de onda de excitación de 350 nm y

una longitud de onda de emisión de 515 nm. La fase estacionaria consistió en una columna EXCEL 120 ODSA (TEKNOKROMA, 100 x 4.6 mm, 3µm) mantenida a 30 °C. La fase móvil consistió en una mezcla de agua (eluyente A) y metanol (eluyente B) en gradiente, con un flujo total de 0.5 ml/min, tal y como se indica en la siguiente tabla (Tabla 3).

Tabla 3: Fase móvil del cromatógrafo. Cantidades de eluyente A (agua) y B (metanol) y flujo.

Time	Flow (ml/min)	% Agua	% MeOH
0	0.5	42	58
10	0.5	34	66
30	0.5	26	74
40	0.5	12	88
44	0.5	0	100
48	0.5	0	100
51	0.5	42	58
54	0.5	42	58

Los tiempos de retención fueron los indicados en la siguiente tabla (Tabla 4):

Tabla 4: Tiempos de retención de los distintos analitos.

analito	t _r (min)
put	29,88
1,6-hexanodiamina	36,07
Espermidina	45,06
Espermina	48,85

El calibrado se realizó empleando disoluciones de cada uno de los analitos y del patrón interno, que se prepararon a partir de disoluciones de las diferentes PA en 0.1 M HCl y que siguieron el tratamiento similar que las muestras. Las disoluciones empleadas y la señal obtenida fueron las siguientes (Tabla 5):

Tabla 5: Concentraciones de los distintos analitos y del patrón interno para el calibrado. Señal obtenida durante el calibrado.

Patrón	[SPD] µM	[SPM] µM	[Put] µM	[Hex] M	I PUT	I HEX	I SPD	I SPM
0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1.44	6.84	1.74	7.25	61374	339742	71809	452374
2	2.88	5.48	3.49	7.25	94030	269936	105460	261499
3	4.32	4.11	5.23	7.25	92049	195235	102152	136456
4	5.76	2.74	6.97	7.25	209271	332981	259833	169874
5	7.21	1.37	8.72	7.25	227497	290413	301363	74119

4.3. Análisis estadístico de los datos

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el programa IBM Statistics para Windows, Versión 21.0. Armonk, NY: IBM Corp. Se utilizó la media como medida de

tendencia central y el error estándar (SE) como medida de dispersión. La normalidad de los datos se estudió mediante el test Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de las varianzas mediante la prueba de Levene. Las diferencias entre tratamientos fueron evaluadas mediante el análisis de varianzas (ANOVA) de un solo factor y como prueba *post-hoc* se utilizó el test Student-Newman-Keuls (SNK) o el no paramétrico T3-Dunnet.

5. RESULTADOS

5.1. Contenido en amonio

En la figura 7 es posible observar como apenas se acumula NH_4^+ en la parte aérea, salvo en las plantas de NH_4^+ 25mM, donde se puede observar una diferencia significativa ($P < 0,05$) respecto al resto de plantas. Mientras que, en las raíces, esta acumulación es algo mayor en las plantas crecidas con NH_4^+ y urea, tanto en bajas como en altas concentraciones, respecto a parte aérea de las mismas plantas.

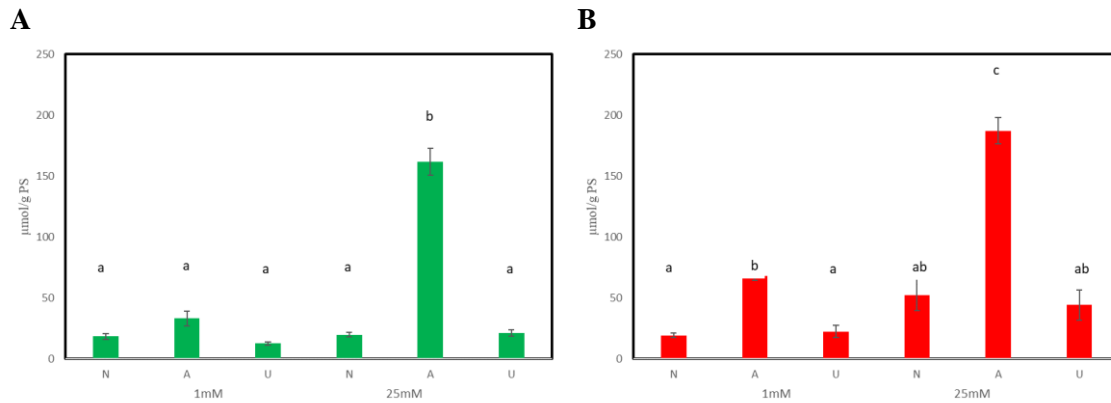


Figura 7: Niveles de NH_4^+ según la fuente de N y las dosis aplicadas de la forma de N en A) parte aérea y B) raíz de *M. truncatula* cultivada en condiciones axénicas. Los valores representan la media \pm el error estándar ($n = 5$). Las diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas usando un test Student-Newman-Keuls con $\alpha = 0,05$.

5.2. Ureidos

5.2.1. Método capilaridad

En la figura 8 podemos ver qué, utilizando el método de capilaridad, se detectó alantoina en todas las plantas, a ambas concentraciones, tanto en parte aérea como en raíz. A bajas concentraciones (1mM) no se presentan diferencias significativas ($P > 0,05$), tanto en parte aérea como en raíz. A altas concentraciones (25 mM) esto solo ocurre en parte aérea, mientras que, en raíz, si hubo diferencias ($P < 0,05$) entre todas las plantas, siendo el contenido en alantoina en las plantas crecidas con urea similar al de parte aérea, con NO_3^- más elevado, y con NH_4^+ muy elevado. Salvo en las plantas crecidas con urea, donde el contenido en alantoina fue similar en ambos órganos, se detectó más alantoina en raíz que en parte aérea.

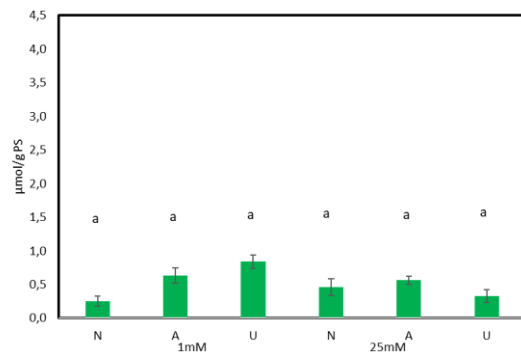
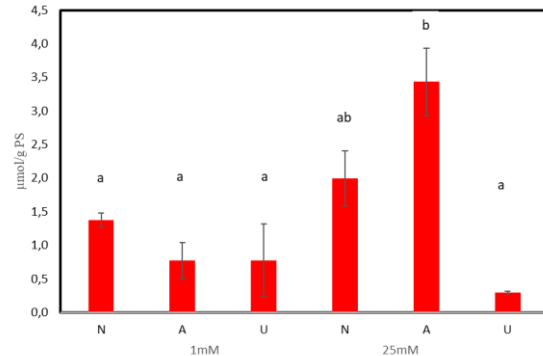
A**B**

Figura 8: Niveles de alantoina según la fuente de N y las dosis aplicadas de la forma de N en A) parte aérea y B) raíz de *M. truncatula* cultivada en condiciones axénicas. Los valores representan la media \pm el error estándar ($n = 5-8$). Las diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas usando un test Student-Newman-Keuls con $\alpha = 0,05$.

En la figura 9 podemos ver qué, utilizando el método de capilaridad, a bajas concentraciones (1mM), se detectaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en parte aérea, mientras que no se hizo en raíz ($P > 0,05$). En altas concentraciones, estas diferencias se hacen especialmente remarcables en la raíz, donde, en las plantas crecidas con NO_3^- y NH_4^+ , se detectó mucho más alantoato que en la parte aérea.

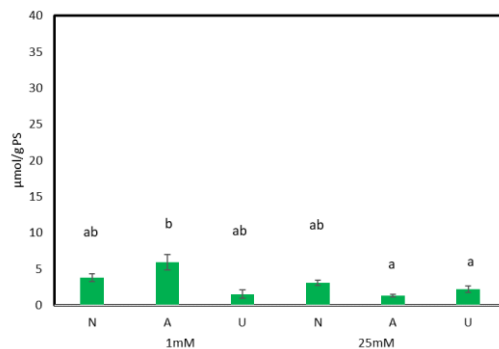
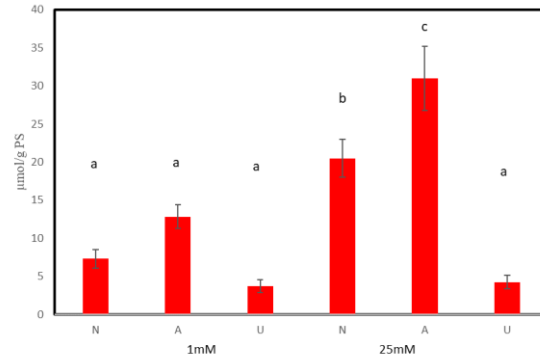
A**B**

Figura 9: Niveles de alantoato según la fuente de N y las dosis aplicadas de la forma de N en A) parte aérea y B) raíz de *M. truncatula* cultivada en condiciones axénicas. Los valores representan la media \pm el error estándar ($n = 5-8$). Las diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas usando un test Student-Newman-Keuls con $\alpha = 0,05$.

En la figura 10, podemos ver como los niveles de ureidos totales son prácticamente idénticos a los de alantoato, debido a que la mayor parte de los ureidos se presentaron de esta forma, con las mismas diferencias entre órganos y concentraciones.

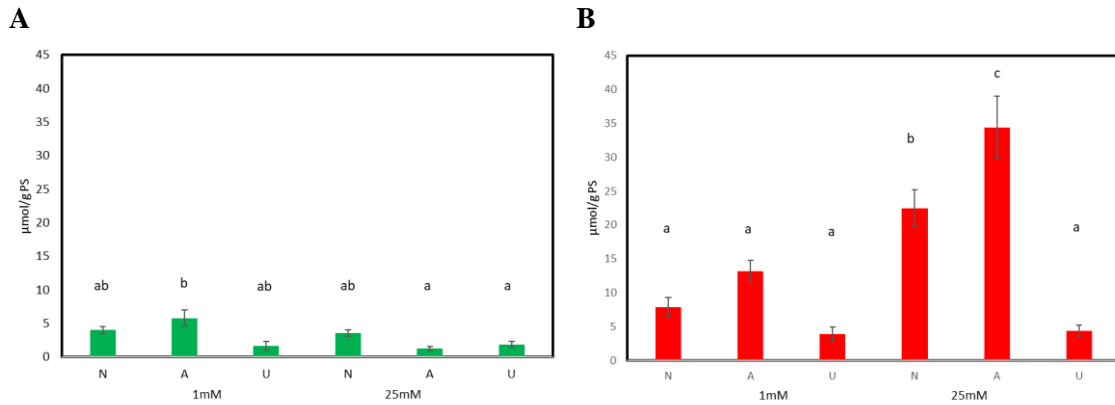


Figura 10: Niveles de ureidos totales según la fuente de N y las dosis aplicadas de la forma de N en A) parte aérea y B) raíz de *M. truncatula* cultivada en condiciones axénicas. Los valores representan la media \pm el error estándar ($n = 5-8$). Las diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas usando un test Student-Newman-Keuls con $\alpha = 0,05$.

5.2.2. Método colorimetría

En la figura 11 podemos ver que utilizando el método descrito en (Vogels y Van Der Drift, 1970), solo se detectó alantoina, en la parte aérea, en las plantas crecidas con urea 1 mM. En cambio, en raíz la alantoina fue detectada en todas las plantas. Se pueden observar diferencias de patrones entre las plantas crecidas a bajas y a altas concentraciones. A bajas concentraciones, el mayor nivel de alantoina se observó en las plantas crecidas con urea, con diferencias significativas ($P < 0,05$) entre todas las plantas. En cambio, para altas concentraciones los niveles de alantoina en plantas crecidas con NO_3^- y NH_4^+ fueron similares y superiores a los de urea.

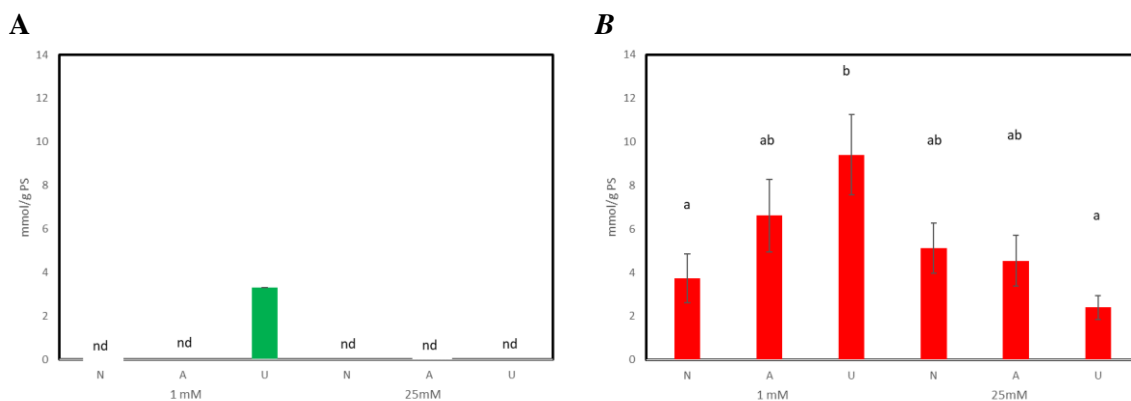


Figura 11: Niveles de alantoina según la fuente de N y las dosis aplicadas de la forma de N en A) parte aérea y B) raíz de *M. truncatula* cultivada en condiciones axénicas. Los valores representan la media \pm el error estándar ($n = 4$). Las diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas usando un test Student-Newman-Keuls con $\alpha = 0,05$.

En la figura 12 podemos ver como los niveles de alantoina en parte aérea son menores en las plantas de urea 1mM, respecto al nivel del resto de plantas, respecto a lo observado en alantoina, donde solo fue en urea donde se detectó. Esta misma tendencia inversa se observa también en las raíces de las plantas crecidas a concentraciones 1mM. Mientras

que los niveles de alantoina en plantas crecidas con NO_3^- fueron inferiores a los otros, en alantoato fueron superiores. En cambio, en los medios concentrados (25 mM), se observa la misma tendencia que en los niveles de alantoina; mayor nivel en plantas con NO_3^- y NH_4^+ que con urea, con diferencias significativas para ambas concentraciones de N.

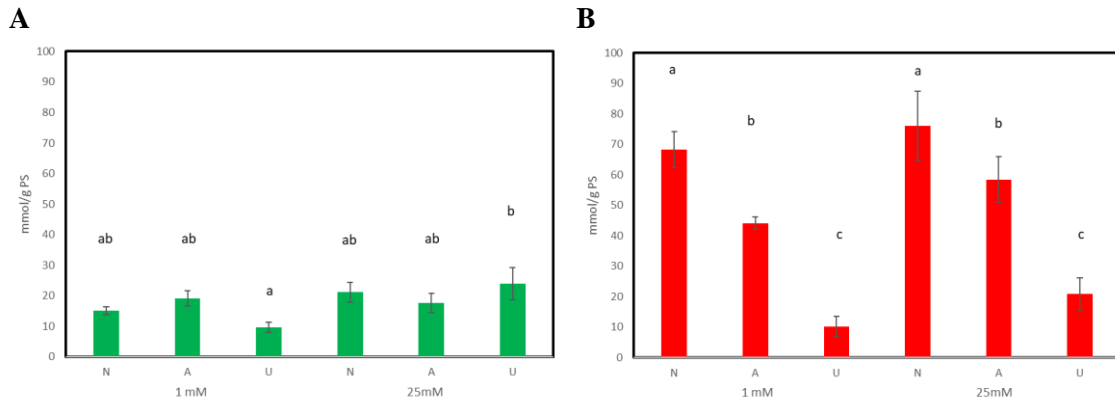


Figura 12: Niveles de alantoato según la fuente de N y las dosis aplicadas de la forma de N en A) parte aérea y B) raíz de *M. truncatula* cultivada en condiciones axénicas. Los valores representan la media \pm el error estándar ($n = 4$). Las diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas usando un test Student-Newman-Keuls con $\alpha = 0,05$.

En la figura 13, podemos ver como los niveles de ureidos totales siguen la misma tendencia que los niveles de alantoato, debido a que, con el método descrito en (Vogels y Van Der Drift, 1970), la mayor parte de los ureidos se presentaron como alantoato.

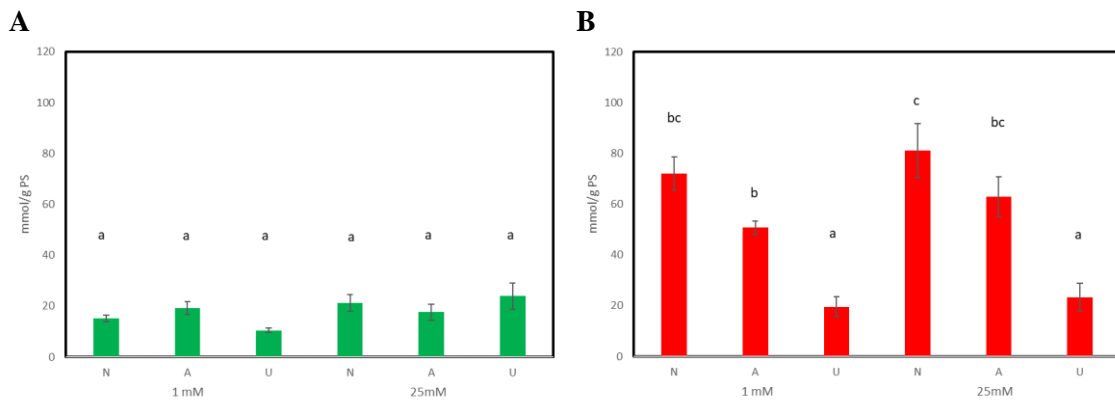


Figura 13: Niveles de ureidos totales según la fuente de N y las dosis aplicadas de la forma de N en A) parte aérea y B) raíz de *M. truncatula* cultivada en condiciones axénicas. Los valores representan la media \pm el error estándar ($n = 4$). Las diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas usando un test Student-Newman-Keuls con $\alpha = 0,05$.

5.3. Contenido en aminoácidos

En la tabla 6 es posible observar como la mayor parte de los aminoácidos presentes en las muestras de nuestros experimentos lo estaban en forma de asparragina. Por otra parte, en las plantas crecidas con urea se observa mayor un contenido de GABA, mientras que su presencia en las plantas crecidas con NH_4^+ es menor que en las plantas crecidas con NO_3^- .

Tabla 6: Contenido relativo de aminoácidos (%) en brotes de *M. truncatula* cultivados usando únicamente nitrato, amonio y urea como fuentes de N. Los valores representan la media \pm el error estándar, (n = 4).

Aminoácido	1mM			25mM		
	Nitrato	Amonio	Urea	Nitrato	Amonio	Urea
Asn	64,93 \pm 10,24	66,56 \pm 9,89	40,14 \pm 6,95	62,84 \pm 3,45	81,78 \pm 0,81	70,39 \pm 5,12
Gln	1,47 \pm 0,24	1,72 \pm 0,60	0,91 \pm 0,18	1,08 \pm 0,16	4,54 \pm 0,59	1,00 \pm 0,20
Arg	0,36 \pm 0,15	0,53 \pm 0,24	0,76 \pm 0,14	0,32 \pm 0,02	2,97 \pm 0,00	1,81 \pm 0,47
Orn	0,36 \pm 0,15	0,64 \pm 0,25	0,90 \pm 0,15	0,77 \pm 0,08	0,48 \pm 0,02	0,57 \pm 0,13
GABA	0,92 \pm 0,38	0,75 \pm 0,27	2,29 \pm 0,53	1,14 \pm 0,21	0,26 \pm 0,00	1,53 \pm 0,70

5.4. Poliaminas

En la figura 14 es posible observar que el nivel de Put en las plantas crecidas con diferentes fuentes de N a bajas concentraciones (1mM), no presenta diferencias significativas ($P > 0,05$) en la parte aérea, mientras que si lo hace en raíz. A altas concentraciones (25mM), esto ocurre tanto en parte aérea como en raíz, donde el contenido en Put en las plantas crecidas con NH_4^+ es especialmente alto.

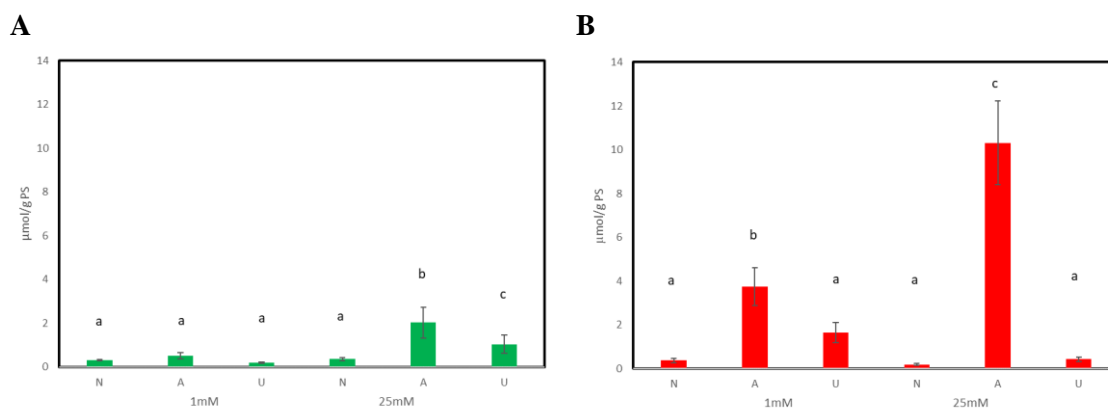


Figura 14: Niveles de Put según la fuente de N y las dosis aplicadas de la forma de N en A) parte aérea y B) raíz de *M. truncatula* cultivada en condiciones axénicas. Los valores representan la media \pm el error estándar (n = 4). Las diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas usando un test Student-Newman-Keuls con $\alpha = 0,05$.

En la figura 15 podemos ver que el ratio de Put frente a Spd+Spm en las plantas crecidas con diferentes fuentes N a bajas concentraciones (1 mM) no presenta diferencias significativas ($P > 0,05$), en parte aérea, mientras que si lo hace en raíz, al igual que ocurre a altas concentraciones (25 mM). Mientras que, en la parte aérea, el contenido en Put no llega a igualar en las plantas crecidas ninguna fuente de N al contenido en Spd+Spm, en raíz esto ocurre en las plantas crecidas con NH_4^+ , llegando a triplicarlo en altas concentraciones de NH_4^+ .

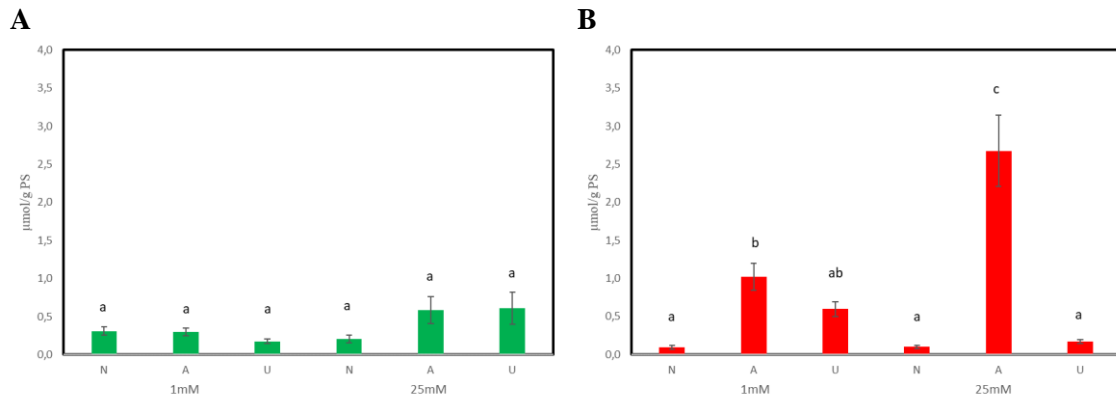


Figura 15: Ratio de Put frente a Spd+Spm según la fuente de N y las dosis aplicadas de la forma de N en A) parte aérea y B) raíz de *M. truncatula* cultivada en condiciones axénicas. Los valores representan la media \pm el error estándar ($n = 4$). Las diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas usando un test Student-Newman-Keuls con $\alpha = 0,05$.

6. DISCUSIÓN

6.1. Efecto de la nutrición nitrogenada sobre *M. truncatula*

El NH_4^+ es una forma común de almacenamiento de N orgánico en las plantas y de este modo se acumula de modo importante durante la nutrición amoniacal (Figura 7). Por el contrario, en las plantas crecidas con urea, que representa el principal fertilizante nitrogenado en campo y que contiene dos moléculas de NH_4^+ por molécula de urea, el aumento del contenido interno de NH_4^+ fue bastante reducido, a pesar de que la urea, tras su hidrólisis por los microorganismos del suelo, es absorbida como NH_4^+ por las plantas. Esto es explicable debido a que la planta parece regular de un modo más eficiente la toma de urea en nuestros medios axénicos (sólidos), mientras que la urea está siendo hidrolizada en el exterior y está siendo introducida en las plantas gracias a transportadores (Kojima *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2015). Por otra parte, el NH_4^+ , sí que está entrando de un modo efectivo en la planta, lo cual se ha propuesto que está facilitado por transportadores del tipo acuaporinas, y que es esta acumulación la principal causante del estrés por NH_4^+ en plantas (Esteban *et al.*, 2016a). En el pasado, la toxicidad por nutrición ureica se relacionó con una alta concentración interna de NH_4^+ (Court *et al.*, 1962), pero esta teoría fue cuestionada en varios artículos, donde no se encontraron síntomas relacionados con toxicidad por NH_4^+ en *A. thaliana*, trigo, maíz o arroz aplicando urea como la única fuente de N (Krogmeier *et al.*, 1989; Mérigout *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2015). El bajo contenido interno de NH_4^+ encontrado en nutrición ureica fue similar al contenido exhibido por plantas crecidas en NO_3^- , sugiriendo así, que las plantas metabolizan toda la urea absorbida sin necesidad de acumularla en forma de NH_4^+ .

El NH_4^+ ha sido demostrado que provoca estrés en plantas acuáticas (Nimptsch y Pflugmacher, 2007), tabaco (Skopelitis *et al.*, 2006) y *Arabidopsis* (Patterson *et al.*, 2010). Sin embargo, en leguminosas, como *M. truncatula*, parece que existe una mayor tolerancia, al no observarse síntomas importantes de esta situación, como pueden ser la clorosis en las hojas o una disminución importante del crecimiento (Britto y Kronzucker, 2002; Esteban *et al.*, 2016a). El estrés y su tolerancia implican importantes cambios en el metabolismo de la planta, incluyendo importantes cambios en los metabolitos nitrogenados y carbonados, estos últimos por ser los responsables de la asimilación del N. Entre las vías metabólicas más afectadas están los contenidos en aminoácidos. Sin embargo, en nuestro trabajo mostramos como las vías de síntesis de ureidos (Figura 16) y de PA (Figura 3) desde el ciclo de la urea resultan en importantes cambios según el tipo de nutrición.

En nuestro trabajo, el contenido en aminoácidos (incluyó Asn y Gln), y fue medido en los tres tipos de nutrición nitrogenada observándose diferencias en el modo en que las plantas almacenaron y transportaron el N. Basándonos en el contenido en Asn y el contenido total de ureidos, nuestros resultados indicaron que las plantas crecidas con NO_3^- transportaban el N en forma de amidas, mientras que las plantas crecidas con NH_4^+ estaban usando los ureidos como forma de transporte de N. Los resultados de Alamillo *et al.* (2010), en donde el contenido total de ureidos, tanto en raíz como en parte aérea, en alubias no noduladas,

crecidas en condiciones de sequía con altas concentraciones de NO_3^- , concuerdan con nuestros resultados, reforzando nuestra hipótesis de que los ureidos superan a las amidas como forma de transporte de N cuando este se presenta en forma de NH_4^+ , probablemente debido a su mayor ratio N/C. De acuerdo con esto, existen estudios que señalan que en plantas de soja y guisante no noduladas, es característico que se acumulen aminoácidos con altos ratios N/C como Asn y Arg, cuando aumenta la concentración de NH_4^+ en el medio (Ueda *et al.*, 2008; Ariz *et al.*, 2013). Estos resultados concuerdan con los elevados niveles de Asn y Gln encontrados en nuestros experimentos en las plantas crecidas con NH_4^+ concentrado, lo que podría indicar mayores requerimientos de C, debido a una menor eficiencia fotosintética. Este incremento en el ratio C/N de los ureidos al ratio C/N de Asn y Gln provee de C extra a las plantas, aumentando así su ratio C/N total (Royo, 2017). De forma acorde con esto, la exposición a alta radiación lumínica, también provee de un aporte extra de C a otras leguminosas, como el guisante, incrementando el ratio entre Glu+Gln frente a Asp+Asn, lo que revierte los síntomas de falta de C observados en condiciones de nutrición amoniacal en estas plantas (Ariz *et al.*, 2013).

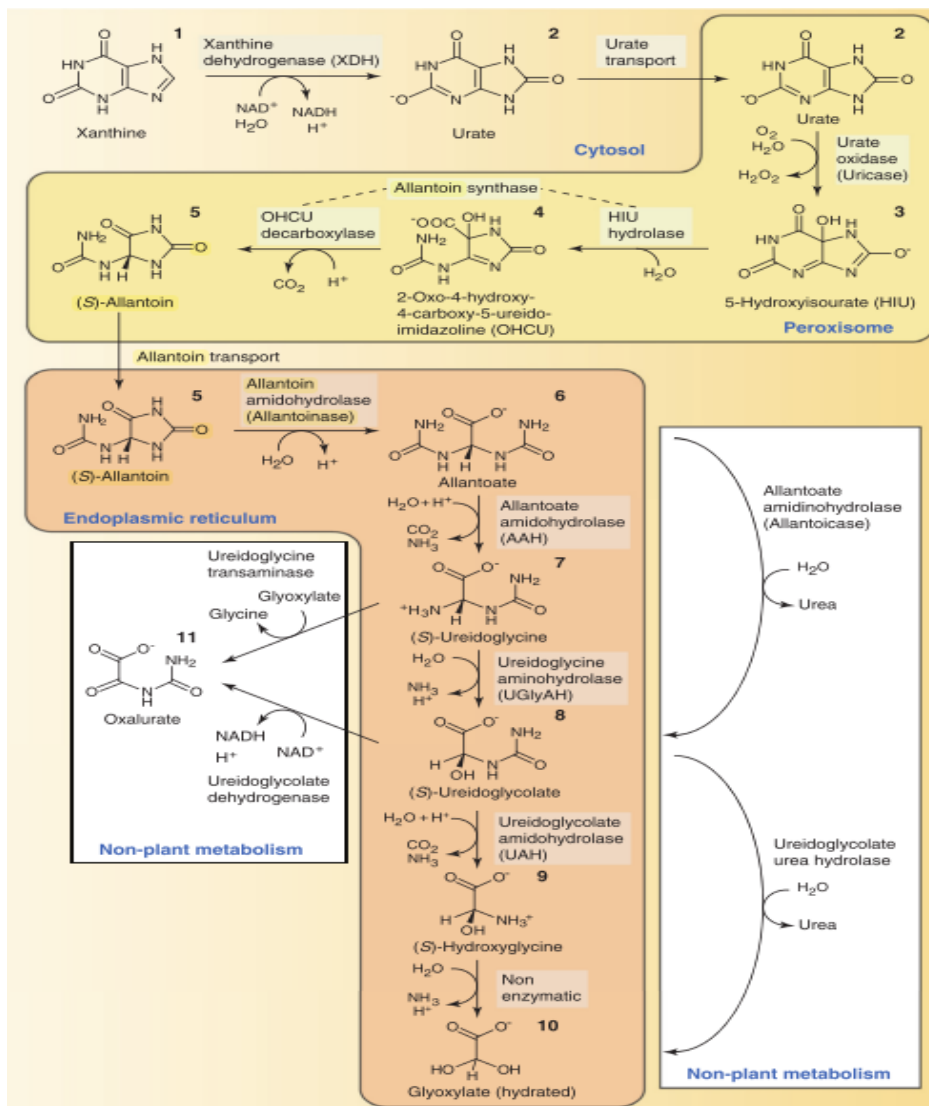


Figura 16: El catabolismo del sistema de anillos de purinas. La ruta catabólica mostrada comienza con la xantina, el primer intermediario común en la degradación de todas las purinas. Fuente: Werner, A. K., y Witte, C. P. (2011).

Tomado en conjunto, todo esto refuerza nuestra hipótesis de que *M. truncatula* crecida en NH_4^+ o urea usa las amidas como forma de transporte de N, mientras que cuando es crecida en NO_3^- , son los ureidos la forma de transporte de N.

Por otra parte, el contenido en GABA ofrece un enlace entre los metabolismos del N y del C. Lo que es más, bajo ciertas situaciones de estrés, las plantas acumulan GABA, el cual se ha descrito como un regulador de crecimiento (Kinnersley y Turano, 2000). Se detectó un incremento del total de aminoácidos, junto con un descenso del contenido de GABA (Tabla 6) en raíces de plantas crecidas en altas concentraciones de NH_4^+ . Estos mismos resultados fueron encontrados en raíces de guisantes, donde altas concentraciones de NH_4^+ en el medio producen los mismos efectos en los contenidos de cada aminoácido (Ariz *et al.*, 2013). Un estudio reciente con raíces de trigo relacionado con el pH y el estrés por aluminio demostró una acumulación de GABA y se propuso un rol para GABA como molécula señalizadora (Ramesh *et al.*, 2015). En anteriores trabajos de este grupo de investigación se propuso que la activación de GABA en condiciones de alta

concentración de NH_4^+ pueda estar ligada al restablecimiento del balance C/N y el control de la toma de NH_4^+ por regulación directa de transportadores de NH_4^+ .

6.2. El papel de los ureidos en la tolerancia frente al estrés

Observando los resultados de los análisis de contenidos de ureidos por el método de cromatografía de capilaridad (Sato *et al.*, 1998), (Figuras 8-10), y por el método de colorimetría (Vogels y Van Der Drift, 1970), (Figuras 11-13), se pueden observar significantes diferencias en los rangos de contenido de ureidos. Además, existió otra importante diferencia en el hecho de que, mediante el método de capilaridad, la alantoina fue detectada en las plantas crecidas con las distintas fuentes de N, mientras que, usando el método de colorimetría, ésta solo fue detectada en las plantas crecidas con urea a baja concentración.

Basándonos en los resultados de otros ensayos en similares condiciones (Cheng *et al.*, 1999), con rangos de contenido en ureidos similares a los obtenidos mediante el método de capilaridad, será éste el que usaremos para la discusión sobre el contenido en ureidos. Por otra parte, este método de cromatografía de capilaridad es el que utiliza regularmente nuestro grupo de investigación, y para el hemos obtenido un mayor número de réplicas y proporciona unos errores estándar más bajos, por lo que seguiremos manteniendo este análisis como de referencia.

Es posible ver, (Figuras 8-10), como los ureidos se presentaron mayoritariamente en forma de alantoato en las raíces de nuestras plantas. Esta situación es especialmente remarcable en las plantas crecidas con NH_4^+ , a ambas concentraciones de N y con NO_3^- en altas concentraciones, mientras que esto no sucede en las plantas crecidas con urea. La acumulación de ureidos en forma de alantoato en las plantas crecidas con NH_4^+ se deba probablemente a la acción inhibitoria de la Asn. Esta situación se corresponde por la observada por Lukaszewski *et al.* (1992), quienes observaron en su estudio en soja que esta acumulación de alantoato se correspondía con la acumulación de Asn. Además de esto, existen estudios en los que se observó en *Lolium perenne*, como el contenido total en ureidos aumentaba en raíz de plantas crecidas con NO_3^- y NH_4^+ de modo concomitante con la dosis de estas formas de N (Sagi *et al.*, 1998). En este mismo estudio, se observó que, a bajas concentraciones de N, el contenido en alantoina era mayor en la raíz de las plantas crecidas con NO_3^- que en las de NH_4^+ , mientras que esta situación era opuesta en el caso del alantoato, tal y como ocurre en nuestros ensayos. Por el contrario, en las plantas crecidas con urea, el contenido en ureidos, tanto en alantoina como en alantoato, es inferior al de las otras plantas. Esto se puede deber más que a una acción inhibitoria por alguna otra molécula, como puede ocurrir en el caso del NH_4^+ , a que las plantas crecidas en urea no parecen necesitar acumular el NH_4^+ , ya que, aparentemente, absorben del medio únicamente aquella urea que necesitan.

De acuerdo a Storey (2006), los ureidos tienen función de transporte de N, en leguminosas de origen tropical y subtropical como la soja, siendo la principal forma de transporte de N desde las raíces a la parte aérea, mientras que las leguminosas de origen templado como la alfalfa, el guisante y la propia *M. truncatula* exportan el N en forma de amidas como

la Asn. Por ello, estos resultados concuerdan con esta afirmación, aunque *M. truncatula* sea una planta que utiliza las amidas para esta función en lugar de las formas ureicas. Las mayores concentraciones de ureidos en las plantas crecidas con NO_3^- 25 mM, sugieren que el exceso de acumulación de N produzca un cambio en la forma de transporte y los ureidos toman más importancia, debido al bajo ratio C/N de estos, aunque las amidas siguen representando la principal forma de transporte de N en *M. truncatula*.

El hecho de que el alantoato representa la mayor parte de los ureidos se puede explicar de acuerdo a Werner y Witte (2011), quienes afirmaron que bajo condiciones en las que el N se encontraba en forma inorgánica, las plantas de *Arabidopsis* eran capaces de crecer normalmente, a expensas de acumular grandes cantidades de alantoato. Sin embargo, no podemos descartar que la inhibición de la vía de ureidos se esté produciendo por producto final, ya que el NH_4^+ que se acumula en el interior celular es el producto en varias reacciones del metabolismo de ureidos (Figura 16). Además, también es posible que el alantoato se esté acumulando de esta forma, tanto para responder a la función del alantoato como transportador de N, como para responder al estrés ocasionado por la alta concentración de NH_4^+ en el medio y acumular N en esqueletos carbonatados mediante moléculas con alto ratio N/C.

Además, se ha demostrado que la acumulación de alantoina juega un papel protector frente al estrés abiótico (Sagi *et al.*, 1998; Watanabe *et al.*, 2014; Lescano *et al.*, 2016). Estos autores proponen que la alantoina juega un papel protector al activar la producción de ácido abscísico (ABA). Anteriormente se había propuesto una acción antioxidante similar a la de las PA para la alantoina, pero se demostró que esto no era así al no observarse una desactivación de radicales libres en presencia de alantoina. Los resultados de Watanabe *et al.* (2014) demostraron una correlación positiva entre el contenido de alantoina, el contenido de ABA y la tolerancia a estrés en plantas de arroz. De hecho, el que esta molécula se haya encontrado a niveles similares a los de las PA, llevó a considerar que tanto ureidos como Put (u otras PA en otros estreses) pueden tener un papel protector (Watanabe *et al.*, 2014).

6.3. El rol de las poliaminas en la respuesta al estrés

Los resultados de nuestros experimentos mostraron que la mayor parte de las PA encontradas en raíz, se presentaban en forma de Put, en plantas crecidas con NH_4^+ , y en forma de Spd, en plantas crecidas con NO_3^- y urea. La raíz es el órgano más afectado en comparación con la parte aérea (Figura 15). Es más, hemos podido observar una elevada acumulación de Put en plantas de *M. truncatula* crecidas con NH_4^+ , lo cual ocurría de manera conjunta con una acumulación de otros precursores del ciclo de la urea (Glu y Arg), mientras se producía una importante disminución de GABA y de las otras PA como son las Spd y la Spm.

Las PA pueden tener un efecto protector como antioxidantes. Según Guye *et al.* (1986), debido a la mayor carga eléctrica por molécula de la Spm (cuatro cargas) sobre la Spd (tres cargas) y la Puta (dos cargas), que se relaciona con su capacidad para secuestrar radicales libres y unirse a otras moléculas, debería ser la Spm, y en menor medida la Spd,

las formas en las que las PA deberían presentarse en su función de tolerancia a estrés, siendo la Put, únicamente, un precursor. Sin embargo, esto no ocurre en nuestro sistema bajo condiciones de estrés amoniacal. Esto sugiere que las PA no están funcionando fisiológicamente como antioxidantes, sino que están teniendo otro papel. De hecho, se ha propuesto que los estreses ambientales, incluyendo el NH_4^+ , pueden desencadenar una situación de estrés oxidativo en plantas como ocurre en las plantas de *Arabidopsis* (Podgórska y Szal, 2015). Aunque en leguminosas no se ha observado el aumento en los marcadores de estrés oxidativos (Domínguez-Valdivia *et al.*, 2008). Por ello la función que el aumento en los contenidos de Put bien podría ser acumular N como forma de reserva. Sin embargo, para esta función serían también más útiles las otras PA, Spm y Spd, que contienen mayores porcentajes de N por molécula que la Put. Por ello, es posible sugerir que la función de la acumulación forme parte del proceso de bloque de la síntesis de GABA, que es un metabolito implicado en la señalización del estrés y que modula el crecimiento de la planta (Ramesh *et al.*, 2015), y que por tanto puede estar condicionando el crecimiento de la planta bajo nutrición amoniacal.

Krishnamurthy y Bhagwat (1989) observaron en sus experimentos como, en el caso de plantas no tolerantes a estrés salino, la Put se acumuló, igual que en nuestros ensayos, pero a diferencia de nuestro estudio, no se observaron grandes cambios en los niveles de Spd y Spm. Sin embargo, en el caso de plantas tolerantes a estrés salino, como es el caso de *Medicago truncatula*, fueron la Spd y Spm las que se acumularon, mientras que el contenido en Put decreció, lo cual evidencia una respuesta diferencial del estrés salino respecto a nuestros resultados con estrés amoniacal. Esta misma acumulación de Put (y Arg) que nosotros observamos se ha mostrado en plantas de guisantes crecidas también con diferentes concentraciones de NH_4^+ (Ariz *et al.*, 2013), y confirma la importancia del ciclo de la urea que proponemos en este trabajo en la respuesta al estrés por NH_4^+ .

Al observar los resultados de nuestros experimentos, vemos como encontramos más PA en las raíces de nuestras plantas que en la parte aérea. Además, salvo en el caso de las plantas crecidas en NH_4^+ 25 mM, estas PA se presentaron en forma de Spd y Spm. Es posible ver también que las plantas crecidas en altas concentraciones de N en forma de urea, esto no fue así, que el contenido en PA fue mayor en la parte aérea que en las raíces. Este menor contenido en PA en la raíz en las plantas nutridas con urea puede deberse a dos razones. La primera de ellas es que la síntesis de GABA no está siendo inhibida por el contenido en NH_4^+ en la planta, ya que las plantas parecen capaces de utilizar toda la urea que absorben sin necesidad de almacenarla en forma de NH_4^+ , algo que se confirma al comparar tanto los contenidos en NH_4^+ como los contenidos en GABA de nuestras plantas con los mismos resultados cuando las plantas fueron crecidas con NO_3^- como fuente de N. La otra posibilidad es que las plantas crecidas en este medio, necesiten mayor cantidad de PA en la parte aérea para usarlas en su función de reguladores de crecimiento (Luna-Esquivel *et al.*, 2014), ya que la Put ha sido relacionada con distintas repuestas morfogénicas en otras especies tales como *A. thaliana* (Tiburcio *et al.*, 1990; R Minocha *et al.*, 1999; Uribe *et al.*, 2011).

La Put es precursora de GABA a través de la enzima DAO, al igual que lo es la Spd, a través de la enzima PAO (Figura 3). Viendo que el contenido en GABA es menor en los medios amoniacaes que en el resto, es evidente que su producción está siendo inhibida por el NH_4^+ , por lo que sería interesante en un futuro inmediato analizar las actividades de DAO y PAO para confirmar esta afirmación.

7. CONCLUSIONES

Los datos presentados en este trabajo demuestran cambios muy remarcables en el metabolismo de N. Entre estos cambios podemos remarcar el aumento de los aminoácidos con grupos amidas, especialmente en la raíz, con la función de acumular grandes cantidades de N en bajas cantidades de C y así poder restablecer el ratio C/N desestabilizado como consecuencia del estrés por amonio. Por otro lado, podemos señalar las diferencias en los mecanismos de tolerancia a estrés en los diferentes tipos de nutrición, especialmente el bloque debido al amonio en el metabolismo de las poliaminas, así como la acumulación regulada por producto final de los ureidos (alantoato principalmente). La demostración de que el estrés por amonio bloquea el ciclo de la urea y la síntesis de poliaminas y su metabolización hacia el GABA (señalizador), renueva el interés por esta vía metabólica, que parece no tener importancia en la nutrición nitrogenada basada en nitrato y urea.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Alamillo, J. M., Dí Az-Leal, J. L., Sánchez-Moran, M. A. V., y Pineda, M. (2010).** Molecular analysis of ureide accumulation under drought stress in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant, Cell and Environment*, 33(11), 1828-1837. 10.1111/j.1365-3040.2010.02187.x
- Allen, A. E., Dupont, C. L., Oborník, M., Horák, A., Nunes-Nesi, A., McCrow, J. P., ... Bowler, C. (2011).** Evolution and metabolic significance of the urea cycle in photosynthetic diatoms. *Nature*, 473(7346), 203-207. 10.1038/nature10074
- Ariz, I., Asensio, A. C., Zamarreño, A. M., García-Mina, J. M., Aparicio-Tejo, P. M., y Moran, J. F. (2013).** Changes in the C/N balance caused by increasing external ammonium concentrations are driven by carbon and energy availabilities during ammonium nutrition in pea plants: The key roles of asparagine synthetase and anaplerotic enzymes. *Physiologia Plantarum*, 148(4), 522-537. 10.1111/j.1399-3054.2012.01712.x
- Azcón-Bieto, J., y Talón, M. (2013).** Fundamentos de fisiología vegetal (Segunda ed).
- Bittsánszky, A., Pilinszky, K., Gyulai, G., y Komives, T. (2015).** Overcoming ammonium toxicity. *Plant Science*, 231, 184-190. 10.1016/j.plantsci.2014.12.005
- Britto, D. T., y Kronzucker, H. J. (2002).** Review NH₄⁺ toxicity in higher plants : a critical review I . Introduction. *Journal of Plant Physiology*, 159(6), 567-584. 10.1078/0176-1617-0774
- Cao, F.-Q., Werner, A. K., Dahncke, K., Romeis, T., Liu, L.-H., y Witte, C.-P. (2010).** Identification and Characterization of Proteins Involved in Rice Urea and Arginine Catabolism. *Plant Physiology*, 154(1), 98-108. 10.1104/pp.110.160929
- Chemnitz, C., y Weigelt, J. (2015).** Soil Atlas. *Soil Atlas*. 10.2788/52319
- Chen, J., Wang, W. H., Wu, F. H., You, C. Y., Liu, T. W., Dong, X. J., ... Zheng, H. L. (2013).** Hydrogen sulfide alleviates aluminum toxicity in barley seedlings. *Plant and Soil*, 362(1-2), 301-318. 10.1007/s11104-012-1275-7
- Cheng, X. G., Nomura, M., Sata, T., Fujikake, H., Ohyama, T., y Tajima, S. (1999).** Effect of exogenous NH₄⁺ -N supply on distribution of ureide content in various tissues of alfalfa plants, *Medicago sativa*. *Soil Science and Plant Nutrition*, 45(4), 921-927. 10.1080/00380768.1999.10414341
- Childs, A. C., Mehta, D. J., y Gerner, E. W. (2003).** Polyamine-dependent gene expression. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 60(7), 1394-1406. 10.1007/s00018-003-2332-4
- Court, M. N., Stephen, R. C., y Waid, J. S. (1962).** Nitrite toxicity arising from the use of urea as fertilizer. *Nature*, 194(1), 1263-1265. 10.1111/j.1365-2389.1964.tb00244.x
- Domínguez-Valdivia, M. D., Aparicio-Tejo, P. M., Lamsfus, C., Cruz, C., Martins-Loução, M. A., y Moran, J. F. (2008).** Nitrogen nutrition and antioxidant metabolism in ammonium-tolerant and -sensitive plants. *Physiologia Plantarum*, 132(3), 359-369. 10.1111/j.1399-3054.2007.01022.x

- Esteban, R., Royo, B., Urarte, E., Zamarreño, Á. M., Garcia-Mina, J. M., y Moran, J. F. (2016).** Both Free Indole-3-Acetic Acid and Photosynthetic Performance are Important Players in the Response of *Medicago truncatula* to Urea and Ammonium Nutrition Under Axenic Conditions. *Frontiers in Plant Science*, 7, 140. 10.3389/fpls.2016.00140
- Esteban, R., Ariz, I., Cruz, C., y Moran, J. F. (2016).** Review: Mechanisms of ammonium toxicity and the quest for tolerance. *Plant Science*, 248, 92-101. 10.1016/j.plantsci.2016.04.008
- FAO. (2017).** El futuro de la alimentación y la agricultura, Tendencias y desafíos.
- Galston, A. W. (1983).** Polyamines as Modulators of Plant Development. *BioScience*, 33(6), 382-388. 10.2307/1309107
- Garnica, M., Houdusse, F., Zamarreño, A. M., y Garcia-Mina, J. M. (2010).** Nitrate modifies the assimilation pattern of ammonium and urea in wheat seedlings. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(3), 357-369. 10.1002/jsfa.3811
- Gerendás, J., Zhu, Z., y Sattelmacher, B. (1998).** Influence of N and Ni supply on nitrogen metabolism and urease activity in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*, 49(326), 1545-1554. 10.1093/jxb/49.326.1545
- Gill, S. S., y Tuteja, N. (2010).** Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signaling and Behavior*, 5(1), 26-33. 10.4161/psb.5.1.10291
- Guye, M. G., Vigh, L., y Wilson, J. M. (1986).** Polyamine titre in relation to chill-sensitivity in *Phaseolus* sp. *Journal of Experimental Botany*, 37(7), 1036-1043. 10.1093/jxb/37.7.1036
- Hawkesford, M., Horst, W., Kichey, T., Lambers, H., Schjoerring, J., Müller, I. S., y White, P. (2011).** Functions of Macronutrients. En *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants: Third Edition* (pp. 135-189). Elsevier. 10.1016/B978-0-12-384905-2.00006-6
- Kinnersley, A. M., y Turano, F. J. (2000).** Gamma Aminobutyric Acid (GABA) and Plant Responses to Stress. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19(6), 479-509. 10.1080/07352680091139277
- Kojima, S., Bohner, A., Gassert, B., Yuan, L., y Wirén, N. von. (2007).** AtDUR3 represents the major transporter for high-affinity urea transport across the plasma membrane of nitrogen-deficient *Arabidopsis* roots. *Plant Journal*, 52(1), 30-40. 10.1111/j.1365-313X.2007.03223.x
- Krishnamurthy, R., y Bhagwat, K. A. (1989).** Polyamines as modulators of salt tolerance in rice cultivars. *Plant physiology*, 91(2), 500-4.
- Krogmeier, M. J., McCarty, G. W., y Bremner, J. M. (1989).** Phytotoxicity of foliar-applied urea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(21), 8189-91. 10.1073/pnas.86.21.8189
- Lasa, B., Frechilla, S., Aparicio-Tejo, P. M., y Lamsfus, C. (2002).** Role of glutamate dehydrogenase and phosphoenolpyruvate carboxylase activity in ammonium nutrition tolerance in roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(11), 969-976. 10.1016/S0981-9428(02)01451-1

- Lescano, C. I., Martini, C., González, C. A., y Desimone, M. (2016).** Allantoin accumulation mediated by allantoinase downregulation and transport by Ureide Permease 5 confers salt stress tolerance to *Arabidopsis* plants. *Plant Molecular Biology*, 91(4-5), 581-595. 10.1007/s11103-016-0490-7
- Liu, J.-H., Wang, W., Wu, H., Gong, X., y Moriguchi, T. (2015).** Polyamines function in stress tolerance: from synthesis to regulation. *Frontiers in Plant Science*, 6(October), 1-10. 10.3389/fpls.2015.00827
- Lukaszewski, K. M., Blevins, D. G., y Randall, D. D. (1992).** Asparagine and boric acid cause allantoate accumulation in soybean leaves by inhibiting manganese dependent allantoate amidohydrolase. *Plant Physiology*, 99(4), 1670-1676.
- Luna-Esquivel, E. N., Ojeda-Barrios, D. L., Guerrero-Prieto, V. M., Ruíz-Anchondo, T., y Martínez-Téllez, J. J. (2014).** Polyamines As Indicators of Stress in Plants. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, XX(3), 283-296. 10.5154/r.rchsh.2013.05.019
- Marschner, H. (1995).** Mineral nutrition of higher plants. Academic Press San Diego, 862.
- Mérigout, P., Lelandais, M., Bitton, F., Renou, J.-P. J.-P., Briand, X., Meyer, C., ... Daniel-Vedele, F. (2008).** Physiological and Transcriptomic Aspects of Urea Uptake and Assimilation in *Arabidopsis* Plants. *Plant Physiology*, 147(3), 1225-1238. 10.1104/pp.108.119339
- Minocha, R., Smith, D. R., Reeves, C., Steele, K. D., y Minocha, S. C. (1999).** Polyamine levels during the development of zygotic and somatic embryos of *Pinus radiata*. *Physiologia Plantarum*. 10.1034/j.1399-3054.1999.105123.x
- Minocha, R., Majumdar, R., y Minocha, S. C. (2014).** Polyamines and abiotic stress in plants: a complex relationship. *Frontiers in Plant Science*, 5(2553), 1-17. 10.3389/fpls.2014.00175
- Nimptsch, J., y Pflugmacher, S. (2007).** Ammonia triggers the promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte *Myriophyllum mattogrossense*. *Chemosphere*, 66(4), 708-714. 10.1016/j.chemosphere.2006.07.064
- Patterson, K., Cakmak, T., Cooper, A., Lager, I., Rasmusson, A. G., y Escobar, M. A. (2010).** Distinct signalling pathways and transcriptome response signatures differentiate ammonium- and nitrate-supplied plants. *Plant, Cell and Environment*, 33(9), 1486-1501. 10.1111/j.1365-3040.2010.02158.x
- Pinton, R., Tomasi, N., y Zanin, L. (2016).** Molecular and physiological interactions of urea and nitrate uptake in plants. *Plant Signaling y Behavior*, 11(1), e1076603. 10.1080/15592324.2015.1076603
- Podgórska, A., y Szal, B. (2015).** The Role of Reactive Oxygen Species Under Ammonium Nutrition y Nitrogen Assimilation in Plants. En J. Gupta Kapuganti y A. U. Igamberdiev (Eds.), *Reactive Oxygen and Nitrogen Species Signaling and Communication in Plants* (23.^a ed., pp. 133-153). Springer. 10.1007/978-3-319-10079-1_7
- Ramesh, S. A., Tyerman, S. D., Xu, B., Bose, J., Kaur, S., Conn, V., ... Gillham, M. (2015).** GABA signalling modulates plant growth by directly regulating the activity

- of plant-specific anion transporters. *Nature Communications*, 6, 7879. 10.1038/ncomms8879
- Royo, B. (2017).** An integrated view of changing nutrient availability in model species : The role of signaling in the plant response. Beatriz Royo Castillejo PhD Thesis 2017. Universidad Pública de Navarra.
- Sagi, M., Omarov, R. T., y Lips, S. H. (1998).** The Mo-hydroxylases xanthine dehydrogenase and aldehyde oxidase in ryegrass as affected by nitrogen and salinity. *Plant Science*, 135(2), 125-135. 10.1016/S0168-9452(98)00075-2
- Sanchez, D. H., Cuevas, J. C., Chiesa, M. A., y Ruiz, O. A. (2005).** Free spermidine and spermine content in *Lotus glaber* under long-term salt stress. *Plant Science*, 168(2), 541-546. 10.1016/j.plantsci.2004.09.025
- Sarasketa, A., González-Moro, M. B., González-Murua, C., y Marino, D. (2014).** Exploring ammonium tolerance in a large panel of *Arabidopsis thaliana* natural accessions. *Journal of Experimental Botany*, 65(20), 6023-6033. 10.1093/jxb/eru342
- Sato, T., Yashima, H., Ohtake, N., Sueyoshi, K., Akao, S., Harper, J. E., y Ohyama, T. (1998).** Determination of leghemoglobin components and xylem sap composition by capillary electrophoresis in hypernodulation soybean mutants cultivated in the field. *Soil Science and Plant Nutrition*, 44(4), 635-645. 10.1080/00380768.1998.10414487
- Skopelitis, D. S., Paranychianakis, N. V., Paschalidis, K. A., Pliakonis, E. D., Delis, I. D., Yakoumakis, D. I., ... Roubelakis-Angelakis, K. A. (2006).** Abiotic Stress Generates ROS That Signal Expression of Anionic Glutamate Dehydrogenases to Form Glutamate for Proline Synthesis in Tobacco and Grapevine. *The plant cell online*, 18(10), 2767-2781. 10.1105/tpc.105.038323
- Storey, J. B. (2006).** Plant Nutrition. *Handbook of Plant Nutrition*, 411-435. 10.1093/treephys/tpq048
- Tiburcio, A., Kaur-Shawney, R., y Galston, R. (1990).** Polyamine metabolism. En M. B. J. y J. L. Peter (Eds.), *The biochemistry of plants* (16.^a ed., pp. 283-325). San Diego: Academic Press.
- Ueda, S., Ikeda, M., y Yamakawa, T. (2008).** Provision of carbon skeletons for amide synthesis in non-nodulated soybean and pea roots in response to the source of nitrogen supply. *Soil Science and Plant Nutrition*, 54(5), 732-737. 10.1111/j.1747-0765.2008.00293.x
- Uribe, Ma., Materán, M. E., Cañal Villanueva, M. J., y Rodriguez, R. (2011).** Variación en la concentración de poliaminas endógenas en función de la edad en microtallos de *Pinus Caribaea Mor.* *Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América*, I, 36(4), 306-311.
- Vogels, G. D., y Van Der Drift, C. (1970).** Differential analyses of glyoxylate derivatives. *Analytical Biochemistry*, 33(1), 143-157. 10.1016/0003-2697(70)90448-3
- Wang, W. H., Liu, G. W., Cao, F. Q., Cheng, X. Y., Liu, B. W., y Liu, L. H. (2013).** Inadequate root uptake may represent a major component limiting rice to use urea

as sole nitrogen source for growth. *Plant and Soil*, 363(1-2), 191-200. 10.1007/s11104-012-1305-5

Watanabe, S., Matsumoto, M., Hakomori, Y., Takagi, H., Shimada, H., y Sakamoto, A. (2014). The purine metabolite allantoin enhances abiotic stress tolerance through synergistic activation of abscisic acid metabolism. *Plant, Cell and Environment*, 37(4), 1022-1036. 10.1111/pce.12218

Werner, A. K., y Witte, C. P. (2011). The biochemistry of nitrogen mobilization: Purine ring catabolism. *Trends in Plant Science*, 16(7), 381-387. 10.1016/j.tplants.2011.03.012

Witte, C. P. (2011). Urea metabolism in plants. *Plant Science*, 180(3), 431-438. 10.1016/j.plantsci.2010.11.010

Yang, H., Menz, J., Häussermann, I., Benz, M., Fujiwara, T., y Ludewig, U. (2015). High and Low Affinity Urea Root Uptake: Involvement of NIP5;1. *Plant and Cell Physiology*, 56(8), 1588-1597. 10.1093/pcp/pcv067

Zhou, Z., Metcalf, A. E., Lovatt, C. J., y Hyman, B. C. (2000). Alfalfa (*Medicago sativa*) carbamoylphosphate synthetase gene structure records the deep lineage of plants. *Gene*, 243(1-2), 105-114. 10.1016/S0378-1119(99)00552-1

ANEXO 1: ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- AIH: Argantina imidohidrolasa
- Arg: Arginasa
- Arg: Arginina
- Arg DC: Arginina descarboxilasa
- AsL: Argininosuscinato liasa
- Asn: Asparagina
- Asp: Aspartato
- AsuS: Argininosuccinato sintasa
- $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$: Urea
- DAO: Diamino oxidasa
- GABA: Ácido γ -aminobutírico
- Gln: Glutamina
- Glu: Glutamato
- GOGAT: Glutamato sintasa
- GS: Glutamina sintetasa
- H_2O_2 : Peróxido de hidrógeno
- NH_4^+ : Amonio
- NO_3^- : Nitrato
- Orn: Ornitina
- Orn DC: Ornitina descarboxilasa
- OTC: Transcarbamilasa
- PA; Poliaminas:
- PAO: Poliamina oxidasa
- PCT: Putrescina carbomil transferasa
- PS: Peso seco
- Put: Putrescina
- Spd: Espermidina
- SpdS: Espermidina sintasa
- Spm: Espermina
- SpmS: Espermina sintasa
- Ure: Ureasa