



Universidad Pública de Navarra
Nafarroako Unibertsitate Publikoa

Mecanismo de acción de sustancias
bioestimulantes. Estudio con mutantes en
Arabidopsis thaliana (L.)

Trabajo Fin de Máster

Máster en Agrobiología ambiental

Curso 2022-2023

Autor: Álvaro Rubio

Directores: Maite Olaetxea y Javier Erro

Tutora: Idoia Ariz

ÍNDICE

1. Introducción	4
2. Objetivos generales	6
3. Material y métodos	7
3.1. Diseño experimental	7
3.2. Preparación de la siembra	7
3.3. Preparación y aplicación de la solución nutritiva	8
3.4. Cambios de solución nutritiva y homogeneización	8
3.5. Tratamiento con ácido húmico	9
3.6. Cosechas	9
3.7. Análisis WinRHIZO	10
3.8. Cuantificación de H ₂ O ₂	10
3.8.1. Extracción de H ₂ O ₂ en planta utilizando buffer de fosfato	10
3.8.2. Puesta a punto de la cuantificación por fluorescencia	11
3.8.3. Cuantificación en lector de placas de fluorescencia	14
3.9. Cuantificación hormonal	14
3.9.1. Análisis de las concentraciones de IAA, ABA, JA y SA en raíz	14
3.9.2. Análisis de la concentración de CKs en parte aérea	16
3.10. Análisis SPAD	17
3.11. ANOVA	17
4. Resultados y discusión	19
4.1. Primera cosecha	19
4.2. Segunda cosecha	23
5. Conclusiones	30
6. Referencias	32

Resumen

La capacidad de los ácidos húmicos (AH) para bioestimular de manera directa el crecimiento vegetal está documentada en diferentes estudios. Sin embargo, el conocimiento sobre los mecanismos implicados en estos efectos directos, es, hasta el momento, escaso y fragmentario. En estudios anteriores, se demostró, con la aplicación de un inhibidor sintético de H₂O₂ (DMTU) en *Arabidopsis thaliana*, que la acción de los ácidos húmicos sobre el H₂O₂, desempeña un papel fundamental en la acción promotora de los AH sobre el desarrollo de raíz y parte aérea. Con el objetivo de proporcionar nuevos conocimientos al modelo actual, sobre el modo de acción de los AH para bioestimular el crecimiento vegetal, nuestro estudio profundizó en la implicación del metabolismo de las especies reactivas de oxígeno como vía de acción. Para ello, se emplearon dos mutantes específicos en *Arabidopsis Thaliana L.*: RbohC y RbohD. Los resultados muestran que la enzima codificada por el gen RbohC, juega un papel crucial en el mecanismo de acción bioestimulante directo de los ácidos húmicos sobre el crecimiento vegetal.

Palabras clave

Sustancias húmicas, ácidos húmicos sedimentarios, crecimiento vegetal, enzima RbohC, enzima RbohD, ROS (Reactive Oxygen Species).

Abreviaturas

ABA: ácido abscísico / AH: ácido húmico / AHS: ácido húmico sedimentario / AF: ácido fúlvico / CKs: citoquininas / DMTU: dimetil tiourea / IAA: ácido indol-3-acético / JA: ácido jasmónico / MO: materia orgánica / ROS: Reactive Oxygen Species (especies reactivas de oxígeno) / RBOH: Respiratory Burst Oxidase Homolog (homólogas de oxidasa de explosión respiratoria) / SA: ácido salicílico / SH: sustancia húmica

1. Introducción

Las sustancias húmicas (SH), sistemas moleculares complejos constituidos por macromoléculas individuales y agregados moleculares, son uno de los principales componentes que conforman la materia orgánica (MO) presente en el suelo y la MO disuelta. (Stevenson 1994; Tipping 2002; Chen *et al.* 2004; Baigorri *et al.* 2007a; Baigorri *et al.* 2007b; Trevisan *et al.* 2011; Canellas & Olivares 2014; Olaetxea *et al.* 2018). Estas sustancias, dada su compleja estructura molecular, poseen propiedades fisicoquímicas como coloidales e hidrofílicas (Piccolo 2002). Las SH se pueden clasificar en función de su solubilidad en agua dependiendo del pH, pudiendo distinguir así tres fracciones: una soluble a pH básico pero insoluble a pH ácido denominada ácido húmico (AH), otra soluble tanto a pH básico como a pH ácido llamada ácido fúlvico (AF) y una tercera fracción, la humina, insoluble a cualquier pH (Stevenson 1994). No obstante, con esta metodología no se puede distinguir la MO húmica de la MO no húmica, si estas poseen propiedades de solubilidad similares. Para reparar en el grado de humificación de la MO y complementar dicha clasificación, existe otra metodología que difiere entre: las SH formadas por medio de transformaciones diferentes al proceso de compostaje natural (SH artificiales), las SH que provienen de residuos frescos de animales o vegetales (SH frescas), las SH provenientes de procesos de compostaje (SH compostadas), y las SH formadas en ambientes naturales humificados de origen sedimentario terrestre o acuático (SH sedimentarias) (Mora *et al.* 2014b). En el presente trabajo se utiliza un extracto de ácido húmico de origen sedimentario proveniente de leonardita (AHS).

Estudios previos han demostrado cómo los AH, dadas su estructura y propiedades, son capaces de bioestimular indirectamente el crecimiento vegetal, al mejorar la disponibilidad de nutrientes en el suelo para las plantas (MacCarthy *et al.* 1990; Chen *et al.* 2004; García-Mina 2006; Gerke 2010; Erro *et al.* 2012; Urrutia *et al.* 2014; Monda *et al.* 2017). Además, los AH también son capaces de interactuar con las raíces, con acciones sobre el metabolismo y la fisiología de las plantas, bioestimulando de manera directa el crecimiento vegetal (Canellas *et al.* 2002; Quaggiotti *et al.* 2004; Muscolo *et al.* 2007; Olaetxea *et al.* 2015; Olaetxea *et al.* 2018). Algunos estudios realizados hasta la fecha, han tratado de relacionar esta bioestimulación directa con diversos acontecimientos a nivel AH-raíz, que desencadenan en modificaciones bioquímicas y metabólicas en la planta (Canellas *et al.* 2002; Zandonadi *et al.* 2007; Mora *et al.* 2010; Trevisan *et al.* 2010a; Trevisan *et al.* 2010b; Zandonadi *et al.* 2010;

Canellas *et al.* 2011; Mora *et al.* 2012; Mora *et al.* 2014; Olaetxea *et al.* 2015). No obstante, a día de hoy, el debate sobre la definición de estos acontecimientos primarios sigue abierto.

Con la información obtenida en dichos estudios sobre las vías involucradas en la bioestimulación de los AH, se decidió estudiar la influencia de las especies reactivas del oxígeno (en adelante ROS por sus siglas en inglés) y su metabolismo como vía de acción de los AH. Existen grupos de investigación que ya han dado los primeros pasos en relacionar esta vía con la aplicación de AH en raíz, obteniendo con la aplicación de AH de vermicompost, aumentos significativos en los niveles radiculares de ROS, en la actividad y expresión génica de las principales enzimas antioxidantes, y en el crecimiento y desarrollo de la raíz (García *et al.* 2016). La hipótesis de partida propuesta en nuestro estudio, radica en el efecto de los AH como primer y principal mecanismo desencadenante en la bioestimulación directa del crecimiento vegetal. Para estudiar dicha hipótesis, se llevó a cabo un primer ensayo aplicando AH y empleando dimetil tiourea (DMTU), un inhibidor sintético de H₂O₂. Los resultados mostraron que el papel del H₂O₂ era clave para la estimulación de los AH. Para afinar más en el mecanismo de acción de los AH, se planteó emplear dos mutantes de *Arabidopsis thaliana* en los cuales las funciones de un determinado gen implicado en la vía del ROS estuviesen inactivas.

Las enzimas que sintetizan ROS en las plantas en base a factores hormonales y ambientales, se denominan NADPH oxidasas u homólogas de oxidasa de explosión respiratoria (RBOH). Hasta la fecha, en la familia de *Arabidopsis* existen 10 miembros de enzimas RBOH con diferentes patrones de expresión, funciones en el desarrollo y respuestas al estrés. De entre estos miembros, las enzimas RbohC, RbohD, RbohE y RbohF, son las que actúan a nivel radicular. Al desarrollo y elongación de la raíz primaria se le asocian la RbohC, la RbohD y la RbohF. Al desarrollo y elongación de las raíces secundarias se le asocian la RbohD, la RbohF y la RbohE. A la formación y al desarrollo de pelos radicales se le asocia únicamente la RbohC (Chapman *et al.* 2019). Mientras que las diferentes enzimas Rboh en raíz comparten funciones, la enzima RbohC tiene un rol específico que ninguna otra enzima posee. Conociendo esto, se decidió realizar el estudio con mutantes de la enzima RbohC y con mutantes de otra enzima que tuviese funciones en raíz (RbohD).

2. Objetivos generales

El principal objetivo del estudio consiste en investigar el mecanismo de acción que mejora el crecimiento de las plantas provocado por los ácidos húmicos sedimentarios (AHS). Para ello, se proponen las siguientes hipótesis:

- I. Profundizar en los mecanismos de acción del ácido húmico como bioestimulante del crecimiento vegetal.
- II. Estudiar las vías de señalización dependientes de las enzimas RbohC o RbohD, como vías esenciales en el mecanismo de acción bioestimulante directo de los AHS en plantas.

Para ello, se han empleado dos mutantes de *Arabidopsis thaliana*, en los cuales se han inactivado las funciones de dos genes de enzimas implicadas en el metabolismo de ROS, RbohC y RbohD. Durante el estudio, se aplican sustancias húmicas sin purificar (con su fracción fúlvica) de origen sedimentario y extraídas de leonardita (AHS), que han sido ampliamente caracterizadas en estudios previos (Aguirre *et al.* 2009; Mora *et al.* 2010; Mora *et al.* 2012; Mora *et al.* 2014; Olaetxea *et al.* 2015).

La acción de las AHS sobre el rendimiento de cultivo se asume que involucra otros mecanismos indirectos complementarios que no se contemplan en este estudio. De hecho, aquellos mecanismos asociados a la mejora de la disponibilidad de nutrientes, producto de la interacción de las AHS con los componentes del suelo, generalmente son más relevantes que los resultantes de la interacción directa de los AHS con las raíces de las plantas (Chen *et al.* 2004; Olaetxea *et al.* 2018).

3. Material y métodos

3.1. Diseño experimental

El ensayo realizado en este estudio se llevó a cabo en hidroponía, utilizando tres ecotipos en *Arabidopsis Thaliana* L.: el ecotipo salvaje (wild-type) y dos transgénicos (RbohC y RbohD). Se distinguieron seis grupos de plantas en función del tipo de planta y su tratamiento. Un primer grupo de plantas sin mutación ni bioestimulante a modo de plantas control, un segundo grupo de plantas sin mutación tratadas con AHS, un tercer grupo de plantas con las funciones del gen que codifica la RbohC inactivas y sin AHS, un cuarto grupo de plantas con AHS y con las funciones del gen que codifica la RbohC inactivas, un quinto grupo de plantas sin AHS y con las funciones del gen que codifica la RbohD inactivas y un último grupo de plantas con AHS y con las funciones del gen que codifica la RbohD inactivas.

La dosis de AHS con la que se realizaron todos los tratamientos durante el ensayo fue de 100 ppm de C. Para la aplicación de los 100 ppm de C de AHS sin purificar (con un 42% de C) se ajusta la dosis para un volumen final de 1,4 L de solución nutritiva.

Durante el ensayo se realizaron dos cosechas: una a los dos y otra a los nueve días de haber tratado con AHS. Cabe mencionar que las mediciones de clorofila se tomaron entre ambas cosechas, a los cuatro y a los ocho días de haber realizado los tratamientos con AHS.

3.2. Preparación de la siembra

Para cada grupo de plantas se emplean 5 repeticiones (5 tupper) por cosecha. De esta forma, el ensayo constó de 60 tupper, con 34 conos de crecimiento por cada tupper. Se preparó el agar como medio para las semillas y se dosificó con jeringas en cada uno de los conos de agar. Se esterilizaron los tres tipos de semillas con lejía diluida durante un minuto, se lavaron los restos de lejía y se conservaron en frío durante una noche. Al día siguiente, se depositó una semilla por cada cono de agar, se rellenaron todos los tupper con agua destilada y se llevaron a la cámara de crecimiento, donde se programaron unas condiciones de luz (10 horas de luz y 14 horas de noche), humedad (75% de humedad) y temperatura (21°C durante el día y 18°C durante la noche) óptimas para la germinación y el crecimiento de las plantas.

3.3. Preparación y aplicación de la solución nutritiva

Pasados 10 días desde la siembra, se retiraron aquellos conos de crecimiento donde la semilla no logró germinar. Ese mismo día, se prepararon los 5 stocks necesarios para realizar la solución nutritiva (Tabla 1).

- Tabla con la composición de la solución nutritiva

Tabla 1. Pesos de soluto y volúmenes de stock empleados en la elaboración de la solución nutritiva.

Nombre del Stock	Contenido	Stock (Peso de soluto por cada 2 L de agua (g soluto /L agua))	SN (Volumen de Stock por cada 50 L de agua (mL Stock / L agua))
STOCK Macros	MgSO ₄ .7H ₂ O	184,86	100
STOCK KH ₂ PO ₄	KH ₂ PO ₄	68,04	100
STOCK Nitratos	KNO ₃	126,38	100
	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	354,22	
STOCK Fe	Fe HBED	24,8	100
STOCK Micros	KCl	7,46	50
	MnSO ₄ .H ₂ O	3,38	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,74	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,16	
	H ₃ BO ₃	6,18	
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0,18	
pH final de la SN = 6 (Si es necesario, corregir pH con NaOH 1M)			

3.4. Cambios de solución nutritiva y homogeneización

7 días después de la aplicación de la solución nutritiva, se homogeneizaron por primera vez los tupper. Esta homogeneización consistió en reducir a 18 el número total de plantas por tupper, eliminando aquellos individuos que manifestasen un crecimiento menor o mayor al considerado como medio. Una vez homogeneizados todos los tupper, se les cambió la

solución nutritiva. La preparación y aplicación de la nueva solución nutritiva, se realizó del mismo modo que en la primera ocasión (Apartado 3.3.).

Pasados 7 días desde el primer cambio de solución nutritiva, se realizó un segundo cambio de solución y una segunda homogeneización (Figura 1). Esta homogeneización no consistió en realizar descartes, sino en redistribuir a los individuos hasta ese momento presentes por todos los tupperes en base al tamaño, de manera que hubiese el mismo número de plantas pequeñas, medianas y grandes en cada tupper.

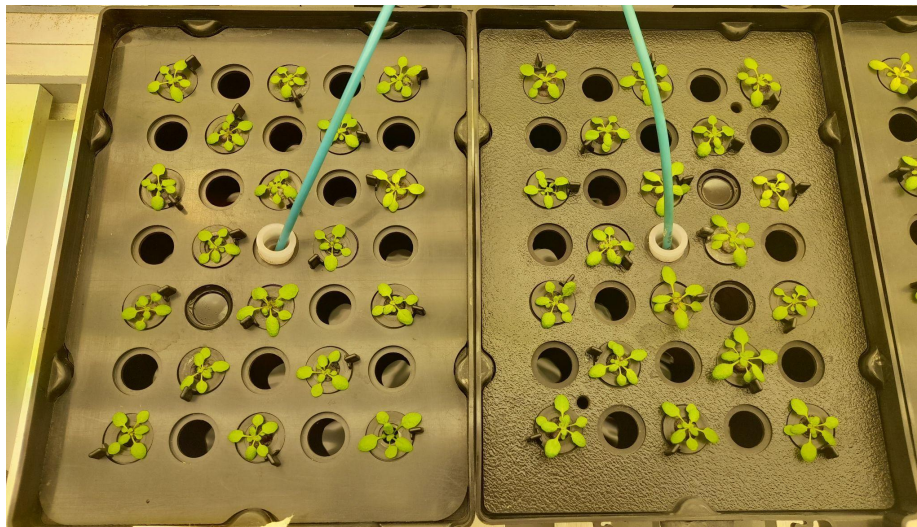


Figura 1. Tupperes con aireación después del segundo cambio de solución nutritiva y la segunda homogeneización.

3.5. Tratamiento con ácido húmico

Tres días después de la segunda homogeneización, se consideró que las plantas ya habían adquirido el tamaño óptimo para recibir los tratamientos, y se aplicaron 100 ppm de C de los AHS en los tupperes correspondientes.

3.6. Cosechas

La primera cosecha se realizó pasados dos días de la aplicación del ácido húmico, y la segunda a los nueve días. En ambas, se cosecharon 30 tupperes en total, 5 por cada grupo. Una vez cosechado el material, se realizó el peso en fresco, tanto de la raíz como de la parte aérea de cada tupper.

En la primera cosecha se conservó en un congelador a -80°C , por un lado, todo el material radicular para analizar la concentración endógena de H_2O_2 mediante una técnica fluorimétrica

y, por otro lado, se congeló también todo el material de la parte aérea para un análisis de las citoquinas presentes en dichas muestras. En la segunda cosecha, se procedió de igual manera con las muestras de parte aérea, no obstante, con el material radicular cosechado y congelado, se decidió realizar una cuantificación hormonal en lugar de una cuantificación de la concentración de H_2O_2 en raíz.

3.7. Análisis WinRHIZO

En la segunda cosecha del ensayo se fotografiaron las raíces de 18 individuos (3 por cada uno de los 6 tratamientos), y con estas imágenes se realizó un análisis WinRHIZO. WinRHIZO es un sistema de análisis de imágenes, diseñado para realizar mediciones de las raíces de las plantas. Puede hacer análisis morfológicos (longitud, área, volumen...), topológicos, arquitectónicos y de color. El producto final despliega un histograma con la distribución de la longitud de las raíces, información cuantitativa sobre el área y el volumen que ocupan las raíces, su diámetro, y el número de ápices, bifurcaciones y cruces presentes en las raíces (Bouma *et al.* 2000; Régent Instrument Inc 2001; Pang *et al.* 2011; Tracy *et al.* 2012). Estos atributos estructurales y funcionales son importantes para evaluar la cantidad y la calidad de las raíces de los cultivos, porque determinan en gran medida la capacidad de absorción de agua y nutrientes, y la competencia entre las plantas vecinas. WinRHIZO® ha sido evaluado en sistemas modelo que garantizan la veracidad de los resultados cuantitativos producidos (Pang *et al.* 2011; Gutiérrez-Soto *et al.* 2014).

3.8. Cuantificación de H_2O_2

3.8.1. Extracción de H_2O_2 en planta utilizando buffer de fosfato

Se realizó la molienda de las muestras congeladas haciendo uso de un mortero y un pilón de cerámica. Una vez molidas, se pesaron 100 mg de cada muestra en tubos eppendorf de 2mL, y se volvieron a conservar a $-80^{\circ}C$ en el congelador. Para evitar la degradación del H_2O_2 de las muestras durante los procesos de molienda y pesada, todo el material empleado se mantuvo en contacto con nitrógeno líquido.

Se prepararon 250 mL de buffer de fosfato, con fosfato disódico y fosfato monosódico:

- Na_2HPO_4 : 6,931 g / 0,250 L
- NaH_2PO_4 : 0,881 g / 0,250 L

Se añadieron 500 μL de este buffer fosfato a cada una de las muestras congeladas, y se agitaron en vortex durante 30 segundos. Una vez realizada la mezcla con el buffer, se agitaron todas las muestras durante 30 minutos a 9.000 rpm en un agitador a temperatura ambiente y, posteriormente, se centrifugaron durante 5 minutos a 10.000 rpm, también a temperatura ambiente (Figura 2).



Figura 2. Agitador y centrifugadora empleados en la extracción de H_2O_2 de las muestras de raíz.

Se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf de 2 mL nuevo. Para evitar la degradación del H_2O_2 , el sobrenadante se mantuvo en hielo hasta la cuantificación de las muestras.

3.8.2. Puesta a punto de la cuantificación por fluorescencia

Se puso a punto una metodología de detección de H_2O_2 por fluorescencia. Para ello, se prepararon los estándares de la recta de calibrado, diluyendo distintos volúmenes de una solución madre de H_2O_2 en el mismo buffer fosfato utilizado para la extracción, en tubos eppendorf de 2 mL. La solución madre de H_2O_2 se preparó a una concentración 1 mM en 100 mL de buffer de fosfato (Tabla 2).

- Tabla de la elaboración de la recta de calibrado

Tabla 2. Volúmenes y concentraciones empleadas para la elaboración de las muestras estándar de la recta de calibrado.

Stock estándar- Volumen total (2 mL)	Solución madre de H ₂ O ₂ (μL)	Buffer de fosfato	Concentración muestra final (μM)
2 μM	4	1 mL + 996 μL	0,1
20 μM	40	1 mL + 960 μL	1
50 μM	100	1 mL + 900 μL	2,5
100 μM	200	1 mL + 800 μL	5

Una vez listas las muestras de la recta de calibrado, se preparó el reactivo Ampliflu y la enzima HRP. El reactivo Ampliflu, una sonda altamente sensible y estable para el H₂O₂, es nuestro mejor sustrato fluorogénico para la peroxidasa. En presencia de peroxidasa de rábano (HRP), el reactivo Ampliflu reacciona en una estequiometría de 1:1 con el H₂O₂ para producir resorufina altamente fluorescente (Figura 3) (Chakraborty *et al.* 2016). Por tanto, la intensidad de fluorescencia de una muestra, es proporcional a la cantidad de resorufina producida, y por consiguiente, a la cantidad de H₂O₂ de dicha muestra.

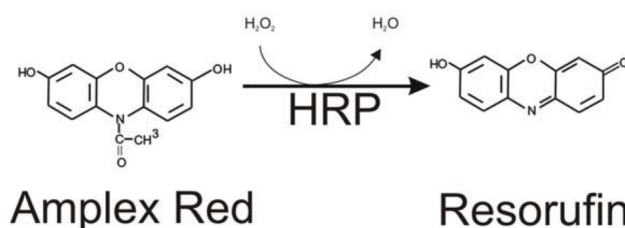


Figura 3. Conversión del Amplex Red (Ampliflu) en Resorufina. Fuente: Quantitation of Hydrogen Peroxide using the Synergy HT™.

Para pesar los solutos Ampliflu y HRP, se hizo uso de una balanza de precisión (Figura 4).

- Ampliflu 10 mM: 0,5 mg / 192 μL de DMSO.
- HRP 10 U/mL: 0,5 mg / 12,5 mL de buffer de fosfato.



Figura 4. Balanza de precisión empleada para pesar los solutos de Ampliflu y HRP.

A continuación, se mezclaron ambas soluciones con buffer fosfato, obteniendo así la mezcla final encargada de activar la reacción.

- 150 μL de Ampliflu 10mM
- 300 μL de HRP 10U/mL
- 14,55 mL de buffer fosfato

Una vez realizados los estándares de la recta de calibrado, la mezcla con el reactivo y la extracción de H_2O_2 de las muestras, se prepararon en una microplaca las muestras finales a analizar (Tabla 3). Una vez añadidos los 500 μL de la mezcla con el reactivo, se dejó incubar la microplaca durante 30 minutos a temperatura ambiente y en ausencia de luz.

- Tabla de la composición de las muestras finales a analizar

Tabla 3. Volúmenes de las muestras finales a analizar en el espectrofluorímetro.

Muestras finales - Volumen total (1 mL)	Solución correspondiente (μL)	Buffer de fosfato (μL)	Mezcla con el reactivo (μL)
Blanco	-	50	50
Estándar	5 μL del stock estándar correspondiente	45	50
Muestra	5 μL del lisado proteico de cada muestra	45	50

3.8.3. Cuantificación en lector de placas de fluorescencia

Pasados los 30 minutos de incubación, las muestras se analizaron en un lector de placas de fluorescencia. La espectroscopía de fluorescencia o fluorimetría es una espectroscopía basada en la emisión fluorescente de una muestra. Un haz de luz es irradiado sobre la muestra, la cual absorbe un fotón y pasa de estar en un estado electrónico fundamental a un estado excitado. Tras la absorción, la molécula de muestra se relaja y vuelve a un estado fundamental emitiendo un fotón. Las longitudes de onda a las que los fotones excitados se emiten, se medirán y representarán en función de la intensidad, en este caso, la absorción del fotón por parte de la muestra la hemos fijado a $\lambda 530$ nm, y el pico de emisión de los fotones excitados se ha dado a $\lambda 587$ nm. El modo de fluorescencia elegido fue el de synchronous, que abarca un rango de excitación y otro de emisión separados por un intervalo constante de longitud de onda. La intensidad del pico de emisión de una muestra es proporcional a la cantidad de resorufina producida, y por consiguiente, a la concentración de H_2O_2 de dicha muestra.

3.9. Cuantificación hormonal

3.9.1. Análisis de las concentraciones de IAA, ABA, JA y SA en raíz

Las concentraciones de ácido indol-3-acético (IAA), ácido abscísico (ABA), ácido jasmónico (JA) y ácido salicílico (SA) en raíz, se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución, electropulverización y espectrometría de masas de alta resolución (HPLC-ESI-HRMS). Los patrones de IAA, ABA, JA se obtuvieron de OlChem Ltd, y el reactivo de SA de Sigma-Aldrich. Los estándares internos marcados con deuterio, ácido 2H_5 -indol-3-acético (D-IAA), y ácido 2H_6 -(El ácido+)-cis,trans-abscísico (D-ABA) y ácido 2H_4 -salicílico (D-SA) se adquirieron también en OlChem Ltd y los marcados con ácido 2H_5 -jasmónico (D-JA) en CDN Isotopes.

Para la extracción y purificación de las hormonas de las muestras vegetales se aplicó el siguiente método. Se homogeneizó 0,1 g de raíz congelada (previamente molida en un mortero) con 1 mL de metanol:agua:HCOOH preenfriado (-20 °C) (90:9:1, v/v/v, con dietilditiocarbamato de sodio 2,5 mM) y 10 μ l de una solución madre de 1.000 ng·ml⁻¹ de patrones internos marcados con deuterio en metanol. Se realizó la extracción agitando las muestras a 2000 rpm durante 60 minutos en un agitador Multi Reax. Tras la extracción, se

separaron los sólidos centrifugando las muestras a 13.000 rpm durante 10 minutos, en una pica centrífuga Biofuge. Se añadió 0,5 mL de mezcla de extracción adicional, y se realizó una segunda extracción con una agitación de 20 minutos, seguida de una centrifugación. Se separó en cada muestra 1 mL del sobrenadante y se evaporó a 40°C con un evaporador RapidVap. Se redisolvió el residuo en 250 µl de metanol/ácido acético al 0,133% (40:60, v/v). Finalmente se centrifugó durante 10 minutos a 20.000 RCF antes de la inyección en el sistema HPLC-ESI-HRMS.

Para la cuantificación hormonal se utilizó un dispositivo UHPLC Dionex Ultimate 3000 acoplado a un espectrómetro de masas Exploris 120 (Thermo Fisher Scientific), con una fuente de iones OptaMax NG, un filtro de masas cuadrupolo, una trampa C, un multipolo de enrutamiento de iones y un analizador de masas Orbitrap. Se empleó una columna de fase inversa (Synergi 4 mm Hydro-RP 80A, 150 x 2 mm; Phenomenex). Se hizo uso de un gradiente lineal de metanol (A), agua (B) y ácido acético al 2% en agua (C): Durante 3 minutos (38% A), en 12 minutos (de 38% a 96% A), durante 2 minutos (96% A), en 1 minuto (de 96% a 38% A) y un tiempo de estabilización de 4 minutos. El porcentaje de C se mantuvo constante en 4%. El caudal fue de 0,30 mL/min⁻¹, el volumen de inyección fue de 20 µl y las temperaturas de la columna y de la muestra fueron de 35 y 15 °C, respectivamente.

La detección y cuantificación de IAA, ABA, JA y SA se llevó a cabo mediante un experimento Product Ion Scan en el modo de iones negativos, empleando curvas de calibración multinivel con los estándares internos. La resolución se estableció en 30.000 FWHM, la resolución Q1 (m/z) en 3, el objetivo de AGC estándar, el modo de tiempo máximo de inyección automático y la lente RF en 70%. La energía de colisión absoluta (CE) depende de la molécula. Se aceptó una tolerancia de masa de 5 ppm. Para cada hormona, se analizaron tres iones fragmentados. El fragmento de ion con mayor intensidad (fragmento 1) se usó para la cuantificación y los otros dos (fragmento 2 y 3) se usaron para confirmar la identidad de los objetivos. En el caso de los estándares internos, solo se analizó el ion fragmento de mayor intensidad. El control del instrumento y el procesamiento de datos se llevaron a cabo mediante el software TraceFinder 5.1 EFS.

3.9.2. Análisis de la concentración de CKs en parte aérea

Nuevamente, las citoquininas (CKs) en parte aérea se analizaron mediante HPLC-ESI-HRMS. Se estudiaron las siguientes citoquininas: trans y cis zeatina (tZ y cZ),

dihidrozeatina (DHZ), trans y cis zeatina ribósido (tZR y cZR), dihidrozeatina ribósido (DHZR), isopenteniladenina (iP) y isopenteniladenosina (iPR). Los estándares internos marcados con deuterio $^2\text{H}_5$ -transzeatina (D-tZ), $^2\text{H}_5$ -transzeatina ribósido (D-tZR), $^2\text{H}_6$ -isopenteniladenina (D-iP), $^2\text{H}_6$ -isopenteniladenosina (D-iPR), se obtuvieron de OlChemim Ltd.

Para la extracción y purificación de las hormonas se siguió el método descrito por Dobrev y Kaminek (2002) con algunas variaciones. Se homogeneizaron 0,1g de material vegetal congelado (previamente molido en mortero) con 1,75 mL de metanol-agua-ácido fórmico preenfriado (-20°C) (15:4:1, v/v/v). Se agregaron estándares internos marcados con deuterio, 20 μL de una solución madre de $100\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ de cada estándar en metanol. Se realiza la extracción durante una noche a -20°C y se separan los sólidos a 4°C centrifugando a 20.000 RCF durante 10 minutos. Se vuelven a extraer con 1,25 mL de extracción, durante 20 minutos en agitación con un agitador Multi Reax, y se centrifuga de nuevo. Pasamos el sobrenadante a través de un cartucho Sep-Pak C18 (ref. WAT054945, Waters Co.) preconditionado con 2 mL de metanol y 1,5 mL de extracción. El material eluido se evaporó prácticamente hasta la sequedad usando un evaporador RapidVap. Se redisolvió el residuo en 1,5 mL de ácido fórmico 1M y se aplicó a una columna Oasis MCX (ref. 186000254, Waters Co.) preconditionada con 2 mL de metanol y 1,5 mL de ácido fórmico 1M. La columna fue lavada sucesivamente con 1,5 mL de ácido fórmico 1 M, 1,5 mL de metanol y 1,5 mL de NH_4OH 0,35 M. Las bases de citoquinina y los ribósidos se eluyeron con 1,5 mL de NH_4OH 0,35 M.OH en metanol al 60% (v/v). Este material eluido se evaporó hasta la sequedad en el evaporador RapidVap, se redisolvió con 200 μL de metanol + 200 μL de ácido fórmico al 0,04% y se centrifugó a 20.000 RCF durante 10 minutos, antes de la inyección en el sistema HPLC-ESI-HRMS.

Para la cuantificación se empleó el mismo dispositivo que el utilizado en la cuantificación del apartado 3.9.1. de este mismo documento. Se utilizó una columna de fase inversa (Tracer Excel 120 ODSA $3\mu\text{m}$, $200 \times 4,6\text{mm}$; Teknokroma). Se utilizó un gradiente lineal de metanol (A), agua (B) y ácido fórmico en agua al 0,4% (C): A tiempo 0 (45% A), en 14 minutos (de 45% a 95% A), durante 0,5 minutos (95% A), en 0,5 minutos (de 95% a 45% A) y un tiempo de estabilización de 6 min. El porcentaje de C permaneció constante en 5%. El caudal fue de $0,40\text{ mL}/\text{min}^{-1}$, el volumen de inyección fue de 20 μL y las temperaturas de la columna y de la muestra fueron de 30 y 15°C , respectivamente.

La detección y cuantificación de citoquininas se llevó a cabo mediante un experimento Product Ion Scan en el modo de iones negativos, empleando curvas de calibración multinivel con los estándares internos. La resolución se estableció en 60.000 FWHM, la resolución Q1 (m/z) en 3, el objetivo de AGC estándar, el modo de tiempo máximo de inyección automático y la lente RF en 70%. La energía de colisión absoluta (CE) depende de la molécula. Se aceptó una tolerancia de masa de 5 ppm. Para cada hormona, se analizaron tres iones fragmentados. El fragmento de ion con mayor intensidad (fragmento 1) se usó para la cuantificación y los otros dos (fragmento 2 y 3) se usaron para confirmar la identidad de los objetivos. En el caso de los estándares internos, solo se analizó el ion fragmento de mayor intensidad. El control del instrumento y el procesamiento de datos se llevaron a cabo mediante el software TraceFinder 5.1 EFS.

3.10. Análisis SPAD

Tras la primera cosecha, a los 4 y a los 8 días de tratar se obtuvieron por medio de un medidor DUALEX, los índices de clorofila de los individuos de cada uno de los 6 tratamientos. Dichas mediciones no condicionaron de ninguna manera la segunda cosecha, puesto que el medidor de clorofila empleado permitió realizar los análisis correspondientes sin destruir la hoja. Esta técnica de análisis consiste en evaluar cuantitativamente la intensidad del verde de las hojas, es decir, la cantidad relativa de clorofila. Se obtiene mediante la medición de la absorbancia de las hojas a dos longitudes de onda, una donde la molécula de clorofila absorbe el haz de luz y otra donde no lo hace. Una vez obtenidas, el medidor de clorofila muestra un valor proporcional a la cantidad de clorofila en la hoja (Da Cunha *et al.* 2015). La cantidad de clorofila está relacionada con la nutrición de la planta, siendo este valor directamente proporcional a la cantidad de nitrógeno presente en la hoja.

3.11. ANOVA

A partir de los datos de pesos de las muestras, de las mediciones radiculares con WinRHIZO, de las concentraciones radiculares de H₂O₂ y de las cuantificaciones hormonales y de clorofila, se realizaron múltiples comparaciones entre tratamientos utilizando el método de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, con el nivel de significación (α) establecido en 0.05 (excepciones puntuales indicadas en las gráficas).

4. Resultados y discusión

4.1. Primera cosecha

En la primera cosecha del ensayo, 2 días después del tratamiento, no se observaron diferencias significativas entre los pesos frescos y secos de parte aérea y raíz de las plantas wild-type tratadas con AHS y los pesos frescos y secos de las plantas wild-type control (Figura 5). Tampoco se registraron diferencias significativas en las características estructurales y morfológicas de las raíces (Figura 6). No obstante, sí que se observó un aumento significativo de la concentración de H_2O_2 radicular en las wild-type con AHS respecto a las wild-type control (Figura 7). Estos resultados muestran una bioestimulación fisiológica inicial, producto de la interacción de la planta con los AHS, durante un corto periodo de tiempo.

En las plantas que tienen el gen que codifica la enzima RbohC inactivado, no se observaron diferencias significativas entre los pesos frescos y secos de raíz y parte aérea, de los mutantes RbohC tratados con AHS y los RbohC control (Figura 5). Tras el análisis WinRHIZO, no se observó ningún incremento significativo en las características radiculares estudiadas, relacionadas con la estructura y la morfología de las raíces (Figura 6). En la concentración de H_2O_2 radicular de los mutantes RbohC tratados con AHS, tampoco se registró ningún aumento significativo respecto al control (Figura 7). Estos resultados denotan la relevancia de las funciones del gen RbohC, en la bioestimulación directa de los AHS en planta.

En el mutante RbohD, después de 2 días de tratamiento, se observa un aumento significativo en el peso fresco y seco de raíz respecto al mutante RbohD sin tratar (Figura 5). Los parámetros relacionados con la estructura y morfología radicular de las plantas control de RbohD, mostraron unos valores significativamente mayores a los observados en los controles de wild-type y RbohC (Figura 6). El desarrollo de las características radiculares, fue a su vez, significativamente superior en los mutantes RbohD tratados con AHS respecto a los mutantes RbohD control. También se vio un aumento significativo en la concentración de H_2O_2 radicular inducido por los AHS sobre el mutante RbohD (Figura 7). Parece que con la inactivación del gen RbohD, aunque se reduzca significativamente la concentración de H_2O_2 radicular respecto a las wild-type, se produce un estrés que potencia un mayor desarrollo en la arquitectura radicular. Se conoce que el H_2O_2 producido por las enzimas RbohD y RbohF tiene un efecto inhibitor sobre el desarrollo de raíces laterales, mientras que el O_2^-

(superóxido) producido por las peroxidasas de clase III promueve dicho desarrollo (Chapman *et al.* 2019). El propio H_2O_2 producido por RbohD y RbohF inhibe estas peroxidasas, por tanto, al inhibir la enzima RbohD, aunque seguramente la enzima RbohF siga activa, los niveles de H_2O_2 disminuyen y el O_2^- producido por las peroxidasas aumenta estimulando el desarrollo de raíces laterales (Chapman *et al.* 2019). En este sentido, parece que el AHS sobre el mutante RbohD es capaz de potenciar en mayor medida estos parámetros relacionados con la arquitectura radicular, como son la longitud, el número de cruces, de ápices y de bifurcaciones, al menos en esta primera cosecha. En un futuro se estudiará la acción del AH en la regulación de estos homólogos y los metabolitos que ellos producen.

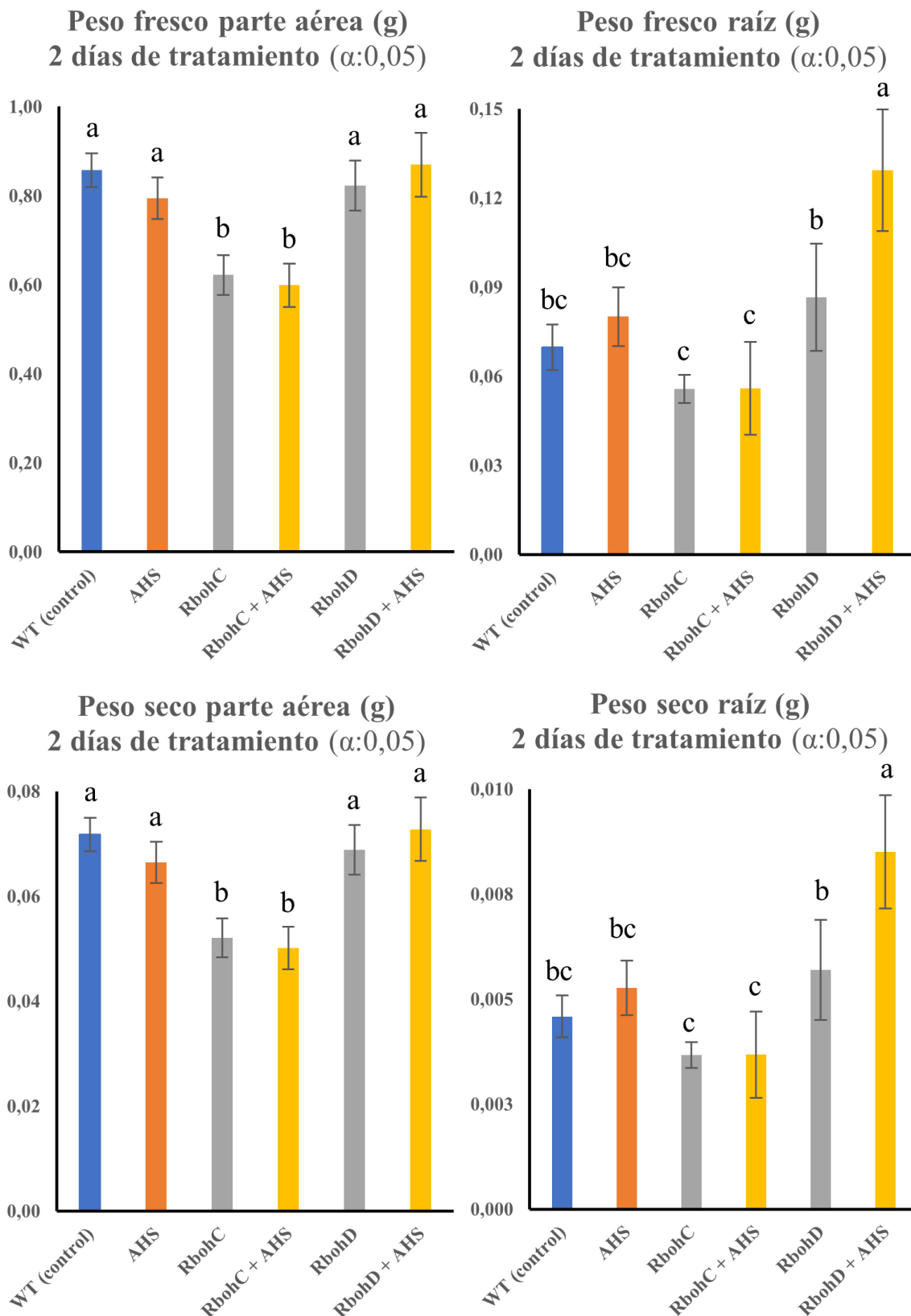


Figura 5. Gráficas de los pesos frescos y secos de raíz y parte aérea, obtenidos en el pesaje de la primera cosecha.

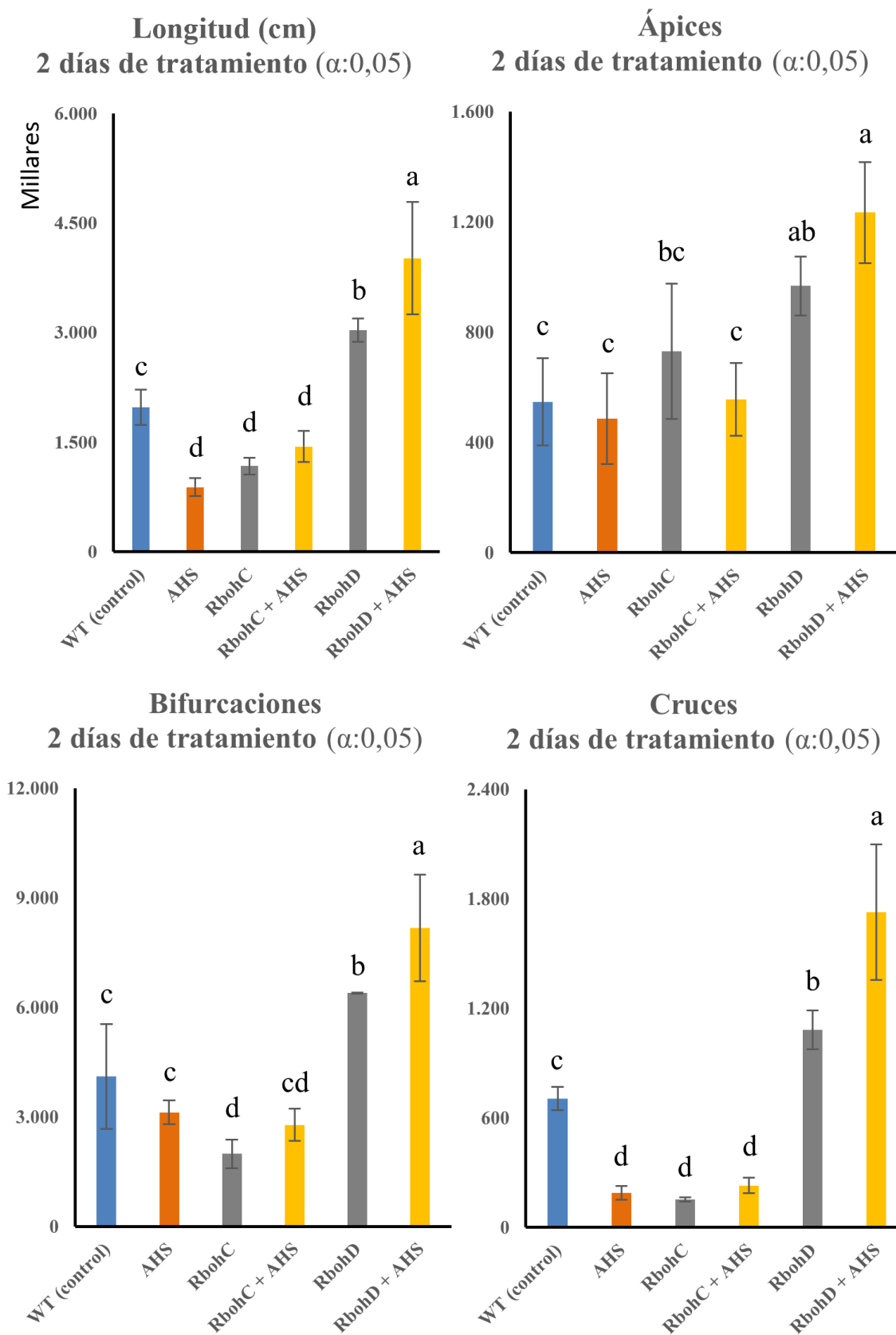


Figura 6. Representación gráfica de los datos obtenidos en el análisis WinRHIZO de las raíces de la primera cosecha.

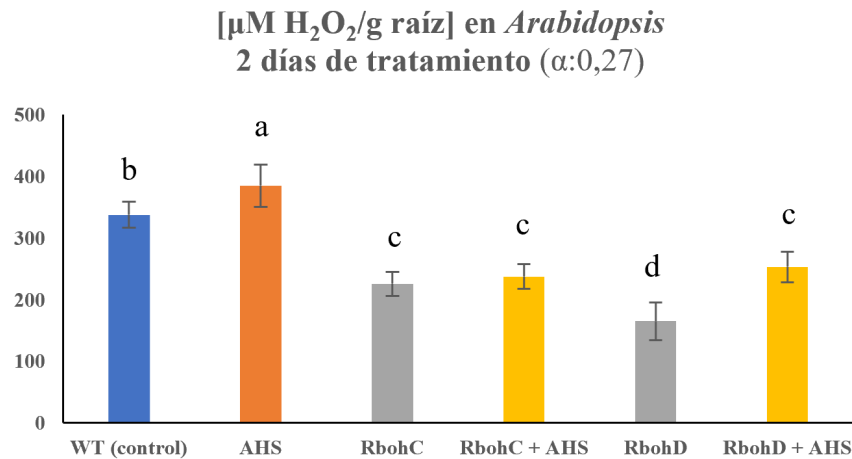


Figura 7. Gráfica de las concentraciones de H_2O_2 obtenidas en el análisis de espectroscopía de fluorescencia de la primera cosecha.

4.2. Segunda cosecha

En la segunda cosecha del ensayo, 9 días después del tratamiento, se observaron diferencias significativas entre los pesos frescos y secos de raíz y parte aérea, de las plantas wild-type tratadas con AHS y las wild-type control (Figura 8). Tras el análisis WinRHIZO, en las wild-type tratadas con AHS se observó, no solo un aumento significativo en el número de bifurcaciones, cruces y longitud en raíz, sino también un leve crecimiento en el número de ápices (Figuras 9 y 10). El análisis hormonal de las plantas wild-type, mostró que las tratadas con AHS, presentaban concentraciones de citoquininas, IAA, ABA, JA y SA, significativamente diferentes a las de las plantas control (Figura 11). A los 4 días de tratamiento no se vieron diferencias significativas en la concentración de clorofila, sin embargo, a los 8 días sí que se pudo observar un aumento significativo en las wild-type tratadas con AHS, respecto a las control (Figura 12). En este sentido, parece que, al aumentar el tiempo de contacto, la estimulación inicial a nivel bioquímico y metabólico de los AHS, observada en la primera cosecha, se traduce en un incremento fenotípico en esta segunda cosecha.

En el mutante RbohC, no se observaron diferencias significativas entre los pesos frescos y secos de raíz y parte aérea de las estimuladas con AHS y las control (Figura 8). Las características estructurales y morfológicas de las raíces de las RbohC tratadas con AHS, fueron similares a las registradas en las RbohC control (Figuras 9 y 10). Estos mutantes con tratamiento también mostraron valores semejantes a sus respectivos controles sin tratar en la cuantificación hormonal (Figura 11). Del mismo modo, las concentraciones de clorofila en

los individuos de RbohC con AHS, no mostraron diferencias respecto a las RbohC control (Figura 12). Al igual que con los resultados obtenidos a los 2 días de tratamiento, parece que el papel que desempeña la enzima RbohC en la bioestimulación directa de los AHS, es de tal relevancia, que la inactivación de dicho gen conlleva el bloqueo de estos efectos directos en planta.

Por último, las plantas de RbohD tratadas con AHS mostraron de nuevo un peso fresco y seco, tanto de raíz como de parte aérea, significativamente superior al registrado en las RbohD control (Figura 8). No obstante, a los 9 días de tratamiento, ya no se obtuvieron diferencias significativas en las características radiculares analizadas con WinRhizo (Figuras 9 y 10). Los mutantes RbohD tratados con AHS también mostraron una tendencia de aumento en la cuantificación hormonal, llegando a ser significativa en las citoquininas de parte aérea y en el ácido jasmónico radicular (Figura 11). Del mismo modo, la cantidad de clorofila en los RbohD con AHS, aumentó significativamente respecto a la de las plantas control, tanto a los 4 como a los 8 días de tratamiento. (Figura 12). Estos resultados muestran que la inactivación del gen que codifica la enzima RbohD no bloquea en ningún momento el efecto directo de los AHS sobre el crecimiento vegetal, la concentración de clorofilas y la estimulación de algunas hormonas (JA en raíz y CKs en hoja). En este sentido, parece que a los dos días de tratamiento la acción de los AHS sobre el mutante RbohD muestra un efecto bioestimulante más pronunciado, y que, a medida que aumenta el tiempo de contacto, el efecto en planta es más semejante al observado en wild-type.

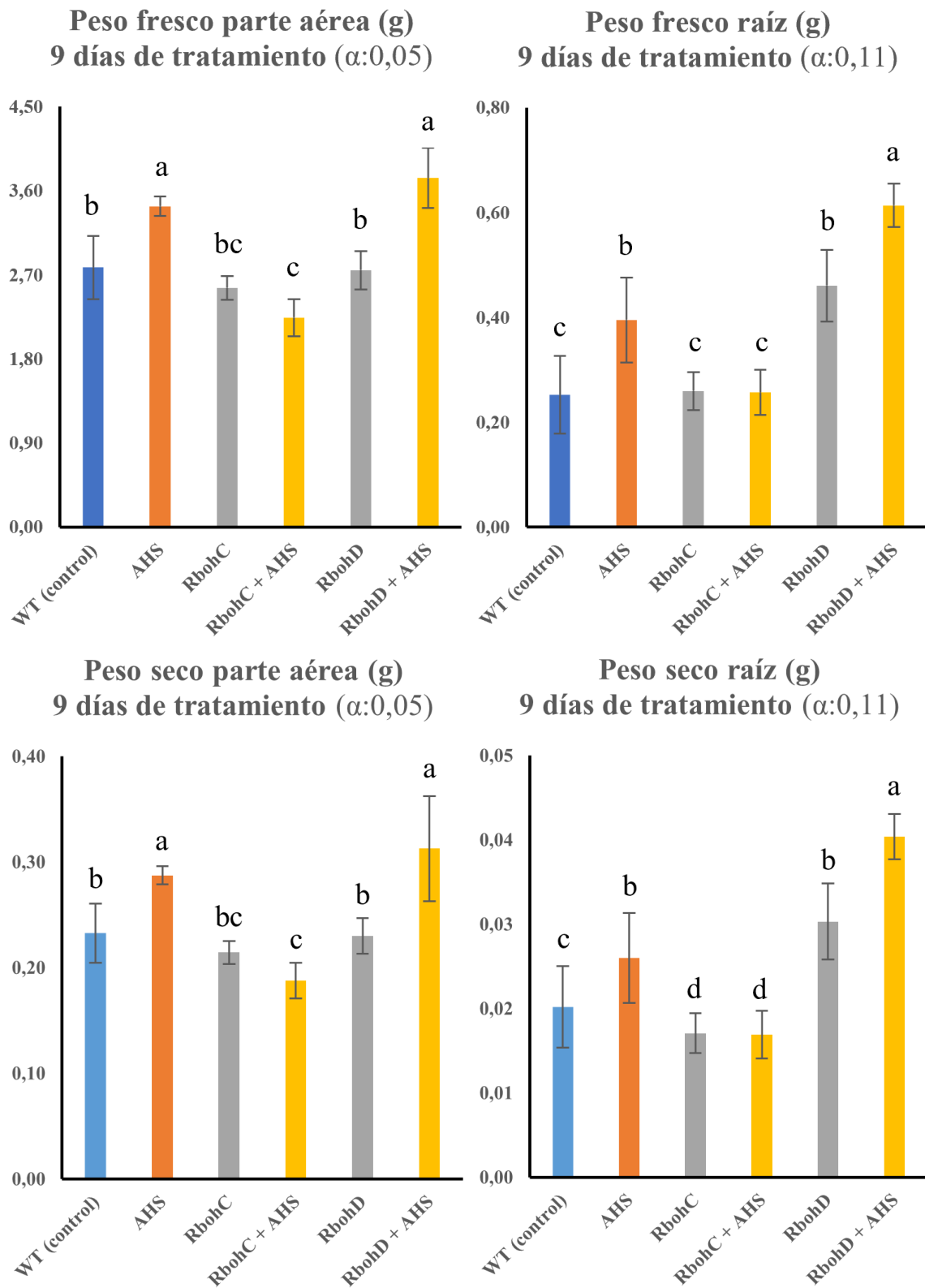


Figura 8. Gráficas de los pesos frescos y secos de raíz y parte aérea, obtenidos en el pesaje de la segunda cosecha.

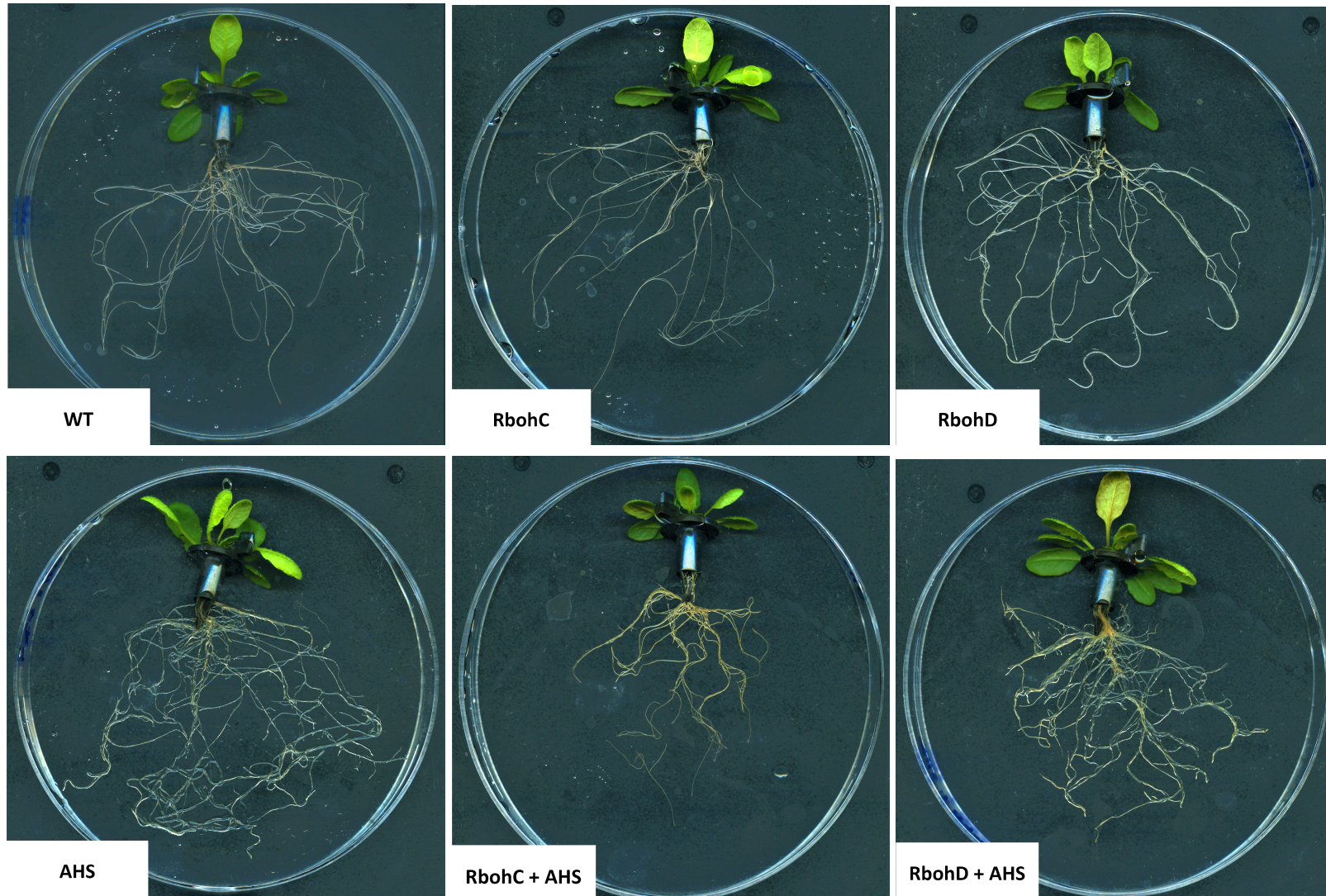


Figura 9. Fotografías de las raíces frescas de la segunda cosecha, utilizadas para el análisis con WinRHIZO.

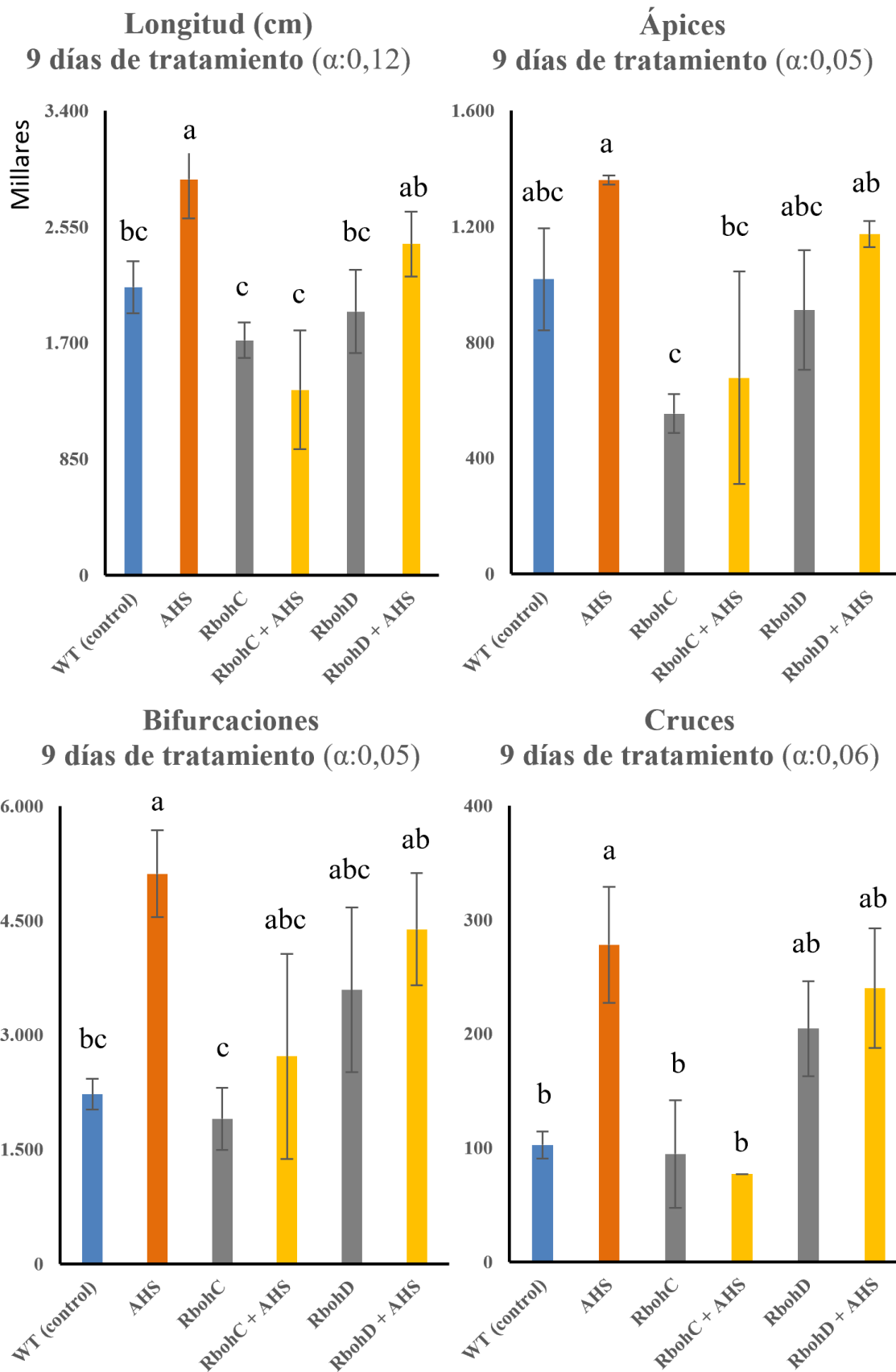


Figura 10. Representación gráfica de los datos obtenidos en el análisis WinRHIZO de las raíces de la segunda cosecha.

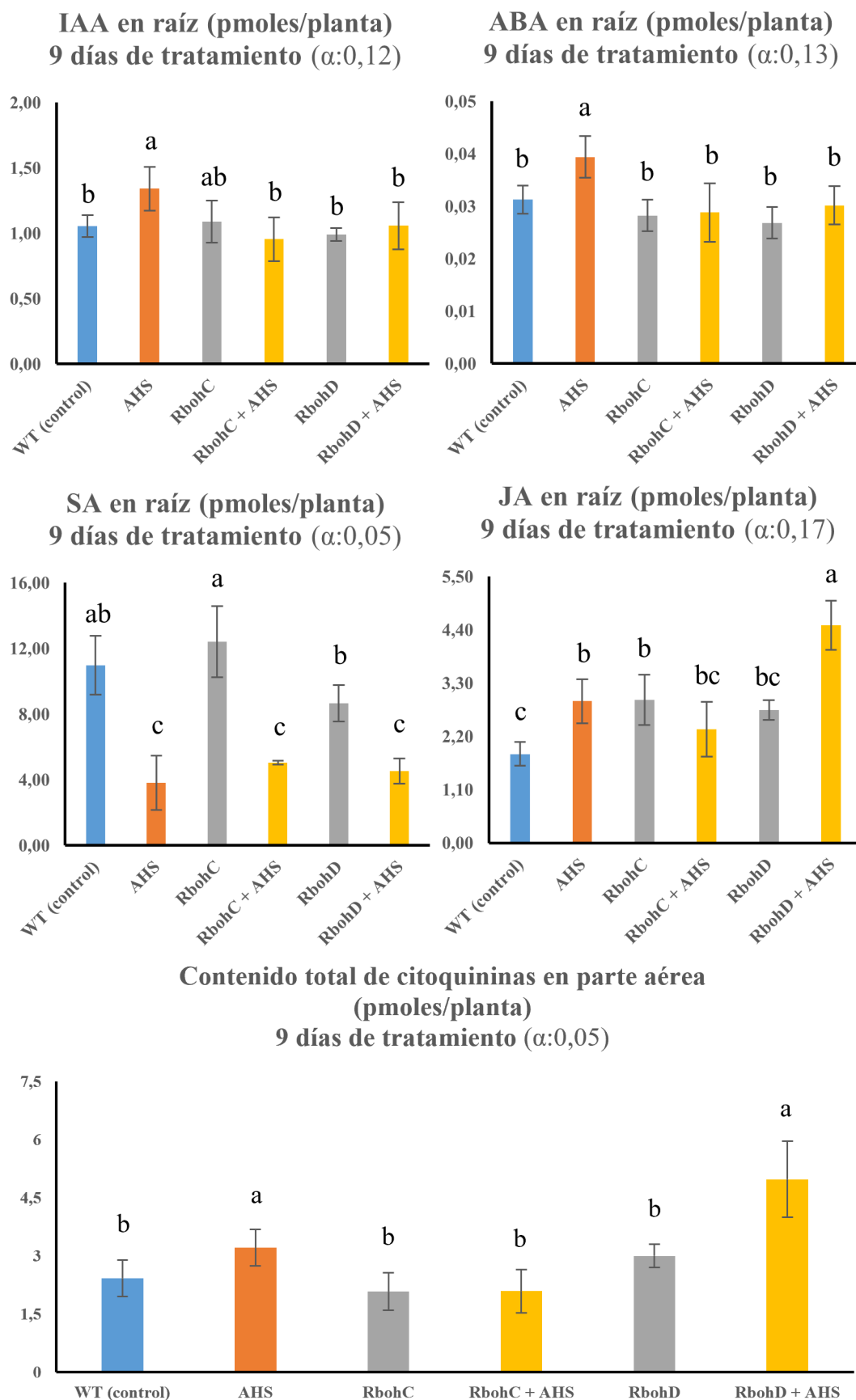


Figura 11. Representación gráfica de los datos obtenidos en el análisis hormonal de las plantas de la segunda cosecha.

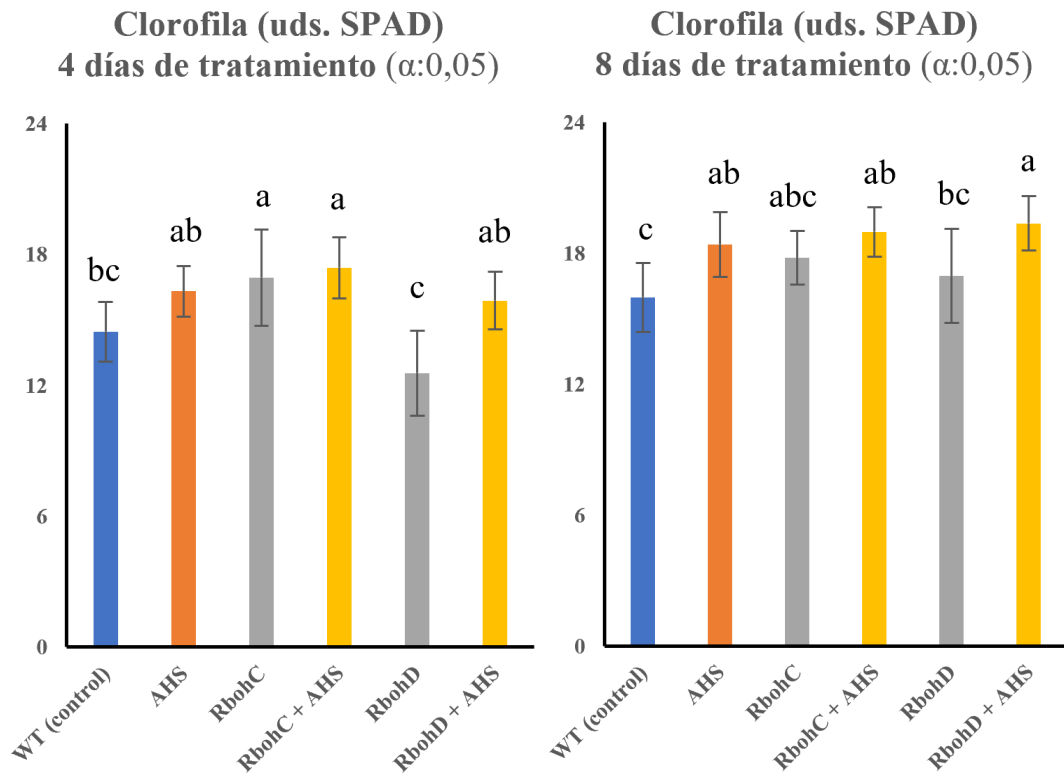


Figura 12. Representación gráfica de los índices de clorofila en las plantas, a los 4 y a los 8 días de tratamiento.

5. Conclusiones

Muchos estudios han demostrado la correlación que existe entre el contenido de materia orgánica humificada en el suelo, la fertilidad de éste y la productividad de los cultivos (Stevenson 1994; Chen et al. 2004). La materia orgánica humificada, principalmente las sustancias húmicas, tiene efectos beneficiosos sobre el crecimiento vegetal, por inducir mejoras en la nutrición mineral de las plantas y en las características fisicoquímicas de la rizosfera (Chen et al. 2004; Aguirre et al. 2009; Olaetxea et al. 2018). Aunque en menor medida, las sustancias húmicas también tienen efectos directos sobre el metabolismo y la fisiología vegetal (Vaughan & Malcolm 1985; Nardi et al. 2002; Olaetxea et al. 2016; Olaetxea et al. 2018; Olaetxea et al. 2019). En este estudio hemos podido observar cómo, los efectos directos de las sustancias húmicas sobre las plantas inducen, en un primer momento, un aumento en la concentración de H_2O_2 radicular. Esta respuesta fisiológica, conforme aumenta el tiempo de contacto, desencadena cambios en el crecimiento radicular y aéreo, en la morfología y estructura radicular, en las concentraciones hormonales de raíz y parte aérea, y en la cantidad de clorofila en hoja.

Al inactivar las funciones de la enzima RbohC, se observa de por sí una reducción significativa en prácticamente todos los parámetros analizados, respecto a los obtenidos en las wild-type. Además, se inhiben completamente todos los efectos y acciones mediados por los AHS sobre el fenotipo y la fisiología vegetal. Esto puede deberse principalmente a que, la enzima RbohC tiene funciones en el crecimiento y desarrollo de las plantas, que no pueden ser desempeñadas por otras enzimas Rboh. De manera que habrá determinadas señales ambientales ante las que ninguna otra enzima Rboh producirá ROS como respuesta, si inactivamos la enzima RbohC.

Bloqueando las funciones de la enzima RbohD, la producción de H_2O_2 en raíz disminuye y la de O_2^- aumenta (Chapman *et al.* 2019), observándose en los mutantes control de RbohD, un crecimiento y un desarrollo radicular significativamente superior al observado en wild-type. Además, no se consigue inhibir la bioestimulación, sino más bien todo lo contrario, los AHS parecen tener unos efectos en el mutante RbohD más inmediatos incluso, que los observados en wild-type. La enzima RbohD, comparte todas sus funciones en raíz con la enzima RbohF, de modo que al inactivar una de ellas, seguramente la otra pueda seguir produciendo ROS, en respuesta a la interacción con las sustancias húmicas.

Finalmente, los resultados obtenidos con los mutantes RbohC y RbohD muestran, por un lado, que la actividad de la vía del ROS en raíz es uno de los principales mecanismos de acción en la bioestimulación directa de las sustancias húmicas en *Arabidopsis thaliana* y, por otro lado, que la vía de señalización dependiente de la enzima RbohC tiene un papel decisivo en dicho mecanismo de acción.

Por consiguiente, las principales conclusiones del estudio son:

- Los AHS estimulan la producción de ROS en raíz en cortos tiempos de contacto con la planta.
- En tiempos de contacto más largos, los AHS bioestimulan la cantidad de clorofila y el crecimiento en parte aérea, así como el crecimiento y el desarrollo morfológico y estructural en raíz.
- Los AHS también tienen efectos directos más tardíos sobre IAA-ABA-JA en raíz y sobre CKs en parte aérea
- Con la inactivación de la enzima RbohC, los AHS pierden sus efectos directos en planta.
- La síntesis de ROS en la raíz es clave en el mecanismo de acción bioestimulante directo de los AHS en las plantas.
- La vía de señalización dependiente de la enzima RbohC, tiene un papel crucial en el mecanismo de acción bioestimulante directo de los AHS en las plantas.

6. Referencias

- Aguirre, E., Lemenager, D., Bacaicoa, E., Fuentes, M., Baigorri, R., Zamarreño, A. M., & García-Mina, J. M. (2009). The root application of a purified leonardite humic acid modifies the transcriptional regulation of the main physiological root responses to Fe deficiency in Fe-sufficient cucumber plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(3), 215–223.
- Baigorri, R., Fuentes, M., Gonzalez-Gaitano, G., & García-Mina, J. M. (2007a). Analysis of molecular aggregation in humic substances in solution. *Colloids and Surf A*, 302, 301–306. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2007.02.048>
- Baigorri, R., Fuentes, M., Gonzalez-Gaitano, G., & Garcia-Mina, J. M. (2007b). Simultaneous presence of diverse molecular patterns in humic substances in solution. *The Journal of Physical Chemistry B*, 111, 10577–10582. <https://doi.org/10.1021/jp0738154>
- Bouma, T.J., K.L. Nielsen, y B. Koutstaal. 2000. Sample preparation and scanning protocol for computerized analysis of root length and diameter. *Plant and Soil* 218:185-196.
- Canellas, L. P., Olivares, F. L., Okorokova-Facanha, A. L., & Facanha, A. R. (2002). Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiology*, 130, 1951–1957.
- Canellas, L. P., Dantas, D. J., Aguiar, N. O., Peres, L. E. P., Zsogon, A., Olivares, F. L., ... Piccolo, A. (2011). Probing the hormonal activity of fractionated molecular humic components in tomato auxin mutants. *The Annals of Applied Biology*, 159, 202–211. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2011.00487>.
- Canellas, L., & Olivares, F. (2014). Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 1, 3–13. <https://doi.org/10.1186/2196-5641-1-3>.
- Chakraborty, S., Amy L. Hill., Shirsekar, G., Ahmed J. Afzal., Wang G, Mackey, D., Bonello, P. (2016). Quantification of hydrogen peroxide in plant tissues using Amplex Red. *Methods*, 109, 105-113.

- Chapman, J. M., Muhlemann, J. K., Gayomba, S. R., & Muday, G. K. (2019). RBOH-Dependent ROS synthesis and ROS scavenging by plant specialized metabolites to modulate plant development and stress responses. *Chemical Research in Toxicology*, 32(3), 370-396. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00028>
- Chen, Y., De Nobili, M., & Aviad, T. (2004). Stimulatory effects of humic substances on plant growth. In F. Magdoff, R. Ray, & R. Weil (Eds.), *Soil organic matter in sustainable agriculture* (pp. 103–129). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Da Cunha, A. R., Katz, I., De Pádua Sousa, A., & Uribe, R. A. M. (2015). Índice SPAD en el crecimiento y desarrollo de plantas de lisianthus en función de diferentes dosis de nitrógeno en ambiente protegido. *Idesia*, 33(2), 97-105. <https://doi.org/10.4067/s0718-34292015000200012>
- Dobrev, P.I. and Kaminek, M. (2002) Fast and Efficient Separation of Cytokinins from Auxin and Abscisic Acid and Their Purification Using Mixed-Mode Solid-Phase Extraction. *Journal of Chromatography A*, 950, 21-29.
- Erro, J., Urrutia, O., Baigorri, R., Aparicio-Tejo, P., Irigoyen, I., Torino, F., ... Garcia-Mina, J. M. (2012). Organic complexed superphosphates (CSP): Physicochemical characterization and agronomical properties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 60, 2008–2017. <https://doi.org/10.1021/jf204821j>
- García, A. C., Santos, L. A., de Souza, L. G., Tavares, O. C., Zonta, E., Gomes, E. T., García-Mina, J. M., & Berbara, R. L. (2016). Vermicompost humic acids modulate the accumulation and metabolism of ROS in rice plants. *Journal of plant physiology*, 192, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.01.008>
- Garcia-Mina, J. M. (2006). Stability, solubility and maximum metal binding capacity in metal–humic complexes involving humic substances extracted from peat and organic compost. *Organic Geochemistry*, 37, 1960–1972. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2006.07.027>
- Gerke, J. (2010). Humic (organic matter)-Al(Fe)-phosphate complexes: An underestimated phosphate form in soils and source of plant-available phosphate. *Soil Science*, 175, 417–425. <https://doi.org/10.1097/SS.0b013e3181f1b4dd>

- Gutiérrez-Soto, M.V., Torres-Acuña, J., Araya-Alfaro, J.M. (2014). Using winRhizo to study and quantify the root on the oil palm (*Elaeis guineensis* jacq.). *Agronomía mesoamericana* 25(1):181-188. <https://www.scielo.sa.cr/pdf/am/v25n1/a18v25n1.pdf>
- MacCarthy, P., Clapp, C. E., Malcom, R. L., & Bloom, P. R. (1990). *An introduction to soil humic substances*. In P. MacCarthy, C. E. Clapp, R. L. Malcom, & P. R. Bloom (Eds.), *Proceedings of a symposium by the IHSS, Chicago* (pp. 161–186).
- Monda, H., Cozzolino, V., Vinci, G., Spaccini, R., & Piccolo, A. (2017). Molecular characteristics of water-extractable organic matter from different composted biomasses and their effects on seed germination and early growth of maize. *Science of the Total Environment*, 590, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.026>
- Mora, V., Bacaicoa, E., Zamarreño, A. M., Aguirre, E., Garnica, M., Fuentes, M., & García-Mina, J. M. (2010). Action of humic acid on promotion of cucumber shoot growth involves nitrate-related changes associated with the root-to-shoot distribution of cytokinins, polyamines and mineral nutrients. *Journal of Plant Physiology*, 167, 633–642. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.11.018>
- Mora, V., Baigorri, R., Bacaicoa, E., Zamarreño, A. M., & García-Mina, J. M. (2012). The humic acid-induced changes in the root concentration of nitric oxide, IAA and ethylene do not explain the changes in root architecture caused by humic acid in cucumber. *Environmental and Experimental Botany*, 76, 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.10.001>
- Mora, V., Bacaicoa, E., Baigorri, R., Zamarreño, A. M., & García-Mina, J. M. (2014). NO and IAA key regulators in the shoot growth promoting action of humic acid in *Cucumis sativus* L. *Journal of Plant Growth Regulation*, 33, 430–439. <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9394-9>
- Mora, V., Olaetxea, M., Bacaicoa, E., Baigorri, R., Fuentes, M., Zamarrerreño, A.M., Garcia-Mina, J.M. (2014b). Abiotic Stress Tolerance in Plants: Exploring the Role of Nitric Oxide and Humic Substances. *In Nitric Oxide in Plants: Metabolism and Role in Stress Physiology*. Springer International Publishing, pp 243-264

- Muscolo, A., Sidari, M., Francioso, O., Tugnoli, V., & Nardi, S. (2007). The auxin-like activity of humic substances is related to membrane interactions in carrot cell cultures. *Journal of Chemical Ecology*, 33, 115–129. <https://doi.org/10.1007/s10886-006-9206-9>
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., & Vianello, A. (2002). Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology & Biochemistry*, 34, 1527–1536. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00174-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00174-8)
- Olaetxea, M., Mora, V., Bacaicoa, E., Baigorri, R., Garnica, M., Fuentes, M., ... Garcia-Mina, J. M. (2015). ABA-regulation of root hydraulic conductivity and aquaporin gene-expression is crucial to the plant shoot rise caused by rhizosphere humic acids. *Plant Physiology*, 169, 2587–2596. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00596>
- Olaetxea, M., Mora, V., Garcia, A. C., Santos, L. A., Baigorri, R., Fuentes, M., ... Garcia-Mina, J. M. (2016). Root-Shoot Signaling crosstalk involved in the shoot growth promoting action of rhizospheric humic acids. *Plant Signaling & Behavior*, 11, e1161878. <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1161878>
- Olaetxea, M., De Hita, D., García, A. C., Fuentes, M., Baigorri, R., Mora, V., ... García Mina, J. M. (2018). Hypothetical framework integrating the main mechanism involved in the promoting action of rhizospheric humic substances on plant root- and shoot- growth. *Applied Soil Ecology*, 123, 521–537.
- Olaetxea M, Mora V, Bacaicoa E, et al. (2019). Root ABA and H⁺-ATPase are key players in the root and shoot growth-promoting action of humic acids. *Plant Direct*. 2019;3:1–12. <https://doi.org/10.1002/pld3.175>
- Pang, W., W.T. Crow, J.E. Luc, R. McSorley, R.M. Ginlin-Davis, K.E. Kenworthy, y K. Kruse. 2011. Comparison of water displacement and WinRhizo Software for plant root parameter assessment. *Plant Disease* 95:1308-1310.
- Piccolo, A. (2002). The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Advances in Agronomy*, 75, 57–134.
- Quaggiotti, S., Ruperti, B., Pizzeghello, D., Francioso, O., Tugnoli, V., & Nardi, S. (2004). Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of

- genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany*, 55, 803–813. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh085>
- Quantitation of Hydrogen Peroxide using the Synergy HT™. Recovered the 5 of april of 2022 from https://www.biotek.com/assets/tech_resources/Synergy%20HT%20Quantitation%20of%20Hydrogen%20Peroxide%20Using%20the%20Synergy.pdf
- Régent Instruments Inc. 2001. Mac/WinRHIZOTM 2002a. Basic, Reg & Pro for washed root measurement.
- Stevenson, F. J. (1994). *Humus chemistry: Genesis, composition, reactions*, Ed 2. New York: Wiley.
- The SPAD. (s. f.). <http://www.gisiberica.com/MEDIDOR%20DE%20CLOROFILA/MCL502.htm>
- Tipping, E. (2002). *Cation binding by humic substances*. Cambridge, England: Cambridge University Press.
- Tracy, S.R., C.R. Black, J.A. Roberts, C. Sturrock, S. Mairhofer, J. Craigon, y S.J. Mooney. (2012). Quantifying the impact of soil compaction on root system architecture in tomato (*Solanum lycopersicum*) by X-ray microcomputed tomography. *Annals of Botany* 110:511-519.
- Trevisan, S., Francioso, O., Quaggiotti, S., & Nardi, S. (2010a). Humic substances biological activity at the plant-soil interface. From environmental aspects to molecular factors. *Plant Signaling & Behavior*, 5, 6 635–643. <https://doi.org/10.4161/psb.5.6.11211>
- Trevisan, S., Pizzeghello, D., Ruperti, B., Francioso, O., Sassi, A., Palme, K., ... Nardi, S. (2010b). Humic substances induce lateral root formation and expression of the early auxin-responsive IAA19 gene and DR5 synthetic element in *Arabidopsis*. *Plant Biology*, 12, 604–614.
- Trevisan, S., Botton, A., Vaccaro, S., Vezzaro, A., Quaggiotti, S., & Nardi, S. (2011). Humic substances affect *Arabidopsis* physiology by altering the expression of genes involved in primary metabolism, growth and development. *Environmental and Experimental Botany*, 74, 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.04.017>

- Urrutia, O., Erro, J., Guardado, I., San Francisco, S., Mandado, M., Baigorri, R., ... Garcia Mina, J. M. (2014). Physico-chemical characterization of humic-metalphosphate complexes and their potential application to the manufacture of new types of phosphate-based fertilizers. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 177, 128–136. <https://doi.org/10.1002/jpln.201200651>
- Vaughan, D., & Malcolm, R. E. (1985). Influence of humic substances on growth and physiological processes. In D. Vaughan, & R. E. Malcolm (Eds.), *Soil organic matter and biological activity*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Zandonadi, D., Canellas, L., & Façanha, A. (2007). Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺ pumps activation. *Planta*, 225, 1583–1595. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0454-2>
- Zandonadi, D., Santos, M., Dobbss, L., Fb, O., Canellas, L., Binzel, M., ... Façanha, A. (2010). Nitric oxide mediates humic acids-induced root development and plasma membrane H⁺-ATPase activation. *Planta*, 231, 1025–1036. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1106-0>