



Universidad Pública de Navarra  
Nafarroako Unibertsitate Publikoa

Departamento de Ciencias

*Institute for Multidisciplinary Research in Applied Biology*

Tesis Doctoral

**Regulación de la simbiosis leguminosa-  
rizobio en condiciones de déficit hídrico:  
antioxidantes y compuestos nitrogenados**

Memoria presentada por Dña. Libertad Cobos Porras

para optar al grado de Doctor

Pamplona, marzo 2021

<https://doi.org/10.48035/Tesis/2454/40742>





# upna

Universidad Pública de Navarra  
Nafarroako Unibertsitate Publikoa

## AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE TESIS:

D. Cesar Arrese- Igor Sánchez, Catedrático de Universidad, y Dña. Estibaliz Larrainzar Rodríguez, Investigadora Ramón y Cajal, del Área de Fisiología Vegetal del Departamento de Ciencias de la Universidad Pública de Navarra,

### HACEN CONSTAR:

Que el trabajo titulado **“Regulación de la simbiosis leguminosa- rizobio en condiciones de déficit hídrico: antioxidantes y compuestos nitrogenados”** que presenta Dña. Libertad Cobos Porras para optar al título de Doctor por la Universidad Pública de Navarra, ha sido desarrollado bajo su dirección en el grupo de Fisiología Vegetal y Agrobiología en el Institute for Multidisciplinary Research in Applied Biology de la universidad Pública de Navarra y que reúne todos los requisitos necesarios para su defensa, por lo que:

### AUTORIZAN:

La presentación de la citada Tesis Doctoral

En Pamplona, a 31 de marzo 2021



D. Cesar Arrese- Igor Sánchez



Dña. Estibaliz Larrainzar Rodríguez



Los resultados obtenidos en este trabajo se han presentado en los siguientes congresos y en una publicación científica:

**Cobos-Porras, L.,** E. Girard, L., Talbi, C., Hernández, G. y Arrese-Igor, C. (2017). Nitrogen fixation of common bean plants inoculated with *Rhizobium etli* with enhanced respiration capacity is increased under recovery of plants after drought. 20th International Conference on Nitrogen Fixation: “Nitrogen Fixation for Agriculture and Environment”. Granada, España.

**Cobos-Porras, L.,** E. Girard, L., Talbi, C., Hernández, G. y Arrese-Igor, C. (2018). Nitrogen fixation increased under recovery of plant after drought in the common bean- *Rhizobium etli* CFNX713 symbiosis. XIV Reunión Nacional del Metabolismo del nitrógeno. Segovia, España.

**Cobos-Porras, L.,** Larrainzar, E. Girard, L., Hernández, G. y Arrese-Igor, C. (2019) Involvement of polyamines in the regulation of nitrogen fixation in the *Phaseolus vulgaris*- *Rhizobium etli* CFNX713 symbiosis under drought stress. XVII National Meeting of the Spanish Society of Nitrogen Fixation and VI Portuguese-Spanish Congress on Nitrogen Fixation. Madrid, España.

**Cobos-Porras, L.,** Rubia, M.I., Huertas, R., Kum, D., Dalton, D., Udvardi, M., Arrese-Igor, C., Larrainzar, E (2021). Increased ascorbate biosynthesis does not improve nitrogen fixation nor alleviate the effect of drought stress in nodulated *Medicago truncatula* plants. *Front. Plant Sci.* 12, 1296. doi:10.3389/FPLS.2021.686075.



Este trabajo ha sido financiado por el *Ministerio de Economía y Competitividad* AGL2014-56561-P, RTI2018-094623-B-C22 y sus correspondientes fondos FEDER.

LCP ha contado con una ayuda del programa de *Formación de Personal Investigador (FPI)* del *Ministerio de Economía y Competitividad*



A mi familia, mi gran familia.

Y a ti, amore.





Hay algo en el hombre que responde al desafío de esta montaña  
y sale a su encuentro.  
La lucha de la vida misma, hacia arriba  
y siempre hacia arriba.  
Lo que obtenemos de esta aventura es pura alegría  
y la alegría es,  
después de todo,  
la finalidad de la vida.  
George Leigh Mallory

Duda siempre de ti mismo,  
hasta que los datos no dejen lugar a dudas.  
Louis Pasteur



## AGRADECIMIENTOS

Un amigo siempre decía “es de bien nacido, ser agradecido” y yo tengo mucho que agradecer a todas esas personas que me han acompañado en este camino.

Empezando por mis directores de tesis, los Dres. Cesar Arrese-Igor y Estíbaliz Larraínzar, por darme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral en su grupo, por su apoyo y por la confianza que depositasteis en mí.

A mi “madre” en la ciencia, la Dra. Carmen Lluch, por todo lo aprendido a su lado y porque fue la base de que hoy esté aquí. Nunca olvidaré la frase de “morirás aprendiendo”.

A mis compañeros de grupo, Joseba y Maribel, esos fijadores que desde el primer momento me acogieron como una más y de los que he recibido siempre colaboración. A Esti, por tus ánimos siempre, tu inestimable ayuda, tu gran corazón y por aguantar estoicamente mis “caras” y altibajos. Gracias mil.

A los becarios del departamento Mikel grande, Antonio, Andrés, Mikel V., Manu, Ainhoa, por los cafés entretenidos donde siempre había algún tema friki del que charlar. En especial a mi brasileña, Jana, capaz de sacarme siempre una sonrisa, por las cervecillas “pa desconectar” después del curro, por todo tu cariño y por esos abrazos! Y como no, a mi gramola preferida, María! Por apoyarme en este último tramo y darle color a los días grises (que no nos quiten el café de las 11).

A ese gran grupo “txokojuevintxos”, Amaia, Miriam, Joseba y David, porque compartir con vosotras trabajo y ocio es siempre un placer. Por vuestras enseñanzas, colaboraciones, cervezas, risas, llantos, viajes.... Porque llegar a esta tierra y encontrar una familia en vosotras, no tiene precio. (Josucristito!)

A Gustavo Garijo, ese pedazo de técnico de laboratorio que me ha enseñado (y aguantado) tanto. Por estar siempre dispuesto y disponible. Por

enseñarme y dejarme “cacharrear” con el instrumental del labo. Porque sin tu ayuda esto no habría sido posible.

Al resto del personal del Departamento, Ana, Mercedes, Pedro, Esther, Susana. A Berta por estar ahí cuando más lo necesitas, por tus ánimos, por tu saber escuchar, por mucho!

A los compañeros del edificio los Olivos, Jorge, Leire, Manu, Maite, Ale, Raúl, Sara... Por vuestros ánimos incesantes y los recreos en la puerta.

A la gran familia de Labrit, que me hacen sentir una navarra más, especialmente a Karli y a mi txikiturri, Ester. Por estar a mi lado en todo momento, aunque sea virtualmente, por enseñarme a usar esos programas estadísticos, por sacarme por los montes, por los viajes que hicimos, y los que nos quedan por hacer.

A mi familia, en especial a “la prima María”, por tus llamadas diarias y tu amor incondicional. A mi madre, por seguir en tu lucha día a día, aun cuando la vida no te ha tratado como te mereces. Y a mis niñas de Graná, por sacarme tantas sonrisas y por ayudarme a confiar en mí.

A Lorién, que me has acompañado en todo este tiempo con tu saber estar. Que has sabido torear mis idas y venidas, mis malas caras y mis días raros, porque sabías que la calma llegaría, y... ya llegó!

Y como no, a mi padre, que me animó a luchar por el futuro que había elegido, levantándose cada vez que las fuerzas caían. Siempre con tu sonrisa sincera y tus palabras calmadas. Te fuiste antes de que este sueño acabase, pero allá donde estés, me sigues cuidando.

## ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de la varianza
AsA	Ácido ascórbico
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
BDO	Barrera de difusión al oxígeno
Cad	Cadaverina
DAO	Diamino oxidasa
DAP	1,3- Diaminopropano
dcSAM	S-adenosilmetionina descarboxilada
DHA	Deshidroascorbato
EE	Error estándar
FBN	Fijación biológica de nitrógeno
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
GME	GDP-D-manosa-3,5-epimerasa
HSpd	Homoespermidina
IA	Invertasa alcalina
Lb	Leghemoglobina
Lys	Lisina
MDHA	Monodeshidroascorbato
MDS	Mínima diferencia significativa
Nasa	Nitrogenasa
NSpd	Norespermidina
OAA	Oxalacetato

PAs	Poliaminas
PAs-L	Poliaminas libres
PAs-C	Poliaminas conjugadas
PAs-U	Poliaminas unidas
PAO	Poliamino oxidasa
Pro	Prolina
Put	Putrescina
ROS	Especies de oxígeno reactivo
SAM	S-Adenosilmetionina
Spd	Espermidina
Spm	Espermina
SS	Sacarosa sintasa
VTC2	GDP-L-galactosa fosforilasa

## RESUMEN

En un mundo que requiere urgentemente una agricultura más sostenible, los cultivos de leguminosas representan una importante alternativa. A nivel agroecológico, la característica más interesante de esta familia de plantas es su capacidad para llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno atmosférico (FBN), reduciendo los insumos de fertilizantes nitrogenados con una baja huella de carbono, lo que disminuye la contaminación ambiental y enriquece el suelo para los siguientes cultivos. Sin embargo, para optimizar el potencial de las leguminosas en un escenario donde los efectos del cambio climático conducirán a un aumento del impacto de las sequías, es preciso dilucidar los mecanismos fisiológicos y las vías de señalización molecular responsables de una mayor tolerancia de estos cultivos a esta situación de estrés. La disminución de la FBN provocada por la sequía es consecuencia de una serie de mecanismos fisiológicos entre los que destacan la disminución de la disponibilidad de sustratos carbonados para los bacteroides, la inhibición de la actividad nitrogenasa debido a la acumulación de compuestos nitrogenados, el incremento de la resistencia a la difusión de oxígeno y el estado redox. Con este fin de profundizar en estos factores, en este trabajo se han evaluado diferentes mecanismos implicados en la regulación del proceso de FBN bajo estrés hídrico.

Estudios previos sugieren que la cepa de *Rhizobium etli* CFNX713, modificada genéticamente para sobreexpresar la oxidasa bacteroidal *cbb<sub>3</sub>*, es más eficiente en FBN tanto en condiciones óptimas de disponibilidad de agua como en situaciones de déficit hídrico en comparación con su cepa parental. Sin embargo, se desconoce su comportamiento en una etapa de recuperación tras un periodo de déficit hídrico. Así, en el primer capítulo utilizamos esta cepa de *R. etli* en simbiosis con *Phaseolus vulgaris* y analizamos los posibles antioxidantes y solutos compatibles que pudieran estar implicados en la mayor resistencia de esta simbiosis al estrés por sequía y tras la recuperación de las plantas. Bajo estas condiciones observamos como

las poliaminas, moléculas relacionadas con el mantenimiento del estado redox celular, parecen estar involucradas en el proceso de tolerancia al déficit hídrico.

Ya que uno de los mecanismos de tolerancia de las plantas al estrés hídrico es la síntesis de antioxidantes, en el segundo capítulo llevamos a cabo la caracterización de la sequía de plantas de *Medicago truncatula* que sobreexpresan el gen *VTC2*, integrante de la vía de síntesis de ascorbato. Dado que en otras especies vegetales se ha descrito que plantas con mayores niveles de ascorbato son más tolerantes a estreses abióticos, en este trabajo analizamos si estas plantas sobreexpresantes presentan una mejora a nivel de la FBN en condiciones de déficit hídrico. Nuestros resultados muestran que la sobreexpresión de *MtVTC2* se traduce en una mayor concentración de ácido ascórbico en los nódulos en condiciones óptimas de irrigación del cultivo, pero sin repercusiones positivas en los niveles de FBN cuando el riego es deficitario.

Finalmente, en el tercer capítulo, y con el fin de analizar el papel de la inhibición de la FBN debida a la acumulación de compuestos nitrogenados, llevamos a cabo un experimento de alimentación por peciolo en plantas de soja. Por esta vía a las plantas se le suministró una solución con asparagina marcada de forma estable ( $\text{Asn } ^{15}\text{N}$ ), para poder localizar su distribución a lo largo de la planta. Estos experimentos demostraron que la aplicación de asparagina inhibió la actividad fijadora a los dos días de tratamiento, alterando el metabolismo nitrogenado nodular, y provocando un desbalance en el aporte de carbohidratos de la parte aérea. Nuestros datos apoyan las hipótesis que respaldan que el estado nitrogenado de la planta es detectado mayormente en la parte aérea, provocando una acumulación de compuestos nitrogenados en el nódulo que provoca la inhibición de la FBN.



# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL .....	1
1. EL NITRÓGENO EN LAS PLANTAS .....	3
2. LAS LEGUMINOSAS .....	5
2.1. Encuadre filogenético .....	5
2.1.1. <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	6
2.1.2. <i>Medicago truncatula</i> Gaertn. ....	6
2.1.3. <i>Glycine max</i> (L.) Merr. ....	7
2.2. Importancia de las leguminosas .....	8
2.2.1. Nivel económico y alimenticio.....	8
2.2.2. Nivel agroecológico .....	9
3. SIMBIOSIS RIZOBIO-LEGUMINOSA.....	10
3.1. Formación del nódulo.....	10
3.1.1. Tipos de nódulos .....	12
3.2. Fijación biológica de nitrógeno .....	14
3.2.1. Complejo enzimático nitrogenasa .....	14
3.2.2. Protección frente al oxígeno .....	16
3.2.3. Metabolismo nodular .....	18
3.2.3.1. Metabolismo del carbono.....	18
3.2.3.2. Metabolismo del nitrógeno .....	19
4. ESTRÉS HÍDRICO EN PLANTAS .....	21
4.1. Efectos del déficit hídrico en plantas.....	22
4.1.1. Potencial hídrico .....	22
4.1.2. Equilibrio osmótico.....	23
4.1.3. Sistemas antioxidantes .....	25

4.1.3.1. Antioxidantes enzimáticos.....	25
4.1.3.2. Antioxidantes no enzimáticos.....	26
5. FBN Y DÉFICIT HÍDRICO.....	28
5.1. Regulación por carbono.....	28
5.2. Regulación por nitrógeno.....	30
5.3. Flujo de oxígeno.....	30
5.4. Estado redox.....	31
OBJETIVOS GENERALES.....	33
CAPÍTULO 1.....	37
1. INTRODUCCIÓN.....	39
1.1. FBN en condiciones de déficit hídrico.....	39
1.1.1. Regulación del flujo de oxígeno.....	39
1.1.2. Implicación de la oxidasa terminal $cbb_3$ .....	39
1.2. Poliaminas.....	41
1.2.1. Biosíntesis PAs.....	43
1.2.2. Catabolismo de PAs.....	45
2. OBJETIVO.....	47
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	49
3.1. Material biológico.....	49
3.1.1. Material vegetal.....	49
3.1.2. Material microbiológico.....	49
3.2. Cultivo de plantas.....	49
3.2.1. Germinación de las semillas e inoculación.....	49
3.2.2. Preparación del inóculo.....	50
3.2.3. Condiciones de la cámara de cultivo.....	51
3.3. Planificación del experimento.....	51

3.3.1.	Diseño experimental .....	51
3.4.	Metodología empleada .....	52
3.4.1.	Obtención de datos de crecimiento .....	52
3.4.2.	Fijación de nitrógeno.....	52
3.4.3.	Conductancia estomática .....	53
3.4.4.	Determinación de la transpiración .....	53
3.4.5.	Determinación del potencial hídrico .....	53
3.4.6.	Determinación del contenido hídrico relativo.....	54
3.4.7.	Determinación de pigmentos fotosintéticos .....	54
3.4.8.	Determinación de carbohidratos y polioles .....	55
3.4.9.	Determinación de ácidos orgánicos y aniones .....	56
3.4.10.	Determinación de aminoácidos.....	56
3.4.11.	Determinación de poliaminas .....	57
3.4.12.	Determinación de S- adenosilmetionina .....	58
3.4.13.	Análisis estadístico .....	59
4.	RESULTADOS .....	61
4.1.	Biomasa vegetal.....	61
4.2.	Fijación de nitrógeno.....	62
4.3.	Conductancia estomática .....	63
4.4.	Potencial hídrico.....	64
4.5.	Contenido hídrico relativo .....	65
4.6.	Contenido de pigmentos fotosintéticos .....	66
4.7.	Contenido de carbohidratos en nódulos y parte aérea.....	67
4.8.	Contenido en polioles en nódulos y parte aérea.....	70
4.9.	Contenido en ácidos orgánicos en nódulos.....	74
4.10.	Contenido en aminoácidos en nódulos .....	77

4.11. Contenido de las diferentes fracciones de PAs en nódulos.....	79
4.12. Contenido de las diferentes fracciones de PAs en hojas.....	83
4.13. Contenido en S- adenosilmetionina en nódulos.....	86
5. DISCUSIÓN .....	87
6. CONCLUSIONES.....	99
CAPÍTULO 2 .....	101
1. INTRODUCCIÓN .....	103
1.1. Ácido ascórbico.....	103
1.2. Biosíntesis de ácido ascórbico .....	104
2. OBJETIVO .....	107
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	109
3.1. Material biológico.....	109
3.1.1. Material vegetal .....	109
3.1.2. Material microbiológico .....	109
3.2. Cultivo de plantas .....	109
3.2.1. Germinación de las semillas e inoculación.....	109
3.2.2. Preparación del inóculo.....	111
3.2.3. Condiciones de la cámara de cultivo .....	111
3.3. Planificación del experimento .....	112
3.3.1. Diseño experimental .....	112
3.3.2. Recolección de plantas .....	112
3.4. Metodología empleada .....	113
3.4.1. Determinación del contenido total de clorofila .....	113
3.4.2. Determinación del contenido de AsA total y DHA.....	113
3.4.3. Microscopía de nódulos .....	114
4. RESULTADOS.....	117

4.1. Biomosas vegetal .....	117
4.2. Estudio de la colonización del microsimbionte .....	117
4.3. Detección <i>in situ</i> de ROS.....	119
4.4. Actividad aparente de la nitrogenasa.....	122
4.5. Contenido de AsA y DHA .....	123
4.6. Determinación del estado hídrico de la planta .....	125
4.6.1. Evapotranspiración.....	125
4.6.2. Conductancia estomática .....	126
4.6.3. Potencial hídrico foliar.....	127
4.6.4. Potencial hídrico nodular .....	127
5. DISCUSIÓN .....	129
6. CONCLUSIONES.....	135
CAPÍTULO 3 .....	137
1. INTRODUCCIÓN .....	139
1.1. Regulación de la FBN por nitrógeno .....	139
1.2. Implicación de los aminoácidos en la regulación de la FBN .....	140
1.2.1. La asparagina .....	141
1.2.2. Efectos de la Asn en la inhibición de la FBN .....	142
2. OBJETIVO .....	145
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	147
3.1. Material biológico.....	147
3.2. Cultivo de plantas .....	147
3.2.1. Germinación de las semillas e inoculación .....	147
3.2.2. Preparación del inóculo.....	148
3.2.3. Condiciones de la cámara de cultivo .....	149
3.3. Planificación del experimento .....	149

3.3.1.	Diseño experimental .....	149
3.3.2.	Recolección de plantas .....	149
3.4.	Metodología empleada .....	150
3.4.1.	Perfusión de las plantas.....	150
3.4.2.	Cálculo de la carga nitrogenada .....	150
3.4.3.	Determinación de ureidos .....	151
3.4.4.	Enriquecimiento en y porcentaje <sup>15</sup> N .....	151
4.	RESULTADOS.....	153
4.1.	Crecimiento vegetal y contenido en clorofila.....	153
4.2.	Actividad aparente de la nitrogenasa.....	154
4.3.	Cantidad total de <sup>15</sup> N en parte aérea y nódulo .....	154
4.4.	Niveles de carbohidratos solubles en parte aérea y nódulo .....	155
4.5.	Niveles de polioles en parte aérea y nódulo .....	157
4.6.	Análisis de ácidos orgánicos .....	159
4.6.1.	Contenido de ácidos orgánicos en nódulo.....	159
4.6.2.	Contenido de ácidos orgánicos en parte aérea .....	160
4.7.	Contenido de ureidos en parte aérea y nódulo.....	161
4.8.	Carga nitrogenada de parte aérea y nódulo.....	161
4.9.	Contenido de aminoácidos.....	162
4.9.1.	Aminoácidos detectados en nódulo.....	162
4.9.2.	Aminoácidos detectados en parte aérea.....	164
5.	DISCUSIÓN .....	167
6.	CONCLUSIONES.....	173
	CONCLUSIONES GENERALES.....	175
	BIBLIOGRAFÍA .....	179

# INTRODUCCIÓN GENERAL





# 1. EL NITRÓGENO EN LAS PLANTAS

El nitrógeno (N) es esencial para el crecimiento y desarrollo de los seres vivos. Se trata de un elemento básico del metabolismo vegetal que forma parte de componentes como la clorofila, proteínas estructurales y enzimáticas, material genético y compuestos energéticos como el ATP.

De manera natural, el nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) se introduce en los ecosistemas en formas biológicamente disponibles a través de descargas eléctricas o mediante la fijación biológica de nitrógeno (FBN) (Figura I.1), tanto en medios acuáticos como terrestres (Fowler et al., 2013). Este nitrógeno es incorporado a la materia orgánica, quedando inmovilizado en la biomasa. Por acción de bacterias nitrificantes, los compuestos nitrogenados serán descompuestos a nitritos o nitratos que finalmente retornarán a la atmósfera por acción de los organismos, cerrando lo que se denomina el ciclo del N (Galloway et al., 2004).

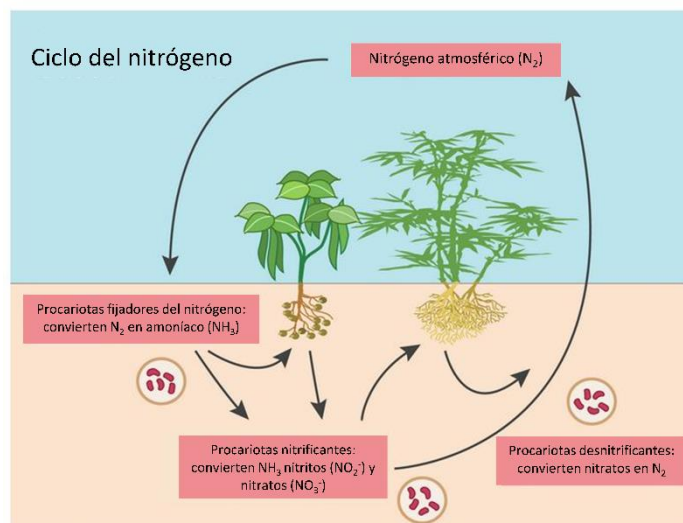


Figura I.1. Incorporación del  $N_2$  mediante la FBN.

Pese a ser el elemento mayoritario de la atmósfera (78%), a menudo es un factor limitante en la productividad de los suelos, debido a su baja disponibilidad, y sólo cuando el  $N_2$  se transforma en amoníaco es accesible para los productores primarios.

Las actividades humanas han alterado significativamente la cantidad de  $N_2$  fijado en los ecosistemas (Figura I.2). A mediados del siglo pasado, gracias al proceso Haber-Bosch, se comenzaron a producir a gran escala fertilizantes nitrogenados, lo que aumentó enormemente la producción de cultivos durante la Revolución Verde y, actualmente, casi la mitad de la población depende del uso de estos fertilizantes, sin tener en cuenta el impacto medioambiental (Smil, 2004). La fabricación de fertilizantes

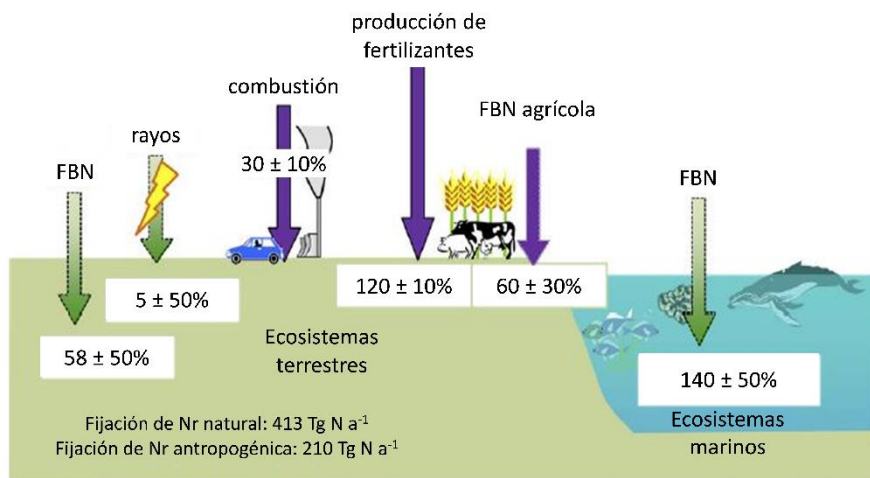


Figura I.2. Fijación global de N, natural y antropogénico en formas oxidadas y reducidas mediante combustión, FBN, rayos, fertilizantes y producción industrial a través del proceso Haber-Bosch en 2010. Las flechas indican una transferencia del reservorio de  $N_2$  a ecosistemas terrestres y marinos independientemente del destino posterior del nitrógeno reactivo ( $N_r$ ). Las flechas verdes representan fuentes naturales, las flechas violetas representan fuentes antropogénicas (adaptado de Fowler et al., 2013).

nitrogenados acelera el agotamiento de grandes cantidades de fuentes de energía fósiles no renovables, contribuyendo a la contaminación ambiental, mediante la emisión a la atmósfera y la lixiviación de compuestos como amoníaco, nitratos y óxido nitroso, ejerciendo un impacto cada vez mayor en el ciclo global del N (Bernhard, 2010; Bishnoi, 2018).

Por tanto, en la búsqueda de una agricultura más sostenible, la FBN representa una alternativa económica, ecológica y sólida para disminuir los insumos de N a los cultivos, enriqueciendo el suelo, mejorando su fertilidad y sostenibilidad y reduciendo la necesidad de fertilizantes industriales (Lanier et al., 2005; Soumare et al., 2020).

## 2. LAS LEGUMINOSAS

### 2.1. Encuadre filogenético

Las leguminosas son un amplio grupo de plantas pertenecientes a la familia *Leguminosae* o *Fabaceae*, cuyo origen se presume hace unos 100 millones de años (Lewis et al., 2013; Azani et al., 2017). Esta familia comprende unas 19.500 especies y 770 géneros, lo que las convierte en la tercera mayor familia dentro de las angiospermas, detrás de las familia *Orchidaceae* y *Asteraceae* (Doyle y Luckow, 2003). A diferencia de éstas, presentan amplia diversidad en distribución geográfica, abundancia y diversidad ecológicas, alta tasa de diversificación y rápida evolución, por lo que las leguminosas son consideradas una de las familias más exitosas dentro de las angiospermas (Koenen et al., 2013).

Engloban a tres grandes subfamilias donde encontramos tanto plantas de porte arbóreo o arbustivo, algarrobas, mimosas o acacias (subfamilias *Caesalpinioideae* y *Mimosoideae*), como plantas herbáceas

donde se clasifican las especies de interés agronómico (subfamilia *Papilionoideae*). A este grupo pertenecen las especies objeto de este estudio tal y como se describe en los siguientes apartados.

#### 2.1.1. *Phaseolus vulgaris* L.

La judía común tuvo su origen en América Latina, y fue extendida por todo el mundo por su capacidad de desarrollo bajo una amplia gama de condiciones ambientales (Beebe et al., 2008; Douchamps et al., 2010; Gepts, 1998). Es generalmente cosechada como grano seco, pero también son consumidas sus hojas frescas, vainas verdes y semillas inmaduras, produciéndose anualmente 30 millones de toneladas (FAOStat, 2020).

Se trata de la leguminosa grano más importante a nivel mundial desde el punto de vista de la alimentación humana, siendo considerada como alimento básico para millones de personas en América Latina y África (Fageria et al, 2011). Es fuente de proteína de alta calidad, rica en aminoácidos como la lisina y el triptófano, micronutrientes como el hierro, zinc y cobre, antioxidantes así como flavonoides beneficiosos para la salud humana (Rao, 2014; Calles et al., 2019).

#### 2.1.2. *Medicago truncatula* Gaertn.

*M. truncatula* es una leguminosa forrajera, originaria de la región mediterránea y bien adaptada a condiciones semiáridas, donde es frecuentemente usada para la rotación de cultivos (Lesins y Lesins, 1979; Crawford et al., 1989). Presenta un crecimiento rápido y elevada producción de biomasa, por lo que se utiliza también en la recuperación de suelos degradados o contaminados (Arocena et al., 2010).

Junto con *Lotus japonicus* es considerada la especie modelo para estudios de simbiosis, fijación de nitrógeno y genómica de las leguminosas

(Cook, 1999), debido a que presenta un ciclo de vida corto y un genoma relativamente pequeño (~ 500 Mb). Estas características la hacen idónea para ser transformada genéticamente, existiendo en la actualidad gran cantidad de mutantes y ecotipos usados en investigación (Tang et al., 2014).

### 2.1.3. *Glycine max* (L.) Merr.

*G. max*, conocida popularmente como soja, es la leguminosa más cultivada en el mundo y el cuarto cultivo más importante a nivel de producción y superficie cultivada, generándose 350 millones de toneladas al año (FAOStat, 2020). Es originaria del sudeste asiático y se estima que fue domesticada por primera vez en China alrededor del 1100 a. C. (Qiu y Chang, 2010).

En la composición de sus semillas presenta alrededor de 35% de proteína y un 20% de aceite (dependiendo de las variedades), además de carbohidratos y otros compuestos como las isoflavonas (Wilcox y Shibles, 2001). Es ampliamente utilizada tanto en la industria alimentaria, para consumo humano o animal, como en la producción de biodiesel y lubricantes, siendo su semilla oleaginosa considerada como una de las fuentes de proteína más importante y menos costosa de producir (Pratap y Kumar, 2011; Soystats, 2019).

Debido a su importancia agroeconómica, es una de las especies de leguminosas más estudiada, con el fin de mejorar tanto la productividad como la resistencia de los cultivos a estreses bióticos o abióticos. Así, en 2010, su genoma fue secuenciado, lo que abrió las puertas para desarrollar multitud de herramientas moleculares, genéticas y genómicas para el estudio de esta especie (Schmutz et al., 2010; Stacey et al., 2004).

## 2.2. Importancia de las leguminosas

### 2.2.1. Nivel económico y alimenticio

Dentro de la subfamilia *Papilionideae* diferenciamos las leguminosas forrajeras, de las que se utiliza el tallo y hojas, y leguminosas de grano, aprovechando las semillas principalmente ya sea para consumo humano, animal o producción de biofuel (Høgh-Jensen, 2012; De Ron et al., 2015).

Debido a su alto valor nutricional, las leguminosas han sido utilizadas en agricultura por muchas civilizaciones de todo el mundo durante más de 10.000 años (Bellwood et al., 2007). Su consumo se remonta al alrededor del 5500 a.C., postulándose como uno de los primeros cultivos (Messina, 1999).

Las leguminosas forrajeras son especies que se han adaptado de la flora silvestre para ser usadas en tierras de pastoreo, donde proporcionan alimento de alta calidad para el ganado a la vez que enriquecen el suelo en materia orgánica cuando son usadas en sistemas de rotación de cultivos. Entre ellas se destacan la alfalfa (*Medicago sativa*), el trébol (*Trifolium spp.*) o la arveja (*Vicia angustifolia*) (O'Hara et al., 2002; Mikic, 2011).

Entre los cultivos de grano, las legumbres ocupan el tercer puesto en producción a nivel mundial, detrás de los cereales y otras especies oleaginosas (Graham y Vance, 2003). Según la *European Association for Grain Legume Research*, las leguminosas representan el 15% del terreno cultivado mundial, con una producción de 250 millones de toneladas/año (<http://www.fao.org/faostat/es/#data> ) y más del 25% de la producción primaria mundial. Entre ellas se distinguen la soja (*G. max*), la judía (*P. vulgaris*), el guisante (*Pisum sativum*), o el haba (*Vicia faba*). Estas leguminosas contribuyeron a la "Revolución agrícola" desde finales de la última Edad de Hielo y siguen siendo una de las principales fuentes de alimento, fitoquímicos, nutrientes y fertilización nitrogenada en los

agrosistemas actuales (Graham y Vance, 2003; Bellwood *et al.*, 2007).

### 2.2.2. Nivel agroecológico

Debido al aumento de la población mundial y la consecuente demanda alimentaria, la FAO animó a dirigir los esfuerzos hacia cultivos que abogasen por una agricultura sostenible, donde las leguminosas juegan un papel muy importante (Calles *et al.*, 2019).

A nivel agroecológico, la característica más interesante de esta familia de plantas es su capacidad para asociarse simbióticamente con bacterias del suelo fijadoras de nitrógeno atmosférico. Esta simbiosis beneficia directamente a la planta, ya que el N es un elemento esencial y limitante de los cultivos, así como también a la rizosfera, aumentando el contenido biodisponible de este elemento. Por ello, las leguminosas han formado parte frecuentemente en el ciclo de rotación de cultivos favoreciendo la incorporación de N al suelo (Mantri *et al.*, 2013; Stagnari *et al.*, 2017). De esta forma, su uso en agricultura favorece la disminución de fertilización nitrogenada exógena, reduciendo la contaminación ambiental y enriqueciendo el suelo para siguientes cultivos (Broughton *et al.*, 2003; Soumare *et al.*, 2020). La introducción de las leguminosas como cobertura del suelo, así como intercaladas junto a otras especies agrícolas, beneficia el reciclaje de nutrientes, evitando su lixiviación y haciéndolos biodisponibles para otros cultivos (Miller y Jastrow, 1996; Santos *et al.*, 2007), ayudando a un mejor desarrollo de las plantas y favoreciendo el incremento de los cultivos en un entorno deficiente en N (Varshney *et al.*, 2013).

### **3. SIMBIOSIS RIZOBIO-LEGUMINOSA**

Las leguminosas tienen la capacidad de establecer simbiosis entre sus raíces y un grupo de bacterias Gram negativas conocidas como rizobios, que forman parte de la microbiota natural del suelo. Esta relación simbiótica de elevada especificidad evolucionó hace 58 millones de años y se estima que ocurre en más del 80% de las especies de leguminosas (De Faria et al., 1989; Sachs et al., 2011).

#### **3.1. Formación del nódulo**

La interacción rizobio-leguminosa es un proceso muy específico que depende del reconocimiento mutuo a través de las señales moleculares producidas por ambos simbioses (Figura I.3). El proceso es iniciado por la planta, mediante la producción de flavonoides que son liberados al medio por los exudados radiculares. La percepción de estos compuestos atrae a los rizobios compatibles e induce en la bacteria la expresión de los genes de nodulación, que determinan la producción de lipoquitooligosacáridos (Maj et al., 2010). Estos lipoquitooligosacáridos, comúnmente denominados factores Nod, presentan diferentes estructuras moleculares, considerándose elementos claves para la especificidad de la simbiosis (Supanjani et al., 2006). El reconocimiento por parte de la planta de los factores Nod a través de receptores específicos a nivel de los pelos radicales, desencadena una serie de respuestas en el vegetal que suponen la puesta en marcha simultánea del proceso de infección y de la organogénesis nodular (Ferguson et al., 2010; Murray, 2011) (Figura I.3, A).

La adhesión de los rizobios al pelo radical induce una despolarización parcial de la membrana de las células radicales, cambios en el flujo de iones calcio, aumento de las corrientes citoplasmáticas y una reorganización de los filamentos de actina que conllevan la curvatura del pelo radical (“curling”)



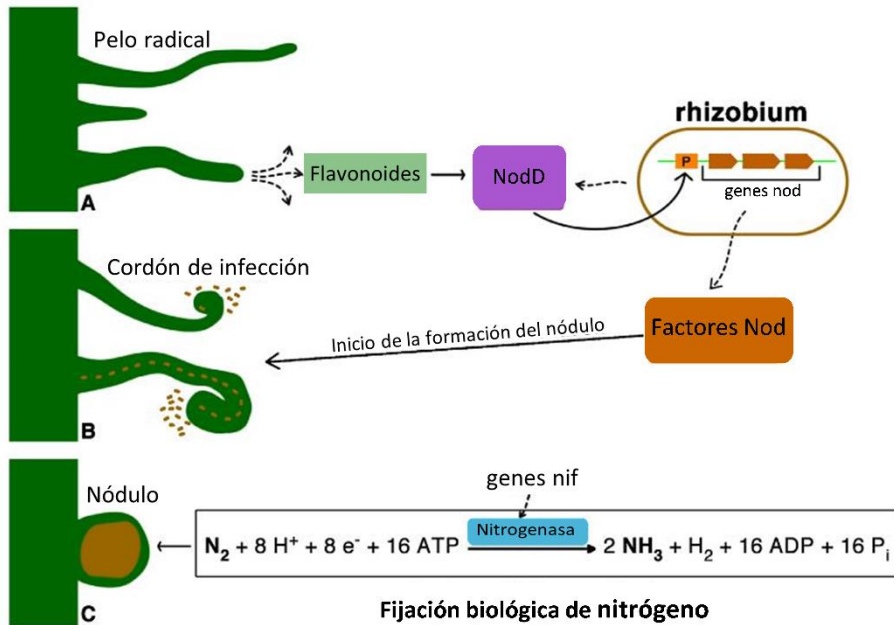


Figura I.3. Proceso de nodulación: (Modificado de Laranjo et al., 2014).

donde quedan encerrados los rizobios (Brewin, 1991). Los factores Nod provocan la invaginación de la membrana citoplasmática del pelo radical, permitiendo la entrada de las bacterias a través de lo que se denomina cordón de infección (Fournier et al., 2015). El cordón de infección es una etapa importante para la discriminación de las especies bacterianas apropiadas e implica una serie de puntos de control: un alto grado de especificidad de los factores Nod, probablemente una acumulación de estos y la presencia de polisacáridos apropiados en la superficie de las bacterias (Figura I.3, B).

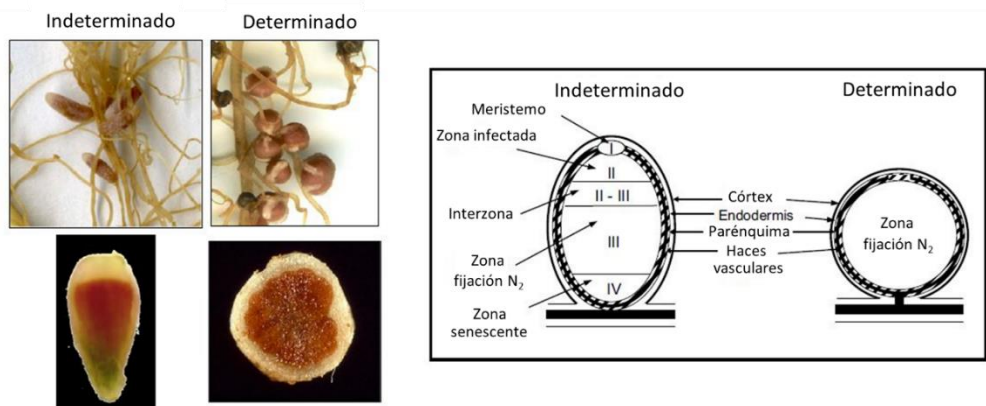
De forma paralela al proceso de infección se induce la expresión de gran cantidad de genes (Larrainzar et al., 2015) que activan la división de las células corticales para originar el primordio nodular (Radutoiu et al., 2003; Cooper, 2007). Los canales crecen hacia los nódulos emergentes y se

ramifican dentro del tejido en formación, donde las bacterias son liberadas e internalizadas en las células del nódulo por un proceso similar a la endocitosis (Brewin, 2004; Xiao et al., 2014). Posteriormente son encapsuladas por una membrana de origen vegetal, la membrana peribacteroidal, lo que da origen a un simbiosoma. En el interior de este nuevo orgánulo vegetal es donde las bacterias sufrirán un proceso de diferenciación, transformándose en bacteroides y adquiriendo la capacidad para realizar la FBN (Oldroyd et al., 2011; De la Peña et al., 2018) (Figura I.3, C).

### 3.1.1. Tipos de nódulos

Se han descrito dos tipos de nódulos dependiendo de la leguminosa hospedadora, clasificándose en determinados e indeterminados. Estos difieren en su organización histológica y anatómica, la presencia o no de un meristemo apical persistente, el desarrollo del cordón de infección y el tipo de compuestos nitrogenados que exportan al resto de la planta (Figura I.4).

Los nódulos determinados se forman en leguminosas de origen tropical y subtropical como las pertenecientes a los géneros *Glycine*, *Phaseolus*, *Vigna* o *Lotus*. Presentan una morfología esférica y estrechos cordones de infección (Ferguson et al., 2010). Son originados por proliferación de las células externas del córtex radicular. Pierden su actividad mitótica a los 10-18 días de desarrollo, por lo cual, el incremento de tamaño es debido a la expansión celular. El tejido central está formado tanto por células infectadas como no infectadas. Estas últimas son denominadas células intersticiales, de menor tamaño y con gran cantidad de vacuolas, siendo las responsables de la asimilación del nitrógeno fijado y su transporte en forma de ureidos, principalmente alantoína y ácido alantoico (Maunoury et al., 2008). Estos nódulos acumulan polímeros de reserva de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (Trevor y Charles, 2006).



	Indeterminado	Determinado
<b>Planta hospedadora</b>	Alfalfa, guisante, <i>M. truncatula</i>	Judía, soja, <i>L. japonicus</i>
<b>Región geográfica</b>	Templadas	Tropicales y subtropicales
<b>Forma del nódulo</b>	Alargado	Esférico
<b>Tipo de meristemo nodular</b>	Córtex interno	Córtex externo
<b>Tipos de flavonoides</b>	Flavonas, flavanonas	Isoflavonas (principalmente)
<b>Compuestos nitrogenados exportados</b>	Amidas	Ureidos

Figura 1.4. Características de los diferentes tipos de nódulos (Modificado de Larrainzar et al., 2020).

Los nódulos indeterminados se presentan en leguminosas de origen templado como *Medicago*, *Lupinus* y *Vicia*. Su morfología es alargada y a menudo con ramificaciones, con anchos cordones de infección (Ferguson et al., 2010). Presentan un meristemo persistente en el ápice, por lo que coexisten células en diferentes estadios, diferenciándose en ellos cuatro zonas diferenciadas, tanto histológica como funcionalmente (Figura 1.4). La zona I o meristemática, donde se formarán los diferentes tejidos del nódulo. En la zona II o de infección, las bacterias siguen liberándose a través del cordón de infección. La zona III o simbiótica está ocupada por bacteroides maduros fijadores de nitrógeno atmosférico y células no infectadas cuya función es la de dar soporte metabólico al proceso. La zona IV o senescente presenta células vegetales y bacteroides en degeneración (Vasse et al.,

1990). Los nódulos indeterminados transportan el nitrógeno fijado en forma de amidas, principalmente asparagina (Asn) y glutamina (Gln) (Maunoury et al., 2008).

### 3.2. Fijación biológica de nitrógeno

La FBN se lleva a cabo gracias al complejo enzimático nitrogenasa (Nasa). Esta enzima, sintetizada por los bacteroides en el interior de los nódulos, es capaz de reducir el  $N_2$  atmosférico hasta  $NH_4^+$ , que puede ser utilizado por la planta. El N fijado en forma de  $NH_4^+$  es rápidamente asimilado a través de las enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT) en forma de Gln y glutamato (Glu). Posteriormente, la Gln actúa como donador de N para la síntesis del resto de compuestos nitrogenados, y como compuesto de transporte de N al resto de la planta (Schubert, 1995).

#### 3.2.1. Complejo enzimático nitrogenasa

La Nasa es la enzima responsable de la FBN y consta de dos componentes proteicos: una ferromolibdoproteína o nitrogenasa (componente I) y una ferroproteína o nitrogenasa reductasa (Componente II) (Thayumanavan et al., 2002) (Figura 1.5).

El componente I es codificado por los genes *nifD* y *nifK*. Se trata de una proteína heterotetramérica ( $\alpha_2\beta_2$ ) con un peso molecular de 220 kDa. Presenta dos grupos activos, un cofactor de hierro- molibdeno (FeMo-Co) y el grupo (8Fe-7S) o grupo P, y proporciona el sitio catalítico para la reducción de  $N_2$ . El componente II está codificado por los genes *nifH*. Lo forma un homodímero ( $\alpha_2$ ) con doble simetría y una masa molecular de 62 kDa. Contiene un centro [4Fe-4S] entre las dos subunidades, y acopla la hidrólisis de ATP para la transferencia de electrones, desde la ferredoxina o de la flavodoxina, hacia el sitio catalítico (Oldroyd y Dixon, 2014; Rubio y Ludden,

2008).

El funcionamiento de la enzima requiere cuatro pasos: 1) formación de un complejo de la ferroproteína reducida unida a 2 ATP y al componente I; 2) transferencia de electrones entre ambas proteínas con hidrólisis de ATP; 3) disociación de la ferroproteína con la reducción e intercambio de ATP a ADP; y 4) repetición del ciclo hasta alcanzar el número de electrones necesario para reducir los sustratos (Olivares, 2006; Seefeldt et al., 2012). La ecuación global es la siguiente:

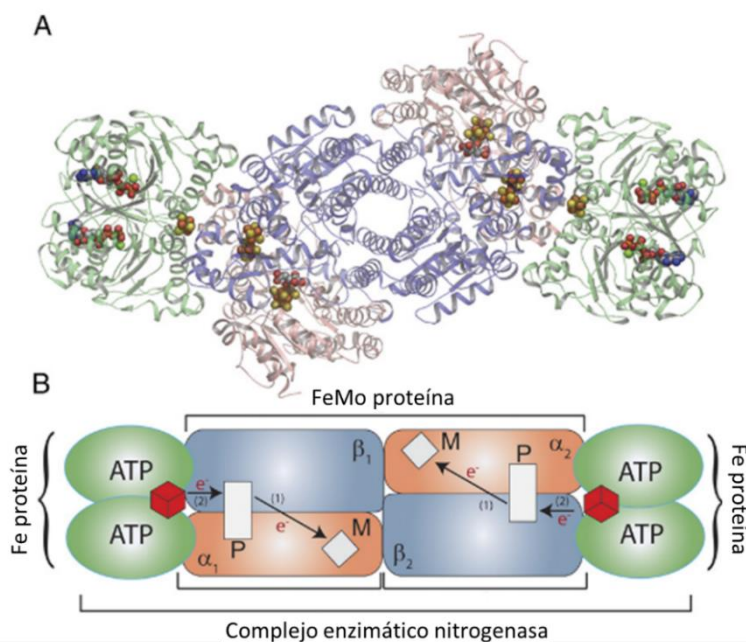
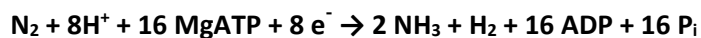


Figura I.5: Complejo enzimático Nasa. (A) Estructura de la Nasa con las subunidades  $\alpha$  (color salm3n), las subunidades  $\beta$  (color azul) y las ferroproteínas (color verde). (B) Esquema de la Nasa con el grupo [4Fe-4S] de la ferroproteína (cubos rojos), los grupos P (rectángulos blancos) y FeMo-co (rombos blancos). La trayectoria del movimiento de los electrones se indica mediante flechas y los números (1) y (2) indican el orden de su transferencia (adaptado de Danyal et al., 2016).

Simultáneamente a la reducción de  $N_2$ , el complejo Nasa cataliza la reducción de protones a una molécula de  $H_2$ , lo que supone una disminución de la eficiencia enzimática del 25% (Phillips, 1980). Existen ciertos rizobios (*hup*<sup>+</sup>) capaces de reciclar este  $H_2$  mediante la enzima hidrogenasa, contrarrestando así la pérdida de energía (Emerich et al., 1979; Baginsky et al., 2002).

### 3.2.2. Protección frente al oxígeno

La actividad Nasa es muy sensible a la inactivación por el oxígeno ( $O_2$ ) por oxidación y reducción irreversible del cofactor FeMoCo (Appleby, 1984). La FBN es un proceso que requiere un gasto considerable de energía, de ahí que la biosíntesis del complejo enzimático Nasa esté sometida a una estricta regulación. Se ha determinado que, bajo condiciones de laboratorio, se requieren 16 moléculas de Mg-ATP por cada molécula de  $N_2$  fijado (Seefeldt et al., 2012). Para mantener la alta tasa metabólica de los nódulos, los

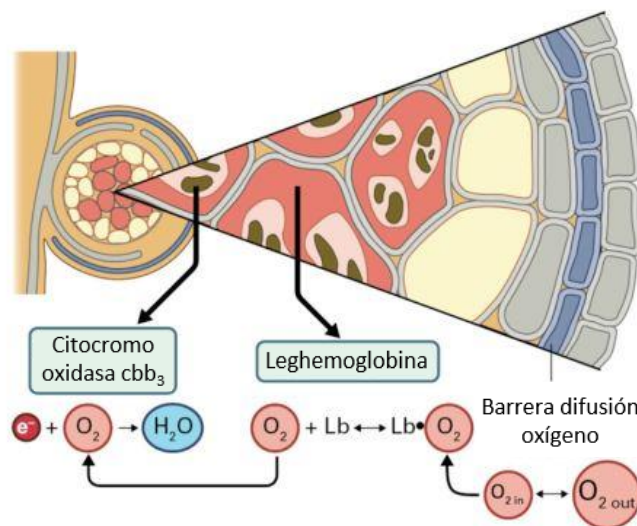


Figura I.6: Dibujo de un corte nodular representando los mecanismos de protección del nódulo frente al  $O_2$

bacteroides deben generar gran cantidad de energía, que obtienen a través de la respiración. Por tanto, en el interior del nódulo, los bacteroides tienen que lidiar con la paradoja de necesitar  $O_2$  para respirar y, por otro lado, proteger a la Nasa de la inactivación por el mismo. Para ello, el nódulo ha desarrollado diferentes estrategias que permiten obtener un ambiente microaeróbico donde tanto la eficiencia energética de los bacteroides como la actividad de la nitrogenasa son máximas (Figura 1.6).

Uno de estos mecanismos es la existencia de una barrera de difusión al oxígeno (BDO) localizada en el córtex interno del nódulo, que limita la permeabilidad del gas a la zona de infección (Witty y Minchin, 1998b). Esa barrera está formada por capas de células con un alto contenido glicoproteínas en su pared que presentan oclusiones en los espacios intercelulares que aumentan al incrementarse la presión parcial de  $O_2$ , lo que contribuye a limitar la difusión del gas al tejido central (Vessey et al., 2005).

Otra estrategia para regular la concentración de  $O_2$  es la presencia de la familia génica de las leghemoglobinas (Lb) recientemente revisadas por Larrainzar et al. (2020), ferroproteínas particulares de las leguminosas que dotan al nódulo de su característico color rosado y representan sobre el 30% del total de proteína nodular. La elevada afinidad de la Lb por el  $O_2$  hace que prácticamente todo el  $O_2$  que entra al nódulo sea transportado por ella hacia el simbiosoma donde será liberado, permitiendo la fosforilación oxidativa sin inhibir la FBN (Becana y Klucas, 1992). Este  $O_2$  es rápida y eficazmente consumido por los bacteroides para mantener una tasa alta de producción de ATP. La liberación de  $O_2$  desde la Lb a través de la membrana peribacteroidal se debe tanto al gradiente del gas como a la presencia de oxidasas terminales tipo  $cbb_3$  que presentan mayor afinidad por el  $O_2$  que la misma Lb (Bueno et al., 2009). De esta manera, los bacteroides son capaces de mantener su tasa

respiratoria aun cuando el O<sub>2</sub> es limitante en el medio (Delgado et al., 1996).

### 3.2.3. Metabolismo nodular

#### 3.2.3.1. Metabolismo del carbono

La FBN es un proceso con altos requerimientos energéticos, ya que, como se evidencia en la ecuación del proceso, se necesitan 16 moléculas de ATP para fijar una molécula de N<sub>2</sub>. La energía necesaria para llevar a cabo la actividad de la Nasa proviene de los compuestos sintetizados mediante la fotosíntesis de la planta hospedadora, estimándose que entre el 10-20% del carbono (C) obtenido es empleado para llevar a cabo este proceso (Gordon et al., 1999). La principal fuente de C que llega a los nódulos a través del floema es la sacarosa (Figura I.7), que será degradada vía glucolisis para la obtención de ácidos orgánicos, necesarios para el mantenimiento del metabolismo nodular y la asimilación del amonio (González et al., 2006; Gordon et al., 1985).

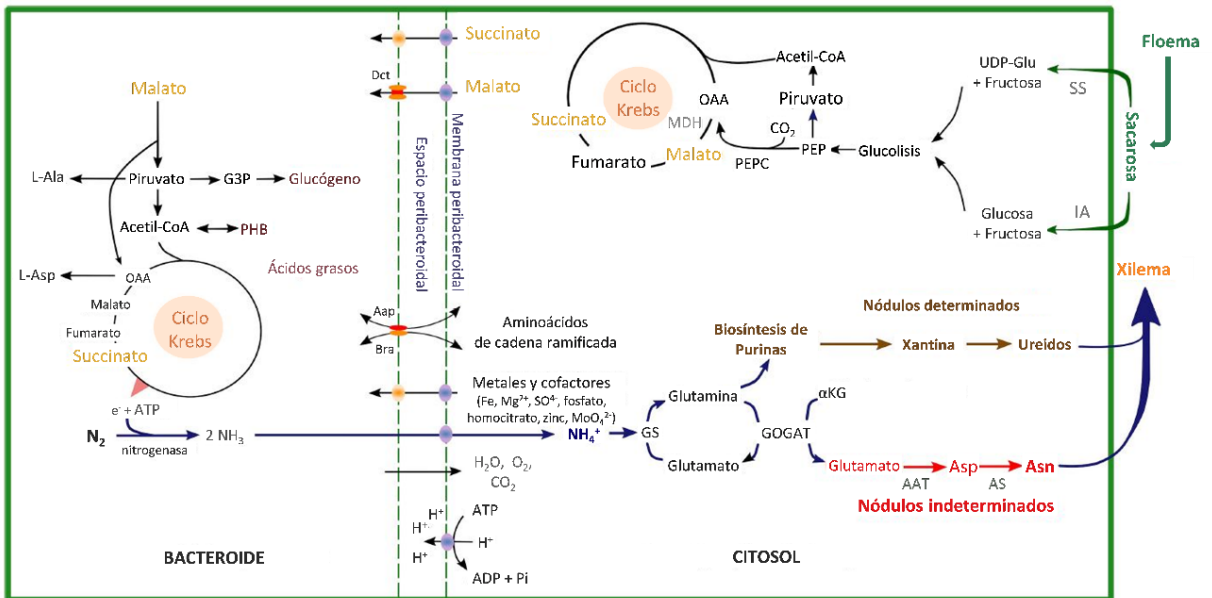


Figura I.7. Metabolismo del C y del N en nódulos de leguminosas (modificado de Liu et al., 2018a).



Una vez en el citosol nodular, la sacarosa tiene que metabolizarse para poder ser utilizada por los bacteroides. Dos son las enzimas capaces de llevar a cabo esta hidrólisis, la invertasa alcalina (IA), que origina glucosa y fructosa, y la sacarosa sintasa (SS), que da lugar a UDP-glucosa y fructosa. En un ambiente pobre en O<sub>2</sub> como es el nódulo, y la consiguiente limitación de ATP, la enzima SS presenta una ventaja frente a la IA, ya que produce hexosas fosfato capaces de reaccionar con pirofosfato para generar glucosa-1-fosfato y UTP sin consumo energético (Day y Copeland, 1991; González et al., 2006). Se ha demostrado que la SS nodular está implicada en el proceso de FBN ya que su actividad se ve incrementada cuando el nódulo maduro comienza su actividad fijadora (Arrese-Igor et al., 1999; Schubert et al., 2011).

Por medio de la glucolisis, los productos de la degradación de la sacarosa, fructosa y UDP-glucosa, serán transformados a fosfoenolpiruvato, que es carboxilado a oxalacetato (OAA) vía fosfoenolpiruvato carboxilasa. Esta ruta en nódulos de leguminosas está favorecida por la alta concentración citosólica de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (> 1-2% del total de proteína soluble), comprobándose una gran interdependencia entre su actividad y la actividad Nasa (Schulze et al., 1998; Nomura et al., 2006).

Los ácidos dicarboxílicos constituyen la principal fuente de carbono utilizada por los bacteroides. A través de la malato deshidrogenasa el OAA es rápidamente transformado a malato, que será transportado a los bacteroides donde es usado como sustrato respiratorio para mantener la actividad fijadora, o quedará en el citosol originando esqueletos carbonados para la asimilación de N (Day y Copeland, 1991; Delgado et al., 1993).

#### 3.2.3.2. Metabolismo del nitrógeno

El NH<sub>3</sub> generado en los bacteroides como resultado de la FBN tiene que ser transferido al citosol vegetal para ser incorporado a compuestos

nitrogenados utilizables para la planta (Figura 1.7). El pH del espacio peribacteroidal es ácido, lo que favorece la formación de  $\text{NH}_4^+$  a partir de  $\text{NH}_3$ , que será transportado a través de canales iónicos de la membrana peribacteroidal al citosol vegetal (Patriarca et al., 2002). Debido a la naturaleza tóxica de este anión y, con el fin de no ocasionar daño celular o la inhibición de la FBN, tiene que ser rápidamente asimilado en el citosol para ser transportado a la planta.

Independientemente del tipo de nódulo, la asimilación del  $\text{NH}_4^+$  se lleva a cabo principalmente a través del ciclo GS/GOGAT donde el amoníaco es incorporado a Gln como primer compuesto nitrogenado resultado de la FBN. En este ciclo la enzima GS cataliza la síntesis de Gln por incorporación del  $\text{NH}_4^+$  a Glu con consumo de una molécula de ATP. Posteriormente, la enzima GOGAT generará dos moléculas de Glu por transferencia del grupo amida de la Gln al 2-oxoglutarato, de las cuales una será usada para incorporar amonio, y la otra será exportada vía xilema para su utilización por la planta. Cuando se incrementa la concentración de amonio en el citosol, la enzima glutamato deshidrogenasa cataliza la incorporación del amonio a oxalacetato sin gasto de ATP (González et al., 2006).

En nódulos indeterminados, Glu y Gln se convierten además en aspartato (Asp) y Asn por la Asp aminotransferasa y la Asn sintetasa. Mientras que, en nódulos determinados, Gln entra en la vía de síntesis de purinas, para dar lugar principalmente a ureidos, que serán exportados a la planta hospedadora.

## 4. ESTRÉS HÍDRICO EN PLANTAS

El agua es el componente mayoritario y esencial de todos los organismos, y en plantas constituye del 80-95% del peso total. Está presente como constituyente del protoplasma, asociada a iones, disolviendo sustancias orgánicas y macromoléculas, almacenada en las vacuolas y como agua intersticial, que actúa de medio de transporte en los espacios intercelulares y en los tejidos de conducción del xilema y el floema (Dawson et al., 1996; Zyalalov, 2004). Debido a sus características físicoquímicas es considerada como el solvente universal, diluyendo y transportando iones y metabolitos básicos para el metabolismo vegetal. El transporte de agua en las plantas se rige según cambios en el potencial hídrico, desde el compartimento de potencial hídrico más negativo (raíz) al que presenta un potencial menos negativo (hoja) (Chavarria y dos Santos, 2012), manteniendo la homeostasis celular (Zyalalov, 2004; Taiz y Zeiger, 2006). Teniendo en cuenta la gran importancia del agua en los procesos básicos de las plantas, una cantidad excesiva o limitada de la misma constituye un factor inductor de situaciones adversas para el vegetal.

De esta manera, se considera que el déficit hídrico es el estrés abiótico de mayor incidencia en el crecimiento de las plantas (Chaves et al., 2003; HongBo et al., 2006). Este tipo de estrés ocurre en las plantas cuando la pérdida de agua por transpiración excede la capacidad de absorción por las raíces, resultando en deshidratación celular, con el consecuente daño en las células, lo que puede, en último término, desencadenar la muerte celular (Lawlor y Cornic, 2002).

Durante los últimos años, los cambios globales en las condiciones climáticas han propiciado la intensificación y la prolongación del déficit hídrico, evento que en el siglo XXI se verá aumentado, según concluía el Panel

Intergubernamental sobre Cambio Climático, debido a la reducción de las precipitaciones y/o al aumento de la evapotranspiración. Esta sequía se define como un periodo prolongado de precipitaciones deficientes en una región en comparación con años anteriores (IPPC, 2014).

En los cultivos, esta disminución de las precipitaciones puede provocar un estrés más severo del que las plantas estaban acostumbradas. Esta perturbación transitoria para las plantas es conocida como sequía hidroedáfica o agrícola, definida como la carencia de humedad suficiente en el suelo para satisfacer las necesidades de un cultivo en un momento determinado (Chaves y Oliveira, 2004; Dai, 2012; Maliva y Missimer, 2012).

Por ello, con el fin de hacer frente al estrés hídrico en el futuro, es clave dilucidar los mecanismos fisiológicos y las vías de señalización molecular responsables de una mayor tolerancia de los cultivos a la sequía.

#### **4.1. Efectos del déficit hídrico en plantas**

Como consecuencia de la reducción del contenido hídrico de la planta se producen cambios morfo-fisiológicos como la reducción del área foliar y el número de hojas para evitar la pérdida de agua, o el aumento de la superficie y densidad radicular, para facilitar la búsqueda de la misma (Comas, et al., 2013).

##### **4.1.1. Potencial hídrico**

El déficit hídrico desencadena la disminución del **potencial hídrico** de la planta, lo que conlleva la pérdida de turgencia celular. Bajo esta condición, rápidamente se produce el cierre de estomas mediado por la acumulación de ácido abscísico con el fin de reducir la pérdida de agua por transpiración. Esto conlleva la disminución del intercambio gaseoso, lo que se traduce en una menor difusión de CO<sub>2</sub> a la planta, que limita la tasa fotosintética a la vez que

incrementa la fotorrespiración. Como proceso fundamental responsable del crecimiento y desarrollo de las plantas, la fotosíntesis se ve afectada por los estreses ambientales. La alteración de las actividades enzimáticas que intervienen en ella conlleva el deterioro de la maquinaria fotosintética, lo que se traduce en una reducción del rendimiento de las leguminosas según la gravedad y duración del estrés (Andrianasolo et al., 2016; Farooq et al., 2009).

#### 4.1.2. Equilibrio osmótico

Otro de los parámetros afectados por el déficit hídrico es el **equilibrio osmótico**. Con el fin de paliar los efectos negativos del estrés, las plantas acumulan diferentes sustancias orgánicas e inorgánicas, conocidas como osmoprotectores u osmolitos (Fang y Xiong, 2015). Estos son solutos compatibles, que pueden acumularse en altas concentraciones en las células sin perturbar las funciones fisiológicas normales (Safarnejad et al., 1996), constituyen un mecanismo clave para mejorar el rendimiento de los cultivos sometidos a estrés por sequía (Wang et al., 1999; Ashraf y Foolad, 2007). Entre estos compuestos encontramos aminoácidos, azúcares, polioles, poliaminas (PAs) e iones inorgánicos, conocidos como osmoprotectores u osmolitos, que participan en el ajuste osmótico, permitiendo la entrada de agua a la célula y evitando daños como la pérdida de turgencia o la disminución de la actividad fotosintética, o colaboran en el mantenimiento de las estructuras y funciones celulares (Cushman, 2001; Fang y Xiong, 2015; Singh et al., 2015).

Entre ellos destacamos la **prolina** (Pro), considerada un soluto compatible y osmoprotector que puede inducir la síntesis de proteínas protectoras frente al estrés (Samaras et al., 1995; Okuma et al., 2000; Khedr et al., 2003). La acumulación de Pro se informa con frecuencia en muchas plantas o tejidos en respuesta a una variedad de estreses abióticos,

umentando considerablemente en respuesta al estrés hídrico en el caso del guisante (Rubia et al., 2020), la soja (Heerden Van y Krüger, 2002), el caupí (Singh y Reddy, 2011) o la judía (Ghanbari et al., 2013), lo cual parece indicar que la Pro puede jugar un papel importante en minimizar el daño causado por la deshidratación.

Entre los azúcares que actúan como osmoprotectores destaca la **trehalosa**, disacárido no reductor formado por dos moléculas de glucosa unidas mediante un enlace  $\alpha,\alpha$ , con amplia distribución en la naturaleza, en particular, ligado a condiciones simbióticas. Ha sido detectada en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, sintetizándose en los bacteroides desde donde es liberada al espacio peribacteroidal y de este al citoplasma de las células huésped (Streeter, 1985). La concentración de trehalosa en los nódulos es 10 veces mayor que en cualquier otro órgano acumulándose en situación de estrés hídrico en nódulos de plantas de soja o judía (Müller et al., 1995), donde los cultivares con más trehalosa en el nódulo mostraron un elevado contenido relativo de agua en hoja así como una mayor tolerancia a dicho estrés (Farías-Rodríguez et al., 1998).

Otro grupo de sustancias implicadas en la osmoprotección son las **poliaminas** (como putrescina, espermina y espermidina). Estas aminas alifáticas de bajo peso molecular son esenciales para la supervivencia de la célula tanto procariota como eucariota. A pH intracelulares estos compuestos interactúan con macromoléculas polianiónicas tales como el DNA, el RNA, fosfolípidos, grupos aniónicos de las membranas y pared celular, así como con proteínas ácidas y enzimas cuyas actividades están directamente moduladas por la unión a PAs. Se ha comprobado su participación en la tolerancia al estrés por sequía donde su aplicación exógena mejora el estatus hídrico en plantas de arroz (Farooq et al., 2010), soja (Amooaghaie, 2011) o garbanzo

(Nayyar y Chander, 2004).

#### 4.1.3. Sistemas antioxidantes

El estrés hídrico va acompañado de una **producción de especies de oxígeno reactivo** (del inglés, ROS), que, a bajas concentraciones, actúan como mensajeros para activar los sistemas de defensa antioxidante en una respuesta inicial de las plantas a la sequía. Cuando los niveles de ROS exceden a los mecanismos de defensa, se produce daño oxidativo en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, que alteran las propiedades intrínsecas de las biomoléculas y conllevan la muerte celular (Kurutas, 2016). La respuesta antioxidante de la planta implica tanto mecanismos enzimáticos como no enzimáticos. Los componentes enzimáticos y no enzimáticos constituyen el mecanismo de defensa frente las ROS en las células, y el mantenimiento de una mayor concentración de éstos ha demostrado ser una respuesta adaptativa del estrés por sequía (Al Hassan et al., 2017).

##### 4.1.3.1. Antioxidantes enzimáticos

Los **antioxidantes enzimáticos** comprenden entre otras las enzimas catalasa, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa, y las pertenecientes al ciclo ascorbato-glutatión o ciclo de Halliwell-Asada (Figura I.9) como la ascorbato peroxidasa, la deshidroascorbato reductasa, la glutatión reductasa y la monodeshidroascorbato reductasa (Matamoros et al., 2003).

La catalasa es una enzima oxidorreductasa con un grupo hemo localizada en los peroxisomas. Degrada rápidamente el  $H_2O_2$  sin consumo de poder reductor, siendo un mecanismo energéticamente muy eficiente en condiciones de estrés (Zhang y Kirkham, 1994). La superóxido dismutasa es una metaloenzima que cataliza la dismutación del radical superóxido. Existen tres tipos según el cofactor que presenten: CuZn superóxido dismutasa

(localizada en cloroplastos, peroxisomas y citoplasma), Mn superóxido dismutasa (localizada en mitocondrias y bacteroides) y Fe superóxido dismutasa (localizada en cloroplastos) (Noctor et al., 2000; Rubio et al., 2007).

El ciclo de Halliwell-Asada (Figura I.9) colabora con la desintoxicación del  $H_2O_2$  utilizando poder reductor. Constituye el principal sistema antioxidante en plantas. Gracias a la oxidación del ascorbato (AsA) a monodeshidroascorbato (MDHA) por la ascorbato peroxidasa se produce la reducción del  $H_2O_2$  a  $H_2O$ . El MDHA puede formar espontáneamente deshidroascorbato (DHA), o gracias a la MDHA reductasa regenerar AsA con consumo de poder reductor. La DHA reductasa proporcionan el sustrato para las reacciones, regenerando AsA con gasto de glutatión reducido que será reciclado por la enzima glutatión reductasa.

El estrés oxidativo normalmente conduce al incremento de uno o más de los componentes de este ciclo, por lo que ha sido descrito como un componente importante de los mecanismos de defensa antioxidante de las células vegetales y su buen funcionamiento confiere resistencia frente al estrés (Noctor y Foyer, 1998).

#### 4.1.3.2. Antioxidantes no enzimáticos

Los antioxidantes no enzimáticos incluyen AsA, glutatión, tocoferoles o carotenoides (Farooq et al., 2009).

El **AsA** o vitamina C es uno de los mayores antioxidantes celulares, sintetizado en las mitocondrias y transportado al resto de la célula. Como veíamos, es utilizado por la AsA peroxidasa en el ciclo de Halliwell-Asada (Figura I.9) para metabolizar el  $H_2O_2$ . Además es capaz de reaccionar de manera no enzimática con radicales como el superóxido ( $O_2^-$ ), el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), hidroxilo y otros hidróxidos lipídicos, alcoxilo, peroxilo y



tocoferoxilo. También presenta la capacidad de proteger y regenerar tocoferoles y carotenoides oxidados (Shao et al., 2006).

El  **$\alpha$ -tocoferol** o vitamina E es un antioxidante liposoluble acumulado principalmente en tejidos fotosintéticos. Es capaz de eliminar peróxidos lipídicos, proporcionando estabilidad a las membranas del aparato fotosintético, así como de neutralizar  $^1\text{O}_2$  producido en los cloroplastos (Yu y Tang, 2004; Krieger-Liszky y Trebst, 2006).

El **glutati3n** juega un papel importante en la protecci3n celular contra el da3o oxidativo de l3pidos, prote3nas y 3cidos nucleicos. Presenta una interacci3n sin3rgica con otros agentes antioxidantes como el AsA, la vitamina E y las super3xido-dismutasas (Shan et al., 1990) y tiene la capacidad de reactivar enzimas que son inhibidas por la exposici3n a altas concentraciones de  $\text{O}_2$  (Matamoros y Becana, 2020).

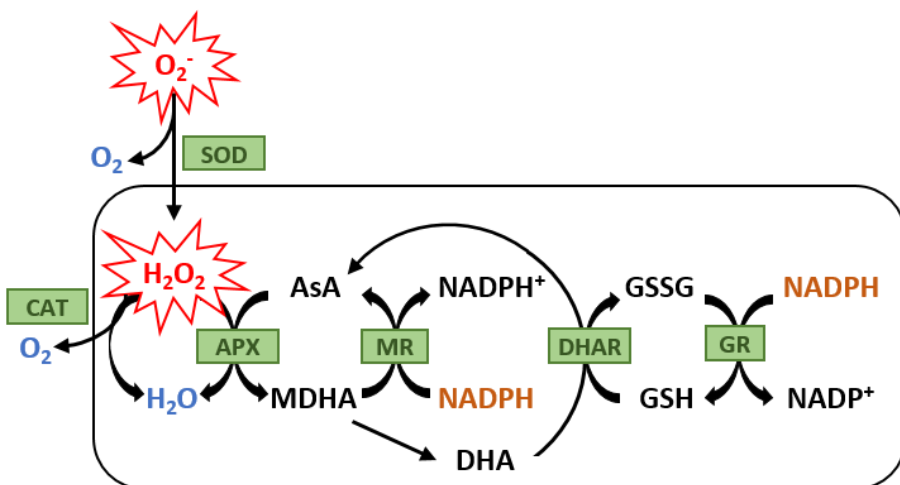


Figura I.9 : Ciclo de Halliwell-Asada. Abreviaturas: SOD, super3xido dismutasa; CAT, catalasa; APX, ascorbato peroxidasa; MR, monodeshidroascorbato reductasa; DHAR, deshidroascorbato reductasa; GR, glutati3n reductasa; GSSG, glutati3n oxidado; GSH, glutati3n reducido.

## 5. FBN Y DÉFICIT HÍDRICO

Uno de los principales factores limitantes de los cultivos de leguminosas es la extrema sensibilidad de la actividad Nasa al déficit hídrico o sequía (Arrese-Igor et al., 2011), lo que provoca una serie de cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que reducen la capacidad fijadora. Las estrategias para obtener tolerancia a estreses abióticos en leguminosas son muy complejas, ya que no sólo hay que considerar a la planta entera, sino a su microsimbionte, así como la capacidad fijadora de los nódulos, que se ve muy afectada por la sequía de forma previa y más intensa que la fotosíntesis (Durand et al., 1987).

La disminución de la FBN provocada por la sequía es consecuencia de una serie de mecanismos fisiológicos de la actividad Nasa entre los que destacan la disminución de sustratos carbonados suministrados a los bacteroides, la inhibición de la FBN debido a la acumulación de compuestos nitrogenados y el incremento de la resistencia a la difusión de oxígeno y el estado redox (Arrese-Igor et al., 1999, 2011; Mhadhbi et al., 2011; Schulze, 2004).

### 5.1. Regulación por carbono

La energía que se requiere para la actividad Nasa deriva del metabolismo de los compuestos carbonados que se producen durante la fotosíntesis del macrosimbionte, siendo el más abundante la sacarosa, que es transportada a los nódulos e hidrolizada por la SS e IA. Tras una serie de reacciones de la ruta glucolítica, será convertida a malato que es transportado al simbiosoma, donde constituye la principal fuente de C para los bacteroides (González et al., 2006).

En nódulos de leguminosas, la sequía provoca la inhibición de la

actividad SS, la consiguiente acumulación de sacarosa y la disminución en el contenido de malato (Udvardi et al., 1988), lo que se ha visto que conlleva la reducción de la FBN en varias especies de leguminosas grano (González et al., 1995, 1998; Ramos et al., 1999), postulándose un mecanismo regulador mediado por compuestos carbonados de la FBN. Evidencias de éste se obtuvieron al comprobar que variedades vegetales con diferente tolerancia a la sequía presentaban también diferentes respuestas en su actividad SS tanto en soja (Ladrera et al, 2007) como en judía (Sassi et al., 2008). Por otro lado, Larrainzar et al. (2007), confirmaron, mediante análisis proteómicos, la implicación de la SS como enzima clave en la respuesta de nódulos a sequía.

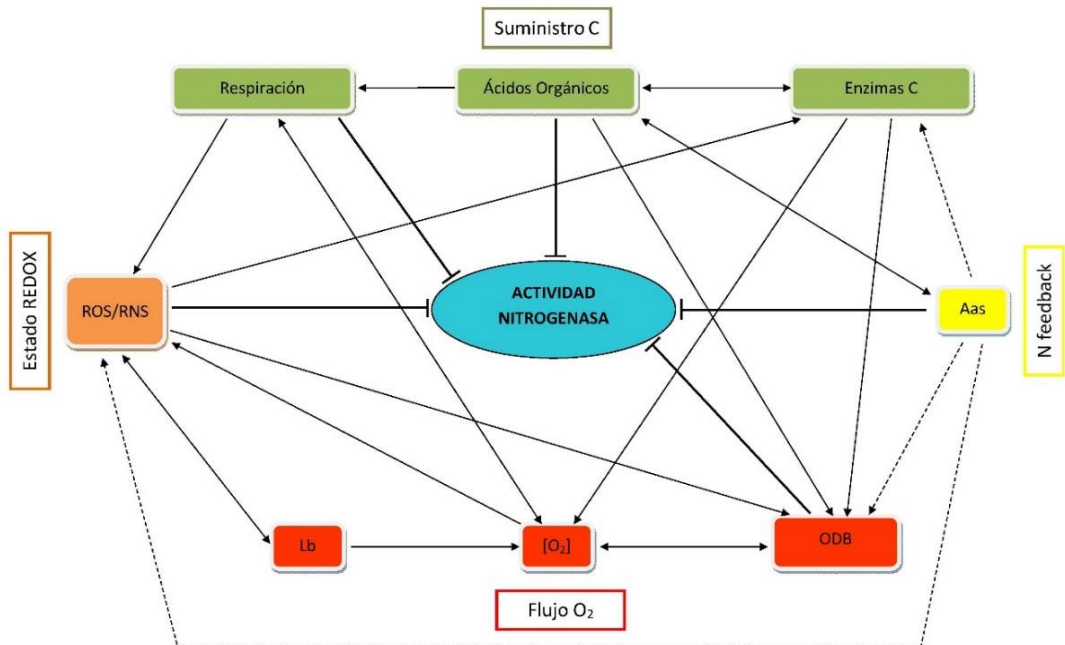


Figura 1.10: Resumen de las hipótesis de la regulación de la actividad nitrogenasa de los nódulos en condiciones de estrés hídrico (modificado de Sulieman y Tran, 2013).

## 5.2. Regulación por nitrógeno

En los últimos años, la regulación de la FBN mediada por N ha recibido mucha atención. Estudios llevados a cabo usando fertilizantes nitrogenados sugirieron que el estado nitrogenado de la planta podría regular la FBN (Streeter y Wong, 1988; Hartwig, 1998) proponiéndose que la inhibición por retroalimentación podría estar implicada en su regulación.

Han sido muchos los compuestos presentados como candidatos responsables de la inhibición, como los ureidos, cuya acumulación se observa en hojas de soja (De Silva et al., 1996; Purcell et al., 1998) y nódulos (Ladrera et al., 2007) sometidos a sequía, o aminoácidos como la Asn o el Asp, propuestos como “moléculas señal” que desencadenan la inhibición de la FBN en soja (Serraj et al, 1999; Vadez et al., 2000), posiblemente a través de un ciclo de aminoácidos entre el citosol de la planta y los bacteroides propuesto por Sulieman y Tran (2013).

Aparte del efecto inhibitorio de los aminoácidos, se han propuesto otras hipótesis para explicar esta acumulación inducida por la sequía de sustancias nitrogenadas en el nódulo, como que la acumulación de aminoácidos puede ayudar a mejorar la capacidad de tolerancia al estrés de la planta ayudando al ajuste osmótico y a la desintoxicación de ROS, y/o mediante la regulación del pH intracelular (Silvente et al., 2012).

## 5.3. Flujo de oxígeno

La FBN es un proceso que requiere un alto consumo energético, de manera que se necesitaría entre el 10 y el 20% del carbono procedente de la fotosíntesis para este proceso (Gordon et al., 1999).

Los fotoasimilados procedentes de la parte aérea de la planta son la principal fuente de energía y de esqueletos carbonados para el desarrollo y

mantenimiento del nódulo, la respiración bacteroidal y la fijación del nitrógeno (Schubert, 1986).

El complejo enzimático de la nitrogenasa es extremadamente sensible al oxígeno, que provoca un daño irreversible, por lo que su actividad se encuentra limitada a condiciones microaeróbicas. Sin embargo, el oxígeno es necesario para la respiración, que garantiza el suministro de energía en forma de ATP, imprescindible para la FBN, y es por ello que los nódulos de leguminosas adoptan las condiciones necesarias de microaerobiosis para que se lleve a cabo el proceso (Minchin, 1997). La protección de la Nasa frente al  $O_2$  se debe a una molécula relativamente específica de la simbiosis, la Lb, en combinación con la denominada barrera a la difusión del oxígeno (James et al., 2000; Wei y Layzell, 2006). La Lb está presente en todos los nódulos efectivos, uniéndose reversiblemente al  $O_2$  y manteniendo una concentración del mismo en la zona infectada del nódulo de 50-100 nM (Arrese-Igor et al., 2011), lo cual evita la inhibición de la nitrogenasa, a la vez que asegura el aporte de  $O_2$  necesario para la respiración de los bacteroides, evidenciándose su papel fundamental en la fijación de nitrógeno (Ott et al., 2005).

La estructura y el funcionamiento bioquímico de la ODB no se conoce con exactitud, pero se acepta de modo general que es esencial para regular la difusión de  $O_2$  en respuesta a los cambios ambientales, y para evitar los daños oxidativos en la zona central del nódulo, manteniendo una fijación de  $N_2$  óptima (Wei y Layzell, 2006).

#### **5.4. Estado redox**

Se ha propuesto que las ROS desempeñan una función crucial en la regulación redox que se produce durante la sequía, afectando a la SS tanto a nivel transcripcional como postraduccional (Marino et al., 2008). La producción de ROS influye en el suministro de  $O_2$  a la zona central o infectada

del nódulo. Debido a sus reacciones con oxígeno, la Lb constituye una de las principales fuentes de ROS en el interior de los nódulos (Günther et al., 2007).

Durante bastante tiempo se ha asumido que las señales implicadas en la percepción y respuesta a la sequía se producían en la fracción vegetal de los nódulos, pero los resultados obtenidos en *M. truncatula* por Larrainzar et al. (2009) sugieren que la capacidad metabólica de los bacteroides y el daño oxidativo de los componentes celulares son también factores que contribuyen a la inhibición de la FBN en situación de sequía.

# OBJETIVOS GENERALES





La FBN es un proceso de gran interés medioambiental gracias al cual se enriquece el suelo en nitrógeno de forma natural, reduciendo los insumos de fertilizantes nitrogenados. Sin embargo, las condiciones ambientales adversas afectan negativamente a este proceso, limitando las tasas de fijación de nitrógeno. El estrés por sequía es una de las limitaciones más hostiles para la simbiosis rizobio-leguminosa. Por ello, el objetivo general de esta tesis era profundizar en el conocimiento del funcionamiento y regulación de la FBN, así como los mecanismos fisiológicos y moleculares responsables de una mayor tolerancia al estrés hídrico.

Varias han sido las hipótesis que intentan explicar la inhibición de la FBN en condiciones de déficit hídrico, como la limitación de esqueletos carbonados, la inhibición por compuestos nitrogenados, la restricción de oxígeno nodular y el mantenimiento del estado redox. De esta manera se definieron específicamente los siguientes objetivos:

- 1) Determinar los compuestos osmoprotectores que puedan estar implicados en la mayor tolerancia al estrés hídrico y posterior recuperación de las plantas en la simbiosis de *Phaseolus vulgaris* con un mutante respiratorio.
- 2) Analizar el efecto sobre la FBN del incremento de ácido ascórbico en plantas de *Medicago truncatula* en condiciones deficitarias de agua.
- 3) Identificar compuestos nitrogenados que puedan causar la inhibición de la FBN en plantas de soja suplementadas con asparagina.



# CAPÍTULO 1

Implicación de las poliaminas y compuestos osmoprotectores en la simbiosis entre *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium etli* CFNX713 bajo condiciones de déficit hídrico y posterior recuperación de las plantas



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. FBN en condiciones de déficit hídrico

### 1.1.1. Regulación del flujo de oxígeno

La reducción del  $N_2$  por la Nasa es un proceso que requiere altas cantidades de ATP, obtenido mediante la oxidación de los ácidos orgánicos procedentes de la planta hospedadora. La BDO y la Lb hacen que la concentración de  $O_2$  en el nódulo sea extremadamente baja (Hunt y Layzell, 1993; Witty y Minchin, 1990). El sistema respiratorio bacteriano presenta múltiples cadenas respiratorias con oxidasas terminales de distinta afinidad por el  $O_2$  (Figura 1.1), lo que les permite adaptar con gran eficacia la fosforilación oxidativa a las variaciones de las condiciones medioambientales (Bueno et al., 2012).

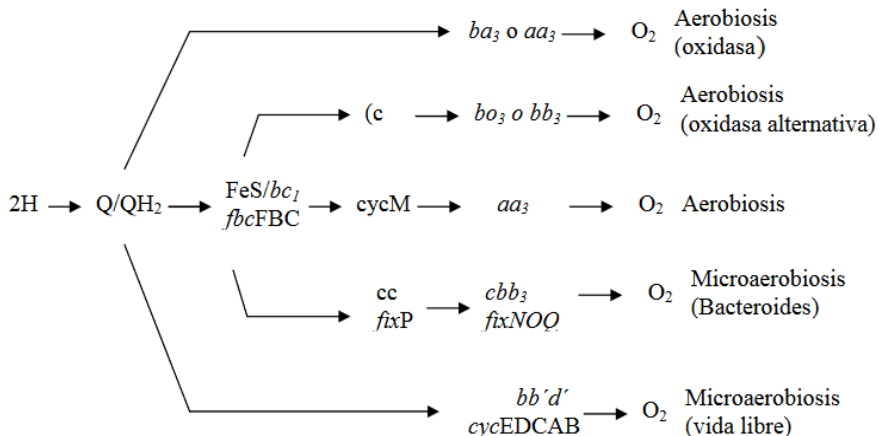


Figura 1.1. Esquema de la cadena respiratoria de rizobios (modificado de Preisig et al. (1996b))

### 1.1.2. Implicación de la oxidasa terminal $cbb_3$

La existencia de una oxidasa terminal con elevada afinidad por el  $O_2$  (del rango de 7 nM) se demostró por primera vez en bacteroides de *Bradyrhizobium diazoefficiens* con la descripción de la citocromo c oxidasa de

hemo-cobre  $cbb_3$  (Preisig et al., 1996).

La enzima está formada por 4 subunidades: FixNOQP

- FixN: subunidad catalítica asociada a la membrana con un tamaño de 16 kDa.
- FixO: citocromo c de 27 kDa.
- FixP: citocromo c de 31 kDa que facilita el transporte de electrones entre el complejo bc1 y el núcleo estructural de la oxidasa (FixN-FixO).
- FixQ: subunidad con 6 kDa de tamaño, que no parece esencial ni para el ensamble de la enzima ni para su función.

Mediante experimentos de transcripción *in vitro* se ha demostrado que la proteína FixK2 es el activador transcripcional de la expresión de los genes *fixNOQP* de *B. diazoefficiens* en respuesta a condiciones limitantes de oxígeno (Mesa et al., 2005). *Ensifer meliloti* presenta tres copias de los genes *fixNOQP* que se expresan en microaerobiosis (Becker et al., 2004). *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* presenta dos copias del operón *fixNOQP*, requiriéndose las dos para una óptima fijación de nitrógeno (Schlüter et al., 1997). *Rhizobium etli* CFN42 presenta dos copias del operón *fixNOQP* (*fixNOQPd* y *fixNOQPf*), requiriéndose solo la primera para el establecimiento de una simbiosis eficaz. El operón *fixNOQPd* se induce en condiciones de microaerobiosis y su expresión está controlada por tres reguladores postranscripcionales: FixKf, FnrNd y FnrNchr (Girard et al., 2000). En condiciones de baja disponibilidad de  $O_2$ , tanto el operón *fixNOQP* como el gen *fixKf* están regulados por dos reguladores transcripcionales denominados StoRd y StoRf, cuya inactivación aumenta la expresión de las copias del operón *fixNOQP*, lo que resulta en el incremento de la expresión de la oxidasa terminal  $cbb_3$  en los bacteroides de nódulos de *P. vulgaris*.

Granados-Baeza et al. (2007) demuestran que la inoculación de plantas de judía con mutantes de *R. etli* CFN42 en el regulador StoRd (cepa CFNX713) representaba una mejora en la expresión de *fixKf* así como un aumento en la capacidad para fijar N<sub>2</sub>. Posteriormente, Talbi et al. (2012), comprueban que bajo condiciones de déficit hídrico, plantas de judía inoculadas con *R. etli* CFNX713 presentaban una mayor capacidad respiratoria en sus bacteroides, así como una mayor tolerancia de la simbiosis al estrés.

Por lo tanto, una estrategia para mejorar la tolerancia de la simbiosis *Rhizobium*- leguminosa en condiciones de sequía es la utilización de cepas de rizobios con alta capacidad respiratoria.

Si el cierre de la BDO fuese el único factor causante de la disminución de la FBN, la inhibición sería reversible al aumentar la disponibilidad de O<sub>2</sub>, pero se demostró que la FBN no se restauraba al aumentar la concentración de O<sub>2</sub> alrededor del nódulo (Diaz del Castillo et al., 1994; Hunt y Layzell, 1993).

Aunque es evidente que una disminución en el flujo de oxígeno hacia el interior de los nódulos es fundamental en la respuesta de los mismos a los estreses ambientales desfavorables, deben existir otras limitaciones metabólicas implicadas en esta respuesta.

## **1.2. Poliaminas**

Las PAs son aminas alifáticas de bajo peso molecular, policatiónicas a pH fisiológico, esenciales para la supervivencia de la célula tanto procarionta como eucariota (Liu et al., 2018). Presentan una potente actividad biológica, estando implicadas en todos los procesos del crecimiento y desarrollo de las plantas: división y diferenciación celular, elongación de raíces, desarrollo floral, maduración del fruto, muerte celular programada, síntesis de ADN, transcripción de genes, traducción de proteínas y organización de la

## Capítulo 1

cromatina (Kusano et al., 2008; Tavladoraki et al., 2012). Además, están implicadas en la respuesta frente a los estreses ambientales, como sequía (Nayyar et al., 2005; Yang et al., 2007), salinidad (Duan et al., 2008), bajas temperaturas (Imai et al., 2004) y toxicidad por metales pesados (Shevyakova et al., 2011), así como estreses bióticos (Walters, 2000).

Las PAs vegetales más comunes en plantas son la diamina putrescina (Put) así como la 1,3- diaminopropano (DAP) o la cadaverina (Cad), la triamina espermidina (Spd) y las tetraaminas espermina (Spm) y termoespermina. En la naturaleza existen otras PAs denominadas poco comunes que presentan una distribución limitada, donde se encuentran derivadas de la Spd o Spm como la homoespermidina (HSpd) o la noespermidina (NSpd) (Figura 1.2) (Sagor et al., 2013; Terui et al., 2005). De forma general, la PA más abundante


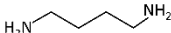

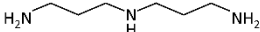
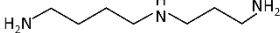
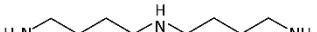

DIAMINAS		
1, 3-Diaminopropano (DAP)		$C_3H_{10}N_2$ (PM= 74.13 g/mol)
Putrescina (PUT)		$C_4H_{12}N_2$ (PM= 88.15 g/mol)
Cadaverina (CAD)		$C_5H_{14}N_2$ (PM= 102.18 g/mol)
TRIAMINAS		
Noespermidina (NSPD)		$C_6H_{17}N_3$ (PM= 131.22 g/mol)
Espermidina (SPD)		$C_7H_{19}N_3$ (PM= 145.25 g/mol)
Homoespermidina (HSPD)		$C_8H_{21}N_3$ (PM= 159.28 g/mol)
TETRAAMINAS		
Espermina (SPM)		$C_{26}H_{19}N_4$ (PM= 202.34 g/mol)

Figura 1.2. Estructura química de las poliaminas determinadas en este estudio.



en plantas es la Put, aunque en leguminosas la Cad se presenta en altas concentraciones (Tomar et al., 2013). La concentración de PAs varía dependiendo del órgano o tejido en estudio, así como de la especie vegetal y la etapa de desarrollo (Jiménez-Bremont et al., 2014). En la naturaleza las PAs pueden presentarse en forma de bases libres (PAs-L), conjugadas con pequeñas moléculas (PAs-C) o unidas a macromoléculas (PAs-U) (Gholami et al., 2013).

### 1.2.1. Biosíntesis PAs

En plantas, la Put es el producto central de la ruta biosintética de PAs (figura 1.3), mediante dos vías principalmente, cuyos precursores son la arginina o la ornitina. La denominada vía indirecta comienza con la descarboxilación de Arg, mediante la enzima arginina descarboxilasa, originando el intermediario agmatina y CO<sub>2</sub>. La degradación de la agmatina vía agmatina iminohidrolasa produce N-carbamilputrescina y NH<sub>3</sub>, que será metabolizado por la carbamilputrescina amidohidrolasa con la formación de Put, CO<sub>2</sub> y NH<sub>3</sub>. Esta es la considerada como principal vía de síntesis de Put en plantas (Docimo et al., 2012).

La vía directa se produce por la descomposición de la ornitina, gracias a la enzima ornitina descarboxilasa, dando como resultado la Put y CO<sub>2</sub>. La pérdida del gen de la ornitina descarboxilasa en *A. thaliana* y especies de la familia Brassicaceae, indica que esta vía no es esencial para el normal crecimiento de las plantas (Hanfrey et al., 2001). La utilización de una vía u otra depende del órgano y estado de desarrollo del vegetal (Hao, 2005).

En leguminosas, la biosíntesis de Cad se lleva a cabo por la descarboxilación de la lisina, mediante la lisina descarboxilasa (Regla-Márquez et al., 2016; Shevyakova, et al., 2004).

## Capítulo 1

Otro precursor importante para la síntesis del resto de PAs es la metionina. De este componente deriva la S-adenosilmetionina (SAM), que a través de la SAM descarboxilasa pasa a S-adenosilmetionina descarboxilada (dcSAM). La dcSAM será el donador de grupos aminopropilos para la formación de Spd y Spm. La aminopropilación de la Put por la enzima espermidina sintetasa (SPDS) forma Spd. De manera consecutiva, la adición de otro grupo aminopropilo mediante la espermina sintasa (SPMS) origina la PA espermina. No se conoce ninguna otra reacción donde la dcSAM pueda

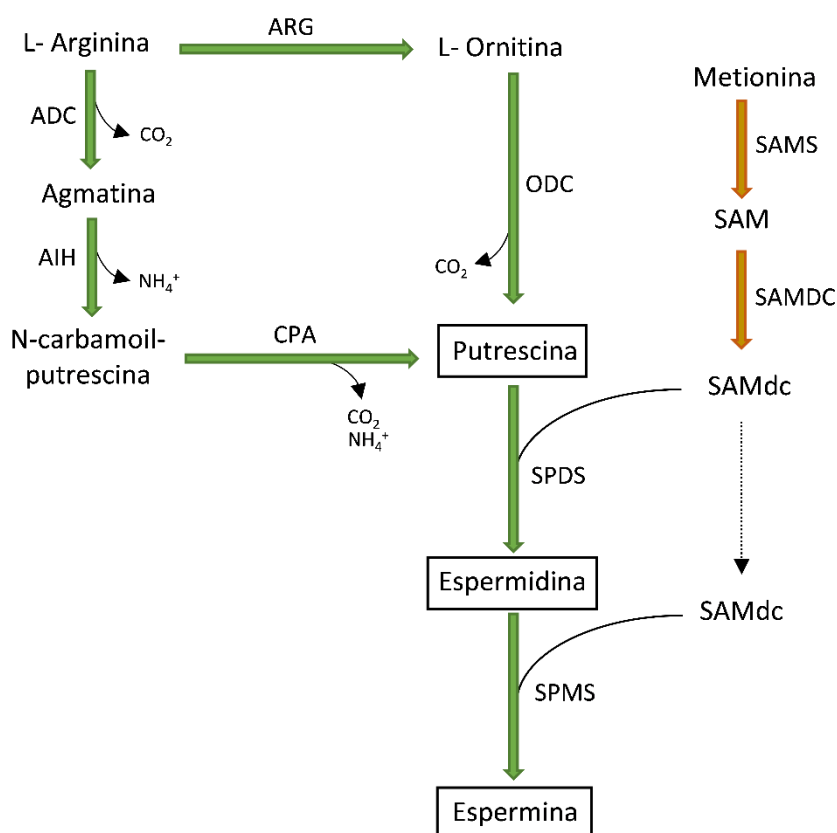


Figura 1.3: Ruta biosintética de las principales PAs en plantas. Abreviaturas: ARG, arginasa; ADC, arginina descaboxilasa; AIH, arginina iminohidrolasa; CPA, carbamoil-putrescina amidohidrolasa; ODC, ornitina descaboxilasa; SAMS, S-adenosilmetionina sintasa; SAM, S-adenosilmetionina; SAMDC, S-adenosilmetionina descaboxilasa; SAMdc, S-adenosilmetionina descaboxilada; SPDS, espermidina sintasa; SPMS, espermina sintasa.

actuar, estando su producción regulada y sus niveles se mantienen bajos, por lo que constituye un factor limitante para la síntesis de Spd y Spm (Pegg y McCann, 1982).

En nódulos de leguminosas, la biosíntesis de HSpd se lleva a cabo en bacteroides a partir de dos moléculas de Put, gracias a la enzima HSpd sintasa y se requieren concentraciones altas de glutamato e iones  $Mg^{2+}$  (Fujihara, 2009).

### 1.2.2. Catabolismo de PAs

La concentración celular de PAs está directamente regulada por su catabolismo. Esto ocurre mediante dos clases de enzimas, las diamino oxidasas que contienen cobre (DAO) y las poliamino oxidasas (PAO).

Las DAO catalizan la oxidación de Put y Cad en sus grupos amino primarios, con la producción de 4-aminobutanal,  $H_2O_2$  y  $NH_3$  (Alcázar et al., 2010). De forma espontánea el 4-aminobutanal se transforma en  $\Delta^1$ -pirrolina y finalmente en GABA, que será transaminado y oxidado a ácido succínico incorporándose al ciclo de Krebs (reutilización del C y N) (Xing et al., 2007). Las proteínas vegetales CuDAO están presentes en alto nivel especialmente en especies de leguminosas, localizándose en el espacio extracelular ligadas a la pared (Cona et al., 2006).

Las PAO son proteínas con alta afinidad por PAs superiores, Spd y/o Spm y sus derivados. Las PAO llevan a cabo el catabolismo terminal de Spd y Spm utilizando  $O_2$  como donador de electrones. Esta reacción produce DAP,  $H_2O_2$  y 4-aminobutanal o N- (3-aminopropil) -4-aminobutanal, dependiendo de si la degradación es Spd o Spm, respectivamente (Cona et al., 2006; Moschou et al., 2012). El DAP puede convertirse en  $\beta$ -alanina, o actuar como precursor primario para la biosíntesis de PAs poco comunes como la NSpd gracias a la NSpd sintasa, involucrando a la dcSAM como donador de grupos aminopropilos.



## 2. OBJETIVO

Una estrategia para mejorar la tolerancia de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa bajo condiciones de déficit hídrico es la utilización de cepas de rizobios con alta capacidad respiratoria. Talbi et al. (2012) demostraron que la inoculación de plantas de judía con la cepa CFNX713 de *R. etli* presentaba una mayor tolerancia de la simbiosis a este estrés, mejorando la FBN del sistema. En este capítulo ampliamos ese trabajo añadiendo una etapa de rehidratación de las plantas tras un periodo de privación del riego.

El objetivo del estudio es analizar la posible implicación de compuestos osmoprotectores como las poliaminas, así como de los osmolitos nodulares que puedan tener implicación en la regulación de la FBN en condiciones de estrés hídrico y posterior recuperación de las plantas en la simbiosis entre *P. vulgaris* y *R. etli* CFNX713.



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Material biológico

##### 3.1.1. Material vegetal

Para la realización de este trabajo se usó *P. vulgaris* variedad Negro Jamapa, debido a su importancia comercial y a su compatibilidad con las cepas bacterianas utilizadas. Las semillas fueron facilitadas por la Prof. M<sup>ª</sup> Lourdes Guirad del Centro de Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de México (Cuernavaca, México).

##### 3.1.2. Material microbiológico

Las plántulas fueron inoculadas con dos cepas de *Rhizobium etli*, la cepa CFN42 (wt o silvestre) y la cepa sobreexpresante CFNX713 (*cbb<sub>3</sub><sup>+</sup>*) procedentes del Centro de Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de México (Cuernavaca, México).

#### 3.2. Cultivo de plantas

##### 3.2.1. Germinación de las semillas e inoculación

Las semillas fueron desinfectadas con hipoclorito sódico al 5% durante 3 minutos y alcohol al 96% (v/v) y lavadas con agua destilada estéril. La germinación se llevó a cabo en bandejas con perlita y vermiculita estériles (1:1), hidratadas con agua destilada, en cámara de germinación a 28°C durante 4 días. Tras este tiempo se seleccionan las semillas que presentan una radícula con el tamaño adecuado para su trasplante a macetas de 0.6 L de capacidad, usándose como sustrato una mezcla de perlita y vermiculita (2:1), previamente humedecida y autoclavada. En el momento del trasplante, las plántulas fueron inoculadas con 1 mL de su correspondiente microsimbionte, proceso que se repitió a los tres días de cultivo.

## Capítulo 1

Se estableció un régimen de dos días de riego por semana alternando solución nutritiva (según Rigaud y Puppo (1975) modificada para judía) carente de nitrógeno para no inhibir la nodulación, a un pH de 6.8 (corregido con NaOH 4N), y agua destilada.

### **Solución nutritiva (modificado de Rigaud-Puppo, 1975)**

<u>Macronutrientes</u>		<u>Micronutrientes</u>	
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.174 g	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.11 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.200 g	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.85 mg
CaCl <sub>2</sub>	0.134 g	CuSO <sub>4</sub>	0.20 mg
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.044 g	ZnSO <sub>4</sub>	0.55 mg
MgSO <sub>4</sub>	0.123 g	MnSO <sub>4</sub>	3.07 mg
Secuestrene (Fe)	0.025 g	CoCl <sub>2</sub>	0.12 mg

Ajustado a 1000 mL con agua destilada.

### 3.2.2. Preparación del inóculo

Las diferentes cepas bacterianas se cultivaron durante 96 h a 28°C en medio sólido TY agar (Tryptone-Yeast extract) (Beringer, 1974). Posteriormente, para obtener el inóculo se dejaron crecer en matraz con medio TY líquido y en agitación (120 rpm) durante 3 días a 28°C, hasta obtener una densidad de 10<sup>9</sup> células viables por mililitro de medio TY según la escala de McFarland (McFarland, 1907). El medio de cultivo para la cepa wt fue adicionado con ácido nalidíxico (Nal) a concentración 20 µg mL<sup>-1</sup>, y para el cultivo de la cepa cbb<sub>3</sub><sup>+</sup> se añadió la misma cantidad de Nal más kanamicina (Kan) a una concentración de 30 µg mL<sup>-1</sup>.



El medio de cultivo TY empleado en la preparación de los inóculos, conservación y crecimiento de esta cepa presenta la siguiente composición:

- Triptona 5 g
- Extracto de levadura 3 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.9 g
- Agar (si medio sólido) 15 g

Ajustado a 1000 mL con agua destilada

El pH del medio se ajustó hasta un valor de 7 con la adición de NaOH y la esterilización se llevó a cabo en autoclave a 120°C durante 30 minutos.

### 3.2.3. Condiciones de la cámara de cultivo

Las plantas fueron crecidas en cámara de cultivo bajo condiciones controladas de fotoperiodo (16 h luz/ 8 h oscuridad), temperatura (24°C día/ 18°C noche) y humedad relativa (60% día /70% noche). Las macetas se distribuyeron aleatoriamente, cambiando su ubicación de manera regular.

## 3.3. Planificación del experimento

### 3.3.1. Diseño experimental

Para la realización del experimento, fueron plantadas un total de 106 plántulas. La mitad de ellas se inocularon con la cepa wt y la otra mitad con la cepa  $\text{cbb}_3^+$ .

El diseño experimental consta de los siguientes tratamientos: control, estrés por privación del riego (sequía) y rehidratación tras la sequía (recuperación). Las plantas control fueron regadas normalmente durante todo el experimento. Las plantas del tratamiento sequía fueron regadas al inicio del experimento (día 0) por última vez, y cosechadas, junto a sus respectivos controles, a 3, 5 y 7 días tras la imposición del tratamiento. El proceso de recuperación se llevó a cabo por la rehidratación de plantas

sometidas a sequía durante 7 días a las que se les añadió agua durante dos días antes de su recolección.

### 3.4. Metodología empleada

#### 3.4.1. Obtención de datos de crecimiento

El peso fresco (PF) de las diferentes partes de la planta, nódulos (PFN) parte aérea (PFPA) y raíz (PFR), se obtuvo por pesada en balanza de precisión. Posteriormente se adquirieron los datos de peso seco (PS) de los diferentes órganos por deshidratación de éstos en estufa de corriente forzada de aire a 70°C durante 2 días.

#### 3.4.2. Fijación de nitrógeno

La determinación de la FBN se realizó mediante la técnica de análisis de intercambio de gases, según Witty & Minchin (1998), consistente en la medida de la evolución de H<sub>2</sub> que se produce junto con la reducción de N<sub>2</sub> a NH<sub>3</sub>, de acuerdo con la reacción:



Mediante este método determinamos la actividad nitrogenasa aparente (ANA), a partir de la producción de H<sub>2</sub>, liberado como producto en plantas noduladas con rizobios *hup*<sup>-</sup>, carentes de la enzima hidrogenasa.

Con el fin de ocasionar una mínima perturbación de la planta, para la medida de FBN el sistema radical es sellado de forma hermética. Tras ello se hace circular una mezcla de gases compuesta de 79% de N<sub>2</sub>, 21% O<sub>2</sub> y con 600 µmoles/mol de CO<sub>2</sub> (Praxair, Madrid, España), cuantificándose el H<sub>2</sub> producido mediante un detector amperométrico (Qubit System Inc., Ontario, Canadá) acoplado al sistema.

### 3.4.3. Conductancia estomática

La medida de la conductancia estomática se llevó a cabo usando un porómetro Delta T AP4 (Delta T Devices Ltd., Cambridge, UK). Se tomaron tres medidas por planta, una en cada foliolo de la hoja más joven totalmente expandida.

### 3.4.4. Determinación de la transpiración

El agua transpirada por las plantas se determinó gravimétricamente mediante diferencia de pesada del sistema maceta-planta antes y después de cada tiempo de exposición a los tratamientos, y partiendo de las plantas a capacidad de campo. Debido a que las macetas empleadas presentan una tapa que evita la pérdida de agua por parte del sustrato, asumimos que la diferencia entre el peso inicial y final corresponde únicamente al agua transpirada por la planta.

### 3.4.5. Determinación del potencial hídrico

El potencial hídrico foliar se determinó en la hoja más joven totalmente expandida utilizando una cámara de presión (Scholander et al., 1965) de Soil Moisture Equipment (Santa Bárbara, CA, EEUU). La presión del interior de la cámara fue medida gracias a un manómetro acoplado al equipo, el cual indica el potencial hídrico del agua de la hoja.

El potencial hídrico nodular y radical fue determinado mediante un microvoltímetro (MOD. HR-33T; Wescor Inc., Logan, UT, EE. UU) conectado a 10 cámaras (Mod. C-52 Wescor Inc.). La medida se llevó a cabo introduciendo una muestra de tejido (20 mg) en cada cámara, y tras la estabilización de la humedad, se toma la lectura del voltaje ( $\mu\text{V}$ ) al que es alcanzado el punto de rocío. Gracias a la utilización de rectas patrón específicas para cada cámara, dicho valor obtenido es traducido a unidades de potencial hídrico (MPa).

### 3.4.6. Determinación del contenido hídrico relativo

También se determinó el estado hídrico de los nódulos mediante su contenido hídrico relativo, según Purcell y Sinclair (1995), usando la ecuación:

$$\text{CHR (\%)} = \frac{\text{PFN-PSN}}{\text{PTN-PSN}} \times 100$$

Dónde: PFN= Peso fresco de nódulos; PSN= Peso seco de nódulos; PTN= Peso turgente de nódulos.

El peso turgente fue obtenido por inmersión de la muestra en agua desionizada durante 24 h, 4°C y oscuridad, hasta su máxima turgencia. Transcurrido dicho tiempo, se eliminó el exceso de agua y se anotó el peso de los nódulos totalmente hidratados. Como dato de peso fresco y seco de nódulos se tomaron los obtenidos según el apartado 3.4.1.

### 3.4.7. Determinación de pigmentos fotosintéticos

Para la determinación de los pigmentos fotosintéticos se procedió según Tully et al. (1979), usando como mezcla extractiva etanol-cloroformo-agua (ECA) en proporciones 12:5:1. En mortero a 4°C se maceraron 0.2 g de hojas frescas, utilizando 4 mL de ECA. El homogeneizado fue centrifugado a 3500 g durante 10 min. Al sobrenadante se le añadió 1.5 mL de agua destilada y 2 mL de cloroformo, y fue agitado vigorosamente. Se dejó reposar a 4°C y oscuridad hasta la formación de dos fases, una traslúcida y otra verde, la cual se utilizó para el análisis de los pigmentos fotosintéticos.

El extracto fue mezclado con metanol en proporción 1:1 (v/v). Se realizaron una serie de medidas espectrofotométricas a diferentes longitudes de onda (653 nm, 666 nm y 470 nm), utilizando metanol como blanco. La clorofila a ( $C_a$ ), clorofila b ( $C_b$ ) y carotenoides (xantofilas + carotenos,  $C_{x+c}$ ), se determinaron según Lichtenthaler (1987). Los resultados se expresaron en  $\mu\text{g}$

$g^{-1}$  PSPA, calculándose en base a las ecuaciones siguientes:

$$C_a = 15.65 \times A_{666} - 7.34 \times A_{653}$$

$$C_b = 27.05 \times A_{653} - 11.21 \times A_{666}$$

$$C_{x+c} = (1000 \times A_{470} - 2.86 C_a - 104 \times C_b) / 221$$

### 3.4.8. Determinación de carbohidratos y polioles

La extracción de carbohidratos y polioles solubles se realizó según el método descrito por Warren y Adams (2000). Para ello, se homogeneizaron en un tubo eppendorf 0.1 g de material vegetal con 1.5 mL de etanol al 80% (v/v) y se llevaron a ebullición en una placa calefactora durante 30 segundos. Tras ello la mezcla fue centrifugada durante 5 min a 7500 g y 4° C recogiendo el sobrenadante en un tubo de cristal. El pellet se resuspendió en 1.5 mL de etanol al 80% (v/v), repitiéndose el proceso anterior dos veces más, siendo los sobrenadantes recogidos en el mismo tubo. El pellet resultante de la tercera repetición se homogenizó con 1.5 mL de etanol al 80% (v/v). Sin calentar, se centrifugó y recuperó el sobrenadante.

El volumen total de extracto etanólico recogido (6 mL) fue llevado a un evaporador (Turbo Vap LV) a 40° C con aire comprimido a una presión de 1.2 bar para ser totalmente evaporado. La muestra seca obtenida se resuspendió en 2 mL de agua desionizada, fue sonicada durante 10 min en un sonicador de baño (Hultrason-H) y centrifugada a 2300 g y 4° C durante 10 min. El sobrenadante resultante del centrifugado se conservó a -20° C hasta el momento de la determinación de la concentración de carbohidratos y polioles solubles.

La cuantificación se llevó a cabo en un equipo de cromatografía de intercambio iónico (940 Professional IC Vario 2, Metrohm), usando las

columnas Metrosep Carb 2 Guard/4.0 y Metrosep Carb 2 - 150/4.0. El flujo fue de 1 mL/min a una temperatura de 30°C y un gradiente usando como eluyentes 300 mM NaOH y 1mM C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>.

### 3.4.9. Determinación de ácidos orgánicos y aniones

La extracción de aniones y ácidos orgánicos se llevó a cabo según Fernández-Fernández et al. (2010), utilizando 0.1 g de material vegetal. Éste fue homogeneizado en mortero a 4°C con 700 µL de una mezcla de metanol/cloroformo/agua (MCW) 5:2:1 (v/v/v). El homogeneizado se agitó durante 10 s e incubó en hielo durante 10 min. Tras ello se centrifugó 15 min a 14000 g y 4°C. El sobrenadante fue recogido en un tubo de vidrio. El pellet se redisolvió en 300 µL de MCW, repitiendo el proceso anterior dos veces más, y recolectando los sobrenadantes en el mismo tubo. El conjunto de sobrenadantes fue secado en TurboVap y redisolto en 1 mL de agua MiliQ para proceder a su análisis.

La cuantificación se llevó a cabo en un equipo de cromatografía de intercambio iónico (940 Professional IC Vario 2, Metrohm), usando una columna metrosep A Supp16 150/4.0, Metrohm. El flujo fue de 1 mL/min a una temperatura de 55°C y un gradiente usando como eluyentes agua y 20 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 2.5 mM NaOH.

### 3.4.10. Determinación de aminoácidos

Para la determinación del contenido de aminoácidos libres en nódulos y hojas se utilizaron los extractos obtenidos para la determinación de ácidos orgánicos (ver apartado 3.4.9).

La concentración de los diferentes aminoácidos se determinó tras la derivatización de los mismos utilizando un sistema de electroforesis capilar MDQ Plus (Ab Sciex, España) acoplado a un detector de fluorescencia

inducida por láser a 488 nm, según el método descrito por Gil-Quintana et al. (2013). Los análisis se realizaron a 20°C y a un voltaje de 30 kV.

#### 3.4.11. Determinación de poliaminas

La separación y cuantificación de PAs solubles libres y conjugadas se realizó siguiendo un método basado en los protocolos de Flores & Galston (1982) y Slocum et al. (1989) con pequeñas modificaciones. Los extractos para la determinación de PAs solubles libres en hoja y nódulo se realizaron macerando 0.2 g de tejido vegetal en 600 µL de ácido perclórico al 5% (v/v), e incubando en oscuridad durante 1 h a 4°C. Pasado este tiempo los extractos se centrifugaron durante 5 min a 3000 g. Una vez recogido el sobrenadante se añadieron 10 µl del estándar interno (diaminohexano 1 mM), y 300 µL de NaOH 2 M para alcalinizar el extracto. Se añadieron 10 µL de cloruro de benzoilo ( $C_7H_5ClO$ ) líquido y fueron incubados durante 30 min a temperatura ambiente y agitación (800 rpm). Tras ello, se agregaron 800 µL de NaCl saturado y 600 µL de cloroformo frío para separar la fase orgánica, que será evaporada. La muestra seca fue resuspendida en 500 µL de agua/metanol (1:1), incubándose durante 5 h a 35°C y agitación (450 rpm). Se volvió a añadir 300 µL de NaOH 2 M y 600 µL de cloroformo, y se evaporó. El resultado fue resuspendido en 100 µL de agua/metanol para su análisis mediante HPLC.

La medida de PAs solubles conjugadas se realizó por obtención de la fracción soluble total de PAs, mediante hidrólisis ácida, previa a la benzoilación. Para ello, se mezclaron en ampollas de vidrio el mismo volumen del extracto obtenido de PAs libres con HCl 12 N. La mezcla fue incubada toda la noche a 130°C y el resultado se centrifugó con el fin de eliminar el material carbonizado, y el sobrenadante fue evaporado. Seguidamente se benzoiló de la misma forma que la fracción de PAs-L y fue analizado mediante HPLC. Para obtener el dato de PAs-C, fue restado el valor de las PAs-L.

Con el fin de extraer las PAs-U el pellet resultante de la extracción de PAs solubles fue disuelto en 2 ml de NaOH 1 N. La mezcla se centrifugó a 21.000 g durante 30 min. Mediante hidrólisis ácida y benzoilación del sobrenadante resultante fueron obtenidas las PAs-U, según las condiciones mencionadas anteriormente.

La cuantificación de PAs solubles se llevó a cabo mediante un equipo HPLC Waters Alliance 2690, con una columna C18 de fase reversa y un detector UV/VIS a longitud de onda de excitación de 225 nm, y un gradiente de metanol: agua (v/v). Para la cuantificación se utilizó una curva patrón preparada para cada una de las PAs a determinar, teniendo en cuenta el valor del estándar interno.

### 3.4.12. Determinación de S-adenosilmetionina

LA SAM fue determinada según el método descrito por Van de Poel et al. (2010), con pequeñas modificaciones. Para ello, 0.1 g de material biológico fue macerado con ácido tricloroacético al 5% (p/v) durante 10 min (Hanfrey et al., 2002) en mortero a 4°C para evitar la degradación de la SAM. La mezcla se centrifugó a 10.000 g durante 15 min 4°C para eliminar restos celulares. El sobrenadante obtenido se volvió a centrifugar a 13.000 g 15 min a 4°C y filtrado con filtro de jeringa de 45 µm de poro.

La cuantificación se llevó a cabo mediante electroforesis capilar de alta resolución en un equipo Beckman PACE MDQ (Beckman Instruments, Fulerton, CA, EEUU) usando un capilar de sílice fundido de 50 µm de diámetro interno, 375 µm de diámetro externo y 50/60.2 cm de longitud. Como tampones se utilizaron glicina 200 mM (Sigma- Aldrich) y fosfato sódico monobásico 50 mM (Sigma- Aldrich) ajustando el pH a 2.5. La detección se realizó a longitud de onda de 260 nm.



### 3.4.13. Análisis estadístico

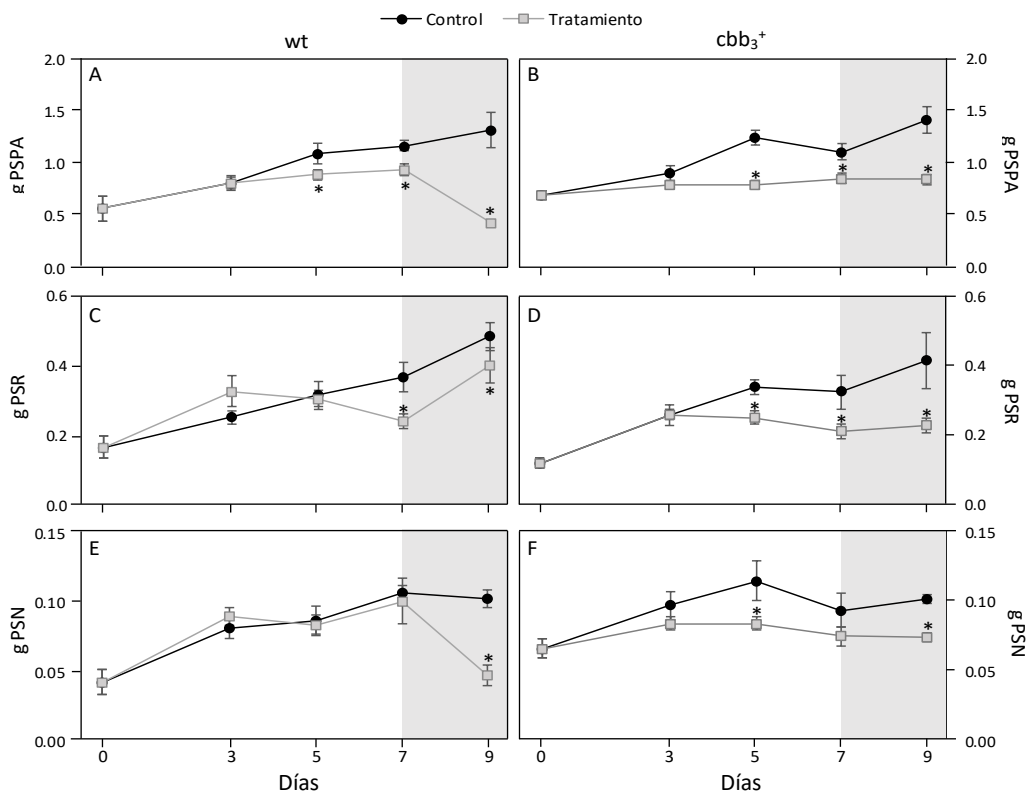
Los datos originales obtenidos se sometieron a un análisis estadístico, asistido por ordenador, con la ayuda del programa IBM SPSS Statistics 24.0, consistente en un análisis de la varianza univariante y un test de mínimas diferencias significativas (MDS) entre medias.



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Biomasa vegetal

El análisis de la biomasa de la planta se llevó a cabo mediante la determinación del peso seco de las diferentes fracciones vegetales, observándose en general una disminución del crecimiento por efecto de la sequía (Figura 1.4). El PSPA de ambos grupos de plantas sufrió un descenso significativo debido al cese de riego a partir del día 7 de tratamiento, disminuyendo un 70% al final del cultivo en las plantas inoculadas con la cepa wt, y un 40% en el caso de las inoculadas con la



cepa mutante.

El PSR muestra un comportamiento similar, disminuyendo significativamente a los 5 días de tratamiento en las plantas inoculadas con la cepa  $cbb_3^+$ , mientras que en las inoculadas con la cepa wt, decrece al séptimo día de imposición de sequía. La recuperación no muestra efecto en las mutantes, mientras que en la wt provoca un aumento de la biomasa no significativo.

La tendencia de la biomasa nodular es similar al resto de tejidos, mostrando diferencias significativas a día 9 de tratamiento, decreciendo un 50% en las plantas inoculadas con la cepa wt y sólo un 25% en las inoculadas con la cepa  $cbb_3^+$ .

#### **4.2. Fijación de nitrógeno**

En la figura 1.5 se muestra la actividad aparente de la nitrogenasa (ANA) como medida de la FBN. Respecto a los valores control, la tasa de fijación es mayor en plantas control inoculadas con la cepa wt que en las inoculadas por la cepa mutante. El estrés por sequía afecta de forma muy diferente a ambos grupos de plantas. Mientras que la reducción de la FBN se hace patente en las plantas inoculadas con la cepa wt a partir del quinto día de tratamiento, donde la FBN se ve reducida en un 50%, en las inoculadas con la cepa  $cbb_3^+$  se hace patente a día 7. El proceso de recuperación no tiene efecto positivo en las plantas inoculadas con la cepa wt, incrementándose la pérdida de capacidad fijadora casi al 80%, mientras que las inoculadas por la cepa mutante presentan tendencia a la recuperación de valores control al ser rehidratadas las plantas, viéndose reducida su FBN sólo un 35% respecto a su control.

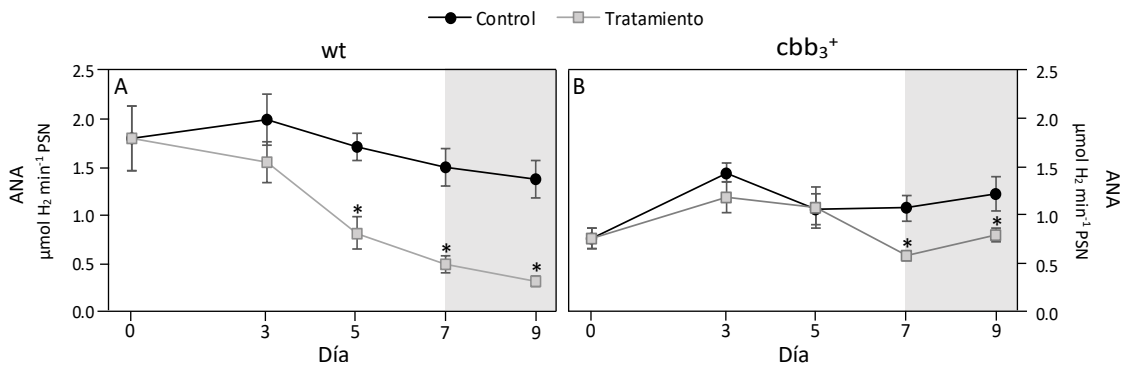


Figura 1.5: Efecto de los tratamientos de sequía/ recuperación (sombreado) sobre la FBN de nódulos de plantas de *P. vulgaris* inoculadas con *R. etli* wt (A) y *R. etli* *cbb3*<sup>+</sup>. Cada punto representa la media de 7 réplicas biológicas + EE. La existencia de diferencias significativas con respecto al control se denota con un asterisco ( $p \leq 0.05$ ).

### 4.3. Conductancia estomática

El estrés por sequía indujo el cierre estomático con el fin de evitar la pérdida de agua por transpiración, presentando valores cada vez más cercanos a cero. En la figura 1.6 se observa cómo este parámetro disminuye a partir del tercer día de privación del riego en ambos grupos de plantas con diferencias significativas respecto a su control. El proceso de rehidratación no conlleva una recuperación total de estos valores, pero sí una cierta tendencia, más patente en plantas inoculadas con la cepa mutante.

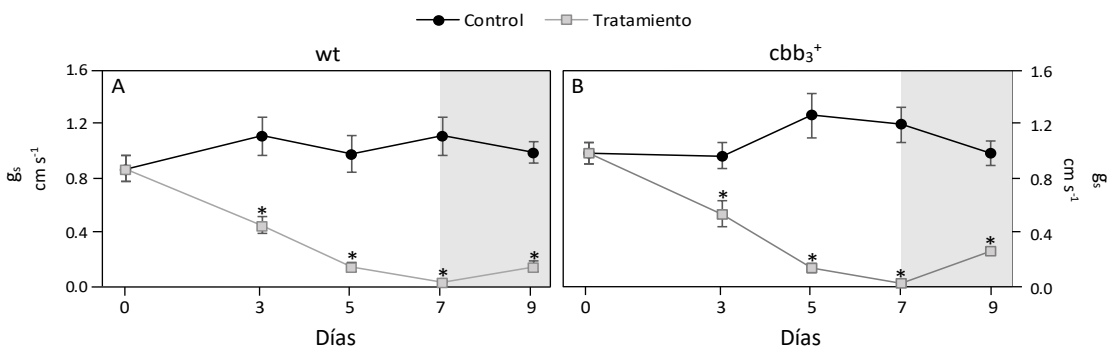


Figura 1.6: Valores de conductancia estomática de hojas de *P. vulgaris* inoculadas con *R. etli* wt (A) y *R. etli* *cbb3*<sup>+</sup> (B) sometidas a sequía y rehidratadas. Cada punto representa la media de 7 réplicas biológicas + EE. La existencia de diferencias significativas con respecto al control se denota con un asterisco ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4.4. Potencial hídrico

Los tratamientos de sequía hacen que los diferentes tejidos de las plantas vean reducido su potencial hídrico, tornando a valores más negativos.

En la figura 1.7 se observa como la falta de irrigación provoca la disminución del potencial hídrico de nódulos (A y B) y raíz (C y D), viéndose significativamente reducido a partir del tercer día de tratamiento y recuperando los valores control al rehidratar, en el caso de las plantas inoculadas con la cepa *cbb3*<sup>+</sup>. En el caso de la parte aérea es al séptimo día cuando el estrés hace más negativo el valor de potencial hídrico, el cual es

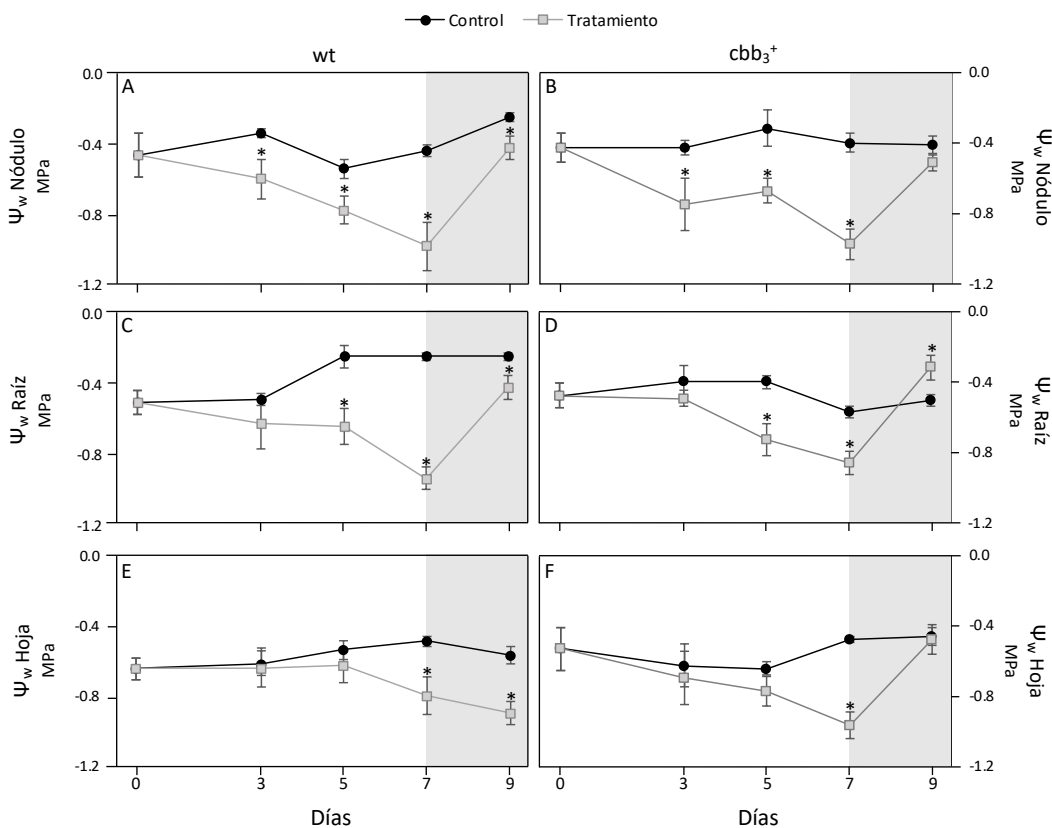


Figura 1.7: Efecto de los tratamientos de sequía/ recuperación sobre el potencial hídrico de nódulos (A y B), raíz (C y D) y hoja (E y F) de plantas de *P. vulgaris* inoculadas con *R. etli* wt y *R. etli* *cbb3*<sup>+</sup>. Cada punto representa la media de 7 réplicas biológicas  $\pm$  EE. La existencia de diferencias significativas con respecto al control se denota con un asterisco ( $p \leq 0.05$ ).

restituido a valores control en las plantas inoculadas con la cepa mutante.

En el grupo de plantas inoculadas con la cepa  $cbb_3^+$ , el proceso de rehidratación hace que se recuperen los valores control en todos los casos, no ocurriendo lo mismo con las plantas inoculadas con la cepa wt.

#### 4.5. Contenido hídrico relativo

El valor del contenido hídrico relativo (CHR) de nódulos nos da una idea del porcentaje de hidratación de estos. Tal como se observa en la figura 1.8 este valor comienza a disminuir desde el día 3 de tratamiento y recupera valores control con la rehidratación de la planta. En el grupo de las plantas inoculadas con la cepa silvestre, esta disminución se hace significativa a partir del quinto día de tratamiento, a diferencia del otro grupo, donde se hace patente a partir del tercer día sin riego. En los nódulos formados por la cepa mutante el contenido hídrico no es inferior al 60% en el caso más acusado (7 DT), mientras que en los originados por la wt este contenido disminuye más del 50% en el mismo punto temporal.

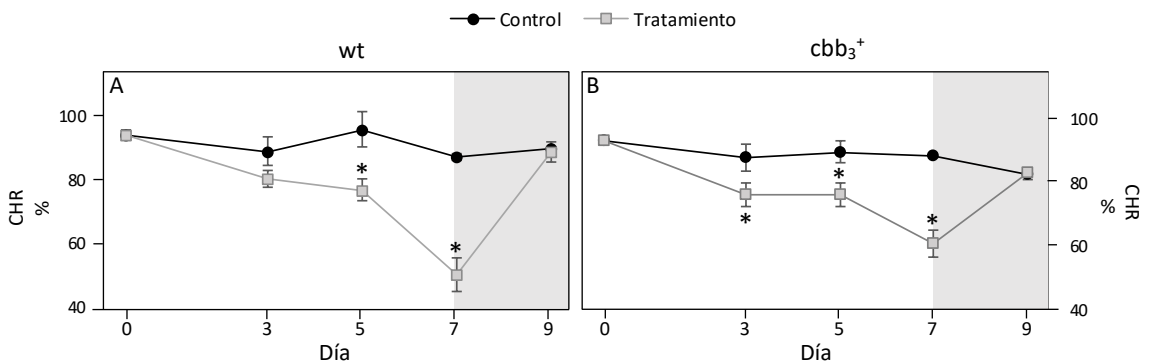


Figura 1.8: Efecto de la sequía y rehidratación sobre el contenido hídrico relativo de nódulos de plantas de *P. vulgaris* inoculadas con *R. etli* wt y *R. etli*  $cbb_3^+$ . Cada punto representa la media de 7 réplicas biológicas  $\pm$  EE. La existencia de diferencias significativas con respecto al control se denota con un asterisco ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4.6. Contenido de pigmentos fotosintéticos

La tabla 1.1 muestra la variación del contenido de pigmentos fotosintéticos a lo largo del experimento. En ambos grupos de plantas, la tendencia difiere. A los 3 días de tratamiento, las plantas inoculadas con la cepa wt ven incrementada la concentración de pigmentos, decreciendo a día 5 de cultivo en el caso de las clorofilas (a y b) y a día 7 en el caso de las xantofilas y carotenos. Estas plantas no recuperan los valores control con la subsiguiente rehidratación.

**Tabla 1.1.** Variación del contenido de clorofila a [ $C_a$  ( $\mu\text{g g}^{-1}$  PSPA)], clorofila b [ $C_b$  ( $\mu\text{g g}^{-1}$  PSPA)] y xantofilas más carotenos [ $X+c$  ( $\mu\text{g g}^{-1}$  PSPA)] en hojas de *P. vulgaris* inoculadas con *R. etli* wt (A) y *R. etli* cbb<sub>3</sub><sup>+</sup> sometidas a sequía y rehidratadas dos días antes de la cosecha. Cada punto representa la media de 7 réplicas biológicas  $\pm$  EE. La existencia de diferencias significativas con respecto al control se denota con un asterisco ( $p \leq 0.05$ ).

		$C_a$		$C_b$		$X+c$	
		C	S/R	C	S/R	C	S/R
wt	<b>T0</b>	2.58 $\pm$ 0.07		1.98 $\pm$ 0.09		121.32 $\pm$ 6.97	
	<b>3</b>	3.61 $\pm$ 0.06	5.89 $\pm$ 0.09*	1.77 $\pm$ 0.06	3.26 $\pm$ 0.36*	225.14 $\pm$ 7.09	416.32 $\pm$ 0.36*
	<b>5</b>	4.01 $\pm$ 0.23	5.00 $\pm$ 0.18	1.87 $\pm$ 0.05	1.55 $\pm$ 0.10	246.32 $\pm$ 20.42	357.02 $\pm$ 0.10*
	<b>7</b>	4.87 $\pm$ 0.14	4.39 $\pm$ 0.15	1.48 $\pm$ 0.06	1.59 $\pm$ 0.07	338.65 $\pm$ 10.84	322.79 $\pm$ 0.07
	<b>9</b>	4.84 $\pm$ 0.15	6.95 $\pm$ 0.16	1.71 $\pm$ 0.19	2.37 $\pm$ 0.17	328.19 $\pm$ 9.50	474.35 $\pm$ 0.17
cbb <sub>3</sub> <sup>+</sup>	<b>T0</b>	2.93 $\pm$ 0.08		2.24 $\pm$ 0.10		137.42 $\pm$ 7.89	
	<b>3</b>	4.36 $\pm$ 0.08	6.16 $\pm$ 0.10*	2.14 $\pm$ 0.07	3.42 $\pm$ 0.38*	271.79 $\pm$ 8.56	435.88 $\pm$ 9.78
	<b>5</b>	4.40 $\pm$ 0.25	5.24 $\pm$ 0.19*	2.05 $\pm$ 0.05	1.63 $\pm$ 0.10*	270.42 $\pm$ 22.42	374.67 $\pm$ 12.32
	<b>7</b>	5.29 $\pm$ 0.15	4.24 $\pm$ 0.14	1.60 $\pm$ 0.07	1.54 $\pm$ 0.06	367.42 $\pm$ 11.76	312.19 $\pm$ 8.18
	<b>9</b>	4.79 $\pm$ 0.15	5.86 $\pm$ 0.13*	1.69 $\pm$ 0.18	2.00 $\pm$ 0.14*	324.57 $\pm$ 9.40	399.66 $\pm$ 8.56*

En el caso de las plantas inoculadas con la cepa mutante, la exposición al estrés hace que aumente el contenido de clorofilas a y b en



los 5 primeros días de tratamiento, y se reestablezcan los valores control en el proceso de recuperación. El contenido en carotenoides no varía a lo largo del estudio en este grupo de plantas, viéndose incrementado su valor a día 9.

#### **4.7. Contenido de carbohidratos en nódulos y parte aérea**

Tal como se muestra en la figura 1.9, en las plantas inoculadas con la bacteria silvestre, se produce una inducción de la concentración de carbohidratos en las primeras etapas del estrés por sequía, disminuyendo a día 7, excepto en el caso de la trehalosa, que permanece aumentada hasta finalizar el estrés, momento en el que también disminuyen el resto de carbohidratos en estudio. Las plantas inoculadas con la cepa mutante muestran una tendencia diferente. Solo la trehalosa y fructosa sufren un aumento de su concentración debido al estrés por sequía a día 5 del tratamiento. El proceso de recuperación conlleva la restitución de los valores control en los casos de la trehalosa y fructosa, y muestran una disminución significativa en cuanto a las concentraciones de sacarosa y glucosa, presentándose estos dos carbohidratos en cantidad mucho mayor que en los nódulos formados por la cepa wt, tanto en situación de estrés como control.

De manera generalizada los nódulos formados por la cepa  $cbb_3^+$  presentan una mayor cantidad de carbohidratos en situación control y bajo el tratamiento de sequía- recuperación que los formados por la bacteria silvestre.

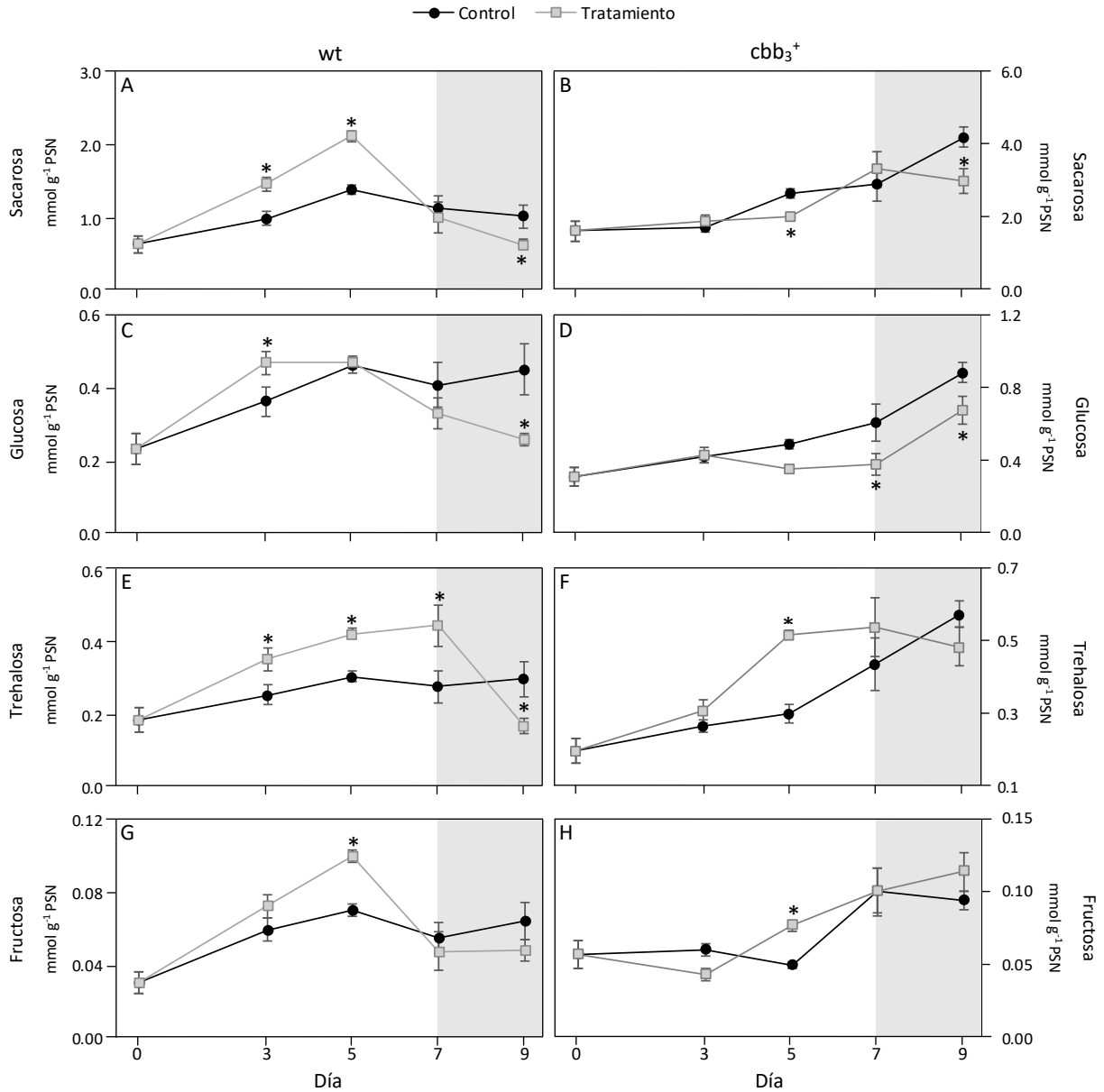


Figura 1.9: Variación del contenido de carbohidratos: sacarosa (A y B), glucosa (C y D), trehalosa (E y F) y fructosa (G y H) en nódulos de plantas de *P. vulgaris* inoculadas con *R. etli* wt y *R. etli* *cbb<sub>3</sub><sup>+</sup>* sometidas a sequía durante 7 días y rehidratadas dos días antes de la cosecha. Cada punto representa la media de 7 réplicas biológicas ± EE. La existencia de diferencias significativas con respecto al control se denota con un asterisco (p ≤ 0,05).

Los datos de la figura 1.10 muestran como la sequía provoca un incremento generalizado de los carbohidratos en estudio en hojas de

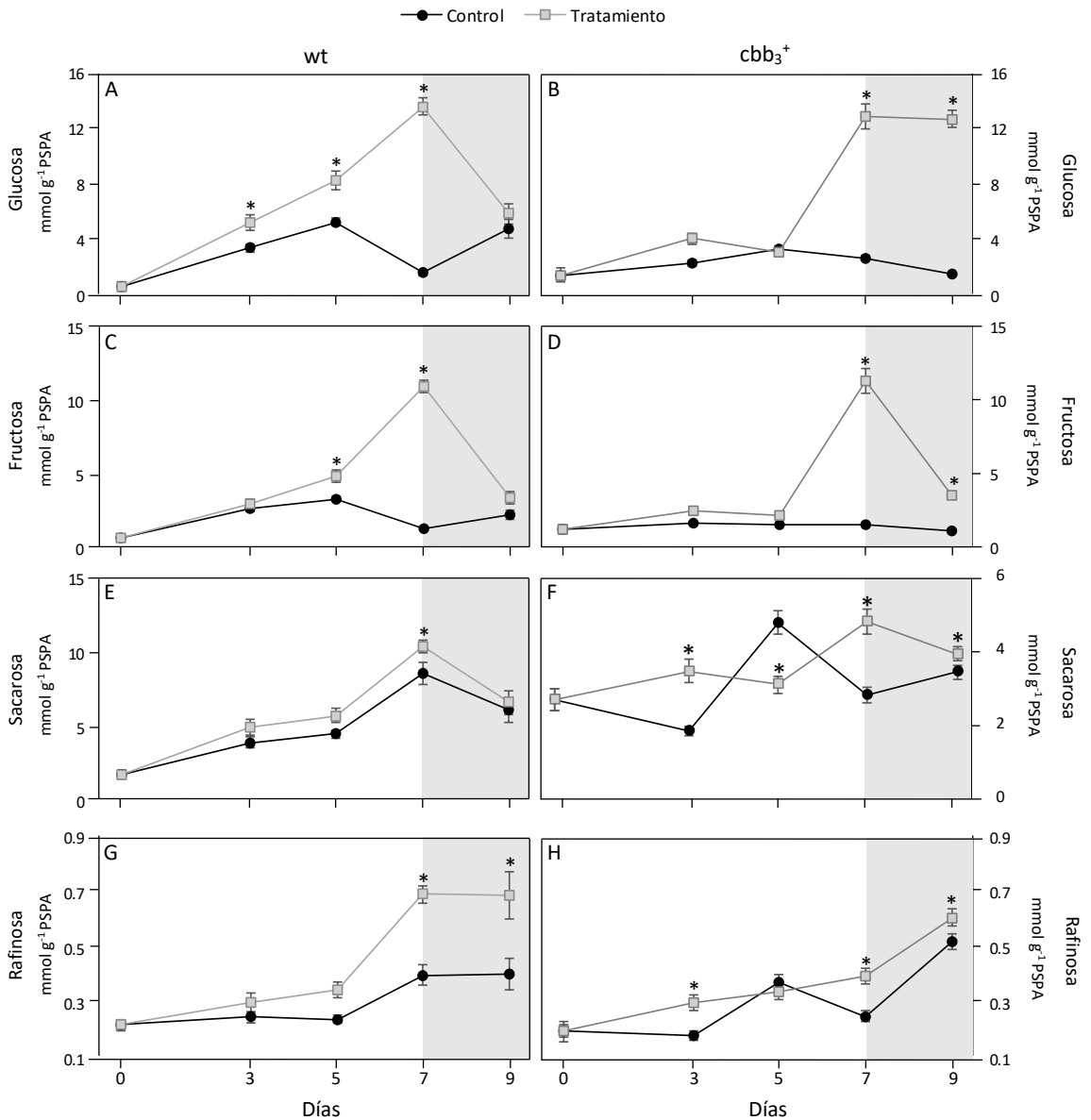


Figura 1.10: Efecto del tratamiento de la sequía y recuperación sobre el contenido de carbohidratos: glucosa (A y B), fructosa (C y D), sacarosa (E y F) y rafinosa (G y H) en hojas de plantas de *P. vulgaris* inoculadas con *R. etli* wt y *R. etli* *cbb3<sup>+</sup>*. Cada punto representa la media de 7 réplicas biológicas ± EE. La existencia de diferencias significativas con respecto al control se denota con un asterisco ( $p \leq 0.05$ ).

plantas inoculadas con la cepa wt, los cuales restituyen los valores control cuando las plantas son rehidratadas, a excepción de la rafinosa.

En el caso de la glucosa, se muestra un incremento significativo a partir del día 3 de tratamiento de sequía, que en el caso más severo (7DT) llega a superar al control un 700%. En las plantas inoculadas con la cepa mutante, este incremento significativo se da a día 7 de tratamiento, cuando el valor es de un 370% mayor que en las plantas control y permanece estable al rehidratar las plantas.

En ambos grupos de plantas la fructosa también se ve bruscamente aumentada a los 7 días de tratamiento, mostrando las plantas inoculadas con la bacteria wt una inducción anterior. El cese del estrés conlleva la recuperación de los valores control solo en plantas inoculadas con la cepa silvestre, presentándose aún aumentada en las plantas inoculadas con la cepa mutante (200% superior a su control).

El contenido en sacarosa y rafinosa de plantas inoculadas con la cepa wt muestran un comportamiento similar a la sequía, presentando valores incrementados significativamente a día 7 de tratamiento (20% y 70%, respectivamente). En el caso de plantas inoculadas con la bacteria mutante, sacarosa y rafinosa incrementan su concentración de forma significativa en los estadios de sequía leve (3DT) y sequía severa (7DT), presentando concentraciones mayores a su control al finalizar el estrés (9DT).

#### **4.8. Contenido en polioles en nódulos y parte aérea**

En la figura 1.11 se representa la concentración de polioles a lo largo del experimento. El pinitol duplica su concentración respecto al control a día 3 de tratamiento en las plantas inoculadas con la cepa wt,

disminuyendo un 45% a partir del día 5. La finalización del estrés no presenta un efecto positivo en este parámetro. En plantas inoculadas con la cepa mutante, no se induce la producción de este compuesto,

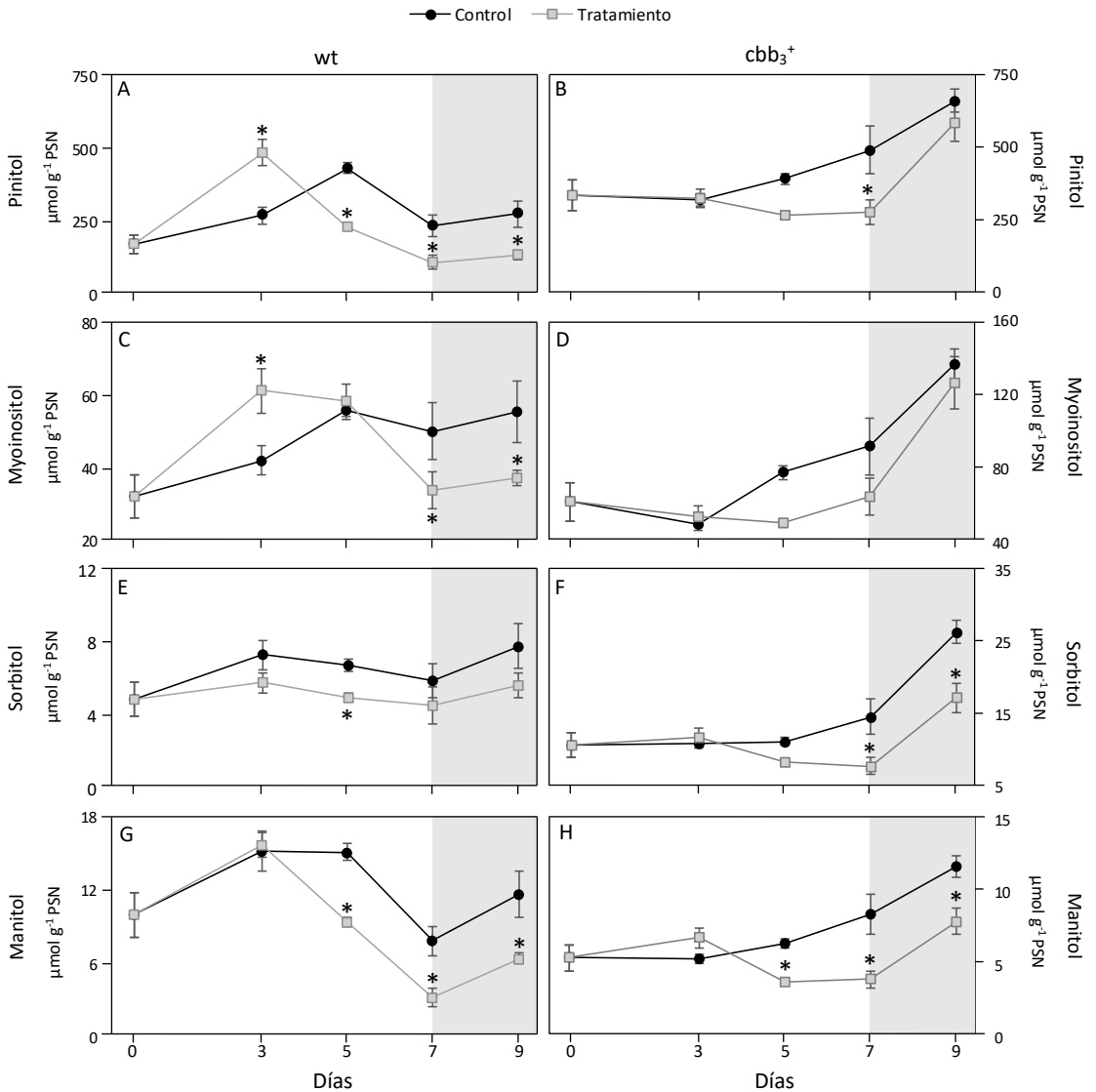


Figura 1.11: Efecto de la sequía y rehidratación sobre el contenido de polioles: pinitol (A y B), myoinositol (C y D), sorbitol (E y F) y manitol (G y H) de nódulos de plantas de *P. vulgaris* inoculadas con *R. etli* wt y *R. etli cbb3*<sup>+</sup>. Cada punto representa la media de 7 réplicas biológicas  $\pm$  EE. La existencia de diferencias significativas con respecto al control se denota con un asterisco ( $p \leq 0.05$ ).

## Capítulo 1

observándose una disminución del 30% cuando el estrés es severo (día 7) y recobrando valores control al rehidratar las plantas.

Las plantas inoculadas con la cepa wt presentan menor cantidad de myoinositol que las inoculadas con la cepa mutante en todos los tratamientos. Mientras que en estas últimas no varía a lo largo del experimento, en las inoculadas con la cepa wt sufre un aumento del 45% a día 3 del tratamiento de sequía y disminuye significativamente a día 7. El cese del estrés no conlleva con la restitución de los valores control en estas plantas.

Por el contrario, el sorbitol, disminuye con diferencias significativas a partir del día 7 de tratamiento en las plantas inoculadas por la cepa  $cbb_3^+$ , manteniéndose estos valores menores al rehidratar las plantas. Mientras que en las plantas inoculadas con la cepa silvestre esta disminución sólo es observada a día 5 de tratamiento de sequía.

El manitol sufre un descenso significativo en ambos grupos de plantas desde el día 5 de tratamiento, siendo más acusado en las plantas inoculadas con la bacteria mutante, donde la disminución llega a ser del 50% (7DT). El fin del estrés hace que esta diferencia se reduzca al 30% en este grupo de plantas, y al 15% en el caso de las plantas inoculadas con la cepa wt.

Las variaciones temporales de los polioles de hojas se presentan en la figura 1.12. Como podemos observar, el efecto de la sequía en plantas inoculadas con la bacteria wt hace que el myoinositol vea incrementado su valor en etapas tempranas del estrés (3DT) y en la etapa final (7DT), recuperando valores control cuando se rehidrataron las plantas. Este comportamiento es diferente en plantas que fueron

inoculadas con la cepa mutante, donde el incremento es significativo a día 7, duplicando el valor control, y en las que el proceso de recuperación no revierte el efecto de la sequía.

En el caso del pinitol, en ambos grupos de plantas se da un incremento que llega a ser significativo a día 7 de sequía (incremento del

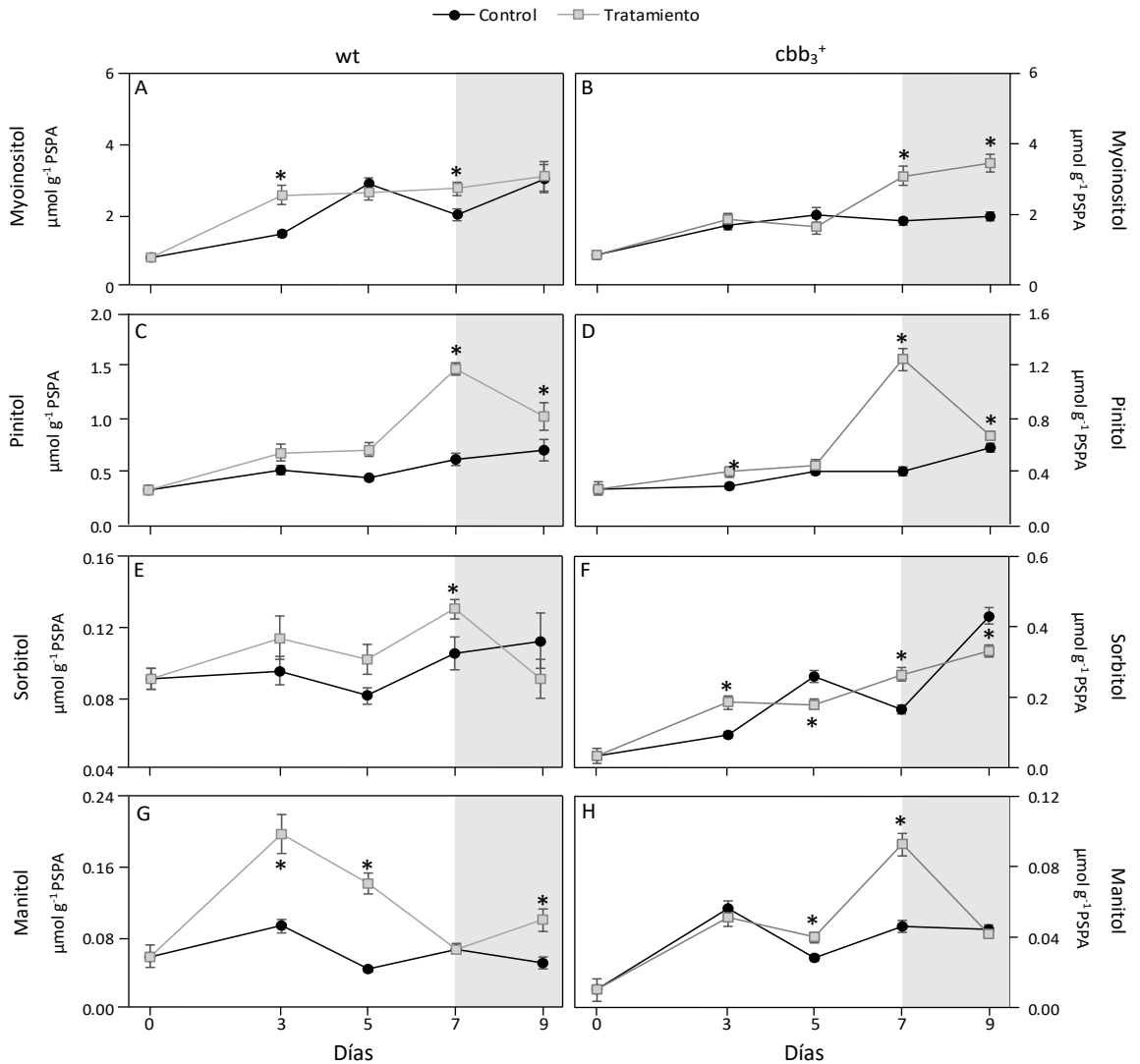


Figura 1.12: Efecto del tratamiento de sequía y recuperación sobre el contenido de polioles: myoinositol (A y B), pinitol (C y D), sorbitol (E y F) y manitol (G y H) en hojas de plantas de *P. vulgaris* inoculadas con *R. etli* wt y *R. etli* cbb<sub>3</sub><sup>+</sup>. Cada punto representa la media de 7 réplicas biológicas  $\pm$  EE. La existencia de diferencias significativas con respecto al control se denota con un asterisco ( $p \leq 0.05$ ).

135%), en el caso de las plantas cuyo inóculo fue la cepa wt, y a día 3 y 7 (incremento del 200%), si el inóculo fue la cepa cbb3+. En ambos casos se tiende a la disminución de la concentración de pinitol al cesar el estrés, aunque se mantienen significativamente mayores a sus correspondientes controles.

El sorbitol duplica su concentración en las plantas inoculadas con la cepa mutante con respecto a las plantas inoculadas con la cepa wt en todos los niveles. Mientras que en plantas inoculadas con la cepa silvestre sólo es significativamente superior a día 7 de tratamiento, en las plantas cuyo inóculo fue el rizobio cbb<sub>3</sub><sup>+</sup> fluctúa a lo largo del tiempo, viendo incrementado su valor a día 3 y 7 del tratamiento, y disminuyendo respecto a su control tras el cese del estrés.

En etapas tempranas de sequía (3 y 5DT), las plantas inoculadas con la cepa wt ven incrementado más de un 200% la concentración de manitol. En el grupo de plantas inoculadas con la cepa mutante, la concentración aumenta al quinto día en torno al 50%, y al 100% a día 7 de tratamiento de sequía, recuperando los valores control al rehidratar las plantas.

### **4.9. Contenido en ácidos orgánicos en nódulos**

En la figura 1.13 se muestra un descenso en la concentración de ácidos orgánicos mayoritarios de forma generalizada. Las plantas inoculadas con la cepa wt ven reducida de forma significativa la cantidad de todos los ácidos estudiados a partir del tercer día de tratamiento de sequía y la rehidratación de las plantas no muestra ningún efecto. En el caso de las plantas inoculadas con la cepa cbb<sub>3</sub><sup>+</sup>, la reducción de estos parámetros se retrasa hasta los 5- 7 días de tratamiento y el proceso de



recuperación conlleva un efecto positivo, recobrándose en la mayoría de los casos los valores control.

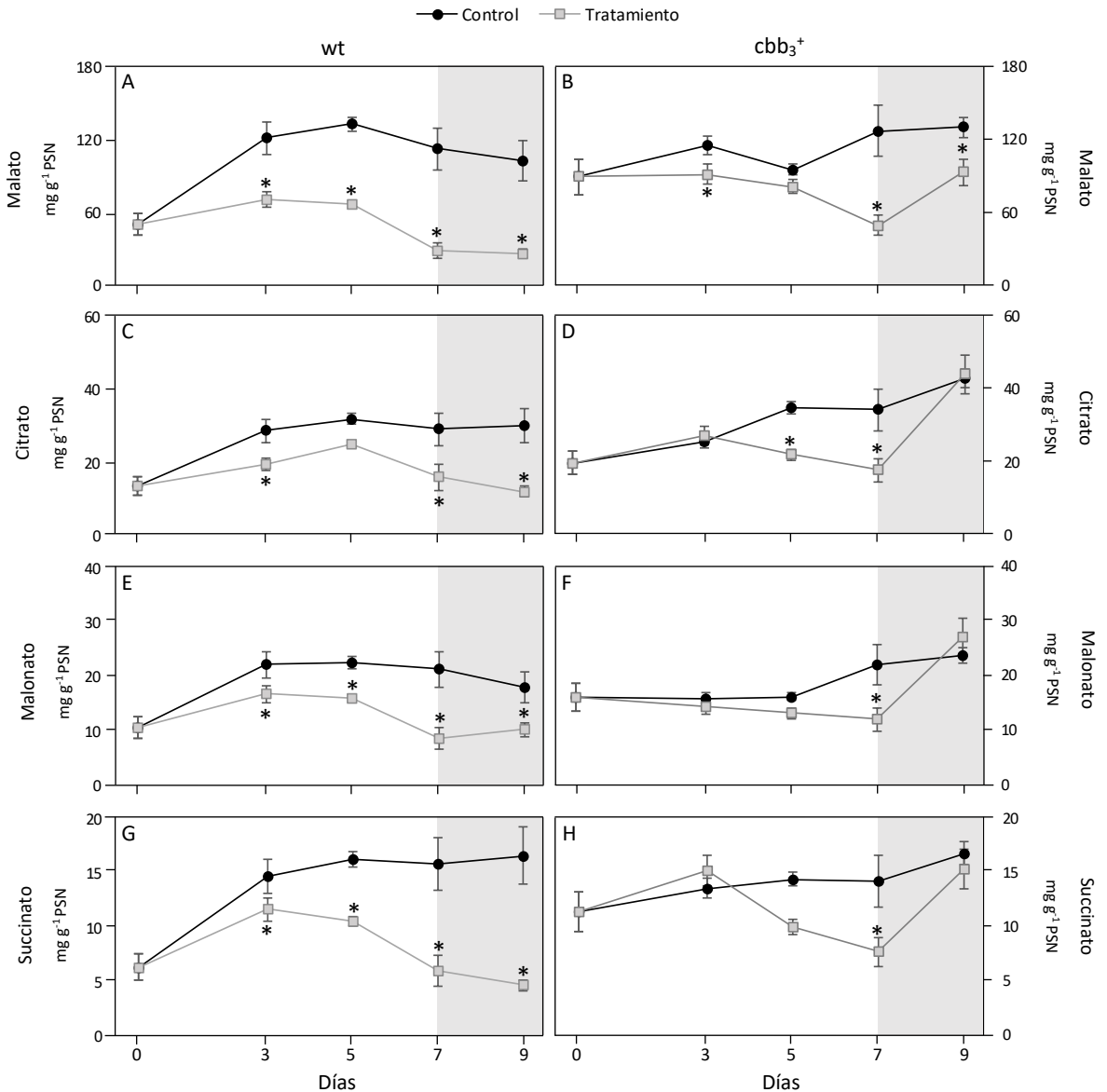


Figura 1.13: Efecto de los tratamientos de sequía/recuperación en el contenido de ácidos orgánicos mayoritarios: malato (A y B), citrato (C y D), malonato (E y F) y succinato (G y H) en nódulos de *P. vulgaris* inoculadas con *R. etli* wt (A) y *R. etli* *cbb<sub>3</sub><sup>+</sup>*. Cada punto representa la media de 7 réplicas biológicas ± EE. La existencia de diferencias significativas con respecto al control se denota con un asterisco ( $p \leq 0,05$ ).

En la figura 1.14 se muestran los valores de ácidos orgánicos minoritarios en las condiciones de sequía y recuperación. La tendencia es diferente según el tipo de inoculante. A excepción del lactato, en ambos grupos de plantas se observa una disminución de la cantidad de ácidos orgánicos en estudio. Ésta se hace patente a partir del tercer día de tratamiento en las plantas inoculadas con la cepa silvestre, y a partir del séptimo en las inoculadas con la mutante. El lactato no varía a lo largo del tratamiento de sequía en estas últimas, sobrepasando el valor control tras

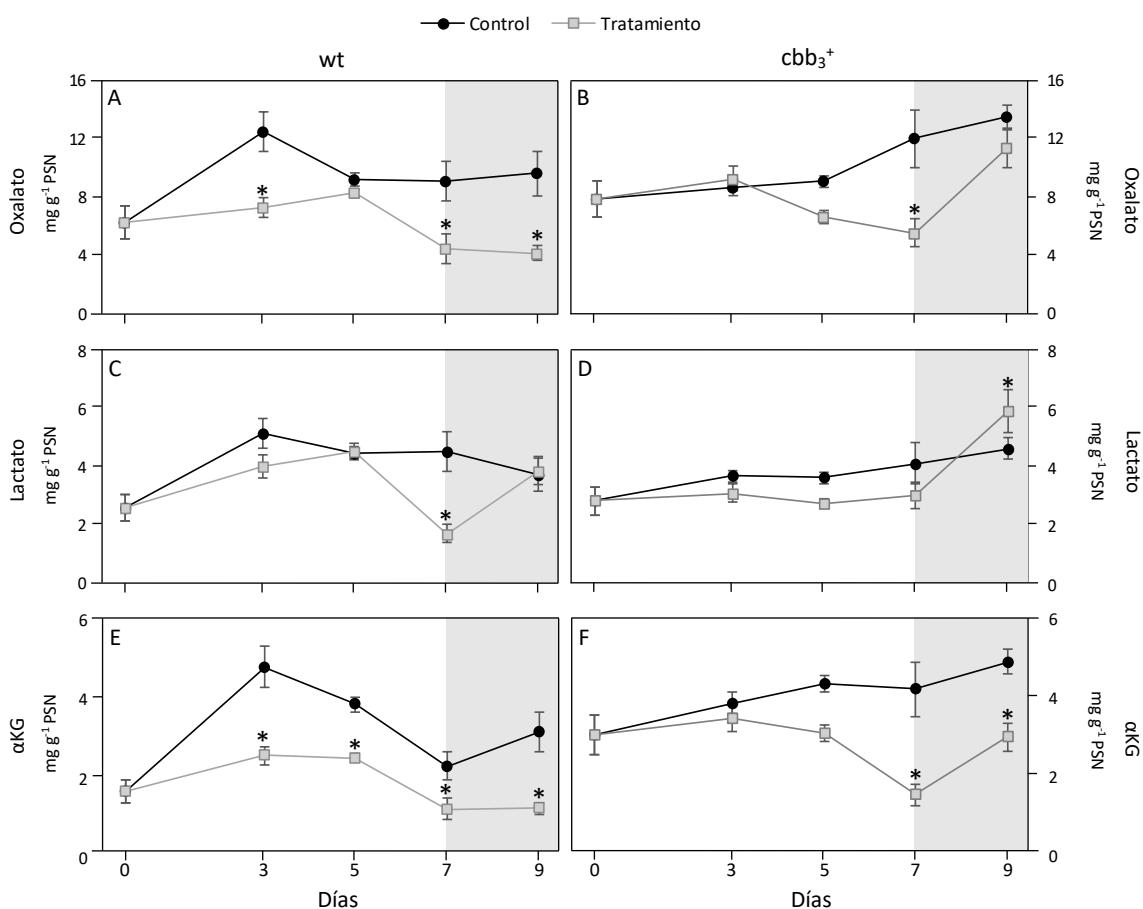


Figura 1.14: Efecto de los tratamientos de sequía/recuperación en el contenido de ácidos orgánicos minoritarios: oxalato (A y B), lactato (C y D) y acetoglutarato (E y F) en nódulos de *P. vulgaris* inoculadas con *R. etli* (wt) y *R. etli* (*cbb<sub>3</sub><sup>+</sup>*). Cada punto representa la media de 7 réplicas biológicas ± EE. La existencia de diferencias significativas respecto al control se denota con un asterisco ( $p < 0.05$ ).

la recuperación. En plantas inoculadas con la cepa wt este ácido disminuye de forma significativa a día 7 de tratamiento de sequía, y es el único que recobra valores control al rehidratar las plantas.

#### **4.10. Contenido en aminoácidos en nódulos**

En la figura 1.15 se presentan los aminoácidos nodulares que sufrieron mayores variaciones en el experimento. Se observa como la Arg incrementa en los nódulos de plantas inoculadas con la cepa wt a día 7 de tratamiento de sequía, recuperando los valores control con el aporte de agua. En este grupo de plantas, el GABA y la prolina sufren un incremento significativo a partir del día 5 de cultivo, incrementando su concentración conforme la sequía se hace más severa. Las concentraciones de ambos compuestos se equiparan a las de las plantas control con la rehidratación (día 9). La lisina es el único aminoácido que presenta una disminución significativa respecto a las plantas control desde el comienzo del tratamiento de privación de agua, valores que siguen disminuyendo, más del 50%, pese a aportarse agua al cultivo.

En los nódulos de plantas inoculadas con la cepa  $cbb_3^+$  observamos como el GABA aumenta respecto a sus controles ligeramente al comienzo de la sequía, alcanzando valores que quintuplican los control cuando la sequía es severa. El contenido de prolina varía significativamente de las plantas control a día 7 tras la privación de agua cuando los valores ascienden a  $211.08 \pm 25.99 \mu\text{g g}^{-1}$  PSN frente a los  $28.76 \pm 1.08 \mu\text{g g}^{-1}$  PSN de las plantas control. En este grupo de plantas, el aminoácido Lys sufre una reducción de su concentración respecto al control del 25% a día 5, obteniéndose el menor valor en condiciones de sequía severa cuando esta disminución supone el 45% de la concentración encontrada en nódulos de plantas control. En el caso de estas plantas, el proceso de recuperación

hace que tanto los valores de Pro como de Lys se restauren a los valores control.

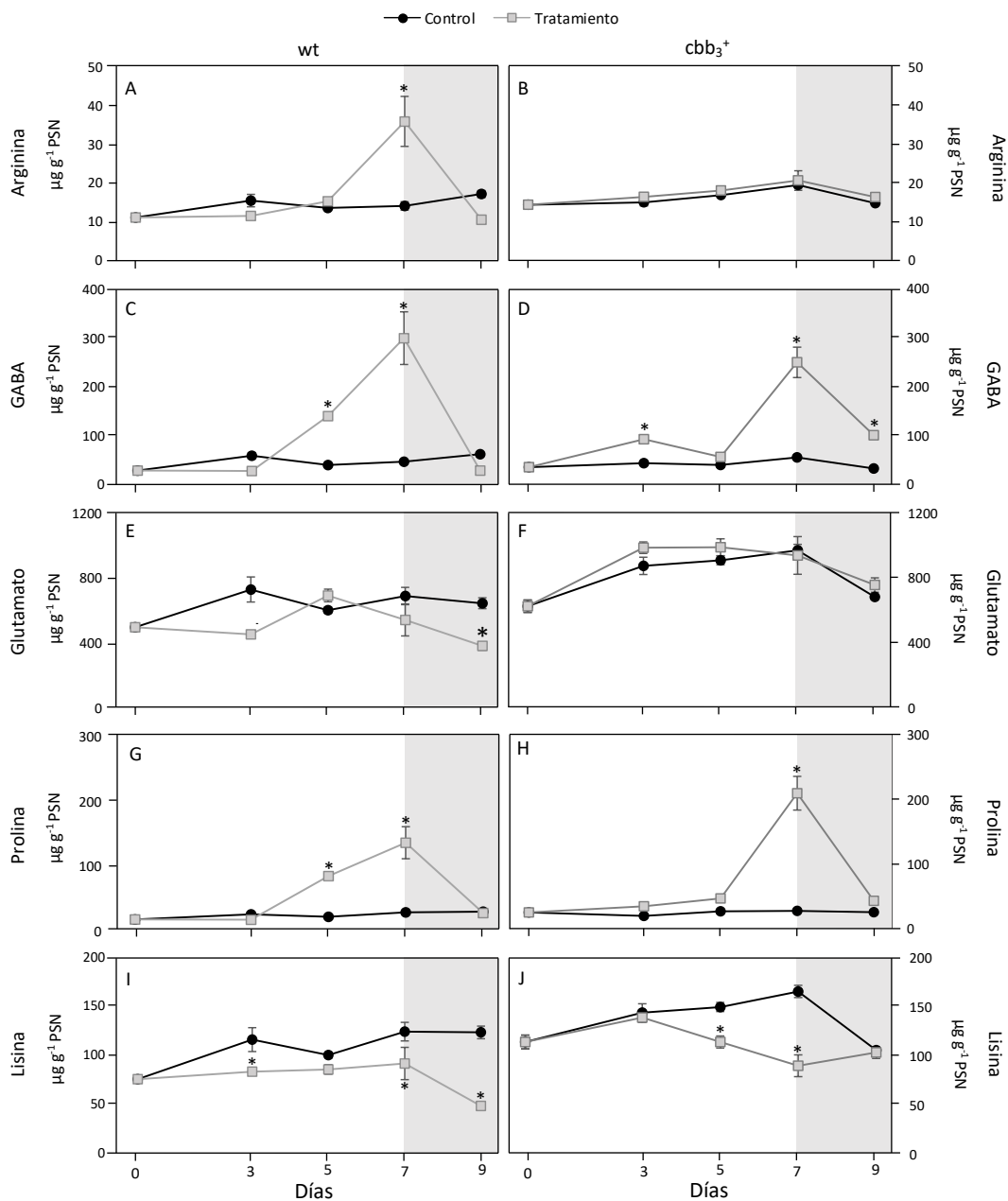


Figura 1.15: Efecto de la sequía y posterior rehidratación sobre el contenido de aminoácidos de nódulos de plantas de *P. vulgaris* inoculadas con *R. etli* wt y *R. etli* *cbb<sub>3</sub><sup>+</sup>*. Cada punto representa la media de 7 réplicas biológicas  $\pm$  EE. La existencia de diferencias significativas con respecto al control se denota con un asterisco ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4.11. Contenido de las diferentes fracciones de PAs en nódulos

En la figura 1.16 se muestra el *pool* total de PAs nodulares de ambos grupos de plantas inoculadas con diferentes microsimbiontes. Observamos en las plantas con nódulos formados por la bacteria mutante presentan del 40 al 60% más de PAs en condiciones control, porcentaje que aumenta entorno al 70% en el proceso de recuperación (día 9).

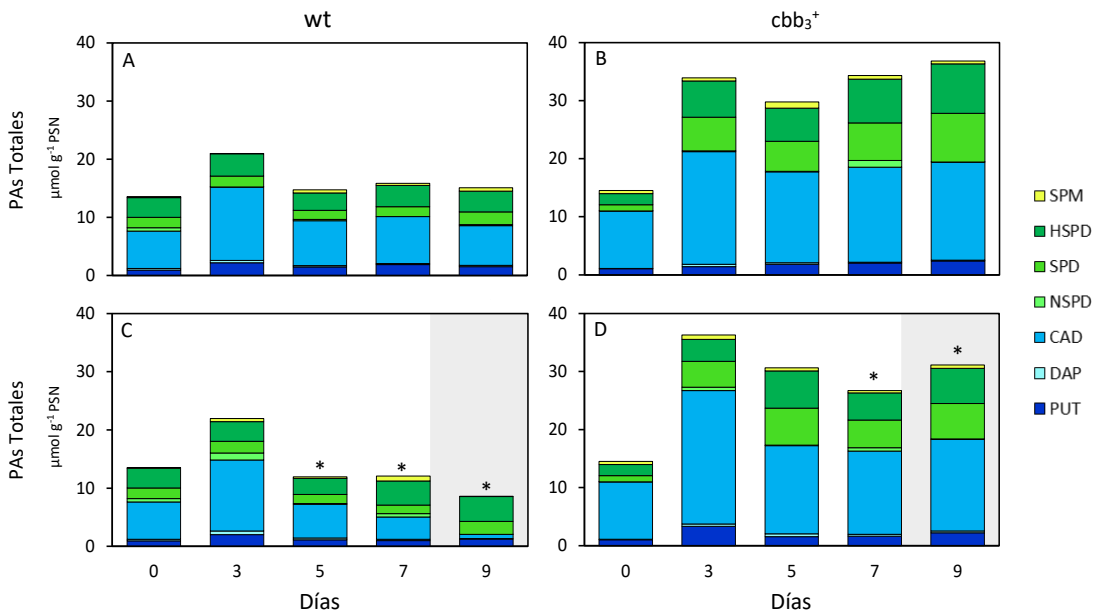


Figura 1.16. Contenido total de PAs en nódulos de *P. vulgaris* inoculadas con *R. etli* wt y *R. etli* cbb<sub>3</sub><sup>+</sup> en condiciones control (A y B) y bajo condición de sequía- recuperación (C y D). Cada barra representa la media de 7 réplicas biológicas. La existencia de diferencias significativas con respecto al control se denota con un asterisco ( $p \leq 0.05$ ).

En condiciones control, las plantas inoculadas con la cepa wt mantienen una concentración estable de PAs a lo largo del experimento, con un incremento a día 3. Entre las PAs detectadas, la Cad es la más abundante (41%) seguida de la HSPd (17%). En condiciones de estrés hídrico, el *pool* de PAs sufre una disminución a partir del quinto día de tratamiento, y la Spd pasa a ser la segunda PA mayoritaria (13%). A lo largo

## Capítulo 1

del tratamiento de estrés, se produce la disminución paulatina en la concentración de PAs (a excepción del día 3), con unos valores mínimos que se detectan a día 9, cuando el *pool* ha disminuido un 43% con relación a la situación control.

Los nódulos formados por la cepa  $cbb_3^+$  presentan una concentración de PAs a lo largo del experimento que ronda los  $34 \mu\text{mol g}^{-1}$  PSN (sin contar el tiempo 0). De esta concentración, el mayor porcentaje es debido a la síntesis de Cad, seguida por la HSpd y la Spd (78%, 30% y 27%, respectivamente). El déficit hídrico moderado (3 y 5 días) hace que el *pool* de PAs aumente en estos nódulos (7 y 3% respectivamente), concentración que disminuye un 27% a día 7 respecto a su control, y que vuelve a aumentar tras la rehidratación, con una pérdida en el *pool* de PAs del 15%.

Con el fin de dilucidar la distribución de las PAs, fueron analizadas las diferentes fracciones en las cuales las podemos encontrar (libres, conjugadas y unidas).

La figura 1.17 muestra la fracción de PAs libres, conjugadas y unidas en los nódulos de plantas inoculados con la cepa wt. En la fracción de PAs-L observamos como el comienzo de la deshidratación hace que el *pool* aumente un 8% respecto al control, disminuyendo en los días siguientes, incluyendo la rehidratación, donde encontramos el valor más alto, con una pérdida de PAs-L del 86%. La PA mayoritaria tanto en situación control como bajo el tratamiento de sequía- recuperación es la Cad, seguida de la HSpd y la Put (62-58%, 13-17%, 12-11%, respectivamente).

Las PAs-C sufren una disminución a día 3, consecuente con la

acumulación en la fracción libre. A partir del día 7 de tratamiento disminuyen en torno al 80% respecto a su control, incluyendo la fase de rehidratación de las plantas. En esta fracción las PAs mayoritarias son Spd y HSPd tanto en control como en el grupo de las plantas tratadas.

En la fracción de PAs-U, el tratamiento de sequía hace que el *pool* aumente, un 50, 0.15 y 9% según los días de tratamiento de sequía, induciéndose un incremento del 690% con la rehidratación, con un claro predominio de la HSPd, que representa más del 50% del total de PAs analizadas.

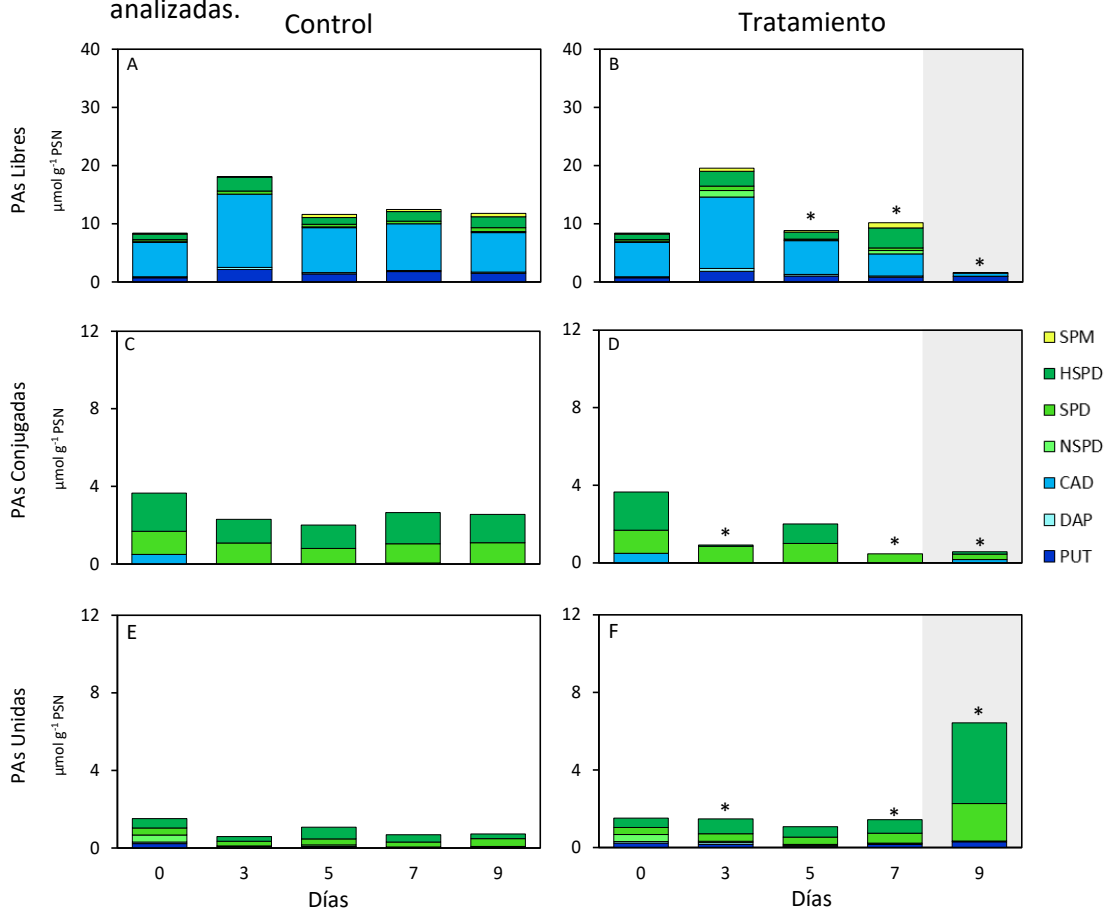


Figura 1.17. Contenido de PAs libres, conjugadas y unidas en nódulos de *P. vulgaris* inoculadas con *R. etli* wt en condiciones control (A, C y E) y bajo tratamiento de sequía-recuperación (B, D y F). Cada barra representa la media de 7 réplicas biológicas. La existencia de diferencias significativas con respecto al control se denota con un asterisco ( $p \leq 0.05$ ).

## Capítulo 1

Por otro lado, el análisis de las distintas fracciones de PAs nodulares de plantas inoculadas con la bacteria *cbb*<sub>3</sub><sup>+</sup> se recoge en la figura 1.18. El tratamiento de sequía hace que se induzca el *pool* de PAs en la fracción libre un 30% a día 3 de tratamiento, disminuyendo en días posteriores, pero manteniendo las concentraciones a nivel de las plantas control. En este caso, la PA mayoritaria fue Cad, seguida de HSpd y Put, con valores estimados de un 78, 10 y 8% en el caso de las plantas control y 73, 10 y 9% en el caso de las plantas sometidas a sequía y recuperación.

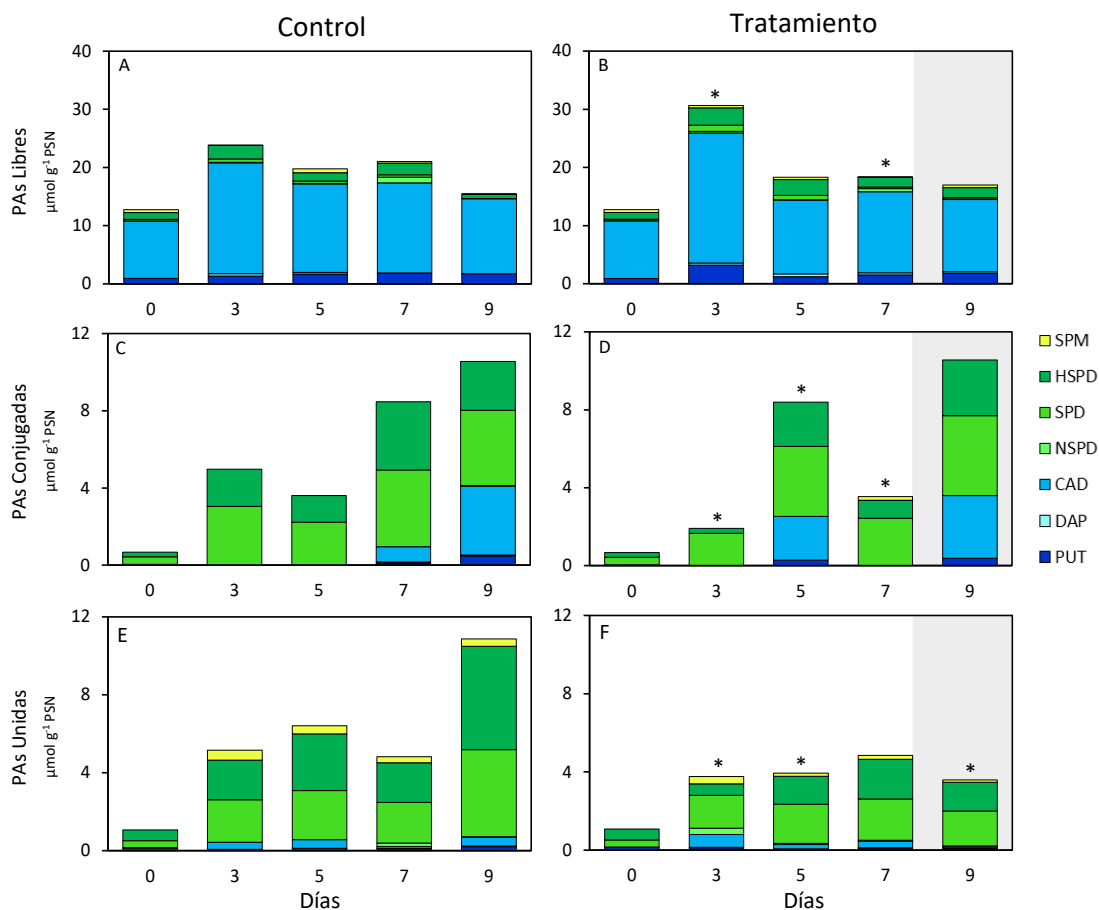


Figura 1.18. Contenido de PAs libres, conjugadas y unidas en nódulos de *P. vulgaris* inoculadas con *R. etli* *cbb*<sub>3</sub><sup>+</sup> en condiciones control (A, C y E) y bajo tratamiento de sequía- recuperación (B, D y F). Cada barra representa la media de 7 réplicas biológicas. La existencia de diferencias significativas con respecto al control se denota con un asterisco ( $p \leq 0.05$ ).



Las PAs-C y U en plantas control sufren variaciones consecutivas a lo largo del cultivo, de forma que cuando un *pool* aumenta, disminuye el otro. En el caso de las plantas tratadas, la concentración de PAs-C disminuye un 40% al comienzo de la sequía, de manera consecuente al aumento de PAs-L. Al incrementarse el estrés, el *pool* aumenta un 30%. La sequía extrema hace que se produzcan pérdidas del 40% respecto al control de PAs. En este caso, la rehidratación de las plantas conlleva la recuperación de los valores control. Las PAs más abundantes tanto en control como en el tratamiento de sequía- recuperación son la Spd y la HSpd (48-49% y 34-26%, respectivamente).

#### 4.12. Contenido de las diferentes fracciones de PAs en hojas

La figura 1.19 representa tanto el *pool* total de PAs solubles en PCA encontradas en la parte aérea de plantas de *P. vulgaris* inoculadas con *R. etli*, así como sus fracciones libres y conjugadas. En este órgano encontramos Put, Spm y Spd, con una contribución en condiciones control del 47, 40 y 13%, respectivamente, siendo la PA mayoritaria la Put.

El *pool* de PAs-L bajo tratamiento de sequía- recuperación (D) sufre una inducción al comienzo del estrés (día 3) aumentando un 47%, valor que disminuye durante los siguientes días con respecto al control (16, 21 y 37%) con un claro predominio de la Put, que ocupa el 71% del valor total de PAs.

En el análisis de PAs-C observamos un aumento del *pool* en un 21% en el primer día de sequía analizado (día 3), concentración que disminuye drásticamente con la sequía en torno al 50% a día 5 de tratamiento, y alrededor del 35% en días sucesivos.

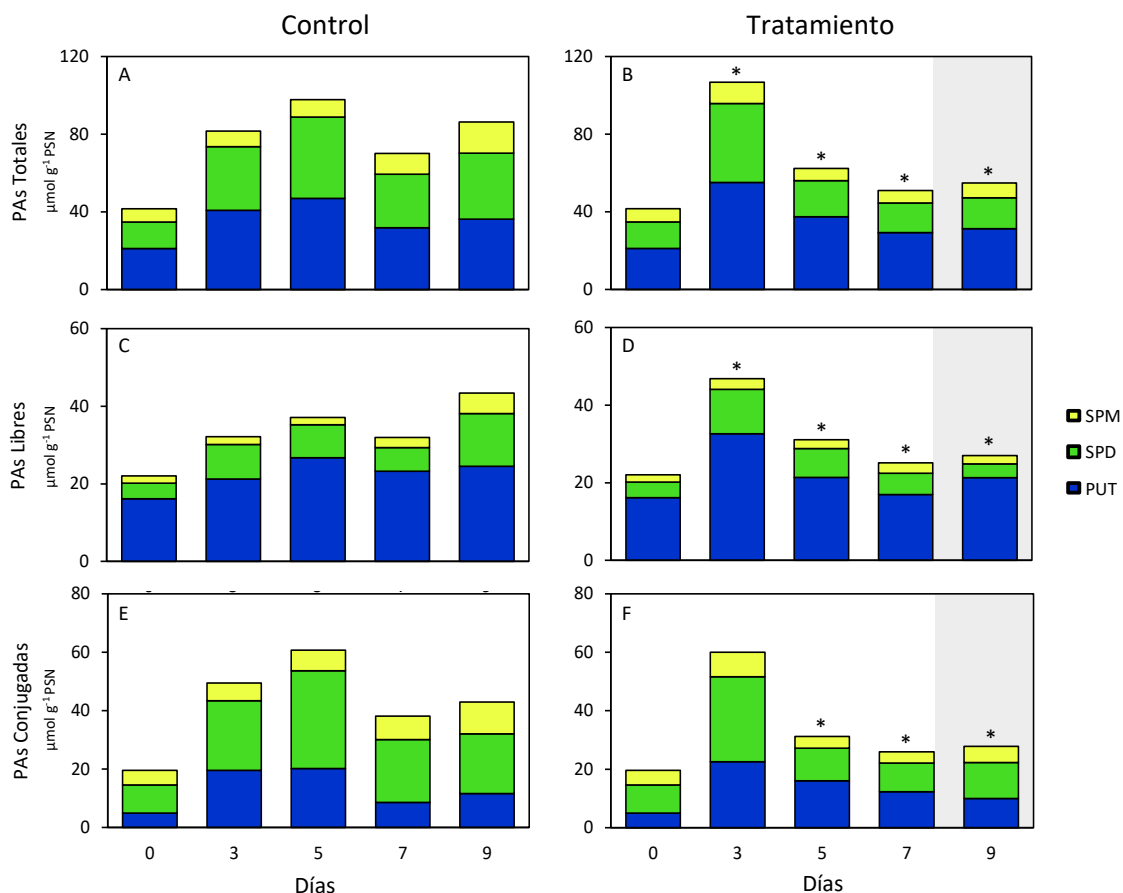


Figura 1.19. Contenido de PAs solubles en PCA totales, libres y conjugadas en hojas de *P. vulgaris* inoculadas con *R. etli* wt en condiciones control (A, C y E) y bajo tratamiento de sequía- recuperación (B, D y F). Cada barra representa la media de 7 réplicas biológicas  $\pm$  EE. La existencia de diferencias significativas con respecto al control se denota con un asterisco ( $p \leq 0.05$ ).

En estas plantas el proceso de rehidratación no conlleva la recuperación de los valores control, observándose una pérdida del 37% del *pool* total de PAs.

En plantas inoculadas con la cepa *cbb*<sub>3</sub><sup>+</sup> el análisis de PAs totales (figura 1.20, A y B) muestra la predominancia de la PA Spd, con valores del 242.80 y 270.65  $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PSN}$  en control y sequía- recuperación, respectivamente, a lo largo del experimento. Se observa un aumento generalizado de PAs en todos los días de sequía analizados, a excepción

del día 7, donde la concentración disminuye un 5% respecto a la situación control. La rehidratación de las plantas mejora el *pool* de PAs que ve incrementada su concentración respecto al control un 52%.

El contenido de PAs-L en condiciones control se mantiene estable a lo largo del experimento, mientras que la sequía hace que a día 3 el *pool* sufra una inducción del 24%, concentración que disminuye a día 5 de

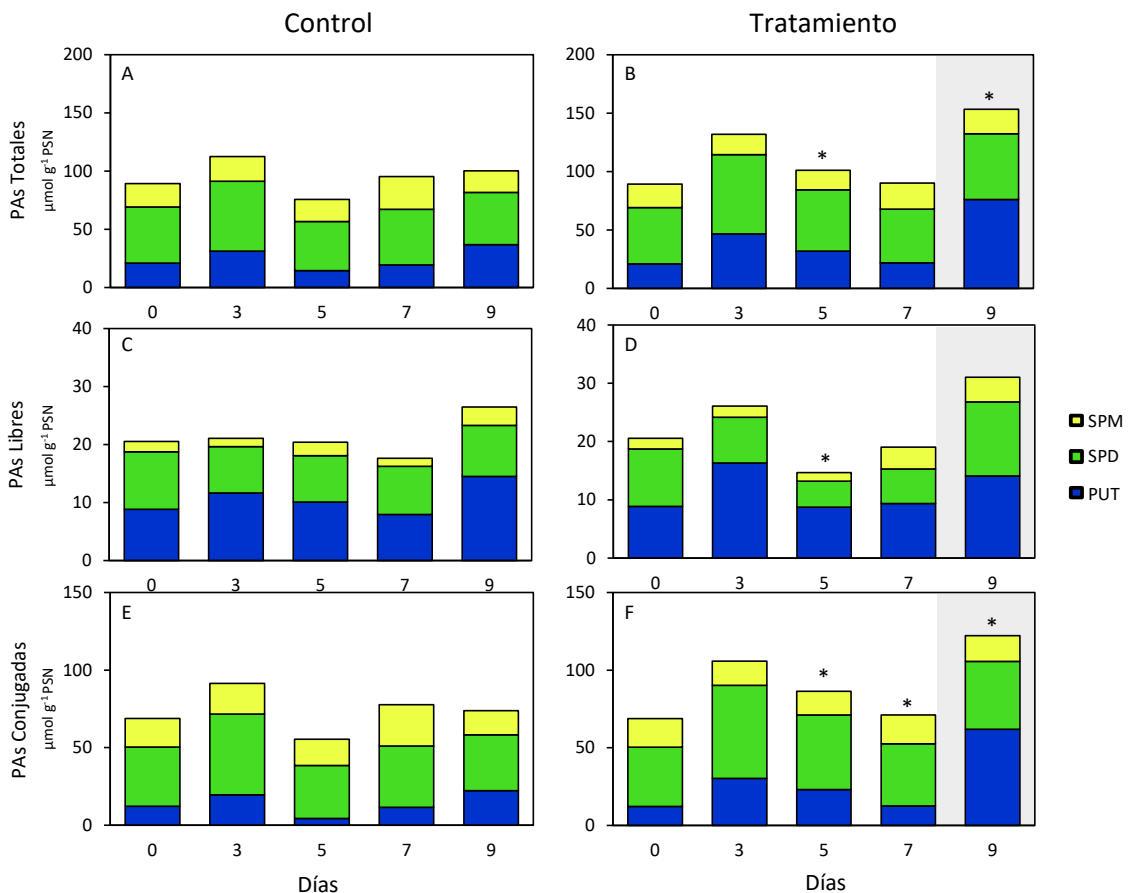


Figura 1.20. Contenido de PAs solubles en PCA totales, libres y conjugadas en hojas de *P. vulgaris* inoculadas con *R. etli cbb3+* en condiciones control (A, C y E) y bajo tratamiento de sequía- recuperación (B, D y F). Cada barra representa la media de 7 réplicas biológicas  $\pm$  EE. La existencia de diferencias significativas con respecto al control se denota con un asterisco ( $p \leq 0.05$ ).

tratamiento en un 28%. Los valores de PAs totales control son superados en un 17% al cesar el estrés.

En el análisis de PAs-C muestra valores aumentados de PAs en todos los días estudiados, a excepción del día 7, cuando el *pool* disminuye su concentración levemente (8% respecto al control). La restitución del riego incrementa la cantidad total de PAs que alcanza valores de 122  $\mu\text{mol g}^{-1}$  PSN, frente a los 73  $\mu\text{mol g}^{-1}$  PSN de su respectivo control.

#### 4.13. Contenido en S-adenosilmetionina en nódulos

Como se observa en la figura 1.21, la concentración de SAM de nódulos provenientes de plantas inoculadas con la cepa wt presenta una inducción en las plantas sometidas a sequía, que se hace significativo a partir del día 7 de tratamiento, y cuyo valor control no es restaurado al rehidratar las plantas. Por el contrario, en nódulos formados por la bacteria mutante, este compuesto muestra una disminución en situación de sequía severa (día 7) que es restaurado a niveles control con la rehidratación de las plantas.

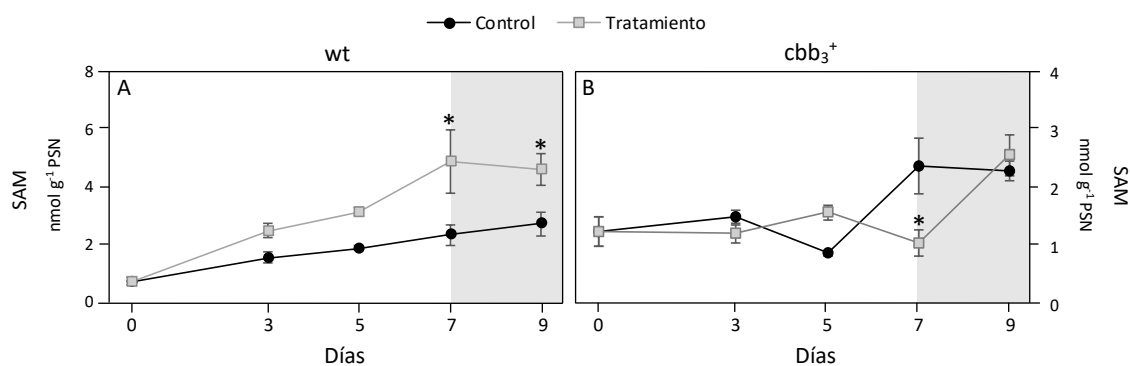


Figura 1.21. Variación del contenido en S- adenosilmetionina en nódulos de *P. vulgaris* inoculadas con *R. etli* wt (A) y *R. etli* *cbb*<sub>3</sub><sup>+</sup> (B) sometidas a sequía durante 7 días y rehidratadas dos días antes de la cosecha. Cada punto representa la media de 7 réplicas biológicas  $\pm$  EE. La existencia de diferencias significativas respecto al control se denota con un asterisco ( $p \leq 0.05$ ).

## 5. DISCUSIÓN

La sequía es una de las condiciones adversas que más comúnmente afecta a las plantas terrestres y se considera uno de los factores limitantes más importantes para el crecimiento y la productividad de las plantas. En las leguminosas, esto es particularmente relevante cuando estas plantas dependen de la FBN para sus requerimientos de nitrógeno. La limitación de su productividad está asociada a un pobre desarrollo de los nódulos radiculares y una disminución de su actividad, lo que conduce a un deterioro de su capacidad de fijación de nitrógeno (Arrese-Igor et al., 2011).

Estudios previos demuestran que la inoculación de plantas de *P. vulgaris* con la cepa CFNX713 de *R. etli*, conlleva una mejora en el crecimiento de las plantas cuando éstas eran sometidas a diferentes niveles de estrés por sequía (Talbi et al., 2012). Bajo nuestras condiciones de cultivo, en condiciones de plena disponibilidad hídrica, no observamos diferencias entre los dos grupos de plantas, respecto a la cantidad total de biomasa. La privación del riego hizo que la biomasa total de plantas inoculadas con la cepa wt disminuyese a partir del día 7 de tratamiento en comparación con sus controles, mientras que, en el grupo de las inoculadas con la cepa mutante, esta disminución se hace patente a partir del tercer día de imposición de la sequía. La rehidratación de las plantas sometidas a estrés hídrico no produjo efectos positivos en ninguno de los dos casos, manteniéndose un crecimiento global reducido en las plantas inoculadas con la cepa mutante, y exhibiendo un decrecimiento si nos referimos al grupo de plantas inoculadas con la wt.

Al analizar los órganos en estudio por separado (Figura 1.4), observamos como en el grupo de la  $cbb_3^+$ , los pesos de todos los órganos

## Capítulo 1

en estudio mantienen constantes sus valores a lo largo del tiempo, incluido el periodo de rehidratación. En plantas wt, tanto la biomasa de parte aérea como nodular decrecieron en todos los casos, y la raíz sólo aumentó su biomasa cuando cesaron las condiciones de sequía. Estudios previos muestran como plantas de judía más tolerantes al estrés osmótico mantienen un crecimiento estable respecto al cultivar sensible (Sassi et al., 2010).

Trabajos anteriores han descrito una mejora en la capacidad fijadora de nitrógeno de plantas de judía inoculadas con la cepa CFNX713 de *R. etli* (Granados-Baeza et al., 2007), así como una menor afección de la actividad nitrogenasa de esta simbiosis en condiciones de sequía (Talbi et al., 2012). Bajo nuestras condiciones no observamos una mayor capacidad fijadora de los nódulos creados por la cepa  $cbb_3^+$ , que durante todo el experimento mostró una menor tasa de FBN en condiciones control que la cepa parental (Figura 1.5). Al someter a las plantas a condiciones de déficit hídrico, las respuestas de ambos grupos fueron diferentes. Mientras que en el grupo control, la actividad fijadora disminuye a partir del tercer día de privación del riego y la rehidratación no mejora esta situación, en plantas inoculadas con la cepa  $cbb_3^+$  esta disminución en la FBN se hace significativa a partir del día 7 de tratamiento de sequía y el restablecimiento del riego, si bien no reestablece los valores control, sí que muestra una tendencia a la recuperación de la tasa de fijación. Resultados similares fueron obtenidos por Furlan et al. (2017) en plantas de cacahuete con diferente tolerancia a la sequía, comprobando que la rehidratación reestablecía parcial o completamente la capacidad para fijar nitrógeno de los nódulos.

En condiciones de sequía, uno de los mecanismos de respuesta de los nódulos a la inactivación de la nitrogenasa es el cierre de la BDO (Witty y Minchin, 1998). Esto provoca una limitación para la respiración bacteroidal, con la consecuente pérdida de actividad FBN (Diaz del Castillo y Layzell, 1995). Por otro lado, el déficit hídrico hace que disminuya la cantidad de Lb, enzima responsable del transporte de O<sub>2</sub> a los bacteroides (Furlan et al., 2014). Según los hallazgos de Talbi et al. (2012), gracias a la sobreexpresión de la oxidasa terminal  $cbb_3^+$ , se reduce el efecto negativo de la sequía sobre la capacidad respiratoria de los bacteroides así como sobre el contenido en Lb, aumentando la tolerancia a la sequía de la maquinaria de la FBN.

Bajo condiciones de estrés hídrico, uno de los mecanismos de respuesta temprana de las plantas es el cierre de los estomas (Figura 1.6), lo que evita la pérdida de agua por transpiración y ayuda a mantener el potencial hídrico de la planta. Al disminuir el intercambio gaseoso, la respiración se ve comprometida a la vez que se incrementa la fotorrespiración. El costoso proceso de la FBN es mantenido por las hexosas, principalmente sacarosa, que llegan vía floema desde la parte aérea, gracias a la fotosíntesis. En condiciones de sequía, la disminución de la actividad fijadora se relaciona con la disminución de sustrato para la respiración bacteroidal. González et al. (1995) observaron en nódulos de soja una fuerte inhibición de la enzima SS, primera enzima nodular encargada de la hidrólisis de hexosas que serán degradadas a malato, proporcionando esqueletos carbonados para el mantenimiento de la actividad fijadora del nódulo. Esta inhibición junto con la acumulación de carbohidratos y el descenso del malato nodular han sido también comprobadas en guisante y judía (Gálvez et al., 2005; Ramos et al., 1999). Bajo nuestras condiciones, se produce una acumulación de sacarosa

(Figura 1.9, A) en el nódulo en las plantas inoculadas con la cepa wt, con el concomitante descenso en la concentración de malato (Figura 1.13, A) a medida que la sequía aumenta (entre el 45-65%) y no recuperan los valores control con la rehidratación (72%). Mientras que las plantas inoculadas con la cepa  $cbb_3^+$  no ven afectada su concentración de sacarosa nodular (Figura 1.9, B), se observa una disminución de malato consecuente con la variación de la FBN (Figura 1.13, B). El término del estrés conduce a una recuperación en estos valores, un 20% menos que en condiciones control. Se ha visto que la inoculación de leguminosas con cepas de incrementada capacidad respiratoria da lugar al aumento de la actividad SS (Silvente y Blanco, 2002) en condiciones control. Esto no parece tener relación con los niveles de transcritos de uno de los dos genes que codifican para la sacarosa sintasa (Silvente et al., 2003), el gen *PvSSn*, ya que se ha comprobado que su síntesis no sufre variaciones en plantas de *P. vulgaris* sometidas a déficit hídrico (Talbi et al., 2012).

### **Papel de los osmolitos en la tolerancia a la sequía de la simbiosis *P. vulgaris*- *R. etli***

En este estudio de sequía-recuperación, observamos cómo el cierre estomático (Figura 1.6) se acentúa a lo largo de los días de tratamiento de sequía, lo que se traduce en potenciales hídricos cada vez más negativos, valores que son reestablecidos en su totalidad en las plantas inoculadas con la cepa  $cbb_3^+$  (Figura 1.7). El CHR nodular denota una mayor desecación en nódulos formados por la cepa silvestre, donde a día 7 de tratamiento la disminución supera el 50% del contenido hídrico relativo, mientras que los nódulos de la cepa  $cbb_3^+$  aún conservan más del 60% del CHR (Figura 1.8).



Una de las estrategias que colaboran en el mantenimiento del estado hídrico de la planta es la síntesis de osmolitos, favoreciendo la entrada de agua en la célula con el fin de evitar la pérdida de turgencia y proteger las estructuras celulares. La prolina es uno de los compuestos relacionados con tal fin, observándose su acumulación en estados de déficit hídrico en diferentes especies de leguminosas (Ghanbari et al., 2013; Heerden Van y Krüger, 2002; Sánchez et al., 2004; Singh y Reddy, 2011). En nuestro experimento la condición de sequía provoca un incremento en la concentración de prolina (Figura 1.15, G y H), que se hace patente en los nódulos formados por la cepa wt al quinto día, mientras que en los formados por la cepa *cbb<sub>3</sub><sup>+</sup>* la inducción se produce cuando la sequía es severa (día 7). En ambos casos, la rehidratación hace que esta acumulación disminuya, denotándose la implicación de este metabolito para actuar como soluto compatible bajo sequía, manteniendo la homeostasis celular (Aziz et al., 1999) a la vez que se metaboliza fácilmente tras la rehidratación (Singh et al. 2000). Existe una relación entre la concentración de PAs y el contenido de prolina, observándose que una disminución en el contenido de Put debido a su catabolismo puede aumentar la síntesis y acumulación de prolina bajo condiciones de estrés hídrico en soja (Su y Bai, 2008). Hare y Cress (1997) postulan que el aumento de determinadas PAs junto con la acumulación de Pro podría ser parte de un mecanismo homeostático para prevenir la fluctuación de pH celular en condiciones de estrés.

La trehalosa participa en reacciones que van desde la osmoprotección a la señalización en respuesta al estrés por sequía en judía (Farías-Rodríguez et al., 1998). Se ha visto que su acumulación es un rasgo que podría generar tolerancia a este estrés en plantas de cacahuete (Furlan et al., 2017). En nuestras plantas wt se da una acumulación en el

contenido de trehalosa nodular a partir del tercer día de tratamiento (Figura 1.9, E) en menor concentración que los nódulos de plantas *cbb<sub>3</sub><sup>+</sup>*, que ven incrementada su concentración solo a día 5 (figura 1.9, F). En nuestro caso no podemos afirmar que la acumulación de trehalosa ofrezca una mayor tolerancia al estrés, aunque sí está relacionada con los efectos de la sequía, ya que la rehidratación de las plantas genera una disminución de este metabolito a nivel nodular.

### **Papel de las PAs en la homeostasis de ROS**

Marino et al. (2008) propusieron que las ROS producidas durante la sequía desempeñan una función crucial en la regulación redox, afectando a la SS tanto a nivel transcripcional como post traduccional. Por otra parte, Larrainzar et al. (2009) sugieren que la capacidad metabólica de los bacteroides y el daño oxidativo de los componentes celulares son factores que contribuyen a la inhibición de la FBN en situación de sequía.

En este aspecto las PAs han sido relacionadas con la homeostasis de ROS, por su capacidad para captarlas y promover la activación de la maquinaria enzimática antioxidante (Pottosin et al., 2014). Se sabe que los nódulos presentan un contenido de PAs muy superior al resto de órganos, informándose correlaciones lineales entre la concentración total de PAs nodulares y su capacidad fijadora (Lahiri et al., 2004), aunque poco se sabe sobre el papel de las PAs en la respuesta a la sequía de los nódulos radiculares.

El estudio de los perfiles de PAs nos reveló comportamientos totalmente diferentes entre las plantas inoculadas con el microsimbionte parental y el mutante *cbb<sub>3</sub><sup>+</sup>*. En condiciones control, observamos como los

nódulos de plantas inoculadas con la cepa  $cbb_3^+$  presentaban del 40 al 70% más de PAs totales que las plantas inoculadas con la bacteria wt (Figura 1.16).

Entre las PAs analizadas, encontramos la Cad como la predominante, seguida de la HSpd. Se ha comprobado que la Cad es sintetizada principalmente por el macrosimbionte, ya que no se reconoce su síntesis en bacteroides (Fujihara, 2009; Hamana et al., 1990; López-Gómez et al., 2014). Por el contrario, la HSpd es la PA más abundantemente sintetizada por los bacteroides, localizada en la fracción bacteroidal (Fujihara, 2009; López-Gómez et al., 2016). La capacidad de síntesis de HSpd en bacteroides formados por la cepa CFNX713 de *R. etli* se ve aumentada del 40 al 60% en relación con la cepa control. La síntesis de HSpd en bacteroides se lleva a cabo principalmente gracias a la unión de dos moléculas de Put, por acción de la enzima HSpd sintasa. Fujihara y Yoneyama (1993) informan que una alta concentración de HSpd a pH bajo amortigua y mantiene el pH citoplasmático ofreciendo protección frente al daño inducido. La relación inversa entre la HSpd y  $K^+$  mantiene la electroneutralidad del citoplasma, lo que reportaría efectos positivos en la tolerancia a la sequía.

La regulación del nivel de PAs en las células vegetales es un proceso que depende de la síntesis *de novo*, la degradación, la conjugación, la interconversión, la alteración química y el transporte. Hay muchos estudios que han demostrado la participación de este metabolismo en las respuestas de las plantas al estrés abiótico, sobre todo a la salinidad y la sequía (Bouchereau et al., 1999; Groppa y Benavides, 2008), ya que en estas situaciones adversas este proceso cobra importancia debido a la implicación de las PAs en los mecanismos de

tolerancia (Wang et al., 2019). De este modo, el análisis de las distintas fracciones de PAs nos proporciona una visión global de su posible regulación bajo nuestras condiciones.

Las PAs-L son detectadas principalmente en tejidos en crecimiento, presentándose en todos los compartimentos celulares, incluido el núcleo, lo que denota su importancia en los procesos celulares fundamentales (Bouchereau et al., 1999). Intervienen en la regulación de diversos procesos fisiológicos, como el desarrollo de flores, la embriogénesis y organogénesis, la senescencia y el desarrollo y maduración de frutos. También están involucradas en las respuestas a los estreses bióticos y abióticos y presentan alta capacidad para actuar como antioxidantes (Gholami et al., 2013; Mustafavi et al., 2018; Xu et al., 2014). Dado que el catabolismo de PAs produce  $H_2O_2$ , que puede actuar como molécula señal a niveles bajos o como molécula tóxica cuando los niveles son altos, la relación entre el catabolismo y la biosíntesis de PAs ha sido considerada un factor crucial para la inducción de las respuestas de tolerancia o muerte celular bajo estrés abióticos (Moschou et al., 2008). Esto sugiere que el  $H_2O_2$  derivado del catabolismo de PAs puede desempeñar un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis de ROS, dependiendo de sus niveles celulares.

En las figuras 1.17 (A y B) y 1.18 (A y B) observamos la fracción de PAs libres. En condiciones control, los nódulos generados por la bacteria  $cbb_3^+$  presentan un *pool* de PA-L entre el 25- 40% superiores a la bacteria wt. En condiciones de estrés hídrico, observamos como a día 3 de tratamiento, existe un aumento de PA-L como respuesta temprana al estrés, que en el caso de las plantas inoculadas con la cepa parental representa una subida del 8% de PAs, frente al 28% de las plantas

inoculadas con la cepa  $cbb_3^+$ . Los efectos de las PAs, que tienen propiedades antioxidantes y antiagregantes de proteínas, contribuyen al mantenimiento de las funciones celulares fisiológicas frente al estrés abiótico, sugiriéndose que las PAs son ventajosas para la homeostasis de proteínas durante las condiciones adversas. El análisis de transcriptomas en frutas transgénicas que acumulan PAs reveló una regulación al alza de las transcripciones de chaperonas en comparación con el control (Mattoo et al., 2007). Por lo que asumimos una capacidad antioxidante mejorada por parte de la bacteria mutante debido a la acción de las PAs para neutralizar ROS.

La conjugación de PAs se origina por la interacción covalente de PA-L con compuestos fenólicos de bajo peso molecular (ácido hidroxicinámico, ácido cumárico, ácido caféico o ácido ferúlico) (Bassard et al., 2010). Esta fracción es importante no sólo para el control de las concentraciones de PAs intracelulares sino también por su interacción con los componentes de la pared celular (Mapelli et al., 2008; Yang et al., 2010). Se ha indicado una relación de tolerancia a estrés en las plantas por la producción de esta fracción de PAs (Groppa y Benavides, 2008; Alcázar et al., 2010). La figura 1.17 (C y D) muestra un diferente patrón de las PA-C entre los dos grupos de plantas, observándose una disminución en la cepa wt durante todo el tratamiento que se hace más patente a medida que la sequía aumenta y donde la recuperación no tiene efecto positivo, no originando un aumento en esta fracción de PAs. En los nódulos  $cbb_3^+$  existe una menor acumulación de esta fracción de PAs a día 3, consecuente con el aumento del *pool* de PA-L, y restaurándose los valores control con el cese del estrés.

## Capítulo 1

Las PAs-L, completamente protonadas a pH fisiológico, también pueden unirse a macromoléculas cargadas negativamente, como proteínas, ácidos nucleicos, ácidos urónicos o lignina mediante enlaces iónicos y de hidrógeno para formar PAs unidas (Igarashi y Kashiwagi, 2015). Su función está relacionada con la regulación de la actividad enzimática, la replicación del ADN, la transcripción de genes, la división celular y la estabilidad de la membrana, presentando además una amplia gama de funciones biológicas en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Generalmente, cuantos más grupos amino presente la estructura, más fuerte será su actividad fisiológica. Nuestros datos revelan que mientras que en la cepa mutante los valores se mantienen constantes a lo largo del tratamiento (Figura 1.17, E y F), con un descenso respecto a la situación control de un 20%, en los nódulos de la cepa parental esta fracción sufre una inducción 2 o 3 veces superior a sus controles en el proceso de sequía. La rehidratación presenta un efecto muy positivo en estos valores, pero a nivel del sistema global no aporta beneficios al sistema.

Parece claro que en los nódulos generados por *R. etli* CFN42 predomina el catabolismo de PAs en respuesta al estrés por sequía, lo que conlleva un aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> celular que muy lejos de actuar como molécula señal, parece aumentar el daño oxidativo de las estructuras, conduciendo al detrimento del sistema y la muerte celular. Sin embargo, en la cepa *cbb<sub>3</sub><sup>+</sup>*, sí que parece tener relación con el estado redox mejorado de los nódulos, y la recuperación parcial de la actividad fijadora de nitrógeno.

En la síntesis de PAs superiores la SAM descarboxilasa parece un punto crítico, regulando la homeostasis de las PAs y pudiendo ser responsable del antagonismo entre éstas y el etileno. Se ha reportado que

la SAM descarboxilasa bajo condiciones de estrés hídrico ve incrementada su actividad (Alcázar et al., 2011; Talaat y Shawky, 2016) y la sobreexpresión del gen repercute positivamente en la tolerancia a estreses abióticos (Luo et al., 2017; Roy y Wu, 2002; Wi et al., 2014; Wi et al., 2006). El sustrato de esta enzima, la SAM se sintetiza gracias a la enzima SAM sintetasa, cuya regulación en condiciones de estrés no está muy clarificada. Existen estudios que indican una disminución de los transcritos de SAM sintetasa bajo condiciones de sequía en nódulos de guisante (Irar et al., 2014), *M. truncatula* (Larrainzar et al., 2014) y soja (Toorchi et al., 2009) y otros donde se comprueba su regulación al alza en condiciones de estrés osmótico en plantas no noduladas, donde se indica que la homeostasis de SAM podría mantenerse para aumentar el potencial adaptativo de la planta (Espartero et al., 1994; Van Breusegem et al., 1994). La cuantificación de SAM en los nódulos (Figura 1.21) reveló una acumulación del compuesto en condiciones de estrés hídrico en las plantas inoculadas con la cepa wt, descartándose que bajo nuestras condiciones fuese la etapa limitante para la síntesis de PAs. Dado que bajo condiciones de estrés la síntesis de SAM se ve reprimida en nódulos, posiblemente sea el macrosimbionte el responsable de su síntesis. Por otro lado, un aumento en la formación de etileno tanto en parte aérea como en raíz bajo situaciones de estrés (Abiri et al., 2017; Wang et al., 2013), podría inhibir a la SAM descarboxilasa (Apelbaum et al., 1984; Icekson et al., 1986; Pál et al., 2015), lo que conduciría a la formación de SAM en los nódulos sometidos a déficit hídrico.





## 6. CONCLUSIONES

- La acumulación de prolina en estados de sequía moderada y severa, así como su disminución cuando las condiciones de riego son óptimas, sugiere una implicación de este compuesto como regulador de la homeostasis celular de nódulos en condiciones de estrés.
- Tras los resultados obtenidos en este trabajo, no podemos afirmar que la acumulación de trehalosa ofrezca una mayor tolerancia al estrés, aunque sí está relacionada con los efectos de la sequía, ya que la recuperación de las plantas genera una disminución de este metabolito a nivel de nódulo.
- La mayor producción de PAs en la cepa CFNX713 de *R. etli*, con respecto a su cepa parental parece estar implicada en una mejor tolerancia al estrés.
- En condiciones de estrés hídrico predomina la oxidación de PAs frente a la conjugación en los nódulos. Esto sugiere que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derivado del catabolismo de PAs puede desempeñar un papel señalizador clave en el mantenimiento de la homeostasis de ROS.



## CAPÍTULO 2

Efecto del aumento en la biosíntesis de ácido ascórbico en la simbiosis *Medicago truncatula-Ensifer meliloti* en condiciones de estrés hídrico



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Ácido ascórbico

El AsA, también conocido como vitamina C o ascorbato, es una vitamina hidrosoluble, considerada como micronutriente esencial para el crecimiento y desarrollo normal de animales. En plantas está vinculado a muchos procesos fisiológicos como la regulación de la fotosíntesis, el crecimiento y el desarrollo, la biosíntesis de la pared celular, la regulación de la germinación de las semillas, el tiempo de floración, la maduración y envejecimiento de la fruta, el almacenamiento postcosecha, la transducción de señales y actúa como cofactor de enzimas (Foyer y Noctor, 2011; Zechmann, 2011; Mellidou et al., 2012; Tóth et al., 2013)

Exceptuando las semillas secas, encontramos AsA en todos los tejidos de las plantas, ya que puede ser fácilmente transportado entre los diferentes tejidos y órganos por el sistema de haces vasculares (Smirnov, 2005; Zechmann, 2011). Tiende a acumularse en los órganos fotosintéticos, jugando un papel importante en la fotosíntesis y en el transporte de electrones transmembrana (Wheeler et al., 1998).

El AsA es uno de los antioxidantes de bajo peso molecular más abundantes en las plantas y su función principal es proteger a la célula de los efectos dañinos de las ROS que se producen como resultado del metabolismo celular normal, especialmente durante la fotosíntesis, la respiración y la fotorrespiración. También protege frente a condiciones adversas donde el daño a la maquinaria celular provoca un aumento de la producción de ROS (Foyer & Noctor, 2011; Gest et al., 2013).

En un escenario donde los patrones climáticos globales tienden a aumentar las condiciones ambientales extremas, como las altas

temperaturas y la sequía, el desarrollo de cultivos tolerantes al estrés abiótico es fundamental. Dado que las plantas con mayores niveles de AsA son más tolerantes a las perturbaciones del medio, la manipulación biotecnológica puede ser una forma prometedora de generar cultivos más resistentes al estrés por déficit hídrico (Lisko et al., 2014).

### 1.2. Biosíntesis de ácido ascórbico

El AsA es sintetizado en plantas principalmente por la ruta de la L- galactosa o ruta de Smirnof- Wheeler (Figura 2.1) (Wheeler et al., 1998; Ishikawa et al., 2018). Se han descrito tres vías alternativas, la vía de la L- gulosa (Wolucka y Van Montagu, 2003), la vía del ácido D- galacturónico (Agius et al., 2003) y la vía del mioinositol (Lorence et al., 2004). En la mayoría de especies vegetales, o al menos en las hojas, la síntesis mayoritaria de AsA se lleva a cabo a través de la ruta de la L- galactosa (Dowdle et al., 2007; Ishikawa et al., 2006).

La biosíntesis de AsA a través de la vía de la L- galactosa involucra un total de 8 reacciones enzimáticas. Tanto los genes como las enzimas que codifican han sido identificados y bien caracterizados en muchas plantas superiores. De todas las enzimas implicadas en la síntesis, se considera que la GDP-D-manosa-3,5-epimerasa (GME) y la GDP-L-galactosa fosforilasa (GGP o VTC2) son claves en la regulación de la síntesis de AsA (Melino et al., 2009; Bulley y Laing, 2016; Akram et al., 2017).

La enzima GME cataliza el cuarto paso enzimático de la ruta de Smirnof-Wheeler que conlleva la conversión reversible de GDP-D-manosa para producir GDP-L-galactosa. Gilbert et al. (2009) demuestran que el silenciamiento del gen *GME* en tomate provoca una reducción de los niveles de AsA casi del 50% respecto al fenotipo silvestre, respaldando la importancia de este gen en la ruta biosintética del AsA. Por otra parte,

existen estudios que verifican que la sobreexpresión de *GME* se traduce en un aumento de la concentración de AsA en plantas de *Arabidopsis* (Zhou et al., 2012), tomate (Li et al., 2019) o arroz (Zhang et al., 2015). Sin embargo, este efecto no fue extrapolable a plantas de tabaco, donde la sobreexpresión del gen *GME* no condujo a un aumento en la síntesis de este metabolito (Imai et al., 2012).

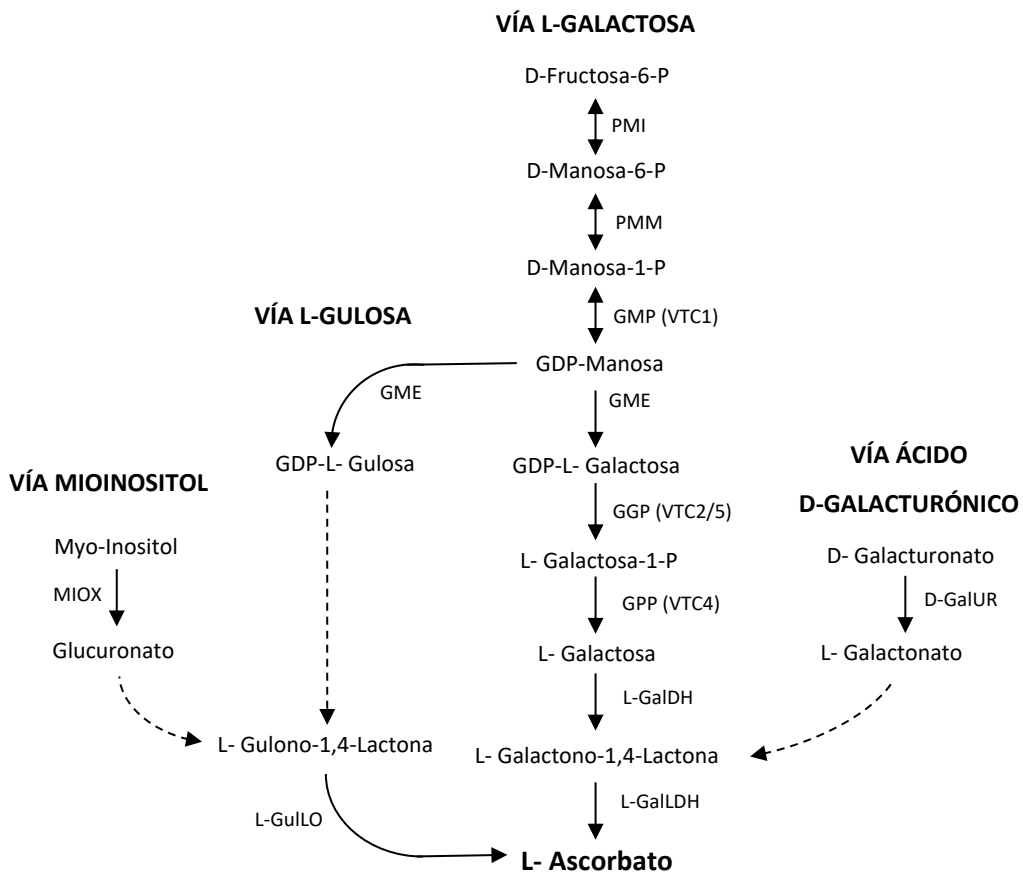


Figura 2.1. Rutas biosintéticas de AsA propuestas en plantas (Broad et al., 2020). Abreviaturas: PMI, fosfomanosa isomerasa; PMM, fosfomanosa mutasa; GMP, GDP-D-manosa pirofosforilasa; GME, GDP-D-manosa-3,5-epimerasa; GGP, GDP-L-galactosa fosforilasa; GPP, L-galactosa-1-P fosfatasa; L-GalDH, L-galactosa deshidrogenasa; L-GalLDH, L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa; L-GulO, L-gulono-1,4-lactona oxidasa; MIOX, mioinositol oxigenasa; D-GalUR, D-galacturonato reductasa.

La enzima VTC2 es responsable de la conversión de GDP-L-galactosa a L-galactosa1-P. Esta quinta reacción de la ruta de la L-galactosa representa el primer paso comprometido de biosíntesis de AsA, ya que la L-galactosa también es necesaria para la formación de la pared celular. Las proteínas VTC2 suelen estar codificadas por múltiples genes homólogos. En *Arabidopsis thaliana* se identificaron dos genes, pertenecientes a la superfamilia de proteínas HIT, el *VTC2* y el *VTC5* (Dowdle et al., 2007). Su expresión es detectada en todas las etapas de crecimiento y desarrollo y está regulada por la luz, siendo en los tejidos verdes significativamente mayor que en otros órganos (Müller-Moulé, 2008). En plantas de *Arabidopsis*, mutaciones sin sentido en el gen *VTC2* conllevaron una reducción de la síntesis de AsA, efecto que ocasionaba la letalidad de las plantas cuando la mutación se daba en ambos genes (*VTC2* y *VTC5*) (Conklin et al., 2000; Dowdle et al., 2007; Laing et al., 2007; Lim et al., 2016). Los estudios de sobreexpresión del gen *VTC2* revelan un aumento de las concentraciones de AsA en diversidad de especies vegetales como *Arabidopsis*, patata, fresa y tomate (Bulley et al., 2012; Zhou et al., 2012; Li et al., 2019) con incrementos que duplican dos y tres veces la tasa biosintética del fenotipo silvestre.

Se ha demostrado que en relación con otros genes de la vía, la sobreexpresión de *VTC2* conlleva, de forma general, un aumento en la concentración de vitamina C. Esto proporciona evidencias de ser el paso limitante en la síntesis de AsA por la ruta de Smirnov- Wheeler en muchas especies, así como destacan su importancia para el crecimiento y desarrollo de las plantas, así como dotar de mayor tolerancia a estreses abióticos como la salinidad o el frío (Bulley et al., 2009; Zhang et al., 2011, 2015; Zhou et al., 2012; Yoshimura et al., 2014; Li et al., 2019).



## 2. OBJETIVO

La hipótesis de trabajo sobre la que surge el presente estudio es que plantas que tengan incrementada su capacidad antioxidante deberían, en principio, ser capaces de tolerar niveles de estrés superiores, sin observarse el clásico descenso de la FBN asociado a condiciones de déficit hídrico.

En colaboración con el Dr. Raúl Huertas, investigador postdoctoral en el grupo del Dr. Michael Udvardi del Noble Research Institute (EEUU), hemos obtenido una serie de líneas de *M. truncatula* que sobreexpresan de forma constitutiva el gen *VTC2*, cuyas plantas denominaremos oxVTC2, oxVTC2#2-1 y oxVTC2#4. En estas líneas la región génica de *MtVTC2* (Medtr5g093390) ha sido clonada delante del promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor. Dicha construcción ha sido integrada de forma estable en *M. truncatula* mediante transformación con la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. Además de las líneas sobreexpresantes, y para asegurarnos de que los efectos fenotípicos observados no se deben a efectos secundarios de la inserción, se han empleado dos líneas equivalentes con la misma construcción, pero carente de región génica, líneas que llamaremos de vector vacío (*Empty vector*) cuyas plantas denominaremos EV, EV#4 y EV#6.

El objetivo de nuestro estudio es comprobar si la sobreexpresión del gen *MtVTC2*, enzima clave en la regulación de la biosíntesis del AsA, tiene efectos positivos sobre la FBN en la simbiosis *M. truncatula*-*E. meliloti* bajo condiciones de óptima irrigación y de riego deficitario.



## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1. Material biológico

#### 3.1.1. Material vegetal

El estudio se llevó a cabo sobre dos líneas de plantas de *M. truncatula* R108 que sobreexpresan de forma constitutiva el gen *VTC2*, perteneciente a la ruta biosintética del AsA, a las que denominamos VTC2#2-1 y VTC2#4. A modo de control se usaron otras dos líneas con la misma construcción, pero carentes de la región génica, denominadas EV, la EV#4 y la EV#6.

#### 3.1.2. Material microbiológico

El microsimbionte utilizado fue *Ensifer meliloti* 2011, microsimbionte específico para *M. truncatula*. Para monitorizar la infección y colonización de los rizobios se utilizaron dos cepas diferentes de *E. meliloti*, una que expresaba de forma constitutiva el gen reportero Lac Z y otra que expresaba la proteína verde fluorescente (GFP).

### 3.2. Cultivo de plantas

#### 3.2.1. Germinación de las semillas e inoculación

Las semillas de *M. truncatula* fueron sometidas a un proceso de escarificación sumergiéndolas en ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) durante 8-10 minutos. Tras ello se lavaron sucesivas veces con agua desionizada. Para su esterilización se utilizó hipoclorito sódico al 5% durante 3 minutos, eliminando el resto de desinfectante mediante varios lavados con agua desionizada.

Con el fin de favorecer la imbibición, las semillas se mantuvieron en agua desionizada y agitador rotatorio durante una hora.

## Capítulo 2

La germinación de las semillas se llevó a cabo en placas de agar-  
agua al 7% (p/v), mantenidas a 4°C durante 24 h con el fin de sincronizar  
el proceso. Posteriormente fueron incubadas a temperatura ambiente y  
oscuridad durante 48 h y se seleccionaron las semillas que presentaban  
una radícula apta para su siembra en macetas de 1L que contenía una  
mezcla de perlita: vermiculita (5:2).

El régimen de riego establecido fue de dos días por semana,  
alternando el uso de agua destilada y solución nutritiva Evans (Evans,  
1981) libre de nitrógeno. Con el fin de favorecer el crecimiento de las  
plantas hasta el establecimiento de la simbiosis, durante las dos primeras  
semanas de cultivo la solución de riego fue suplementada con nitrato  
amónico ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) 0.25 mM.

### Solución Nutritiva Evans (1981)

Macronutrientes		Micronutrientes	
$\text{K}_2\text{SO}_4$	0.279 g	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.050 mg
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.023 g	$\text{H}_3\text{BO}_3$	1.430 mg
$\text{CaCl}_2$	0.056 g	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.080 mg
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.145 g	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.220 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.493 g	$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.772 mg
EDTA-Fe	0.017 g	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.117 mg
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.120 g		

Ajustado a 1000 mL con agua destilada.

### 3.2.2. Preparación del inóculo

Todos los inóculos de *E. meliloti* 2011 fueron obtenidos a partir de un cultivo fresco en medio sólido (YEMA) durante 72 h a 28°C. Posteriormente, los rizobios fueron crecidos en matraz con medio YEM líquido adicionado con tetraciclina (Tet) a concentración 10 µg mL<sup>-1</sup>. El cultivo fue mantenido en agitación (120 rpm) a 28°C durante 48 h, alcanzando una densidad óptica equivalente a una suspensión bacteriana de 10<sup>9</sup> células viables mL<sup>-1</sup>.

El medio de cultivo YEM fue esterilizado en autoclave a 120°C durante 30 minutos, y presentaba la siguiente composición:

- Manitol 10 g
- Extracto de levadura 0.4 g
- NaCl 0.1 g
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g
- MgSO<sub>4</sub> heptahidratado 0.2 g
- Agar (si medio sólido) 15 g

Ajustado con agua destilada hasta 1000 mL.

Las plántulas fueron inoculadas con 1 mL de cultivo bacteriano en el momento de la siembra, repitiéndose la inoculación a los 3 días.

### 3.2.3. Condiciones de la cámara de cultivo

Las plantas fueron crecidas en cámara de cultivo (fitotron) bajo condiciones controladas. El fotoperiodo establecido para el cultivo de *M. truncatula* fue de 12 h luz/ 12 h oscuridad con una intensidad luminosa fotosintéticamente activa (PPF) de 500 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. La temperatura fue de 22°C día/ 18°C noche y humedad relativa del 60% día /70% noche. Las macetas fueron distribuidas de manera aleatoria en el fitotron y su

ubicación fue cambiada regularmente.

### 3.3. Planificación del experimento

#### 3.3.1. Diseño experimental

Para llevar a cabo el experimento se sembraron un total de 20 plantas de *M. truncatula* de cada línea (EV#4, EV#6, oxVTC2#2-1 y oxVTC2#4) inoculadas con *E. meliloti* al inicio de la siembra y reinoculadas 3 días después, con el fin de asegurar la nodulación de las plantas. Éstas fueron regadas a capacidad de campo durante 8 semanas, momento en el que las plantas presentaban un crecimiento vegetativo óptimo y previo a la floración.

Se realizaron dos tipos de tratamientos con cada línea de plantas. Un tratamiento Control (C), que consistió en mantener una irrigación óptima de las plantas hasta el momento de su cosecha, y un tratamiento de sequía (S), para lo cual se dejó de suministrar agua a ese grupo de plantas. Dentro de la condición de sequía diferenciamos entre un tratamiento de sequía moderada (SM) en el que establecimos cosechar las plantas al alcanzar un potencial hídrico foliar de entre -1 y -1.5 MPa y una sequía severa (SS), cosechando plantas cuyo potencial hídrico hubiera alcanzado valores cercanos o más negativos de -2 MPa, aproximadamente.

#### 3.3.2. Recolección de plantas

El muestreo tuvo una duración total de 10 días, en los cuales se realizaron medidas no invasivas de FBN, peso, actividad fotosintética (SPAD) y conductancia estomática. Con el fin de minimizar los efectos del tiempo en el crecimiento vegetal, 5 plantas del grupo control fueron cosechadas aleatoriamente a lo largo del muestreo. Las plantas de los

distintos grupos de sequía fueron cosechadas según alcanzaban los potenciales hídricos estipulados. De esta manera conseguimos grupos de 5 plantas para cada uno de los tratamientos establecidos.

Una vez realizadas las medidas fisiológicas, se procedió a la recolección de las diferentes partes de la planta, obteniéndose así muestras de hoja, nódulo y raíz, de las diferentes líneas, que fueron conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posteriores determinaciones o secadas en estufa para la cuantificación del resto de parámetros en estudio.

### 3.4. Metodología empleada

Los datos referentes a biomasa seca, FBN, conductancia estomática, transpiración, potencial hídrico nodular y foliar y el análisis estadístico fueron determinados según se detalla en el capítulo 1.

#### 3.4.1. Determinación del contenido total de clorofila

Con el fin de determinar el contenido relativo de clorofila en la hoja *in situ*, se utilizó un clorofilómetro portátil (Minolta Chlorophyll Meter, SPAD-502). El SPAD evalúa cuantitativamente la intensidad de verde de la hoja, midiendo las transmisiones de luz a 650 nm (donde ocurre la absorción de energía luminosa por la molécula de clorofila) y a 940 nm (donde no ocurre absorción). La medida se llevó a cabo en la hoja más joven totalmente expandida, tomándose varios datos de cada foliolo, y expresadas en unidades SPAD que reflejan el contenido de clorofila total ( $C_{a+b}$ ) presente en la hoja.

#### 3.4.2. Determinación del contenido de AsA total y DHA

La determinación de AsA en el nódulo se llevó a cabo mediante electroforesis capilar de alta afinidad, según el método descrito por Davey et al. (1996). Para ello, 0.1 g de peso fresco de nódulos fueron

homogeneizados en mortero y nitrógeno líquido con 1 mL de ácido metafosfórico 2% (v/v) que contenía 1mM de etilendiaminotetraacetato (EDTA). La mezcla se centrifugó (12 min, 13000 g, 4°C) y filtró, utilizándose el sobrenadante para la determinación de AsA reducido. La electroforesis capilar se llevó a cabo por detección directa por UV a 256 nm, usando un buffer que contenía 60 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 60 mM NaCl (pH 7) y 0.0001% de bromuro de hexadimetrina y bajo las condiciones de potencial de -15 kV y un capilar de 50 µm de diámetro interno y 30/40.2 cm de longitud.

Para obtener el dato de AsA total, las muestras fueron previamente tratadas con 200 mM ditioneitol. La concentración de DHA se obtuvo por diferencia entre la concentración total de AsA y la concentración de su forma reducida.

### 3.4.3. Microscopía de nódulos

Para observar los nódulos a microscopio se realizaron cortes de éstos de aproximadamente 75 µm con vibratomo (Lacer series 1000). En el caso de los nódulos formados por rizobios que estaban marcados con la GFP, la observación se llevó a cabo con un microscopio óptico con filtro de fluorescencia (CH- 9435 Leica Microsystem Heerbrugg, Switzerland), obteniéndose imágenes de los mismos con una cámara Leica MC170 HD acoplada al microscopio. El resto de los cortes fueron observados con un microscopio óptico Zeiss (Zeiss Microscopy, Axioskop2, EE.UU.) y fotografiados con una cámara Nikon d750. Los nódulos fueron previamente teñidos según se detalla a continuación.

La detección *in situ* de especies de oxígeno reactivo se llevó a cabo según Muglia et al., (2008). Para la localización histoquímica del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en nódulos de *M. truncatula-E. meliloti*, éstos se sumergieron en una solución de 10 mM fosfato sódico (pH 7.8) que contenía 5 mg mL<sup>-1</sup> de



diaminobencidina (DAB; Sigma) y dimetil sulfóxido (DMSO) diluido 1:10, según Muglia et al., (2008). Los nódulos fueron sometidos a infiltración por vacío (Groten et al., 2006) durante toda la noche para su posterior corte y visualización a microscopio. La reacción de la DAB con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  origina un precipitado de color marrón, indicador de la presencia del compuesto en el tejido.

La detección del anión  $\text{O}_2^-$  se realizó según el protocolo propuesto por Muglia et al. (2008). Los nódulos fueron expuestos a una solución que contenía 0.1% cloruro de nitroblue tetrazolium (NBT, Sigma) y se sometieron a infiltración por vacío (Groten et al., 2006) durante toda la noche. Transcurrido ese tiempo se procedió al corte de los mismos para poder visualizarlos a microscopio. La presencia de  $\text{O}_2^-$  se denota por aparición de un compuesto azul oscuro (NBT- diformazan) resultado de la interacción de éste con el NBT.

La actividad  $\beta$ -galactosidasa fue detectada por tinción directa de cortes nodulares según el protocolo modificado de Díaz et al. (2005). La solución GUS contenía 0.2 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7), 0.1 M  $\text{MgSO}_4$ , 1 M KCl, 0.1 M  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , 0.1 M  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  y 40  $\text{mg mL}^{-1}$  X-Gal. Las muestras se incubaron durante 1 h a 28°C, y fueron visualizadas a microscopio y fotografiadas.

Para cuantificar la colonización bacteriana y la presencia de ROS en los diferentes cortes nodulares se utilizó el software de análisis de imágenes WinFolia Pro 2019 (Regent Instrument Inc, Canadá).



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Biomasa vegetal

La tabla 2.1 representa el crecimiento de los distintos órganos en estudio de plantas de las líneas EV y oxVTC2 en condiciones hídricas óptimas. Los datos muestran que no existen diferencias significativas entre ambas líneas de plantas en relación a la biomasa de ninguno de los parámetros estudiados.

**Tabla 2.1.** Análisis de la biomasa en peso seco de la parte aérea (PSPA), raíz (PSR) y nódulos (PSN) de plantas de *M. truncatula* EV y oxVTC2 inoculadas con *E. meliloti* en condiciones de plena disponibilidad hídrica. Los valores representan el promedio  $\pm$  EE (n=5). La existencia de diferencias significativas se denota con un asterisco ( $p \leq 0,05$ ) entre las diferentes líneas.

	PSPA (g)	PSR (g)	PSN (g)
EV	1.29 $\pm$ 0.07	0.72 $\pm$ 0.08	0.034 $\pm$ 0.003
oxVTC2	1.46 $\pm$ 0.15	0.69 $\pm$ 0.08	0.039 $\pm$ 0.003

### 4.2. Estudio de la colonización del microsimbionte

Con el fin de analizar la existencia de diferencias en la colonización bacteriana, se realizaron micrografías de cortes nodulares formados por las diferentes líneas de plantas con la tinción X-Gal (Figura 2.2) y mediante la observación de fluorescencia debida a la GFP (Figura 2.3).

En la figura 2.2 observamos cortes nodulares teñidos con la tinción X-Gal que pone de manifiesto la actividad de la enzima  $\beta$  galactosidasa, no observándose diferencias significativas en la colonización bacteriana de los nódulos formados por ambas líneas de plantas (Tabla 2.2).

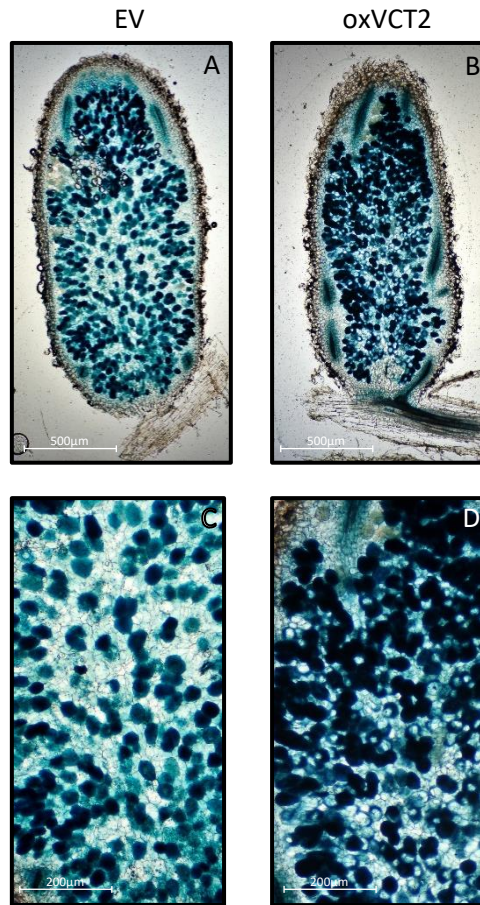


Figura 2.2. Micrografías de cortes de nódulos formados por la simbiosis de *M. truncatula* y *E. meliloti* 2011 con tinción X-Gal para determinar la actividad de la  $\beta$  galactosidasa, en condiciones control. A y C nódulos formados por líneas EV. B y D nódulos formados por líneas oxVCT2.

En la figura 2.3 se muestra la fluorescencia emitida por las bacterias portadoras de la GFP en ambas líneas de plantas. En los distintos nódulos formados por las líneas en estudio la fluorescencia no presenta diferencias significativas (Tabla 2.2).

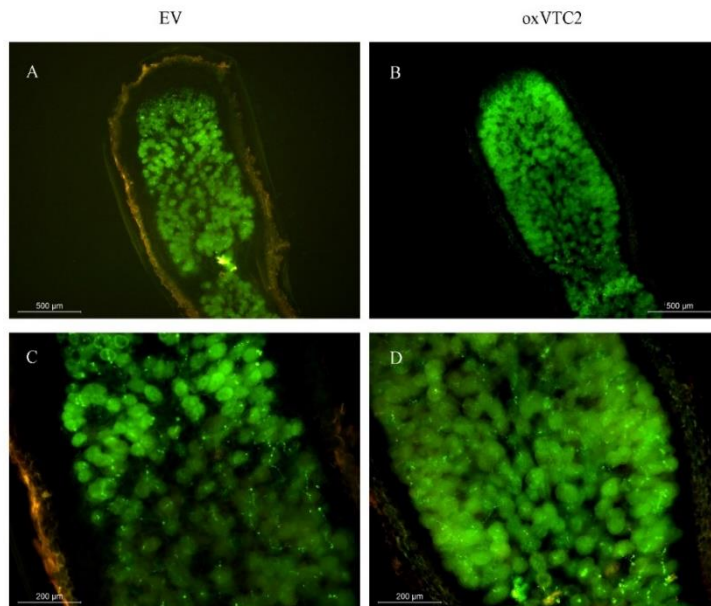


Figura 2.3. Fotografías con microscopio óptico y filtro de fluorescencia de cortes de nódulos formados por la simbiosis de *M. truncatula* y *E. meliloti* 2011, que expresan la proteína verde fluorescente, en condiciones control. A y C nódulos formados por la línea EV. B y D nódulos formados por la línea oxVTC2.

**Tabla 2.2.** Análisis cuantitativo de las imágenes de colonización nodular en plantas de *M. truncatula* EV y oxVTC2 bajo condiciones de plena disponibilidad hídrica. Los valores representan el promedio  $\pm$  EE (n=3). La existencia de diferencias significativas se denota con un asterisco ( $p \leq 0,05$ ) entre las diferentes líneas.

	Lac Z (%)	GFP (%)
<b>EV</b>	48.91 $\pm$ 2.70	80.49 $\pm$ 6.23
<b>oxVTC2</b>	52.76 $\pm$ 8.37	81.70 $\pm$ 7.15

#### 4.3. Detección *in situ* de ROS

Dada la alta actividad oxidante en los nódulos, se realizó el estudio histoquímico de detección *in situ* de diferentes especies de oxígeno reactivo. En la figura 2.4 se muestran cortes nodulares teñidos por exposición a NBT. La presencia de este anión de denota por la

aparición de un precipitado azul oscuro originado por la reacción del anión  $O_2^-$  con el NBT. Podemos observar como en los nódulos formados por la línea EV (Figura 2.4, A y C) aparecen franjas azuladas tanto en la zona apical como basal. Respecto a los nódulos formados por las plantas oxVTC2 no es tan clara la presencia de compuesto azul en la zona basal.

En la figura 2.5 observamos la detección histoquímica de  $H_2O_2$ , denotada por el precipitado de color marrón. Comprobamos como, en

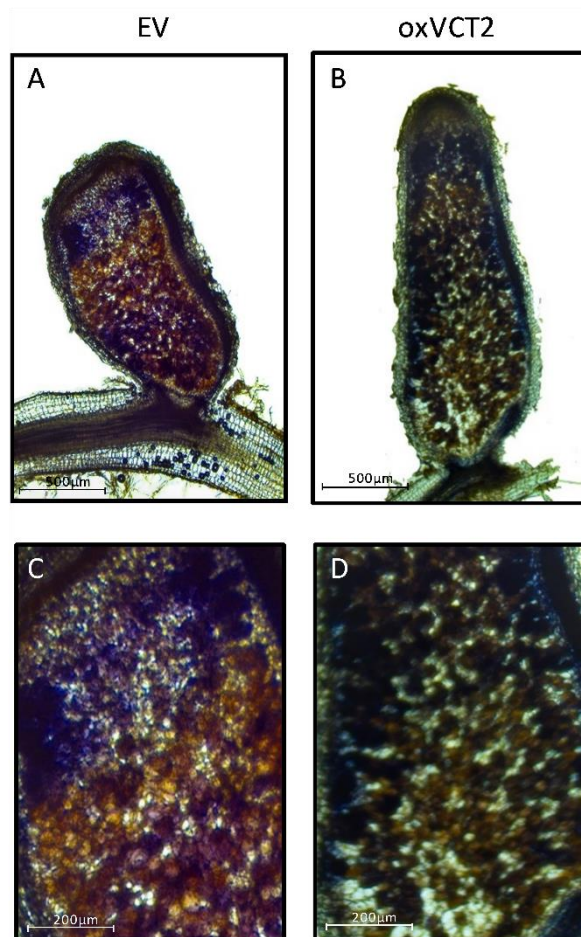


Figura 2.4. Micrografías de cortes de nódulos formados por la simbiosis de *M. truncatula* y *E. meliloti* 2011 en condiciones control, teñidos con NBT para la detección *in situ* de anión superóxido. A y C nódulos formados por la línea EV. B y D nódulos formados por la línea oxVTC2.

nódulos de la línea sobreexpresante (figura 2.5 B y D), es en el ápice nodular donde se acumula más  $H_2O_2$ . En nódulos de plantas EV denotamos la presencia de este compuesto también en la parte central del nódulo.

El análisis cuantitativo confirmó que no existen diferencias significativas entre ambas líneas respecto a la presencia de  $H_2O_2$  y  $O_2^-$  (Tabla 2.3).

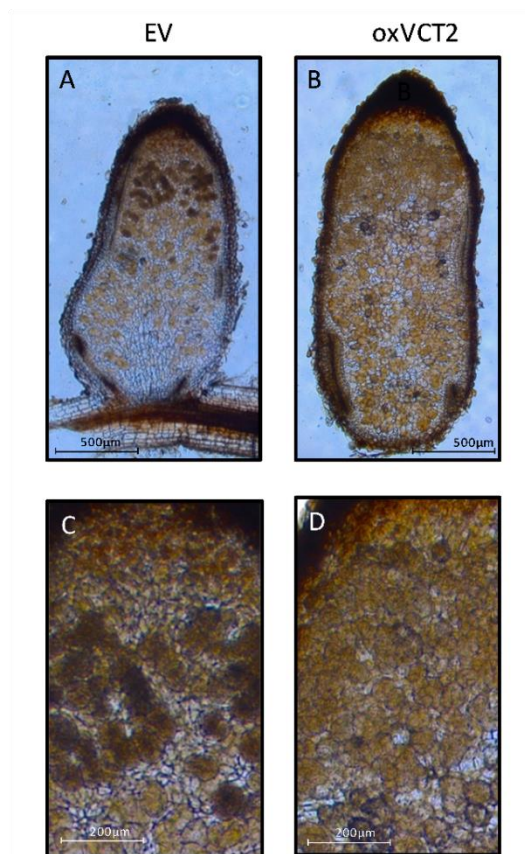


Figura 2.5. Micrografías de cortes de nódulos formados por la simbiosis de *M. truncatula* y *E. meliloti* 2011 con tinción DAB para la detección *in situ* de  $H_2O_2$ , en condiciones control. A y C nódulos formados por la línea EV. B y D nódulos formados por la línea oxVCT2.

**Tabla 2.3.** Análisis cuantitativo de las imágenes de actividad antioxidante de nódulos formados por plantas de *M. truncatula* EV y oxVTC2 en condiciones de plena disponibilidad hídrica. Los valores representan el promedio  $\pm$  EE (n=3). La existencia de diferencias significativas se denota con un asterisco (ANOVA,  $p \leq 0,05$ ) entre las diferentes líneas.

	<b>NBT (%)</b>	<b>DAB (%)</b>
<b>EV</b>	39.74 $\pm$ 1.69	45.77 $\pm$ 8.84
<b>oxVTC#2</b>	46.80 $\pm$ 4.07	31.87 $\pm$ 1.99

#### 4.4. Actividad aparente de la nitrogenasa

En condiciones de estrés hídrico, la ANA (en  $\mu\text{mol H}_2\text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PSN}$ ) se ve drásticamente reducida, como se muestra en la figura 2.6.

Observamos como en condiciones control, es la línea oxVTC2#4 la que presenta una mayor FBN, siendo un valor estadísticamente significativo con respecto a las plantas EV#6 y oxVTC2#2-1.

En el grupo de las plantas EV, la línea EV#4 obtuvo valores de FBN de  $6.02 \pm 0.21 \mu\text{mol H}_2 \text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PSN}$ , frente a los  $4.76 \pm 0.71 \mu\text{mol H}_2 \text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PSN}$  de la línea EV#6. El tratamiento de SM hizo que este valor control disminuyera el 75% y el 88% en SS en ambos casos, sin diferencias significativas frente al grupo de plantas sobreexpresantes, ni entre plantas de esta línea.

Dentro del grupo de plantas que sobreexpresan VTC2 la actividad aparente de la nitrogenasa en condiciones control fue más elevada en la línea #4 que en la #2-1 la cual presenta valores muy similares a las plantas EV. Las plantas oxVTC2#2-1 sufren una disminución de la FBN respecto al control del 74% en SM y del 88% en SS. La línea #4 presenta en condiciones de plena disponibilidad de agua un valor de FBN de  $6.84 \pm 0.67 \mu\text{mol H}_2 \text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PSN}$ , el más elevado de todos los grupos de plantas



en estudio. En situaciones de estrés, sufre las menores pérdidas de actividad nitrogenasa, con valores del 67% en condiciones de sequía moderada y del 85% cuando la sequía se hace severa.

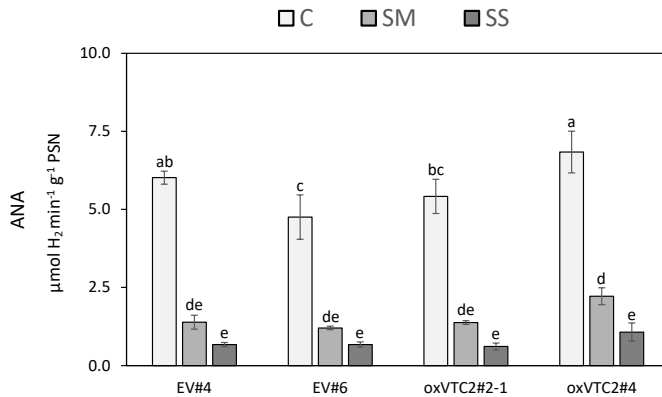


Figura 2.6. Efecto de la sequía sobre la FBN en plantas de *M. truncatula* de las líneas EV (EV#4 y EV#6) y oxVTC2 (oxVTC2#2-1 y oxVTC2#4) inoculadas con *E. meliloti* 2011, en condición de plena disponibilidad de agua (C), sequía moderada (SM) y sequía severa (SS). Los valores representan el promedio  $\pm$  EE (n=5). Las distintas letras representan diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre los tratamientos.

#### 4.5. Contenido de AsA y DHA

El contenido nodular de AsA y DHA de todas las líneas de plantas durante el experimento de sequía se muestran en la figura 2.7.

Observamos como las plantas de las líneas sobreexpresantes muestran valores más elevados de AsA en condiciones de plena disposición de agua, difiriendo significativamente de las líneas no sobreexpresantes.

Entre los grupos de plantas EV la sequía afecta de forma distinta. En la línea EV#4, los dos tratamientos de sequía hacen que la cantidad de AsA disminuya sobre un 30% en sequía moderada y hasta el 80% en el caso de la sequía severa, con diferencias significativas. Mientras que en la línea EV#6 esta disminución solo se hace patente cuando el estrés se torna a severo, presentando una disminución en la cantidad de AsA del 8% en SM y del 75% en SS, respecto a los valores medios control. En ningún caso se denotan diferentes comportamientos en situación de sequía respecto a las plantas oxVTC2.

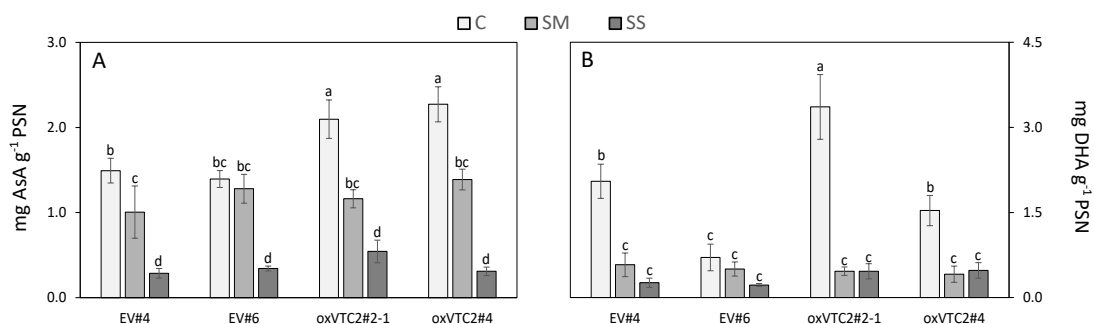


Figura 2.7. Efecto de la sequía en el contenido de ácido ascórbico (A) y deshidroascorbato (B) en plantas de *M. truncatula* de las líneas EV (EV#4 y EV#6) y oxVTC2 (oxVTC2#2-1 y oxVTC2#4) inoculadas con *E. meliloti* 2011, en condición de plena disponibilidad de agua (C), sequía moderada (SM) y sequía severa (SS). Los valores representan el promedio ± EE (n=5). Las distintas letras representan diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre los tratamientos.

Las dos líneas de plantas oxVTC2 presentan un comportamiento similar en los distintos tratamientos. Bajo condiciones de sequía moderada, se ven más afectadas las plantas de la línea oxVTC2#2-1, con una disminución del 44% de su contenido control, frente al 38% de la otra línea. El avance de la sequía hace que la cantidad de AsA siga disminuyendo, pero en este caso, la afección es mayor en la línea #4, donde la pérdida de compuesto asciende al 86% respecto a la condición control, frente al 74% de las plantas de la línea #2-1. En ninguno de los casos se dan diferencias significativas entre estos grupos de plantas.

Respecto a la cantidad de DHA, la línea sobreexpresante #2-1 presenta los valores medios más elevados en condiciones control, siendo diferentes estadísticamente del resto de plantas. Exceptuando las plantas de la línea EV#6, donde no se encuentran comportamientos distintos entre la situación control y los diferentes estados de sequía, el estrés provoca la drástica disminución de la concentración de DHA, no existiendo diferencias entre la severidad de este en ningún grupo de plantas.

#### **4.6. Determinación del estado hídrico de la planta**

##### **4.6.1. Evapotranspiración**

La medida de evapotranspiración relaciona dos procesos combinados. Por un lado, la pérdida de agua desde el sistema suelo, que no suele superar el 10%, y por otro, la proporción de agua que se pierde por las hojas debido a la transpiración de la planta. En la figura 2.8 A está representado el peso del sistema maceta-planta de los diferentes tratamientos (C, SM y SS) donde, la diferencia de pesada representa la cantidad de agua evapotranspirada por la planta.

En todos los casos existen diferencias significativas entre los tratamientos C y los casos donde la disponibilidad de agua era menor (SM y SS). La pérdida de agua fue más evidente entre los tratamientos C y SM, observándose disminuciones del 50% en el caso de las plantas EV y algo menor (en torno al 45%) en plantas de la línea oxVTC2. En el caso de la SS, en las líneas EV la pérdida de agua se estima entorno al 60% respecto a los tratamientos control, y no existen diferencias significativas entre los dos niveles de sequía. Respecto a las plantas oxVTC2 se observa una mayor

pérdida de agua de manera significativa conforme la sequía se acentúa, sin que existan diferencias con las plantas de la línea EV.

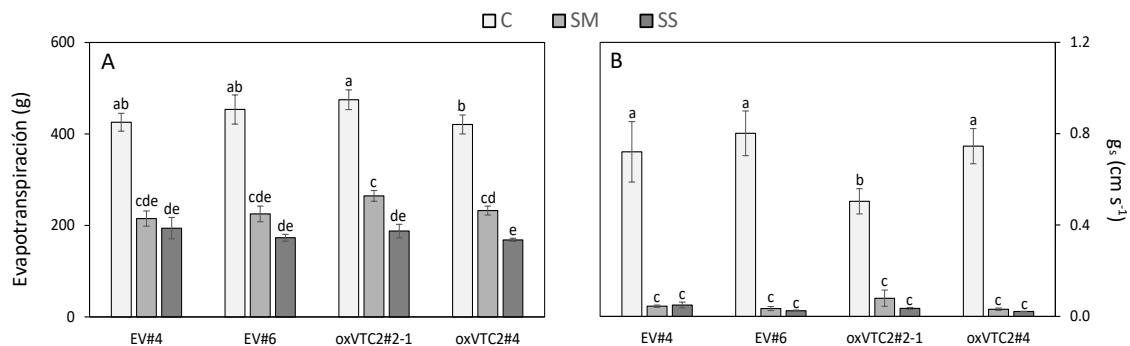


Figura 2.8. Efecto de la sequía en el peso (g) del sistema maceta-planta (A) y la conductancia estomática (B) de plantas de *M. truncatula* de las líneas EV (EV#4 y EV#6) y oxVTC2 (oxVTC2#2-1 y oxVTC2#4) inoculadas con *E. meliloti* 2011, en condición de plena disponibilidad de agua (C), sequía moderada (SM) y sequía severa (SS). Los valores representan el promedio  $\pm$  EE (n=5). Las distintas letras representan la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre los tratamientos.

#### 4.6.2. Conductancia estomática

El estrés hídrico provoca en las plantas el cierre estomático con el fin de minimizar las pérdidas de agua por la superficie foliar. La supresión del riego provocó en todas las plantas el descenso de la conductancia estomática (Figura 2.8, B). En los tratamientos C, las plantas de la línea oxVTC2#2-1 muestran valores significativamente más negativos que el resto de líneas, lo que se traduce en un mayor cierre estomático. En todos los casos, los diferentes tratamientos de sequía indujeron un cierre casi total de los estomas, con un descenso cercano al 95% respecto a los valores control, y no habiendo diferencias significativas entre dichos tratamientos ni líneas vegetales.

### 4.6.3. Potencial hídrico foliar

La figura 2.9 A se muestra el potencial hídrico foliar observándose que, en situación de plena disponibilidad de agua (C), las plantas de la línea oxVTC#2-1 muestran valores medios menos negativos que el resto de líneas de manera significativa.

El tratamiento de SM hace que las plantas EV vean disminuido su potencial hídrico foliar hasta valores medios de -1.58 MPa, mientras que en las líneas oxVTC2 estos valores promedios son de -1.38 MPa, existiendo diferencias significativas entre ambos grupos de plantas.

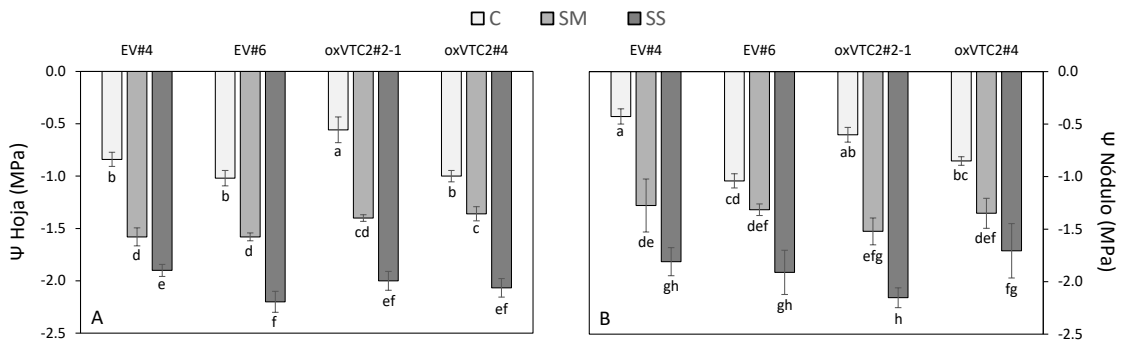


Figura 2.9. Medidas del potencial hídrico foliar (A) y nodular (B) de plantas de *M. truncatula* de las líneas EV (EV#4 y EV#6) y oxVTC2 (oxVTC2#2-1 y oxVTC2#4) inoculadas con *E. meliloti* 2011, en condición de plena disponibilidad de agua (C), sequía moderada (SM) y sequía severa (SS). Los valores representan el promedio  $\pm$  EE (n=5). Las distintas letras representan diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre los tratamientos.

La sequía severa provoca que este parámetro siga disminuyendo, alcanzándose valores diferentes significativamente de entre -1.90 y -2.20 MPa en las líneas EV#4 y EV#6 respectivamente, y de -2.00 MPa en plantas de las líneas VTC2, no existiendo diferencias significativas entre las distintas líneas de plantas sobreexpresantes o no.

### 4.6.4. Potencial hídrico nodular

La figura 2.9 B muestra los valores medios del potencial hídrico nodular, donde observamos como a medida que el agua deja de estar disponible los valores son más negativos.

## Capítulo 2

Los diferentes tratamientos de sequía hacen que los valores de potencial hídrico de los nódulos se vean reducidos en todas las líneas de plantas respecto a la situación control, no observándose diferencias significativas en ningún caso entre las plantas EV y oxVTC2.

Se observan diferencias significativas en los valores medios en situación C en las distintas plantas de la línea EV. Dentro de este grupo de plantas, en la línea EV#4 tanto la SM como la SS conllevan una disminución con diferencias significativas respecto a su control, situación que sólo se observa en la línea EV#6 cuando la sequía es severa.

Respecto a las plantas oxVTC2, en la línea oxVTC2#2-1 existen diferencias significativas con respecto a la situación C en los dos niveles de sequía, y entre ambos tratamientos de privación de agua. En la línea VTC2#4 se observan diferencias entre la situación control y la sequía, no observándose diferencias entre los dos niveles de déficit hídrico.

## 5. DISCUSIÓN

El AsA juega un papel fundamental en plantas como antioxidante, ya que protege a las células de las ROS generadas como consecuencia del metabolismo aeróbico, jugando un papel clave en su captación en nódulos (Matamoros et al., 2006; Becana et al., 2010). Por otra parte, también está involucrado en la tolerancia de las plantas a diferentes estreses abióticos, como el déficit hídrico, que generan, en el vegetal, sobreproducción de ROS, pudiendo actuar directamente sobre ellas, o indirectamente, vía enzimática, a través de la AsA peroxidasa.

Actualmente, a causa de la domesticación de los cultivos, los niveles de AsA se han ido diluyendo en pro de un mayor crecimiento y producción de las plantas cultivadas, lo que podría tener consecuencias importantes para el rendimiento de los cultivos, sobre todo en términos de tolerancia y plasticidad frente a cambios ambientales (Gest et al., 2013; Macknight et al., 2017). Por ello, la manipulación biotecnológica de genes de la ruta de síntesis del AsA, puede ser una vía para originar cultivos más resistentes a los ambientes estresantes (Lisko et al., 2014). Se ha comprobado que, de forma generalizada, la sobreexpresión del gen *VTC2* en diferentes vegetales hace aumentar la cantidad de AsA en la planta (Bulley et al., 2012; Zhou et al., 2012), lo que parece mejorar la respuesta a estreses (Zhang et al., 2015).

En nuestro estudio caracterizamos las respuestas fisiológicas de plantas de *M. truncatula* que sobreexpresan el gen *MtVTC2* bajo condiciones óptimas de irrigación y sometiéndolas a varios niveles de sequía en simbiosis con *E. meliloti*.

### **Efectos de la sobreexpresión del gen VTC2 en la simbiosis *M. truncatula*- *E. meliloti* en estado de óptima irrigación**

El AsA está presente en todos los tejidos de la planta a excepción de las semillas secas. Es sintetizado principalmente en órganos fotosintéticos, siendo transportado fácilmente entre los diferentes tejidos y órganos de la planta (Smirnoff, 2005; Zechmann, 2011). Mediante las medidas de AsA realizadas en nódulos (figura 2.6), podemos observar como en condiciones de plena disponibilidad de agua, este compuesto se acumula de manera significativa en los nódulos formados por las plantas sobreexpresantes. Esta mayor cantidad de AsA nodular en nuestro trabajo no ofrece una ventaja frente a la eliminación de ROS, como se denota en las imágenes de detección *in situ* de ROS (Figuras 2.4 y 2.5 y tabla 2.3). Pese al efecto positivo en el incremento de AsA nodular en las líneas de plantas sobreexpresantes, la biomasa de nódulos tampoco se ve beneficiada respecto a las líneas control (Tabla 2.1).

A nivel de nodulación, el estudio mediante micrografías (Figuras 2.2 y 2.3), confirma que la capacidad de colonización de los rizobios es similar, no existiendo distinción entre los nódulos de las diferentes líneas de plantas (Tabla 2.2).

El AsA está presente en nódulos en concentraciones elevadas, de 1-2 mM. Su concentración, así como la actividad de enzimas implicadas con este compuesto (como la AsA peroxidasa) están directamente relacionadas con el proceso de FBN (Matamoros, et al., 2018). Dado que en nuestro trabajo existen diferencias de concentración de AsA en situación de plena disponibilidad de agua entre los nódulos formados por las distintas líneas de plantas, esperábamos encontrar una mayor tasa de FBN de los nódulos de plantas sobreexpresantes. No obstante, bajo



nuestras condiciones, se observa un incremento de la FBN en los nódulos formados por la línea oxVTC2#4, aunque sin diferencias entre otra de las líneas que no sobreexpresan el gen. Asumimos que el mayor contenido de AsA nodular no ofrece una ventaja para la FBN, de manera que no podemos afirmar que la sobreexpresión del gen *MtVTC2* en plantas de *M. truncatula* mejore la eficiencia de la simbiosis con *E. meliloti* en condiciones óptimas de crecimiento. En este trabajo se usó el promotor constitutivo CaMV35S, utilizado ampliamente en el análisis funcional de nódulos de leguminosas. Los datos obtenidos por Auriac y Timmers (2007) sugieren que este promotor era inactivo en el meristemo y en las células infectadas de los nódulos de raíz de *M. truncatula*. Asumimos que, aunque el promotor no se esté expresando de forma homogénea en el nódulo, sí que ocasionó un aumento en la expresión del gen *MtVTC2* y como resultado, un aumento en los niveles de AsA en el tejido.

#### **Efectos de la sobreexpresión del gen VTC2 en la simbiosis *M. truncatula*- *E. meliloti* en situación de déficit hídrico**

Las diferentes líneas de *M. truncatula* fueron sometidas a una privación progresiva del riego para testar el posible efecto beneficioso de la sobreproducción de AsA que presentaban. Uno de los primeros mecanismos de defensa de la planta frente al estrés hídrico es el cierre estomático, evitando así un exceso en la pérdida de agua por transpiración. Las dos funciones clave de los estomas son controlar la transpiración y la entrada de CO<sub>2</sub>, lo cual se transforma en la principal limitación de la fotosíntesis, generando un coste en términos de crecimiento vegetal en condiciones de sequía. Al disminuir la apertura estomática se limita la disminución excesiva del potencial hídrico foliar, garantizando que la demanda de agua de las hojas no exceda al suministro

de agua del sistema (Flexas y Medrano, 2002). La privación del riego ocasionó una rápida reducción de la conductancia estomática, independientemente de la sobreexpresión (Figura 2.8, B), que se vio reflejado en una disminución progresiva de los potenciales hídricos de hoja y nódulos (Figura 2.9).

### **Contenido de AsA y FBN**

La sobreexpresión del gen *MtVTC2* ha sido estudiada en otras especies no leguminosas, demostrándose un aumento significativo de la producción de AsA en las plantas sobreexpresantes en condiciones control y en condiciones desfavorables (Bulley et al., 2012; Zhang et al., 2015; Ali et al., 2019), lo cual constituye una mejora para la productividad y supervivencia de los cultivos.

En nuestros experimentos, observamos como las líneas oxVTC2 al igual que las EV ven disminuida la concentración de AsA (Figura 2.7 A) a medida que las condiciones de déficit hídrico se acentúan. Esta disminución no se traduce en un aumento de la concentración de DHA (Figura 2.7 B), por lo que podemos pensar que, en condiciones de sequía, el transporte de AsA desde los órganos fotosintéticos al nódulo se vea disminuido, o exista una desviación de la vía de síntesis hacia otras rutas metabólicas. La disminución de la concentración de AsA en leguminosas en condiciones de déficit hídrico ha sido reportada por otros investigadores tanto en parte aérea como en nódulos (Zabalza et al., 2008; Seminario et al., 2017).

En condiciones de estrés hídrico el proceso de FBN se ve progresivamente afectado a lo largo del experimento, lo que puede

producir la senescencia de nódulos y su inactividad de forma irreversible (Arrese-Igor, et al., 2011). En todas las líneas de plantas testadas la FBN se vio progresivamente inhibida (Figura 2.6) en los diferentes grados de déficit hídrico. Ante la aparición de ROS en los nódulos en condiciones de déficit hídrico, el AsA juega un papel importante, ya que regenera el  $\alpha$ -tocoferol oxidado por las ROS en las membranas celulares y actúa como sustrato de la AsA peroxidasa (Matamoros et al., 2018). Tras los resultados obtenidos, la sobreexpresión del gen *MtVTC2* no proporciona una mejoría de la actividad fijadora cuando las plantas eran sometidas a estrés hídrico.



## 6. CONCLUSIONES

- La sobreexpresión del gen *MtVTC2* produce un aumento en la síntesis de AsA de plantas de *M. truncatula*.
- La sobreexpresión de *MtVTC2* en plantas de *M. truncatula* no afecta a la colonización bacteriana de los nódulos formados en simbiosis con *E. meliloti*.
- A pesar de tener incrementada la capacidad antioxidante, tanto el crecimiento como las respuestas fisiológicas observadas en las líneas de plantas oxVTC2 no se traducen en una mayor tolerancia a los niveles de estrés hídrico.
- La actividad fijadora de nódulos en la simbiosis *M. truncatula*-*E. meliloti*, bajo condiciones control y en condición de déficit hídrico, no se ve mejorada con la sobreexpresión del gen *MtVTC2*.



## CAPÍTULO 3

Efecto de la perfusión foliar con Asn en la regulación de la fijación biológica de nitrógeno en plantas de *Glycine max*.





# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Regulación de la FBN por nitrógeno

Cuando hay N suficiente en el suelo las leguminosas regulan negativamente el número, tamaño y actividad fijadora de sus nódulos radiculares con el fin de optimizar la energía y los recursos, debido al alto coste de C que conlleva para la planta el proceso de fijación de nitrógeno atmosférico (Streeter y Wong, 1988). Se ha estimado que por cada gramo de nitrógeno fijado son necesarios entre 5 y 12 gramos de carbono (Minchin y Witty, 2005), por lo que la planta hospedadora debe regular estrictamente el proceso para evitar que suponga una carga metabólica excesiva. Parece probable que en este control de la actividad fijadora estén implicadas las principales formas de intercambio orgánico entre el macro y el microsimbionte (Prell y Poole, 2006). Ya que la tasa de crecimiento de la planta está determinado por la capacidad de sintetizar carbohidratos y compuestos nitrogenados aportados por la fijación de los nódulos (relación C:N), hay autores que suponen que el control de la actividad fijadora se rige a través del estado nitrogenado del macrosimbionte (Sulieman y Schulze, 2010).

Touraine (2004) define el concepto de demanda de N como el equilibrio entre la cantidad real de N en los tejidos vegetales y el requerimiento de dicho nutriente. Por lo tanto, si la demanda de compuestos nitrogenados es menor que la tasa de N fijado, una hipótesis de trabajo es que se envíen señales al nódulo, vía floema, que reducirán la FBN (Sulieman y Tran, 2013). Parece que el estado nitrogenado de la planta se detecta con mayor intensidad en la parte aérea, enviándose las señales a las raíces y nódulos, acerca de la carga en N de la planta entera (Marino et al., 2007).

Existen hipótesis que respaldan la idea de que estas señales son compuestos nitrogenados generados por la planta, cuya acumulación reduciría la tasa de FBN con el fin de mantener el equilibrio C:N del vegetal (Schubert, 2007; Sulieman, 2011). La adquisición de un adecuado equilibrio entre el N requerido por la planta y la disponibilidad de C viene determinada por un lado por el control del número y desarrollo de los nódulos [proceso de autorregulación de la nodulación (Ferguson et al., 2010, 2019)] y por la regulación por N de la FBN en los tejidos simbióticos (Jeudy et al., 2010), procesos que son controlados por diferentes mecanismos.

### **1.2. Implicación de los aminoácidos en la regulación de la FBN**

Debido a las diferencias tanto en la estructura como en la anatomía de los nódulos de las diferentes leguminosas, muchos han sido los compuestos nitrogenados sugeridos como candidatos responsables de la inhibición por nitrógeno de la FBN. Algunos autores apuntan a los ureidos, cuya acumulación se observa en hojas de soja (De Silva et al., 1996; Purcell et al., 1998) y nódulos (Ladrera et al., 2007) sometidos a sequía. También aminoácidos como la Asn o el Asp, propuestos como “moléculas señal” que desencadenan la inhibición de la FBN en soja (Serraj et al, 1999; Vadez et al., 2000), posiblemente a través del ciclo de aminoácidos entre el citosol de la planta y los bacteroides propuesto por Sulieman y Tran (2013). Whitehead et al. (2001) comprueban que el aumento de PAs en los nódulos de soja tienen la capacidad de reducir el suministro de N fijado a la planta, observándose una correlación del contenido de PAs y la tasa de FBN (Lahiri et al., 2004).

Dado que los aminoácidos se presentan en grandes cantidades en el floema de las plantas, parecen ser claros candidatos para desempeñar el

papel de señalización a larga distancia del estado nitrogenado de la planta, desde las hojas a los nódulos (Sulieman et al., 2014). Compuestos como Asn, Asp, Gln, Glu y GABA pueden tener un papel clave en este proceso, debido a que son exportados en grandes cantidades desde la parte aérea del macrosimbionte, se producen rápidamente en el proceso de asimilación de N y tienen un fuerte impacto sobre la actividad fijadora de los nódulos (Sulieman et al., 2010).

### 1.2.1. La asparagina

La Asn es un importante aminoácido con peso molecular de 132.12 g mol<sup>-1</sup> soluble en agua (en soluciones tanto ácidas como básicas) y con gran estabilidad. Se trata de una sustancia que, en leguminosas, está involucrada en la germinación, la asimilación de nitrógeno y la FBN. Presenta una alta relación C:N (2:4), lo que la convierte en una molécula favorable para el transporte y almacenamiento de N en las plantas (Lea et al., 2007).

Aunque las leguminosas son clasificadas como ureídicas o amídicas, dependiendo del compuesto exportado a la parte aérea como producto final de la FBN (Sprent, 2009), se ha visto que especies como la soja emplean también Asn como compuesto nitrogenado exportado a la planta (Tajima et al., 2000; Lima y Sodek, 2003).

La Asn se sintetiza principalmente en las células infectadas, a partir del aspartato en una reacción dependiente de ATP. En esta reacción la Asn sintetasa cataliza la transferencia de un grupo amida desde la Gln, con la formación de Asn y Glu. Gaufichon et al. (2010) también comprobaron que la Asn sintetasa podía usar directamente el NH<sub>3</sub> como sustrato cuando su concentración es elevada.

Ya que el metabolismo del C/N está estrechamente relacionado en prácticamente todas las rutas metabólicas dentro de la planta, la síntesis de este aminoácido es fundamental para el mantenimiento del equilibrio entre los metabolitos carbonados y nitrogenados (Suliman y Tran, 2013). En plantas no leguminosas como tabaco o maíz sujetas a condiciones de bajo C, se ve incrementada la síntesis de Asn, mientras que el resto de aminoácidos ve disminuida su concentración (Stitt et al., 2002; Brouquisse et al., 2007).

### 1.2.2. Efectos de la Asn en la inhibición de la FBN

El impacto negativo de la aplicación exógena de ASN sobre la FBN han sido abordados mediante diferentes procedimientos. En comparación con el uso de diferentes fuentes de nitrógeno combinado, la aplicación de Asn tiene la ventaja de no alterar las reservas internas de carbono, vinculadas estrechamente con la entrada de fotoasimilados al nódulo (Oti-Boateng y Silsbury, 1993).

Estudios previos en leguminosas exportadoras de ureidos muestran como la aplicación exógena de Asn provoca la inhibición de la FBN. Serraj et al. (1999b) aplican una solución 10mM de Asn a plantas de soja noduladas cultivadas hidropónicamente, observando un descenso de la FBN a partir de las 48 h de tratamiento. Este efecto también era notable cuando se aplicaba una solución de menor concentración (3-9 mM) bajo las mismas condiciones (Vadez et al., 2000).

En leguminosas exportadoras de amidas, la aplicación vía raíces cortadas o por inyección directa al tallo de Asn marcada 10 mM, reduce la FBN en un 50-70%, observándose como a las 48 h de tratamiento la medida de Asn marcado era 7 veces superior en hojas que en raíces (Oti-Boateng y

Silisbury, 1993). Sulieman et al. (2010) sometieron a plantas de *M. truncatula* noduladas a alimentación por peciolo con una solución de Asn marcada, lo que provocó una acumulación de esta amida en los nódulos junto a una fuerte inhibición de la FBN. En este experimento observan que del total de  $^{15}\text{N}$  el 10% se localizaba en los nódulos.



## 2. OBJETIVO

Estudios previos sugieren que la FBN está regulada desde la parte aérea de la planta por compuestos nitrogenados transportados vía floema según las necesidades de nitrógeno de la planta hospedadora. En este contexto, debido a su rápida producción y alto transporte, así como por el impacto que ejercen sobre la actividad fijadora de nódulos, los aminoácidos parecen ser posibles candidatos en esta señalización a larga distancia.

Por ello, el objetivo principal de este capítulo fue analizar si un incremento en la concentración foliar de Asn tendría efectos negativos sobre la FBN de plantas de soja en simbiosis con *B. diazoefficiens*, estudiando los posibles cambios producidos en el metabolismo del sistema debidos al incremento de compuestos nitrogenados en la parte aérea.





## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1. Material biológico

Para este estudio se utilizaron plantas de soja [*Glycine max* (L.) Merr] de la variedad Sumatra, caracterizada por su productividad, gran tamaño de grano y alta cantidad de proteína, comercializadas por la empresa Caussade semences S.L.

Como inoculante se empleó el microsimbionte específico de soja *Bradyrhizobium diazoefficiens* cepa UPM 752.

### 3.2. Cultivo de plantas

#### 3.2.1. Germinación de las semillas e inoculación

Las semillas fueron esterilizadas según el método descrito por Labhili et al. (1995) para semillas de trigo. Durante 40 min se sumergieron las semillas en una solución de SDS al 0.01% (p/v) e hipoclorito sódico al 1% (v/v). Transcurrido este tiempo y después de ser lavadas con agua desionizada, fueron introducidas en durante 10 minutos en una solución con HCl 0.01N, siendo lavadas nuevamente con agua desionizada al finalizar la desinfección.

La germinación se llevó a cabo en bandejas con perlita y vermiculita estériles (1:1), hidratadas con agua destilada, en cámara de germinación a 26°C y oscuridad durante 4 días. Tras este tiempo se seleccionan las semillas que presentan una radícula con el tamaño adecuado para su trasplante a macetas de 0.6 L de capacidad, usándose como sustrato una mezcla de perlita y vermiculita (2:1), previamente humedecida y autoclavada. En el momento del trasplante, las plántulas fueron inoculadas con 1 mL de un cultivo líquido de *B. diazoefficiens*, obtenido según se detalla en el siguiente apartado, repitiéndose el proceso tres días tras la siembra.

### Capítulo 3

El régimen de riego establecido fue de dos días por semana a capacidad de campo, alternando entre solución nutritiva carente de nitrógeno a pH 6.8 según Rigaud y Puppo (1975) y agua destilada.

#### **Solución Nutritiva (modificado de Rigaud-Puppo, 1975)**

<u>Macronutrientes</u>		<u>Micronutrientes</u>	
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.174 g	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.11 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.200 g	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.85 mg
CaCl <sub>2</sub>	0.134 g	CuSO <sub>4</sub>	0.20 mg
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.044 g	ZnSO <sub>4</sub>	0.55 mg
MgSO <sub>4</sub>	0.123 g	MnSO <sub>4</sub>	3.07 mg
Secuestrene (Fe)	0.025 g	CoCl <sub>2</sub>	0.12 mg

Ajustado a 1000 mL con agua destilada.

#### 3.2.2. Preparación del inóculo

El inóculo se cultivó durante 96 h a 28°C en medio sólido YEMA (Yeast Extract Manitol Agar). Posteriormente, para obtener el inóculo se dejó crecer en matraz con medio YEM líquido y en agitación (150 rpm) durante 3 días a 28°C, hasta obtener una densidad de 10<sup>9</sup> células viables por mililitro de medio YEM según la escala de McFarland (McFarland, 1907).

El medio de cultivo YEM fue esterilizado en autoclave a 120°C durante 30 minutos, y presentaba la siguiente composición:

- Manitol 10 g
- Extracto de levadura 0.4 g
- NaCl 0.1 g
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g
- MgSO<sub>4</sub> heptahidratado 0.2 g
- Agar (si medio sólido) 15 g
- Completado con agua destilada hasta 1000 mL

### 3.2.3. Condiciones de la cámara de cultivo

Las macetas se distribuyeron aleatoriamente en la cámara de cultivo, cambiando su ubicación de manera regular. Fueron crecidas bajo las siguientes condiciones controladas: fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad, a una temperatura de 24°C día/ 18°C noche y una humedad relativa del 60% durante el día y 70% durante la noche.

## 3.3. Planificación del experimento

### 3.3.1. Diseño experimental

Para la realización del experimento, fueron sembradas un total de 8 plantas por cada tratamiento. Tras 4 semanas de cultivo, las plantas fueron divididas en 3 grupos, correspondientes al tiempo 0 (T0), plantas control y plantas tratadas con Asn. A todas ellas se les realizó perfusión a través del peciolo de la primera hoja que desarrolló, con una solución inicial a base de agua destilada para todos los grupos de plantas.

### 3.3.2. Recolección de plantas

El experimento tuvo una duración de 35 días en las condiciones anteriormente mencionadas. Previo a la toma de muestra vegetal, a un total

de 8 plantas por cada tratamiento se les midió la ANA. Transcurridas las primeras 24 h del corte del peciolo, se recolectaron las plantas correspondientes al grupo “tiempo 0”, con el fin de minimizar los efectos de la perturbación en el metabolismo vegetal. En ese momento también se cambió la solución acuosa de las plantas del grupo “plantas Asn” por una solución con asparagina  $^{15}\text{N}$  a concentración 2 mM. Las siguientes cosechas fueron realizadas 3, 4 y 5 días tras la perfusión de las plantas, correspondientes a los tratamientos 48, 72 y 96 h respectivamente. De cada cosecha se obtuvo material vegetal (raíz, arte aérea y nódulos) en cantidades suficientes para las posteriores determinaciones conservándose las muestras a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.4. Metodología empleada**

Los datos referentes a biomasa seca, FBN, concentración de carbohidratos solubles, polioles, ácidos orgánicos y aminoácidos, así como el análisis estadístico se llevaron a cabo según se detalla en el Capítulo 1. Por otra parte, la determinación del contenido relativo total de clorofilas se obtuvo tal cual se explica en el Capítulo 2.

#### **3.4.1. Perfusión de las plantas**

El sistema de alimentación por peciolo se llevó a cabo según Lin et al. (2011), con pequeñas modificaciones en el grosor de los tubos y volumen de las jeringas utilizados. Para la solución de asparagina se empleó Asn marcada  $^{15}\text{N}$  (Sigma-Aldrich).

#### **3.4.2. Cálculo de la carga nitrogenada**

La determinación del estado nitrogenado tanto de la parte aérea como de los nódulos se calculó como indican Parsons y Sunley (2001), considerando la proporción de glutamina, glutamato y  $\alpha$ -cetoglutarato.

### 3.4.3. Determinación de ureidos

Para la determinación de ureidos en los diferentes órganos se utilizaron los extractos obtenidos para la determinación de ácidos orgánicos (ver Capítulo 1, apartado 3.4.9).

La concentración de ureidos (ácido alantoico y alantoína) de los diferentes tejidos se determinó mediante electroforesis capilar de alta resolución en un equipo Beckman PACE MDQ (Beckman Instruments, Fulerton, CA, EEUU) según el método descrito por Sato et al. (1998).

### 3.4.4. Enriquecimiento en y porcentaje $^{15}\text{N}$

La determinación de la  $\delta^{15}\text{N}$  se realizó a partir de material vegetal seco de parte aérea, raíces y nódulos. Las muestras de material vegetal, previamente pesadas (4-5 mg) y encapsuladas en cápsulas de estaño (97,5%) se combustionaron en un analizador elemental (Carlo Erba NC 2500) hasta generar los gases  $\text{N}_2$  y  $\text{CO}_2$  (condiciones de combustión:  $T^{\text{a}}$  columna de oxidación  $1020^{\circ}\text{C}$ ,  $T^{\text{a}}$  columna de reducción:  $650^{\circ}\text{C}$ ). Los gases generados se analizaron en el espectrómetro de masas (EA-Conflo II-IRMS. ThermoQuest, Delta Plus). El análisis de la composición isotópica del nitrógeno ( $\delta^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) se hizo considerando las señales registradas para las masas 29 ( $^{15}\text{N}^{14}\text{N}$ ) y 28 ( $^{14}\text{N}^{14}\text{N}$ ) y se expresa como:

$$\delta^{15/14}\text{N} (0/00) = ((R_p/R_s) - 1) \times 1000$$

Siendo,

$R_p$ : relación  $^{15}\text{N}^{14}\text{N}$  en la muestra

$R_s$ : relación en el estándar internacional

A partir del  $\delta^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ , y teniendo en cuenta también el contenido total de nitrógeno (%) y la biomasa (g), se calculó la cantidad de  $^{15}\text{N}$  de cada tejido y del total de la planta, a partir del cual se calculó el% de  $^{15}\text{N}$  en cada tejido.



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Crecimiento vegetal y contenido en clorofila

En la tabla 3.1 se representa el crecimiento de las diferentes partes de la planta y los niveles relativos de clorofila encontrados en hojas, determinados como unidades SPAD. Observamos como el tratamiento de perfusión de 4 días con una solución que contenía 2 mM de Asn sólo presenta variaciones en peso seco de la parte aérea, que es significativo respecto a su control al cuarto día de tratamiento, donde la parte aérea de las plantas que fueron perfusionadas con Asn se ve incrementada. La perfusión no origina cambios en el peso seco del resto de órganos estudiados.

De igual manera, el índice SPAD de plantas a las que se les trató con Asn no difiere significativamente de los valores de plantas control.

**Tabla 3.1:** Efecto de la perfusión con 2 mM de Asn <sup>15</sup>N en el peso seco de las diferentes partes de la planta: parte aérea (PSPA), raíz (PSR) y nódulos (PSN) y del contenido relativo total de clorofilas en plantas de *G. max* inoculadas con *B. diazoefficiens*. Cada punto representa la media de 5 réplicas biológicas  $\pm$  EE. La existencia de diferencias significativas con respecto al control se denota con un asterisco ( $p \leq 0.05$ ).

		PSPA	PSR	PSN	SPAD
Control	T0	0.77 $\pm$ 0.15	0.42 $\pm$ 0.04	0.065 $\pm$ 0.003	20.1 $\pm$ 1.7
	48 h	0.69 $\pm$ 0.11	0.52 $\pm$ 0.08	0.071 $\pm$ 0.005	23.0 $\pm$ 1.7
	72 h	0.64 $\pm$ 0.04	0.45 $\pm$ 0.03	0.077 $\pm$ 0.004	25.8 $\pm$ 1.0
	96 h	0.46 $\pm$ 0.01	0.34 $\pm$ 0.02	0.058 $\pm$ 0.002	24.3 $\pm$ 0.8
Asn 2 mM	T0	0.77 $\pm$ 0.15	0.42 $\pm$ 0.04	0.065 $\pm$ 0.003	20.1 $\pm$ 1.7
	48 h	0.68 $\pm$ 0.09	0.46 $\pm$ 0.05	0.063 $\pm$ 0.004	22.1 $\pm$ 1.4
	72 h	0.54 $\pm$ 0.04	0.43 $\pm$ 0.03	0.067 $\pm$ 0.003	24.3 $\pm$ 1.4
	96 h	0.52 $\pm$ 0.03*	0.34 $\pm$ 0.03	0.057 $\pm$ 0.003	26.1 $\pm$ 0.6

#### 4.2. Actividad aparente de la nitrogenasa

La medida de FBN, cuantificada como actividad nitrogenasa aparente, fue realizada tanto en las plantas sometidas a perfusión con una solución de Asn  $^{15}\text{N}$  a concentración 2 mM como en las plantas control (figura 3.1). Los resultados denotan una bajada de la FBN a día 2 del tratamiento, que difiere significativamente de su respectivo control. En los posteriores días de cultivo, la actividad FBN de los nódulos de ambos grupos de plantas no muestra diferencias significativas.

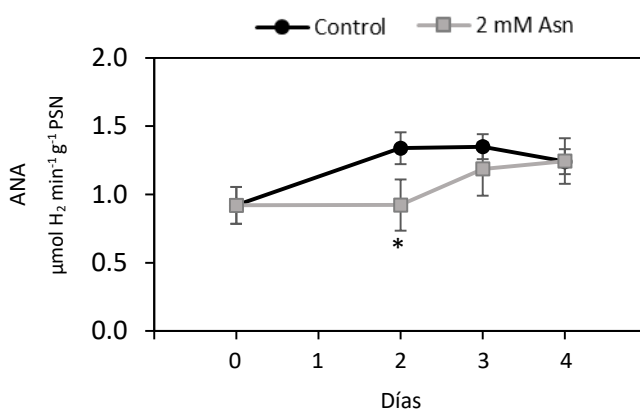


Figura 3.1: Variación de la FBN de plantas de *G. max* inoculadas con *B. diazoefficiens* sometidas a perfusión con 2 mM de Asn  $^{15}\text{N}$  durante 4 días. Cada punto representa la media de 8 réplicas biológicas  $\pm$  EE. La existencia de diferencias significativas con respecto al control se denota con un asterisco ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4.3. Cantidad total de $^{15}\text{N}$ en parte aérea y nódulo

En la figura 3.2 se muestra la cantidad total de  $^{15}\text{N}$  encontrada en parte aérea y nódulos, así como la cantidad de solución de Asn 2 mM que penetró en las plantas del tratamiento de perfusión.



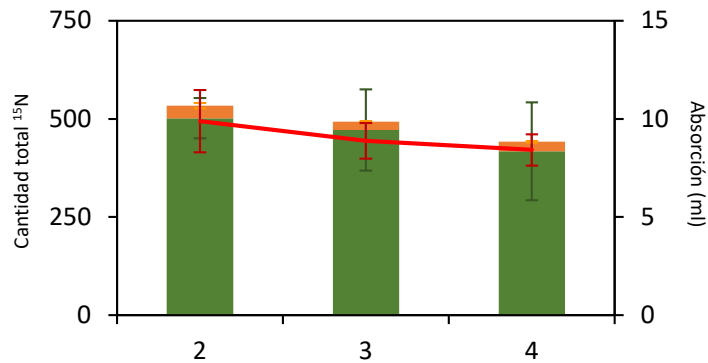


Figura 3.2: Variación de la cantidad total de  $^{15}\text{N}$  encontrado en parte aérea (verde) y nódulo (naranja) y cantidad de solución absorbida (línea roja) en plantas de soja sometidas a perfusión con 2 mM de  $\text{Asn } ^{15}\text{N}$  durante 4 días. Cada punto representa la media de 5 réplicas biológicas  $\pm$  EE. La existencia de diferencias significativas en el tiempo se denotan con un asterisco ( $p \leq 0,05$ ).

En los diferentes días muestreados tanto la absorción de plantas control como la de plantas suplementadas con  $\text{Asn}$  tiende a disminuir, sin existir diferencias ni en el tiempo ni debidas al tratamiento.

Para monitorizar la cantidad total de nitrógeno marcado, se analizaron los  $\delta^{15/14}\text{N}$  tanto de la parte aérea como de los nódulos. Conforme avanzan los días de tratamiento, de forma más acusada en la parte aérea, observamos que el marcaje en  $^{15}\text{N}$  disminuye, pero sin presentar diferencias en la cantidad de  $^{15}\text{N}$  total entre los días analizados. En nódulos, a las 48 h de tratamiento, encontramos un 9% del total de  $^{15}\text{N}$ , proporción que disminuye a las 72 h en un 3% y con un valor del 8.2% del total de  $^{15}\text{N}$  al fin del tratamiento, no siendo estos datos diferentes significativamente entre sí.

#### 4.4. Niveles de carbohidratos solubles en parte aérea y nódulo

De los carbohidratos analizados en la parte aérea (Figura 3.3), la sacarosa se presenta como el mayoritario, observándose una variación dependiendo del tiempo experimental, de manera que al segundo día de

### Capítulo 3

tratamiento y a día 4 aumenta significativamente su concentración respecto a las plantas control. La fructosa y la glucosa son los carbohidratos que encontramos en segundo lugar según su concentración. Éstos presentan una tendencia similar a lo largo del tratamiento. A día 3 del experimento, la perfusión con Asn origina un

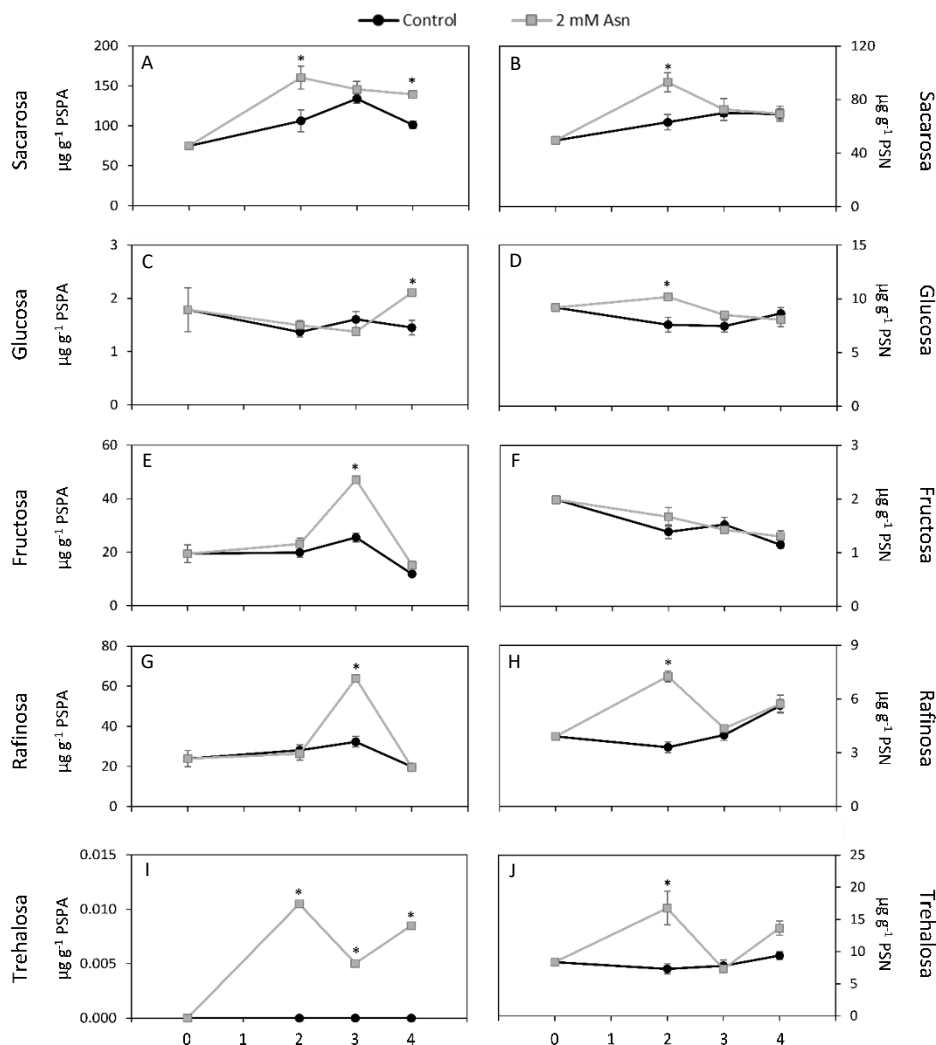


Figura 3.3: Efecto de la perfusión con 2 mM de Asn  $^{15}\text{N}$  durante 4 días sobre el contenido en distintos carbohidratos en parte aérea (izquierda) y nódulos (derecha) de plantas de *G. max* inoculadas con *B. diazoefficiens*. Cada punto representa la media de 8 réplicas biológicas  $\pm$  EE. La existencia de diferencias significativas con respecto al control se denota con un asterisco ( $p \leq 0,05$ ).

incremento significativo de su concentración alrededor del 50% al tercer día de perfusión, cantidad que recupera los valores control a las 96 h de tratamiento. La rafinosa es el carbohidrato que se presenta de forma minoritaria. Durante el tiempo que duró el experimento sólo hubo variación a día 4, cuando la concentración de este metabolito superó un 45% la concentración control. Curiosamente detectamos trazas de trehalosa en plantas perfusionadas con Asn, indetectable en las plantas control.

En el nódulo observamos como, a excepción de la fructosa, el resto de los carbohidratos analizados presentan la misma tendencia a lo largo de nuestro experimento. A las 48 h encontramos un aumento en la concentración de azúcares que se incrementan desde un 35% en el caso de la glucosa, al 130% de la trehalosa. Durante consecutivos días de tratamiento, los valores de carbohidratos son reestablecidos, a excepción de la trehalosa, que fluctúa considerablemente a lo largo del tiempo, de manera significativa respecto a su control.

#### **4.5. Niveles de polioles en parte aérea y nódulo**

En el mismo extracto obtenido para el análisis de carbohidratos analizamos los polioles tanto en hojas como en nódulos. En la parte aérea el inositol se presenta como el mayoritario, seguido de mioinositol y sorbitol en menor medida. La perfusión con Asn origina a las 48 h un incremento del 93, 36 y 31% de mioinositol, pinitol y sorbitol, respectivamente, diferenciándose de los valores control. A las 72 h de tratamiento, pinitol y sorbitol sufren una disminución cercana al 30% en sus concentraciones, mientras que la cantidad de mioinositol permanece en los valores control. Al finalizar el experimento, todos los compuestos presentan concentraciones similares a las de las plantas control.

En cuanto al análisis de polioles en los nódulos, a diferencia de la parte aérea, observamos que el pinitol se presenta como mayoritario, seguido de mioinositol y sorbitol. En este caso, la concentración de pinitol no varía a lo largo del tiempo. Tanto mioinositol como sorbitol ven incrementada su concentración a las 48 h tras la perfusión, con valores medios de 62  $\mu\text{g g}^{-1}$  PSPA frente a los 38  $\mu\text{g g}^{-1}$  PSPA en situación control del mioinositol y 4  $\mu\text{g g}^{-1}$  PSPA, frente a los 2.31  $\mu\text{g g}^{-1}$  PSPA de las plantas perfusionadas con la solución control en el caso del sorbitol.

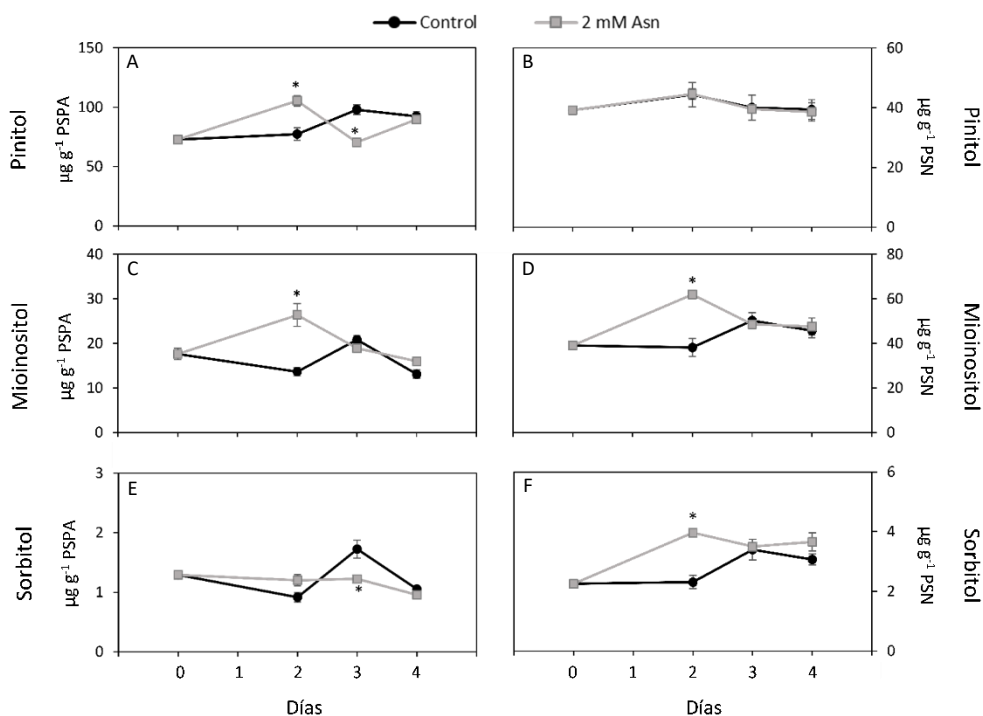


Figura 3.4: Efecto de la perfusión con 2 mM de  $\text{Asn}^{15\text{N}}$  durante 4 días sobre el contenido de polioles en parte aérea (A, C y E) y nódulos (B, D y F) de plantas de *G. max* inoculadas con *B. diazoefficiens*. Cada punto representa la media de 8 réplicas biológicas  $\pm$  EE. La existencia de diferencias significativas con respecto al control se denota con un asterisco ( $p \leq 0,05$ ).

## 4.6. Análisis de ácidos orgánicos

### 4.6.1. Contenido de ácidos orgánicos en nódulo

En la tabla 3.2 se recogen las concentraciones de los ácidos orgánicos que se vieron afectados durante el tratamiento de perfusión realizado. Malato y malonato fueron los compuestos mayoritarios, con una media de 12.48 y 11.90  $\mu\text{g g}^{-1}$  PSN en situación control y 13.82 y 12.96  $\mu\text{g g}^{-1}$  PSN en el tratamiento de perfusión, respectivamente. La perfusión con Asn hace que los valores medios del malato se vean incrementados, con diferencias significativas respecto a su control al tercer día de tratamiento, mientras que el malonato incrementa su concentración a las 48 h de ser perfusionadas las plantas. Entre el resto de ácidos orgánicos estudiados que se ven afectados por el tratamiento con Asn están el oxalato y el lactato, con concentraciones minoritarias y un promedio de 0.85 y 0.45  $\mu\text{g g}^{-1}$  PSN, respectivamente, a lo largo del experimento. El oxalato muestra una tendencia similar al malonato, incrementando su concentración un 36% a día 2 de tratamiento, mientras que el lactato

**Tabla 3.2.** Contenido en ácidos orgánicos  $\mu\text{g g}^{-1}$  PSN en nódulos de plantas de *G. max* inoculadas con *B. diazoefficiens* y perfusionadas con una solución 2 mM de Asn durante 4 días. Cada punto representa la media de 8 réplicas biológicas  $\pm$  EE. La existencia de diferencias significativas con respecto al control se denota con un asterisco ( $p \leq 0.05$ ).

		Malato	Malonato	Oxalato	Lactato
Control	T0	14.17 $\pm$ 0.44	11.54 $\pm$ 0.34	0.77 $\pm$ 0.02	0.47 $\pm$ 0.04
	48 h	13.15 $\pm$ 1.23	12.00 $\pm$ 1.21	0.82 $\pm$ 0.09	0.37 $\pm$ 0.06
	72 h	12.15 $\pm$ 1.11	13.08 $\pm$ 1.07	0.84 $\pm$ 0.07	0.59 $\pm$ 0.05
	96 h	10.43 $\pm$ 0.59	10.97 $\pm$ 0.62	0.79 $\pm$ 0.05	0.39 $\pm$ 0.03
Asn 2 mM	T0	14.17 $\pm$ 0.44	11.54 $\pm$ 0.34	0.77 $\pm$ 0.02	0.47 $\pm$ 0.04
	48 h	13.89 $\pm$ 1.11	14.72 $\pm$ 0.49*	1.11 $\pm$ 0.04*	0.39 $\pm$ 0.07
	72 h	12.88 $\pm$ 0.49	12.57 $\pm$ 0.31	0.73 $\pm$ 0.02	0.44 $\pm$ 0.07*
	96 h	14.35 $\pm$ 1.87*	13.00 $\pm$ 0.96	0.93 $\pm$ 0.11	0.50 $\pm$ 0.02*

disminuye al tercer día y supera en un 30% los valores control al finalizar el tratamiento.

#### 4.6.2. Contenido de ácidos orgánicos en parte aérea

En la tabla 3.3 se recogen los datos de las concentraciones de ácidos orgánicos que sufrieron modificaciones con el tratamiento de perfusión foliar en la parte aérea. En este órgano, el ácido orgánico mayoritario fue el malonato con concentraciones en torno a 10 µg g<sup>-1</sup> PSPA. La perfusión con Asn hace que sus valores medios varíen a lo largo del tiempo, disminuyendo su concentración a los 3 días de tratamiento y superando al control en un 30% al finalizar el estudio. El malato aparece como el segundo compuesto mayoritario de este grupo, sufriendo un incremento desde el primer día de tratamiento con Asn y triplicando los valores control al cuarto día de ser perfusionadas las plantas.

**Tabla 3.3.** Efecto de la perfusión con 2 mM de Asn <sup>15</sup>N durante 4 días sobre el contenido en ácidos orgánicos (mg g PSPA<sup>-1</sup>) en parte aérea de plantas de *G. max* inoculadas con *B. diazoefficiens*. Cada punto representa la media de 8 réplicas biológicas ± EE. La existencia de diferencias significativas con respecto al control se denota con un asterisco (p ≤ 0.05).

		Malonato	Malato	Citrato	Succinato	α-ceto glutarato
Control	T0	15.87 ± 0.79	1.70 ± 0.19	1.05 ± 0.12	0.15 ± 0.02	0.15 ± 0.02
	48 h	8.88 ± 0.94	2.48 ± 0.21	0.91 ± 0.04	0.22 ± 0.01	0.17 ± 0.01
	72 h	10.39 ± 0.56	1.58 ± 0.17	1.84 ± 0.37	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01
	96 h	6.39 ± 0.62	1.98 ± 0.13	1.17 ± 0.10	0.14 ± 0.02	0.26 ± 0.03
Asn 2 mM	T0	15.87 ± 0.79	1.70 ± 0.19	1.05 ± 0.12	0.15 ± 0.02	0.15 ± 0.02
	48 h	7.73 ± 0.33	2.81 ± 0.15	2.48 ± 0.13*	0.13 ± 0.01*	0.41 ± 0.02*
	72 h	7.86 ± 0.51*	2.50 ± 0.17*	1.35 ± 0.12	0.13 ± 0.01	0.20 ± 0.01
	96 h	8.40 ± 0.37*	5.68 ± 1.15*	2.32 ± 0.18*	0.25 ± 0.01*	0.19 ± 0.02

#### 4.7. Contenido de ureidos en parte aérea y nódulo

El análisis del contenido en ureidos totales (ácido alantoico y alantoína) en parte aérea y nódulos se refleja en la figura 3.5. En nódulos de plantas tratadas con Asn observamos un descenso de la concentración con valores de  $0.35 \pm 0.04 \mu\text{g g}^{-1}$  PSN frente a los  $0.60 \pm 0.04 \mu\text{g g}^{-1}$  PSN de su respectivo control.

En la parte aérea, el tratamiento de perfusión hizo que la concentración de ureidos fluctuase a lo largo de nuestro experimento, disminuyendo en relación a las plantas control a día 2 y 4 de tratamiento con descensos del 53 y 65% respectivamente.

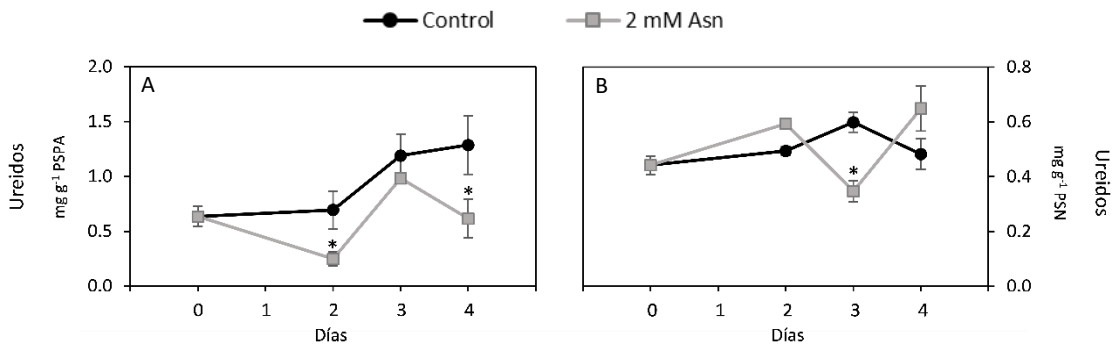


Figura 3.5: Contenido total de ureidos (ácido alantoico y alantoína) en hojas (A) y nódulos (B) de plantas de *G. max* inoculadas con *B. diazoefficiens* perfusión con 2 mM de Asn <sup>15</sup>N durante 4 días. Cada punto representa la media de 8 réplicas biológicas  $\pm$  EE. La existencia de diferencias significativas con respecto al control se denota con un asterisco ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.8. Carga nitrogenada de parte aérea y nódulo

El análisis de la carga nitrogenada muestra como la aplicación de una solución 2 mM de Asn vía alimentación por peciolo mejora la carga nitrogenada de parte aérea en un 90% a las 48 h de tratamiento, valor que disminuye a las 72 h cuando la diferencia es del 30% respecto a su

control (Figura 3.5, A). Sin embargo, en el análisis de carga nitrogenada de la fracción nodular no existen diferencias significativas (Figura 3.3, B).

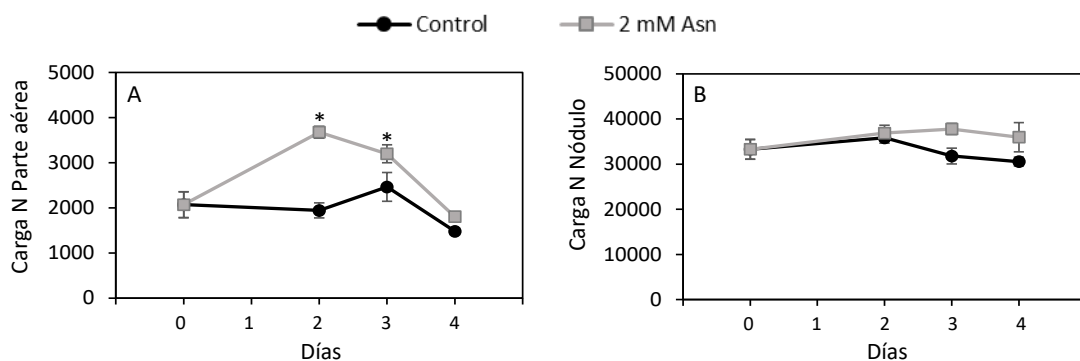


Figura 3.6: Carga de nitrógeno en parte aérea (A) y nódulo (B) de plantas de *G. max* inoculadas con *B. diazoefficiens* sometidas a perfusión con 2 mM de Asn <sup>15</sup>N durante 4 días. Cada punto representa la media de 8 réplicas biológicas  $\pm$  EE. La existencia de diferencias significativas con respecto al control se denota con un asterisco ( $p \leq 0.05$ ).

## 4.9. Contenido de aminoácidos

### 4.9.1. Aminoácidos detectados en nódulo

La tabla 3.4 recoge los valores medios del perfil de aminoácidos que presentaron variaciones a lo largo del cultivo en los nódulos. De los 11 compuestos, todos sufrieron un incremento en la concentración causado por el proceso de perfusión, exceptuando el contenido de Asn, que fue menor que los valores control a las 48 h de inicio del tratamiento, e His cuya cantidad se vio afectada negativamente pasadas 96 h del inicio de la perfusión. Aminoácidos como Asp, Tyr, Phe, Ile y Leu vieron incrementadas sus concentraciones de forma significativa respecto al control en todos los días analizados.



**Tabla 3.4.** Contenido en aminoácidos (mg g PSN<sup>-1</sup>) de nódulos de plantas de *G. max* inoculadas con *B. diazoefficiens* sometidas a perfusión con 2 mM de Asn <sup>15</sup>N durante 4 días. Cada punto representa la media de 8 réplicas biológicas ± EE. La existencia de diferencias significativas con respecto al control se denota con un asterisco ( $p \leq 0.05$ ).

		ASN	ASP	HIS	THR	TYR	TRP
Control	T0	37.54 ± 2.96	10.31 ± 0.48	2.43 ± 0.12	1.98 ± 0.08	1.66 ± 0.10	1.47 ± 0.11
	48 h	64.01 ± 4.87	8.31 ± 0.32	2.87 ± 0.32	2.39 ± 0.16	2.50 ± 0.13	1.95 ± 0.11
	72 h	64.12 ± 4.68	5.61 ± 0.53	2.64 ± 0.38	1.84 ± 0.17	2.10 ± 0.26	1.74 ± 0.25
	96 h	96.11 ± 9.90	4.65 ± 0.63	3.83 ± 0.75	2.78 ± 0.24	2.59 ± 0.21	1.58 ± 0.04
Asn 2 mM	T0	37.54 ± 2.96	10.31 ± 0.48	2.43 ± 0.12	1.98 ± 0.08	1.66 ± 0.10	1.47 ± 0.11
	48 h	24.86 ± 1.75*	11.67 ± 0.33*	2.05 ± 0.11	1.75 ± 0.03	4.46 ± 0.12*	4.02 ± 0.17*
	72 h	59.78 ± 5.52	6.81 ± 0.53*	2.32 ± 0.13	2.17 ± 0.19	3.00 ± 0.13*	2.09 ± 0.20
	96 h	98.15 ± 11.80	7.20 ± 0.67*	4.30 ± 0.18*	3.17 ± 0.25*	4.36 ± 1.07*	2.20 ± 0.19
		PHE	ARG	VAL	ILE	LEU	Total
Control	T0	1.04 ± 0.05	2.09 ± 0.16	1.39 ± 0.06	0.86 ± 0.04	0.64 ± 0.05	113.24 ± 4.63
	48 h	1.56 ± 0.09	1.40 ± 0.09	1.26 ± 0.05	0.75 ± 0.03	0.62 ± 0.04	140.28 ± 7.11
	72 h	1.72 ± 0.11	1.23 ± 0.06	1.24 ± 0.07	0.68 ± 0.07	0.57 ± 0.06	128.22 ± 7.57
	96 h	2.22 ± 0.20	1.04 ± 0.06	1.41 ± 0.09	0.81 ± 0.07	0.61 ± 0.06	165.86 ± 12.28
Asn 2 mM	T0	1.04 ± 0.05	2.09 ± 0.16	1.39 ± 0.06	0.86 ± 0.04	0.64 ± 0.05	113.24 ± 4.63
	48 h	4.03 ± 0.21*	1.51 ± 0.03*	1.80 ± 0.06*	1.27 ± 0.03*	1.05 ± 0.07*	112.42 ± 1.18*
	72 h	2.58 ± 0.10*	1.18 ± 0.02	1.39 ± 0.04	0.88 ± 0.03*	0.69 ± 0.01*	133.27 ± 5.27
	96 h	3.72 ± 0.66*	1.22 ± 0.01*	1.61 ± 0.15	0.91 ± 0.09*	0.82 ± 0.07*	179.59 ± 19.35

### 4.9.2. Aminoácidos detectados en parte aérea

El análisis de los aminoácidos de la parte aérea que sufrieron alteraciones en su concentración tras la perfusión con Asn 2 mM se recoge en la tabla 3.5. La práctica totalidad de los aminoácidos estudiados sufrieron un aumento de sus concentraciones al inicio del tratamiento, a excepción de la Asn, que disminuye a las 48 h sin diferencias significativas respecto a su control. La Pro también sufre una disminución a las 72 h de la perfusión sin variaciones en los días restantes. Observamos como las concentraciones de Glu, Phe, Asp, Val, GABA y Thr son mayores que los valores control en todos los días muestreados. Leu, His, Tyr y Asn incrementan su concentración sólo en los muestreos a 72 y 96 h.

**Tabla 3.5.** Efecto de la perfusión con 2 mM de Asn <sup>15</sup>N durante 4 días sobre el contenido en aminoácidos (mg g PSPA<sup>-1</sup>) en parte aérea de plantas de *G. max* inoculadas con *B. diazoefficiens*. Cada punto representa la media de 8 réplicas biológicas ± EE. La existencia de diferencias significativas con respecto al control se denota con un asterisco (p ≤ 0.05).

		GLU	GABA	ALA	ASN	PHE	GLN	TRP	THR
Control	T0	1.90 ± 0.30	0.55 ± 0.07	0.77 ± 0.08	0.86 ± 0.03	0.43 ± 0.08	0.30 ± 0.02	0.56 ± 0.03	0.24 ± 0.04
	48 h	1.78 ± 0.16	1.58 ± 0.23	1.11 ± 0.15	0.94 ± 0.10	0.55 ± 0.03	0.54 ± 0.05	0.29 ± 0.01	0.38 ± 0.02
	72 h	2.34 ± 0.31	0.58 ± 0.10	0.90 ± 0.13	0.41 ± 0.05	0.91 ± 0.09	0.49 ± 0.04	0.44 ± 0.07	0.40 ± 0.02
	96 h	1.28 ± 0.05	1.77 ± 0.09	1.14 ± 0.03	1.36 ± 0.25	0.75 ± 0.05	0.34 ± 0.03	0.27 ± 0.05	0.50 ± 0.03
Asn 2 mM	T0	1.90 ± 0.30	0.55 ± 0.07	0.77 ± 0.08	0.86 ± 0.03	0.43 ± 0.08	0.30 ± 0.02	0.56 ± 0.03	0.24 ± 0.04
	48 h	3.27 ± 0.15*	2.05 ± 0.09*	2.37 ± 0.11*	0.72 ± 0.03	0.07 ± 0.00*	2.69 ± 0.12*	0.20 ± 0.01	0.63 ± 0.03*
	72 h	3.00 ± 0.20*	0.73 ± 0.04	0.82 ± 0.05	3.16 ± 0.43*	1.18 ± 0.15*	0.58 ± 0.06	0.30 ± 0.03*	0.58 ± 0.03*
	96 h	1.54 ± 0.06	2.22 ± 0.27*	1.11 ± 0.10	3.60 ± 0.14*	1.10 ± 0.11*	0.94 ± 0.04*	0.30 ± 0.09	0.52 ± 0.04

**Tabla 3.5 (continuación).** Efecto de la perfusión con 2 mM de Asn <sup>15</sup>N durante 4 días sobre el contenido en aminoácidos (mg g PSPA<sup>-1</sup>) en parte aérea de plantas de *G. max* inoculadas con *B. diazoefficiens*. Cada punto representa la media de 8 réplicas biológicas  $\pm$  EE. La existencia de diferencias significativas con respecto al control se denota con un asterisco ( $p \leq 0.05$ ).

		ASP	PRO	VAL	TYR	ILE	LEU	HIS	Total
Control	T0	0.26 $\pm$ 0.04	0.15 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.00	0.05 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.00	5.73 $\pm$ 0.57
	48 h	0.38 $\pm$ 0.06	0.13 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.00	0.07 $\pm$ 0.00	0.05 $\pm$ 0.00	7.81 $\pm$ 0.60
	72 h	0.26 $\pm$ 0.06	0.16 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.03	0.09 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.00	0.05 $\pm$ 0.01	7.97 $\pm$ 0.31
	96 h	0.12 $\pm$ 0.00	0.10 $\pm$ 0.00	0.12 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.00	0.08 $\pm$ 0.01	7.63 $\pm$ 0.23
Asn 2 mM	T0	0.26 $\pm$ 0.04	0.15 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.00	0.05 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.00	5.73 $\pm$ 0.57
	48 h	1.82 $\pm$ 0.08*	0.20 $\pm$ 0.03*	0.20 $\pm$ 0.01*	0.06 $\pm$ 0.00	0.13 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.00	0.05 $\pm$ 0.00	14.45 $\pm$ 0.65*
	72 h	0.78 $\pm$ 0.04*	0.11 $\pm$ 0.43	0.16 $\pm$ 0.03*	0.36 $\pm$ 0.05*	0.14 $\pm$ 0.03	0.17 $\pm$ 0.03*	0.09 $\pm$ 0.01*	10.21 $\pm$ 0.74*
	96 h	0.48 $\pm$ 0.09*	0.12 $\pm$ 0.14	0.27 $\pm$ 0.01*	0.44 $\pm$ 0.03*	0.21 $\pm$ 0.06*	0.24 $\pm$ 0.04*	0.23 $\pm$ 0.02*	10.92 $\pm$ 0.77*

## 5. DISCUSIÓN

### **Efecto de la alimentación por peciolo sobre la FBN**

Estudios anteriores han informado que suplementando la solución nutritiva de plantas de soja con concentraciones menores de 2 mM de Asn se promovía la biomasa de nódulos, así como su actividad fijadora, seguramente por el mejorado estado nitrogenado de la planta hospedadora. Por otro lado, cuando las plantas eran suplementadas con concentraciones superiores del mismo aminoácido (3-10 mM) el efecto provocado era el contrario, mostrándose una reducción en la biomasa nodular y la inhibición parcial o completa de la FBN (Serraj et al., 1999b; Vadez et al., 2000).

En nuestro estudio, buscamos una concentración que inhibiese temporalmente la FBN, permitiendo la recuperación de la actividad fijadora, con el fin de dilucidar qué compuestos variaban en ese periodo de tiempo. La aplicación de una concentración de Asn marcada 2 mM vía alimentación por peciolo en plantas de soja noduladas hizo que la FBN disminuyera un 30% respecto a la tasa de fijación de las plantas control (figura 3.1) a las 48 h de tratamiento, dato acorde con los estudios previos. Dado que la FBN se recuperó progresivamente en días posteriores, nos centramos en analizar los cambios metabólicos que ocasionaba nuestro tratamiento a las 48 h de su imposición.

Observamos como la perfusión con Asn 2 mM hizo que el estado nitrogenado de la planta mejorase sin repercusiones en la carga de N de nódulos (Figura 3.5, B). Como era de esperar, debido en gran parte a la corta duración de nuestro experimento, la mejora en la carga nitrogenada no supuso un aumento en la biomasa vegetal (Tabla 3.1) tal como encuentran

Sulieman et al. (Sulieman et al., 2014) en plantas de *M. truncatula* suplementadas con nitrato.

El análisis isotópico del N reveló que, a las 48 h de tratamiento, el 91% del N suplementado se distribuía en la parte aérea, translocándose a los nódulos un 9%. Este aporte de N a la biomasa nodular fue disminuyendo en los días posteriores (5% y 7% a 72 y 96 horas, respectivamente). Plantas de soja suplementadas con diferentes fuentes de N marcadas, muestran una distribución de <sup>15</sup>N mayoritaria en parte aérea, y solo un 1.5 – 3.0% de <sup>15</sup>N en nódulos (Yamashita et al., 2019).

### **Efecto de la alimentación por peciolo sobre la concentración de compuestos nitrogenados en parte aérea y nódulos**

Serraj et al. (1999b) comprueban que la perfusión de tallos de soja con ureidos y su adición en la solución nutritiva de las plantas ocasionaba una disminución en la FBN, no observando un incremento de estos compuestos en los nódulos, pero sí en la parte aérea. Diferente era el caso de las mismas plantas sometidas a sequía donde la acumulación de ureidos en el nódulo está correlacionado con la reducción de la actividad fijadora del nódulo (Serraj et al., 1999b; Ladrera et al., 2007). En nuestro experimento el aporte extra de Asn a la parte aérea origina una acumulación no significativa de ureidos (figura 3.5) en los nódulos radiculares tras 2 días de tratamiento que coincide con un menor transporte de éstos a la planta. Por ello asumimos que la reducción de la FBN observada a las 48 h de exposición a la solución con Asn no parece deberse a una acumulación de estos compuestos a nivel de parte aérea o nódulos en condiciones de plena disponibilidad hídrica.

Experimentos previos de suplementación con Asn en la solución nutritiva de plantas de soja mostraban una menor tasa fijadora de los

nódulos, acompañada de un incremento de la concentración foliar y nodular de Asn (Vadez et al., 2000). En nuestro análisis del perfil aminoacídico de hojas (tabla 3.5) de plantas perfusionadas con Asn, este compuesto curiosamente no mostró un aumento en su concentración a día 2 de tratamiento. En cambio, glutamato, glutamina y aspartato aumentan bruscamente (1.8, 5 y 4.7 veces los valores control, respectivamente). Es lógico pensar que, tal como observaron Atkins et al. (1983) en altramuza, la asparagina suministrada vía foliar se esté descomponiendo por acción de la enzima asparaginasa en aspartato y  $\text{NH}_4^+$ , y este último rápidamente incorporado a glutamato/glutamina en el proceso de asimilación de N en hojas. En plantas de soja suplementadas con nitrato se observa un incremento en la concentración de Asp en el floema, junto a una disminución en Asn (Lima y Sodek, 2003). En nuestro experimento la concentración de Asp nodular se ve aumentada un 40% sobre los valores control a 48 h de tratamiento de perfusión y coincidiendo con un descenso en la FBN. En el ciclo de aminoácidos del bacteroide propuesto por Lodwig et al. (2003), la planta suministra Glu a los bacteroides que será metabolizado a Asp o Ala a partir de OAA, siendo reciclados al citosol vegetal. Al no existir variaciones en la concentración de Glu nodular cabría pensar que este aumento de Asp se deba a un aporte de la planta cuando las concentraciones son elevadas. Similar respuesta obtienen Yamashita et al. (2019) al suplementar plantas de soja noduladas con diferentes fuentes de nitrógeno, denotando una alteración al alza del Asp nodular.

La limitación de los bacteroides para asimilar el  $\text{NH}_4^+$  fijado mediante el proceso de FBN los hace dependientes de la planta para la obtención de otras formas nitrogenadas. La pérdida de la facultad para producir aminoácidos ramificados por parte del bacteroide fue denominada auxotrofia simbiótica y ocasiona una total dependencia de la planta para la

obtención de aminoácidos como leucina, isoleucina y valina (Prell et al., 2009). En nuestro experimento la aplicación vía peciolo de Asn hace que se incremente la concentración de estos aminoácidos un 44% en parte aérea a las 48 h de tratamiento ocasionando un mayor aporte de los mismos al nódulo donde observamos un aumento de la concentración total de estos aminoácidos un 56% superior a la detectada en nódulos de plantas control (Tabla 3.4) y que disminuye en días posteriores (10 y 15% a las 72 y 96 h respectivamente). Este incremento de aminoácidos a las 48 h coincide con el descenso de la actividad fijadora de los nódulos. En este punto el *pool* de aminoácidos aromáticos nodulares también se ve fuertemente incrementado con valores que superan los control un 78, 106 y 158% para tirosina, triptófano y fenilalanina, respectivamente.

Mientras que el tratamiento de perfusión con Asn origina un desequilibrio en el *pool* total de aminoácidos de la parte aérea, más acusado a las 48 h de tratamiento, cuando el *pool* en nódulos se ve disminuido. El descenso de la actividad fijadora nodular podría ser un mecanismo regulatorio del N global del sistema cuando los requerimientos en N de la planta están cubiertos. El aporte extra de aminoácidos ramificados al nódulo y el incremento en la síntesis de aminoácidos aromáticos, podrían ser el detonante que provoca la inhibición de la FBN.

### **Efecto de la alimentación por peciolo sobre la concentración de carbohidratos**

El incremento en N de la planta hace que se aumenten las concentraciones de fotoasimilados en las hojas (Figura 3.3), sin un aumento significativo en la cantidad de clorofilas de las hojas (Tabla 3.1). Estos



metabolitos carbonados son transportados al nódulo, donde observamos una acumulación de sacarosa 2.3 veces mayor que la control que coincide con la bajada de la actividad fijadora de nódulos. González et al. (2001) demuestran que la alteración de la actividad o expresión de enzimas claves como la SS o la PEPC son fundamentales para la FBN, por lo que puede que la degradación de sacarosa se haya visto interrumpida por nuestro tratamiento. No obstante, esto se reflejaría en la reducción de la concentración de malato (Tabla 3.2), principal ácido dicarboxílico utilizado por los bacteroides para su respiración, cosa que no ocurre en nuestro experimento, donde la cantidad de malato nodular parece invariable en los primeros días de tratamiento.

Encontramos una alta concentración de trehalosa en nódulos de plantas perfusionadas con Asn y trazas de este carbohidrato bacteroidal en los análisis de hojas. Este compuesto es sintetizado por los bacteroides a partir de la glucosa y su acumulación se ha comprobado en nódulos de plantas sometidas a diferentes estreses abióticos (López et al., 2006; Asaf et al., 2017). La llegada de una mayor cantidad de fotosintatos desde la planta al bacteroide podría causar el incremento de este metabolito a nivel nodular.

A las 48 h de tratamiento con Asn se provoca una acumulación de rafinosa a nivel nodular. Este compuesto se mantiene estable en la parte aérea y está relacionado con situaciones estresantes (Larrazar et al., 2009; Echeverría et al., 2021). Sengupta et al. (2015) consideran a la rafinosa como una molécula de almacenamiento y transporte de C y la relacionan con la transducción de señales en la planta. La acumulación de esta sustancia a nivel nodular también es coincidente con el descenso de la FBN encontrado.



## 6. CONCLUSIONES

- Nuestros datos validan la hipótesis de una inhibición de la FBN por *feedback* mediada por compuestos nitrogenados en nódulos de plantas de soja.
- La aplicación de 2 mM vía alimentación por peciolo en plantas de soja se traduce en un aumento de los aminoácidos libres totales en parte aérea y a una mejora en el estado nitrogenado de la planta.
- En nódulos de plantas de soja la suplementación con Asn de la parte aérea conlleva a las 48 h a una acumulación de aminoácidos aromáticos y ramificados, coincidente con un descenso en la actividad fijadora de N.
- El tratamiento de perfusión foliar incrementa el transporte de fotoasimilados de la planta al nódulo a las 48 h.



# CONCLUSIONES GENERALES



- La acumulación de prolina en estados de sequía moderada y severa, así como su disminución cuando las condiciones de riego son óptimas, sugiere una implicación de este compuesto como regulador de la homeostasis celular de nódulos en condiciones de estrés.
- Tras los resultados obtenidos en este trabajo, no podemos afirmar que la acumulación de trehalosa ofrezca una mayor tolerancia al estrés, aunque sí está relacionada con los efectos de la sequía, ya que la recuperación de las plantas genera una disminución de este metabolito a nivel de nódulo.
- La mayor producción de PAs en la cepa CFNX713 de *R. etli*, con respecto a su cepa parental parece estar implicada en una mejor tolerancia al estrés.
- En condiciones de estrés hídrico predomina la oxidación de PAs frente a la conjugación en los nódulos. Esto sugiere que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derivado del catabolismo de PAs puede desempeñar un papel señalizador clave en el mantenimiento de la homeostasis de ROS.
- La sobreexpresión del gen *MtVTC2* produce un aumento en la síntesis de AsA de plantas de *M. truncatula*.
- A pesar de tener incrementada la capacidad antioxidante, tanto el crecimiento como las respuestas fisiológicas observadas en las líneas de plantas oxVTC2 no se traducen en una mayor tolerancia a los niveles de estrés hídrico.

- La sobreexpresión de *MtVTC2* en plantas de *M. truncatula* no afecta a la colonización bacteriana de los nódulos formados en simbiosis con *E. meliloti*.
- La actividad fijadora de nódulos en la simbiosis *M. truncatula*-*E. meliloti*, bajo condiciones control y en condición de déficit hídrico, no se ve mejorada con la sobreexpresión del gen *MtVTC2*.
- Nuestros datos validan la hipótesis de una inhibición de la FBN por *feedback* mediada por compuestos nitrogenados en nódulos de plantas de soja.
- El tratamiento de perfusión foliar incrementa el transporte de fotoasimilados de la planta al nódulo a las 48 h.
- La aplicación de 2 mM vía alimentación por peciolo en plantas de soja se traduce en un aumento de los aminoácidos libres totales en parte aérea y a una mejora en el estado nitrogenado de la planta.
- En nódulos de plantas de soja la suplementación con Asn de la parte aérea conlleva a las 48 h a una acumulación de aminoácidos aromáticos y ramificados, coincidente con un descenso en la actividad fijadora de N.



# BIBLIOGRAFÍA



- Abiri, R., Shaharuddin, N. A., Maziah, M., Yusof, Z. N. B., Atabaki, N., Sahebi, M., et al. (2017). Role of ethylene and the APETALA 2/ethylene response factor superfamily in rice under various abiotic and biotic stress conditions. *Environ. Exp. Bot.* 134, 33–44. doi:10.1016/j.envexpbot.2016.10.015.
- Agius, F., González-Lamothe, R., Caballero, J. L., Muñoz-Blanco, J., Botella, M. A., and Valpuesta, V. (2003). Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *Nat. Biotechnol.* 21, 177–181. doi:10.1038/nbt777.
- Akram, N. A., Shafiq, F., and Ashraf, M. (2017). Ascorbic acid-a potential oxidant scavenger and its role in plant development and abiotic stress tolerance. *Front. Plant Sci.* 8, 613. doi:10.3389/fpls.2017.00613.
- Alcázar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolotti, C., Reymond, M., Koncz, C., et al. (2010). Polyamines: Molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta* 231, 1237–1249. doi:10.1007/s00425-010-1130-0.
- Alcázar, R., Bitrián, M., Bartels, D., Koncz, C., Altabella, T., and Tiburcio, A. F. (2011). Polyamine metabolic canalization in response to drought stress in *Arabidopsis* and the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Signal. Behav.* 6, 243–250. doi:10.4161/psb.6.2.14317.
- Ali, B., Pantha, S., Acharya, R., Ueda, Y., Wu, L. B., Ashrafuzzaman, M., et al. (2019). Enhanced ascorbate level improves multi-stress tolerance in a widely grown indica rice variety without compromising its agronomic characteristics. *J. Plant Physiol.* 240, 152998. doi:10.1016/j.jplph.2019.152998.
- Amooghaie, R. (2011). Role of polyamines in the tolerance of soybean to water deficit stress. *World Acad. Sci. Eng. Technol.* 80, 498–502.
- Andrianasolo, F. N., Debaeke, P., Champolivier, L., and Maury, P. (2016). Analysis and modelling of the factors controlling seed oil concentration in sunflower: A review. *OCL - Oilseeds fats, Crop. Lipids* 23, 1–12. doi:10.1051/ocl/2016004.
- Apelbaum, A., Icekson, I., and Goldlust, A. (1984). “Reduced S-adenosylmethionine decarboxylase activity in ethylene treated etiolated pea seedlings,” in *Ethylene* (Springer Netherlands), 149–157. doi:10.1007/978-94-009-6178-4\_21.
- Appleby, C. A. (1984). Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35, 443–478. doi:10.1146/annurev.pp.35.060184.002303.
- Arocena, J. M., Van Mourik, J. M., Schilder, M. L. M., and Faz Cano, A. (2010). Initial soil development under pioneer plant species in metal mine waste deposits. *Restor. Ecol.* 18, 244–252. doi:10.1111/j.1526-100X.2009.00582.x.
- Arrese-Igor, C., González, E., Marino, D., Ladrera, R., Larrainzar, E., and Gil-Quintana, E. (2011). Physiological responses of legume nodules to drought. *Plant Stress* 5, 24–31.

- Arrese-Igor, C., González, E. M., Gordon, A. J., Minchin, F. R., Galvez, L., Royuela, M., et al. (1999). Sucrose synthase and nodule nitrogen fixation under drought and other environmental stresses. *Symbiosis* 27, 189–212.
- Asaf, S., Khan, A. L., Khan, M. A., Imran, Q. M., Yun, B. W., and Lee, I. J. (2017). Osmoprotective functions conferred to soybean plants via inoculation with *Shingomonas* sp. LK11 and exogenous trehalose. *Microbiol. Res.* 205, 135–145. doi:10.1016/j.micres.2017.08.009.
- Ashraf, M., and Foolad, M. R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exp. Bot.* 59, 206–216. doi:10.1016/j.envexpbot.2005.12.006.
- Atkins, C. A., Pate, J. S., Peoples, M. B., and Joy, K. W. (1983). Amino acid transport and metabolism in relation to the nitrogen economy of a legume leaf. *Plant Physiol.* 71, 841–848. doi:10.1104/pp.71.4.841.
- Auriac, M. C., and Timmers, A. C. J. (2007). Nodulation studies in the model legume *Medicago truncatula*: Advantages of using the constitutive EF1 $\alpha$  promoter and limitations in detecting fluorescent reporter proteins in nodule tissues. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20, 1040–1047. doi:10.1094/MPMI-20-9-1040.
- Azani, N., Babineau, M., Bailey, C. D., Banks, H., Barbosa, A. R., Pinto, R. B., et al. (2017). A new subfamily classification of the leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon* 66, 44–77. doi:10.12705/661.3.
- Aziz, A., Martin-Tanguy, J., and Larher, F. (1999). Salt stress-induced proline accumulation and changes in tyramine and polyamine levels are linked to ionic adjustment in tomato leaf discs. *Plant Sci.* 145, 83–91. doi:10.1016/S0168-9452(99)00071-0.
- Baginsky, C., Brito, B., Imperial, J., Palacios, J. M., and Ruiz-Argüeso, T. (2002). Diversity and evolution of hydrogenase systems in *Rhizobia*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4915–4924. doi:10.1128/AEM.68.10.4915-4924.2002.
- Bassard, J. E., Ullmann, P., Bernier, F., and Werck-Reichhart, D. (2010). Phenolamides: Bridging polyamines to the phenolic metabolism. *Phytochemistry* 71, 1808–1824. doi:10.1016/j.phytochem.2010.08.003.
- Becana, M., and Klucas, R. V. (1992). Oxidation and reduction of leghemoglobin in root nodules of leguminous plants. *Plant Physiol.* 98, 1217–1221. doi:10.1104/pp.98.4.1217.
- Becana, M., Matamoros, M. A., Udvardi, M., and Dalton, D. A. (2010). Recent insights into antioxidant defenses of legume root nodules. *New Phytol.* 188, 960–976. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03512.x.
- Becker, A., Bergès, H., Krol, E., Bruand, C., Rüberg, S., Capela, D., et al. (2004). Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and

- symbiotic conditions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17, 292–303. doi:10.1094/MPMI.2004.17.3.292.
- Beebe, S. E., Rao, I. M., Cajiao, C., and Grajales, M. (2008). Selection for drought resistance in common bean also improves yield in phosphorus limited and favorable environments. *Crop Sci.* 48, 582–592. doi:10.2135/cropsci2007.07.0404.
- Bellwood, P., Gamble, C., le Blanc, S. A., Pluciennik, M., Richards, M., and Terrell, J. E. (2007). *First Farmers: The Origins of Agricultural Societies.*, ed. P. Bellwood Malden (MA): Blackwell doi:10.1017/S0959774307000078.
- Beringer, J. E. (1974). R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 84, 188–198. doi:10.1099/00221287-84-1-188.
- Bernhard, A. (2010). The nitrogen cycle: Processes, players, and human impact. *Nat. Educ. Knowl.* 3, 25.
- Bishnoi, U. (2018). Agriculture and the dark side of chemical fertilizers. *Environ. Anal. Ecol. Stud.* 3, 1–4. doi:10.31031/EAES.2018.03.000552.
- Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F., and Martin-Tanguy, J. (1999). Polyamines and environmental challenges: Recent development. *Plant Sci.* 140, 103–125. doi:10.1016/S0168-9452(98)00218-0.
- Brewin, N. J. (1991). Development of the legume root nodule. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7, 191–226. doi:10.1146/annurev.cb.07.110191.001203.
- Brewin, N. J. (2004). Plant cell wall remodelling in the rhizobium-legume symbiosis. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 23, 293–316. doi:10.1080/07352680490480734.
- Broad, R. C., Bonneau, J. P., Hellens, R. P., and Johnson, A. A. T. (2020). Manipulation of ascorbate biosynthetic, recycling, and regulatory pathways for improved abiotic stress tolerance in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1790. doi:10.3390/ijms21051790.
- Broughton, W. J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., and Vanderleyden, J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.) - Model food legumes. *Plant Soil* 252, 55–128. doi:10.1023/A:1024146710611.
- Brouquisse, R., Rolin, D., Cortès, S., Gaudillère, M., Evrard, A., and Roby, C. (2007). A metabolic study of the regulation of proteolysis by sugars in maize root tips: Effects of glycerol and dihydroxyacetone. *Planta* 225, 693–709. doi:10.1007/s00425-006-0378-x.
- Bueno, E., Mesa, S., Bedmar, E. J., Richardson, D. J., and Delgado, M. J. (2012). Bacterial adaptation of respiration from oxic to microoxic and anoxic conditions: Redox control. *Antioxidants Redox Signal.* 16, 819–852. doi:10.1089/ars.2011.4051.

- Bueno, E., Richardson, D. J., Bedmar, E. J., and Delgado, M. J. (2009). Expression of *Bradyrhizobium japonicum* cbb<sub>3</sub> terminal oxidase under denitrifying conditions is subjected to redox control. *FEMS Microbiol. Lett.* 298, 20–28. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01711.x.
- Bulley, S., and Laing, W. (2016). The regulation of ascorbate biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 33, 15–22. doi:10.1016/j.pbi.2016.04.010.
- Bulley, S., Rassam, M., Hoser, D., Otto, W., Schünemann, N., Wright, M., et al. (2009). Gene expression studies in kiwifruit and gene over-expression in *Arabidopsis* indicates that GDP-L-galactose guanyltransferase is a major control point of vitamin C biosynthesis. *J. Exp. Bot.* 60, 765–778. doi:10.1093/jxb/ern327.
- Bulley, S., Wright, M., Rommens, C., Yan, H., Rassam, M., Lin-Wang, K., et al. (2012). Enhancing ascorbate in fruits and tubers through over-expression of the L-galactose pathway gene GDP-L-galactose phosphorylase. *Plant Biotechnol. J.* 10, 390–397. doi:10.1111/j.1467-7652.2011.00668.x.
- Calles, T., del Castello, R., Baratelli, M., Xipsiti, M., and Navarro, D. K. (2019). *The International Year of Pulses - Final report*. Rome: FAO.
- Chavarria, G., and dos Santos, H. P. (2012). Plant water relations: absorption, transport and control mechanisms. *Adv. Sel. Plant Physiol. Asp.*, 105–132. doi:10.5772/33478.
- Chaves, M. M., Maroco, J. P., and Pereira, J. S. (2003). Understanding plant responses to drought - From genes to the whole plant. *Funct. Plant Biol.* 30, 239–264. doi:10.1071/FP02076.
- Chaves, M. M., and Oliveira, M. M. (2004). Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: Prospects for water-saving agriculture. *J. Exp. Bot.* 55, 2365–2384. doi:10.1093/jxb/erh269.
- Comas, L. H., Becker, S. R., Cruz, V. M. V., Byrne, P. F., and Dierig, D. A. (2013). Root traits contributing to plant productivity under drought. *Front. Plant Sci.* 4, 442. doi:10.3389/fpls.2013.00442.
- Cona, A., Rea, G., Angelini, R., Federico, R., and Tavladoraki, P. (2006). Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends Plant Sci.* 11, 80–88. doi:10.1016/j.tplants.2005.12.009.
- Conklin, P. L., Saracco, S. A., Norris, S. R., and Last, R. L. (2000). Identification of ascorbic acid-deficient *Arabidopsis thaliana* mutants. *Genetics* 154, 847–856. doi:10.1093/genetics/154.2.847.
- Cook, D. R. (1999). *Medicago truncatula* - A model in the making! *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 301–304. doi:10.1016/S1369-5266(99)80053-3.
- Cooper, J. E. (2007). Early interactions between legumes and rhizobia: Disclosing complexity in a molecular dialogue. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1355–1365.

- doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03366.x.
- Crawford, E. J., Lake, A. W. H., and Boyce, K. G. (1989). Breeding annual *Medicago* species for semiarid conditions in Southern Australia. *Adv. Agron.* 42, 399–437. doi:10.1016/S0065-2113(08)60530-1.
- Cushman, J. C. (2001). Crassulacean acid metabolism. A plastic photosynthetic adaptation to arid environments. *Plant Physiol.* 127, 1439–1448. doi:10.1104/pp.010818.
- Dai, A. (2012). Increasing drought under global warming in observations and models. *Nat. Clim. Chang.* 3. doi:10.1038/NCLIMATE1633.
- Danyal, K., Shaw, S., Page, T. R., Duval, S., Horitani, M., Marts, A. R., et al. (2016). Negative cooperativity in the nitrogenase Fe protein electron delivery cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E5783–E5791. doi:10.1073/pnas.1613089113.
- Davey, M. W., Bauw, G., and Van Montagu, M. (1996). Analysis of ascorbate in plant tissues by high-performance capillary zone electrophoresis. *Anal. Biochem.* 239, 8–19. doi:10.1006/abio.1996.0284.
- Dawson, T., Harvey, C., Stork, A., Traw, B., Gregg, J., Perkins, C., et al. (1996). “Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups.” in *The Quarterly Review of Biology*, eds. W. Larcher and J. Wieser, 416–417. doi:10.1086/419487.
- Day, D., and Copeland, L. (1991). Carbon metabolism and compartmentation in nitrogen-fixing legume nodules. *Plant Physiol. Biochem.* 29, 185–201.
- De Faria, S. M., Lewis, G. P., Sprent, J. I., and Sutherland, J. M. (1989). Occurrence of nodulation in the Leguminosae. *New Phytol.* 111, 607–619.
- De la Peña, T. C., Fedorova, E., Pueyo, J. J., and Mercedes Lucas, M. (2018). The symbiosome: Legume and rhizobia co-evolution toward a nitrogen-fixing organelle? *Front. Plant Sci.* 8. doi:10.3389/fpls.2017.02229.
- De Ron, A. M., Papa, R., Bitocchi, E., González, A. M., Debouck, D. G., Brick, M. A., et al. (2015). “Common bean,” in *Grain Legumes. Handbook of Plant Breeding*, ed. A. De Ron (NY: Springer New York), 1–36. doi:10.1007/978-1-4939-2797-5\_1.
- De Silva, M., Purcell, L. C., and King, C. A. (1996). Soybean petiole ureide response to water deficits and decreased transpiration. *Crop Sci.* 36, 611–616. doi:10.2135/cropsci1996.0011183X003600030015x.
- Delgado, M. J., Bedmar, E. J., and Downie, J. A. (1998). Genes involved in the formation and assembly of rhizobial cytochromes and their role in symbiotic nitrogen fixation. *Adv. Microb. Physiol.* 40, 191–231. doi:10.1016/S0065-2911(08)60132-0.
- Delgado, M. J., Garrido, J. M., Ligeró, F., and Lluch, C. (1993). Nitrogen fixation and

- carbon metabolism by nodules and bacteroids of pea plants under sodium chloride stress. *Physiol. Plant.* 89, 824–829. doi:10.1111/j.1399-3054.1993.tb05291.x.
- Díaz, C. L., Schlaman, H. R. M., and Spaink, H. P. (2005). “Concurrent visualization of gusA and lacZ reporter gene expression,” in *Lotus Japonicus Handbook* (Springer Netherlands), 99–109. doi:10.1007/1-4020-3735-X\_7.
- Díaz del Castillo, L., Hunt, S., and Layzell, D. B. (1994). The role of oxygen in the regulation of nitrogenase activity in drought-stressed soybean nodules. *Plant Physiol.* 106, 949–955. doi:10.1104/pp.106.3.949.
- Díaz del Castillo, L., and Layzell, D. B. (1995). Drought stress, permeability to O<sub>2</sub> diffusion, and the respiratory kinetics of soybean root nodules. *Plant Physiol.* 107, 1187–1194. doi:10.1104/pp.107.4.1187.
- Docimo, T., Reichelt, M., Schneider, B., Kai, M., Kunert, G., Gershenzon, J., et al. (2012). The first step in the biosynthesis of cocaine in *Erythroxylum coca*: The characterization of arginine and ornithine decarboxylases. *Plant Mol. Biol.* 78, 599–615. doi:10.1007/s11103-012-9886-1.
- Douxchamps, S., Humbert, F. L., van der Hoek, R., Mena, M., Bernasconi, S. M., Schmidt, A., et al. (2010). Nitrogen balances in farmers fields under alternative uses of a cover crop legume: A case study from Nicaragua. *Nutr. Cycl. Agroecosystems* 88, 447–462. doi:10.1007/s10705-010-9368-2.
- Dowdle, J., Ishikawa, T., Gatzek, S., Rolinski, S., and Smirnoff, N. (2007). Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. *Plant J.* 52, 673–689. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03266.x.
- Doyle, J. J., and Luckow, M. A. (2003). The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol.* 131, 900–10. doi:10.1104/pp.102.018150.
- Duan, J. J., Li, J., Guo, S., and Kang, Y. (2008). Exogenous spermidine affects polyamine metabolism in salinity-stressed *Cucumis sativus* roots and enhances short-term salinity tolerance. *J. Plant Physiol.* 165, 1620–1635. doi:10.1016/j.jplph.2007.11.006.
- Durand, J. L., Sheehy, J. E., and Minchin, F. R. (1987). Nitrogenase activity, photosynthesis and nodule water potential in soybean plants experiencing water deprivation. *J. Exp. Bot.* 38, 311–321. doi:10.1093/jxb/38.2.311.
- Echeverría, A., Larrainzar, E., Li, W., Watanabe, Y., Sato, M., Tran, C. D., et al. (2021). *Medicago sativa* and *Medicago truncatula* show contrasting root metabolic responses to drought. *Front. Plant Sci.* 12, 612. doi:10.3389/fpls.2021.652143.
- Emerich, D. W., Ruiz-Argueso, T., Ching, T. M., and Evans, H. J. (1979). Hydrogen-dependent nitrogenase activity and ATP formation in *Rhizobium japonicum*



- bacteroids. *J. Bacteriol.* 137, 153–160. doi:10.1128/jb.137.1.153-160.1979.
- Espartero, J., Pintor-Toro, J. A., and Pardo, J. M. (1994). Differential accumulation of S-adenosylmethionine synthetase transcripts in response to salt stress. *Plant Mol. Biol.* 25, 217–227. doi:10.1007/BF00023239.
- Evans, H. (1981). “Symbiotic nitrogen fixation in legume nodules,” in *Research Experiences in Plant Physiology*, ed. T. Moore (New York: Springer Berlin Heidelberg), 294–311. doi:10.1007/978-3-642-96168-7\_26.
- Fageria, N. K., Moreira, A., and Coelho, A. M. (2011). Yield and yield components of upland rice as influenced by nitrogen sources. *J. Plant Nutr.* 34, 361–370. doi:10.1080/01904167.2011.536878.
- Fang, Y., and Xiong, L. (2015). General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 673–689. doi:10.1007/s00018-014-1767-0.
- FAOStat (2020). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistics Division. 2. Available at: <http://www.fao.org/faostat/en/#data> [Accessed March 25, 2020].
- Farías-Rodríguez, R., Mellor, R. B., Arias, C., and Peña-Cabriaes, J. J. (1998). The accumulation of trehalose in nodules of several cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris*) and its correlation with resistance to drought stress. *Physiol. Plant.* 102, 353–359. doi:10.1034/j.1399-3054.1998.1020303.x.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., and Basra, S. M. A. (2009). “Plant drought stress: Effects, mechanisms and management,” in *Sustainable Agriculture* (Springer Netherlands), 153–188. doi:10.1007/978-90-481-2666-8\_12.
- Farooq, M., Wahid, A., Lee, D. J., Cheema, S. A., and Aziz, T. (2010). Comparative time course action of the foliar applied glycinebetaine, salicylic acid, nitrous oxide, brassinosteroids and spermine in improving drought resistance of rice. *J. Agron. Crop Sci.* 196, 336–345. doi:10.1111/j.1439-037X.2010.00422.x.
- Ferguson, B. J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M. H., Lin, Y. H., Reid, D. E., et al. (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *J. Integr. Plant Biol.* 52, 61–76. doi:10.1111/j.1744-7909.2010.00899.x.
- Ferguson, B. J., Mens, C., Hastwell, A. H., Zhang, M., Su, H., Jones, C. H., et al. (2019). Legume nodulation: The host controls the party. *Plant Cell Environ.* 42, 41–51. doi:10.1111/pce.13348.
- Fernández-Fernández, R., López-Martínez, J. C., Romero-González, R., Martínez-Vidal, J. L., Alarcón Flores, M. I., and Garrido Frenich, A. (2010). Simple LC-MS determination of citric and malic acids in fruits and vegetables. *Chromatographia* 72, 55–62. doi:10.1365/s10337-010-1611-0.

- Flexas, J., and Medrano, H. (2002). Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: Stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Ann. Bot.* 89, 183–189. doi:10.1093/aob/mcf027.
- Flores, H. E., and Galston, A. W. (1982). Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. *Plant Physiol.* 69, 701–706. doi:10.1104/pp.69.3.701.
- Fournier, J., Teillet, A., Chabaud, M., Ivanov, S., Genre, A., Limpens, E., et al. (2015). Remodeling of the infection chamber before infection thread formation reveals a two-step mechanism for rhizobial entry into the host legume root hair. *Plant Physiol.* 167, 1233–1242. doi:10.1104/pp.114.253302.
- Fowler, D., Coyle, M., Skiba, U., Sutton, M. A., Cape, J. N., Reis, S., et al. (2013). The global nitrogen cycle in the twenty first century. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 368, 20130164. doi:10.1098/rstb.2013.0164.
- Foyer, C. H., and Noctor, G. (2011). Ascorbate and glutathione: The heart of the redox hub. *Plant Physiol.* 155, 2–18. doi:10.1104/pp.110.167569.
- Fujihara, S. (2009). Biogenic amines in rhizobia and legume root nodules. *Microbes Environ.* 24, 1–13. doi:10.1264/jsme2.ME08557.
- Fujihara, S., and Yoneyama, T. (1993). Effects of pH and osmotic stress on cellular polyamine contents in the soybean *Rhizobium fredii* P220 and *Bradyrhizobium japonicum* A1017. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1104–1109.
- Furlan, A. L., Bianucci, E., Castro, S., and Dietz, K. J. (2017). Metabolic features involved in drought stress tolerance mechanisms in peanut nodules and their contribution to biological nitrogen fixation. *Plant Sci.* 263, 12–22. doi:10.1016/j.plantsci.2017.06.009.
- Furlan, A. L., Bianucci, E., Tordable, M. D. C., Castro, S., and Dietz, K.-J. J. (2014). Antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in peanut nodules during a drought and rehydration cycle. *Funct. Plant Biol.* 41, 704–713. doi:10.1071/FP13311.
- Galloway, J. N., Dentener, F. J., Capone, D. G., Boyer, E. W., Howarth, R. W., Seitzinger, S. P., et al. (2004). Nitrogen cycles: Past, present, and future. *Biogeochemistry* 70, 153–226. doi:10.1007/s10533-004-0370-0.
- Gálvez, L., González, E. M., and Arrese-Igor, C. (2005). Evidence for carbon flux shortage and strong carbon/nitrogen interactions in pea nodules at early stages of water stress. *J. Exp. Bot.* 56, 2551–2561. doi:10.1093/jxb/eri249.
- Gaufichon, L., Reisdorf-Cren, M., Rothstein, S. J., Chardon, F., and Suzuki, A. (2010). Biological functions of asparagine synthetase in plants. *Plant Sci.* 179, 141–153. doi:10.1016/j.plantsci.2010.04.010.
- Gepts, P. (1998). Origin and evolution of common bean: Past events and recent

- trends. in *HortScience*, 1124–1130. doi:10.21273/hortsci.33.7.1124.
- Gest, N., Gautier, H., and Stevens, R. (2013). Ascorbate as seen through plant evolution: The rise of a successful molecule? *J. Exp. Bot.* 64, 33–53. doi:10.1093/jxb/ers297.
- Ghanbari, A. A., Mousa, S. H. V. I., Mousapour Gori, A., and Rao, I. (2013). Effects of water stress on leaves and seeds of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Turkish J. F. Crop.* 18, 73–77. doi:10.17557/tjfc.54612.
- Gholami, M., Fakhari, A. R., and Ghanati, F. (2013). Selective regulation of nicotine and polyamines biosynthesis in tobacco cells by enantiomers of ornithine. *Chirality* 25, 22–27. doi:10.1002/chir.22107.
- Gil-Quintana, E., Larrainzar, E., Arrese-Igor, C., and González, E. M. (2013). Is N-feedback involved in the inhibition of nitrogen fixation in drought-stressed *Medicago truncatula*? *J. Exp. Bot.* 64, 281–92. doi:10.1093/jxb/ers334.
- Gilbert, L., Alhaghdow, M., Nunes-Nesi, A., Quemener, B., Guillon, F., Bouchet, B., et al. (2009). GDP-d-mannose 3,5-epimerase (GME) plays a key role at the intersection of ascorbate and non-cellulosic cell-wall biosynthesis in tomato. *Plant J.* 60, 499–508. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03972.x.
- Girard, L., Brom, S., Davalos, A., López, O., Soberón, M., and Romero, D. (2000). Differential regulation of *fixN*-reiterated genes in *Rhizobium etli* by a novel *fixL-fixK* cascade. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13, 1283–1292. doi:10.1094/MPMI.2000.13.12.1283.
- González, E. M., Aparicio-Tejo, P. M., Gordon, A. J., Minchin, F. R., Royuela, M., and Arrese-Igor, C. (1998). Water-deficit effects on carbon and nitrogen metabolism of pea nodules. *J. Exp. Bot.* 49, 1705–1714. doi:10.1093/jxb/49.327.1705.
- González, E. M., Gálvez, L., Marino, D., Ladrera, R., Larrainzar, E., and Arrese-Igor, C. (2006). “Metabolismo carbonado y nitrogenado en nodulos,” in *Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones*, 194–206.
- González, E. M., Gálvez, L., Royuela, M., Aparicio-Tejo, P. M., and Arrese-Igor, C. (2001). Insights into the regulation of nitrogen fixation in pea nodules: Lessons from drought, abscisic acid and increased photoassimilate availability. in *Agronomie* (EDP Sciences), 607–613. doi:10.1051/agro:2001151.
- González, E. M., Gordon, A. J., James, C. L., and Arrese-Igor, C. (1995). The role of sucrose synthase in the response of soybean nodules to drought. *J. Exp. Bot.* 46, 1515–1523. doi:10.1093/jxb/46.10.1515.
- Gordon, A. J., Minchin, F. R., James, C. L., and Komina, O. (1999). Sucrose synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation. *Plant Physiol.* 120, 867–877. doi:10.1104/pp.120.3.867.
- Gordon, A. J., Ryle, G. J. A., Mitchell, D. F., and Powell, D. C. E. (1985). The flux of <sup>14</sup>C-

- labelled photosynthate through soyabean root nodules during N<sub>2</sub> fixation. *J. Exp. Bot.* 36, 756–769. doi:10.1093/jxb/36.5.756.
- Graham, P. H., and Vance, C. P. (2003). Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* 131, 872–877. doi:10.1104/pp.017004.
- Granados-Baeza, M. J., Gómez-Hernández, N., Mora, Y., Delgado, M. J., Romero, D., and Girard, L. (2007). Novel reiterated Fnr-type proteins control the production of the symbiotic terminal oxidase cbb<sub>3</sub> in *Rhizobium etli* CFN42. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20, 1241–1249. doi:10.1094/MPMI-20-10-1241.
- Groppa, M. D., and Benavides, M. P. (2008). Polyamines and abiotic stress: Recent advances. *Amino Acids* 34, 35–45. doi:10.1007/s00726-007-0501-8.
- Groten, K., Dutilleul, C., Van Heerden, P. D. R., Vanacker, H., Bernard, S., Finkemeier, I., et al. (2006). Redox regulation of peroxiredoxin and proteinases by ascorbate and thiols during pea root nodule senescence. *FEBS Lett.* 580, 1269–1276. doi:10.1016/j.febslet.2006.01.043.
- Günther, C., Schlereth, A., Udvardi, M., and Ott, T. (2007). Metabolism of reactive oxygen species is attenuated in leghemoglobin- deficient nodules of *Lotus japonicus*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20, 1596–1603. doi:10.1094/MPMI-20-12-1596.
- Hamana, K., Minamisawa, K., and Matsuzaki, S. (1990). Polyamines in *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* and *Agrobacterium*. doi:10.1111/j.1574-6968.1990.tb03800.x.
- Hanfrey, C., Franceschetti, M., Mayer, M. J., Illingworth, C., and Michael, A. J. (2002). Abrogation of upstream open reading frame-mediated translational control of a plant S-adenosylmethionine decarboxylase results in polyamine disruption and growth perturbations. *J. Biol. Chem.* 277, 44131–44139. doi:10.1074/jbc.M206161200.
- Hanfrey, C., Sommer, S., Mayer, M. J., Burtin, D., and Michael, A. J. (2001). Arabidopsis polyamine biosynthesis: Absence of ornithine decarboxylase and the mechanism of arginine decarboxylase activity. *Plant J.* 27, 551–560. doi:10.1046/j.1365-313X.2001.01100.x.
- Hao, Y.-J. (2005). Expression of arginine decarboxylase and ornithine decarboxylase genes in apple cells and stressed shoots. *J. Exp. Bot.* 56, 1105–1115. doi:10.1093/jxb/eri102.
- Hare, P. D., and Cress, W. A. (1997). Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regul.* 21, 79–102. doi:10.1023/A:1005703923347.
- Hartwig, U. A. (1998). The regulation of symbiotic N<sub>2</sub> fixation: a conceptual model of N feedback from the ecosystem to the gene expression level. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 1, 92–120. doi:10.1078/1433-8319-00054.

- Hassan, M. Al, Chaura, J., Donat-Torres, M. P., Boscaiu, M., and Vicente, O. (2017). Antioxidant responses under salinity and drought in three closely related wild monocots with different ecological optima. *AoB Plants* 9, plx009. doi:10.1093/aobpla/plx009.
- Heerden Van, P. D. R., and Krüger, H. J. G. (2002). Separately and simultaneously induced dark chilling and drought stress effects on photosynthesis, proline accumulation and antioxidant metabolism in soybean. *J. Plant Physiol.* 159, 1077–1086. doi:10.1078/0176-1617-00745.
- Høgh-Jensen, H. (2012). “To meet future food demands we need to change from annual grain legumes to multipurpose semi-perennial legumes,” in *Food Production - Approaches, Challenges and Tasks* doi:10.5772/32618.
- HongBo, S., Zongsuo, L., and Mingan, S. (2006). Osmotic regulation of 10 wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes at soil water deficits. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 47, 132–139. doi:10.1016/j.colsurfb.2005.11.028.
- Hunt, S., and Layzell, D. B. (1993). Gas exchange of legume nodules and the regulation of nitrogenase activity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44, 483–511. doi:10.1146/annurev.pp.44.060193.002411.
- Icekson, I., Bakhanashvili, M., and Apelbaum, A. (1986). Inhibition by ethylene of polyamine biosynthetic enzymes enhanced lysine decarboxylase activity and cadaverine accumulation in pea seedlings'. *Plant Physiol* 82, 607–609.
- Igarashi, K., and Kashiwagi, K. (2015). Modulation of protein synthesis by polyamines. *IUBMB Life* 67, 160–169. doi:10.1002/iub.1363.
- Imai, R., Ali, A., Pramanik, M. H. R., Nakaminami, K., Sentoku, N., and Kato, H. (2004). A distinctive class of spermidine synthase is involved in chilling response in rice. *J. Plant Physiol.* 161, 883–886. doi:10.1016/j.jplph.2003.11.002.
- Imai, T., Ban, Y., Yamamoto, T., and Moriguchi, T. (2012). Ectopic overexpression of peach GDP-d-mannose pyrophosphorylase and GDP-d-mannose-3',5'-epimerase in transgenic tobacco. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 111, 1–13. doi:10.1007/s11240-012-0165-2.
- IPPC (2014). Mitigation of climate change. in *Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* doi:10.1002/wea.422.
- Irar, S., González, E. M., Arrese-Igor, C., and Marino, D. (2014). A proteomic approach reveals new actors of nodule response to drought in split-root grown pea plants. *Physiol. Plant.* 152, 634–645. doi:10.1111/ppl.12214.
- Ishikawa, T., Dowdle, J., and Smirnoff, N. (2006). Progress in manipulating ascorbic acid biosynthesis and accumulation in plants. *Physiol. Plant.* 126, 343–355. doi:10.1111/j.1399-3054.2006.00640.x.

- Ishikawa, T., Maruta, T., Yoshimura, K., and Smirnof, N. (2018). "Biosynthesis and regulation of ascorbic acid in plants," in *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants* (Springer International Publishing), 163–179. doi:10.1007/978-3-319-75088-0\_8.
- Ishikawa, T., and Shigeoka, S. (2008). Recent advances in ascorbate biosynthesis and the physiological significance of ascorbate peroxidase in photosynthesizing organisms. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 1143–1154. doi:10.1271/bbb.80062.
- James, E. K., Iannetta, P. P. M., Deeks, L., Sprent, J. I., and Minchin, F. R. (2000). Detopping causes production of intercellular space occlusions in both the cortex and infected region of soybean nodules. *Plant, Cell Environ.* 23, 377–386. doi:10.1046/j.1365-3040.2000.00549.x.
- Jedy, C., Ruffel, S., Freixes, S., Tillard, P., Santoni, A. L., Morel, S., et al. (2010). Adaptation of *Medicago truncatula* to nitrogen limitation is modulated via local and systemic nodule developmental responses. *New Phytol.* 185, 817–828. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.03103.x.
- Jiménez-Bremont, J. F., Marina, M., Guerrero-González, M. de la L., Rossi, F. R., Sánchez-Rangel, D., Rodríguez-Kessler, M., et al. (2014). Physiological and molecular implications of plant polyamine metabolism during biotic interactions. *Front. Plant Sci.* 5. doi:10.3389/fpls.2014.00095.
- Khedr, A. H. A., Abbas, M. A., Abdel Wahid, A. A., Quick, W. P., and Abogadallah, G. M. (2003). Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancratium maritimum* L. to salt-stress. *J. Exp. Bot.* 54, 2553–2562. doi:10.1093/jxb/erg277.
- Koenen, E. J. M., de Vos, J. M., Atchison, G. W., Simon, M. F., Schrire, B. D., de Souza, E. R., et al. (2013). Exploring the tempo of species diversification in legumes. *South African J. Bot.* 89, 19–30. doi:10.1016/j.sajb.2013.07.005.
- Krieger-Liszkay, A., and Trebst, A. (2006). Tocopherol is the scavenger of singlet oxygen produced by the triplet states of chlorophyll in the PSII reaction centre. *J. Exp. Bot.* 57, 1677–1684. doi:10.1093/jxb/erl002.
- Kurutas, E. B. (2016). The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: Current state. *Nutr. J.* 15, 1–22. doi:10.1186/s12937-016-0186-5.
- Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., and Takahashi, Y. (2008). Polyamines: Essential factors for growth and survival. *Planta* 228, 367–381. doi:10.1007/s00425-008-0772-7.
- Labhili, M., Joudrier, P., and Gautier, M. F. (1995). Characterization of cDNAs encoding *Triticum durum* dehydrins and their expression patterns in cultivars that differ in drought tolerance. *Plant Sci.* 112, 219–230. doi:10.1016/0168-

9452(95)04267-9.

- Ladrera, R., Marino, D., Larrainzar, E., González, E. M., and Arrese-Igor, C. (2007). Reduced carbon availability to bacteroids and elevated ureides in nodules, but not in shoots, are involved in the nitrogen fixation response to early drought in soybean. *Plant Physiol.* 145, 539–546. doi:10.1104/pp.107.102491.
- Lahiri, K., Chattopadhyay, S., and Ghosh, B. (2004). Correlation of endogenous free polyamine levels with root nodule senescence in different genotypes in *Vigna mungo* L. J. *Plant Physiol.* 161, 563–571. doi:10.1078/0176-1617-01057.
- Laing, W. A., Wright, M. A., Cooney, J., and Bulley, S. M. (2007). The missing step of the L-galactose pathway of ascorbate biosynthesis in plants, an L-galactose guanyltransferase, increases leaf ascorbate content. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 9534–9539. doi:10.1073/pnas.0701625104.
- Lanier, J. E., Jordan, D. L., Spears, J. F., Wells, R., and Johnson, P. D. (2005). Peanut response to inoculation and nitrogen fertilizer. *Agron. J.* 97, 79–84. doi:10.2134/agronj2005.0079a.
- Laranjo, M., Alexandre, A., and Oliveira, S. (2014). Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the *Mesorhizobium* genus. *Microbiol. Res.* 169, 2–17. doi:10.1016/j.micres.2013.09.012.
- Larrainzar, E., Molenaar, J. A., Wienkoop, S., Gil-Quintana, E., Alibert, B., Limami, A. M., et al. (2014). Drought stress provokes the down-regulation of methionine and ethylene biosynthesis pathways in *Medicago truncatula* roots and nodules. *Plant. Cell Environ.* 37, 2051–63. doi:10.1111/pce.12285.
- Larrainzar, E., Riely, B. K., Kim, S. C., Carrasquilla-García, N., Yu, H. J., Hwang, H. J., et al. (2015). Deep sequencing of the *Medicago truncatula* root transcriptome reveals a massive and early interaction between nodulation factor and ethylene signals. *Plant Physiol.* 169, 233–265. doi:10.1104/pp.15.00350.
- Larrainzar, E., Villar, I., Rubio, M. C., Pérez-Rontomé, C., Huertas, R., Sato, S., et al. (2020). Hemoglobins in the legume–*Rhizobium* symbiosis. *New Phytol.* 228, 472–484. doi:10.1111/nph.16673.
- Larrainzar, E., Wienkoop, S., Scherling, C., Kempa, S., Ladrera, R., Arrese-Igor, C., et al. (2009). Carbon metabolism and bacteroid functioning are involved in the regulation of nitrogen fixation in *Medicago truncatula* under drought and recovery. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 22, 1565–76. doi:10.1094/MPMI-22-12-1565.
- Larrainzar, E., Wienkoop, S., Weckwerth, W., Ladrera, R., Arrese-Igor, C., and González, E. M. (2007). *Medicago truncatula* root nodule proteome analysis reveals differential plant and bacteroid responses to drought stress. *Plant Physiol.* 144, 1495–1507. doi:10.1104/pp.107.101618.
- Lawlor, D. W., and Cornic, G. (2002). Photosynthetic carbon assimilation and

- associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell Environ.* 25, 275–294. doi:10.1046/j.0016-8025.2001.00814.x.
- Lea, P. J., Sodek, L., Parry, M. A. J., Shewry, P. R., and Halford, N. G. (2007). Asparagine in plants. *Ann. Appl. Biol.* 150, 1–26. doi:10.1111/j.1744-7348.2006.00104.x.
- Lesins, K. A., and Lesins, I. (1979). *Genus Medicago (Leguminosae) A Taxogenetic Study*. Springer Netherlands doi:10.1007/978-94-009-9634-2.
- Lewis, G. P., Schrire, B. D., Mackinder, B. A., Rico, L., and Clark, R. (2013). A 2013 linear sequence of legume genera set in a phylogenetic context - A tool for collections management and taxon sampling. *South African J. Bot.* 89, 76–84. doi:10.1016/j.sajb.2013.06.005.
- Li, X., Ye, J., Munir, S., Yang, T., Chen, W., Liu, G., et al. (2019). Biosynthetic gene pyramiding leads to ascorbate accumulation with enhanced oxidative stress tolerance in tomato. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1558. doi:10.3390/ijms20071558.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* 148, 350–382. doi:10.1016/0076-6879(87)48036-1.
- Lim, B., Smirnoff, N., Cobbett, C. S., and Golz, J. F. (2016). Ascorbate-deficient *vtc2* mutants in *Arabidopsis* do not exhibit decreased growth. *Front. Plant Sci.* 7, 1025. doi:10.3389/fpls.2016.01025.
- Lima, J. D., and Sodek, L. (2003). N-stress alters aspartate and asparagine levels of xylem sap in soybean. *Plant Sci.* 165, 649–656. doi:10.1016/S0168-9452(03)00251-6.
- Lin, Y. H., Lin, M. H., Gresshoff, P. M., and Ferguson, B. J. (2011). An efficient petiole-feeding bioassay for introducing aqueous solutions into dicotyledonous plants. *Nat. Protoc.* 6, 36–45. doi:10.1038/nprot.2010.171.
- Lisko, K. A., Aboobucker, S. I., Torres, R., and Lorence, A. (2014). “Engineering elevated vitamin C in plants to improve their nutritional content, growth, and tolerance to abiotic stress,” in *Phytochemicals – Biosynthesis, Function and Application*, ed. R. Jetter (Switzerland: Springer International Publishing), 109–128. doi:10.1007/978-3-319-04045-5\_6.
- Liu, W., Tan, M., Zhang, C., Xu, Z., Li, L., and Zhou, R. (2018). Functional characterization of murB-potABCD operon for polyamine uptake and peptidoglycan synthesis in *Streptococcus suis*. *Microbiol. Res.* 207, 177–187. doi:10.1016/j.micres.2017.11.008.
- Lodwig, E. M., Hosie, A. H. F., Bourdès, A., Findlay, K., Allaway, D., Karunakaran, R., et al. (2003). Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-Rhizobium symbiosis. *Nature* 422, 722–6. doi:10.1038/nature01527.
- López-Gómez, M., Cobos-Porras, L., Hidalgo-Castellanos, J., and Lluch, C. (2014).



- Occurrence of polyamines in root nodules of *Phaseolus vulgaris* in symbiosis with *Rhizobium tropici* in response to salt stress. *Phytochemistry* 107, 32–41. doi:10.1016/j.phytochem.2014.08.017.
- López-Gómez, M., Cobos-Porras, L., Prell, J., and Lluch, C. (2016). Homospermidine synthase contributes to salt tolerance in free-living *Rhizobium tropici* and in symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Plant Soil*. doi:10.1007/s11104-016-2848-7.
- López, M., Herrera-Cervera, J. A., Lluch, C., and Tejera, N. A. (2006). Trehalose metabolism in root nodules of the model legume *Lotus japonicus* in response to salt stress. *Physiol. Plant.* 128, 701–709. doi:10.1111/j.1399-3054.2006.00802.x.
- Lorence, A., Chevone, B. I., Mendes, P., and Nessler, C. L. (2004). Myo-Inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. *Plant Physiol.* 134, 1200–1205. doi:10.1104/pp.103.033936.
- Luo, J., Liu, M., Zhang, C., Zhang, P., Chen, J., Guo, Z., et al. (2017). Transgenic centipedegrass (*Eremochloa ophiuroides* [Munro] Hack.) overexpressing S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) gene for improved cold tolerance through involvement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO signaling. *Front. Plant Sci.* 8, 1655. doi:10.3389/fpls.2017.01655.
- Macknight, R. C., Laing, W. A., Bulley, S. M., Broad, R. C., Johnson, A. A., and Hellens, R. P. (2017). Increasing ascorbate levels in crops to enhance human nutrition and plant abiotic stress tolerance. *Curr. Opin. Biotechnol.* 44, 153–160. doi:10.1016/j.copbio.2017.01.011.
- Maj, D., Wielbo, J., Marek-Kozaczuk, M., and Skorupska, A. (2010). Response to flavonoids as a factor influencing competitiveness and symbiotic activity of *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiol. Res.* 165, 50–60. doi:10.1016/j.micres.2008.06.002.
- Maliva, R., and Missimer, T. (2012). "Aridity and drought," in *Environmental Science and Engineering (Subseries: Environmental Science)* (Springer Berlin Heidelberg), 21–39. doi:10.1007/978-3-642-29104-3\_2.
- Mantri, N., Basker, N., Ford, R., Pang, E., and Pardeshi, V. (2013). The role of micro-ribonucleic acids in legumes with a focus on abiotic stress response. *Plant Genome* 6, 1–14. doi:10.3835/plantgenome2013.05.0013.
- Mapelli, S., Brambilla, I. M., Radyukina, N. L., Ivanov, Y. V., Kartashov, A. V., Reggiani, R., et al. (2008). Free and bound polyamines changes in different plants as a consequence of UV-B light irradiation. *Gen. Appl. plAnt Physiol.* 34, 55–66.
- Marino, D., Frendo, P., Ladrera, R., Zabalza, A., Puppo, A., Arrese-Igor, C., et al. (2007). Nitrogen fixation control under drought stress. Localized or systemic? *Plant Physiol.* 143, 1968–1974. doi:10.1104/pp.107.097139.
- Marino, D., Hohnjec, N., Küster, H., Moran, J. F., González, E. M., and Arrese-Igor, C.

- (2008). Evidence for transcriptional and post-translational regulation of sucrose synthase in pea nodules by the cellular redox state. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 21, 622–30. doi:10.1094/MPMI-21-5-0622.
- Matamoros, M. A., and Becana, M. (2020). Redox control of the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Adv. Bot. Res.* 94, 67–96. doi:10.1016/bs.abr.2019.09.011.
- Matamoros, M. A., Dalton, D. A., and Becana, M. (2018). “Ascorbate metabolism and nitrogen fixation in legumes,” in *Ascorbic Acid in Plant Growth, Development and Stress Tolerance* (Springer International Publishing), 471–490. doi:10.1007/978-3-319-74057-7\_18.
- Matamoros, M. A., Dalton, D. A., Ramos, J., Clemente, M. R., Rubio, M. C., and Becana, M. (2003). Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis. *Plant Physiol.* 133, 499–509. doi:10.1104/pp.103.025619.
- Matamoros, M. A., Loscos, J., Coronado, M. J., Ramos, J., Sato, S., Testillano, P. S., et al. (2006). Biosynthesis of ascorbic acid in legume root nodules. *Plant Physiol.* 141, 1068–1077. doi:10.1104/pp.106.081463.
- Mattoo, A. K., Chung, S. H., Goyal, R. K., Fatima, T., Solomos, T., Srivastava, A., et al. (2007). Overaccumulation of higher polyamines in ripening transgenic tomato fruit revives metabolic memory, upregulates anabolism-related genes, and positively impacts nutritional quality. *J. AOAC Int.* 90, 1456–1464. doi:10.1093/jaoac/90.5.1456.
- Maunoury, N., Kondorosi, A., Kondorosi, E., and Mergaert, P. (2008). Cell biology of nodule infection and development. *Nitrogen-fixing Legum. symbioses*, 153–189. doi:10.1007/978-1-4020-3548-7\_6.
- McFarland, J. (1907). The nephelometer: An instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *J. Am. Med. Assoc.* XLIX, 1176–1178. doi:10.1001/jama.1907.25320140022001f.
- Melino, V. J., Soole, K. L., and Ford, C. M. (2009). Ascorbate metabolism and the developmental demand for tartaric and oxalic acids in ripening grape berries. *BMC Plant Biol.* 9, 145. doi:10.1186/1471-2229-9-145.
- Mellidou, I., Keulemans, J., Kanellis, A. K., and Davey, M. W. (2012). Regulation of fruit ascorbic acid concentrations during ripening in high and low vitamin C tomato cultivars. *BMC Plant Biol.* 12, 239. doi:10.1186/1471-2229-12-239.
- Mesa, S., Ucurum, Z., Hennecke, H., and Fischer, H. M. (2005). Transcription activation in vitro by the *Bradyrhizobium japonicum* regulatory protein FixK2. *J. Bacteriol.* 187, 3329–3338. doi:10.1128/JB.187.10.3329-3338.2005.
- Messina, M. J. (1999). Legumes and soybeans: Overview of their nutritional profiles and health effects. doi:10.1093/ajcn/70.3.439s.

- Mhadhbi, H., Fotopoulos, V., Mylona, P. V., Jebara, M., Elarbi Aouani, M., and Polidoros, A. N. (2011). Antioxidant gene-enzyme responses in *Medicago truncatula* genotypes with different degree of sensitivity to salinity. *Physiol. Plant.* 141, 201–214. doi:10.1111/j.1399-3054.2010.01433.x.
- Mikic, A. (2011). Words denoting faba bean (*Vicia faba*) in European languages. *Ratar. i Povrt.* 48, 233–238. doi:10.5937/ratpov1101233m.
- Miller, R.M., A., and Jastrow, J. D. (1996). “Contributions of legumes to the formation and maintenance of soil structure,” in *Legumes in sustainable farming systems*, ed. D. Younie (British Grassland Society), 105–112.
- Minchin, F. R. (1997). Regulation of oxygen diffusion in legume nodules. *Soil Biol. Biochem.* 29, 881–888. doi:10.1016/S0038-0717(96)00204-0.
- Minchin, F. R., and Witty, J. F. (2005). “Respiratory/carbon costs of symbiotic nitrogen fixation in legumes,” in *Plant Respiration* (Springer-Verlag), 195–205. doi:10.1007/1-4020-3589-6\_11.
- Moschou, P. N., Paschalidis, K. A., and Roubelakis-Angelakis, K. A. (2008). Plant polyamine catabolism: The state of the art. *Plant Signal. Behav.* 3, 1061–1066. doi:10.4161/psb.3.12.7172.
- Moschou, P. N., Wu, J., Cona, A., Tavladoraki, P., Angelini, R., and Roubelakis-Angelakis, K. A. (2012). The polyamines and their catabolic products are significant players in the turnover of nitrogenous molecules in plants. *J. Exp. Bot.* 63, 5003–5015. doi:10.1093/jxb/ers202.
- Muglia, C., Comai, G., Spegazzini, E., Riccillo, P. M., and Aguilar, O. M. (2008). Glutathione produced by *Rhizobium tropici* is important to prevent early senescence in common bean nodules. *FEMS Microbiol. Lett.* 286, 191–198. doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01285.x.
- Müller-Moulé, P. (2008). An expression analysis of the ascorbate biosynthesis enzyme VTC2. *Plant Mol. Biol.* 68, 31–41. doi:10.1007/s11103-008-9350-4.
- Müller, J., Boller, T., and Wiemken, A. (1995). Effects of validamycin A, a potent trehalase inhibitor, and phytohormones on trehalose metabolism in roots and root nodules of soybean and cowpea. *Planta* 197, 362–368. doi:10.1007/BF00202658.
- Murray, J. D. (2011). Invasion by invitation: Rhizobial infection in legumes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24, 631–639. doi:10.1094/MPMI-08-10-0181.
- Mustafavi, S. H., Naghdi Badi, H., Şekara, A., Mehrafarin, A., Janda, T., Ghorbanpour, M., et al. (2018). Polyamines and their possible mechanisms involved in plant physiological processes and elicitation of secondary metabolites. *Acta Physiol. Plant.* 40. doi:10.1007/s11738-018-2671-2.
- Nayyar, H., and Chander, S. (2004). Protective effects of polyamines against oxidative

- stress induced by water and cold stress in chickpea. *J. Agron. Crop Sci.* 190, 355–365. doi:10.1111/j.1439-037X.2004.00106.x.
- Nayyar, H., Kaur, S., Smita, Kumar, S., Singh, K. J., and Dhir, K. K. (2005). Involvement of polyamines in the contrasting sensitivity of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and soybean (*Glycine max* (L.) Merrill.) to water deficit stress. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 46, 333–338. doi:10.7016/BBAS.200510.0333.
- Noctor, G., and Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Biol.* 49, 249–279. doi:10.1146/annurev.arplant.49.1.249.
- Noctor, G., Veljovic-Jovanovic, S., and Foyer, C. H. (2000). Peroxide processing in photosynthesis: antioxidant coupling and redox signalling. *Philos. Trans. R. Soc.* 355, 1465–1475. doi:10.1098/rstb.2000.0707.
- Nomura, M., Mai, H. T., Fujii, M., Hata, S., Izui, K., and Tajima, S. (2006). Phosphoenolpyruvate carboxylase plays a crucial role in limiting nitrogen fixation in *Lotus japonicus* nodules. *Plant Cell Physiol.* 47, 613–621. doi:10.1093/pcp/pcj028.
- O’Hara, G., Yates, R., and Howieson, J. (2002). Selection of strains of root nodule bacteria to improve inoculant performance and increase legume productivity in stressful environments. *Inoculants Nitrogen Fixat. Legum. Vietnam ; ACIAR Proc. 109c*, 75–80.
- Okuma, E., Soeda, K., Muratal, Y., and Tada, M. (2000). Exogenous proline mitigates the inhibition of growth of *Nicotiana tabacum* cultured cells under saline conditions. *Soil Sci. Plant Nutr.* 46, 257–263. doi:10.1080/00380768.2000.10408781.
- Oldroyd, G. E. D., and Dixon, R. (2014). Biotechnological solutions to the nitrogen problem. *Curr. Opin. Biotechnol.* 26, 19–24. doi:10.1016/j.copbio.2013.08.006.
- Oldroyd, G. E. D., Murray, J. D., Poole, P. S., and Downie, J. A. (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu. Rev. Genet.* 45, 119–144. doi:10.1146/annurev-genet-110410-132549.
- Olivares, J. (2006). “Nitrogenasa. Enzima clave en la fijación,” in *Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones*, 29–34.
- Oti-Boateng, C., and Silsbury, J. H. (1993). The effects of exogenous amino acid on acetylene reduction activity of *Vicia faba* L. cv. Fiord. *Ann. Bot.* 71, 71–74. doi:10.1006/anbo.1993.1008.
- Ott, T., Van Dongen, J. T., Günther, C., Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H., et al. (2005). Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Curr. Biol.* 15, 531–535. doi:10.1016/j.cub.2005.01.042.

- Pál, M., Szalai, G., and Janda, T. (2015). Speculation: Polyamines are important in abiotic stress signaling. *Plant Sci.* 237, 16–23. doi:10.1016/j.plantsci.2015.05.003.
- Parsons, R., and Sunley, R. J. (2001). Nitrogen nutrition and the role of root-shoot nitrogen signalling particularly in symbiotic systems. *J. Exp. Bot.* 52, 435–443. doi:10.1093/jxb/52.suppl\_1.435.
- Patriarca, E. J., Tatè, R., and Iaccarino, M. (2002). Key role of bacterial  $\text{NH}_4^+$  metabolism in *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 203.
- Pegg, A. E., and McCann, P. P. (1982). Polyamine metabolism and function. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 12. doi:10.1152/ajpcell.1982.243.5.c212.
- Phillips, D. A. (1980). Efficiency of symbiotic nitrogen fixation in legumes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31, 29–49. doi:10.1146/annurev.pp.31.060180.000333.
- Pottosin, I., Velarde-Buendía, A. M., Bose, J., Zepeda-Jazo, I., Shabala, S., and Dobrovinskaya, O. (2014). Cross-talk between reactive oxygen species and polyamines in regulation of ion transport across the plasma membrane: Implications for plant adaptive responses. *J. Exp. Bot.* 65, 1271–1283. doi:10.1093/jxb/ert423.
- Pratap, A., and Kumar, J. (2011). *Biology and breeding of food legumes*. CABI.
- Preisig, O., Zufferey, R., and Hennecke, H. (1996a). The *Bradyrhizobium japonicum* *fixGHIS* genes are required for the formation of the high-affinity  $\text{cbb}_3$ -type cytochrome oxidase. *Arch. Microbiol.* 165, 297–305. doi:10.1007/s002030050330.
- Preisig, O., Zufferey, R., Thöny-Meyer, L., Appleby, C. A., and Hennecke, H. (1996b). A high-affinity  $\text{cbb}_3$ -type cytochrome oxidase terminates the symbiosis-specific respiratory chain of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 178, 1532–1538. doi:10.1128/jb.178.6.1532-1538.1996.
- Prell, J., and Poole, P. (2006). Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends Microbiol.* 14, 161–168. doi:10.1016/j.tim.2006.02.005.
- Prell, J., White, J. P., Bourdes, A., Bunnewell, S., Bongaerts, R. J., and Poole, P. S. (2009). Legumes regulate *Rhizobium* bacteroid development and persistence by the supply of branched-chain amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 12477–12482. doi:10.1073/pnas.0903653106.
- Purcell, L. C., Serraj, R., De Silva, M., Sinclair, T. R., and Bona, S. (1998). Ureide concentration of field-grown soybean in response to drought and the relationship to nitrogen fixation. *J. Plant Nutr.* 21, 949–966. doi:10.1080/01904169809365456.
- Purcell, L. C., and Sinclair, T. R. (1995). Nodule gas exchange and water potential response to rapid imposition of water deficit. *Plant. Cell Environ.* 18, 179–187.

- doi:10.1111/j.1365-3040.1995.tb00351.x.
- Qiu, L. J., and Chang, R. Z. (2010). "The origin and history of soybean," in *The Soybean: Botany, Production and Uses* (CABI Publishing), 1–23. doi:10.1079/9781845936440.0001.
- Radutoiu, S., Madsen, L. H., Madsen, E. B., Felle, H. H., Umehara, Y., Grønlund, M., et al. (2003). Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 425, 585–592. doi:10.1038/nature02039.
- Ramos, M. L. G., Gordon, A. J., Minchin, F. R., Sprent, J. I., and Parsons, R. (1999). Effect of water stress on nodule physiology and biochemistry of a drought tolerant cultivar of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Ann. Bot.* 83, 57–63. doi:10.1006/anbo.1998.0792.
- Rao, I. (2014). "Advances in improving adaptation of common bean and Brachiaria forage grasses to abiotic stresses in the tropics," in *Handbook of plant and crop physiology*, ed. M. Pessarakli (CRC Press), 847–890. doi:10.1201/b16675-49.
- Regla-Márquez, C. F., Canto-Flick, A., Avilés-Viñas, S. A., Valle-Gough, R. E., Pérez-Pastrana, J., García-Villalobos, F. J., et al. (2016). Cadaverine: a common polyamine in zygotic embryos and somatic embryos of the species *Capsicum chinense* Jacq. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 124, 253–264. doi:10.1007/s11240-015-0889-x.
- Rigaud, J. R., and Puppo, A. (1975). Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids. *J. Gen. Microbiol.* 88, 223–228. doi:10.1099/00221287-88-2-223.
- Roy, M., and Wu, R. (2002). Overexpression of S-adenosylmethionine decarboxylase gene in rice increases polyamine level and enhances sodium chloride-stress tolerance. *Plant Sci.* 163, 987–992. doi:10.1016/S0168-9452(02)00272-8.
- Rubia, M. I., Ramachandran, V. K., Arrese-Igor, C., Larrainzar, E., and Poole, P. S. (2020). A novel biosensor to monitor proline in pea root exudates and nodules under osmotic stress and recovery. *Plant Soil* 452, 413–422. doi:10.1007/s11104-020-04577-2.
- Rubio, L. M., and Ludden, P. W. (2008). Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *Annu. Rev. Microbiol.* 62, 93–111. doi:10.1146/annurev.micro.62.081307.162737.
- Rubio, M. C., Becana, M., Sato, S., James, E. K., Tabata, S., and Spink, H. P. (2007). Characterization of genomic clones and expression analysis of the three types of superoxide dismutases during nodule development in *Lotus japonicus*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20, 262–275. doi:10.1094/MPMI-20-3-0262.
- Sachs, J. L., Skophammer, R. G., and Regus, J. U. (2011). Evolutionary transitions in bacterial symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 10800–10807. doi:10.1073/pnas.1100304108.

- Safarnejad, A., Collin, H. A., Bruce, K. D., and McNeilly, T. (1996). Characterization of alfalfa (*Medicago sativa* L.) following in vitro selection for salt tolerance. *Euphytica* 92, 55–61. doi:10.1007/BF00022828.
- Sagor, G. H. M., Liu, T., Takahashi, H., Niitsu, M., Berberich, T., and Kusano, T. (2013). Longer uncommon polyamines have a stronger defense gene-induction activity and a higher suppressing activity of *Cucumber* mosaic virus multiplication compared to that of spermine in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.* 32, 1477–1488. doi:10.1007/s00299-013-1459-5.
- Samaras, Y., Bressan, R. A., Csonka, L. N., Garcia-Rios, M. G., Paino, Du., and Rhodes, D. (1995). Proline accumulation during drought and salinity. *Environ. Plant Metab. Bios Sci. Publ. Oxford*, 161–187.
- Sánchez, F. J., De Andrés, E. F., Tenorio, J. L., and Ayerbe, L. (2004). Growth of epicotyls, turgor maintenance and osmotic adjustment in pea plants (*Pisum sativum* L.) subjected to water stress. *F. Crop. Res.* 86, 81–90. doi:10.1016/S0378-4290(03)00121-7.
- Santos, C. A. B. dos, Borges, W. L., Rocha, M. V. de, Espindola, J. A. de A., and Guerra, J. G. M. (2007). Efeito da adubação verde com leguminosa sobre a disponibilidade de nutrientes fornecidos pelas rochas brecha e carbonatito. *Rev. Bras. Agroecol.* 2, 1381–1384.
- Sassi, S., Aydi, S., Hessini, K., González, E. M., Arrese-Igor, C., and Abdelly, C. (2010). Long-term mannitol-induced osmotic stress leads to stomatal closure, carbohydrate accumulation and changes in leaf elasticity in *Phaseolus vulgaris* leaves. *African J. Biotechnol.* 9, 6061–6069.
- Sassi, S., González, E. M., Aydi, S., Arrese-Igor, C., and Abdelly, C. (2008). Tolerance of common bean to long-term osmotic stress is related to nodule carbon flux and antioxidant defenses: Evidence from two cultivars with contrasting tolerance. *Plant Soil* 312, 39–48. doi:10.1007/s11104-008-9613-5.
- Schlüter, A., Patschkowski, T., Quandt, J., Selinger, L. B., Weidner, S., Krämer, M., et al. (1997). Functional and regulatory analysis of the two copies of the fixNOQP operon of *Rhizobium leguminosarum* strain VF39. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10, 605–616. doi:10.1094/MPMI.1997.10.5.605.
- Schmutz, J., Cannon, S. B., Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W., et al. (2010). Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* 463, 178–183. doi:10.1038/nature08670.
- Scholander, P. F., Hammel, H. T., Bradstreet, E. D., and Hemmingsen, E. A. (1965). Sap pressure in vascular plants: negative hydrostatic pressure can be measured in plants. *Science.* 148, 339–346. doi:10.1126/science.148.3668.339.
- Schubert, K. R. (1986). Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport, and metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37, 539–574.

- doi:10.1146/annurev.pp.37.060186.002543.
- Schubert, M., Koteyeva, N. K., Wabnitz, P. W., Santos, P., Büttner, M., Sauer, N., et al. (2011). Plasmodesmata distribution and sugar partitioning in nitrogen-fixing root nodules of *Datisca glomerata*. *Planta* 233, 139–152. doi:10.1007/s00425-010-1285-8.
- Schubert, S. (2007). “The apoplast of indeterminate legume nodules: Compartment for transport of amino acids, amides and sugars?,” in *The Apoplast of Higher Plants: Compartment of Storage, Transport and Reactions: The Significance of the Apoplast for the Mineral Nutrition of Higher Plants* (Springer Netherlands), 445–454. doi:10.1007/978-1-4020-5843-1\_31.
- Schulze, J. (2004). How are nitrogen fixation rates regulated in legumes? *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 167, 125–137. doi:10.1002/jpln.200320358.
- Schulze, J., Shi, L., Blumenthal, J., Samac, D. A., Gantt, J. S., and Vance, C. P. (1998). Inhibition of alfalfa root nodule phosphoenolpyruvate carboxylase through an antisense strategy impacts nitrogen fixation and plant growth. *Phytochemistry* 49, 341–346. doi:10.1016/S0031-9422(98)00221-0.
- Seefeldt, L. C., Hoffman, B. M., and Dean, D. R. (2012). Electron transfer in nitrogenase catalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 16, 19–25. doi:10.1016/j.cbpa.2012.02.012.
- Seminario, A., Song, L., Zulet, A., Nguyen, H. T., González, E. M., and Larrainzar, E. (2017). Drought stress causes a reduction in the biosynthesis of ascorbic acid in soybean plants. *Front. Plant Sci.* 8. doi:10.3389/fpls.2017.01042.
- Sengupta, S., Mukherjee, S., Basak, P., and Majumder, A. L. (2015). Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants. *Front. Plant Sci.* 6, 656. doi:10.3389/fpls.2015.00656.
- Serraj, R., Sinclair, T. R., and Purcell, L. C. (1999a). Symbiotic N<sub>2</sub> fixation response to drought. *J. Exp. Bot.* 50, 143–155. doi:10.1093/jxb/50.331.143.
- Serraj, R., Vadez, V., Denison, R. F., and Sinclair, T. R. (1999b). Involvement of ureides in nitrogen fixation inhibition in soybean. *Plant Physiol.* 119, 289–296. doi:10.1104/pp.119.1.289.
- Shan, X., Aw, T. Y., and Jones, D. P. (1990). Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmacol. Ther.* 47, 61–71. doi:10.1016/0163-7258(90)90045-4.
- Shao, H. B., Chu, L. Y., Zhao, C. X., Guo, Q. J., Liu, X. A., and Ribaut, J. M. (2006). Plant gene regulatory network system under abiotic stress. *Acta Biol. Szeged.* 50, 1–9.
- Shevyakova, N. I., Il'ina, E. N., Stetsenko, L. A., and Kuznetsov, V. V. (2011). Nickel accumulation in rape shoots (*Brassica napus* L.) increased by putrescine. *Int. J. Phytoremediation* 13, 345–356. doi:10.1080/15226514.2010.495147.



- Shevyakova, N. I., Shorina, M. V., Rakitin, V. Y., Stetsenko, L. A., and Kuznetsov, V. V. (2004). Ethylene-induced production of cadaverine is mediated by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Dokl. Biol. Sci.* 395, 127–129. doi:10.1023/B:DOBS.0000025237.42824.7c.
- Silvente, S., and Blanco, L. (2002). *Rhizobium etli* mutant modulates carbon and nitrogen metabolism in *Phaseolus vulgaris* nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15, 728–733.
- Silvente, S., Camas, A., and Lara, M. (2003). Heterogeneity of sucrose synthase genes in bean (*Phaseolus vulgaris* L.): Evidence for a nodule-enhanced sucrose synthase gene. *J. Exp. Bot.* 54, 749–755. doi:10.1093/jxb/erg086.
- Silvente, S., Sobolev, A. P., and Lara, M. (2012). Metabolite adjustments in drought tolerant and sensitive soybean genotypes in response to water stress. *PLoS One* 7, e38554. doi:10.1371/journal.pone.0038554.
- Singh, M., Kumar, J., Singh, S., Singh, V. P., and Prasad, S. M. (2015). Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 14, 407–426. doi:10.1007/s11157-015-9372-8.
- Singh, S. K., and Raja Reddy, K. (2011). Regulation of photosynthesis, fluorescence, stomatal conductance and water-use efficiency of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) under drought. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 105, 40–50. doi:10.1016/j.jphotobiol.2011.07.001.
- Slocum, R. D., Flores, H. E., Galston, A. W., and Weinstein, L. H. (1989). Improved method for HPLC analysis of polyamines, agmatine and aromatic monoamines in plant tissue. *Plant Physiol.* 89, 512–517. doi:10.1104/pp.89.2.512.
- Smil, V. (2004). *Enriching the Earth: Fritz Haber, Carl Bosch, and the Transformation of World Food Production*. Cambridge, MA: MIT Press.
- Smirnoff, N. (2005). "Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions," in *Antioxidants and reactive oxygen species in plants* (Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd), 53–86. doi:10.1002/9780470988565.ch3.
- Soumare, A., Diedhiou, A. G., Thuita, M., Hafidi, M., Ouhdouch, Y., Gopalakrishnan, S., et al. (2020). Exploiting biological nitrogen fixation: A route towards a sustainable agriculture. *Plants* 9, 1–22. doi:10.3390/plants9081011.
- Soystats (2019). A reference guide to soybean facts and figures. *Am. Soybean Assoc. U.S. Dep. Agric.* Available at: <http://soystats.com/> [Accessed March 25, 2020].
- Sprent, J. I. (2009). *Legume nodulation: a global perspective*. Wiley-Blackwell doi:10.1002/9781444316384.
- Stacey, G., Vodkin, L., Parrott, W. A., and Shoemaker, R. C. (2004). National science

- foundation-sponsored workshop report. Draft plan for soybean genomics. in *Plant Physiology* (American Society of Plant Biologists), 59–70. doi:10.1104/pp.103.037903.
- Stagnari, F., Maggio, A., Galieni, A., and Pisante, M. (2017). Multiple benefits of legumes for agriculture sustainability: an overview. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 4. doi:10.1186/s40538-016-0085-1.
- Stitt, M., Müller, C., Matt, P., Gibon, Y., Carillo, P., Morcuende, R., et al. (2002). Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *J. Exp. Bot.* 53, 959–970. doi:10.1093/jexbot/53.370.959.
- Streeter, J. G. (1985). Accumulation of  $\alpha,\alpha$ -trehalose by Rhizobium bacteria and bacteroids. *J. Bacteriol.* 164, 78–84. doi:10.1128/JB.164.1.78-84.1985.
- Streeter, J., and Wong, P. P. (1988). Inhibition of legume nodule formation and  $N_2$  fixation by nitrate. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 7, 1–23. doi:10.1080/07352688809382257.
- Su, G. X., and Bai, X. (2008). Contribution of putrescine degradation to proline accumulation in soybean leaves under salinity. *Biol. Plant.* 52, 796–799. doi:10.1007/s10535-008-0156-7.
- Sulieman, S. (2011). Does GABA increase the efficiency of symbiotic  $N_2$  fixation in legumes? *Plant Signal. Behav.* 6, 32–36. doi:10.4161/psb.6.1.14318.
- Sulieman, S., Fischinger, S. A., Gresshoff, P. M., and Schulze, J. (2010). Asparagine as a major factor in the N-feedback regulation of  $N_2$  fixation in *Medicago truncatula*. *Physiol. Plant.* 140, 21–31. doi:10.1111/j.1399-3054.2010.01380.x.
- Sulieman, S., and Schulze, J. (2010). The efficiency of nitrogen fixation of the model legume *Medicago truncatula* (Jemalong A17) is low compared to *Medicago sativa*. *J. Plant Physiol.* 167, 683–692. doi:10.1016/j.jplph.2009.12.016.
- Sulieman, S., Schulze, J., and Tran, L. S. P. (2014). N-feedback regulation is synchronized with nodule carbon alteration in *Medicago truncatula* under excessive nitrate or low phosphorus conditions. *J. Plant Physiol.* 171, 407–410. doi:10.1016/j.jplph.2013.12.006.
- Sulieman, S., and Tran, L.-S. P. (2013). Asparagine: an amide of particular distinction in the regulation of symbiotic nitrogen fixation of legumes. *Crit. Rev. Biotechnol.* 33, 309–327. doi:10.3109/07388551.2012.695770.
- Supanjani, S., Habib, A., Mabood, F., Lee, K. D., Donnelly, D., and Smith, D. L. (2006). Nod factor enhances calcium uptake by soybean. *Plant Physiol. Biochem.* 44, 866–872. doi:10.1016/j.plaphy.2006.10.001.
- Taiz, L., and Zeiger, E. (2006). *Plant physiology*. 4th ed. Sinauer Associates.
- Tajima, S., Takane, K., Nomura, M., and Kouchi, H. (2000). Symbiotic nitrogen fixation

- at the late stage of nodule formation in *Lotus japonicus* and other legume plants. *J. Plant Res.* 113, 467–473. doi:10.1007/pl00013957.
- Talaat, N. B., and Shawky, B. T. (2016). Dual application of 24-epibrassinolide and spermine confers drought stress tolerance in maize (*Zea mays* L.) by modulating polyamine and protein metabolism. *J. Plant Growth Regul.* 35, 518–533. doi:10.1007/s00344-015-9557-y.
- Talbi, C., Sánchez, C., Hidalgo-García, A., González, E. M., Arrese-Igor, C., Girard, L., et al. (2012). Enhanced expression of *Rhizobium etli* cbb<sub>3</sub> oxidase improves drought tolerance of common bean symbiotic nitrogen fixation. *J. Exp. Bot.* 63, 5035–43. doi:10.1093/jxb/ers101.
- Tang, H., Krishnakumar, V., Bidwell, S., Rosen, B., Chan, A., Zhou, S., et al. (2014). An improved genome release (version Mt4.0) for the model legume *Medicago truncatula*. *BMC Genomics* 15, 312. doi:10.1186/1471-2164-15-312.
- Tavladoraki, P., Cona, A., Federico, R., Tempera, G., Viceconte, N., Saccoccio, S., et al. (2012). Polyamine catabolism: target for antiproliferative therapies in animals and stress tolerance strategies in plants. *Amino Acids* 42, 411–426. doi:10.1007/s00726-011-1012-1.
- Terui, Y., Ohnuma, M., Hiraga, K., Kawashima, E., and Oshima, T. (2005). Stabilization of nucleic acids by unusual polyamines produced by an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *Biochem. J.* 388, 427–433. doi:10.1042/BJ20041778.
- Tomar, P. C., Lakra, N., and Mishra, S. N. (2013). Cadaverine: A lysine catabolite involved in plant growth and development. *Plant Signal. Behav.* 8. doi:10.4161/psb.25850.
- Toorchi, M., Yukawa, K., Nouri, M. Z., and Komatsu, S. (2009). Proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in soybean roots. *Peptides* 30, 2108–2117. doi:10.1016/j.peptides.2009.09.006.
- Tóth, S. Z., Schansker, G., and Garab, G. (2013). The physiological roles and metabolism of ascorbate in chloroplasts. *Physiol. Plant.* 148, 161–175. doi:10.1111/ppl.12006.
- Touraine, B. (2004). “Nitrate uptake by roots - transporters and root development,” in *Nitrogen Acquisition and Assimilation in Higher Plants*, 1–34. doi:10.1007/978-1-4020-2728-4\_1.
- Trevor, M. A. T., and Charles, C. (2006). The role of PHB metabolism in the symbiosis of rhizobia with legumes. *Appl Microbiol Biotechnol* 71, 377–386. doi:10.1007/s00253-006-0354-1.
- Tully, R. E., Hanson, A. D., and Nelsen, C. E. (1979). Proline accumulation in water-stressed barley leaves in relation to translocation and the nitrogen budget. *Plant Physiol.* 63, 518–523. doi:10.1104/pp.63.3.518.

- Udvardi, M., Price, G. D., Gresshoff, P. M., and Day, D. A. (1988). A dicarboxylate transporter on the peribacteroid membrane of soybean nodules. *FEBS Lett.* 231, 36–40. doi:10.1016/0014-5793(88)80697-5.
- Vadez, V., Sinclair, T. R., and Serraj, R. (2000). Asparagine and ureide accumulation in nodules and shoots as feedback inhibitors of N<sub>2</sub> fixation in soybean. *Physiol. Plant.* 110, 215–223. doi:10.1034/j.1399-3054.2000.110211.x.
- Van Breusegem, F., Dekeyser, R., Gielen, J., Van Montagu, M., and Caplan, A. (1994). Characterization of a S-adenosylmethionine synthetase gene in rice. *Plant Physiol.* 105, 1463–1464. doi:10.1104/pp.105.4.1463.
- Varshney, R. K., Roorkiwal, M., and Nguyen, H. T. (2013). Legume genomics: from genomic resources to molecular breeding. *Plant Genome* 6. doi:10.3835/plantgenome2013.12.0002in.
- Vasse, J., De Billy, F., Camut, S., and Truchet, G. (1990). Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J. Bacteriol.* 172, 4295–4306. doi:10.1128/jb.172.8.4295-4306.1990.
- Vessey, J. K., Pawlowski, K., and Bergman, B. (2005). Root-based N<sub>2</sub>-fixing symbioses: Legumes, actinorhizal plants, *Parasponia* sp. and cycads. *Plant Soil* 266, 205–230. doi:10.1007/s11104-005-0871-1.
- Walters, D. R. (2000). Polyamines in plant-microbe interactions. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 57, 137–146. doi:10.1006/pmpp.2000.0286.
- Wang, F., Cui, X., Sun, Y., and Dong, C. H. (2013). Ethylene signaling and regulation in plant growth and stress responses. *Plant Cell Rep.* 32, 1099–1109. doi:10.1007/s00299-013-1421-6.
- Wang, H. L., Lee, P. Du, Liu, L. F., and Su, J. C. (1999). Effect of sorbitol induced osmotic stress on the changes of carbohydrate and free amino acid pools in sweet potato cell suspension cultures. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 40, 219–225.
- Wang, W., Paschalidis, K., Feng, J. C., Song, J., and Liu, J. H. (2019). Polyamine catabolism in plants: A universal process with diverse functions. *Front. Plant Sci.* 10, 561. doi:10.3389/fpls.2019.00561.
- Warren, C. R., and Adams, M. A. (2000). Capillary electrophoresis for the determination of major amino acids and sugars in foliage: application to the nitrogen nutrition of sclerophyllous species. *J. Exp. Bot.* 51, 1147–1157. doi:10.1093/JEXBOT/51.347.1147.
- Wei, H., and Layzell, D. (2006). Adenylate-coupled ion movement. A mechanism for the control of nodule permeability to O<sub>2</sub> diffusion. *Plant Physiol.* 141, 280–287. doi:10.1104/pp.106.077552.
- Wheeler, G. L., Jones, M. A., and Smirnoff, N. (1998). The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* 393, 365–369. doi:10.1038/30728.

- Whitehead, L. F., Tyerman, S. D., and Day, D. A. (2001). Polyamines as potential regulators of nutrient exchange across the peribacteroid membrane in soybean root nodules. *Aust. J. Plant Physiol.* 28, 675–681. doi:10.1071/pp01025.
- Wi, S. J., Kim, S. J., Kim, W. T., and Park, K. Y. (2014). Constitutive S-adenosylmethionine decarboxylase gene expression increases drought tolerance through inhibition of reactive oxygen species accumulation in *Arabidopsis*. *Planta* 239, 979–988. doi:10.1007/s00425-014-2027-0.
- Wi, S. J., Kim, W. T., and Park, K. Y. (2006). Overexpression of carnation S-adenosylmethionine decarboxylase gene generates a broad-spectrum tolerance to abiotic stresses in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Rep.* 25, 1111–1121. doi:10.1007/s00299-006-0160-3.
- Wilcox, J. R., and Shibles, R. M. (2001). Interrelationships among seed quality attributes in soybean. *Crop Sci.* 41, 11–14. doi:10.2135/cropsci2001.41111x.
- Witty, J. F., and Minchin, F. R. (1990). "Oxygen diffusion in the legume root nodule," in *Nitrogen Fixation* (Springer US), 285–292. doi:10.1007/978-1-4684-6432-0\_29.
- Witty, J. F., and Minchin, F. R. (1998a). Hydrogen measurements provide direct evidence for a variable physical barrier to gas diffusion in legume nodules. *J. Exp. Bot.* 49, 1015–1020. doi:10.1093/jexbot/49.323.1015.
- Witty, J. F., and Minchin, F. R. (1998b). Methods for the continuous measurement of O<sub>2</sub> consumption and H<sub>2</sub> production by nodulated legume root systems. *J. Exp. Bot.* 49, 1041–1047. doi:10.1093/jxb/49.323.1041.
- Wolucka, B. A., and Van Montagu, M. (2003). GDP-mannose 3',5'-epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the de novo biosynthesis of vitamin C in plants. *J. Biol. Chem.* 278, 47483–47490. doi:10.1074/jbc.M309135200.
- Xiao, T. T., Schilderink, S., Moling, S., Deinum, E. E., Kondorosi, E., Franssen, H., et al. (2014). Fate map of *Medicago truncatula* root nodules. *Dev.* 141, 3517–3528. doi:10.1242/dev.110775.
- Xing, S. G., Jun, Y. B., Hau, Z. W., and Liang, L. Y. (2007). Higher accumulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid induced by salt stress through stimulating the activity of diamine oxidases in *Glycine max* (L.) Merr. roots. *Plant Physiol. Biochem.* 45, 560–566. doi:10.1016/j.plaphy.2007.05.007.
- Xu, D., Guo, J., Xu, L., Sun, X., and Sun, X. Z. (2014). The relationship between polyamine oxidase activity and lignin deposition and chrysanthemum flower bud differentiation. *Acta Agric. Boreali Sin.* 29, 164–169.
- Yamashita, N., Tanabata, S., Ohtake, N., Sueyoshi, K., Sato, T., Higuchi, K., et al. (2019). Effects of different chemical forms of nitrogen on the quick and reversible inhibition of soybean nodule growth and nitrogen fixation activity. *Front. Plant Sci.* 10. doi:10.3389/fpls.2019.00131.

- Yang, H., Shi, G., Wang, H., and Xu, Q. (2010). Involvement of polyamines in adaptation of *Potamogeton crispus* L. to cadmium stress. *Aquat. Toxicol.* 100, 282–288. doi:10.1016/j.aquatox.2010.07.026.
- Yang, J., Zhang, J., Liu, K., Wang, Z., and Liu, L. (2007). Involvement of polyamines in the drought resistance of rice. *J. Exp. Bot.* 58, 1545–1555. doi:10.1093/jxb/erm032.
- Yoshimura, K., Nakane, T., Kume, S., Shiomi, Y., Maruta, T., Ishikawa, T., et al. (2014). Transient expression analysis revealed the importance of VTC2 expression level in light/dark regulation of ascorbate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78, 60–66. doi:10.1080/09168451.2014.877831.
- Yu, S. W., and Tang, K. X. (2004). MAP kinase cascades responding to environmental stress in plants. *Acta Bot. Sin.* 46, 127–136.
- Zabalza, A., Gálvez, L., Marino, D., Royuela, M., Arrese-Igor, C., and González, E. M. (2008). The application of ascorbate or its immediate precursor, galactono-1,4-lactone, does not affect the response of nitrogen-fixing pea nodules to water stress. *J. Plant Physiol.* 165, 805–812. doi:10.1016/j.jplph.2007.08.005.
- Zechmann, B. (2011). Subcellular distribution of ascorbate in plants. *Plant Signal. Behav.* 6, 360–363. doi:10.4161/psb.6.3.14342.
- Zhang, C., Liu, J., Zhang, Y., Cai, X., Gong, P., Zhang, J., et al. (2011). Overexpression of SIGMEs leads to ascorbate accumulation with enhanced oxidative stress, cold, and salt tolerance in tomato. *Plant Cell Rep.* 30, 389–398. doi:10.1007/s00299-010-0939-0.
- Zhang, G. Y., Liu, R. R., Zhang, C. Q., Tang, K. X., Sun, M. F., Yan, G. H., et al. (2015). Manipulation of the rice L-galactose pathway: Evaluation of the effects of transgene overexpression on ascorbate accumulation and abiotic stress tolerance. *PLoS One* 10, e0125870. doi:10.1371/journal.pone.0125870.
- Zhang, J., and Kirkham, M. B. (1994). Drought-stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species. *Plant Cell Physiol.* 35, 785–791. doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a078658.
- Zhou, Y., Tao, Q. C., Wang, Z. N., Fan, R., Li, Y., Sun, X. F., et al. (2012). Engineering ascorbic acid biosynthetic pathway in *Arabidopsis* leaves by single and double gene transformation. *Biol. Plant.* 56, 451–457.
- Zyalalov, A. A. (2004). Water flows in higher plants: Physiology, evolution, and system analysis. *Russ. J. Plant Physiol.* 51, 547–556. doi:10.1023/B:RUPP.0000035750.70352.f0.