

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



Trabajo de Fin de Máster presentado por Lorena Felipe Larráyo

Resumen

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) es un proceso muy sensible a estreses ambientales, sobre todo al estrés hídrico. Bajo estas condiciones el proceso de desarrollo nodular es el más afectado, provocando la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y cuyos mecanismos de tolerancia conllevan la producción de antioxidantes como el ácido ascórbico (AsA). En este estudio se han empleado una serie de líneas de plantas de *Medicago truncatula* que sobreexpresan de forma constitutiva el gen *VTC2* y otra línea equivalente con la misma construcción pero carente de región génica. Tras 8 semanas de cultivo bajo condiciones controladas y después de someterlas a los estados de sequía moderada, sequía severa y óptima irrigación, se ha analizado el crecimiento y las respuestas fisiológicas de dos líneas de plantas. No se observan diferencias significativas en cuanto a la respuesta global de la planta bajo las condiciones de estrés hídrico aplicadas.

Palabras clave: fijación biológica de nitrógeno (FBN), sequía, especies reactivas de oxígeno (ROS), ácido ascórbico (AsA), *Medicago truncatula*.

Abstract

Biological Nitrogen Fixation (BNF) is one of the physiological processes most affected by environmental stresses, particularly drought. Under these conditions, plant growth is arrested and reactive oxygen species (ROS) are accumulated, triggering the activation of plant defense mechanisms such as the production of antioxidants like ascorbic acid (AsA). In the current work, two lines of *Medicago truncatula* plants have been used.: one of the lines over-expresses the gene *VTC2*, key enzyme in the production of AsA, while the other is also transformed but with an empty vector, thus lacking the genetic region of the construct. After 8 weeks of growth under controlled environmental conditions, plants were subjected to progressive water deficit. Two drought stages were measured: moderate and severe drought. As controls, a subset of plants was maintained under optimal irrigation states. We have analysed the growth and the physiological responses of the two lines of plants. We conclude that both lines of plants show similar global responses to the water deficit conditions applied.

Key words: biological nitrogen fixation (BNF), drought, reactive oxygen species (ROS), *ascorbic acid (AsA)*, *Medicago truncatula*.

Índice

Abreviaturas.....	5
I. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Importancia del nitrógeno	8
1.2. Importancia de las leguminosa	8
1.3. Leguminosas forrajeras	9
1.4. Fijación biológica de nitrógeno (FBN)	10
1.4.1 Organismos involucrados en la FBN	10
1.4.2 Simbiosis rizobio-leguminosas	11
1.4.3 Complejo enzimático nitrogenasa	14
1.5. Estrés hídrico	15
1.5.1 El agua en las plantas	15
1.5.2 Efectos del estrés hídrico en las plantas	16
1.5.3 Efectos del estrés hídrico en la FBN	17
1.6. Sistema de defensa antioxidante en las plantas	18
1.6.1 Especies reactivas de oxígeno (ROS)	18
1.6.2 Defensa antioxidante	18
1.7. Ácido ascórbico (AsA)	19
1.7.1 Principales funciones del AsA	19
1.7.2 Biosíntesis del AsA	20
1.7.3 Regeneración del AsA	22
1.7.4 AsA en la simbiosis	22
1.7.5 VTC2	22

II. OBJETIVO	25
III. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1. Material biológico	28
3.2. Condiciones de crecimiento	28
3.2.1 Procedimiento de germinación de las semillas	28
3.2.2 Preparación del inóculo	28
3.2.3 Riego	28
3.2.4 Condiciones de la cámara de cultivo	29
3.3. Diseño experimental	29
3.4. Metodología empleada	31
3.4.1 Determinación del estado hídrico de la planta	31
3.4.1.1 Evapotranspiración	31
3.4.1.2 Conductancia estomática	31
3.4.1.3 Potencial hídrico foliar	31
3.4.1.4 Potencial hídrico nodular	32
3.4.2 Actividad fotosintética	33
3.4.3 Crecimiento	33
3.4.4 Fijación de nitrógeno	34
3.5. Análisis estadístico	35
IV. RESULTADOS	37
4.1. Determinación del estado hídrico de la planta	38
4.1.1. Evapotranspiración	38
4.1.2. Conductancia estomática	39

4.1.3. Potencial hídrico foliar	40
4.1.4. Potencial hídrico nodular	40
4.2. Actividad fotosintética	41
4.3. Crecimiento	42
4.4. Actividad nitrogenasa aparente (ANA)	45
V. DISCUSIÓN	47
VI. CONCLUSIONES	52
VII. BIBLIOGRAFÍA	54

Abreviaturas

- ANA: Actividad nitrogenasa aparente
- APX: Ascorbato peroxidasa
- AsA: Ácido ascórbico
- ASC-GSH: Ciclo del glutatión-ascorbato
- C: Control
- DHA: Deshidroascórbico
- DHAR: Deshidroascorbato reductasa
- FBN: Fijación biológica de nitrógeno
- Fd: Ferredoxina
- GLDH: L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa
- GME: GDP-D-manosa 3', 5'- epimerasa
- GOGAT: Glutamato sintasa
- GR: Glutatión
- *GS/GOGAT*: Ciclo de la glutamina sintetasa/glutamato sintasa
- gs: Conductancia estomática
- GS: glutamina sintetasa
- GSH: Glutatión
- GSSG: Glutatión oxidado
- hGSH: Homoglutatión
- Lb: leghemoglobina
- MDHA: Monodeshidroascorbato
- *NADPH*: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
- OBD: Barrera de difusión de oxígeno
- PFN: Peso fresco de nódulos
- PFPA: Peso fresco parte aérea
- PFR: Peso fresco raíz
- PSN: Peso seco nódulos
- PSPA: Peso seco de la parte aérea
- PSR: Peso seco de la raíz
- ROS: Especies reactivas de oxígeno
- PSR/PSPA: ratio peso seco raíz/peso seco parte aérea
- SM: Sequía moderada

- SS: Sequía severa

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia del nitrógeno

El nitrógeno (N) es un elemento necesario en la composición de proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares, siendo una molécula esencial para el crecimiento de todos los organismos (Mayz-Figueroa, 2004). Es uno de los elementos más abundantes en la superficie terrestre, encontrándose el mayor depósito en la litosfera, en la atmósfera donde representa el 78,1% del volumen en forma de dinitrógeno (N_2) y en la biomasa (Aparicio-Tejo et al., 2008).

En los ecosistemas naturales el N se encuentra inmerso en un ciclo donde la actividad de diversos microorganismos es capaz de llevar a cabo un conjunto de funciones que lo transforman y almacenan (Schulze, 1994). Sin embargo, la molécula inerte N_2 (nitrógeno atmosférico) no es utilizable por la mayor parte de los sistemas biológicos ya que estos solo pueden utilizar el nitrógeno combinado como el amonio (NH_4^+) o nitrato (NO_3^-), por lo que solo un pequeño grupo de microorganismos altamente especializados puede utilizarlo. El proceso por el cual estos microorganismos reducen el N_2 hasta una forma utilizable se conoce como Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) y puede ser llevada a cabo por los microorganismos en vida libre o en simbiosis con plantas (Allan y Graham, 2002).

1.2. Importancia de las leguminosas

Las leguminosas son un grupo de plantas de distribución cosmopolita pertenecientes a la familia *Fabaceae*. Sus 730 géneros y casi 20.000 especies, las convierte en la tercera familia con mayor riqueza de especies.

Son plantas ampliamente utilizadas para alimentación humana y animal por ser fuente de proteína vegetal de alta calidad con un alto contenido en lisina, de algunos minerales como el Ca, Fe, Cu, Zn, P, K y Mg y de vitaminas hidrosolubles (Múzquiz, 2001). Actualmente también tienen un papel creciente en alimentación animal al ser incluidas en las formulaciones de piensos como en pastos y forrajes para producción de carne y leche de alta calidad (Rubiales, 2016). Por todo ello desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de la agricultura y representan aproximadamente un tercio de la producción de los cultivos primarios a nivel mundial (Benedito et al., 2008).

Las leguminosas son capaces de crecer en suelos áridos de escasa fertilidad, lo que se debe a su capacidad para establecer asociaciones simbióticas con bacterias del suelo del género *Rhizobium* que son capaces de llevar a cabo la FBN (Ramírez-Bahena, 2016). Por ello, el uso de las leguminosas en las rotaciones de cultivos ha sido un componente importante de muchos sistemas agrícolas y una práctica ampliamente utilizada para evitar la degradación y el

empobrecimiento, presentado un gran potencial para suministrar el nitrógeno requerido por la agricultura moderna. (López-Bellido, 2006). Se estima que entre 40 y 60 millones de toneladas de N se fijan anualmente por las leguminosas cultivadas (Smil, 1999).

1.3. Leguminosas forrajeras

Desde el punto de vista del uso en nutrición animal pueden considerarse dos tipos de leguminosas: leguminosas forrajeras, de las que se aprovecha el tallo y las hojas (p. ej. la alfalfa) y son usadas en la alimentación de rumiantes, y leguminosas de grano, de las que se aprovecha la semilla principalmente (p. ej. habas, guisantes) usadas esencialmente para aves y cerdos (Rubio y Molina, 2016). En los suelos del Centro-Oeste de España aparecen con frecuencia un grupo de leguminosas silvestres forrajeras y pratenses con alto valor nutritivo para los animales, cuyo grupo lo constituye el género *Medicago* (Fuentes, 1993). Se reconocen por su forma trifoliada en la que la hoja del centro posee un peciolo más largo que las dos laterales, las cuales se hallan dispuestas en posición simétrica respecto a la anterior. Las semillas son arriñonadas y se hallan encerradas en una vaina enrollada en forma de espiral formando un fruto muy compreso. Los animales tienen preferencia por el género *Medicago* frente a los tréboles ya que son más digestibles y poseen un alto contenido proteico.

En este género se encuentra la especie *Medicago truncatula*, una hierba anual espinosa típica de climas templados que alcanza unos 40 cm de altura y de inflorescencia amarilla, que crece en herbazales y campos de cultivo con indiferencia edáfica entre los 150-1000 m de altitud (Castroviejo et al., 2015). Sus semillas y plántulas son pequeñas y se adaptan a condiciones semiáridas. Puede reproducirse por autofertilización o mediante cruzamientos y su ciclo de vida es relativamente corto (entre 3 y 4 meses). También posee un genoma diploide pequeño (550 Mbp) que ha sido recientemente secuenciado (Young et al., 2011).



Figura 1: Hojas trifoliadas de una planta de *Medicago truncatula* en condiciones de cultivo controladas.

Gracias a su rápido desarrollo, sus características reproductivas y su genoma reducido, *Medicago truncatula* ha sido ampliamente utilizada como modelo para el estudio de bases moleculares, genéticas y biológicas de la FBN.

1.4. Fijación biológica de nitrógeno (FBN)

1.4.1 Organismos involucrados en la FBN

El nitrógeno en las plantas es el cuarto elemento más abundante después del carbono (C), hidrógeno (H) y oxígeno (O), por lo que su deficiencia limita su productividad (López-Bellido, 2006). Como el N biológicamente utilizable comprende solo una pequeña fracción de N total presente en la tierra, el proceso de fijación de N₂ adquiere importancia al ser responsable de la transformación del mayor volumen de N₂ atmosférico a formas utilizables por las plantas.

La FBN es llevada a cabo por organismos procariotas en un proceso altamente dergónico que requiere una fuente energética. Entre los organismos involucrados en la FBN se pueden encontrar viviendo libremente (arqueobacterias, bacterias fotosintéticas, cianobacterias con heterocistos etc.) o formando asociaciones (Mayz-Figueroa, 2004). Entre las asociaciones simbióticas más comunes se encuentran las que realizan simbiosis con no leguminosas (como por ejemplo, con el género *Frankia*), y las que realizan simbiosis con leguminosas. En estas últimas la FBN es posible mediante el establecimiento de nódulos radicales con Rizobacterias, organismos pertenecientes al subgrupo de las proteobacterias que incluye, al menos, a los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium* y *Allorhizobium* (Arrese-Igor et al., 2002).

FIJADORES EN VIDA LIBRE

Arqueobacterias	<i>Methanosarcina</i>	Constituyen un reino diferenciado de las eubacterias. Presentan
	<i>Methanococcus</i>	algunas características peculiares, como poseer intrones.
Anaeróbios	<i>Clostridium</i>	Suelos, aguas dulces y marinas, sedimentos, tracto intestinal.
Anaerobios facultativos	<i>Klebsiella</i>	Flora intestinal, suelos, aguas.
Microaerobios	<i>Azospirillum</i>	Suelos, generalmente asociado a raíces de plantas.
Aerobios	<i>Azotobacter</i>	Suelos, aguas y superficies vegetales. Generalmente más eficaces
	<i>Beijerinckia</i>	a bajas concentraciones de O ₂ .
Bacterias fotosintéticas	<i>Rhodospirillum</i>	Acuáticas. Fijan N ₂ en anaerobiosis utilizando la energía de la
	<i>Chromatium</i>	fotosíntesis.
Cianobacterias sin heterocistos	<i>Oscillatoria</i>	Fijan N ₂ en microaerobiosis o en aerobiosis con separación
	<i>Gloeotheca</i>	temporal de la fijación y de la fotosíntesis.
Cianobacterias con heterocistos	<i>Nostoc</i>	Capaces de fijar N ₂ en condiciones aeróbicas y anaeróbicas.
	<i>Anabaena</i>	

Tabla 1: Grupos representativos de organismos fijadores de N₂ en vida libre y alguna de sus características. Modificado de Aparicio-Tejo et al., (2008).

		<i>FIJADORES EN SIMBIOSIS</i>
<i>Con leguminosas</i>	<i>Rhizobium, Sinorhizobium,</i>	Leguminosas de origen templado. Leguminosas de origen tropical y subtropical.
	<i>Mesorhizobium, Bradyrhizobium, Allorhizobium</i>	
	<i>Azorhizobium</i>	Sesbania.
<i>Con no leguminosas</i>	<i>Frankia</i>	Alnus, Casuarina, Myrica, Comptonia, Coriaria.
<i>Otras simbiosis</i>	<i>Nostoc</i>	Hongos (formando líquenes), briófitos (<i>Blasia</i>), gimnospermas (<i>Macrozamia</i>) y angiospermas (<i>Gunnera</i>).
	<i>Anabaena</i>	Pteridófitos (<i>Azolla</i>).

Tabla 2: Grupos representativos de organismos fijadores de N₂ en simbiosis y alguna de sus características. Modificado de Aparicio-Tejo et al., (2018).

1.4.2 Simbiosis rizobio-leguminosas

La simbiosis entre plantas y las bacterias fijadoras de nitrógeno ha permitido la colonización de las plantas en nuevos ambientes, ya que esta simbiosis permite que las plantas sobrevivan en ambientes deficientes en nitrógeno (Suzaki et al., 2019). La planta proporciona al nódulo una fuente de energía y carbono en forma de fotosintatos que llegan por los haces vasculares, mientras que el nódulo a cambio, suministra nitrógeno en forma asimilable (Verdoy, 2004). En el caso de las plantas leguminosas, la asociación simbiótica que forma con bacterias de la familia *Rhizobiaceae* es un proceso complejo que culmina con la formación del nódulo fijador (Sanjuan et al., 2002).

En este establecimiento simbiótico se producen un continuo y adecuado intercambio de señales entre ambos organismos, la bacteria y la planta. El proceso comienza con la exudación de flavonoides por parte de las plantas que a concentraciones nanomolares (nM) provocan la atracción quimiotáctica de las bacterias. Estos mismos flavonoides, a concentraciones micromolares (μM), junto con algunos ácidos aldónicos y betaínas, activan la expresión de un grupo de genes bacterianos, los genes de nodulación, que conducen a la síntesis de factores Nod. Los factores Nod son lipoquitinolisacáridos con características específicas según la especie de rizobio que determinan la especificidad de la simbiosis (Mulligan y Long, 1989). Presentan una estructura básica similar compuesta por un esqueleto de 3-5 residuos de N-acetil-D-glucosamina unidos mediante enlaces β (esqueleto de quitina) al que se une un ácido graso en el residuo de azúcar de extremo no reductor. Así, en *Sinorhizobium meliloti*

(renombrado actualmente como *Ensifer meliloti*), la estructura es convertida a una forma sulfatada por los productos de los genes de la nodulación específicos *nodH*, *nodP* y *nodQ*.

En presencia de los factores Nod la raíz vegetal inicia la formación del nódulo que incluye la deformación de los pelos radicales que acaba formando el cayado de pastor, la desdiferenciación de ciertas células del córtex interno (en nódulos indeterminados) y la formación del cordón de infección (Aparicio-Tejo et al., 2008).

Posteriormente, las bacterias penetran a través de la pared celular del pelo radical mediante la secreción de celulasas (Xie et al., 2012) y viajan por el canal de infección que progresa hacia la base del pelo radical. Este cordón de infección contiene una matriz de origen bacteriano y glicoproteínas de origen vegetal. Cuando el cordón de infección alcanza el tejido vegetal con actividad meristemática, comienza la diferenciación nodular. En este proceso las células bacterianas se transforman en simbiosomas de la siguiente forma: aumentan su tamaño, su metabolismo se especializa en la fijación de nitrógeno con la síntesis de la nitrogenasa, pierden la capacidad de multiplicación y se reducen o reprimen la expresión de muchos genes implicados en el metabolismo celular básico o de mantenimiento (Arrese-Igor et al., 2002).

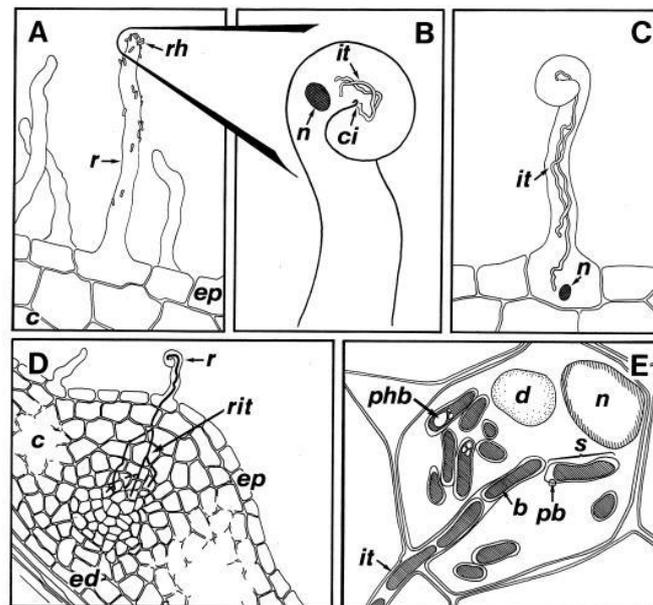


Figura 2: Invasión de pelos radicales por *Rhizobium* sp. (A) El rhizobio (*rh*) coloniza la rizósfera y se adhiere a los pelos radicales de la raíz. (B) Los factores Nod inducen la formación del cayado de pastor permitiendo la penetración bacteriana al centro de infección (*ci*). El núcleo del pelo radical (*n*) precede el crecimiento del hilo de infección (*it*). (C) El hilo de infección alcanza la base del pelo radical (*it*), aún acompañado del núcleo (*n*). (D) El pelo radical (*r*) se ramifica (*rit*) cerca del primordio nodular formado por las células corticales en división. (E) los bacteroides (*b*) son liberados desde el hilo de infección (*it*) y forman simbiosomas (*s*) donde se acumulan gránulos de poli-hidroxitbutarato (*phb*) rodeados por la

membrana peribacteroidal (*pb*). Otras abreviaturas: *c*, corteza; *d*, vacuola digestiva; *ep*, epidermis; *ed*, endodermis. Imagen extraída de Perret et al., (2000).

En cuanto a los nódulos ya formados se pueden diferenciar dos patrones de desarrollo, los nódulos indeterminados de leguminosas de climas templados y los determinados de leguminosas de climas tropicales. Los nódulos indeterminados se caracterizan por la presencia de un meristemo nodular persistente constituido por un grupo de células que se dividen continuamente por mitosis, lo que proporcionan un crecimiento continuado del nódulo. En esta zona, un grupo de células forman parte del meristemo y otras se van diferenciando progresivamente en tipos celulares específicos. El meristemo permanente hace que los nódulos indeterminados presenten generalmente una forma alargada, ya que se forman continuamente nuevas células en el extremo distal del nódulo. Por el contrario, en los nódulos determinados existen dos regiones meristemáticas diferenciadas en los que la mayoría de las divisiones celulares de la región central del nódulo cesan días después de la inoculación. Esto hace que su crecimiento sea determinado y presenten una forma esférica.

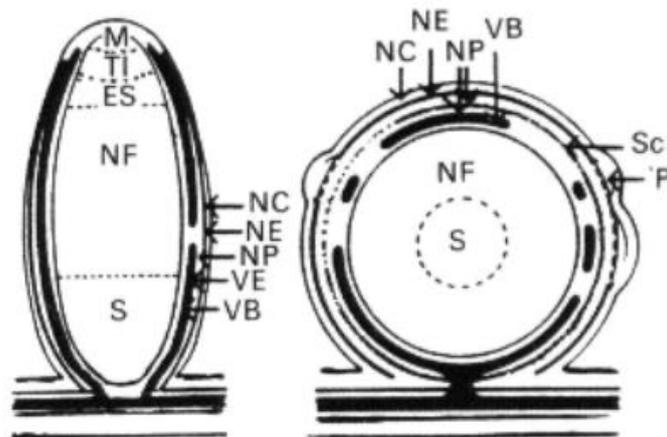


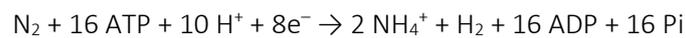
Figura 3: Estructura general de un nódulo indeterminado (a la izquierda) y un nódulo determinado (a la derecha). M: meristemo; TI: zona de infección; ES: zona de simbiosis temprana; NF: zona fijadora de nitrógeno; S: zona senescente; NC: corteza nodular; NE: endodermis nodular; NP: parénquima nodular; VE: endodermis vascular; VB: haz vascular; Sc: esclerénquima; P: peridermis. Imagen extraída de Hirsch, (1992).

En especies de nódulos indeterminados como *Medicago truncatula*, el cordón de infección llega hasta las células próximas al cilindro vascular y el proceso de infección perdura a lo largo de la existencia del nódulo (Azcon-Bieto y Talón, 2008). Cuando ya se han formado un número suficiente de nódulos la planta inhibe la formación de los siguientes, gracias a respuestas reguladoras que requieren la presencia de la parte aérea. De la misma manera, la formación de

nódulos se inhibe cuando las plantas tienen suficiente disponibilidad de N asimilable en el suelo. Recientemente se ha revelado que este proceso está mediado por genes relacionados con la familia del gen NIN (Lin et al., 2018).

1.4.3 Complejo enzimático nitrogenasa

La fijación del N₂ se lleva a cabo en el complejo enzimático nitrogenasa, sintetizada por los bacteroides en el interior de los nódulos. Esta reacción es altamente endérgica (≈ 960 kJ/mol de N₂ fijado) y su estequiometría es:



La presencia de este sistema enzimático permite a los bacteroides la reducción del N₂ hasta la forma asimilable de NH₄⁺. El nitrógeno fijado en forma de NH₄⁺ es asimilado en la vía de metabolización glutamina sintetasa/glutamato sintasa (GS/GOGAT) en forma de glutamato y glutamina (Mayz-Figueroa, 2004).

La nitrogenasa consta de dos ferrosulfoproteínas. La Fe-proteína (dinitrogenasa reductasa, componente II) y la FeMo-proteína (dinitrogenasa, componente I), y los dos centros constituyen el llamado cofactor FeMo o FeMoco. La Fe-proteína y la FeMo-proteína son extraordinariamente sensibles al dióxígeno (O₂) y se inactivan de forma irreversible cuando se exponen al aire (Aparicio-Tejo et al., 2008). Por ello los organismos fijadores de nitrógeno poseen mecanismos que les permiten mantener bajas concentraciones de oxígeno a fin de mantener la enzima en funcionamiento, como por ejemplo, una alta tasa respiratoria, compartimentalizaciones o protección conformacional (Ureta y Nordlunf, 2002).

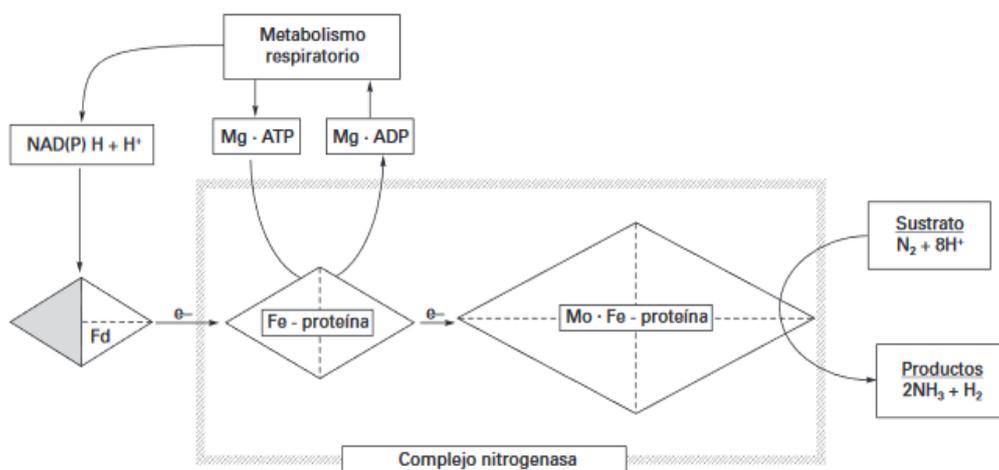


Figura 4: Esquema de la reacción catalizada por la nitrogenasa. El principal donador de electrones es la ferredoxina (Fd), proteína de potencial redox muy negativa que recibe dos electrones, a su vez, de la cadena respiratoria. Imagen extraída de Aparicio-Tejo et al., (2008).

1.5. Estrés hídrico

1.5.1 El agua en las plantas.

La vida está íntimamente asociada al agua cuya importancia para los seres vivos es consecuencia de sus propiedades físicas y químicas. El agua es la forma en que el átomo de H, elemento esencial en todas las moléculas orgánicas, es absorbido y, posteriormente, asimilado durante la fotosíntesis, por lo que ha de considerarse como un nutriente para la planta. La estructura y las propiedades del agua influyen en la estructura y las propiedades de proteínas, membranas, ácidos nucleicos y otros constituyentes celulares. Es el componente mayoritario de las plantas y llega a suponer hasta el 90% del peso fresco especies herbáceas y más del 50% en las leñosas (Tadeo y Gómez-Cadenas, 2008).

El proceso dominante en las relaciones hídricas de una planta es la absorción de grandes cantidades de agua a partir del suelo, su transporte a través de la misma y la pérdida eventual de vapor de agua hacia la atmósfera circundante debida a la transpiración. En una planta en crecimiento activo existe una fase de agua líquida continua que se extiende desde la epidermis de la raíz hasta las paredes celulares del parénquima foliar. El movimiento del agua en las plantas está regido por gradientes de potencial hídrico (Ψ), un proceso totalmente pasivo que se presenta a lo largo de gradientes de disminución de energía libre, de ordinario expresado como diferencias de Ψ . El agua se mueve desde zonas de mayor a menor potencial hídrico. En el interior de la planta el Ψ es más elevado en las raíces y disminuye progresivamente en el tallo, observándose los valores más bajos en las hojas (Sanchez-Díaz y Aguirreolea, 2008).

En cuanto a la transpiración, a lo largo de la vida de una planta aproximadamente un 95% del agua absorbida pasa simplemente a través de ella y se pierde por transpiración. Aunque se puede perder una pequeña cantidad del vapor de agua a través de lenticelas en la corteza del tallo y en las ramas jóvenes, la mayor proporción (más del 90%) se escapa por las hojas. Por ello, la evaporación del agua en las hojas proporciona la mayor parte de la energía para el movimiento del agua, dado que establece el gradiente de potencial hídrico.

Para mantener la turgencia de la parte aérea, así como para posibilitar las actividades bioquímicas hasta un nivel que asegure la supervivencia, el agua perdida en la planta mediante transpiración ha de reponerse continuamente a través de la absorción radicular. Este proceso requiere de un crecimiento constante de las raíces y de un estrecho contacto con las partículas del suelo y se da principalmente en las raíces laterales.

1.5.2 Efectos del estrés hídrico en las plantas

Ante la escasez de los recursos hídricos, la sequía es la principal amenaza para la seguridad alimentaria mundial. Debido a que el suministro de agua del mundo es limitado y al continuo crecimiento de la población, la futura demanda de alimentos agravará aún más este efecto (Somerville y Briscoe, 2001). Los efectos de la sequía varían desde el nivel morfológico al molecular y son evidentes en todas las etapas fenológicas del crecimiento de las plantas ya que provoca un déficit de agua a nivel de la planta (Farooq et al., 2009). Este déficit se puede definir como el contenido de agua de un tejido o célula por debajo del contenido de agua más alto en el estado óptimo de hidratación.

El estrés hídrico es una de las principales causas de muerte en las plantas y ocurre cuando la transpiración excede al agua absorbida por las raíces, y su intensidad y duración influyen en los efectos y la capacidad que la planta tiene para resistirlos (Luna-Flores et al., 2012). El crecimiento celular es el primer proceso fisiológico que se ve afectado a medida que el contenido de agua celular disminuye cuando las plantas se encuentran niveles de déficit hídrico, seguidos de la inhibición de la pared celular y la biosíntesis de proteínas (González et al., 2015).

Otro efecto importante que produce el estrés hídrico es la reducción en la fotosíntesis debido a la pérdida de agua en el tejido vegetal, y cuyo resultado final se traduce en la reducción del crecimiento de la planta y en la disminución de la producción de alimentos. En este caso, el estrés hídrico también influye en la apertura o cierre estomático. Los estomas pueden sufrir cambios en cuanto a su resistencia bajo condiciones ambientales, condiciones que son vitales para la regulación de la transpiración y para el control de la tasa de absorción de dióxido de carbono (CO₂) necesaria para la fotosíntesis. En condiciones normales de disponibilidad hídrica, los estomas permanecen abiertos durante el día y cerrados durante la noche (ya que en este periodo de tiempo no hay demanda de CO₂ dentro de la hoja) previniendo pérdidas innecesarias de agua. Sin embargo, en condiciones de baja disponibilidad hídrica los estomas se cierran inducidos por estrés hídrico, y a parte de disminuir la transpiración, también limitan la captación de CO₂ por la planta, aumentando la susceptibilidad de sufrir daños oxidativos (Cornic y Massacci, 1996).

A parte de ello, la pérdida de agua del tejido vegetal también provoca la reducción de su Ψ haciéndolo cada vez más negativo. Cuando el Ψ interno se iguala con el externo, la planta ya no puede absorber agua y empieza a deshidratarse (Sanchez-Díaz y Aguirreolea, 2008).

1.5.3 Efectos del estrés hídrico en la FBN

En las plantas de leguminosas cultivadas en condiciones simbióticas, uno de los efectos principales del déficit hídrico es una disminución en las tasas de FBN. Las causas de esta inhibición se producen incluso antes de la disminución de la fotosíntesis, aunque el mecanismo involucrado aún no se conoce completamente (Larrainzar et al., 2007).

En el caso de FBN en las leguminosas, hay que considerar la tolerancia del microsimbionte a las condiciones de sequía. La sequía reduce la disponibilidad de agua alrededor de las partículas del suelo y aumenta la concentración de sal en la solución del suelo, la cual tiene efectos negativos en el crecimiento y la persistencia de las bacterias, limitando su crecimiento y, en último lugar, disminuyendo la diversidad de poblaciones bacterianas (González et al., 2015).

En cuanto a los factores clave que regulan la FBN bajo déficit hídrico se han propuesto tres principales que intervienen en la inhibición. El primer factor en la disminución de la FBN se ha atribuido a una falta de suministro de carbohidratos a los nódulos como resultado de una reducción en la fotosíntesis, ya que la FBN depende en gran medida de la cantidad de sacarosa suministrada desde el floema al nódulo por la planta. Sin embargo se ha comprobado que la FBN disminuye constantemente a lo largo del periodo de déficit hídrico, mientras que la fotosíntesis disminuye ligeramente durante los primeros días (Arrese-Igor et al., 2011).

El segundo factor planteado tiene que ver con la concentración de O_2 en el nódulo. El O_2 es crítico para la FBN ya que la mayoría de las nitrogenasas son muy sensibles a su presencia, por lo que se inhiben de forma irreversible. Por lo tanto, los nódulos deben mantener un ambiente microaeróbico dentro de la zona central con la presencia de bacteroides. Sin embargo, la FBN requiere un gran suministro de energía y un metabolismo anaeróbico no podría proporcionarla. Este problema se resuelve con la presencia de la leghemoglobina (Lb), que mantiene una concentración de oxígeno muy baja dentro de las células infectadas (50-100 nM), mientras que proporciona un alto flujo de oxígeno a los citocromos de alta afinidad de los bacteroides. Además, este flujo de oxígeno se debe equilibrar con la disponibilidad de carbohidratos para los bacteroides y se mantiene mediante una barrera de difusión de oxígeno (ODB) variable. En condiciones de déficit hídrico, las respuestas de funcionamiento del nódulo pueden relacionarse con la ODB, ya que un cierre de la ODB representa una disminución en la disponibilidad de O_2 para los bacteroides y por lo tanto, una falta de energía para mantener la FBN altamente exigente.

En último lugar, el tercer factor sugiere que el estado de nitrógeno de la planta puede estar regulando la FBN en el nódulo, actuando varias moléculas como "molécula señal" para vincular

el “estado de nitrógeno” y la inhibición de la FBN. De todos modos, la disminución de la FBN a causa del déficit hídrico conlleva finalmente a la senescencia del nódulo.

1.6. Sistema de defensa antioxidante en las plantas

1.6.1 Especies reactivas de oxígeno (ROS)

El O₂ presente en la atmósfera permitió la aparición de organismos aeróbicos que presentan sistemas de generación de energía que utilizan el O₂ como aceptor final de electrones, y aunque el oxígeno molecular es relativamente no reactivo, su reducción conduce a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que se producen de forma natural y continua (alrededor del 1% del total de O₂ consumido) como consecuencia del metabolismo celular (Bhattacharjee, 2005). El término ROS incluye radicales libres (moléculas con uno o más electrones no apareados, como los radicales superóxido e hidroxilo) y radicales no libres (moléculas sin electrones no apareados, como el peróxido de oxígeno (H₂O₂) y oxígeno singlete), y presentan una reactividad de moderada a muy alta (Matamoros et al., 2003).

Las ROS juegan una doble función dependiendo de su concentración en las células vegetales. A bajas concentraciones pueden actuar como agentes de señalización intracelular induciendo respuestas positivas. Sin embargo, a altas concentraciones las ROS se vuelven tóxicas y son capaces de interactuar con varios tipos de moléculas orgánicas como ácidos nucleicos y los lípidos (Mittler, 2017). De esta forma, el estrés oxidativo surge de la desproporción entre la producción de ROS y su eliminación, por lo que las plantas necesitan tener mecanismos que actúen rápidamente para contrarrestar esta situación (Soares et al., 2019).

Uno de los principales factores responsables del deterioro en el crecimiento y la productividad de las plantas durante el estrés hídrico es la producción de ROS en los orgánulos como el cloroplasto, la mitocondria y los peroxisoma (Faraooq et al., 2009). En esta situación si el incremento de ROS no es contrarrestado se produce la oxidación de componentes celulares como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos que conllevan a una pérdida de su función. Por ello, los mecanismos de tolerancia o adaptación de las plantas conllevan la síntesis de solutos compatibles y la producción de antioxidantes.

1.6.2 Defensa antioxidante

El sistema de defensa antioxidante en la célula vegetal lo constituyen tanto componentes enzimáticos y como no enzimáticos. Entre los componentes enzimáticos se encuentran el superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasa, peroxidasa de ascorbato y glutatión reductasa. Entre los no enzimáticos están la cisteína, glutatión reducido y el ácido ascórbico (AsA) (Gong et

al., 2005). Frente a la tolerancia ante el estrés hídrico es importante que la planta mantenga un alto contenido de componentes antioxidantes, ya que permiten la eliminación de radicales como el superóxido (O_2^-) y el H_2O_2 y evitan los daños por estrés oxidativo. Además, las enzimas antioxidantes controlan los niveles de estabilización de las ROS moderadamente reactivas, lo que les permite desempeñar funciones importantes en sitios específicos frente a ciertas condiciones ambientales o etapas de desarrollo de las plantas (Matamoros et al., 2003).

Las ROS también se generan en los nódulos debido a la elevada actividad respiratoria de los bacteroides, el alto contenido de proteínas oxidables como la nitrogenasa y la leghemoglobina, y al ambiente altamente reductor en el que tiene lugar la FBN (Becana et al., 2000). Uno de los metabolitos antioxidantes más importantes en los nódulos es el ácido ascórbico junto con los tripéptidos glutatión (GSH) y homoglutatión (hGSH). Entre las enzimas antioxidantes cabe mencionar las cuatro enzimas del ciclo ascorbato-glutation (ascorbato peroxidasa, deshidroascorbato reductasa, monodeshidroascorbato reductasa y glutatión reductasa) presentes en citosol, mitocondrias, peroxisomas y plastidios; las superóxido dismutasas de citosol, plastidios, peroxisomas, mitocondrias y bacteroides; y las catalasas de peroxisomas y bacteroides (Matamoros et al., 2003).

1.7. Ácido ascórbico (AsA)

1.7.1 Principales funciones del AsA

EL AsA, también conocido como vitamina C, es uno de los compuestos antioxidantes solubles en agua más abundantes presentes en los tejidos de las plantas (Song et al., 2017). Posee propiedades ácidas y fuertemente reductoras, y es considerado uno de los más potentes agentes antioxidantes en las plantas. Su concentración en las plantas varía entre los tejidos, con concentraciones más altas en las hojas y flores y concentraciones más bajas en los tejidos menos activos sintéticamente como por ejemplo, los tallos y las raíces. Se transporta a larga distancia en el floema, por lo que puede pasar desde las hojas fotosintéticamente activas hasta las raíces.

El AsA es capaz de interactuar directamente con las ROS neutralizando los efectos tóxicos de O_2 , O_2^- y radical hidroxilo ($O\cdot H$), además de actuar como donante de electrones en reacciones enzimáticas que conducen a la reducción del contenido de H_2O_2 a través de la ascorbato peroxidasa (APX) (Smirnoff, 2008). Además juega un papel importante actuando como molécula señalizadora en numerosos procesos, incluyendo la división y expansión celular, la fotosíntesis, biosíntesis de hormonas, elongación y crecimiento radicular, biosíntesis de compuestos

necesarios en la pared celular, fotoprotección, tolerancia estreses abiótico y bióticos, e interviene en la absorción y transporte de hierro (Hernández y Díaz, 2015)

En este sentido, numerosas enzimas requieren AsA como cofactor para su actividad catalítica:

- La APX es probablemente la enzima más conocida debido a su capacidad para usar AsA específicamente en la eliminación de H_2O_2 . Además el AsA puede reaccionar con ROS como el H_2O_2 , el radical superóxido (O_2^-) y el $O\cdot H$.
- Es cofactor de muchas dioxigenasas dependientes de oxiácidos que catalizan la incorporación del O_2 a sustratos orgánicos. Este tipo de dioxigenasas comparten un mecanismo catalítico común que requiere de forma específica AsA, Fe^{2+} y 2-oxoglutarato. Entre estas enzimas se encuentran la *Peptidil-prolil-4-hidroxilasa*, implicada en la hidroxilación de la prolina en plantas para la síntesis de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina; *Flavona sintasa* y *flavonona 3 β -hidroxilasas*, implicadas en la síntesis de flavonoides; *GA 13-hidroxilasa*, *GA 20-Oxidasa*, *GA 3 β -hidroxilasa*, *GA 2 β -hidroxilasa* y *GA 3-oxidasa*, implicadas en el metabolismo de las giberelinas; *9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasas*, implicada en el paso clave de la biosíntesis del ácido abscísico; *1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa*, la enzima que cataliza el último paso de la biosíntesis del etileno; y la *Violaxantina de-epoxidasa*, pertenecientes al ciclo de las xantofilas.

Como ya hemos comentado, se sabe que frente a estreses abióticos las plantas activan mecanismos de eliminación de ROS, por lo que podría esperarse que el estrés hídrico provocara un aumento en la biosíntesis del AsA. De esta forma, las plantas con altos niveles de AsA podrían presentar una mayor tolerancia a este tipo de estrés. Esto cobra importancia en el caso de cultivos de leguminosas, principal fuente de proteínas para los seres humanos y la alimentación animal, que son altamente sensibles a el estrés ambiental (Tuteja et al., 2012).

1.7.2 Biosíntesis del AsA

Las plantas son capaces de sintetizar AsA a través de una secuencia de 4 pasos enzimáticos, los cuales convierten la glucosa en AsA o Vitamina C. La biosíntesis de AsA tiene lugar mediante la ruta D-manosa/L-galactosa o ruta de Smirnoff-Wheeler (Wheeler et al., 1998). En esta ruta la D-manosa es transformada a L-galactosa, la cual es oxidada hasta L-galactono-1,4-lactona que es convertida en AsA por la acción de la enzima L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (L-GALLDH), localizada en la membrana interna de la mitocondria. Esta reacción usa el citocromo c de la cadena de transporte electrónico comoceptor final (Harvey et al., 2003). Además, la biosíntesis del AsA también es regulada por las enzimas GDP-D-manosa pirofosforilasa (*VTC1*),

GDP-D-manosa 3', 5'-epimerasa (GME) en asociación con GDP-L-galactosa fosforilasa (VTC2 / VTC5), la proteína F-box AMR1 y la proteína quinasa o proteína fosfatasa (VTC3) (Seminaro et al, 2017).

Sin embargo, también se han descrito otras rutas alternativas para la síntesis del AsA: la ruta de la L-gulosa, la ruta del mio-inositol y la ruta del ácido D-galacturónico.

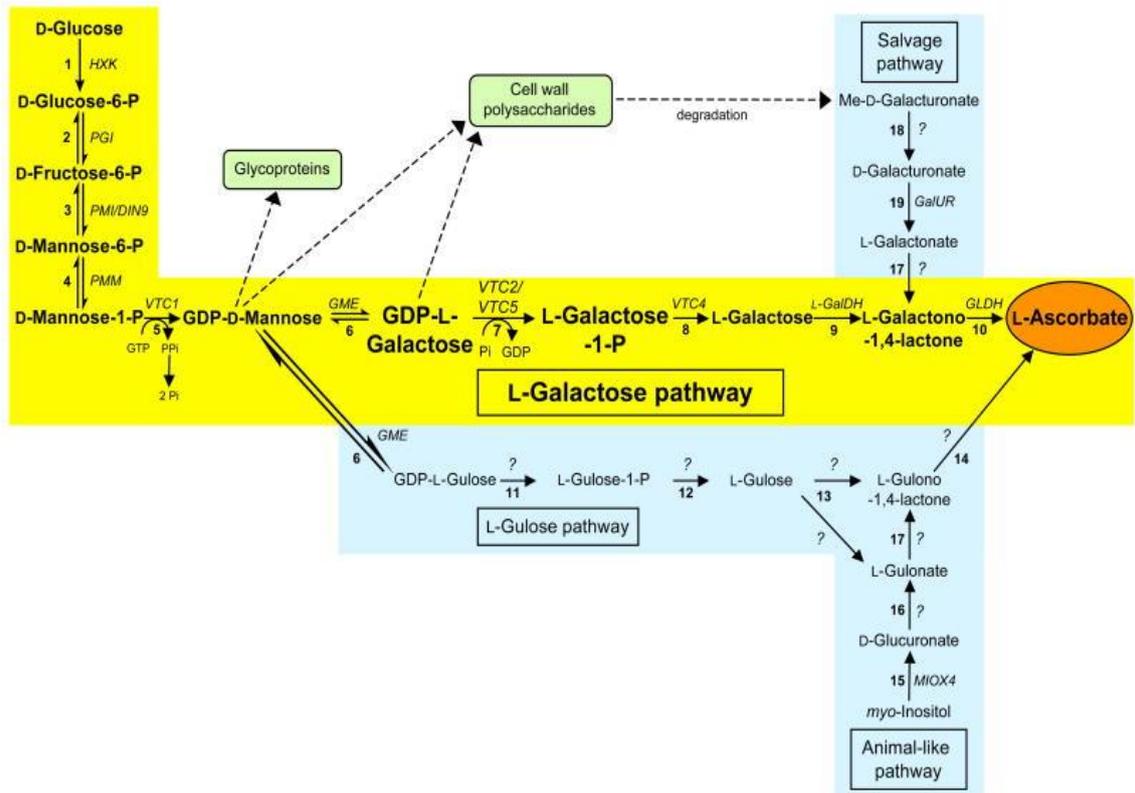


Figura 5: Ruta biosintética del L-ascorbato en plantas superiores. La vía principal de la L-galactosa está resaltada en color amarillo (12). Las rutas biosintéticas alternativas están resaltadas en color azul (13-15). Las designaciones en cursiva se dan para genes que codifican enzimas conocidas de la vía. Los signos de interrogación indican posibles reacciones donde el gen y la enzima específica aún no se ha identificado. La reacción central en la vía de L-galactosa, que es catalizada por VTC2 y VTC5, se muestra en una fuente más grande. Las enzimas que catalizan las reacciones numeradas son: 1, hexoquinasa; 2, fosfoglucoasa isomerasa; 3, fosfomanosa isomerasa (PMI); 4, fosfomannomutasa (PMM); 5, GDP-D-manosa pirofosforilasa; 6, GDP-D-manosa 3', 5' epimerasa (GME); 7, GDP-L-galactosa fosforilasa; 8, L-galactosa-1-P fosfatasa; 9, L-galactosa deshidrogenasa; 10, L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (GLDH); 11, nucleótido pirofosfatasa o azúcar-1-P guanililtransferasa; 12, azúcar fosfatasa; 13, azúcar deshidrogenasa; 14, L-gulono-1,4-lactona deshidrogenasa / oxidasa; 15, mioinositol oxigenasa; 16, urona reductasa; 17, aldona lactonasa; 18, metilesterasa; 19, D-galacturonato reductasa. Imagen extraída de Linster y Clarke, (2008).

1.7.3 Regeneración del AsA

La oxidación del AsA da lugar a un radical libre tipo semiquinona, el radical libre ascorbato también denominado monodeshidroascorbato (MDHA). El MDHA puede desproporcionarse y producir una molécula de AsA y una molécula de ácido deshidroascórbico (DHA). El DHA puede transformarse de forma no enzimática en ácido 2,3-dicetogulónico, que no puede ser reciclado hasta AsA, siendo catabolizado posteriormente por la célula.

El MDHA es reciclado hasta AsA por acción de la enzima Monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR), que usa nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) como poder reductor, mientras que el DHA es reducido a AsA por acción de la enzima Deshidroascorbato reductasa (DHAR) en una reacción dependiente de glutatión reducido (GSH). Estas enzimas, junto con la APX y la glutatión reductasa (GR), enzima que recicla el GSH, forman parte del denominado ciclo ASC-GSH, cuya función es la de eliminar el H_2O_2 y regenerar los antioxidantes ASC y GSH (Harvey et al., 2003).

1.7.4 AsA en la simbiosis

El AsA se puede encontrar en los nódulos en concentraciones de 1 a 2 mM. Es necesario para la progresión del ciclo celular y para la elongación celular. Sin embargo, el AsA en el nódulo es importante por sus propiedades antioxidantes. El ascorbato regenera el α -tocoferol oxidado por ROS y es el sustrato de la peroxidasa de ascorbato. En los nódulos se ha encontrado actividad APX en el citosol y las mitocondrias, pero es probable que existan isoformas adicionales en los peroxisomas y plastidios, como ocurre en las hojas (Jímenez et al., 1997).

A parte de ello, el ciclo ASC-GSH es crítico para el funcionamiento del nódulo. El producto inicial de APX es MDHA (radical libre del ascorbato), que luego se desproporciona a ascorbato y DHA. El MDHAR y el DHA se reducen de nuevo a AsA mediante reductasas específicas utilizando NADH y GSH respectivamente. Finalmente, el glutatión oxidado (GSSG) formado por la DHAR se reduce a GSH mediante la GR utilizando NADPH (Matamoros et al., 2003).

1.7.5 VTC2

El AsA y su biosíntesis en plantas y animales ha tenido una gran importancia en la comunidad científica desde que fue descubierto por Szent-Györgyi en 1928 (Hickey y Saul, 2014). Con el desarrollo de la tecnología de plantas transgénicas se han encontrado diversas aplicaciones en el campo de micronutrientes y biofortificación, lográndose un gran éxito en la generación de plantas transgénicas con niveles elevados de vitamina E, provitamina A (b-caroteno) o ácido fólico (vitamina B9). Sin embargo, todavía no se ha podido lograr el mismo éxito con la

generación de plantas transgénicas con niveles elevados de vitamina C, y poco se sabe sobre la regulación de su biosíntesis en condiciones de estrés por sequía (Seminario et. al, 2017).

La reciente identificación de la enzima *VTC2* formada a partir de la GDP-manosa 3',5' epimerasa, un centro de producción de GDP-hexosas y L-galactosa-1-fosfato (Laing et al., 2007), ha sido un gran avance para la comprensión de la biosíntesis del AsA en plantas. También se ha observado que la enzima *VTC2* puede usar glucosa 1-fosfato y GDP-D-glucosa como sustratos, y sabiendo de la existencia de la actividad enzimática GDP-D-manosa 2' epimerasa, se ha propuesto un ciclo extendido de *VTC2* que une la fotosíntesis con la biosíntesis del AsA y el metabolismo de la pared celular en plantas (Wolucka y Montagu, 2007).

Sin embargo, todavía se necesitan realizar más estudios para poder determinar si alguno de estos dos ciclos *VTC2* es fisiológicamente relevante en las plantas, y con ello poder lograr con éxito la generación de plantas transgénicas que mantengan niveles elevados de AsA en condiciones de sequía.

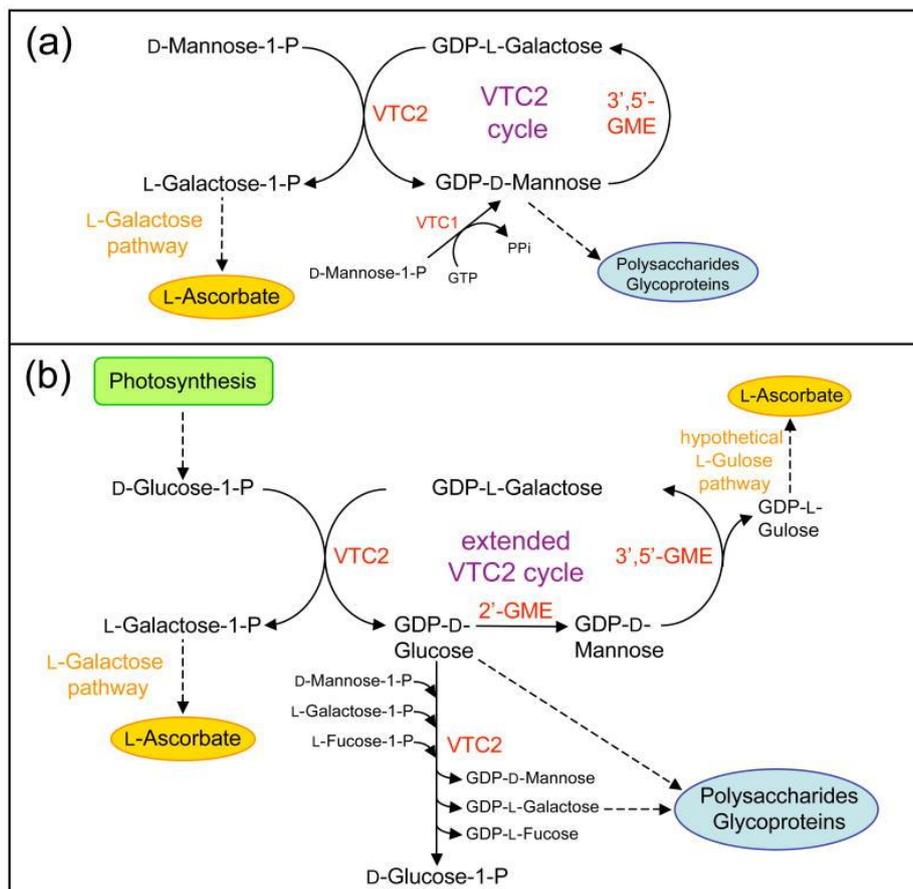


Figura 6: Ciclos propuestos de *VTC2*. (a) Ciclo *VTC2* original propuesto por Laing et al. El ciclo requiere solo dos enzimas, *VTC2* y GDP-D-manosa 3', 5' epimerasa (3', 5'-GME), para generar L-galactosa-1-fosfato a partir de D-manosa-1-fosfato para la biosíntesis del AsA. En este esquema, el GDP-D-manosa generado por la actividad de la transferasa de *VTC2* es reciclado al sustrato de GDP-L-galactosa de *VTC2* por 3',5'-

GME. La actividad de VTC1 solo es necesaria para compensar las moléculas de GDP-D-manosa se utilizan para la síntesis de polisacáridos y glucoproteínas. (b) El ciclo *VTC2* extendido propuesto por Wolucka y Van Montagu. Este ciclo involucra una enzima adicional que interconvierte GDP-D-glucosa y GDP-D-manosa (2'-GME). Aquí, la D-glucosa-1-fosfato, derivada de la fotosíntesis, se convierte en L-galactosa-1-fosfato por la actividad de transferasa *VTC2*. L-Galactosa-1-fosfato se usa para la síntesis de L-ascorbato; el otro producto *VTC2* (GDP-D-glucosa) se puede convertir a otras hexosas de GDP para la síntesis de polisacáridos y glucoproteínas o se puede reciclar a GDP-L-galactosa a través de la acción sucesiva de los supuestos 2'-GME y 3', 5'-GME. Imagen extraída de Linster y Clarke, (2008).

II. 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 al de plantas control, sin observarse el clásico descenso de la FBN asociado a condiciones de déficit hídrico. En colaboración con el Dr. Raúl Huertas, investigador postdoctoral del grupo del Dr. Michael Udvardi en el Instituto Noble, hemos obtenido una serie de líneas que sobreexpresan de forma constitutiva el gen *VTC2*, cuyas plantas denominaremos *VTC2*. En estas líneas la región génica de *VTC2* (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 *Medicago 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 ha empleado una línea equivalente con la misma construcción pero carente de región génica, líneas que llamamos de vector vacío (Empty vector) cuyas plantas denominaremos *EV*.

El objetivo de nuestro estudio es comprobar si la sobreexpresión del gen *VTC2*, enzima clave en la regulación de la biosíntesis del AsA, tienen efectos positivos sobre la FBN en la simbiosis *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* bajo condiciones de sequía.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material biológico

El estudio se llevó a cabo con plantas de *Medicago truncatula* R108 de una línea que sobreexpresa de forma constitutiva el gen *VTC2* perteneciente a la ruta biosintética del ácido ascórbico. Estas plantas fueron comparadas con otra línea equivalente con la misma construcción pero carente de región génica, denominada vector vacío (*EV*). Las plantas fueron inoculadas con 1 mL de cultivo bacteriano de *Sinorhizobium meliloti* 2011, el microsimbionte específico que establece simbiosis fijadora de nitrógeno con *Medicago truncatula*.

3.2. Condiciones de crecimiento

3.2.1 Procedimiento de germinación de las semillas

Las semillas de *Medicago truncatula* fueron sometidas a un proceso de escarificación, realizando una abrasión en el tegumento con ácido sulfúrico (H_2SO_4) durante 8 minutos para acortar el tiempo de germinación. Tras ser enjuagadas con agua desionizada, las semillas se esterilizaron con una mezcla del 5% de hipoclorito sódico durante 3 minutos y se volvieron a enjuagar con agua desionizada (entre 6 y 8 veces). Para favorecer la imbibición, las semillas se colocaron en un tubo de ensayo con agua desionizada y se las tuvo en un agitador rotatorio durante una hora. Seguidamente, las semillas fueron germinadas en placas de Petri y se las mantuvo en ellas durante 48 horas. Las placas de Petri se envolvieron en parafilm y fueron invertidas para que las semillas se adhirieran a la parte superior de la placa, logrando así un crecimiento uniforme de las plántulas con raíces rectas. Tras la germinación, se seleccionaron las semillas que presentaban una radícula adecuada para la siembra en maceta y se sembraron en macetas de 1L con una mezcla de perlita: vermiculita (5:2).

3.2.2 Preparación del inóculo

La preparación del inóculo con el cultivo bacteriano de *Sinorhizobium meliloti* 2011, que expresa de forma constitutiva el gen reportero *Lac Z*, se realizó en un medio de cultivo YEM. El inóculo se dejó en agitación a 28 °C durante 48 h.

3.2.3 Riego

Las plantas se regaron 2 veces por semana alternando solución nutritiva de Evans y agua destilada. No obstante, las dos primeras semanas de crecimiento se añadió al riego una solución de nitrato amónico (NH_4NO_3) con una concentración 0,25 mM para favorecer el crecimiento de las plantas mientras se establece la simbiosis fijadora.

Solución Nutritiva (Evans, 1981)

MACRONUTRIENTES	CONCENTRACIÓN
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,493 g/L
K_2SO_4	0,275 g/L
KH_2PO_4	0,023 g/L
$CaCl_2$	0,056 g/L
EDTA-Fe	0,017 g/L
K_2HPO_4	0,145 g/L
MICRONUTRIENTES	CONCENTRACIÓN
$MnSO_4$	0,47 mg/L
H_3BO_3	1,43 mg/L
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,772 mg/L
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,22 mg/L
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,08 mg/L
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,117 mg/L
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0,05 mg/L
SULFATO CÁLCICO	CONCENTRACIÓN
$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	0,12 g/L

Tabla 3: Componentes de la solución nutritiva (Evans, 1981) utilizada para el riego de las plantas de *Medicago truncatula*.

3.2.4 Condiciones de la cámara de cultivo

Las plantas fueron cultivadas en una cámara de cultivo en condiciones controladas:

- $T^a = 18/22$ °C (día/noche)
- Humedad relativa (HR) = 60/70% (día/noche)
- Fotoperiodo = 12 horas
- Intensidad luminosa fotosintéticamente activa (PPF) = $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

3.3. Diseño experimental

El diseño experimental se llevó a cabo con plantas de *Medicago truncatula* de la línea VTC2, y estas fueron comparadas con otras de la línea equivalente EV. Ambas plantas fueron inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* y se cultivaron durante 8 semanas en una cámara de cultivo, contando con 25 macetas de la línea VTC2 y otras 25 de la línea de EV. Las plantas se regaron a capacidad de campo con una solución nutritiva libre de nitrógeno (Solución Evans) y agua, de forma alterna. En estas 8 semanas, las plantas tuvieron el tiempo suficiente para nodular y

crecer sin entrar en la floración, ya que en caso de producirse este proceso, podría afectar disminuyendo las tasas FBN complicando la interpretación de resultados.



Figura 7: Cultivo experimental de plantas de *Medicago truncatula* en la cámara de cultivo de la UPNA tras la siembra (primera semana).



Figura 8: Cultivo experimental de plantas de *Medicago truncatula* en la cámara de cultivo de la UPNA antes de la toma de muestras (octava semana).

Transcurrido ese este tiempo, las plantas se dividieron en dos grupos para la imposición de los diferentes tratamientos, por un lado las VTC2 y por otro las EV. De cada grupo se seleccionaron aleatoriamente 5 plantas como muestra control (C), 5 plantas para someterlas a sequía moderada (SM) y otras 5 plantas para someterlas a sequía severa (SS). Las plantas control contaron con una irrigación óptima en todo momento, mientras que al resto se les suprimió el riego. Los tratamientos de sequía moderada y sequía severa fueron determinados por la medida

del potencial hídrico de la plantas, tomando un valor de -1 MPa para SM y de -2 MPa para SS aproximadamente.

Se realizaron tres muestreos correspondientes a los estados de C, SM y SS. Los parámetros que se determinaron fueron los siguientes:

- a) Determinación del estado hídrico de la planta: evapotranspiración, conductancia estomática (gs), potencial hídrico foliar (Ψ_{foliar}) y potencial hídrico nodular (Ψ_{nodular}).
- b) Actividad fotosintética: determinación del índice SPAD.
- c) Crecimiento: peso seco de la parte aérea (PSPA), peso seco de la raíz (PSR), relación peso seco raíz/peso seco parte aérea (PSR/PSPA) y peso seco de nódulos (PSN).
- d) Fijación de nitrógeno: determinación de la actividad nitrogenasa aparente (ANA) según Witty y Minchin (1998).

3.4. Metodología empleada

3.4.1 Determinación del estado hídrico de la planta

3.4.1.1 Evapotranspiración

La evapotranspiración se determinó mediante la diferencia de pesada entre el estado de óptima irrigación y los estados de sequía moderada y sequía severa.

3.4.1.2 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. Las unidades de conductancia estomática se expresaron en cm/s.

3.4.1.3 Potencial hídrico foliar

El potencial hídrico foliar se determinó utilizando una cámara de presión de Scholander, instrumento utilizado para medir el potencial hídrico aproximado de los tejidos de una planta, en los estados de irrigación óptima para las plantas control y los estados de sequía moderada y sequía severa para las plantas restantes. El funcionamiento de la cámara de presión consiste en colocar una hoja unida al tallo en el interior de la cámara con el peciolo hacia arriba, de forma que este salga al exterior a través de un orificio. La cámara se sella y se introduce gas lentamente hasta que aparece una gotita de agua por el peciolo de la hoja. En este momento, la cantidad de presión requerida para conseguir la salida de la gota de agua por el peciolo es igual y con signo opuesto al potencial hídrico de la planta. Este potencial es negativo debido al

intercambio de gases que sucede mediante los estomas, ya que trae consigo una pérdida neta de agua. La presión del interior de la cámara se mide con un manómetro y se provoca inyectando aire desde una bala que contiene el gas a presión. Los resultados del potencial hídrico foliar se expresaron en MPa.



Figura 9: Cámara de Presión de Scholander utilizado para determinar el potencial hídrico foliar.

3.4.1.4 Potencial hídrico nodular

El potencial hídrico nodular se determinó mediante un microvoltímetro (MOD. HR-33T; Wescor Inc., Logan, UT, EE.UU) al que se le conectaron 10 cámaras (Mod. C-52 Wescor Inc.). El HR-33 permite la determinación del potencial hídrico mediante la utilización de una serie de sensores que permiten trabajar mediante el método del punto de rocío o en modo psicrométrico.



Figura 10: Microvoltímetro con 10 cámaras utilizado para determinar el potencial hídrico nodular.

La medición se realizó introduciendo una o dos muestras de nódulos en cada cámara por planta muestreada y se esperó alrededor de una hora para que la cámara se estabilizara. Una vez

estabilizada se realizaron las mediciones recogiendo la lectura del voltaje al que se alcanzó el punto de rocío. El valor del voltaje obtenido (μV) se tradujo a unidades de potencial (MPa) mediante la utilización de rectas patrón específicas de cada cámara.

3.4.2 Actividad fotosintética

El índice SPAD (Soil Plant Analysis Development) se determinó con el clorofilómetro portátil (Minolta Chlorophyll Meter, SPAD-502) y es proporcional a la cantidad de clorofila presente en la hoja. El SPAD evalúa cuantitativamente la intensidad de verde de la hoja, midiendo las transmisiones de luz a 650 nm, donde ocurre la absorción de luz por la molécula de clorofila y a 940 nm, donde no ocurre absorción. Este instrumento permite realizar mediciones instantáneas del valor correspondiente al contenido en la hoja y determina un índice SPAD o índice relativo de clorofila que, normalmente, está altamente correlacionado con el contenido de clorofila de la hoja (Riberio et al., 2015). La medida del SPAD se realizó tomando tres medidas por planta, una en cada foliolo de la hoja más joven totalmente expandida.



Figura 11: Clorofilómetro portátil (Minolta Chlorophyll Meter, SPAD-502) utilizado para determinar el índice SPAD.

3.4.3 Crecimiento

Se recolectaron las dos líneas de plantas cultivadas (*EV* y *VTC2*) en las condiciones de control, sequía moderada y sequía severa de forma aleatoria, en las que se determinaron los parámetros relacionados con el crecimiento. Para ello se aislaron los nódulos de la planta, se separó la raíz de la parte aérea y se registró el peso fresco de nódulos (PFN), el peso fresco de la parte aérea (PFPA) y el peso fresco de la raíz (PFR) en unidades de g. Además, se tomaron alícuotas de nódulos (de unos 0.04 g) y de la parte aérea y raíz (de unos 0.2 g en ambos casos) y se conservaron a -80°C para posteriores determinaciones analíticas en el laboratorio.



Figura 12: Planta de *Medicago truncatula* utilizada en la toma de muestras en la que se observa la parte aérea y la raíz.



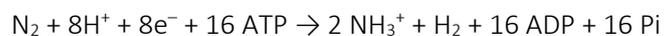
Figura 13: Nódulos indeterminados de una planta de *Medicago truncatula* de la línea VTC2 utilizada en la toma de muestras.

A continuación se procedió al secado del material vegetal en una estufa de corriente forzada de aire a 80°C durante 72h. Pasado ese tiempo, se determinó el peso seco de los nódulos (PSN), el peso seco de la parte aérea (PSPA), el peso seco de la raíz (PSR) y la relación entre el peso seco de la raíz y el peso seco de la parte aérea (PSR/PSPA) en unidades de g.

3.4.4 Fijación de nitrógeno

Dentro de los nódulos formados por cepas de rizobios como *Sinorhizobium meliloti*, que carecen de un sistema de absorción de hidrogenasa, el H₂ producido por la nitrogenasa no puede

metabolizarse más. La relación entre la concentración interna de H₂ y su velocidad de salida del nódulo solo puede determinarse por la resistencia de una barrera física a la difusión (Wity JF. y Minchin FR., 1998). De esta forma, la actividad fijadora de N₂ se estimó a partir de la producción de H₂ que se genera junto con la reducción de N₂ a NH₃⁻ de acuerdo a la siguiente ecuación:



La medida del H₂ producido por los nódulos en una corriente de aire proporciona la ANA, ya que solo dos de los ocho electrones son empleados para la producción de H₂, mientras que el resto se utiliza para reducir el N₂ a NH₃⁻.

Para la determinación de la ANA se hizo pasar una corriente de gas puro (79% N₂: 21% O₂) a través de los nódulos, los cuales se encuentran en un recipiente herméticamente cerrado, y se empleó un detector amperométrico (Qubit Systems Inc., Ontario, Canadá) compuesto por un semiconductor incluido en el interior de un tubo cerámico caliente.



Figura 14: Detector amperométrico utilizado en la determinación de la actividad aparente nitrogenasa (ANA).

Su funcionamiento consiste en que cuando el H₂ entra en contacto con el semiconductor se produce la combustión del gas, provocando cambios en la resistencia del semiconductor que dependen de la concentración de H₂ y O₂, dando como resultado una señal de voltaje. Los resultados finales se expresaron en μmol H₂/min g PSN.

3.5. Análisis estadístico

Las variables analizadas se determinaron calculando la media como estadístico de tendencia central y el error estándar como estadístico de dispersión. Los distintos parámetros analizados se examinaron mediante una ANOVA comparando los grupos de tratamiento y planta, con una significancia de $p \leq 0,05$. Las diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos se representan con letras (a, b, c, d etc.).

IV. RESULTADOS

4.1. Determinación del estado hídrico de la planta

4.1.1. Evapotranspiración

En cuanto a la evapotranspiración, hay que tener en cuenta que la mayor proporción de agua se pierde por las hojas por transpiración (más del 90%), con lo que la pérdida por evaporación no supera el 10%. La figura 15 muestra el peso del sistema maceta-planta en los estados de C, SM y SS minutos antes de la toma de muestras. Por lo tanto, la diferencia de pesada del sistema maceta-planta en los estados de sequía respecto al C representa la cantidad de agua evapotranspirada por la planta.

Se observan diferencias significativas en los valores medios de los estados de sequía y el C en las plantas *EV* y *VTC2*. Para las plantas *EV*, la cantidad de agua evapotranspirada en SM ha sido de un 38% y de un 49% en SS respecto al C. Para las plantas *VTC2* en cambio, la cantidad de agua evapotranspirada en SM ha sido de un 38% y de un 61% en SS respecto al C. Por lo tanto, se observa una mayor pérdida de agua en el sistema maceta-planta conforme la sequía se acentúa.

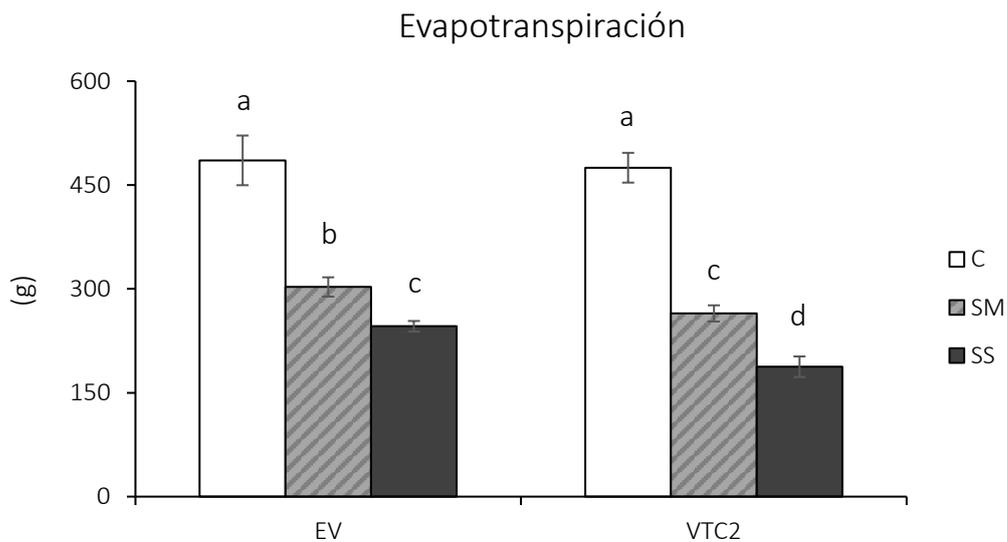


Figura 15: Peso (en g) del sistema maceta-planta de plantas de *Medicago truncatula* de la línea *EV* y *VTC2* en los estados de control (C), sequía moderada (SM) y sequía severa (SS). Los valores representan el promedio \pm EE (n=5). Las letras (a, b, c y d) representan la existencia de diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, $p \leq 0,05$) entre los distintos tratamientos.

Sin embargo, no se observan diferencias significativas entre los controles de *EV* y *VTC2*, por lo que en condiciones de óptima irrigación (C) el agua evapotranspirada por las plantas es prácticamente la misma.

4.1.2. Conductancia estomática

En condiciones de baja disponibilidad hídrica los estomas se cierran inducidos por estrés hídrico, disminuyendo su grado de apertura a medida que se van cerrando y tomando valores cada vez más cercanos a 0. Tal y como muestra la figura 16, la conductancia estomática (en cm/s) disminuye en los estados de sequía, encontrándose diferencias significativas en los valores medios entre los estados de sequía y el C en las dos líneas de plantas.

En las plantas *EV* en estado de C, el valor de la conductancia estomática toma un valor de $0,543 \pm 0,088$ cm/s. En estado de sequía se reduce considerablemente, adquiriendo un valor de $0,052 \pm 0,014$ cm/s en SM con una reducción del 90% respecto al C, y un valor de $0,041 \pm 0,008$ cm/s en SS con una reducción del 92%. En las plantas *VTC2* ocurre prácticamente lo mismo. En estado de C el valor de la conductancia estomática es de $0,525 \pm 0,057$ cm/s. En estado de SM toma un valor de $0,079 \pm 0,036$ cm/s con una reducción del 84% respecto al C, y un valor de $0,038 \pm 0,006$ cm/s en SS con una reducción del 92%. En consecuencia, los valores tan bajos obtenidos indican el cierre estomático inducido por estrés hídrico.

En el caso de los controles no se encuentran diferencias significativas entre ellos. Sus valores son cercanos a 1, lo que indica que los estomas permanecen abiertos ante una buena disponibilidad de agua

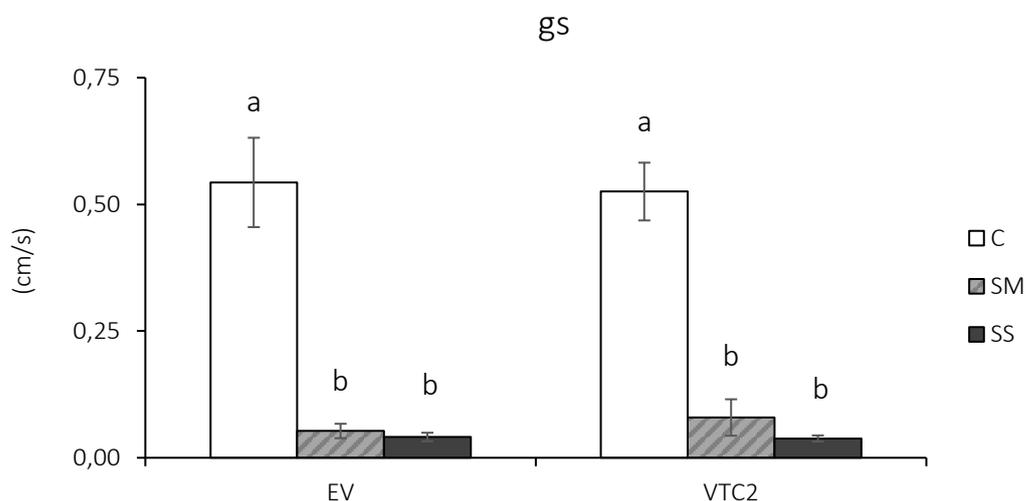


Figura 16: Conductancia estomática (gs) en cm/s de plantas de *Medicago truncatula* de la línea *EV* y *VTC2* en los estados de control (C), sequía moderada (SM) y sequía severa (SS). Los valores representan el promedio \pm EE (n=5). Las letras (a y b) representan la existencia de diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, $p \leq 0,05$) entre los distintos tratamientos.

4.1.3. Potencial hídrico foliar

La pérdida de agua del tejido vegetal provoca la reducción de su potencial hídrico haciéndose cada vez más negativo. Tal y como muestra la figura 17, el potencial hídrico foliar (MPa) se hace más negativo conforme la sequía se acentúa, observándose diferencias significativas en los valores medios entre los estados de sequía y el C en las plantas *EV* y *VTC2*.

En las plantas *EV* el potencial hídrico foliar ha alcanzado un valor de $-0,82 \pm 0,11$ MPa en el C, $-1,43 \pm 0,13$ MPa en SM y $-1,51 \pm 0,36$ MPa en SS. En las plantas *VTC2* el valor del C ha sido de $-0,56 \pm 0,12$ MPa, de $-1,40 \pm 0,03$ MPa en SM y de $-2,08 \pm 0,13$ MPa en SS, siendo este último el valor más negativo registrado.

Se observan diferencias significativas entre los controles de las dos líneas de plantas, con un valor más negativo en las plantas *VTC2*. Por lo tanto, en estado de óptima irrigación, el potencial hídrico foliar entre ambas plantas ha sido distinto.

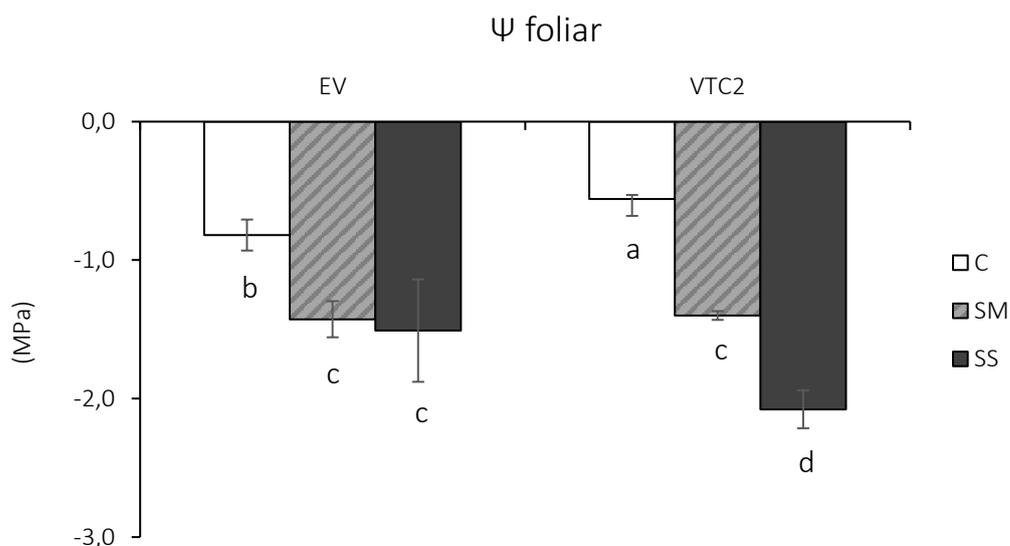


Figura 17: Potencial hídrico foliar (Ψ foliar) en MPa de plantas de *Medicago truncatula* de la línea *EV* y *VTC2* en los estados de control (C), sequía moderada (SM) y sequía severa (SS). Los valores representan el promedio \pm EE (n=5). Las letras (a, b, c y d) representan la existencia de diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, $p \leq 0,05$) entre los distintos tratamientos.

4.1.4. Potencial hídrico nodular

Tal y como muestra la figura 18, el potencial hídrico nodular (MPa) se hace cada vez más negativo a medida que la sequía aumenta. Se observan diferencias significativas en los valores medios entre los estados de sequía y el C en las plantas *EV* y *VTC2*.

En las plantas *EV* el potencial hídrico nodular ha alcanzado un valor de $-0,84 \pm 0,02$ MPa en C, $-1,36 \pm 0,07$ MPa en SM y $-2,15 \pm 0,16$ MPa en SS. En las plantas *VTC2* el potencial hídrico nodular ha tomado un valor de $-0,60 \pm 0,07$ MPa en C, $-1,52 \pm 0,12$ MPa en SM y de $-2,05 \pm 0,05$ MPa en SS.

En el caso de los controles también se observan diferencias significativas entre los valores medios de las dos líneas de plantas, con un valor más negativo en las plantas *VTC2*, por lo que en estado de óptima irrigación el potencial hídrico nodular ha sido distinto.

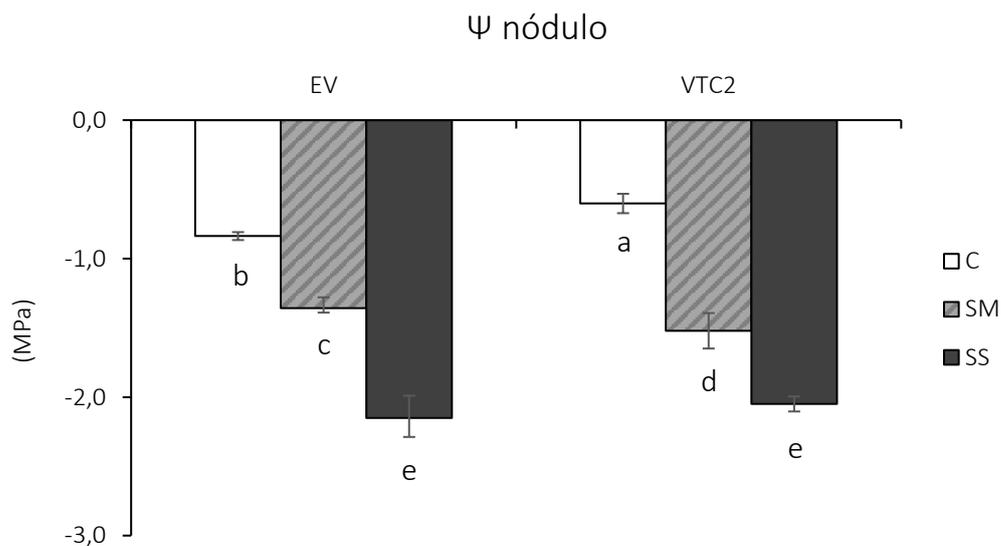


Figura 18: Potencial hídrico nodular (Ψ nodular) en MPa de plantas de *Medicago truncatula* de la línea *EV* y *VTC2* en los estados de control (C), sequía moderada (SM) y sequía severa (SS). Los valores representan el promedio \pm EE (n=5). Las letras (a, b, c, d y e) representan la existencia de diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, $p \leq 0,05$) entre los distintos tratamientos.

4.2. Actividad fotosintética

Tal y como muestra la figura 19, solo se observan diferencias significativas en el índice SPAD en los valores medios entre los estados de SS y el C de las plantas *EV* y *VTC2*.

Los valores obtenidos en las plantas *EV* del índice SPAD han sido de $42 \pm 2,48$ unidades en C, $51 \pm 2,38$ unidades y $36 \pm 1,76$ unidades en SS. En este caso, el índice SPAD se redujo un 14% en SS respecto al C. Para las plantas *VTC2*, los valores obtenidos han sido de $44 \pm 1,45$ unidades en C, $47 \pm 1,72$ unidades en SM y $38 \pm 0,93$ unidades en SS, reduciéndose un 27% respecto al C en este último caso.

Si observamos los controles de las plantas *EV* y *VTC2*, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre ellos, por lo que, en nuestro caso, el tipo de línea de planta no influye en el índice SPAD en estado de óptima irrigación.

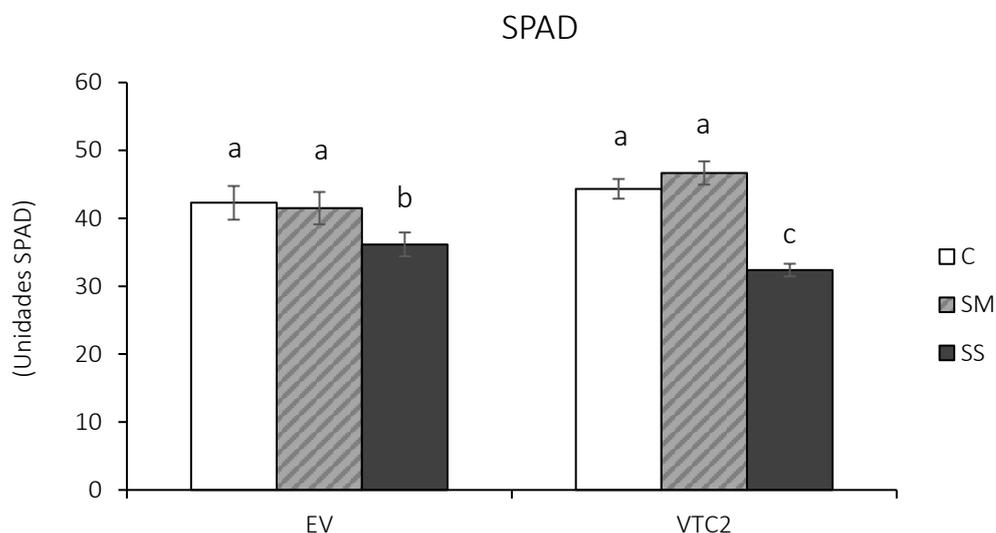


Figura 19: índice SPAD de plantas de *Medicago truncatula* de la línea *EV* y *VTC2* en los estados de control (C), sequía moderada (SM) y sequía severa (SS). Los valores representan el promedio \pm EE (n=5). Las letras (a, b y c) representan la existencia de diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, $p \leq 0,05$) entre los distintos tratamientos.

4.3. Crecimiento

Tal y como muestran las figuras 20 y 21, las plantas *VTC2* presentan un mejor crecimiento tanto en parte aérea como en raíz en estado de control y sequía que las plantas *EV*.

Se encuentran diferencias significativas entre los valores medios del PSPA entre la SS y el C en las plantas *VTC2*, en el que se ha dado una reducción del 27% del crecimiento. En este caso, los valores obtenidos del PSPA han sido de $1,3 \pm 0,12$ g en C, $1,27 \pm 0,15$ g en SM y $0,95 \pm 0,13$ g en SS.

También se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios del PSR entre los estados de sequía y C en las plantas *VTC2*. La reducción del PSR respecto al C ha sido de un 27% en estado de SM y de un 42% en estado de SS. Los valores obtenidos en este caso han sido de $0,92 \pm 0,14$ g en C, $0,67 \pm 0,11$ g en SM y $0,54 \pm 0,11$ g en SS.

Además, se encuentran diferencias significativas entre los controles de ambas plantas tanto en el PSPA como en el PSR. En este caso, las plantas *VTC2* han presentado un crecimiento mayor del 42% en la parte aérea y de un 78% en la raíz que las plantas *EV*.

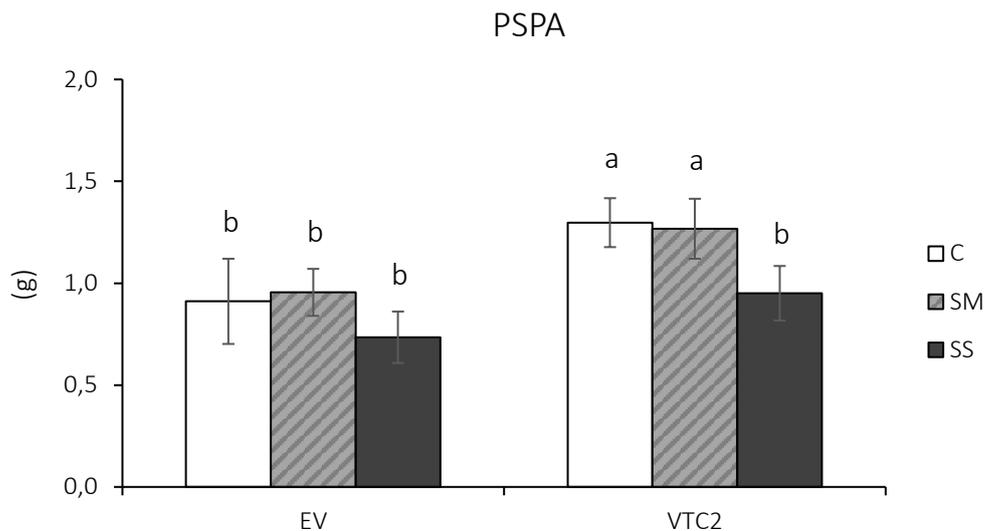


Figura 20: Peso seco de la parte aérea (PSPA) en g de plantas de *Medicago truncatula* de la línea EV y VTC2 en los estados de control (C), sequía moderada (SM) y sequía severa (SS). Los valores representan el promedio \pm EE (n=5). Las letras (a, y b) representan la existencia de diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, $p \leq 0,05$) entre los distintos tratamientos.

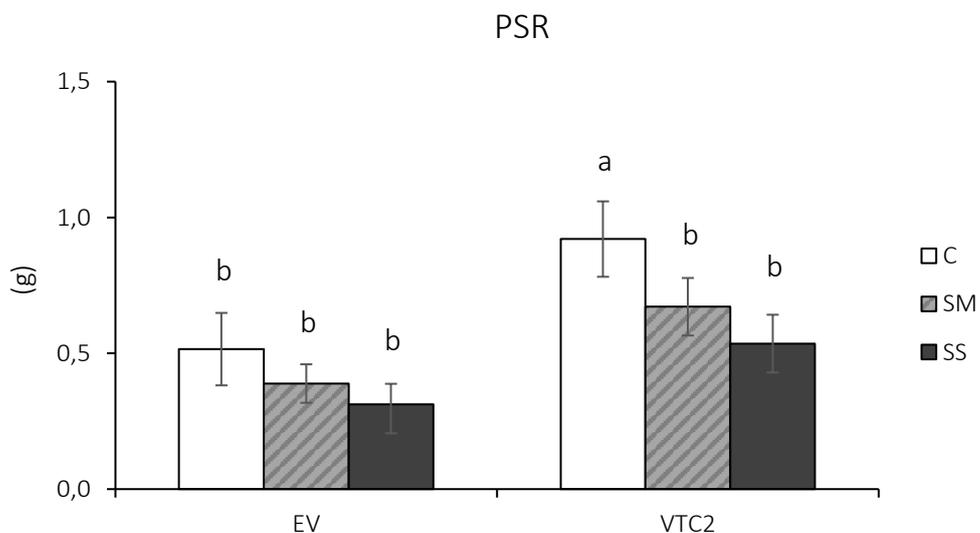


Figura 21: Peso seco de la raíz (PSR) en g de plantas de *Medicago truncatula* de la línea EV y VTC2 en los estados de control (C), sequía moderada (SM) y sequía severa (SS). Los valores representan el promedio \pm EE (n=5). Las letras (a, y b) representan la existencia de diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, $p \leq 0,05$) entre los distintos tratamientos.

Tal y como muestra la figura 22, la relación entre el peso seco de la raíz y el peso seco de la parte aérea disminuye en estado de sequía en ambas plantas, observándose diferencias significativas entre los estados de sequía y el C. En las plantas EV los valores obtenidos en este

ratio han sido de $0,59 \pm 0,06$ en C, $0,39 \pm 0,03$ en SM y $0,41 \pm 0,05$ en SS. En las VTC2 los valores obtenidos han sido mayores, siendo de $0,72 \pm 0,11$ en C, $0,52 \pm 0,05$ en SM y $0,58 \pm 0,11$ en SS.

En el caso de los controles, también se encuentran diferencias significativas entre ellos, con una mayor relación raíz/parte aérea en las plantas VTC2.

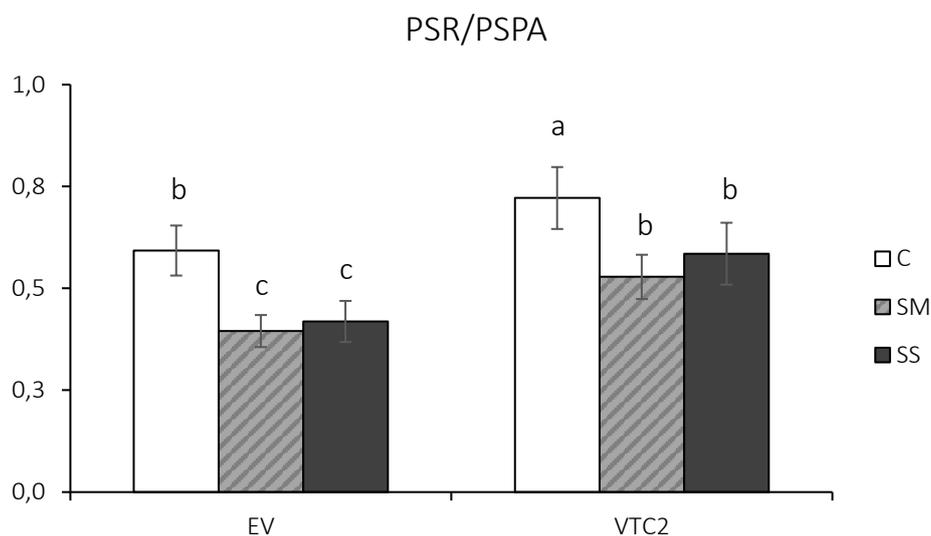


Figura 22: Ratio entre el peso seco de la raíz y el peso seco de la parte aérea (PSR/PSPA) de plantas de *Medicago truncatula* de la línea EV y VTC2 en los estados de control (C), sequía moderada (SM) y sequía severa (SS). Los valores representan el promedio \pm EE (n=5). Las letras (a, y b) representan la existencia de diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, $p \leq 0,05$) entre los distintos tratamientos.

Tal y como muestra la figura 23, el peso seco de nódulos en las plantas EV y VTC2 es mayor en condiciones de sequía. Se observan diferencias significativas en los valores medios entre los estados de sequía y el control en las plantas EV y VTC2. En plantas EV los valores obtenidos en el PSN han sido de $0,017 \pm 0,003$ g en el caso del C, $0,034 \pm 0,003$ g en SM y $0,027 \pm 0,004$ g en SS. En VTC2 en cambio los valores son más elevados, siendo de $0,021 \pm 0,003$ g en C, $0,042 \pm 0,006$ g en SM y $0,047 \pm 0,002$ g en SS.

Para los controles, no se encuentran diferencias significativas entre las plantas EV y VTC2, lo que significa que ambas plantas han desarrollado un porcentaje de nódulos de forma similar en estado de óptima irrigación.

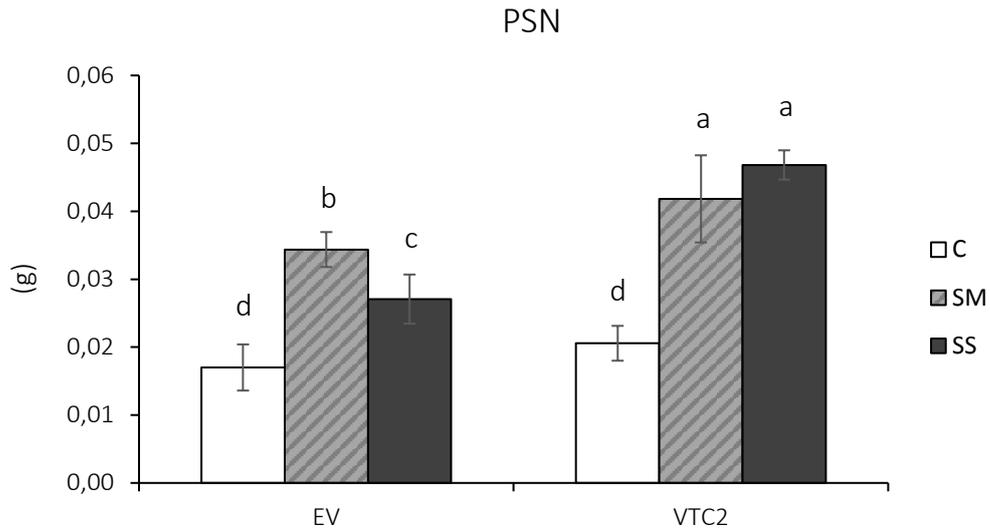


Figura 23: Peso seco de nódulos de plantas de *Medicago truncatula* de la línea *EV* y *VTC2* en los estados de control (C), sequía moderada (SM) y sequía severa (SS). Las letras (a, b, c y d) representan la existencia de diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, $p \leq 0,05$) entre los distintos tratamientos.

4.4. Actividad nitrogenasa aparente

Tal y como muestra la figura 24, la actividad aparente nitrogenasa (en $\mu\text{mol H}_2/\text{min g PSN}$) se reduce en condiciones de sequía. Se observan diferencias significativas en los valores medios entre los estados de sequía y el control en las plantas *EV* y *VTC2*.

En el caso de las plantas *EV*, en estado de C la ANA ha tomado un valor de $5,20 \pm 0,62 \mu\text{mol H}_2/\text{min g PSN}$. En SM, la ANA se ha reducido un 70% respecto al C, adquiriendo un valor de $1,57 \pm 0,25 \mu\text{mol H}_2/\text{min g PSN}$. En SS, la ANA alcanza una reducción del 83% respecto al C, tomando un valor de $0,89 \pm 0,09 \mu\text{mol H}_2/\text{min g PSN}$. Para las *VTC2*, el valor de la ANA obtenido en C es de $5,41 \pm 0,54 \mu\text{mol H}_2/\text{min g PSN}$. En SM desciende hasta a $1,23 \pm 0,13 \mu\text{mol H}_2/\text{min g PSN}$, dándose una reducción del 70%, y en SS llega a los $0,52 \pm 0,11 \mu\text{mol H}_2/\text{min g PSN}$, equivaliendo con una reducción del 90%. Por lo tanto, las plantas *VTC2* en estado de sequía presentan menos actividad nitrogenasa aparente que las plantas *EV*, a pesar de contar con una aparente mejora en los niveles de AsA y un mayor peso seco de nódulos total.

En el caso de los controles, no se encuentran estadísticamente significativas entre las plantas *EV* y *VTC2*, por lo que en estado de óptima irrigación, la actividad nitrogenasa aparente ha sido similar.

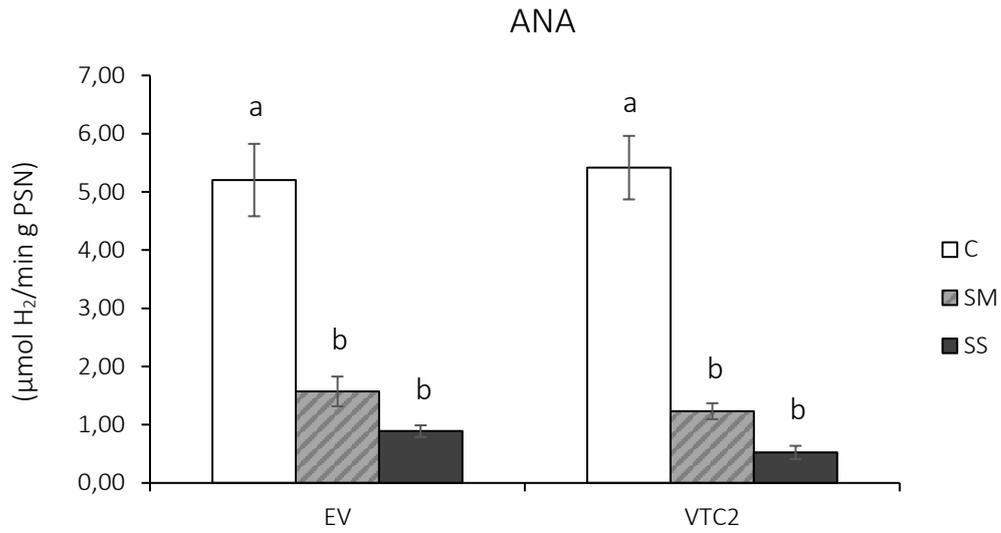


Figura 24: Actividad nitrogenasa aparente (ANA) en $\mu\text{mol H}_2/\text{min g PSN}$ de plantas de *Medicago truncatula* de la línea EV y VTC2 en los estados de control (C), sequía moderada (SM) y sequía severa (SS). Las letras (a, y b) representan la existencia de diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, $p \leq 0,05$) entre los distintos tratamientos.

V. DISCUSIÓN

La FBN es un proceso muy sensible a estreses ambientales, sobre todo al estrés hídrico (Larrainzar et al., 2007), y ante la escasez de recursos hídricos a nivel mundial y el continuo crecimiento de la población, la sequía supone una gran amenaza para la seguridad alimentaria (Somerville y Briscoe, 2001).

En este estudio se ha utilizado una línea de plantas de *Medicago truncatula* que sobreexpresan de forma constitutiva el gen *VTC2*, gen que codifica una enzima clave en la regulación de la biosíntesis del AsA, y otra línea de plantas igualmente transformada, a la que llamamos EV. Las plantas fueron inoculadas con un cultivo bacteriano de *Sinorhizobium meliloti*, cuya elección se ha debido a que la interacción *Medicago truncatula-Sinorhizobium meliloti* ha sido elegida como simbiosis modelo para el estudio de las bases moleculares, genéticas y fisiológicas de la FBN (Rolfe et al., 2003). Las dos líneas de plantas fueron sometidas a un estado de sequía moderada y sequía severa y se compararon los efectos fenotípicos observados frente a otras en estado de irrigación óptima o control.

Comparación del crecimiento de las plantas EV y VTC2 en estado de control:

En cuanto al crecimiento de las plantas EV y VTC2, tanto de la raíz como de la parte aérea, se observan diferencias significativas entre los controles (figura 20 y 21). Las plantas VTC2 han presentado un mayor crecimiento respecto a las plantas EV tanto en la raíz como en la parte aérea (de un 78% y un 42% respectivamente). De la misma forma, la relación raíz/parte aérea también ha sido significativa entre ambas plantas (figura 22), dándose una priorización del crecimiento de la raíz.

En relación al desarrollo de nódulos en la asociación simbiótica *Medicago truncatula-Sinorhizobium meliloti*, este proceso se inhibe cuando la planta ha formado un número suficiente de ellos para poder realizar la FBN satisfactoriamente (Azcon-Bieto y Talón, 2008). En estado de óptima irrigación, no se han encontrado diferencias significativas en el peso seco de nódulos entre los controles de las dos líneas de plantas (figura 23). No obstante, el peso seco de nódulos ha sido mayor en las plantas VTC2.

Comparación de las respuestas fisiológicas de las plantas EV y VTC2 en estado de control:

En la evapotranspiración de un sistema maceta-planta, más del 90% de la proporción de agua se pierde por las hojas por transpiración (Revilla y Zarra, 2008), siendo los estomas los responsables de la mayor pérdida de agua en las plantas (Taiz y Zeiger, 2006). En estado de óptima irrigación, no se observan diferencias significativas entre los controles de ambas líneas de plantas en cuanto a la cantidad de agua que presentan en el sistema maceta-planta (figura

15). En el caso de la conductancia estomática (figura 16), aunque tampoco se encuentran diferencias significativas entre los controles, se observa que ambos presentan un valor cercano a 1, lo que indica que los estomas permanecen abiertos ante una buena disponibilidad de agua. Para el índice SPAD, que está altamente correlacionado con el contenido de clorofila de las hojas (Riberio et al., 2015), no se observan diferencias significativas entre los controles (figura 19).

El movimiento del agua en las plantas está regido por gradientes de potencial hídrico, moviéndose desde zonas de mayor a menor potencial hídrico (Sanchez-Díaz y Aguirreolea, 2008). En el caso del potencial hídrico foliar y nodular, nuestro estudio indica que se encuentran diferencias significativas entre los controles de las plantas *EV* y *VTC2* (figura 17 y 18). No obstante, el potencial hídrico depende de varios factores en un sistema suelo-planta-atmósfera.

En relación a la ANA, no se muestran diferencias significativas en la eficiencia de la fijación de nitrógeno entre los controles de las plantas *EV* y *VTC2* (figura 24).

Comparación del crecimiento de las plantas *EV* y *VTC2* en estado de sequía:

El crecimiento de las plantas es uno de los primeros procesos fisiológicos que ven afectados cuando las plantas se encuentran en estrés hídrico, ya que el contenido de agua celular se reduce y en consecuencia, también lo hace la fotosíntesis (González et al., 2015). Nuestro estudio ha demostrado que el estrés hídrico ha tenido un impacto en el crecimiento de las plantas ya que este se ha visto reducido en condiciones de sequía moderada y, en mayor medida, en condiciones de sequía severa, en ambas líneas de plantas. En las plantas *VTC2* se encuentran diferencias significativas en el crecimiento de la parte aérea en sequía severa (figura 20) y en el crecimiento de la raíz (figura 21) respecto al control. Sin embargo, aunque el crecimiento en las plantas *VTC2* ha sido mayor tanto en parte aérea como en raíz que en las plantas *EV*, no se traduce en un mayor crecimiento significativo en estado de sequía.

En referencia a la relación raíz/parte aérea, el sistema radicular en plantas con déficit hídrico continua creciendo por elongación de las raíces existentes y por la formación de nuevas raíces (Marschner, 2002). Normalmente las plantas reaccionan ante el estrés hídrico aumentando la relación raíz/parte aérea, reduciendo el número de hojas (Zhang et al., 2014) y produciéndose cambios en la distribución radicular en busca de agua en el suelo (Kuster et al., 2012). Sin embargo, las plantas sometidas a sequía tuvieron una menor relación raíz/parte aérea (figura 22) respecto al control con diferencias significativas, dándose una priorización en el crecimiento de la raíz en condiciones de estrés por sequía. Aun así, observando los dos estados de sequía en las plantas *EV* y *VTC2*, se aprecia un ligero aumento de la relación raíz/parte aérea en sequía

severa, por lo que existe la posibilidad de que la planta haya empezado a priorizar el crecimiento radicular en busca de agua, sobre todo en la línea que sobreexpresa la *VTC2*.

En cuanto al desarrollo de nódulos, las dos líneas de plantas han obtenido un mayor peso seco de nódulos en condiciones de sequía con diferencias significativas, con un resultado mayor en las plantas *VTC2* (figura 23).

Comparación de las respuestas fisiológicas de las plantas EV y *VTC2* en estado de sequía:

En condiciones de estrés hídrico los estomas se cierran para evitar la pérdida de agua por transpiración por lo que ésta se reduce y, a su vez, también lo hace la fotosíntesis al limitar la captación de CO₂ por parte de los estomas, aumentando la posibilidad de sufrir daños oxidativos (Cornic y Massacci, 1996). El estudio muestra como la conductancia estomática (figura 16) en estado de sequía se reduce significativamente en las dos líneas de plantas (hasta un 90%), alcanzando valores cercanos a 0. En este caso, los estomas se encuentran prácticamente cerrados evitando pérdidas de agua en la planta por transpiración (Revilla y Zarra, 2008). En el caso del índice SPAD (figura 29), se observan diferencias significativas en los estados de sequía severa tanto en las plantas *EV* como en las *VTC2* (con una reducción del 14 % y del 27% respectivamente), ya que la fotosíntesis se ve reducida por el cierre de estomas.

En el caso del potencial hídrico, la pérdida de agua del tejido vegetal provoca su reducción haciéndolo cada vez más negativo (Sanchez-Díaz y Aguirreolea, 2008). El estudio muestra como el potencial hídrico foliar y nodular en las dos líneas de plantas ha ido decreciendo y haciéndose cada vez más negativo a medida que la sequía se ha acentuado, observándose diferencias significativas (figura 17 y 18).

La FBN disminuye progresivamente a lo largo del periodo de déficit hídrico, lo que puede producir la senescencia de nódulos y su inactividad de forma irreversible (Arrese-Igor et al., 2011). Ante la aparición de ROS en los nódulos en condiciones de déficit hídrico, el AsA juega un papel importante, ya que regenera el α -tocoferol oxidado por las ROS en el citosol y el sustrato APX (Jímenez et al., 1997). En nuestro estudio, la ANA se ha reducido considerablemente en condiciones de sequía en las dos líneas de plantas con diferencias significativas, con una reducción en sequía severa del 83% en las plantas *EV* y del 90% en plantas *VTC2* (figura 24). En este caso, la ventaja que se esperaba que tuvieran las plantas *VTC2* sobreexpresando de forma constitutiva el gen *VTC2*, no se ha traducido en una mayor eficiencia de la actividad nitrogenasa aparente en condiciones de sequía.

Por lo tanto, las respuestas fisiológicas observadas en las plantas *VTC2* frente a las plantas *EV* no se traducen en una mayor tolerancia a los niveles de estrés hídrico.

V. CONCLUSIONES

1. Las plantas *VTC2* en estado de óptima irrigación presentaron un mayor crecimiento tanto en raíz como en parte aérea, así como una mayor relación raíz/parte aérea, dándose una priorización del crecimiento de la raíz. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el resto de los parámetros fisiológicos medidos entre ambas líneas de plantas en estado de óptima irrigación.
2. En condiciones de sequía se observó un descenso progresivo del potencial hídrico foliar y nodular en ambas líneas, siendo el descenso más pronunciado en el caso de la *VTC2*.
3. Similarmente, la sequía severa provocó una reducción de la evapotranspiración así como de los niveles de clorofila presentes en hojas (SPAD), viéndose más afectada la línea *VTC2*.
4. Se observó una reducción significativa de los niveles de fijación de nitrógeno en condiciones de sequía en ambas líneas de plantas, por lo que la sobreexpresión del gen *VTC2* no parece mejorar o aliviar el efecto de la sequía en las condiciones aplicadas.
5. Tanto el crecimiento como las respuestas fisiológicas observadas en la línea de plantas *VTC2* no se traducen en una mayor tolerancia a los niveles de estrés hídrico, a pesar de tener incrementada su capacidad antioxidante.

VI. BIBLIOGRAFÍA

Allan D y Graham P. (2002). *Soil biology and fertility: Symbiotic nitrogen fixation, other N₂-fixing symbiosis*. Dep. of Soil, Water, and Climate. University of Minnesota.

- Aparicio-Tejo PM, Arrese-Igor C y Becana M. (2008). *Fijación biológica de nitrógeno*. En: *Fundamentos de Fisiología Vegetal (2a edición)*. Ed. Azcon-Bieto J y Talón M. MC Graw Hill Interamericana. pp 305-322.
- Arrese-Igor C, González EM, Marino D, Ladrera R, Larrainzar E y Gil-Quintana E. (2011). *Physiological responses of legume nodules to drought*. Plant Stress Vol. 5, pp 24-31.
- Arrese-Igor C, González E., Royuela M, Gálvez L y Aparicio-Tejo PM. (2002). *Aspectos fisiológicos de la fijación de nitrógeno en leguminosas: un diálogo sobre C, N y O*. En: *Avances en el Metabolismo del Nitrógeno: De la Biología Molecular a la Agronomía*. Ed. Aparicio P, Arrese-Igor C, González C, Lamsfus C, Llama MJ, Muñoz A, Royuela M y Serra JL. Universidad Pública de Navarra. pp 333-344.
- Becana M, Dalton DA, Moran JF, Iturbe-Ormaetxe I, Matamoros MA, Rubio MC. (2000). *Reactive oxygen species and antioxidants in legume nodules*. Physiol Plant, Vol. 109. pp 372-381.
- Benedito V, Torres-Jerez I, Murray JD, Andriankaja A, Allen S, Kakar K, Wandrey M, Verdier J, Zuber H, Ott T, Moreau S, Nibel A, Frickey T, Weiller G, He J, Dai X, Zhao P, Tang Y y Udvardi M. (2008). *A gene expression atlas of the model legume Medicago truncatula*. The Plant Journal, Vol. 55. pp 361-542.
- Bhattacharjee S. (2005). *Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal*. Curr. Sci., Vol. 89. pp 1113–1121.
- Castroviejo S, Muñoz F, Navarro C, Quintanar A y Buirra A. (2015). *Flora Ibérica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Vol. IX, Rhamnaceae-Polygalaceae*. Madrid (España).
- Cornic G, Massacci A. (1996). *Leaf photosynthesis under drought stress*. En: *Photosynthesis and the Environment*. Ed. Baker NR. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp 347-366.
- Faraooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Barasa SMA. (2009). *Plant drought stress: effects, mechanisms and management*. Agronomy for Sustainable Development, Vol. 29. pp 185-212.
- Fuentes C. (1993). *Leguminosas forrajeras*. Agricultura: Revista agropecuaria y ganadera, ISSN 0002-1334, N° 734. pp 774-780.
- Gong H, Zhu X, Chen K, Wang S, Zhang C. (2005). *Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought*. Plant Sci., Vol. 169. pp 313–321.

- González EM, Larrainzar E, Marino D, Stefanie W, Gil-Quintana E y Arrese-Igor C. (2015). *Physiological responses of N₂-fixing legumes to water limitation*. En: Legume Nitrogen Fixation in a Changing Environment-Achievements and Challenges. Ed. Suileman S y Tram Lan-Son. pp 5-33.
- Harvey A, Mittova V, Kiddle G, Heazlewood JL, Bartoli CG, Theodoulou FL y Foyer CH. (2003). *Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for Stress Responses*. Plant Physiology, Vol. 133. pp 443-447.
- Hernández JA, y Díaz P. (2015). *La vitamina C o ácido Ascórbico: Un antioxidante diseñado para proteger a las células aerobias*. CEBAS-CSIC, Murcia (España).
- Hickey S y Saul A. (2014). *Vitamina C, la verdadera historia*. Sirio Editorial.
- Hirsch AM. (1992). *Developmental biology of legume nodulation*. New Phytologist, Vol. 122, nº2. pp. 211-237.
- Jiménez A, Hernández J, Del Río LA y Sevilla F. (1997) *Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves*. Plant Physiol, Vol. 114. pp 275–284.
- Kuster TM, Arend M, Günthardt-Goerg MS, Schulin R. (2012). *Root growth of different oak provenances in two soil under drought stress and air warming conditions*. Plant and Soil, Vol. 369. pp 61-71.
- Ladrera R, Jimenez R, Marqués O, Ederra A, Huguet T, González ME y Arrese-Igor C. (2006). *Tolerancia a la sequía en diferentes cultivares de Medicago truncatula*. En: Nuevos Retos y Oportunidades de las Leguminosas en el Sector Agroalimentario Español. Ed. De los Mozos M, Giménez MJ, Rodríguez MF y Sánchez R. Consejería de Agricultura. Junta de Comunidades de Castilla la Mancha, Cuenca. pp 125-132.
- Laing WA, Wright MA, Cooney J y Bulley SM. (2007). *The missing step of the L-galactose pathway of ascorbate biosynthesis in plants, an L-galactose guanyltransferase, increases leaf ascorbate content*. PNAS, Vol. 104. pp. 9534-9539.
- Larrainzar E, Wienkoop S, Weckwerth W, Ladrera R, Arrese-Igor C y González EM. (2017). *Medicago truncatula Root Nodule Proteome Analysis Reveals Differential Plant and Bacteroid Responses to Drought Stress*. Plant Physiol, Vol. 144(3). pp 1495–1507.
- Lin J, Li X, Luo Z, Mysore KS, Wen J, y Xie F. (2008). *NIN interacts with NLPs to mediate nitrate inhibition of nodulation in Medicago truncatula*. Nature Plants, Vol. 4. pp. 942-952.

Linster CL y Clarke SG. (2008). *L-Ascorbate biosynthesis in higher plants: the role of VTC2*. Trends in Plant Science, Vol. 13. pp. 567-573.

López-Bellido L. (2006). *El papel de las leguminosas en la sostenibilidad de la agricultura mediterránea: ilusión o realidad*. En: Nuevos Retos y Oportunidades de las Leguminosas en el Sector Agroalimentario Español. Ed. De los Mozos M, Giménez MJ, Rodríguez MF y Sánchez R. Consejería de Agricultura. Junta de Comunidades de Castilla la Mancha, Cuenca. pp 29-50.

Luna-Flores W, Estrada-Medina H, Jiménez-Osornio JM y Pinzón-López L. (2012). *Efecto del estrés hídrico sobre el crecimiento y eficiencia del uso del agua en plántulas de tres especies arbóreas caducifolias*. Terra Latinoamericana, Vol. 30, núm. 4, 2012, pp. 343-353.

Marschner H. (2002). *Mineral nutrition of higher plants*. 2nd ed. Academic Press, Londres.

Matamoros MA, Dalton DA, Ramos J, Clemente MR, Rubio MC y Becana M. (2003). *Biochemistry and Molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis*. Plant Physiol, 133(2), pp 499-509.

Mayz-Figueroa J. (2004). *Fijación biológica de Nitrógeno*. Revista Científica UDO Agrícola, ISSN-e 1317-9152, Vol. 4, N° 1. pp 1-20.

Mittler R. (2017). *ROS are good*. Trends Plant. Sci., Vol. 22. pp 11-19.

Mulligan JT y Long SK. (1989). *A family of activator genes regulates expression of Rhizobium meliloti nodulation genes*. Genetics, Vol. 112, n°1. pp 7-18.

Múzquiz M. (2001). *Las leguminosas en la nutrición*. Agricultura: Revista agropecuaria y ganadera, ISSN 0002-1334, N° 824. pp 104-105.

Perret X, Staehelin C y Broughton WJ. (2000). *Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, Vol.64. pp 180-201.

Ramírez-Bahena MH, Peix A, Velázquez E y Bebmás EJ. (2016). *Historia de la investigación en la simbiosis leguminosa bacteria*. Arbor: Ciencia, pensamiento y cultura, ISSN 0210-1963, Vol. 192, N° 779.

Revilla G y Zarra I. (2008). *Fisiología vegetal. Introducción a las células de las plantas: membranas y pared*. En: Fundamentos de Fisiología Vegetal (2a edición). Ed. Azcon-Bieto J y Talón M. MC Graw Hill Interamericana. pp 3-25.

- Riberio AC, Katz I, De Pádua Sousa A y Martínez RA. (2015). *Índice SPAD en el crecimiento y desarrollo de plantas de lisiantus en función de diferentes dosis de nitrógeno en ambiente protegido*. IDESA, Vol. 33, N° 2. pp 97-105.
- Rolfe BG, Mathesius U, Djordjevic M, Weinman J, Hocart C, Weiller G y Bauer WD. (2003). *Proteomic analysis of legume-microbe interacciones*. Comparative and Funtional Genomics. pp. 225-228.
- Rubiales D. (2016). *2016, El año en que las naciones unidas nos recuerdan la importancia de las leguminosas en la dieta y en la agricultura*. ARBOR Ciencia, Pensamiento y Cultura; Vol. 192-779.
- Rubio LA y Molina E. (2016). *Las leguminosas en la agricultura del futuro / Grain legumes in future agriculture*. Arbor, Vol. 192 n° 779.
- Sanchez-Díaz M y Aguirreolea J. (2008). *El agua en la planta. Movimiento del agua en el sistema suelo-planta-atmósfera*. En: Fundamentos de Fisiología Vegetal (2a edición). Ed. Azcon-Bieto J y Talón M. MC Graw Hill Interamericana.
- Sanjuan J, Nogales J, Sanjuan-Pinilla JM, Muñoz S, Herrera-Cervera JA, Soto MJ, Lluch C y Olivares J. (2002). *Desarrollo de simbiosomas en nódulos de leguminosas: Fijación del nitrógeno en un ambiente... ¿ideal?*. En: Avances en el Metabolismo del Nitrógeno: De la Biología Molecular a la Agronomía. Ed. Aparicio P, Arrese-Igor C, González C, Lamsfus C, Llama MJ, Muñoz A, Royuela M y Serra JL. Universidad Pública de Navarra. pp 325-332.
- Schulze E-D. (1994). *Carbon and nitrogen cycling in European Forest Ecosystems*. Ecological Studies, Vol. 142.
- Smil V. (1999). *Nitrogen in crop production: an account of global flows*. Global Biogeochem. Cycles, Vol. 13. pp 647-662.
- Smirnoff N. (2018). *Ascorbic acid metabolism and functions: A comparasion of plants and mammals*. Free Radical Biology and Medicine, Vol. 112. pp 116-129.
- Soares C, Carvalhob M, Azevedob RA y Fidalgo F. (2019). *Plants facing oxidative challenges—A little help from the antioxidant networks*. Elsevier Environmental and Experimental Botany, Vol. 161. pp 4-25.
- Somerville C y Briscoe J. (2001). *Genetic engineering and water*. Science, Vol. 292. pp. 2217.

- Song L, Zulet A, Nguyen HT, González EM y Larrainzar E. (2017). *Drought stress causes a reduction in the biosynthesis of ascorbic acid in soybean plants*. Front Plant Sci, Vol. 8.
- Suzaki T, Takeda N, Nishida H, Hoshino M, Ito M, Misawa F, Handa Y, Miura K, Kawaguchi M. (2019). *Lack of Symbiont Accommodation controls intracellular symbiont accommodation in root nodule and arbuscular mycorrhizal symbiosis in Lotus japonicus*. United States, North America: Public Library of Science.
- Tadeo FR y Gómez-Cadenas A. (2008). *Fisiología de las plantas y el estrés*. En: Fundamentos de Fisiología Vegetal (2a edición). Ed. Azcon-Bieto J y Talón M. MC Graw Hill Interamericana.
- Taiz L y Zeiger E. (2006). *Plant Physiology. 4th Edition*. Sinauer Associates.
- Tuteja N, Gill SS, Tiburcio AF y Tuteja R. (2012). *Improving crop resistance to abiotic stress*. Wiley-Blackwell.
- Ureta A y Nordlund S. (2002). *Evidence for conformational protection of nitrogenase against oxygen in gluconacetobacter diazotrophicus by a Putative FeSII Protein*. Journal of Bacteriology, Vol. N°184(20). pp 5805–5809.
- Verdoy D. (2004). *Estudio de la respuesta de leguminosas a los estreses hídrico y salino y obtención de plantas tolerantes por acumulación de osmolitos*. Universidad Autónoma de Madrid (España).
- Wity JF y Minchin FR. (1998). *Hydrogen measurements provide direct evidence for a variable physical barrier to gas diffusion in legume nodules*. Journal of Experimental Botany, Vol. 49, N°323. pp. 1015-120.
- Wolucka BA y Montagu MV. (2007). *The VTC2 cycle and the de novo biosynthesis pathways for vitamin C in plants: An opinion*. Phytochemistry, Vol. 69, N°21. pp. 2602-2613.
- Xie F, Murray JD, Kim J, Heckmann AB, Edwards A, Oldroyd GED y Downie A. (2012). *Legume pectate lyase required for root infection by rhizobia*. PNAS, Vol. 109. pp. 633-638.
- Young ND, Debelle F, Oldroyd GE, Geurts R, Cannon SB, Udvardi MK, Benedito VA, Mayer KF, Gouzy J, Schoof H, Van de Peer Y, Proost S, Cook DR, Meyers BC, Spannagl M., et al. (2011). *The Medicago genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses*. Nature, Vol. 480. pp 520-524.

Zhang FJ, Zhang KK, Du CZ, Li J, Xing YX, Yang LT, Li YR. (2014). *Effect of drought stress on anatomical structure and chloroplast ultrastructure in leaves of sugarcane*. Sugar Tech Vol.17. pp 41-48.