

Análisis de los efectos de inhibidores de la nitrificación sobre la fijación de nitrógeno en leguminosas

MÁSTER UNIVERSITARIO EN AGROBIOLOGÍA AMBIENTAL

TRABAJO FIN DE MÁSTER
KAMILA MATTGE
DIRECTOR
CESAR ARRESE-IGOR SANCHEZ
CODIRECTORA
MARÍA ISABEL RUBIA GALIANO

AGRADECIMIENTOS

A nivel personal, en primer lugar a Dios por estar siempre conmigo. A mis padres que, aún tan lejos, están conmigo todos los días dándome apoyo y fuerza para seguir adelante, en un año tan difícil como éste por el Covid-19, ellos fueron los que me dieron más ánimos para estar aquí.

Me gustaría dar las gracias a mi director el Dr. Cesar Arrese-Igor por darme la oportunidad de realizar este trabajo en su grupo, y confiar en este proyecto. Gracias por tus enseñanzas.

Agradezco también a todos los compañeros y profesores del máster por todo lo que hemos pasado este año, en Pamplona y en Bilbao, fue una experiencia inolvidable. Gracias a Gustavo por las determinaciones analíticas tan importantes para este trabajo. Al grupo de fisiología del IMAB también por ayudarme en los muestreos, ¡Eskerrik asko!

Y, sobre todo, agradezco a Maribel Rubia Galiano, por ayudarme desde el principio, por poner a disposición su tiempo, incluso en festivos y fines de semana, gracias por su paciencia (¡mucha paciencia!), sabiduría, y por las correcciones e incentivos, ¡este trabajo no sería posible sin su ayuda, muchas gracias!

*The greatest accomplishment is not in never falling,
but in rising again after you fall.*

(Vince Lombardi [1913 – 1970])

Listado de abreviaturas

AMO	Amonio monooxigenasa
ANA	Actividad aparente de la nitrogenasa
CH	Contenido hídrico
DCD	Diciandiamida
DPI	Días después de la inoculación
DMPP	3,4-dimetilpirazol fosfato
EUN	Eficiencia del uso de nitrógeno
FBN	Fijación biológica de nitrógeno
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HPPA	ácido 3-(4-hidroxifenil)propiónico
IBN	Inhibidores biológicos de la nitrificación
IN	Inhibidores de la nitrificación
Lb	Leghemoglobina
MHPP	3-(4-hidroxifenil) propionato de metilo
OD	Densidad óptica
PA	Parte aérea
PS	Peso seco
PF	Peso fresco
R	Raíz
T ^a	Temperatura

Resumen

El objetivo de este trabajo fue determinar si los inhibidores de la nitrificación (IN) (DMPP y MHPP) pueden modificar el establecimiento de la simbiosis, así como el desarrollo y funcionamiento de los nódulos en plantas de guisante y alfalfa. En primer lugar, se analizó el efecto de los IN sobre el crecimiento de los rizobios en vida libre, donde observamos que los rizobios pueden crecer en presencia de los IN. En cuanto al estudio del establecimiento de la simbiosis, los resultados obtenidos en este trabajo de investigación mostraron que los IN no tienen un efecto sobre la fisiología de los cultivos. Además, se confirmó por primera vez que el inhibidor MHPP se degrada por acción biológica tras un periodo corto de tiempo.

Palabras clave: Guisante, Alfalfa, DMPP, MHPP, HPPA, Fisiología vegetal.

Abstract

The objective of this experiment was to determine if the nitrification inhibitors (NIs) (DMPP and MHPP) can modify the establishment of the symbiosis, as well as the development and functioning of nodules in pea and alfalfa plants. First, the effect of NIs on the growth of rhizobia in free living culture was analyzed, where we observed that rhizobia can grow in the presence of NI. Regarding the study of the establishment of symbiosis, the results obtained in this research work showed that NIs do not have an effect on the physiology of crops. In addition, it was confirmed for the first time that the MHPP inhibitor is degraded by biological action after a short period of time.

Keywords: Pea, Alfalfa, DMPP, MHPP, HPPA, Plant Physiology.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. EL NITRÓGENO	1
1.2. LAS LEGUMINOSAS	3
1.2.1. Cultivo de guisante (<i>Pisum sativum</i> L.)	3
1.2.2. Cultivo de alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.)	4
1.3. FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO (FBN).....	5
1.3.1. Simbiosis rizobio-leguminosa	6
1.3.1.1. Proceso de infección y organogénesis	7
1.3.2. Nitrogenasa	9
1.4. INHIBIDORES DE LA NITRIFICACIÓN.....	11
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1. CRECIMIENTO Y ANÁLISIS DE RIZOBIOS EN VIDA LIBRE	13
3.2. CONDICIONES DE CULTIVO DE LAS PLANTAS	14
3.2.1. Germinación	14
3.2.2. Cultivo Hidropónico	15
3.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO HÍDRICO Y BIOMASA	16
3.4. NÚMERO DE NÓDULOS.....	16
3.5. CONTENIDO DE CLOROFILA.....	17
3.6. DETERMINACIÓN DE LA FBN: ACTIVIDAD APARENTE DE LA NITROGENASA	17
3.7. DETERMINACIÓN DE MHPP Y HPPA	18
3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	19
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
4.1. CRECIMIENTO DE RIZOBIOS EN VIDA LIBRE	20
4.1.1. Determinación de MHPP y DMPP en vida libre	22
4.2. CULTIVO HIDROPÓNICO	25
4.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO HÍDRICO Y BIOMASA	30
4.4. NÚMERO DE NÓDULOS.....	31
4.5. CONTENIDO DE CLOROFILA.....	32
4.6. DETERMINACIÓN DE LA FBN: ACTIVIDAD APARENTE DE LA NITROGENASA	33
4.7. DETERMINACIÓN DE MHPP Y HPPA EN SOLUCIÓN NUTRITIVA	34
5. CONCLUSIONES	37
6. BIBLIOGRAFÍA	38

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL NITRÓGENO

En el medio ambiente, uno de los elementos más abundantes es el nitrógeno (N). Está presente en diferentes formas en el suelo, en los seres vivos y en la atmósfera, esta última siendo considerada como la principal fuente de N (ya que constituye, aproximadamente, el 80%). El conjunto de intercambio entre estos tres reservorios de N se denomina como el ciclo biogeoquímico del N (Figura 1), y ocurre mediante procesos físico-químicos y biológicos (Coskun et al., 2017; Aldasoro, 2017). A pesar de que la litosfera representa la mayor reserva de N, no tiene una participación muy significativa en el ciclo del N una vez que se encuentra retenido en rocas, de este modo la principal fuente de N para las plantas proviene del gas dinitrógeno atmosférico (N_2 atmosférico) (Muñoz-Azcárate, 2014).

Para que este N_2 atmosférico entre en el ciclo del N y pueda ser fijado por las plantas es necesario que sufra algunas transformaciones (Fig. 1). El N_2 puede ser fijado a través de la oxidación provocada por las descargas eléctricas de las tormentas a ácido nítrico en presencia de oxígeno (O_2) y vapor de agua, sin embargo, la mayor parte es fijado por los microorganismos (Aparicio-Tejo et al., 2013). La fijación del N_2 atmosférico por microorganismos se da mediante la fijación biológica de nitrógeno (FBN) a través del complejo enzimático nitrogenasa. Además de estos dos procesos de reducción del N_2 atmosférico, hay una tercera, que es la principal vía de producción de fertilizantes nitrogenados: el proceso industrial de Haber-Bosh, en que el N_2 es reducido a amoníaco (NH_3) por el hidrógeno (H_2) a elevada presión y temperatura (T^a) (Aparicio-Tejo et al., 2013; Aldasoro, 2017).

En las plantas, el N es considerado como el principal nutriente después del carbono (C), del hidrógeno (H) y del oxígeno (O). Es esencial para el proceso fotosintético, además de formar parte de las biomoléculas como proteínas, ácidos nucleicos, alcaloides y porfirinas (Frink et al., 1999). Las plantas absorben el N del suelo en forma de nitrato (NO_3^-) y amonio (NH_4^+) o bien por reducción del N_2 estableciendo asociaciones simbióticas con diversas bacterias (Aparicio-Tejo et al., 2013). Estas bacterias pertenecen a los dominios filogenéticos *Archaea* (arqueobacterias) y *Eubacteria* (bacterias) y pueden reducir el N_2 tanto en vida libre como en asociaciones simbióticas con plantas (dentro de los nódulos de las raíces de las plantas) (Coskun et al., 2017).

Otros procesos importantes en el ciclo del N se presentan en la Fig. 1. El proceso de nitrificación ocurre cuando el NH_4^+ es oxidado por microorganismos del suelo (*Nitrosomonas* y *Nitrobacter*) y produce hidroxilamina (NH_2OH), nitrito (NO_2^-) y NO_3^- (Van Kessel et al., 2015). La desnitrificación es el proceso inverso, y es responsable de la salida de N de los ecosistemas como N_2 . Este proceso lleva consigo la formación de NO_2^- , óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N_2O) y está

catalizado por bacterias, arqueas y hongos (Muñoz-Azcárate, 2014; Van Kessel et al., 2015).

El proceso de conversión del N orgánico en NH_4^+ se denomina amonificación, a través del cual bacterias y hongos presentes en el suelo mineralizan y convierten las diferentes formas de N orgánico en inorgánico (Fig. 1). En la Fig. 1, también se muestra la cantidad de N en millones de toneladas presentes en cada etapa (Aparicio-Tejo et al., 2013, Muñoz-Azcárate, 2014).

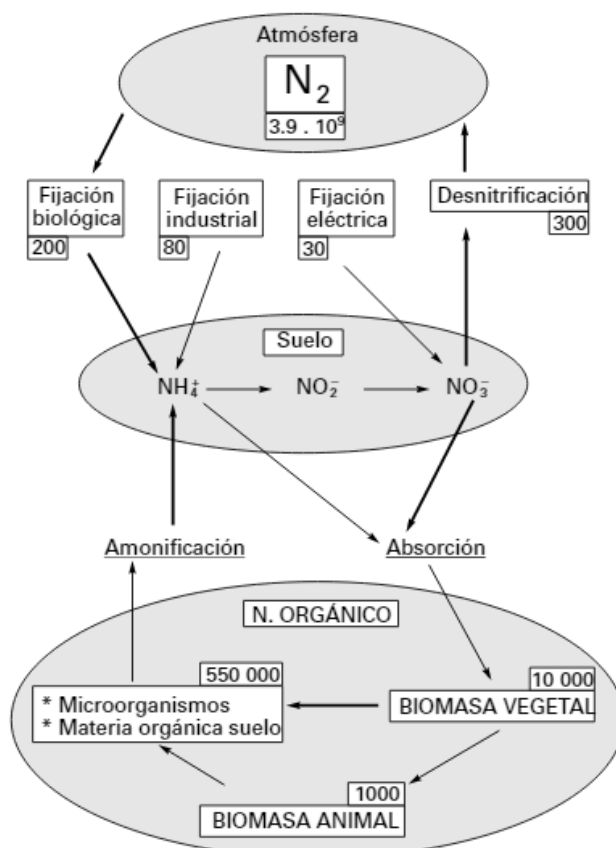


Figura 1. Ciclo del N – Principales procesos y relaciones; cifras correspondientes a millones de Tm de N (Aparicio-Tejo et al., 2013).

Para una producción alimentaria más sostenible y buscando disminuir la contaminación difusa promovida por las actividades agrícolas, es imprescindible la búsqueda de una mejora en la eficiencia del uso del nitrógeno en el sistema agrícola. La mayor inquietud se debe sobre todo por los impactos ambientales causados por el N en la agricultura, como la creciente contaminación de aguas superficiales y subterráneas por nitratos, además de la contaminación atmosférica provocada por los gases nitrogenados (óxidos de nitrógeno NO_x , NH_3 y N_2O), que favorecen el efecto invernadero, la lluvia ácida y al deterioro de la capa de ozono (Wang et al., 2021). Controlar las pérdidas de N a fin de evitar mayores impactos ambientales, hacen que la búsqueda de métodos y alternativas aplicadas a los cultivos sean una estrategia imprescindible en la actualidad (IPCC, 2021).

1.2. LAS LEGUMINOSAS

Las leguminosas son miembros de la familia Leguminosae. Dentro de las angiospermas constituyen la tercera mayor familia por número de especies (Azani et al., 2017), y además se consideran el cultivo para alimentación más importante después de los cereales (Liew et al., 2014). Desde los orígenes de la agricultura se evidencia la importancia de las leguminosas para la alimentación humana y animal, así como para la salud y productividad del suelo. Además de los usos como forraje y estiércol verde, en los países en desarrollo las leguminosas son una fuente económica de proteínas y micronutrientes en comparación con las proteínas animales. La horticultura y la medicina también se benefician del cultivo de leguminosas, así como la industria de barnices y pinturas (Azani et al., 2017).

En la actualidad debido a la necesidad de producir más alimentos para una población mundial en crecimiento y con el avance de la agricultura moderna, el uso intensivo de fertilizantes inorgánicos y riego ha aumentado exponencialmente a fin de aumentar el rendimiento de los cultivos (Meena y Lal, 2018). En este sentido, las leguminosas son primordiales en los sistemas de cultivo pues además de servir como una fuente alimentaria y nutricional, también auxilian en el mantenimiento del suelo sin comprometer el potencial de fertilidad y productividad a largo plazo, ya sea como monocultivos, en rotación de cultivos o en siembra intercalada (Embrapa, 2007; Meena y Lal, 2018).

Cuando se utilizan en rotación con otras especies de cultivo, los cultivos de leguminosas pueden restaurar las existencias de carbono orgánico del suelo, minimizar la incidencia de plagas y enfermedades (Deakin y Broughton, 2009), además de disponer de la capacidad biológica de fijar N₂ en simbiosis con bacterias del suelo, lo que supone una reducción en el uso de fertilizantes y una mejora en la cantidad de N en el suelo. Sin embargo, es importante señalar que, en suelos con alto contenido de N, no es imprescindible para el desarrollo de la planta el establecimiento de la simbiosis entre leguminosas y rizobios (Aldasoro, 2017).

De esta manera, las leguminosas influyen en la salud y nutrición por ser uno de los alimentos más nutritivos del mundo; en la seguridad alimentaria por ser un cultivo de coste bajo y que pueden ser cultivadas en un rango amplio de clima y suelo, influyen también en la biodiversidad, teniendo en cuenta que mejoran el suelo y la cantidad de N presente en él, y sobre todo en el cambio climático, por su capacidad de absorción, contribuyendo en la reducción de los gases de efecto invernadero (Meena y Lal, 2018; Powers y Thavarajah, 2019).

1.2.1. Cultivo de guisante (*Pisum sativum* L.)

El guisante es la leguminosa de grano de clima templado más comúnmente cultivada en Europa, debido a su mayor potencial de rendimiento

en comparación con otras leguminosas. Debido a su gran flexibilidad de utilización (como grano, ensilado o heno) su valor potencial aumenta tanto para la agricultura convencional como para la ecológica (Pecetti et al., 2019). La producción mundial de guisantes secos en 2019 fue de más de 14,1 millones de toneladas, siendo los principales productores Canadá, Rusia y China (FAOstat, 2021). España es responsable de producir alrededor de 290 mil toneladas de guisantes secos y verdes y tiene un rendimiento de 8 mil kg/ha, aproximadamente (FAOstat, 2021).

La temperatura óptima para el crecimiento de guisante es de 18 a 22°C, además es una especie que se puede cultivar durante todo el año. Se adapta a diversos tipos de suelo, aunque es sensible a la acidez y a la salinidad. El rango ideal del pH del suelo para este cultivo es de 6,0 a 7,5 (Dhall, 2017). El guisante contiene tallos trepadores y angulosos y una altura que varía hasta 2 m dependiendo de la variedad. Tiene un sistema radicular poco desarrollado en conjunto y sus hojas tienen folíolos en pares y terminan en zarcillos que se sujetan a los tutores durante su crecimiento (Peralta y González, 2009).

El cultivo de guisante sin ninguna aplicación de fertilizante nitrogenado tiene la capacidad de acumular hasta el 65-75% de N₂ debido a la FBN (Corre-Hellou y Crozat, 2005). La nodulación es caracterizada por la simbiosis con la bacteria del género *Rhizobium leguminosarum*, formando nódulos indeterminados, con lo cual permite un aporte mínimo de N (Aparicio-Tejo et al., 2013; Muñoz-Azcárate, 2014).

1.2.2. Cultivo de alfalfa (*Medicago sativa* L.)

Considerada como la especie forrajera más cultivada e importante en muchos países del mundo, la alfalfa es principalmente utilizada por la industria ganadera para la alimentación animal debido a su alto contenido en proteínas y potencial de producción de biomasa (Radovic et al., 2009; Delic et al., 2010). La producción mundial de heno de alfalfa (forma más utilizada tradicionalmente) fue alrededor de 210 millones de toneladas en 2017, y se espera un incremento anual de 7% hasta 2023 (Research and Markets, 2021). Los principales productores de alfalfa a nivel mundial son Estados Unidos y España (Research and Markets, 2021). Pasados tres años de baja producción, en 2019/20 España produjo 1.4 millones de toneladas de alfalfa (AEFA, 2020).

El cultivo óptimo de la alfalfa se da en localidades de clima templado, donde la temperatura varía entre 18 y 28°C. Es una especie que tiene tolerancia al calor y a suelos salinos, pero no al encharcamiento, y el pH del suelo debe estar en el rango de 6,6 y 7,5 (Canals et al., 2009). La alfalfa presenta hojas trifoliadas, con estípulas que crecen juntas al pecíolo, las flores son de color violeta y las vainas enrolladas. Tiene un sistema de enraizamiento profundo,

presentando una raíz robusta y con múltiples raíces secundarias (Peralta y González, 2009; Canals et al., 2009).

La nodulación es caracterizada por la simbiosis con la bacteria del género *Ensifer meliloti* formando nódulos indeterminados (Aparicio-Tejo et al., 2013).

1.3. FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO (FBN)

En agricultura, la producción de cultivos requiere grandes cantidades de N para mantener y garantizar un buen crecimiento, desarrollo y rendimiento de los cultivos. La eficiencia del uso de nitrógeno (EUN), o sea, la fracción de nitrógeno aplicado que es absorbida y utilizada por la planta, es muy pobre en los sistemas agrícolas actuales, lo que supone un aporte mayor de fertilizantes nitrogenados para garantizar la demanda de producción y el rendimiento de los cultivos (Ladha et al., 2005).

A nivel mundial, aproximadamente 70% del N aplicado en los sistemas de cultivo no son absorbidos por las plantas y se pierden hacia el medio ambiente, contribuyendo en la contaminación y al cambio climático, promoviendo cambios en la productividad y en la biodiversidad de los ecosistemas (Ladha et al., 2005; Cassman et al., 2002; IPCC, 2021). Las pérdidas de los fertilizantes nitrogenados se dan en el medio ambiente por la volatilización del NH_3 , por la nitrificación y desnitrificación, resultando en NO_3^- y N_2O , uno de los principales gases del efecto invernadero, capaz de retener 300 veces más el calor del dióxido de carbono (CO_2) (Coskun et al., 2017; IPCC, 2021; Wang et al., 2021).

Según Wang et al. (2021), mejorar la EUN y reducir el impacto negativo del N en el medio ambiente se ha convertido en un tema de interés global. La búsqueda de nuevas tecnologías y estrategias debe ser constante, para poder controlar la nitrificación en los cultivos, disminuir la huella de N, las emisiones de N_2O y ampliar la eficiencia en el uso de fertilizantes nitrogenados (Ruser y Schulz, 2015). Una alternativa ecológica y económica para mejorar la EUN es la utilización de leguminosas por su FBN, que les permite colonizar suelos con baja disponibilidad de N, o que incluso carecen de él (Muñoz-Azcárate, 2014).

De manera general, el proceso de FBN es considerado como un proceso de alto coste energético catalizado por el complejo enzimático nitrogenasa, que busca romper el triple enlace del N_2 molecular para generar dos moléculas de NH_3 . Este proceso es llevado a cabo exclusivamente por algunos organismos procariotas que se encuentran en el suelo denominados diazotrofos, y se encuentran prácticamente en cualquier hábitat, comprenden tanto bacterias de vida libre como organismos capaces de establecer una simbiosis con plantas, normalmente leguminosas (Burén et al., 2020).

La capacidad de un organismo para fijar el N puede determinarse experimentalmente a través de la medida del isótopo $^{15}\text{N}_2$ en un organismo, o

bien por la presencia de genes que codifican las proteínas fundamentales para la síntesis de la nitrogenasa (genes *nif*). En presencia de oxígeno, la actividad nitrogenasa se inhibe rápidamente, por este motivo, los organismos diazotrofos son normalmente anaerobios estrictos o facultativos, además son capaces de crear ambientes microaeróbicos para proteger la nitrogenasa (Aparicio-Tejo et al., 2013; Muñoz-Azcárate, 2014).

1.3.1. Simbiosis rizobio-leguminosa

La simbiosis fijadora de N_2 más importante y estudiada desde el punto de vista económico es aquella que se establece entre miembros de la familia *Leguminosae* y las bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Ensifer*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* (comúnmente llamados rizobios) (Aparicio-Tejo et al., 2013).

Los rizobios también se encuentran en los suelos como organismos de vida libre, sin embargo, en condiciones de baja disponibilidad de N sucede un intercambio de señales que derivan en el establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa (Taiz et al., 2015). Una vez establecida la simbiosis, los rizobios inducen el desarrollo de un nuevo órgano en la planta, llamado nódulo, que es donde tiene lugar el proceso de FBN (Aldasoro, 2017).

La clasificación de los principales rizobios capaces de establecer la simbiosis con leguminosas se presenta en la Tabla 1. El género *Rhizobium* se caracteriza por formar nódulos en leguminosas provenientes de climas templados, y su crecimiento se da relativamente rápido en medios de cultivo ácidos. *Ensifer* tiene características semejantes al *Rhizobium*, sin embargo, al ser un género que se ha incluido desde hace poco todavía se hace necesario nuevos debates y estudios. *Bradyrhizobium* tiene un crecimiento lento y forma nódulos en leguminosas de climas tropicales y subtropicales. *Mesorhizobium* tiene un crecimiento intermedio entre *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. (Aparicio-Tejo et al., 2013).

Tabla 1. Clasificación de los principales rizobios que forman nódulos en leguminosas (Aparicio-Tejo et al., 2013).

Género	Especie	Leguminosa huésped
<i>Rhizobium</i>	<i>leguminosarum</i> - Biovariedad <i>viciae</i>	<i>Pisum sativum</i> (Guisante), <i>Lathyrus</i> , <i>Lens</i> , <i>Vicia</i>
	- Biovariedad <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	- Biovariedad <i>trifolii</i>	<i>Trifolium</i>
	<i>etli</i>	<i>P. vulgaris</i>
	<i>tropici</i>	<i>P. vulgaris</i> , <i>Leucaena</i> , <i>Onobrychis</i>
<i>Ensifer</i>	<i>melliloti</i>	<i>Medicago sativa</i> (Alfalfa), <i>M. truncatula</i> , <i>Trigonella</i>
	<i>fredii</i>	<i>Glycine max</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>Vigna radiata</i> , <i>V. unguiculata</i> , <i>Cajanus</i>
	<i>medicae</i>	<i>Medicago spp.</i>
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>japonicum</i>	<i>G. max</i> , <i>G. soja</i>
<i>Azorhizobium</i>	<i>caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>
<i>Mesorhizobium</i>	<i>loti</i>	<i>Lotus japonicum</i> , <i>L. corniculatus</i>
	<i>ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>

1.3.1.1. Proceso de infección y organogénesis

En términos generales, la formación de nódulos simbióticos fijadores de N₂ requiere dos procesos de desarrollo: organogénesis de nódulos e infección bacteriana. Los rizobios colonizan naturalmente la rizosfera, metabolizando los compuestos orgánicos secretados por las raíces de las plantas. El éxito de la interacción simbiótica se basa en el diálogo molecular entre la planta y la bacteria (Oldroyd, 2013), de esta manera, el primer paso en el proceso simbiótico es la aproximación del rizobio a la raíz de la planta huésped a través del intercambio de señales (Deakin y Broughton, 2009). En condiciones de bajo N, las raíces de las leguminosas exudan compuestos flavonoides e isoflavonoides, que inducen la producción por rizobios de factores de nodulación (Factores Nod) (Ferguson et al., 2010). Los factores Nod son esenciales para el proceso de infección y la organogénesis del nódulo, pues activan la vía de señalización de la simbiosis, inducen la deformación del pelo radicular, estimula el desarrollo de los nódulos y dan inicio al proceso de infección (Downie, 2014).

Las bacterias ingresan en las plantas a través de deformaciones del pelo radical inducidas por los factores Nod. La pared celular de la planta se degrada por la acción de las enzimas tanto de la planta como del rizobio, es decir, las celulasas (Oldroyd et al., 2011). A través de la ruptura de la capa de células epidérmicas, los rizobios entran en la raíz y se multiplican dentro de estos focos

de infección, y eventualmente invaden las células vegetales (Deakin y Broughton, 2009).

El proceso de infección continúa con la formación y desarrollo del cordón de infección que se funde a la membrana plasmática y permite que los rizobios infecten las vesículas de la membrana vegetal (Taiz et al., 2015; Aldasoro, 2017), al mismo tiempo los rizobios avanzan y se multiplican. Simultáneamente a este proceso de infección, se produce la inducción de la división celular en la corteza de la raíz, formando el nódulo primordial (Figura 2). Durante la infección intracelular de las células de los nódulos, cuando el cordón de infección alcanza el nódulo primordial, los rizobios se diferencian en "bacteroides" y se liberan por endocitosis de la membrana de la planta, denominada membrana peribacteroidea o membrana del simbiosoma. La membrana junto con las bacterias que rodea forma una estructura llamada simbiosoma, en el cual los rizobios siguen creciendo y dividiéndose junto con la membrana del simbiosoma para finalmente diferenciarse en bacteroides fijadores de N₂ (Udvardi y Poole, 2013; Downie, 2014).

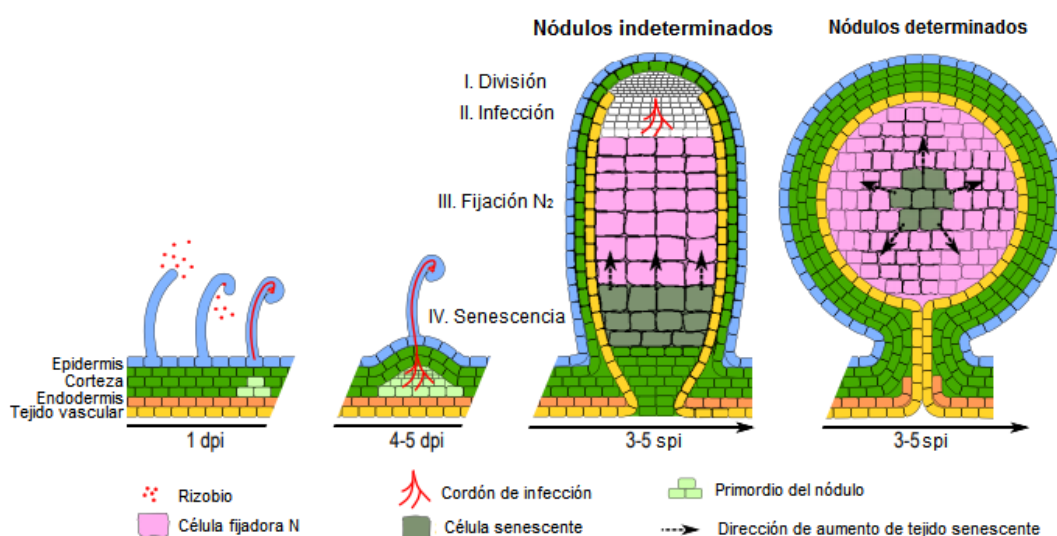


Figura 2. Proceso de desarrollo de nódulos radiculares determinados e indeterminados (adaptado de Kazmierczak et al., 2020).

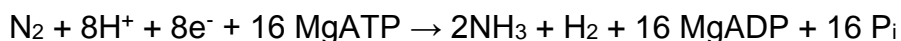
Existen dos tipos de nódulos predominantes en las leguminosas (Fig. 2), nódulos determinados e indeterminados. El tipo de nódulo depende de la planta hospedante y está definido por el patrón de desarrollo del meristemo del nódulo (Oldroyd, 2013). Los nódulos determinados son esféricos ya que las divisiones celulares ocurren solo durante un corto período de tiempo y exportan compuestos de N en forma de ureidos. Los nódulos determinados no tienen un meristemo persistente y, por tanto, sus células invadidas se encuentran todas en una fase de desarrollo similar (Popp y Ott, 2011). Generalmente se forman en

leguminosas tropicales como la soja o el frijol común (Gibson et al., 2008; Kazmierczak et al., 2020). Por lo general, los simbiosomas contienen dos o más bacteroides, mientras que los nódulos indeterminados contienen un único bacteroide (Oldroyd et al., 2011).

Los nódulos indeterminados tienen forma cilíndrica y exportan compuestos de N en forma de amidas, principalmente glutamina y asparagina. Las células de la corteza que forman el nódulo primordial continúan dividiéndose de forma perpendicular a la raíz. Contienen un meristemo persistente que genera continuamente células nuevas y divisiones corticales, de esta manera, dentro de un mismo nódulo indeterminado se observa diferentes fases de desarrollo (Fig. 2): la zona de división, zona de invasión, zona de fijación de N₂ y la zona senescente. Son característicos de leguminosas de climas templados, como el guisante y la alfalfa. (Gibson et al., 2008; Kazmierczak et al., 2020). En los nódulos de las leguminosas un requisito esencial para la fijación de N₂ es la liberación de los bacteroides de los cordones de infección (Aparicio-Tejo et al., 2013).

1.3.2. Nitrogenasa

La FBN ocurre cuando el N₂ atmosférico es reducido por el complejo enzimático nitrogenasa y es convertido en NH₃. La reacción requiere un alto coste energético para romper el triple enlace de la molécula de N₂ atmosférico, y necesitan acumular 8 electrones para poder hidrolizar 16 moléculas de ATP y reducirlo a NH₃. La reacción de la nitrogenasa tiene como estequiometría:



Al reducir una molécula de N₂ atmosférico, la nitrogenasa produce una molécula de hidrógeno (H₂) como subproducto de la reducción de protones excedentes. El H₂ producido en la reacción hace que se reduzca en un 25% (Skizim et al., 2012) la eficiencia de la nitrogenasa y al mismo tiempo también supone una ineficiencia energética hacia la relación rizobio-leguminosa. Algunas cepas de rizobios disponen del gen de captación de H₂ (*Hup*) para codificar la enzima hidrogenasa. Esta enzima hidrogenasa permite que las bacterias recuperen parte de la energía perdida en el proceso de reducción. La mayoría de los rizobios liberan el H₂ al exterior durante la reacción de la nitrogenasa por no poder metabolizarlo, o sea, los nódulos no expresan ni poseen el gen *Hup*, en este caso se denominan cepas *Hup*⁻. Sin embargo, algunos rizobios son capaces de reciclar este H₂ producido a través de la captación de la hidrogenasa en el interior de los nódulos (cepas *Hup*⁺) y generar electrones para auxiliar en la reducción del N₂ atmosférico, mejorando así la eficiencia energética de la FBN (Annan et al., 2012; Brito et al., 2005; Muñoz-Azcárate, 2014).

El complejo enzimático de la nitrogenasa consta de dos metaloproteínas, codificadas por los genes *nif*: la dinitrogenasa reductasa (componente II o Fe-proteína) y la dinitrogenasa (componente I o MoFe-proteína):

- La Fe-proteína es un homodímero con una masa molecular comprendida entre 30 y 72 kDa dependiendo del organismo, y está codificada por el gen *nifH* (Tabla 2). Cada subunidad contiene un centro de hierro-azufre [4Fe-4S] que auxilia en las reacciones redox hacia la reducción de N₂ a NH₃, además cada subunidad contiene dos zonas de unión a moléculas de MgATP (Muñoz-Azcárate, 2014; Burén et al., 2020).
- La MoFe-proteína es un heterodímero con una masa molecular que oscila entre 180 y 235 kDa dependiendo del organismo, compuesto por dos subunidades de tipo α y β , codificadas respectivamente por los genes *nifD* y *nifK* (Tabla 2). Cada par $\alpha\beta$ está compuesto de hierro y molibdeno y es denominado cofactor FeMo o FeMoco. Los cofactores de las unidades α y β son responsables de formar el centro activo de la nitrogenasa, donde tiene lugar la reducción de N₂ molecular a NH₃ (Muñoz-Azcárate, 2014; Burén et al., 2020).

Tabla 2. Funciones de los genes *nif* en la FBN (adaptado de Burén et al., 2020).

Genes <i>nif</i>	Funciones en la FBN
<i>nifA</i>	Gen regulador
<i>nifB</i>	Cataliza el precursor del FeMoco que contiene Fe-S
<i>nifDK</i>	Subunidades α y β de la dinitrogenasa
<i>nifH</i>	Dinitrogenasa reductasa
<i>nifM</i>	Auxilia en la maduración de <i>nifH</i>
<i>nifQ</i>	Incrementa Mo en el FeMoco

En resumen, para el funcionamiento de la nitrogenasa se activan diversas reacciones que requieren un gasto de energía en forma de ATP. Para que empiece el proceso de óxido-reducción, una ferrosulfoproteína conocida como ferredoxina actúa como donadora de electrones para la Fe-proteína. La unión de moléculas MgATP hace que la Fe-proteína se asocie a la MoFe-proteína y los electrones transferidos hidrolizan el ATP y produce la reducción de la MoFe-proteína (Figura 3). Cada electrón donado promueve la hidrólisis de dos moléculas de MgATP a ADP, de esta manera, la MoFe-proteína mantiene su poder reductor para numerosos sustratos, aunque de manera natural, reacciona solo con N₂ y H⁺ (Aparicio-Tejo et al., 2013; Muñoz-Azcárate, 2014; Burén et al., 2020).

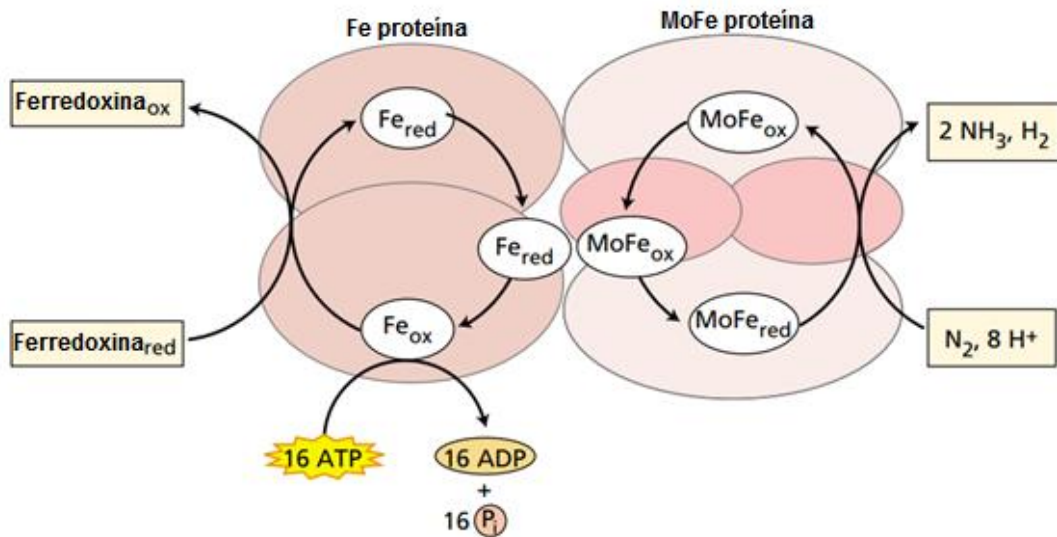


Figura 3. Complejo enzimático de la nitrogenasa (adaptado de Taiz et al., 2015).

El complejo nitrogenasa es extremadamente sensible a la presencia de O_2 , ya que en concentraciones elevadas modifica las Fe-proteínas que conforman el complejo enzimático. Por ello, los nódulos de leguminosas necesitan mantener un entorno microaeróbico dentro de su zona central que contiene los bacteroides (Arrese-Igor et al., 2011). Con eso, los nódulos han desarrollado mecanismos capaces de regular la concentración del O_2 para que la tasa respiratoria en los bacteroides sea suficiente, garantizando así su correcto funcionamiento. Esto es posible por la presencia de una barrera de difusión de O_2 , y también por una proteína denominada leghemoglobina (Lb). La presencia de hierro en esta proteína es el responsable por dar a los nódulos un color rosado, característicos de ellos (Denison y Harter, 1995; Aparicio-Tejo et al., 2013).

1.4. INHIBIDORES DE LA NITRIFICACIÓN

Los inhibidores de la nitrificación (IN) son compuestos que retrasan la oxidación del NH_4^+ a NO_2^- al reducir durante un cierto período de tiempo las actividades de las bacterias *Nitrosomonas* en el suelo (Figura 4) (Trenkel, 2010). Como resultado, mejoran la EUN y reducen el impacto ambiental causado por el N (Ruser y Schulz, 2015).

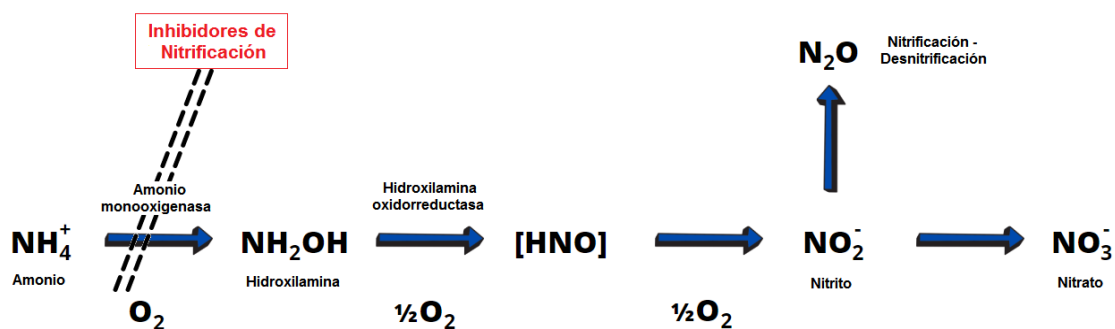


Figura 4. Esquema de acción de los inhibidores de la nitrificación (Trenkel, 2010).

Muchos compuestos orgánicos sintéticos y de origen natural pueden actuar como IN (Subbarao et al., 2015), siendo los más utilizados la nitrapirina, la diciandiamida (DCD) y el 3,4-dimetilpirazol fosfato (DMPP) (Ruser y Schulz, 2015). Estos IN sintéticos suprimen específicamente la vía de la enzima amonio monooxigenasa (AMO) dentro de la nitrificación (Subbarao et al., 2008). Sin embargo, para una eficiencia en la inhibición de la nitrificación en los cultivos es necesario el uso de grandes cantidades de estos inhibidores. Diversos factores hacen que el uso de IN en los sistemas agrícolas todavía sea muy criticado y limitado, como, por ejemplo: baja solubilidad en agua, susceptibilidad a la lixiviación, costos relativamente altos y por un posible impacto negativo en las comunidades microbianas del suelo (Coskun et al., 2017; Raza et al., 2021).

Además de los IN sintéticos, una amplia gama de cultivos (sorgo, arroz, trigo y maíz) son capaces de producir inhibidores biológicos de la nitrificación (IBN) por exudados de las raíces o después de la descomposición de los brotes, esto ocurre debido a la competitividad por el N presente en el suelo y la búsqueda de una mejora en la absorción y asimilación de N de las plantas (Subbarao et al., 2015; Coskun et al., 2017). El proceso de inhibición biológica de la nitrificación es un fenómeno ecológico único que ocurre en la rizosfera de las plantas, en el cual los metabolitos secundarios exudados por las raíces inhiben la nitrificación al suprimir las vías enzimáticas de la AMO y la hidroxilamina oxidoreductasa (HAO) en *Nitrosomonas* (Subbarao et al., 2008; Subbarao et al., 2015).

Al reducir la tasa de nitrificación, los IBN también disminuyen las pérdidas de N por lixiviación y desnitrificación, lo que resulta en una mayor disponibilidad de N, que a su vez mejora la fertilidad del suelo y proporciona una ventaja a las especies que prefieren absorber NH_4^+ (Raza et al., 2021). Algunos de los principales IBN derivados de compuestos exudados por las raíces de las plantas son los exudados del sorgo: la sorgoleona, la sakuranetina y el 3-(4-hidroxifenil) pironato de metilo (MHPP) (Subbarao et al., 2013).

Dado que en sistemas de cultivos mixtos o en sistemas de rotación de cultivos con leguminosas los IN pueden estar presentes en suelo y afectar a la simbiosis *rhizobium-leguminosa*, hasta el momento hay poca información con

relación a estos posibles efectos, de esta manera, se hace necesario más estudios y revisiones sobre los IN y los IBN.

2. OBJETIVOS

- Determinar si los IN (DMPP y MHPP) pueden modificar el establecimiento de la simbiosis, así como el desarrollo y funcionamiento de los nódulos, afectando así a la fisiología de la planta y al rendimiento de las leguminosas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. CRECIMIENTO Y ANÁLISIS DE RIZOBIOS EN VIDA LIBRE

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio fueron *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* NLV8 y *Ensifer meliloti* 2011.

Para el crecimiento rutinario de las bacterias se utilizó el cultivo YEM (Yeast Extract Mannitol, Vincent, 1970), cuya composición es: K₂HPO₄ (0,5g), MgSO₄·7H₂O (0,2g), NaCl (0,1g), Manitol (10g) y extracto de levadura (0,4g) en 1 litro de agua desionizada, con un pH de 6,8 y autoclavado a 121°C durante 20 minutos. El crecimiento de las bacterias se llevó a cabo en matraces con 50ml del medio en agitación (180rpm) y a 28°C. Después de 3 días de crecimiento, el cultivo se trasladó a un tubo de centrifuga estéril y se centrifugó durante 20 minutos a 4200 rpm (Centrífuga SORVALL RC-5C Plus, rotor SH-3000). Finalmente, el sedimento se resuspendió en 1ml de medio mínimo para posterior inoculación.

Para el análisis del efecto de los inhibidores se utilizó un medio mínimo para rizobios (Robertsen et al., 1981). La composición de este medio es: K₂HPO₄ (0,3g), KH₂PO₄ (0,3g), MgSO₄·7H₂O (0,15g), CaCl₂·2H₂O (0,05g), FeCl₃ (0,006g), NaCl (0,05g), glutamato sódico (1,1g), manitol (10g), en 1 litro de agua desionizada con un pH entre 6,8/7,2 y autoclavado a 121°C durante 20 minutos. Tras autoclavar el medio, se añadió 1ml de una solución de vitaminas como suplemento: HCl de tiamina 0,1mg, Pantotenato sódico 0,1mg y Biotina 0,2mg en 1 litro de agua desionizada.

Para el cultivo de *R. leguminosarum* bv. *viciae* NLV8 y *E. meliloti* 2011 se utilizaron tubos de vidrio provistos de tapón de rosca y enrasados hasta un volumen final de 7ml con medio mínimo y con diferentes concentraciones de DMPP y MHPP: Control, 5, 50 y 100µM. El diseño experimental se presenta en la Figura 5.

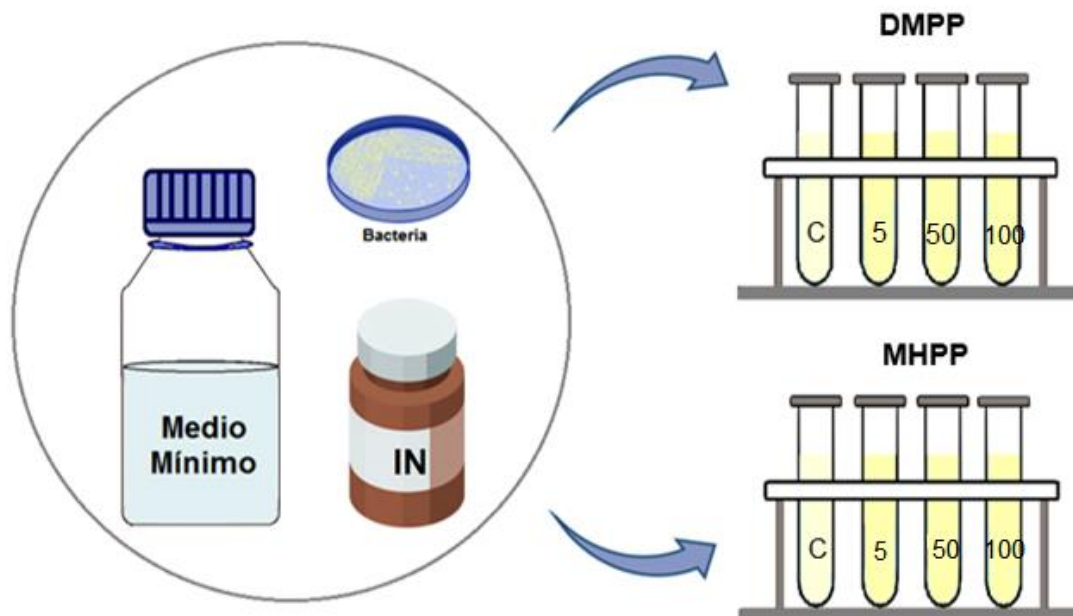


Figura 5. Diseño experimental del crecimiento de los rizobios en vida libre. IN (inhibidor de la nitrificación); DMPP (3,4-dimetilpirazol fosfato); MHPP (methyl 3-4-hydroxyphenyl propionate); C (control); 5 (5 μ M); 50 (50 μ M); 100 (100 μ M).

Estos tubos se inocularon de manera que la densidad óptica (OD₆₀₀) inicial de los cultivos fuera alrededor de 0,10 y se incubaron con agitación (180 rpm) a 28°C. La OD₆₀₀ se determinó tras 0, 12, 18, 24, 36, 48 y 60 horas de incubación para *R. leguminosarum* bv. *viciae* NLV8. Para *E. meliloti* 2011 la OD₆₀₀ se midió después de 0, 12, 18, 24, 36 y 48 horas de incubación.

3.2. CONDICIONES DE CULTIVO DE LAS PLANTAS

3.2.1. Germinación

Las especies utilizadas en este experimento han sido el guisante (*Pisum sativum* L. var. Avola), y la alfalfa (*Medicago sativa* L. var. Capitana). Las semillas de guisante se esterilizaron según el método Labhili et al. (1995), manteniéndolas en solución 1% v/v de hipoclorito sódico (NaClO) y en 0,01% p/v SDS (lauryl sulfato sódico, dodecil sulfato sódico) durante 40 minutos. Tras lavarlas con agua desionizada, se sumergieron en solución de ácido clorhídrico (HCl) a 0,01N. Las semillas de alfalfa se esterilizaron manteniéndolas 45 segundos en solución 95% v/v de etanol y tras lavarlas con agua desionizada, se mantuvieron 15 minutos en solución 2% v/v de NaClO.

La germinación de ambas especies se llevó a cabo en bandejas con una mezcla de perlita y vermiculita 1/1 (v/v), hidratadas con agua desionizada. Las bandejas con las semillas de guisante se mantuvieron en una cámara germinadora a 26°C durante 3 días en oscuridad. En el caso de alfalfa se mantuvieron durante 13 días en una cámara de crecimiento con temperatura

22/18°C (día/noche), humedad 60/70% (día/noche), fotoperiodo de 10 horas y radiación fotosintética 326µmol m⁻² s⁻¹.

3.2.2. Cultivo Hidropónico

Transcurrido el periodo de germinación las plántulas se trasladaron a macetas individuales de 600ml (Figura 6) con solución hidropónica aireada, y se inocularon con las cepas bacterianas correspondientes, añadiendo a la solución nutritiva 1 ml de cultivo bacteriano en medio YEM en su fase exponencial. Para alfalfa, se añadió 0.17 mM de nitrato de amonio (NH₄NO₃) hasta el establecimiento de la simbiosis. El crecimiento de los cultivos se dio en una cámara de crecimiento controlado bajo las siguientes condiciones: T^a 22/18°C (día/noche), humedad 60/70% (día/noche), fotoperiodo de 10 horas y radiación fotosintética 326µmol m⁻² s⁻¹. Para el cultivo hidropónico se utilizó una solución nutritiva libre de N (Rigaud y Puppo, 1975) cuya composición se recoge en la Tabla 3.

Tabla 3. Solución nutritiva libre de nitrógeno (Rigaud y Puppo, 1975)

Macronutrientes		Micronutrientes	
K ₂ HPO ₄	1,1 mM	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	16,5 µM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,8 mM	FeCl ₃ ·6H ₂ O	3,7 µM
KCl	2,7 mM	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	3,5 µM
Na ₂ Fe EDTA	0,1 mM	H ₃ BO ₃	16,2 µM
CaSO ₄ ·2H ₂ O	0,7 mM	MnSO ₄ ·H ₂ O	0,5 µM
		CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,1 µM
		AlCl ₃ ·6H ₂ O	0,2 µM
		NiCl ₂ ·6H ₂ O	0,1 µM
		KI	0,1 µM

La solución nutritiva se cambió dos veces a la semana hasta el final del experimento, ajustando el pH antes de transferir la solución a las plantas, manteniendo un rango de pH de 6,3 tanto para guisante como para alfalfa. Los tratamientos analizados fueron la dosis recomendada en campo y 10x de los inhibidores de la nitrificación, siendo: Control, DMPP (5 y 50µM) y MHPP (5 y 50µM). El diseño experimental fue el siguiente:

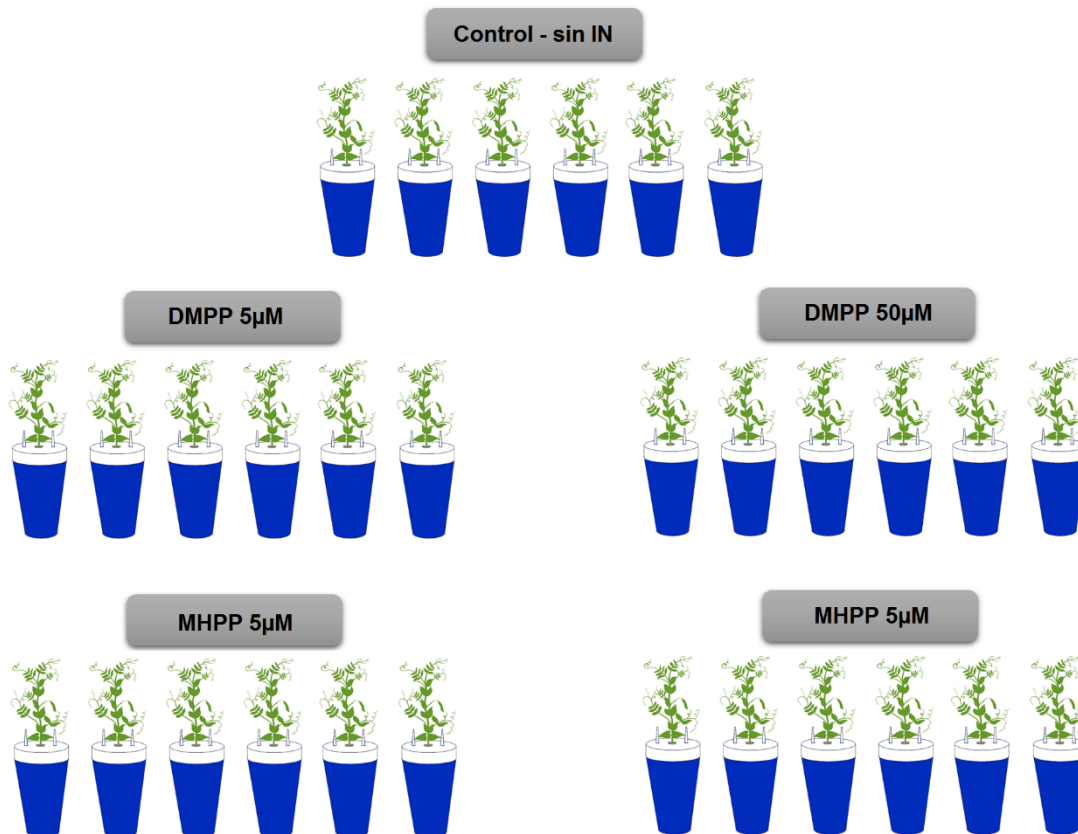


Figura 6. Diseño experimental aplicado para guisante y alfalfa.

Durante el cultivo hidropónico se tomaron imágenes de las dos especies para verificar su crecimiento y desarrollo. Las imágenes de guisante y de alfalfa se analizaron utilizando el software ImageJ para determinar la longitud de la parte aérea (PA) y de la raíz (R) (cm).

3.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO HÍDRICO Y BIOMASA

El contenido hídrico (CH) se calculó utilizando el peso fresco (PF) de la parte aérea, raíz y nódulos de las plantas, y el peso seco (PS) obtenido tras secar el material vegetal en una estufa a 70° C durante 72 horas. El CH se calculó mediante la siguiente fórmula, expresando los resultados en % de agua:

$$CH(\%) = \left(\frac{PF - PS}{PF} \right) \times 100$$

3.4. NÚMERO DE NÓDULOS

El número de nódulos se cuantificó durante una semana a partir de la aparición del primer nódulo en la raíz y al final de cada experimento tanto para guisante como para alfalfa.

3.5. CONTENIDO DE CLOROFILA

La clorofila se estimó utilizando un medidor de clorofila SPAD 502 (*Spectrum Technologies, Inc.*). El SPAD calcula esta cantidad a través de un valor numérico que representa la proporción de clorofila total en cada hoja, a este valor se expresa en unidades SPAD (unidades arbitrarias) (Coste et al., 2010). Se realizaron 3 medidas por planta para el posterior cálculo de una media representativa de cada tratamiento empleado.

3.6. DETERMINACIÓN DE LA FBN: ACTIVIDAD APARENTE DE LA NITROGENASA

La FBN fue determinada como actividad aparente de la nitrogenasa (ANA) según el método presentado por Witty y Minchin (1998). Este método se basa en la evolución del H₂ producido en la reacción catalizada por la enzima nitrogenasa en los bacteroides del interior del nódulo de plantas fijadoras. Las cepas de rizobios utilizadas en este estudio (cepas *Hup⁻*) carecen de la enzima hidrogenasa, que es la responsable por reoxidar el H₂ producido en la planta. De esta manera, en un sistema cerrado de gases es posible cuantificar el H₂ producido en los nódulos como una estimación de la cantidad de N₂ que es fijado por la planta.

A fin de evitar posibles daños y causar una mínima perturbación a las plantas, las medidas se tomaron en la misma maceta en que crecieron, a la cual se le retiró la solución nutritiva. Para ello se hace pasar una mezcla de gases conocida (79% N₂, 21% O₂ y 600ppm de CO₂) a través de las macetas previamente selladas (Figura 7). El gas entra por un tubo mientras que por el otro sale todo el H₂ producido por la reacción de la nitrogenasa hacia el electrodo de medida.

El electrodo de H₂ es muy sensible a la humedad, por tanto, se debe garantizar que la humedad procedente de la maceta no llegue al electrodo, para ello se hace pasar el gas de salida por una trampa de frío y por un desecante (perclorato de magnesio).

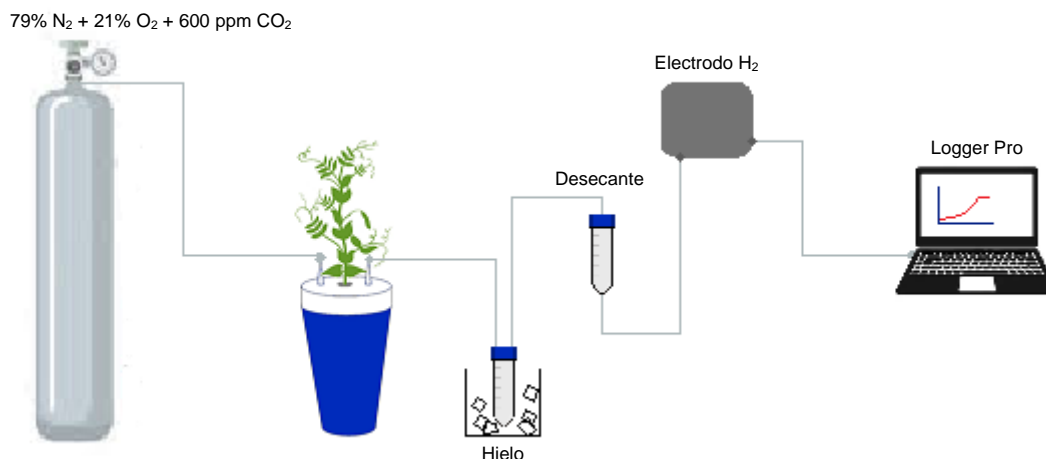


Figura 7. Método de evolución del H₂ (Witty y Minchin, 1998).

Para determinar la evolución de H₂ producido se utilizó un sensor electroquímico de H₂ (Qubit Systems). El equipo se calibró utilizando gases de alta pureza (Praxair, Pamplona, España) utilizando un mezclador de gases (Air Liquide, Madrid, España) con un flujo similar al usado para la medida de las muestras (500 mL min⁻¹). Los datos obtenidos en la calibración resultan en una ecuación que se utiliza para cuantificar la ANA en μmol H₂ min⁻¹ g⁻¹ PS nódulo.

3.7. DETERMINACIÓN DE MHPP Y HPPA

La determinación de la concentración de MHPP y ácido 3-(4-hidroxifenil)propiónico (HPPA) se hizo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se utilizó un cromatógrafo líquido Waters 2690 con un detector dual de absorbancia Waters 2487 y una columna Tracel Excel 120 ODS TR-416345 (Teknokroma, Sant Cugat del Vallés, España). La detección de los compuestos se realizó a 220 nm y una temperatura de 30°C. Las muestras se separaron mediante gradiente a un flujo de 1ml/min con los siguientes eluyentes:

A. Buffer fosfato (1 mM H₃PO₄+ 5 mM K₂HPO₄) 788 ml / metanol 212 ml

B. Metanol

Gradiente:

Tiempo (min.)	% A	% B
0	90	10
20	50	50
23	50	50
24	90	10
32	90	10

3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para expresar los resultados de este estudio, se utilizó la media de las repeticiones y el error estándar. Los resultados se analizaron mediante el análisis de la varianza de un factor (ANOVA) tras comprobar la normalidad y la homogeneidad de varianzas por la prueba de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente, y aplicando una transformación en caso de no homogeneidad. Para las comparaciones de medias entre tratamientos se utilizó la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) y la prueba T3 de Dunnett.

El programa utilizado fue el software SPSS Statistics (IBM® versión 27). Las diferencias de medias se consideraron significativas a un nivel de significancia $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CRECIMIENTO DE RIZOBIOS EN VIDA LIBRE

Con el objetivo de determinar si el crecimiento en vida libre de los rizobios *R. leguminosarum* bv. *viciae* NLV8 y *E. meliloti* 2011 puede verse afectado por la presencia de los IN, se evaluó la capacidad de crecimiento de los rizobios en medio mínimo (MM) con diferentes concentraciones de DMPP y MHPP (5, 50 y 100 μ M).

Con fines comparativos, al no encontrar dosis recomendada en campo para el MHPP, se utilizaron las mismas concentraciones que el DMPP. Los resultados se obtuvieron mediante la medida de la absorbancia a 600nm (OD₆₀₀) en un colorímetro a diferentes tiempos hasta su fase estacionaria, o sea, hasta que el crecimiento se mantuvo en un nivel constante.

Tal y como muestra la Figura 8-A y B, para *R. leguminosarum* bv. *viciae* NLV8 no se observaron diferencias significativas al comparar crecimiento bajo las condiciones control con el crecimiento bajo las diferentes concentraciones de los IN, se percibe que la bacteria tiene un crecimiento semejante tanto en presencia de DMPP como de MHPP. El incremento de las absorbancias de ambos cultivos empieza de manera lenta a partir de 12h con OD₆₀₀≈0,21 y alcanzan en la fase exponencial una OD₆₀₀ de aproximadamente 0,95, momento en que empieza su fase estacionaria tras 48h de cultivo.

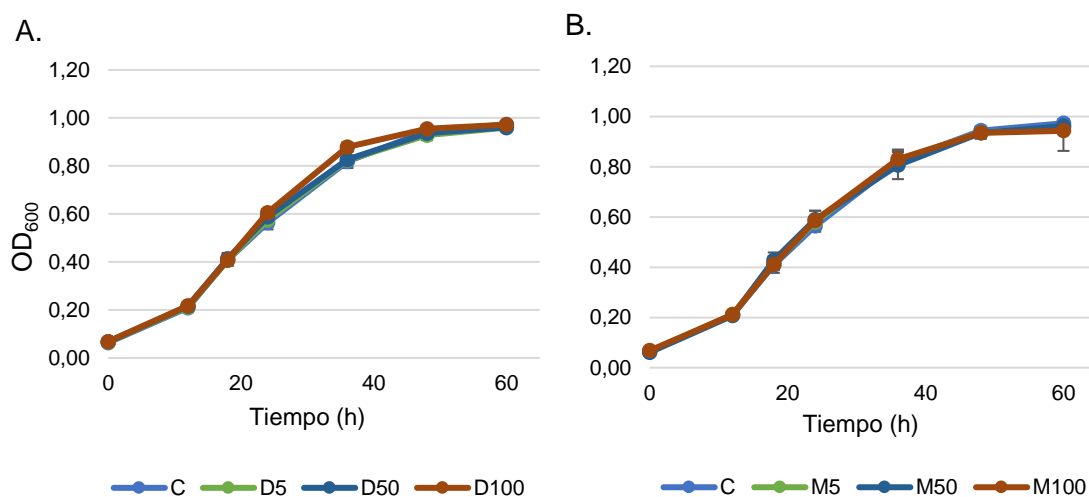


Figura 8-A. Crecimiento de *R. leguminosarum* bv. *viciae* NLV8 en MM con diferentes concentraciones de DMPP: C (control, sin IN); D5 (DMPP 5 μ M); D50 (DMPP 50 μ M); D100 (DMPP 100 μ M). **B.** Crecimiento de *R. leguminosarum* bv. *viciae* NLV8 en MM con diferentes concentraciones de MHPP: C (control, sin IN); M5 (MHPP 5 μ M); M50 (MHPP 50 μ M); M100 (MHPP 100 μ M). Las barras verticales representan el error estándar de las medias de tres réplicas correspondientes a tres experimentos independientes.

Las curvas de crecimiento de *E. meliloti* 2011 presentan valores similares a los obtenidos con *R. leguminosarum* bv. *viciae* NLV8, de manera que el incremento de absorbancias despunta a las 12h con una $OD_{600} \approx 0,28$ para DMPP y MHPP y su fase exponencial de crecimiento ocurre tras 12h a 36h de incubación, momento a partir del cual la población bacteriana empieza su fase estacionaria, con una $OD_{600} \approx 0,90$ tras 36h de cultivo (Figura 9-A y B). Sin embargo, para *E. meliloti* 2011, los dos cultivos bacterianos presentan una variación en el tiempo 36h, en que tanto para DMPP 5 μ M como para MHPP 5 μ M se observaron diferencias significativas al comparar con el control.

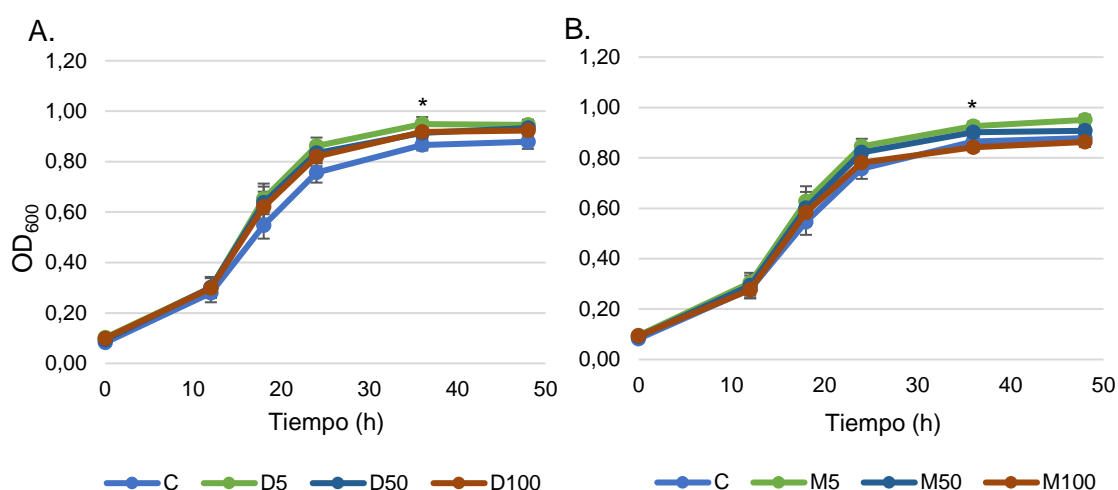


Figura 9-A. Crecimiento de *E. meliloti* 2011 en MM con diferentes concentraciones de DMPP: C (control, sin IN); D5 (DMPP 5 μ M); D50 (DMPP 50 μ M); D100 (DMPP 100 μ M). **B.** Crecimiento de *E. meliloti* 2011 en MM con diferentes concentraciones de MHPP: C (control, sin IN); M5 (MHPP 5 μ M); M50 (MHPP 50 μ M); M100 (MHPP 100 μ M). Las barras verticales representan el error estándar de las medias de tres réplicas correspondientes a tres experimentos independientes. El asterisco (*) representa diferencias significativas del IN respecto al control ($p \leq 0,05$).

Estos resultados permiten demostrar que *R. leguminosarum* bv. *viciae* NLV8 y *E. meliloti* 2011 pueden crecer en presencia de DMPP y también del MHPP. De esta manera, si ocurre algún problema en el establecimiento de la simbiosis, se considera que no es por los IN.

Con todo, no ha sido posible encontrar estudios donde analicen el crecimiento de las bacterias en vida libre junto a estos IN en concreto. Sin embargo, estudios realizados por Zacherl y Amberger (1990) demostraron que el inhibidor de la nitrificación diciandiamida (DCD) no inhibió el crecimiento y la respiración de las bacterias *R. leguminosarum* RL 1 tanto a dosis mínimas (200ppm), como en dosis máximas (400ppm). Sin embargo, el crecimiento bacteriano de *R. leguminosarum* y de *Azotobacter chroococcum* se vieron afectados al utilizar el inhibidor nitrapirina, de forma que a 100ppm hubo una inhibición significativa de 17% y 50% respectivamente.

4.1.1. Determinación de MHPP y DMPP en vida libre

Para completar el estudio microbiológico se recogieron alícuotas de los cultivos bacterianos descritos anteriormente a cada tiempo de medida de absorbancia (OD₆₀₀). A continuación, se determinaron las concentraciones de los IN mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para evaluar posibles efectos generados sobre los IN en el proceso de crecimiento de *R. leguminosarum* bv. *viciae* NLV8 y *E. meliloti* 2011.

Los primeros análisis del medio de cultivo a tiempo final de crecimiento de la bacteria mostraron que no se producían cambios en la concentración de DMPP durante el crecimiento, sin embargo, el MHPP se mantuvo indetectable en los cromatogramas, aunque estos presentaban un pico nuevo que aún no se había identificado. Por el tipo de molécula que es el MHPP, se propuso que lo más probable era de que este pico nuevo podría corresponder a una molécula de ácido 3-(4-hidroxifenil)propiónico (HPPA), teniendo en cuenta que estudios realizados por Subbarao et al., (2008) sintetizaron moléculas de HPPA a partir de MHPP. Finalmente, se pudo confirmar que el pico desconocido que aparecía en nuestros cromatogramas pertenecía a este compuesto.

Para *R. leguminosarum* bv. *viciae* NLV8, tanto la concentración del MHPP como del HPPA presentan diferencias significativas respecto al control. En la Figura 10-A se refleja la degradación del MHPP mientras que en la Figura 10-B la producción del HPPA. En MHPP, el tiempo que la bacteria degrada el inhibidor y lo transforma a HPPA no pasa de 15 minutos, que es el tiempo que se tarda en hacer la lectura OD₆₀₀, coger la alícuota y congelarla. De esta manera, en el tiempo 0h ya se indica presencia del ácido HPPA, y a las 24h de crecimiento de la bacteria ya no se observa el MHPP en el medio de cultivo, únicamente el HPPA, que sigue acumulando hasta la fase estacionaria de crecimiento de la bacteria (Fig. 10-A y B).

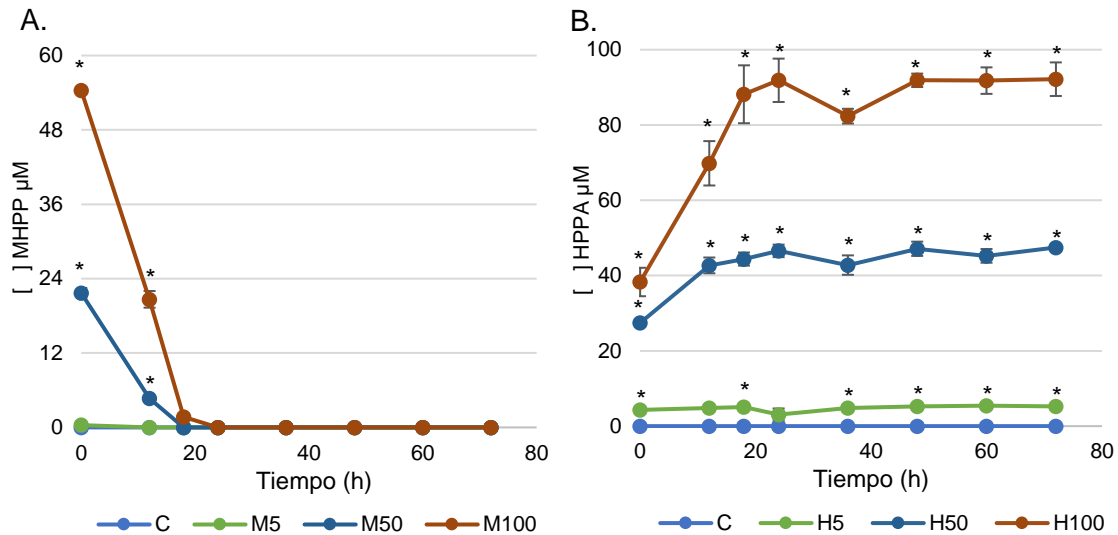


Figura 10-A. Concentración de MHPP de *R. leguminosarum* bv. *viciae* NLV8 cultivado en MM: C (control, sin IN); M5 (MHPP 5µM); M50 (MHPP 50µM); M100 (MHPP 100µM). **B.** Producción de HPPA a partir del MHPP de *R. leguminosarum* bv. *viciae* NLV8 cultivado en MM: C (control, sin IN); H5 (HPPA 5µM); H50 (HPPA 50µM); H100 (HPPA 100µM). Las barras verticales representan el error estándar de las medias de tres réplicas independientes. El asterisco (*) representa diferencias significativas del MHPP y del HPPA respecto al control ($p \leq 0,05$).

En el caso de *E. meliloti* 2011 también ocurre una disminución la concentración de MHPP al inicio del experimento a tiempo 0h, no obstante, la degradación del MHPP es más rápida que en *R. leguminosarum* bv. *viciae* NLV8: a 18h del inicio del crecimiento del cultivo ya no hay más presencia del inhibidor en todos los tratamientos. Al mismo tiempo, la concentración del HPPA crece de manera repentina entre 0h a 12h del inicio del experimento, momento en que se estabiliza la concentración hasta el final del experimento (Figura 11-A y B).

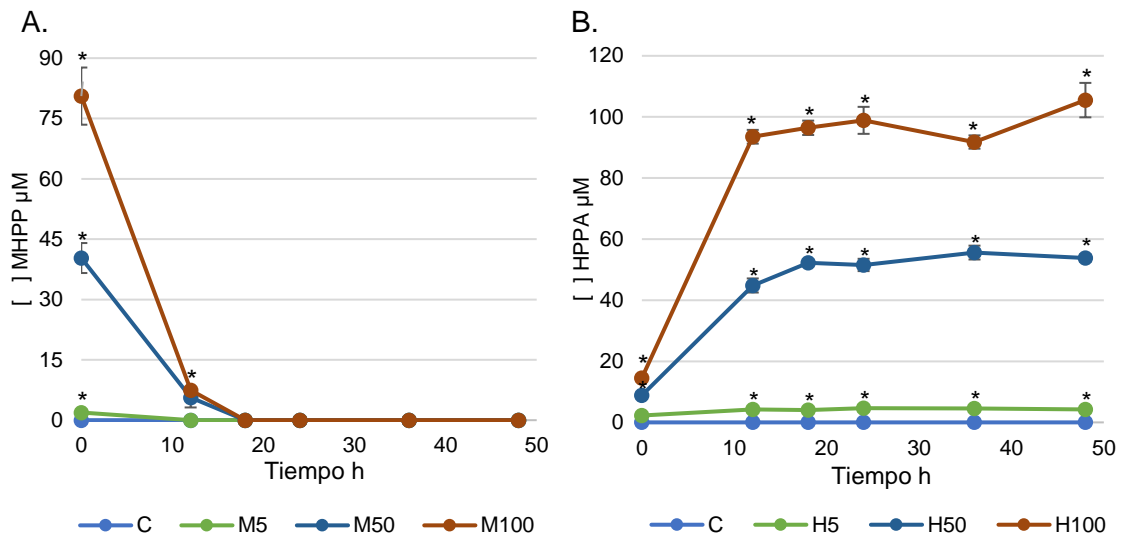


Figura 11-A. Concentración de MHPP de *E. meliloti* 2011 cultivado en MM: C (control, sin IN); M5 (MHPP 5µM); M50 (MHPP 50µM); M100 (MHPP 100µM). **B.** Producción de HPPA a partir del MHPP de *E. meliloti* 2011 cultivado en MM: C (control, sin IN); H5 (HPPA 5µM); H50 (HPPA 50µM); H100 (HPPA 100µM). Las barras verticales representan el error estándar de las medias de tres réplicas independientes. El asterisco (*) representa diferencias significativas del MHPP y del HPPA respecto al control ($p \leq 0,05$).

En las Figuras 10 y 11 se observa cómo va desapareciendo el MHPP y apareciendo el HPPA a lo largo del tiempo de crecimiento de las bacterias en MM con diferentes concentraciones de MHPP. De esta manera, lo más probable es que el inhibidor MHPP es degradado por acción de las bacterias y se transforma en HPPA, tanto para *R. leguminosarum* bv. *viciae* NLV8 como para *E. meliloti* 2011. Estudios realizados por Nardi et al., (2013), indican que el efecto del MHPP parece ser más breve y dependiente de la dosis.

De esta manera, al no encontrar estudios que comprueben esta acción por parte de las bacterias en los inhibidores biológicos, y con el fin de demostrar que el compuesto se degradaba por acción biológica, se evaluó por primera vez la estabilidad del compuesto MHPP en MM sin ninguna bacteria durante 96h. Como se observa en la Figura 12, el MHPP mantiene su concentración a lo largo del tiempo en ausencia de la bacteria.

Estos resultados permiten demostrar por primera vez que en el crecimiento en vida libre el MHPP se degrada por acción biológica y se convierte en el compuesto HPPA tras un periodo corto de tiempo. Comprobando lo que sugiere Nardi et al., (2013), que ocurre una descomposición microbiana del MHPP transcurrido 3 días de su aplicación.

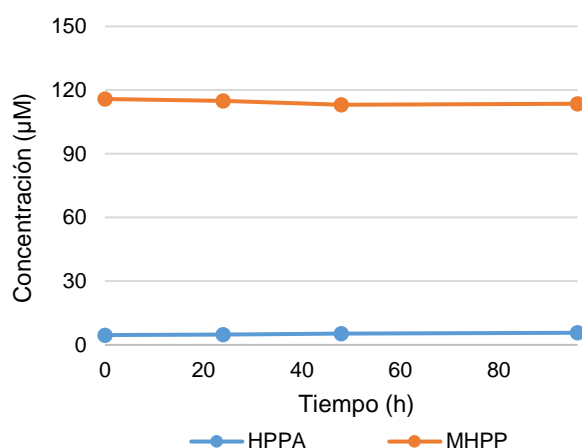


Figura 12. Estabilidad del compuesto MHPP en MM bajo las mismas condiciones de crecimientos de los rizobios durante 96 horas.

4.2. CULTIVO HIDROPÓNICO

Para evaluar si los IN pueden tener algún efecto negativo sobre el establecimiento de la simbiosis, así como en el desarrollo y funcionamiento de los nódulos, se crecieron en cultivo hidropónico plantas de guisante y alfalfa en simbiosis, las cuales fueron tratadas con diferentes dosis de dos IN. Los tratamientos aplicados fueron el control (C) al cuál no se le adicionó ningún IN, DMPP 5µM (D5), DMPP 50µM (D50), MHPP 5µM (M5), MHPP 50µM (M50), para cada cultivo.

Antes de la floración se determinaron parámetros indicativos del estado fisiológico de las plantas, tal como el CH, la biomasa, la clorofila, el número de nódulos y la ANA. Para un mejor entendimiento sobre el efecto que los IN tienen sobre las plantas, después de la cosecha las plantas fueron separadas en parte aérea (PA), raíz (R) y nódulos. Las figuras 13 y 14 muestran imágenes del crecimiento de PA y R de guisante y alfalfa con diferencia de una semana entre fotos.

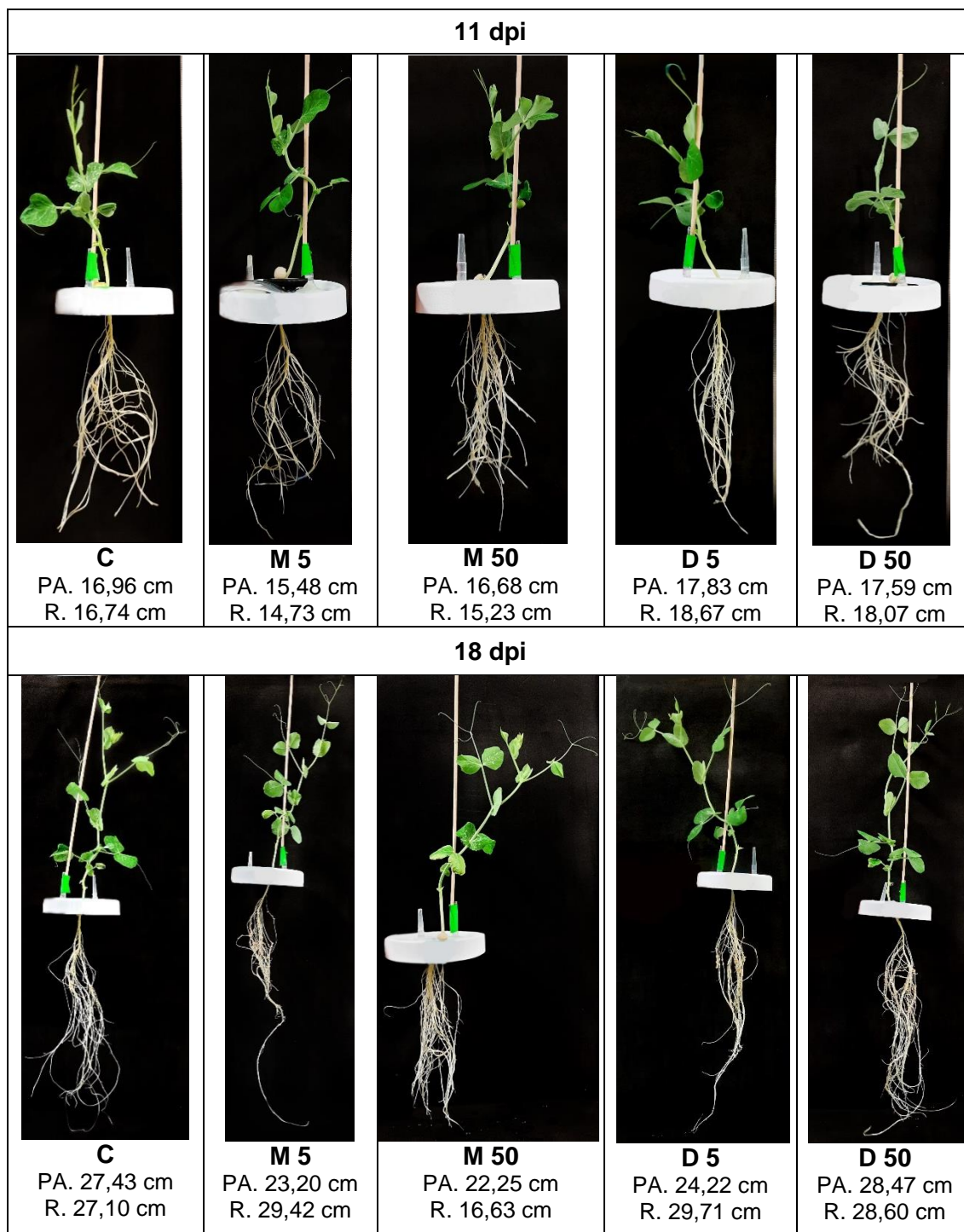


Figura 13. Fotos de guisante a los 11 y 18 días después de la inoculación (dpi) con diferentes concentraciones de DMPP y MHPP: C (control, sin IN); M5 (MHPP 5 μ M); M50 (MHPP 50 μ M); D5 (DMPP 5 μ M); D50 (DMPP 50 μ M). Al pie de las figuras se presentan la longitud (cm) de PA y R aproximada de cada planta. Imagen representativa de cada tratamiento.

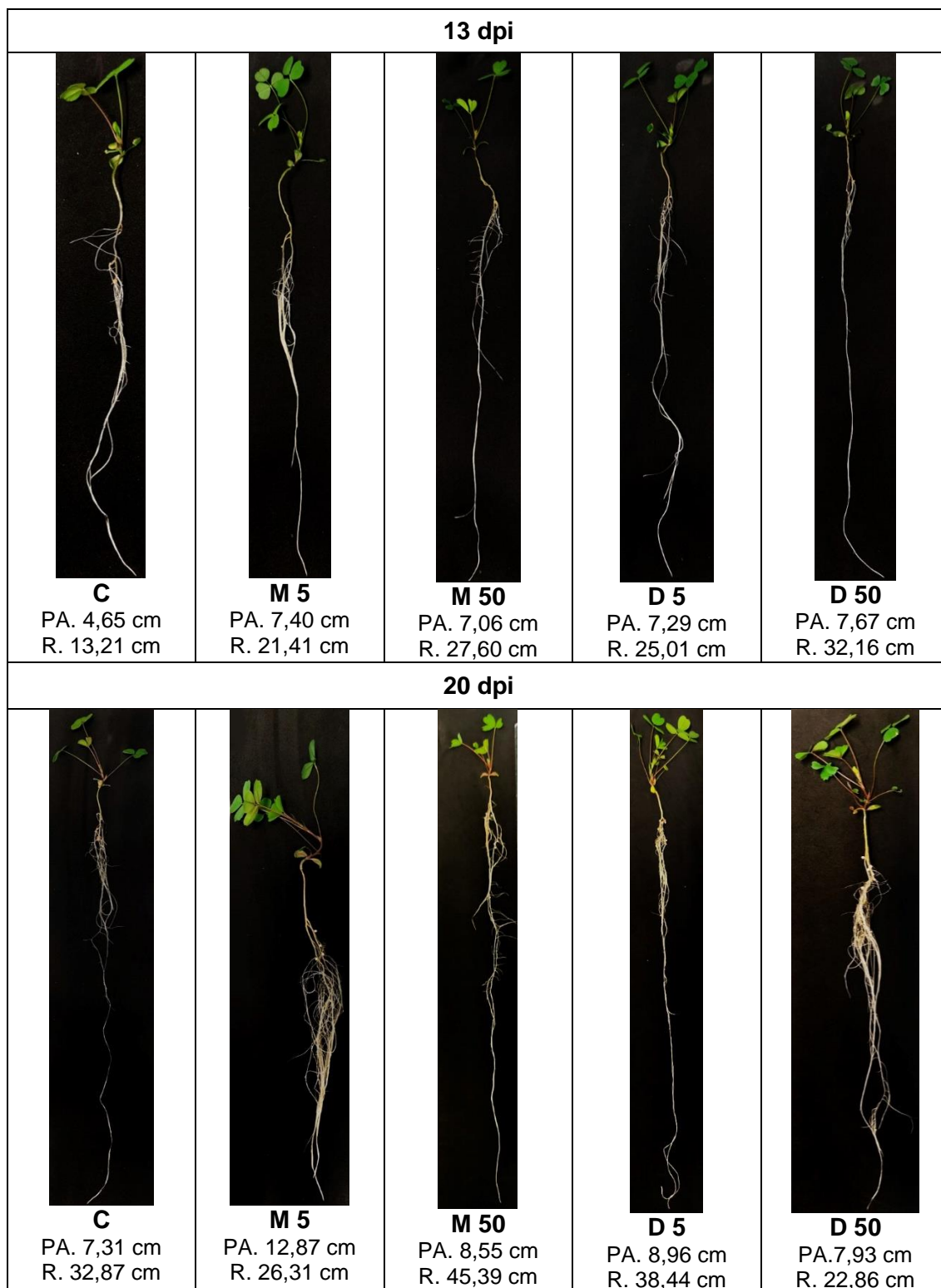


Figura 14. Fotos de alfalfa a los 13 y 20 dpi con diferentes concentraciones de DMPP y MHPP: C (control, sin IN); M5 (MHPP 5 μ M); M50 (MHPP 50 μ M); D5 (DMPP 5 μ M); D50 (DMPP 50 μ M). Al pie de las figuras se presentan la longitud (cm) de PA y R aproximada de cada planta. Imagen representativa de cada tratamiento.

Para guisante, de acuerdo con el software ImageJ, los tratamientos que presentaron mayor PA y R en relación al control a los 11 dpi fueron el D5 y el D50, mientras que los tratamientos con MHPP presentaron longitudes más bajas. A los 18 dpi, tras un ritmo de crecimiento acelerado en todos los tratamientos, el D50 presentó mayor PA y D5 mayor longitud de R en relación al control. El uso de M5 y D5 mejoró el desarrollo sobre las raíces primarias. Específicamente, el alargamiento de la raíz primaria de M50 se inhibió un 38% en relación al control, aunque ocurrió un incremento en raíces laterales.

Lo contrario ocurrió con alfalfa, a los 13 dpi todas las plantas tratadas con DMPP y MHPP presentaron mayor longitud de PA y R en relación al control. A los 20 dpi la PA de todos los tratamientos siguió presentando una mayor longitud en relación al control. Sin embargo, el alargamiento de las raíces M5 y D50 en relación al control, se inhibieron un 20% y en un 30% respectivamente.

Estudios realizados en plantas de *Perilla frutescens* y en *Arabidopsis*, demuestran que el uso del MHPP modula el desarrollo del sistema radicular, inhibiendo el alargamiento de raíces primarias y aumenta notablemente el crecimiento de raíces laterales de manera dependiente de la dosis (Liu et al., 2016; Ma et al., 2020). En conjunto, los resultados obtenidos en este experimento indican que el MHPP no sigue una regla, una vez que presentó longitudes distintas tanto en PA como en R en cada cultivo. Sin embargo, se puede señalar que el MHPP es capaz de modular la arquitectura del sistema radicular y también la fisiología radicular (Ma et al., 2020).

Tanto en guisante como en alfalfa, al utilizar el DMPP se observó un incremento en la longitud de las raíces primarias, bien como un incremento de raíces laterales. Martínez et al., (2017) al evaluar el contenido de N en las hojas, en la corona y en la raíz de plantas de fresa, comprobó que ocurrió un incremento en longitud en los tratamientos que llevaban el DMPP, incluso también observaron que en plantas con DMPP+NH₄⁺ resultó en un crecimiento significativo de raíces laterales.

Las figuras 15 y 16 presentan el resumen del crecimiento de las plantas al final de cada experimento. En guisantes (Fig. 15), el tratamiento D5 presentó mejor desarrollo y crecimiento de las hojas, sin embargo, los síntomas necróticos en los bordes de las hojas fueron evidentes en las plantas sometidas a M50. En alfalfa (Fig. 16), las plantas control y D5 presentaron un mejor desarrollo, mientras que en los tratamientos D50 y M50 se observó un síntoma de toxicidad en los bordes de las hojas.

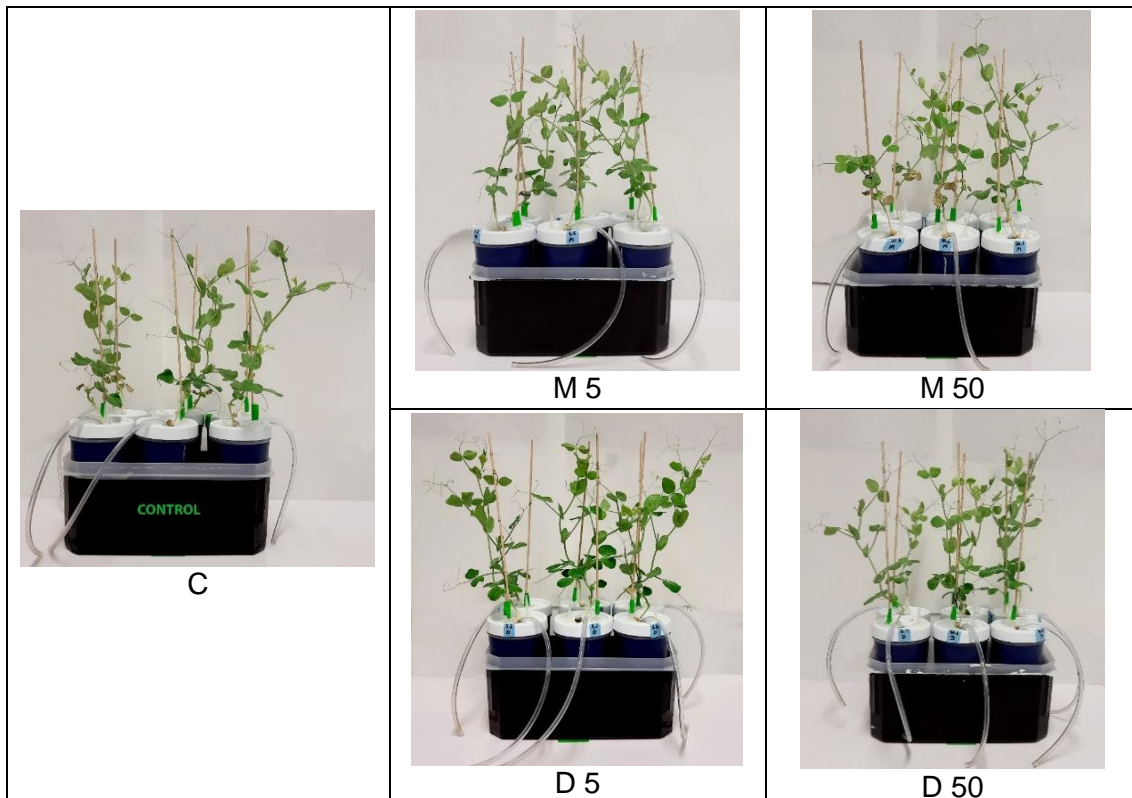


Figura 15. Cultivo hidropónico de guisante después de 25 dpi, cada foto representa las diferentes concentraciones de DMPP y MHPP: C (control, sin IN); M5 (MHPP 5 μ M); M50 (MHPP 50 μ M); D5 (DMPP 5 μ M); D50 (DMPP 50 μ M).

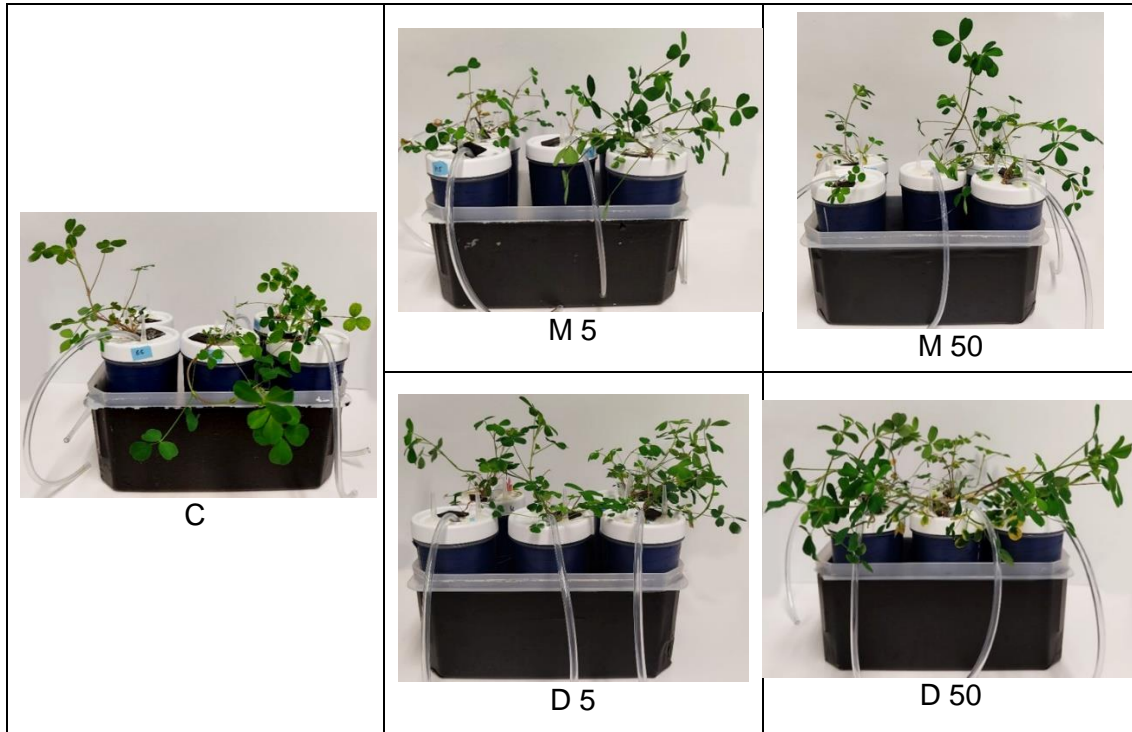


Figura 16. Cultivo hidropónico de alfalfa después de 40 dpi, cada foto representa las diferentes concentraciones de DMPP y MHPP: C (control, sin IN); M5 (MHPP 5 μ M); M50 (MHPP 50 μ M); D5 (DMPP 5 μ M); D50 (DMPP 50 μ M).

4.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO HÍDRICO Y BIOMASA

En este estudio, al ser un cultivo de crecimiento en hidropónico en que hay plena disponibilidad de agua, no se observaron diferencias significativas en el contenido hídrico (CH) de los diferentes tejidos muestreados en ambas especies (Figura 17-A y B), y los IN no producen ningún estrés osmótico a las plantas. Sin embargo, el CH del tratamiento D50 de la PA de alfalfa fue la excepción, presentando diferencias significativas respecto al control (Fig. 17-B).

Una posible explicación para este efecto sobre el CH de la PA de alfalfa puede ser debido a un estrés osmótico. Estudios realizados por Aydi et al., (2008), al utilizar Manitol en plantas de frijol en cultivo hidropónico, describieron que el estrés osmótico induce a cambios significativos en el contenido relativo de agua de la hoja en cultivos con amplia disponibilidad de agua, en el crecimiento y en la fijación simbiótica de N₂ en plantas estresadas.

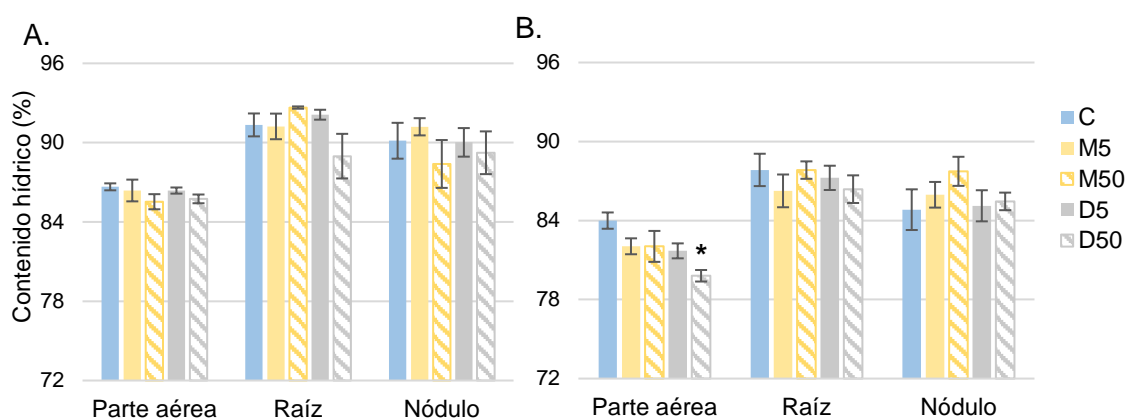


Figura 17. Efecto de los tratamientos DMPP y MHPP a diferentes concentraciones (0, 5 y 50 μM) sobre el contenido hídrico de las plantas de guisante (A) y alfalfa (B) para cada tejido (parte aérea, raíz y nódulos). C (control, sin IN); M5 (MHPP 5 μM); M50 (MHPP 50 μM); D5 (DMPP 5 μM); D50 (DMPP 50 μM). El asterisco (*) representa diferencias significativas del IN respecto al control ($p \leq 0,05$).

La Figura 18 presenta los valores de la biomasa total de cada cultivo. No se observaron diferencias significativas tanto para el guisante como para la alfalfa. Sin embargo, otros autores sí observaron un aumento en la biomasa, aunque utilicen N junto con los IN, como por ejemplo Liu et al., (2013), en que determinaron un aumento significativo en la biomasa después de utilizar el DMPP+N en cultivos de trigo y maíz, así como Osorio et al., (2020) en arándanos utilizando el DMPP+NH₄⁺. Sin embargo, otros autores no observaron una respuesta significativa con el uso del DMPP sobre la biomasa total de colza, trébol rojo y en las plantas de *Lotus japonicus* (Huérfano et al., 2015; Rodrigues et al., 2018; Rodrigues et al., 2019).

Al no presentar diferencias significativas en los resultados de guisante y alfalfa, se puede considerar como indicativo de que el IN no ha tenido un efecto

negativo, de lo contrario, las plantas serían más pequeñas y consecuentemente tendrían menos biomasa. Hasta el momento no se ha podido encontrar ninguna descripción a respecto al efecto que el MHPP tiene sobre la biomasa de los cultivos, aunque en este estudio se observa que el MHPP tiene acción semejante al DMPP tanto en cultivo de guisante como de alfalfa.

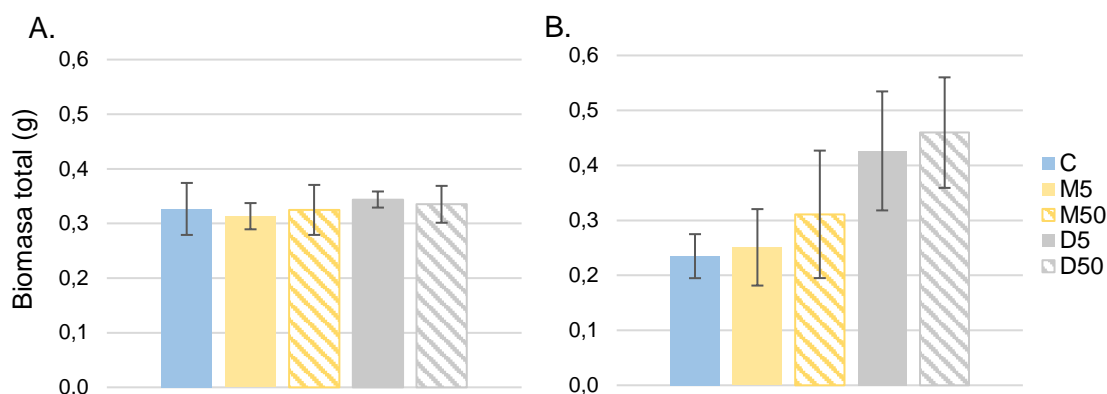


Figura 18. Acumulación de biomasa total de plantas de guisante (A) y alfalfa (B) expuestas durante 25 y 41 días a diferentes concentraciones de DMPP y MHPP: C (control, sin IN); M5 (MHPP 5µM); M50 (MHPP 50µM); D5 (DMPP 5µM); D50 (DMPP 50µM). El asterisco (*) representa diferencias significativas del IN respecto al control ($p \leq 0,05$).

4.4. NÚMERO DE NÓDULOS

Para evaluar el efecto de los IN en el proceso de nodulación de alfalfa y guisante tras la inoculación con *R. leguminosarum* bv. *viciae* NLV8 y *E. meliloti* 2011, respectivamente, se contó el número de nódulos en los diferentes tratamientos analizados (Figura 19).

Los primeros nódulos en guisante se observaron a los 11 dpi en todos los tratamientos menos en el de MHPP 50µM, que empezó a presentar nódulos tras 18 dpi. También se cuantificó el número de nódulos al final del experimento, a los 25 dpi. En todos los tratamientos hubo un aumento en el número de nódulos (Fig. 19-A). A 25 dpi el tratamiento que presentó mayor número de nódulos fue el D5, alrededor de 305 nódulos por planta. Sin embargo, tan solo el M50 demostró diferencias significativas en relación al control, presentando alrededor de 54 nódulos por planta.

Aunque los primeros nódulos de alfalfa se hicieron visibles 9 días después de la inoculación en todos los tratamientos, el incremento de nódulos transcurrió de forma lenta (Fig. 19-B). Sin embargo, en alfalfa no se observaron diferencias significativas en el número de nódulos entre plantas control y diferentes IN.

El efecto de los IN sobre el número de nódulos también se ha estudiado por otros autores, en los que han visto que el IN nitrapirina cuando se aplicó a bajas dosis ($2 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) produjo un incremento en el número de nódulos de alfalfa al final del período de crecimiento (Rice y Olsen, 1988). Resultados similares se

observaron utilizando la nitrapirina en soja (0,1 y 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) (Morris et al., 1980) y en el trébol subterráneo (5 y 15 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) (Chambers et al., 1980).

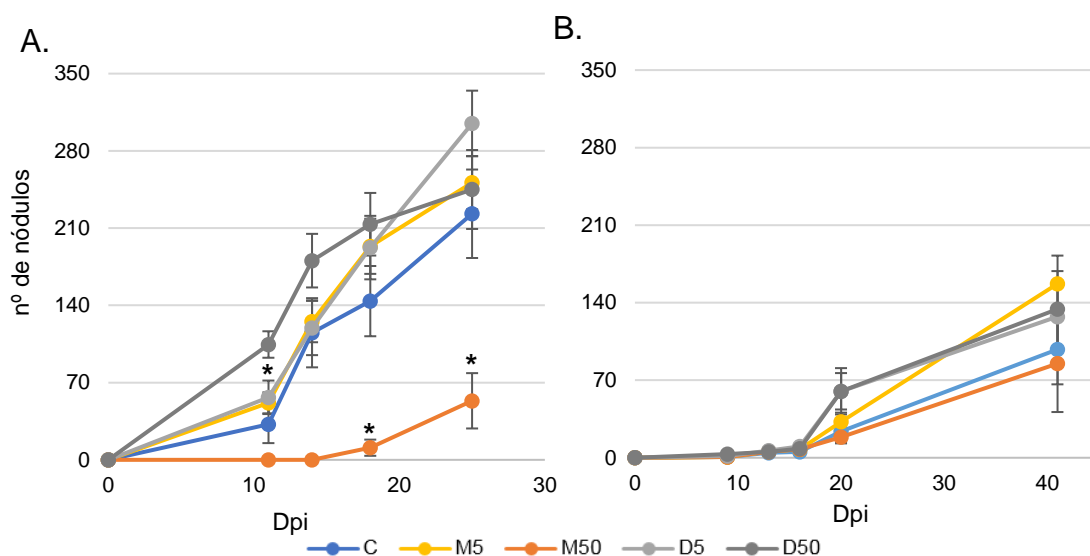


Figura 19. A. Número de nódulos de plantas de guisante a 11, 14, 18 y 25 dpi con *R. leguminosarum* bv. *viciae* NLV8 con diferentes concentraciones de DMPP y MHPP. **B.** Número de nódulos en plantas de alfalfa a 9, 13, 16, 20 y 41 dpi con *E. meliloti* 2011 con diferentes concentraciones de DMPP y MHPP. Dpi (días después de la inoculación); C (control, sin IN); M5 (MHPP 5 μM); M50 (MHPP 50 μM); D5 (DMPP 5 μM); D50 (DMPP 50 μM). El asterisco (*) representa diferencias significativas del IN respecto al control ($p\leq 0,05$).

4.5. CONTENIDO DE CLOROFILA

Una aproximación para evaluar el posible efecto de los IN sobre el funcionamiento de los nódulos es la determinación del contenido de clorofila, como reflejo del estado nitrogenado de las plantas.

En las condiciones de crecimiento en simbiosis de este estudio, tanto alfalfa como guisante, no presentaron diferencias significativas entre tratamientos y respecto al control (Figura 20- A y B). De esta manera, se entiende por los resultados obtenidos que no ocurre una deficiencia de N en las plantas, por tanto, los IN no afectan al funcionamiento de los nódulos.

Sin embargo, estudios realizados en plantas de fresa y de arándano crecidas con NH_4^+ y utilizando diferentes concentraciones de DMPP en la solución nutritiva, demostraron una mayor concentración de clorofila con la utilización del IN que en plantas sin ningún IN (Martínez et al., 2015; Osorio et al., 2020). Granja y Covarrubias (2018) también han informado de una tendencia similar para el aguacate y para la fresa. No obstante, el contenido de clorofila en *Perilla frutescens* fue más alto al utilizar el MHPP (Ma et al., 2020).

Todavía se hacen falta más investigaciones sobre el efecto del MHPP sobre el contenido de clorofila y sobre la fisiología de plantas, pero se observa que este inhibidor también actúa de manera semejante al DMPP en las dos especies estudiadas.

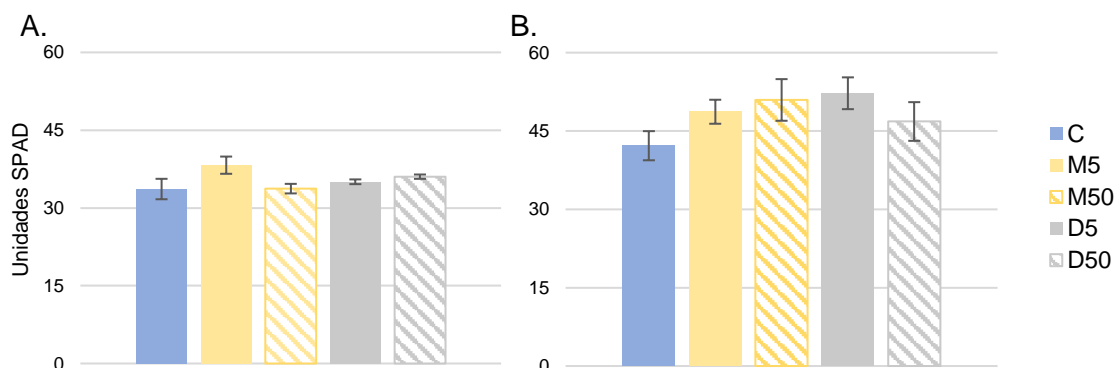


Figura 20. Contenido de clorofila de plantas de guisante (A) y alfalfa (B) crecidas bajo diferentes concentraciones de DMPP y MHPP (0, 5 y 50µM). C (control, sin IN); M5 (MHPP 5µM); M50 (MHPP 50µM); D5 (DMPP 5µM); D50 (DMPP 50µM). El asterisco (*) representa diferencias significativas del IN respecto al control ($p \leq 0,05$).

4.6. DETERMINACIÓN DE LA FBN: ACTIVIDAD APARENTE DE LA NITROGENASA

La fijación del N_2 atmosférico en los nódulos tiene lugar por el complejo enzimático nitrogenasa presente en los bacteroides. Una forma de cuantificar la FBN es por la actividad aparente de la nitrogenasa (ANA), que cuantifica el H_2 producido en los nódulos como una estimación de la cantidad de N_2 que es fijado por la planta.

La ANA de guisante y alfalfa se representa en la Figura 21-A y B. En el cultivo de guisante se observaron diferencias significativas para M50 en relación al control, sin embargo, no se observaron diferencias significativas para la alfalfa en los tratamientos DMPP y MHPP comparados al control.

El tratamiento M50 en guisante a pesar de tener menor número de nódulos presentó valores de ANA mayores que los obtenidos en el control ($4,03 \mu\text{mol } H_2 \cdot \text{min}^{-1} \text{ g.PS}_{\text{nod}}$ vs $1,52 \mu\text{mol } H_2 \cdot \text{min}^{-1} \text{ g.PS}_{\text{nod}}$, respectivamente).

Según Nardi et al. (2013), el efecto del MHPP depende de la dosis aplicada, en que una dosis más alta podría resultar más beneficiosa en la inhibición de la nitrificación. La ANA se vio afectada positivamente por la aplicación de MHPP a dosis máximas, lo que indica que existe un efecto positivo sobre la actividad metabólica nodular por el tratamiento con MHPP a altas concentraciones en el caso de guisante, que puede estar asociada a un aumento de la eficiencia de la nitrogenasa.

Una baja fijación de N_2 se puede relacionar con la baja nodulación (Muñoz-Azcárate, 2014), pero no es lo que ocurrió en este estudio, una vez que

en el experimento de guisante, el tratamiento que tuvo menor número de nódulos (MHPP 50 μ M) fue el que presentó una mayor fijación de N₂. Estos resultados sugieren que el tratamiento con MHPP a 50 μ M puede mejorar la ANA en plantas de guisante.

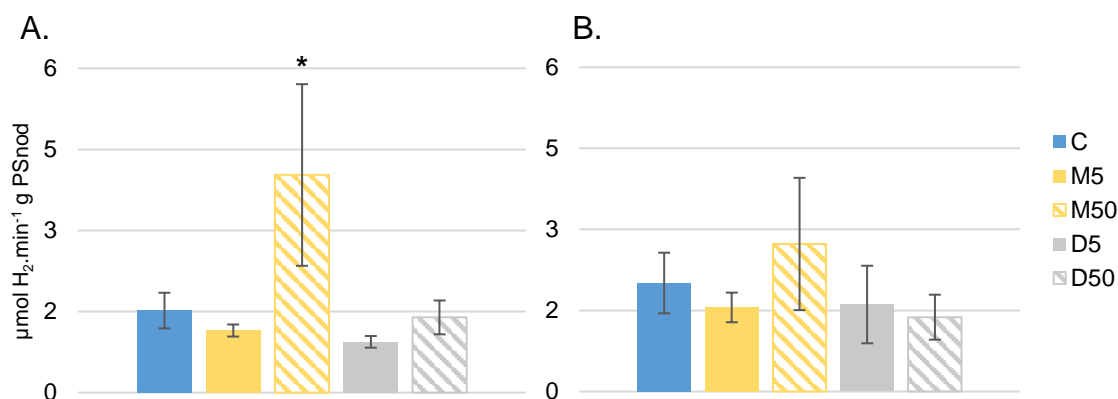


Figura 21. Efecto del uso de DMPP y MHPP a diferentes concentraciones (0, 5 y 50 μ M) en la actividad aparente nitrogenasa de guisante (A) y alfalfa (B) expresados por $\mu\text{mol H}_2 \cdot \text{min}^{-1} \text{ g PS}_{\text{nod}}$. El asterisco (*) representa diferencias significativas del IN respecto al control ($p \leq 0,05$).

A pesar de que, en alfalfa, esta tendencia no llegó a ser significativa, y el resultado parece ser muy variable y requiere ser verificado, este aparente incremento de FBN en presencia de M50 merece ser resaltado por su novedad. Las posibles razones de este incremento son inciertas, más aún puesto que el MHPP parece desaparecer rápidamente del medio en que se encuentra. De esta manera, es probable que el MHPP puede ser absorbido por las plantas y, o bien el propio MHPP, como sus posibles productos de degradación puedan estar modulando la FBN.

En general, los efectos de IN en guisantes y alfalfa en cultivo hidropónico comprobaron los resultados obtenidos en vida libre, en que los IN no afectan sobre la fijación de N₂, sobre el crecimiento y el establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa.

4.7. DETERMINACIÓN DE MHPP Y HPPA EN SOLUCIÓN NUTRITIVA

A fin de evaluar si el MHPP desaparecía de la solución nutritiva y si se producía el HPPA del mismo modo como ocurrió en vida libre, se recogieron alícuotas de la solución nutritiva en el último cambio de solución nutritiva de guisante y de alfalfa (tiempo 0h, 24h, 48h y 72h respectivamente) del tratamiento control (sin ningún IN), del MHPP 5 μ M y del MHPP 50 μ M.

Al igual que se percibió durante el crecimiento de los rizobios en vida libre, la concentración de MHPP en el sistema hidropónico no se mantuvo a un nivel

contante. En este sentido, se observaron diferencias significativas para guisante a tiempo 0h tanto para M5 como para M50 respecto al control (Figura 22- A y B). Transcurrido 24h del cambio de solución nutritiva, los niveles de MHPP disminuyeron en todos los tratamientos (M5 y M50) en la solución nutritiva. A las 48h ya era inexistente el inhibidor en la solución nutritiva.

El HPPA no tuvo una presencia tan significativa al final del experimento, una posible razón sería porque lo absorba o lo degrade la planta. Del mismo modo, la disminución del MHPP puede ser a causa de una posible degradación por la bacteria o incluso por una posible absorción del MHPP por la planta. Estos resultados van de acuerdo con lo que sugieren Nardi et al., (2013), que ocurre una descomposición microbiana del MHPP en el suelo a cabo de 3 de su aplicación.

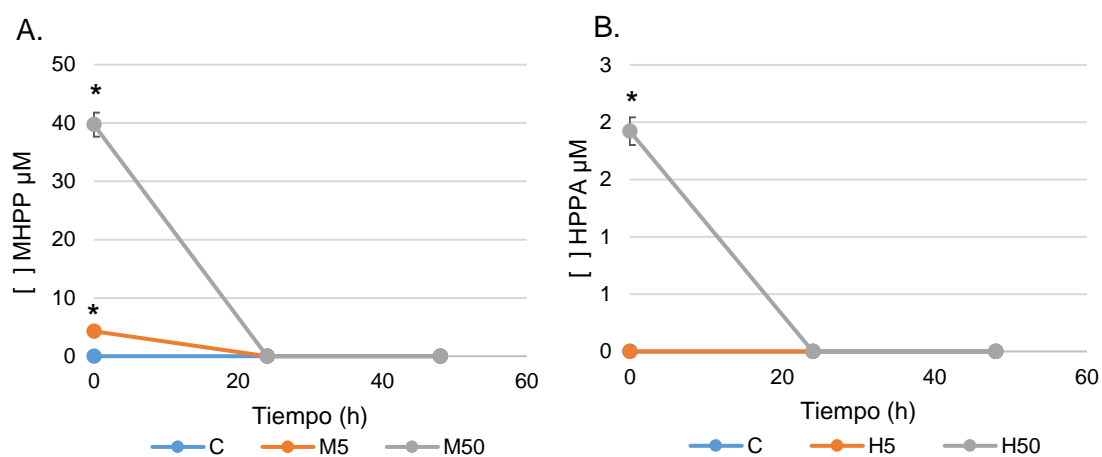


Figura 22-A. Concentración de MHPP en solución nutritiva de guisante cultivado en sistema hidropónico; C (control, sin IN); M5 (MHPP 5µM); M50 (MHPP 50µM). **B.** Producción de HPPA a partir del MHPP en solución nutritiva de guisante cultivado en sistema hidropónico; C (control, sin IN); H5 (HPPA 5µM); H50 (HPPA 50µM). Las barras verticales representan el error estándar de las medias de tres réplicas independientes. El asterisco (*) representa diferencias significativas del MHPP y del HPPA respecto al control ($p \leq 0,05$).

Para Alfalfa, tal cual como guisante, también se observaron diferencias significativas tanto para M50 como para H50 respecto al control. En la Figura 23- A y B se nota una reducción del MHPP a lo largo del tiempo, mientras ocurre una producción del HPPA. Ocurrió una reducción en ambos compuestos en la solución nutritiva, aunque al final de 72h todavía se pudo registrar MHPP a dosis máximas (M50).

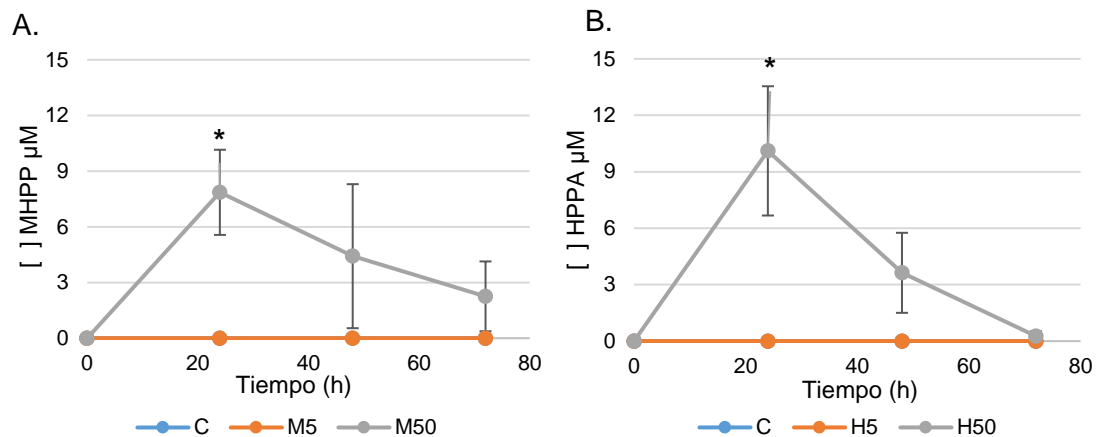


Figura 23-A. Concentración de MHPP en solución nutritiva de alfalfa cultivado en sistema hidropónico; C (control, sin IN); M5 (MHPP 5µM); M50 (MHPP 50µM). **B.** Producción de HPPA a partir del MHPP en solución nutritiva de alfalfa cultivado en sistema hidropónico; C (control, sin IN); H5 (HPPA 5µM); H50 (HPPA 50µM). Las barras verticales representan el error estándar de las medias de tres réplicas independientes. El asterisco (*) representa diferencias significativas del MHPP y del HPPA respecto al control ($p \leq 0,05$).

5. CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos a través del cultivo bacteriano permiten demostrar que *R. leguminosarum* bv. *viciae* NLV8 y *E. meliloti* 2011 pueden crecer en presencia de DMPP y de MHPP.
- Se presentan por primera vez resultados concretos que muestran que durante el crecimiento en vida libre de los rizobios el MHPP se degrada por acción biológica en el medio de cultivo y aparece un nuevo compuesto (HPPA) tras un periodo corto de tiempo.
- Los parámetros fisiológicos determinados en este estudio muestran que, en las condiciones aplicadas en este trabajo, los IN (DMPP y MHPP) no modifican el establecimiento de la simbiosis, así como el desarrollo y el funcionamiento de los nódulos en plantas de guisante y de alfalfa.
- Se comprobó que el MHPP desaparece de la solución nutritiva del cultivo hidropónico después de un periodo de tiempo, siendo un punto de interés para futuros estudios.
- Aunque el resultado obtenido al utilizar el MHPP sea muy preliminar, es necesario destacar el hecho de que, aparentemente, podría estimular la FBN, sin que existan evidencias de los potenciales mecanismos implicados.

6. BIBLIOGRAFÍA

Aldasoro, J. (2017). Disponibilidad hídrica y fijación de nitrógeno en leguminosas: fisiología, metabolismo y proteómica. [Tesis doctoral, Universidad Pública de Navarra]. E-Archivo. <https://academica-e.unavarra.es/handle/2454/27782>.

Annan, H., Golding, A. L., Zhao, Y., Dong, Z. (2012). Choice of hydrogen uptake (Hup) status in legume-rhizobia symbioses. *Ecology and evolution*, 2(9), 2285–2290. Doi: 10.1002/ece3.325.

Aparicio-Tejo, P.M., Arrese-Igor, C., Becana, M. (2013). Fijación biológica de nitrógeno. En: J., Azcón-Bieto, M., Talón, (Ed. 2), *Fundamentos de Fisiología Vegetal* (305-322). McGraw-Hill-Interamericana.

Arrese-Igor, C., González, E., Marino, D., Ladrera, R., Larrainzar, E., Gil-Quintana, E. (2011). Physiological response of legume nodules to drought. *Plant Stress*. 5. 24-31.

Asociación Española de Fabricantes de Alfalfa Deshidratada A.E.F.A (2020). *Balance final de la campaña 2019/20 de la alfalfa deshidratada*. <https://www.alfalfaspain.es/balance-final-de-la-campana-2019-20-de-la-alfalfa-deshidratada/>

Aydi, S. S., Aydi S., González, E., Abdelly, C. (2008). Osmotic stress affects water relations, growth, and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* plants. *Acta Physiologiae Plantarum*. 30. 441-449. Doi: 10.1007/s11738-008-0141-y.

Azani, N., Babineau, M., Bailey, C., Banks, H., Barbosa, A. R., Pinto, R. B., Boatwright, J. S., Borges, L., Brown, G., Bruneau, A., Cândido, E., Cardoso, D., Chung, K., Clark, R., Conceição, A., Crisp, M., Cubas, P., Delgado-Salinas, A., Dexter, K. G. ... Zimmerman, E. (2017). A new subfamily classification of the leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon*, 66(1), 44–77. Doi: 10.12705/661.3

Brito, B., Baginski, C., Palacios, J.M., Cabrera, E., Argüeso, T., Imperial, J. (2005). Biodiversity of hydrogenase systems from legume endosymbiotic bacteria. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 33-35. Doi: 10.1042/BST0330033

Burén, S., Jiménez-Vicente, E., Echavarri-Erasun C., Rubio L. M. (2020). Biosynthesis of nitrogenase cofactors. *Chem. Rev.* 120, 12, 4921–4968. Doi: 10.1021/acs.chemrev.9b00489

Canals, R. M., Peralta, J., Zubiri E. (2009). Flora Pratense y Forrajera Cultivada de la Península Ibérica. (*Medicago sativa* L.). Herbario de la Universidad Pública de Navarra. E-31006 Pamplona (Navarra) – España. [<http://www.unavarra.es/herbario/pratenses/htm/inicio.htm>].

Cassman, K. G., Dobermann, A. R., Walters, D. T. (2002). Agroecosystems, nitrogen-use efficiency, and nitrogen management. *Agronomy & Horticulture -- Faculty Publications*. 356.

Chambers, C. A., Smith, S. E., Smith, F. A., Ramsey, M. D., Nicholas, D.J.D. (1980). Symbiosis of *Trifolium subterraneum* with mycorrhizal fungi and *Rhizobium trifolii* as affected by ammonium sulphate and nitrification inhibitors. *Soil Biol. Biochem*, 12(2), 93–100. Doi: 10.1016/0038-0717(80)90042-5

- Coskun, D., Britto, D. T., Shi, W., Kronzucker, H. J. (2017). How plant root exudates shape the nitrogen cycle. *Trends in Plant Science*, 22(8), 661-673. Doi: 10.1016/j.tplants.2017.05.004.
- Corre-Hellou, G., Crozat, Y. (2005). N₂ fixation and N supply in organic pea (*Pisum sativum* L.) cropping systems as affected by weeds and pea weevil (*Sitona lineatus* L.), *European Journal of Agronomy*, 22(4), 449-458. Doi: 10.1016/j.eja.2004.05.005.
- Coste, S., Baraloto, C., Leroy, C. et al. (2010). Assessing foliar chlorophyll contents with the SPAD-502 chlorophyll meter: a calibration test with thirteen tree species of tropical rainforest in French Guiana. *Annals of Forest Science*. 67, 607. Doi: 10.1051/forest/2010020
- Dhall, R. K. (2017). *Pea Cultivation*. (Ed. 1), 22, PAU Printing Press, Ludhiana.
- Deakin, W., Broughton, W. (2009). Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. *Nat Rev Microbiol* 7, 312–320. Doi: 10.1038/nrmicro2091
- Delic D., Stajković O., Radović J., Stanojković A., Kuzmanović D., Rasulić N., Miličić B. (2010). Genotypic differences in symbiotic N₂ fixation of some alfalfa (*Medicago sativa* L.) genotypes. In: Huyghe C. *Sustainable use of Genetic Diversity in Forage and Turf Breeding*, 79-84. Doi: 10.1007/978-90-481-8706-5_9
- Denison, R. F., & Harter, B. L. (1995). Nitrate effects on nodule oxygen permeability and leghemoglobin (nodule oximetry and computer modeling). *Plant physiology*, 107(4), 1355–1364. Doi: 10.1104/pp.107.4.1355
- Downie, J. A. (2014). Legume nodulation. *Current Biology*, 24(5), R184–R190. Doi: 10.1016/j.cub.2014.01.028
- Embrapa. (2007). Diversidade e Taxonomia de Rizóbio. En: Vieira R. F. (cap 10), *Microbiota do solo e qualidade ambiental*, (165-192). Silveira e Freitas.
- FAOstat. (2021). FAOSTAT. Consultado en agosto de 2021 en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL>
- Ferguson, B. J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M.H., Lin, Y.H., Reid, D. E. (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52, 61-76. Doi: 10.1111/j.1744-7909.2010.00899.x
- Frink, C.R., Waggoner, P.E., Ausubel, J.H. (1999). Nitrogen fertilizer: retrospect and prospect. *Proc Natl Acad Sci*. Feb 16;96(4):1175-80. doi: 10.1073/pnas.96.4.1175.
- Gibson, K.E., Kobayashi, H., Walker, G.C. (2008). Determinantes moleculares de una infección crónica simbiótica. *Annu. Rev. Genet.* 42, 413 – 441. Doi: 10.1146/annurev.genet.42.110807.091427
- Granja, F., Covarrubias, J. (2018). Evaluation of acidifying nitrogen fertilizers in avocado trees with iron deficiency symptoms. *J Soil Sci Plant Nutr*, 18(1), 157–172. Doi: 10.4067/S0718-95162018005000702

Huérfino, X., Fuertes-Mendizábal, T., Duñabeitia, M. K., González-Murua, C., Estavillo, J. M., Menéndez, S. (2015). Splitting the application of 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP): Influence on greenhouse gases emissions and wheat yield and quality under humid Mediterranean conditions. *European Journal of Agronomy*, 64, 47-57. Doi: 10.1016/j.eja.2014.11.008

IPCC (2021) Climate Change 2021: The physical science basis. Contribution of working group I to the sixth assessment report of the intergovernmental panel on Climate Change. Cambridge University Press. In Press.

Kazmierczak, T., Yang, L., Boncompagni, E., Meilhoc, E., Frugier, F., Frendo, P., Bruand, C. Gruber, V., Brouquisse, R. (2020). Legume nodule senescence: a coordinated death mechanism between bacteria and plant cells. *Advances in Botanical Research*, 94, 181–212. Doi:10.1016/bs.abr.2019.09.013

Labhili, M., Joudrier, P., Gautier, M.F. (1995). Characterization of cDNAs encoding *Triticum durum* dehydrins and their expression patterns in cultivars that differ in drought tolerance. *Plant Science*, 12, 219-230. Doi: 10.1016/0168-9452(95)04267-9

Ladha, J.K., Pathak, H., Krupnik, T. J., Six, J., Van Kessel, C. (2005). Efficiency of fertilizer nitrogen in cereal production, retrospects and prospects. *Adv. Agron.*, 87, 85-156. Doi: 10.1016/S0065-2113(05)87003-8

Liew, L. C., Singh, M. B., Bhalla, P. L. (2014). Unique and conserved features of floral evocation in legumes. *Journal of Integrative Plant Biology*, 56(8), 714-728. Doi: 10.1111/jipb.12187

Liu, C., Wang, K., and Zheng, X. (2013). Effects of nitrification inhibitors (DCD and DMPP) on nitrous oxide emission, crop yield and nitrogen uptake in a wheat–maize cropping system, *Biogeosciences*, 10, 2427–2437, Doi: 10.5194/bg-10-2427-2013

Liu, Y., Wang, R., Zhang, P., Chen, Q., Luo, Q., Zhu, Y., Xu, J. (2016). The nitrification inhibitor methyl 3-(4-hydroxyphenyl) propionate modulates root development by interfering with auxin signaling via the NO/ROS pathway. *Plant Physiology*, 171(3), 1686–1703. Doi: 10.1104/pp.16.00670

Ma, J., Cao, Y., Sun, L., Li, Y., Ju, Q., Yang, X., Xu, J. (2020). Methyl 3-(4-hydroxyphenyl) propionate modulates plant growth and secondary metabolite accumulation by inducing metabolic changes in *Perilla frutescens*. *Plant Soil*, 453, 577–593. Doi: 10.1007/s11104-020-04625-x

Martínez, F., Palencia, P., Weiland, C.M., Alonso, D., Oliveira, J.A. (2015). Influence of nitrification inhibitor DMPP on yield, fruit quality and SPAD values of strawberry plants, *Scientia Horticulturae*, 185, 233-239. Doi: 10.1016/j.scienta.2015.02.004

Martínez, F., Palencia, P., Alonso, D., Oliveira, J. A. (2017). Advances in the study of nitrification inhibitor DMPP in strawberry, *Scientia Horticulturae*, 226, 191-200. Doi: 10.1016/j.scienta.2017.07.046.

Meena, R.S., Lal, R. (2018). *Legumes and Sustainable Use of Soils*. In: Meena R., Das A., Yadav G., Lal R. (eds) *Legumes for soil health and sustainable management*. Springer, Singapore. Doi: 10.1007/978-981-13-0253-4_1

Morris, D.R., Boonkerd, N., Vasuvat, Y. Effects of N-serve on soybeans and soil nitrogen transformations. *Plant Soil* 57, 31–39 (1980). Doi: 10.1007/BF02139639

Muñoz-Azcárate, O. (2014). *Metabolismo del azufre en la simbiosis Guisante-rhizobium*. [Tesis doctoral, Universidad Pública de Navarra]. E-Archivo. <https://academica-e.unavarra.es/handle/2454/29227>.

Nardi, P., Akutsu, M., Pariasca-Tanaka, J, Wissuwa M. (2013). Effect of methyl 3-4-hydroxyphenyl propionate, a Sorghum root exudate, on N dynamic, potential nitrification activity and abundance of ammonia-oxidizing bacteria and archaea. *Plant Soil*, 367, 627–637. Doi: 10.1007/s11104-012-1494-y

Oldroyd, G. E. D., Murray, J. D., Poole, P. S., Downie, J. A. (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual Review of Genetics*, 45(1), 119–144. Doi: 10.1146/annurev-genet-110410-132549

Oldroyd, G. (2013) Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol*, 11, 252–263. Doi: 10.1038/nrmicro2990

Osorio, R., Cáceres, C., Covarrubias, J.I. (2020). Vegetative and physiological responses of “Emerald” blueberry to ammoniacal sources with a nitrification inhibitor. *J Soil Sci Plant Nutr*, 20, 507–515. Doi: 10.1007/s42729-019-00135-7

Pecetti, L., Marcotrigiano, A. R., Russi, L., Romani M., Annicchiarico, P. (2019). Adaptation of field pea varieties to organic farming across different environments of Italy. *Crop and Pasture Science*, 70(4), 327. Doi: 10.1071/CP18216

Peralta, J., E. González. (2009). Leguminosas de Navarra. Herbario de la Universidad Pública de Navarra. E-31006 Pamplona (Navarra) – España. [http://www.unavarra.es/herbario/leguminosas/htm/inicio_L.htm].

Popp, C., Ott, T. (2011). Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(4), 458–467. Doi: 10.1016/J.PBI.2011.03.016

Powers, S.E., Thavarajah, D. (2019). Checking agriculture’s pulse: Field pea (*Pisum Sativum* L.), sustainability, and phosphorus use efficiency. *Front. Plant Sci.* 10, 1489. Doi: 10.3389/fpls.2019.01489

Radovic, J., Sokolovic, D., Marković, J. (2009). Alfalfa-most important perennial forage legume in animal husbandry. *Biotechnology in Animal Husbandry* 25, 465-475. Doi: 10.2298/BAH0906465R

Raza, S., Jiang, Y., Elrys, A. S., Tao, J., Liu, Z., Li, Z., Chen, Z., Zhou, J. (2021). Dicyandiamide efficacy of inhibiting nitrification and carbon dioxide emission from calcareous soil depends on temperature and moisture contents, *Archives of Agronomy and Soil Science*. Doi:10.1080/03650340.2021.1895432

Research and Markets. (2021). *Alfalfa Hay Market - Growth, Trends, COVID-19 Impact, and Forecasts (2021 - 2026)*. <https://www.researchandmarkets.com/>

reports/4520188/alfalfa-hay-market-growth-trends-covid-19?w=4&utm_source=BW&utm_medium=PressRelease&utm_code=8qvgfr

Rigaud, J., Puppo, A. (1975). Indole-3-acetic-acidcatabolism by soybean bacteroids. *J. Gen. Microbiol.* 88: 223-228.

Rice, W.A., Olsen, P.E. (1988). Dinitrogen fixation in soil and alfalfa nodules in the presence of nitrification inhibitors. *Soil Biology & Biochemistry*, 20(2), 245–249. Doi: 10.1016/0038-0717(88)90044-2

Robertsen, B.K., Åman, P., Darvill, A.G., McNeil, M., Albersheim, P. V. (1981). Host-symbiont interactions. The structure of acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. *Plant Physiol.*, 67, 389–400. Doi: 10.1104/pp.67.3.389

Rodrigues, J. M., Lasa, B., Aparicio-Tejo, P. M., González-Murua C., Marino D. (2018). 3,4-Dimethylpyrazole phosphate and 2-(N-3,4-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl) succinic acid isomeric mixture nitrification inhibitors: Quantification in plant tissues and toxicity assays. *Science of the Total Environment*, 624, 1180-1186. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.12.241

Rodrigues, J. M., Lasa, B., Betti, M., Fernández-Irigoyen, J., Santamaría, E., González-Murua, C., Aparicio-Tejo, P. M., Marino, D. (2019). Multi-omic and physiologic approach to understand *Lotus japonicus* response upon exposure to 3,4 dimethylpyrazole phosphate nitrification inhibitor, *Science of The Total Environment*, 660,1201-1209, Doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.01.047.

Ruser, R., Schulz, R. (2015). The effect of nitrification inhibitors on the nitrous oxide (N₂O) release from agricultural soils - a review. *J Plant Nutr Soil Sci* 178:171–188. Doi: 10.1002/jpln.201400251

Skizim, N. J., Ananyev, G. M., Krishnan, A., & Dismukes, G. C. (2012). Metabolic pathways for photobiological hydrogen production by nitrogenase- and hydrogenase-containing unicellular cyanobacteria *Cyanothece*. *The Journal of biological chemistry*, 287(4), 2777–2786. Doi: 10.1074/jbc.M111.302125

Subbarao, G.V., Nakahara, K., Ishikawa, T., Yoshihashi, T., Ito, O., Ono, H., Ohnishi-Kameyama, M., Yoshida, M., Kawano, N., Berry, W.L. (2008). Free fatty acids from the pasture grass *Brachiaria humidicola* and one of their methyl esters as inhibitors of nitrification. *Plant and Soil* 313: 89–99. Doi: 10.1007/s11104-008-9682-5

Subbarao, G.V., Nakahara, K., Ishikawa, T., Ono, H., Yoshida, M., Yoshihashi, T., Zhu, Y.Y., Zakir, H.A.K.M., Deshpande, S.P., Hash, C.T., Sahrawat, K.L. (2013). Biological nitrification inhibition (BNI) activity in sorghum and its characterization. *Plant Soil*. 366, 243–259. Doi: 10.1007/s11104-012-1419-9

Subbarao, G.V., Yoshihashi, T., Worthington, M., Nakahara, K., Ando, Y., Sahrawat, K.L., Rao, I.M., Lata, J.C., Kishii, M., Braun, H.J. (2015). Suppression of soil nitrification by plants. *Plant Sci.* 233, 155–164. Doi: 10.1016/j.plantsci.2015.01.012

Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., Murphy, A. (2015). *Plant Physiology and Development*. 6th Ed. Sinauer Associates Inc. Sunderland, MA (EEUU).

Trenkel, M. E. (2010). *Slow- and controlled-release and stabilized fertilizers: an option for enhancing nutrient use efficiency in agriculture*. (Ed. 2). Paris: International fertilizer industry association (IFA).

Udvardi, M., Poole, P. S. (2013). Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 781–805. Doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120235

Van Kessel, M., Speth, D., Albertsen, M. Nielsen, P., Op den Camp H., Kartal B., Jetten M., Lücker, S. (2015). Complete nitrification by a single microorganism. *Nature*, 528, 555–559. Doi: 10.1038/nature16459.

Vincent, J.M. (1970). *A manual for the practical study of root nodule bacteria*. Blackwell, Oxford and Edinburgh, pp.164.

Wang, X., Bai, J., Xie, T., Wang, W., Zhang, G., Yin, S., Wang, D. (2021). Effects of biological nitrification inhibitors on nitrogen use efficiency and greenhouse gas emissions in agricultural soils: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 220. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.112338.

Witty, F., J., Minchin, F., R. (1998). Methods for the continuous measurement of O₂ consumption and H₂ production by nodulated legume root systems. *J. Exp. Bot.* 49, 1041-1047.

Zacherl, B.; Amberger, A. (1990). Effect of nitrification inhibitors on N-fixing bacteria *Rhizobium leguminosarum* and *Azotobacter chroococcum*. *Fertilizer Research*, 22(3), 137–139. Doi: 10.1007/bf01120388