

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**



**Implicación de las poliaminas en la respuesta a la  
salinidad de la simbiosis rizobio-leguminosa**

**Programa de Doctorado Biología Fundamental y de Sistemas**

**Javier Hidalgo Castellanos**

**TESIS DOCTORAL**

**Granada 2019**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Javier Hidalgo Castellanos  
ISBN: 978-84-1306-300-3  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/56864>

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DEPARTAMENTO FISIOLÓGÍA VEGETAL**

Implicación de las poliaminas en la respuesta a la  
salinidad de la simbiosis rizobio-leguminosa

**JAVIER HIDALGO CASTELLANOS**

**TESIS DOCTORAL**

Granada 2019







## ABREVIATURAS

4-ABcad	4-aminobutilcadaverina
AAT	aspartato aminotransferasa
ABA	ácido abcísico
ACC	ácido 1-aminociclopropano-1- carboxílico
ADC	arginina descarboxilasa
AG	aminoguanidina
ANA	actividad nitrogenasa aparente
ANT	actividad nitrogenasa total
APX	arcorato peroxidasa
APX	ascorbato peroxidasa
AS	asparagina sintasa
ASC	ascorbato reducido
Asn	asparragina
Asp	aspartato
BHT	butilhidroxitolueno
BRs	brasinoesteroides
Cad	cadaverina
CAT	catalasa
CTE	coeficiente de transporte de electrones
D.O.	densidad óptica
DAB	3,3-diaminobencidina
DAO	diamino oxidasa
DHA	dehidroascorbato
DHAR	dehidroascorbato reductasa

dNTPs	cebadores de oligonucleótidos-dt
DTT	ditiotritol
EBL	24-Epibrassinolide
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético
E.E.	error estándar
EROs	especies reactivas del oxígeno
GABA	ácido $\gamma$ aminobutírico
Gln	glutamina
Glu	glutamato
GOGAT	glutamato sintasa
GPX	glutación peroxidasa
GR	glutación reductasa
GS	glutamina sintasa
GSH	glutation reducido
HKT	transportador $H^+ / K^+$
Homspd	homoespermidina
HTD	1,7-diaminoheptano
L.Orn	L-ornitina
L-Arg	L-arginina
LCOs	lipoquitoolisacáridos
Lys	lisina
MDA	malondialdehido
MDHAR	monodehidroascorbato reductasa
NBT	cloruro de nitrotetrazolio azul
NHX	antiporte $Na^+ / H^+$
NN	número de nódulos
ODC	ornitina descarboxilasa



PAO	poliamino oxidasa
PA <sub>s</sub>	poliaminas
PEG	polietilenglicol
PFN	peso fresco de nódulos
POX	peroxidasas
Pro	prolina
PSN	peso seco de nódulos
PSP	peso de la planta
PSPA	peso seco parte aérea
PSR	peso seco raíz
Put	putrescina
PVPP	polivinil-pirrolidona
RPA	relación raíz-parte aérea
SAMDC	S-adenosilmetionina descarboxilasa
SOD	superóxido dismutasa
Spd	espermidina
SPDS	espermidina sintasa
Spm	espermina
TCA	ácido tricloroacético
TFN	tasa de fijación de nitrógeno



# *ÍNDICE*



---

<b>I. Introducción.</b>	<b>1</b>
<b>1. Leguminosas.</b>	<b>3</b>
1.1. Descripción.	3
1.2. Importancia agraria.	3
1.3. Leguminosas de estudio: <i>M. truncatula</i> , <i>M. sativa</i> , <i>P. vulgaris</i> .	4
1.3.1. <i>Medicago truncatula</i> .	4
1.3.2. <i>M. sativa</i> .	4
1.3.3. <i>P. vulgaris</i> .	5
<b>2. Simbiosis rizobio-leguminosa.</b>	<b>5</b>
2.1. Fijación Biológica de Nitrógeno.	5
2.2. Importancia de la fijación biológica del nitrógeno.	6
2.3. Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas.	6
2.4. <i>Sinorhizobium meliloti</i> , <i>Rizobium tropici</i> .	7
2.5. Establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa.	8
2.6. Tipos de nódulos: determinados e indeterminados.	10
2.6.1. Nódulos indeterminados.	10
2.6.2. Nódulos determinados.	12
2.7. Funcionamiento del nódulo.	12
2.7.1. Complejo nitrogenasa.	12
2.7.2. Asimilación del amonio.	14
2.7.3. Metabolismo carbonado.	15
<b>3. Salinidad.</b>	<b>16</b>
3.1. Definición, importancia agrícola.	16
3.2. Efectos de la salinidad en plantas.	17
3.2.1. Daño osmótico.	17
3.2.2. Daño iónico.	17
3.2.3. Daño oxidativo.	18
3.3. Mecanismos de respuesta al estrés salino.	19

3.3.1. Osmoprotección.	19
3.3.2. Destoxificación iónica.	20
3.3.3. Sistemas antioxidantes.	21
3.4. Efecto del estrés salino sobre la simbiosis rizobio-leguminosa.	24
3.5. Tolerancia a la salinidad en la simbiosis rizobio-leguminosa.	25
<b>4. Poliaminas.</b>	<b>27</b>
4.1. Características, funciones y tipos.	27
4.2. Biosíntesis de poliaminas.	28
4.3. Catabolismo de poliaminas.	30
4.4. Regulación de los niveles de poliaminas.	30
4.5. Participación de las poliaminas frente al estrés salino.	32
4.6. Interacción entre poliaminas y otros reguladores de respuestas a estrés abiótico.	34
4.7. Poliaminas en la simbiosis rizobio-leguminosa.	36
<b>5. Brasinoesteroides.</b>	<b>37</b>
5.1. Metabolismo de brasinoesteroides.	38
5.2. Participación de los brasinoesteroides en estrés salino.	38
5.3. Brasinoesteroides en la simbiosis rizobio-leguminosa.	40
<b>II. Objetivos.</b>	<b>41</b>
<b>III. Diseño experimental.</b>	<b>45</b>
<b>1. Estudio comparativo de la implicación de las poliaminas en la respuesta a la salinidad de la simbiosis rizobio-leguminosa en nódulos determinados e indeterminados.</b>	<b>47</b>
1.1. <i>Implicación de las poliaminas en la respuesta a la salinidad en nódulos indeterminados de la simbiosis M. sativa-S. meliloti.</i>	47
1.2. <i>Implicación de las poliaminas en la respuesta a la salinidad en nódulos determinados de la simbiosis P. vulgaris-R. tropici.</i>	48
<b>2. Interacción entre poliaminas y brasinoesteroides en la respuesta a la salinidad de la simbiosis M. truncatula-S. meliloti.</b>	<b>49</b>
2.1. <i>Efecto de la aplicación exógena de 24-Epibrassinolide en la respuesta a la salinidad de la simbiosis M. truncatula-S. meliloti y su interacción sobre el metabolismo de poliaminas.</i>	50

2.2. Efecto de la aplicación exógena de poliaminas en la respuesta a la salinidad de la simbiosis <i>M. truncatula</i> - <i>S. meliloti</i> y su interacción sobre el metabolismo de brasinoesteroides.	51
<b>3. Estudio de la implicación de las poliaminas en la respuesta al estrés salino en la simbiosis <i>M. truncatula</i> – <i>S. meliloti</i>, mediante alteraciones en las rutas metabólicas de biosíntesis y oxidación.</b>	<b>52</b>
3.1. Efecto de la alteración de la biosíntesis de poliaminas en la respuesta a la salinidad en la simbiosis <i>M. truncatula</i> - <i>S. meliloti</i> .	53
3.2. Efecto de la inhibición de la oxidación de poliaminas en la respuesta a la salinidad en la simbiosis <i>M. truncatula</i> - <i>S. meliloti</i> .	54
<b>IV. Material y Métodos.</b>	<b>55</b>
<b>1. Material biológico.</b>	<b>57</b>
1.1 Microorganismos.	57
1.1.1. Medios de cultivo.	57
1.1.2. Crecimiento de las cepas bacterianas.	57
1.1.3. Conservación de las cepas bacterianas.	58
1.2. Material vegetal.	58
1.2.1. Solución nutritiva para plantas.	59
<b>2. Cultivo de plantas.</b>	<b>59</b>
2.1. Desinfección y germinación de las semillas.	60
2.2. Preparación del inóculo.	61
2.3. Siembra e inoculación.	61
2.4. Condiciones de la cámara de cultivo.	61
<b>3. Metodología empleada.</b>	<b>62</b>
3.1. Recolección de las plantas.	62
3.2. Actividad nitrogenasa.	62
3.3. Aislamiento de bacteroides.	63
3.4. Actividades enzimáticas.	64
3.4.1. Arginina descarboxilasa y ornitina descarboxilasa.	64
3.4.2. Cuantificación de la actividad diamino oxidasa y poliamino oxidasa.	65
3.4.3. Catalasa.	66

3.4.4. Superóxido dismutasa.	67
3.5. Determinaciones analíticas de poliaminas y compuestos nitrogenados.	68
3.5.1 Poliaminas.	68
3.5.2. Aminoácidos.	71
3.5.3. Prolina.	72
3.5.4. Proteína soluble.	72
3.6. Detección de peróxido de hidrógeno.	72
3.6.1. Detección cuantitativa.	73
3.6.2. Detección histoquímica.	73
3.7. Detección histoquímica de anión superóxido.	74
3.8. Peroxidación de lípidos de membrana.	74
3.9. Técnicas moleculares.	74
3.9.1. Análisis de la expresión génica.	74
3.10. Análisis estadístico.	78
<b>V. Resultados.</b>	<b>79</b>
<b>1. Estudio comparativo de la implicación de las poliaminas en la respuesta a la salinidad de la simbiosis rizobio-leguminosa en nódulos determinados e indeterminados.</b>	<b>81</b>
1.1. <i>Experimento 1: Implicación de las poliaminas en la respuesta a la salinidad en nódulos indeterminados de la simbiosis Medicago sativa - S. Meliloti.</i>	81
1.1.1. Análisis de crecimiento.	81
1.1.2. Fijación de nitrógeno.	82
1.1.3. Contenido de poliaminas en nódulo.	84
1.1.4. Contenido de poliaminas en las diferentes fracciones nodulares y en bacterias de vida libre.	84
1.1.5. Catabolismo de poliaminas.	86
1.1.6. Contenido de prolina.	87
1.1.7. Peroxidación lipídica.	87
1.1.8. Efecto de las poliaminas y salinidad en el establecimiento de la simbiosis.	88



1.1.9. Efecto de las poliaminas y salinidad en el crecimiento de <i>S. meliloti</i> .	89
1.2. <i>Experimento 2: Implicación de las poliaminas en la respuesta a la salinidad en nódulos determinados de la simbiosis Phaseolus vulgaris-Rhizobium tropici</i>	91
1.2.1. Análisis de crecimiento.	91
1.2.2. Fijación de nitrógeno.	91
1.2.3. Identificación y análisis de poliaminas en diferentes órganos de la planta.	92
1.2.4. Contenido de poliaminas en diferentes fracciones nodulares y en bacterias en vida libre.	95
1.2.5. Contenido de poliaminas solubles en nódulos.	96
1.2.6. Contenido de poliaminas conjugadas en nódulos.	96
1.2.7. Biosíntesis de poliaminas en nódulos: actividades arginina descarboxilasa y ornitina descarboxilasa.	98
1.2.8. Análisis de expresión de genes implicados en la síntesis de poliaminas.	99
1.2.9. Efecto del estrés salino en la expresión de genes implicados en la biosíntesis de poliaminas en nódulos.	100
<b>2. Interacción entre poliaminas y brasinoesteroides en la respuesta a la salinidad de la simbiosis <i>M. truncatula-S. meliloti</i>.</b>	<b>103</b>
2.1. <i>Experimento 1: Efecto de la aplicación exógena de 24-Epibrassinolide en la respuesta a la salinidad de la simbiosis M. truncatula-S. meliloti y su interacción sobre el metabolismo de poliaminas.</i>	103
2.1.1. Análisis de crecimiento.	103
2.1.2. Fijación de nitrógeno.	104
2.1.3. Niveles de poliaminas en nódulos y hojas.	105
2.1.4. Expresión de genes involucrados en la biosíntesis de poliaminas y brasinoesteroides.	107
2.1.5. Peroxidación lipídica.	109
2.1.6. Contenido de prolina.	110
2.1.7. Efecto de brasinoesteroides en el establecimiento de la simbiosis.	110

2.2. Experimento 2: Efecto de la aplicación exógena de poliaminas en la respuesta a la salinidad de la simbiosis <i>M. truncatula</i> - <i>S. meliloti</i> y su interacción sobre el metabolismo de brasinoesteroides.	113
2.2.1. Análisis de crecimiento.	113
2.2.2. Fijación de nitrógeno.	113
2.2.3. Niveles de poliaminas en nódulos y hojas.	114
2.2.4. Expresión de genes involucrados en la biosíntesis de brasinoesteroides.	116
2.2.5. Peroxidación lipídica.	118
2.2.6. Contenido de prolina.	118
2.2.7. Producción de peróxido de hidrógeno.	119
<b>3. Estudio del papel de las poliaminas en la respuesta al estrés salino en la simbiosis <i>M. truncatula</i> – <i>S. meliloti</i>, mediante alteraciones en las rutas metabólicas de biosíntesis y oxidación.</b>	<b>121</b>
3.1. Experimento 1: Efecto de la alteración de la biosíntesis de poliaminas en la respuesta a la salinidad de la simbiosis <i>M. truncatula</i> - <i>S. meliloti</i> .	121
3.1.1 Expresión del gen <i>Adc</i> de avena en plantas transformadas.	122
3.1.2. Efecto de la sobreexpresión del gen <i>Adc</i> y salinidad sobre el establecimiento de la simbiosis.	123
3.1.3. Visualización histológica de secciones transversales y longitudinales de nódulos.	123
3.1.4. Análisis de crecimiento.	124
3.1.5. Fijación de nitrógeno.	126
3.1.6. Contenido de poliaminas.	126
3.1.7. Catabolismo de poliaminas.	129
3.1.8 Contenido de peróxido de hidrógeno y actividad catalasa.	130
3.1.9. Determinación de aminoácidos en nódulo.	130
3.2 Experimento 2: Efecto de la alteración del catabolismo de poliaminas en la respuesta a la salinidad en la simbiosis <i>M. truncatula</i> - <i>S. meliloti</i> .	133
3.2.1. Análisis de crecimiento.	134
3.2.2. Fijación de nitrógeno.	135
3.2.3. Contenido de poliaminas en hojas y nódulos.	136

3.2.4. Catabolismo de poliaminas.	136
3.2.5. Peróxido de hidrógeno.	139
3.2.6. Anión superóxido.	141
3.2.7. Actividad catalasa y superóxido dismutasa.	141
3.2.8. Contenido de aminoácidos en nódulo.	142
3.2.9. Cinética nodulación.	142
<b>VI. Discusión.</b>	<b>145</b>
<b>1. Estudio comparativo de la implicación de las poliaminas en la respuesta a la salinidad de la simbiosis rizobio-leguminosa en nódulos determinados e indeterminados.</b>	<b>147</b>
1.1. Análisis de poliaminas en nódulos.	147
1.2. Catabolismo de poliaminas.	150
1.3. Expresión de los genes de biosíntesis de poliaminas.	150
1.4. Fijación de nitrógeno.	152
1.5. Crecimiento.	153
1.6. Contenido de prolina.	153
1.7. Estrés oxidativo.	154
1.8. Cinética de nodulación.	154
<b>2. Interacción entre poliaminas y brasinoesteroides en la respuesta a la salinidad de la simbiosis <i>M. truncatula</i>-<i>S. meliloti</i>.</b>	<b>155</b>
2.1. Crecimiento.	156
2.2. Fijación de nitrógeno.	156
2.3. Contenido de poliaminas.	157
2.4. Expresión de genes del metabolismo de poliaminas y brasinoesteroides.	158
2.5. Estrés oxidativo.	159
2.6. Contenido de prolina.	160
2.7. Cinética de nodulación.	160
<b>3. Estudio de la implicación de las poliaminas en la respuesta al estrés salino en la simbiosis <i>M. truncatula</i> – <i>S. meliloti</i>, mediante alteraciones en las rutas metabólicas de biosíntesis y de oxidación.</b>	<b>161</b>

## *Índice*

---

3.1. Crecimiento y fijación de nitrógeno.	161
3.2. Cinética nodulación.	163
3.3. Contenido de poliaminas.	164
3.4. Catabolismo poliaminas.	164
3.5. Peróxido de hidrógeno.	165
3.6. Aminoácidos relacionados con el metabolismo de poliaminas.	166
<b>VII. Conclusiones.</b>	<b>169</b>
<b>VIII. Bibliografía.</b>	<b>173</b>

# ***I- INTRODUCCIÓN***



## **1. Leguminosas.**

### **1.1. Descripción.**

Las leguminosas son plantas pertenecientes a la familia *Fabaceae*, con aproximadamente 20.000 especies repartidas en unos 700 géneros, son la tercera familia en número de especies entre las plantas superiores, con capacidad de adaptarse a todo tipo de condiciones ecológicas gracias a una gran variedad de estrategias (Smykal et al. 2015). Dentro de la familia *Fabaceae* existen 3 subfamilias: *Mimosioideae*, *Cesalpinioideae* (árboles y arbustos tropicales subtropicales) y *Papilionoideae*, formada por especies arbustivas y herbáceas que incluyen la mayoría de las especies cultivables (Doyle y Luckow 2003). Las leguminosas más comunes utilizadas en investigación pertenecen a la subfamilia *Papilionoideae*, como son el cacahuete (*Arachis hypogaea*), *Lotus* (*Lotus japonicus*), *Medicago* (*Medicago truncatula*), soja (*Glycine max*), judía común (*Phaseolus vulgaris*), guisante (*Pisum sativum*) y habas (*Vicia faba*) (Le et al. 2007).

### **1.2. Importancia agraria.**

Las leguminosas son la segunda familia en importancia agronómica después de las gramíneas (Gepts et al. 2005) clasificándose en dos grupos según su uso: forrajeras y de grano. La gran importancia de estos cultivos reside en su contenido de aminoácidos y proteínas, los mayores del reino vegetal, aportando a la dieta humana un tercio de las proteínas necesarias (Zhu et al. 2005). Esto es debido a su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico en simbiosis con bacterias diazótrofes del suelo, conocidas como rizobios. Esta importante característica hace de las legumbres piezas fundamentales en las rotaciones de cultivos ya que permiten la incorporación de nitrógeno orgánico al suelo (Mantri et al. 2013), reduciendo la necesidad de utilizar fertilizantes químicos. Otras características de estos cultivos que hacen que su importancia agraria sea remarcable son la producción de compuestos metabólicos secundarios que pueden proteger a la planta contra patógenos y plagas (Kudapa et al. 2013), así como la mejora de la calidad de los suelos degradados por la salinidad (Ferguson et al. 2013), mejorando su drenaje interno (Swanepoel y Tshuma 2017).

Las leguminosas favorecen, por tanto, un estado de fertilización natural del suelo ayudando a preservar la diversidad de la microflora del ecosistema edáfico (Peoples et al. 2009). Por otra parte, mediante el cultivo de leguminosas se puede recuperar para la agricultura zonas marginales, ya que son capaces de tolerar y adaptarse a diferentes estreses abióticos y bióticos, lo que permite su utilización en zonas castigadas por prácticas agrícolas abusivas o inadecuadas, que han provocado en los suelos cierto grado de salinización, desertificación o contaminación por insumos químicos (Dimkpa et al. 2009).

### **1.3. Leguminosas de estudio: *M. truncatula*, *M. sativa*, *P. vulgaris*.**

En este trabajo ha sido objeto de estudio las leguminosas *M. truncatula*, *M. sativa*, *P. vulgaris* por las características que se muestran a continuación:

#### **1.3.1. *Medicago truncatula*.**

Entre las leguminosas, *M. truncatula* está considerada como planta modelo para estudios genéticos y genómicos. Esto es debido a que presenta unas características únicas: genoma diploide ( $2n=16$ ) de pequeño tamaño (465 Mb/C), en contraste con otras leguminosas de interés agrícola que tienen genomas muy grandes o dotaciones cromosómicas mayores, su ciclo de vida es corto, presentan autofecundación, son de fácil transformación y existe una rica colección de mutantes y ecotipos (Tang et al. 2014a). *M. truncatula* forma nódulos indeterminados en simbiosis con *Sinorhizobium meliloti*, siendo una leguminosa de referencia para estudios de interés agrícola (Wang et al. 2010).

#### **1.3.2. *Medicago sativa*.**

Conocida comúnmente como alfalfa, es una planta muy cultivada por su pasto y forraje de gran calidad, con importante valor económico. Debido a su origen mediterráneo tiene gran capacidad para adaptarse a un amplio rango de condiciones climáticas y edáficas, presentando cierta tolerancia a la sequía y a la salinidad (Prosperi et al. 2006; Tang et al. 2014b). Estas características



hacen de la alfalfa una planta ideal para estudios bioquímicos y fisiológicos de leguminosas con importancia agraria en condiciones de estrés abiótico.

### **1.3.3. *Phaseolus vulgaris*.**

Originaria de América, la judía o frijol es una importante especie agraria, domesticada ya desde la antigüedad (6000 a.C.). Es una de las leguminosas de mayor importancia económica del mundo, ya que es una de las más consumidas al ser una importante fuente de proteínas y micronutrientes de origen vegetal (Castro-Guerrero et al. 2016). Es una de las leguminosas más promiscuas a la hora de establecer simbiosis con diferentes bacterias del género *Rhizobium*, entre ellas *R. tropici*, con las que forma nódulos determinados. Esta gran capacidad de nodular está relacionada con la variedad y cantidad de flavonoides que liberan sus exudados radiculares que actúan como señales de comunicación con los rizobios (Mart et al. 2003).

## **2. Simbiosis rizobio-leguminosa.**

La capacidad de establecer simbiosis con bacterias diazótrofes del suelo es sin duda una de las características que le confiere a las leguminosas un gran interés desde el punto de vista económico y ambiental por su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico.

### **2.1. Fijación Biológica de Nitrógeno.**

La atmósfera, es el mayor reservorio de nitrógeno en forma gaseosa ( $N_2$ ), sin embargo, no es utilizable por los vegetales, que sólo pueden tomar el nitrógeno por las raíces en forma de nitrato ( $NO_3^-$ ) o de amonio ( $NH_4^+$ ), siendo estos iones limitantes del crecimiento en determinadas condiciones ambientales. Existe un proceso mediante el que se produce la reducción de  $N_2$  atmosférico a  $NH_4^+$ , el cual es llevado a cabo por diferentes microorganismos y representa aproximadamente el 87% del nitrógeno atmosférico fijado en la naturaleza. Este proceso es conocido como Fijación Biológica de Nitrógeno (Bedmar 2006).

## **2.2. Importancia de la fijación biológica de nitrógeno.**

El nitrógeno es el principal nutriente limitante para el desarrollo vegetal. Gracias a la aplicación de fertilizantes nitrogenados de origen industrial, la agricultura mundial vivió un auge de producción a partir de los años 50 del siglo pasado (Vance 1998). Sin embargo, el uso de estos fertilizantes nitrogenados, combinados con otras acciones industriales y antropogénicas, ha alterado el ciclo natural del nitrógeno. La eficiencia de incorporación de nitrógeno en los cultivos es baja, por lo que el nitrógeno remanente en los suelos es utilizado por bacterias nitrificantes y desnitrificantes que contribuyen a las emisiones de  $N_2O$  y  $NO_x$ , lo que conlleva un aumento del efecto invernadero, la destrucción de la capa de ozono y lluvia ácida (Fowler et al. 2013). Así mismo, este exceso de nitrógeno contribuye a la contaminación por nitratos principalmente de aguas y suelos, dando lugar a diversos problemas medio ambientales y de salud humana (Du et al. 2007). A estos problemas hay que sumarle el altísimo coste energético que resulta de la producción de estos fertilizantes mediante el proceso Haber-Bosch, que obtiene la energía de combustibles fósiles con su consecuente contaminación ambiental (Jensen and Hauggaard-Nielsen 2003; Olivares et al. 2013).

Gracias al proceso de fijación biológica de nitrógeno se pueden usar técnicas agronómicas sostenibles que permiten reducir la aplicación de fertilizantes químicos nitrogenados, lo que conlleva una reducción del uso de energía y de emisiones de  $CO_2$  asociados a su fabricación (Jensen et al. 2012). Así mismo, se evita la acumulación de un exceso de nitratos en el suelo que pueden ser lixiviados y contaminar aguas. Además, la fijación biológica de nitrógeno mejora la calidad del suelo al favorecer una fertilización natural del mismo, preservando la microbiota edáfica (Peoples et al. 2009).

## **2.3. Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas.**

En la agricultura, la fijación biológica de nitrógeno está mayoritariamente relacionada con las especies de leguminosas, que establecen asociaciones simbióticas con rizobios. Esta asociación conocida como simbiosis rizobio-leguminosa, tiene como resultado la formación de nódulos en las raíces de las leguminosas, donde los rizobios se diferencian a bacteroides y se produce la reducción del nitrógeno atmosférico a amonio.

Además de la simbiosis rizobio-leguminosa, existen otros tipos de asociaciones entre bacterias fijadoras de nitrógeno y plantas, como por ejemplo bacterias del género *Frankia* que establecen asociaciones poco específicas, conocidas como actinorrizas, con raíces de plantas leñosas no leguminosas (K. Leary 2006). En gramíneas, también se han aislado endófitos diazotrofos de los géneros *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Gluconacetabacter*, *Herbaspirillum* y *Azoarcus* (Tejera N. Ortega 2006).

#### **2.4. *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium tropici*.**

Los rizobios (Fam. *Rhizobiaceae*) son bacterias gram-negativas, pertenecientes a los subgrupos  $\alpha$  y  $\beta$  de las Proteobacterias, con capacidad de fijar nitrógeno atmosférico en vida libre o en simbiosis. Normalmente viven en el suelo donde compiten como saprófitos con bacterias quimioheterótrofas (Sprent 1979). Su morfología es bacilar presentando un flagelo polar y entre dos y seis flagelos periféricos.

Los rizobios forman un grupo taxonómico muy heterogéneo cuya clasificación está en constante revisión, ya que está basada en criterios moleculares para ARNr16S y ARNr23S o para genes concretos relacionados con la fijación de nitrógeno (*nif*) o de nodulación (*nod*) ([www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia](http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia)).

*Sinorhizobium meliloti*, tiene la capacidad de inducir la formación de nódulos indeterminados en raíces de especies de los géneros *Medicago*, *Melilotus* y *Trigonella*. Presenta un crecimiento rápido y su genoma es relativamente pequeño. Este genoma consta de tres replicones: un replicón grande de 3,65 Mb y dos replicones más pequeños, pSymA y pSymB, de 1,35 y 1,68 Mb, respectivamente (Galibert et al. 2001), por lo que resulta óptimo para estudios genómicos. De hecho, fue el rizobio modelo que se utilizó para estudiar el proceso de nodulación a nivel genómico, e incluso la respuesta a diferentes condiciones de estrés (Djordjevic et al. 2003).

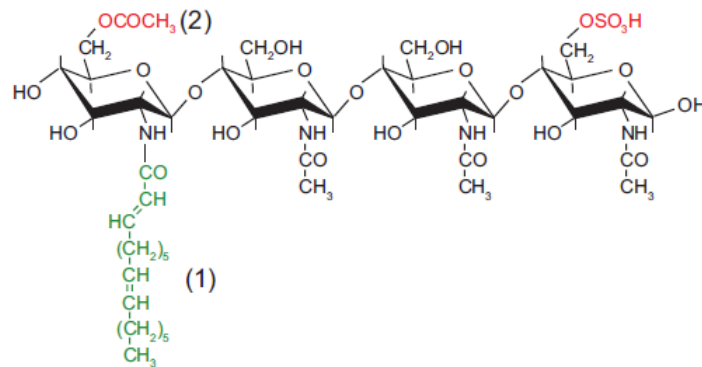
*R. tropici*, es el simbiote más común de *P. vulgaris* en suelos ácidos tropicales, induciendo en la planta la formación de nódulos determinados. También es capaz de nodular con gran variedad de leguminosas, en especial con especies del género *Leucaena* (del Cerro et al. 2017). Una característica importante es que *R. tropici* muestra una mayor estabilidad genética que las

otras especies de rizobios de judías, manteniendo sus propiedades simbióticas en condiciones de estrés. Se ha demostrado que la cepa CIAT 899 tolera diferentes tipos de estreses abióticos, incluyendo altas temperaturas, pH bajo o salinidad (Hungria et al. 2000).

## 2.5. Establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa.

El establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa consta de varias etapas:

**1. Preinfección**, consiste en una comunicación química entre la raíz de la planta y los rizobios presentes en la rizosfera, resultando en una quimioatracción. Este diálogo molecular se inicia con la liberación de compuestos fenólicos, principalmente flavonoides, en los exudados radiculares (Subramanian et al. 2006). Estos flavonoides inducen la expresión de genes *nod* en rizobios compatibles. La expresión de estos genes da lugar a la síntesis de moléculas de naturaleza oligopolisacárida (LCOs), conocidos como factores Nod (Maj et al. 2010). Los factores Nod presentan diversas estructuras moleculares que serán clave para la especificidad de la simbiosis (Supanjani et al. 2006). Los receptores específicos de la raíz para estos factores Nod transducen la señal, desencadenando diferentes respuestas en la epidermis radical que dará lugar al proceso de infección por parte del rizobio (Oldroyd 2013).

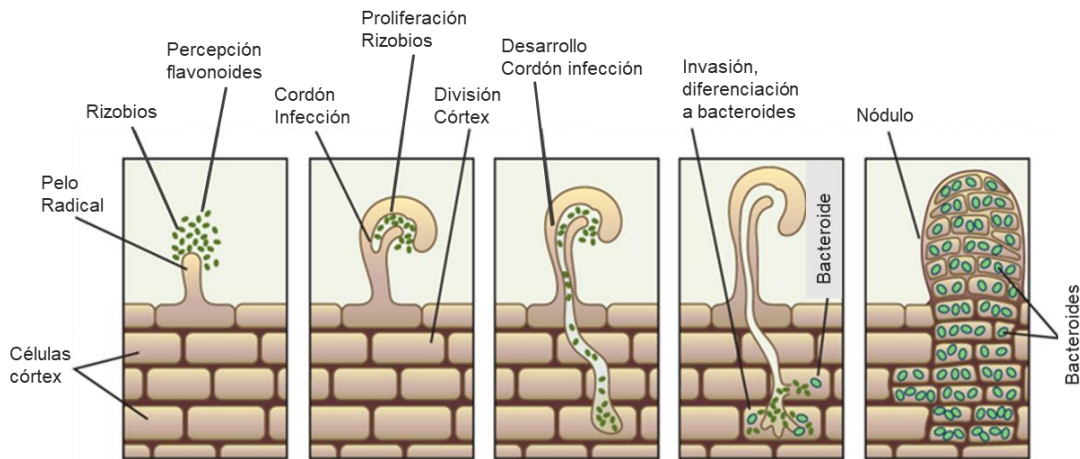


**Figura 2.5.a.** Factor Nod producido por *S. meliloti*. En negro esqueleto de residuos de N-Acetilglucosamina unidos por enlaces β 1-4, en verde (1) grupo acilo, en rojo (2) radicales de especificidad con el hospedador. Tomado de Oldroyd and Downie 2008.

**2. Infección**, los rizobios se adhieren a los pelos radicales mediante lectinas (Smit et al. 1992), estos comienzan a curvarse debido a respuestas provocadas por los factores Nod, como la despolarización de la membrana, un cambio en el flujo de iones calcio, una reorganización de los filamentos de actina y un aumento en las corrientes citoplasmáticas; quedando los rizobios atrapados por esta curvatura de los pelos radicales (“curling”) y estableciendo el punto de infección (Oldroyd y Downie 2008).

**3. Desarrollo del cordón de infección.** Este comienza con una invaginación de la membrana citoplasmática de los pelos radicales, por donde penetran los rizobios, quedando aislados del citoplasma de la célula hospedadora por una capa de material similar a la pared celular. El cordón de infección se prolonga a través de las células corticales de la raíz, por donde van avanzando los rizobios y dividiéndose (Fournier et al. 2015).

**4. Formación del primordio nodular**, al mismo tiempo que se produce la entrada de los rizobios en la raíz, se inicia la formación del primordio nodular, mediante la activación de la división de células del córtex de la raíz gracias a la expresión de genes *enod* que sintetizan nodulinas (Charon et al. 1999). El cordón de infección crece hasta alcanzar las células del primordio nodular, y por endocitosis los rizobios penetran en el citoplasma de dichas células quedando rodeados por una membrana de origen vegetal llamada membrana peribacteroidal (Coba de la Peña et al. 2018). Aquí es dónde los rizobios se diferencian a bacteroides, con capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, y forman un orgánulo llamado simbiosoma. Posteriormente el primordio nodular evolucionará a nódulo maduro (Maunoury et al. 2008).



**Figura 2.5.b.** Esquema de las etapas de formación de un nódulo indeterminado. Tomado y modificado de *Evolution (2007) Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

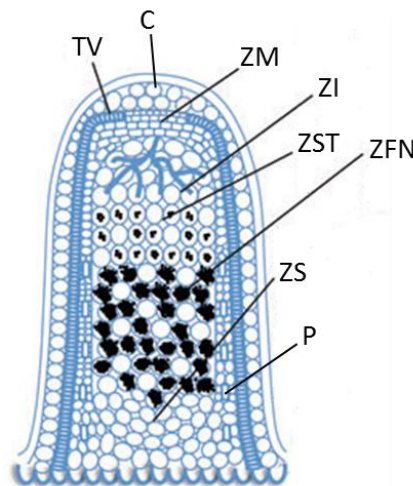
## 2.6. Tipos de nódulos: determinados e indeterminados

La evolución de los procesos de nodulación ha dado lugar a dos tipos de nódulos, indeterminados y determinados, existiendo diferencias en cuanto a su morfología y fisiología. Las diferencias más notables se refieren a su forma, presencia o ausencia de meristemo apical, a su organización histológica y anatómica, diferencias en el desarrollo del cordón de infección o en la vía de asimilación del nitrógeno y los metabolitos que exportan (Sprenst y James 2007).

### 2.6.1. Nódulos indeterminados.

Se dan en leguminosas de origen subtropical y de climas templados como los géneros *Medicago*, *Pisum*, *Vicia* o *Lupinus*. Estos nódulos se originan por la proliferación de las células internas del córtex de la raíz, dando lugar a un nódulo con forma cilíndrica debido a la presencia de un meristemo apical persistente. La exportación del nitrógeno fijado en estos nódulos se realiza en forma de amidas (Maunoury et al. 2008). El crecimiento longitudinal de este tipo de nódulos va a permitir la identificación de zonas perfectamente diferenciadas histológica y funcionalmente:

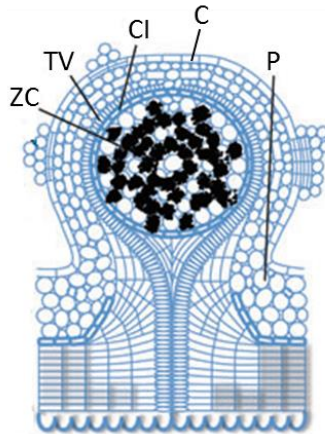
- **Zona I o Zona meristemática:** constituida por células en proliferación, donde se formarán los distintos tejidos del nódulo.
- **Zona II o Zona de infección:** aquí las bacterias siguen liberándose desde los cordones de infección. Las bacterias se rodean de la membrana peribacteroidal y se diferencian a bacteroides. Las células de esta zona suelen ser grandes y vacuoladas.
- **Interzona II y III:** en esta región del nódulo las células están en proceso de diferenciación. Se sintetiza la leghemoglobina que va a regular el flujo de  $O_2$  que llega a los simbiosomas. Los bacteroides se presentan elongados y con grandes amiloplastos, y comienzan la transcripción de genes relacionados con la nitrogenasa.
- **Zona III o Zona de fijación:** Se realiza la fijación de nitrógeno atmosférico en células que contienen bacteroides totalmente maduros. También existe una zona ineficiente formada por células no infectadas y que están encargadas del soporte metabólico de las células infectadas.
- **Zona IV o Zona de senescencia:** es la parte más próxima a la raíz. Es una zona de degeneración de bacteroides y células del nódulo. No presenta actividad fijadora de  $N_2$  (Berrabah et al. 2018).



**Figura 2.6.1.** Nódulo indeterminado: zona meristemática (ZM), zona de infección (ZI), zona de simbiosis temprana (ZST), zona de fijación de nitrógeno (ZFN), zona de senescencia (ZS), córtex (C), parénquima (P) y tejido vascular (TV). Imagen tomada y modificada de Ferguson et al. 2010.

### 2.6.2. Nódulos determinados.

Son típicos de leguminosas de origen tropical como *Glycine* (soja), *Phaseolus* (judía), *Vigna* o *Lotus*. Estos nódulos se originan por la proliferación de las células externas del córtex. No presentan un meristemo indeterminado, sino que las células se dividen en la zona central durante un periodo de 10 a 18 días después de la infección. A partir de este momento el nódulo solo crecerá por expansión de sus células adquiriendo su forma esférica. En la zona central encontramos células infectadas, donde se realizará la fijación de nitrógeno, y células no infectadas (células intersticiales), encargadas del mantenimiento del nódulo y de la asimilación y transporte de ureidos provenientes de la fijación de nitrógeno (Maunoury et al. 2008).



**Figura 2.6.2.** Nódulo determinado: córtex (C), parénquima (P), córtex interno (CI), tejido vascular (TV) y zona central (ZC) que incluye la zona fijadora de  $N_2$ . Imagen tomada y modificada de Ferguson et al. 2010.

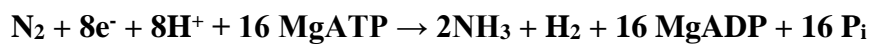
## 2.7. Funcionamiento del nódulo.

### 2.7.1. Complejo nitrogenasa.

En los bacteroides se sintetiza el complejo enzimático nitrogenasa, que cataliza la reducción de  $N_2$  a  $NH_4^+$ . Se encuentra exclusivamente en procariotas y es una enzima muy conservada en todas las bacterias diazótrofes (Smith 2002). La nitrogenasa es una enzima dependiente de molibdeno (Mo) cuya estructura es diferenciable en dos componentes proteicos: el componente reductor, conocido como ferro-proteína, y el componente catalítico



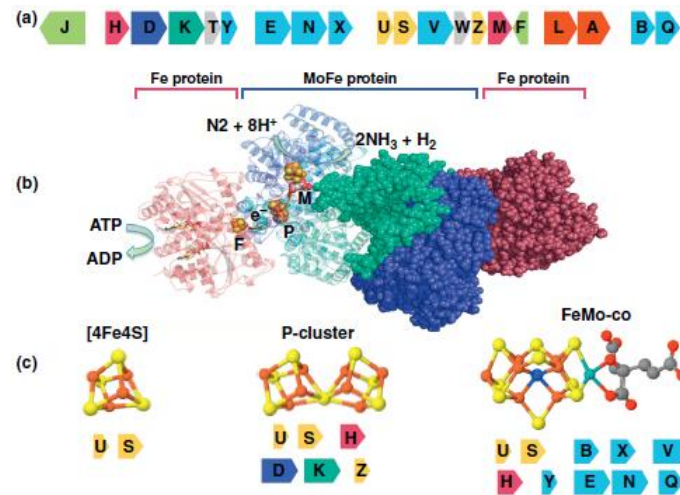
denominado proteína MoFe. La nitrogenasa contiene tres grupos metálicos, relacionados con la transferencia de electrones necesaria para la reducción de  $N_2$ . Uno de ellos, el FeMoco (cofactor Hierro-Molibdeno), se localiza en la ferro-proteína. El FeMoco proporciona el lugar catalítico para la reducción de  $N_2$ , y consta de Mo, Fe, S, un átomo central de carbono y homocitrato como motivo orgánico [Mo Fe<sub>7</sub> S<sub>9</sub> C-homocitrato]. Los restantes grupos metálicos son el centro activo [4Fe-4S] localizado en la ferro-proteína y grupo P [8Fe-7S] que está unido a la proteína MoFe. Estos dos grupos permiten la transferencia de electrones, procedentes de la ferredoxina o de la flavodoxina, hacia el sitio catalítico (FeMoco) (Oldroyd and Dixon 2014). Este proceso es dependiente del MgATP, requiriendo 2 MgATP por electrón transferido (Seefeldt et al. 2012). Debido a la complejidad bioquímica de la nitrogenasa son necesarios numerosos genes *nif* para su ensamblaje y funcionamiento (Oldroyd and Dixon 2014) (**Figura 2.7.1**).



La nitrogenasa en condiciones aeróbicas sufre un daño irreversible provocado por el  $O_2$ , debido a que los cofactores metálicos de la nitrogenasa son extremadamente sensibles al  $O_2$  (Curatti y Rubio 2014). Sin embargo, la fijación de nitrógeno requiere la utilización de grandes cantidades de energía en forma de ATP. Este ATP se obtiene mediante respiración mitocondrial por lo que las células infectadas de los nódulos han de adaptarse a condiciones de microaerobiosis para su correcto funcionamiento (Gordon et al. 1997). La nitrogenasa se protege del exceso de  $O_2$  principalmente mediante una barrera de difusión del oxígeno a la célula, en la que juega un importante papel la leghemoglobina. Esta leghemoglobina es una proteína férrica con alta afinidad por el  $O_2$ , que permite regular la difusión de este desde el citosol hasta el bacteroide en concentraciones adecuadas para poder llevar a cabo la respiración sin inhibir la nitrogenasa (Becana 2015).

Simultáneamente a la reducción de  $N_2$ , la nitrogenasa también cataliza la reducción de  $H^+$  a  $H_2$  que es liberado al exterior al no ser capaz el bacteroide de metabolizar este hidrógeno. Esto supone una pérdida de eficiencia enzimática de alrededor del 25% (Phillips 1980). Estos bacteroides, carentes de la capacidad de reciclar el  $H_2$  producido presentan un fenotipo *hup-*, sin

embargo existen cepas de rizobios *hup+* que son capaces de reciclar el H<sub>2</sub> gracias a una hidrogenasa [NiFe] de membrana que cataliza el paso de e<sup>-</sup> del H<sub>2</sub> al O<sub>2</sub> generando ATP (Palacios et al. 2005).



**Figura 2.7.1.** Estructura de la nitrogenasa y grupos de genes de biosíntesis. (a) genes de fijación de N<sub>2</sub> (*nif*). Genes estructurales nitrogenasa (*nifH*, *nifD*, *nifK*), genes de maduración ferro-proteína (*nifM*), genes biosíntesis FeMo-co (*nifY*, *nifE*, *nifN*, *nifX*, *nifV*, *nifB*, *nifQ*), genes de biosíntesis del grupo-P (*nifU*, *nifS*, *nifZ*), genes de transporte electrónico (*nifJ*, *nifF*), genes de regulación transcripcional (*nifL*, *nifA*), genes de función desconocida (*nifT*, *nifW*). (b) Estructura del complejo nitrogenasa y los centros activos: **F** (4Fe-4S), **P** (grupo-P), **M** (FeMo-co). Se muestra la hidrólisis de ATP por la ferro-proteína, la ruta de transferencia de electrones hacia la zona catalítica y la reacción enzimática. (c) estructura de los 3 centros activos de la nitrogenasa. Imagen tomada de Oldroyd y Dixon 2014.

### 2.7.2. Asimilación del amonio.

La asimilación de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, tóxico para la planta, ocurre en el citoplasma de las células del nódulo. El amonio se incorpora a ácidos orgánicos, que sirven de esqueletos carbonados para formar aminoácidos. En **nódulos indeterminados** el amonio se incorpora a asparragina (Asn) y glutamina (Gln), que son la forma en la que este nitrógeno fijado se transporta por el xilema (Scharff et al. 2003). Mientras que en **nódulos determinados** el amonio se incorpora inicialmente a Gln y aspartato (Asp). Posteriormente, en los amiloplastos se incorpora a purinas sintetizadas *de novo* para formar

xantina que será oxidada a ácido úrico, el cual es transportado a células no infectadas del nódulo donde es metabolizado a ureidos, principalmente ácido alantoíco y alantoína que serán exportados al xilema (Tajima et al. 2004).

Independientemente del tipo de producto nitrogenado que sea exportado al xilema, el  $\text{NH}_4^+$  fijado será asimilado por cuatro enzimas: glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT), ambas actúan como el ciclo GS/GOGAT catalizando la síntesis de Gln y glutamato (Glu). La incorporación del  $\text{N}_2$  reducido a Asp se produce gracias a la aspartato aminotransferasa (AAT) y a Asn vía asparragina sintasa (AS) (Vance 2008).

### **2.7.3. Metabolismo carbonado.**

La fijación biológica de nitrógeno es un proceso altamente costoso a nivel energético. Según la ecuación de reducción de  $\text{N}_2$  a  $\text{NH}_4^+$  se requieren 16 moléculas de ATP por molécula de  $\text{N}_2$  fijada. Esta energía proviene principalmente de la fotosíntesis. A través del floema los nódulos reciben sacarosa formada en la parte aérea. El bacteroide no puede utilizar la sacarosa directamente por lo que es hidrolizada en el citosol vegetal a monosacáridos por la sacarosa sintasa (SS). Esta enzima en el nódulo está muy ligada al proceso de fijación de nitrógeno, ya que se ha demostrado que aumenta su actividad en el momento que el nódulo maduro comienza su actividad fijadora y se ha formado la leghemoglobina (Schubert et al. 2011); en mutantes de guisante deficientes en esta enzima se ha comprobado que no fueron capaces de fijar  $\text{N}_2$  (Gordon et al. 1999). Las hexosas producidas (glucosa y fructosa) mediante glicolisis forman sucesivamente fosfoenolpiruvato (PEP), oxalacetato (OAA) y malato, que puede ser utilizado por los bacteroides como fuente de energía para la actividad nitrogenasa o entrar en los amiloplastos donde se utilizará como esqueleto carbonado para la biosíntesis de Asp. En los amiloplastos también se sintetiza Glu utilizando como esqueletos carbonados  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ KG) provenientes del ciclo de Krebs (Vance 2008), (Udvardi y Poole 2013).

### 3. Salinidad.

#### 3.1. Definición, importancia agrícola.

La salinidad se debe a la acumulación de sales minerales en los suelos y aguas en forma de electrolitos catiónicos como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ; y electrolitos aniónicos como  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$  (Manchanda y Garg 2008).

La salinidad del suelo afecta negativamente al desarrollo normal de las plantas, siendo uno de los principales factores ambientales que limita la productividad agrícola en regiones áridas y semiáridas del planeta. Se calcula que unos 45 millones de hectáreas de tierras cultivables, aproximadamente un 20% del total, están afectadas por la salinidad (Munns 2009). Resultando un serio problema para alcanzar el objetivo de aumentar la producción agraria en un 70% para el año 2050 (FAO 2009), que es lo que se necesitaría para satisfacer la demanda de una población mundial cercana a los 10.000 millones.

Las causas de la salinidad están relacionadas con varios factores: **1)** Acumulación de sales debido a la erosión de rocas con alto contenido en sales solubles como cloruros de sodio, de calcio o de magnesio, y en menor medida sulfatos, carbonatos y bicarbonatos, **2)** deposición de sales marinas arrastradas por el viento, lluvia o mareas, siendo el cloruro sódico la principal sal presente (Rengasamy 2006), estos dos factores son conocidos como **salinidad primaria**; **3)** actividades antropogénicas, como un mal uso de fertilizantes, riegos excesivos con agua con alto contenido en sales, sistema de drenaje deficientes en los cultivos, malas prácticas agrarias, deforestación, monocultivos o exceso de urbanización de los campos; todo ello altera el balance hídrico del suelo causando salinización (Abiala et al. 2018), estos factores causados por el hombre provocan la **salinidad secundaria**.

Como resultado, la salinidad afecta a las propiedades fisicoquímicas del suelo lo que conlleva un efecto adverso en el balance ecológico de la zona afectada, que a nivel agrario se traducirá en un descenso en la producción de los cultivos, así como una degradación del suelo cultivable (Hu y Schmidhalter 2004).

### 3.2. Efectos de la salinidad en plantas.

El estrés salino produce alteraciones en varios procesos fisiológicos y metabólicos; que dependerán de la severidad del estrés, la duración y de la capacidad tolerante de la planta (Hasanuzzaman et al. 2013). Los principales efectos fisiológicos de la salinidad sobre los vegetales están relacionados con una reducción del crecimiento producido, inicialmente, por un efecto osmótico, seguido por una toxicidad iónica y un desequilibrio nutricional debido a la interferencia de los iones salinos con los nutrientes. De forma secundaria el estrés salino desencadena un daño oxidativo (Gupta y Huang 2014).

#### 3.2.1. Daño osmótico.

Cuando las concentraciones de sales en la rizosfera aumentan por encima del nivel de tolerancia de la planta, se produce una reducción de la capacidad de absorción de agua por parte de las raíces, debido a una reducción del potencial hídrico del suelo, generando un estrés hiperosmótico que conlleva varios cambios a nivel fisiológico: **1)** reducción en la división y elongación celular, al decaer el turgor celular, **2)** disminución del área foliar y su capacidad fotosintética provocada por alteraciones en el transporte electrónico e inhibición de enzimas clave del ciclo de Calvin (Manchanda y Garg 2008), **3)** disrupción de las membranas, **4)** reducción de la capacidad de eliminar especies reactivas del oxígeno, **5)** cierre estomático debido a la reducción de la presión de turgor de las células estomáticas (Munns y Tester 2008).

#### 3.2.2. Daño iónico.

Otro de los efectos perjudiciales del estrés salino es la acumulación excesiva de iones procedentes de las sales disueltas, sobre todo  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  que provoca un desequilibrio iónico en la planta. Las alteraciones fisiológicas serán distintas dependiendo donde se acumulen los iones:

- En el **apoplasto** la célula sufrirá una deshidratación.
- En el **citoplasma** los iones tóxicos pueden inhibir enzimas esenciales del metabolismo celular.

-En los **cloroplastos** se produce un daño directo sobre el sistema fotosintético (Geissler et al. 2009).

La toxicidad iónica afecta al crecimiento de diferentes maneras, ya que produce un desequilibrio nutricional al competir los iones  $\text{Na}^+$  con iones esenciales como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^+$  (Tejera et al. 2006) que causan desordenes fisiológicos y estructurales graves, al ser el  $\text{K}^+$  es esencial para el crecimiento y desarrollo (Maathuis 2006).

El  $\text{Cl}^-$  es necesario para la regulación de ciertas enzimas en el citoplasma, además es un co-factor en la fotosíntesis e interviene en la regulación del pH celular (Hasanuzzaman et al. 2013). Sin embargo, la toxicidad por  $\text{Cl}^-$  altera el potencial de membrana reduciendo su funcionalidad, así mismo produce desequilibrios en la regulación de los gradientes de pH celular (Broadley y White 2001). También induce clorosis en hojas debido a que afecta a la producción de clorofila (McDonald et al. 2010).

### **3.2.3. Daño oxidativo.**

De forma secundaria, el estrés salino induce en la planta la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs) al producirse desequilibrios y roturas en la cadena de transporte de electrones en cloroplastos y mitocondrias, actuando el  $\text{O}_2$  como aceptor de electrones. Entre las EROs que se acumulan, destacan el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ), radical superóxido ( $\text{O}_2^\cdot$ ), oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ), ozono ( $\text{O}_3$ ), alcoxilo (RO), hidroperoxilo ( $\text{HO}_2$ ), peroxilo ( $\text{RO}_2$ ) (Anjum et al. 2012). Las EROs pueden producir un daño oxidativo en diferentes componentes celulares como ADN, proteínas y lípidos, produciendo alteraciones en las funciones celulares (Foyer y Noctor 2005). A nivel de proteínas, estos radicales son capaces de actuar sobre las cadenas laterales de residuos de aminoácidos, lo que cambia totalmente la estructura y la función proteica. Los ácidos grasos, en especial los fosfolípidos de membrana, son muy susceptibles a sufrir oxidación, generando peróxidos lipídicos. Esto conlleva la alteración de la fluidez, produce cambios en los transportadores y receptores de la membrana y el funcionamiento de la misma (Koca et al. 2007). Sobre el ADN, las EROs son capaces de romper y alterar las cadenas del ADN originándose mutaciones. Los radicales más reactivos son  $\text{OH}^\cdot$  y  $^1\text{O}_2$  que actúan a nivel de las bases de

nucleótidos, en especial sobre la guanina formando hidroxiguanina. Sin embargo,  $H_2O_2$  y  $O_2^-$  no reaccionan con las cadenas de ADN (Møller et al. 2007).

### **3.3. Mecanismos de respuesta al estrés salino en plantas.**

Las plantas han desarrollado diferentes mecanismos fisiológicos y bioquímicos para tolerar y crecer en ambientes salinos, de manera que, en base a su capacidad de adaptación frente a la sal, las plantas pueden clasificarse como halófitas (soportan condiciones salinas moderadas) y glicófitas (incapaces de tolerar la salinidad), perteneciendo la mayoría de los cultivos a este segundo grupo (Gupta y Huang 2014).

Las adaptaciones genéticas y distintas respuestas frente al estrés salino en las plantas, permiten identificar los mecanismos fisiológicos, genes implicados y sus productos en los mecanismos de tolerancia a la salinidad, siendo una herramienta muy útil para la incorporación a los cultivos de variedades más tolerantes a la salinidad, como se ha comprobado en *M. truncatula* y *L. japonicus* condiciones de estrés hídrico (Sańko-Sawczenko et al. 2019).

#### **3.3.1. Osmoprotección.**

La acumulación de sales en el interior de la vacuola provoca un gradiente osmótico que se controla mediante la síntesis y acumulación de solutos orgánicos moleculares (solutos compatibles) en el citosol (Munns y Tester 2008). Este ajuste osmótico permite mantener el volumen y turgencia celular, evitando la deshidratación celular, estabilizando y protegiendo la estructura de membranas y proteínas (Rhodes et al. 2004).

Los solutos compatibles son compuestos de bajo peso molecular, sin carga eléctrica, altamente solubles en agua y compatibles con la actividad metabólica de la célula. Entre los solutos compatibles más destacados se encuentran azúcares (sacarosa, glucosa, trealosa), polioles (sorbitol, manitol, pinitol), glicina-betaina, prolina (Pro) y otros aminoácidos (Hasegawa et al. 2000).

La acumulación de **Pro** está considerada como una respuesta metabólica a determinados tipos de estrés (Demir y Oztürk 2003), actuando como mediador de ajuste osmótico en salinidad (Yamchi et al. 2007). Sin embargo, en algunas plantas la concentración de Pro no es lo suficientemente elevada en condiciones de estrés, por lo que podría estar relacionada con otras funciones, como estabilizar estructuras celulares, activar respuestas específicas a la salinidad actuando como molécula señal o eliminar radicales libres (Maggio et al. 2002) (Anamul Hoque et al. 2007).

### **3.3.2. Destoxificación iónica.**

Las plantas tienen la capacidad de limitar el exceso de iones mediante dos mecanismos: evitando la entrada de iones tóxicos en el vegetal y contrarrestando la concentración de iones tóxicos en el citosol (Hasanuzzaman et al. 2013).

Para la supervivencia de la planta es esencial mantener la homeostasis iónica en el citoplasma celular. El equilibrio intracelular entre  $K^+$  y  $Na^+$  es esencial para la actividad de muchas enzimas citosólicas, para mantener el potencial de membrana y el potencial osmótico (Zhu 2003).

Al ser  $Na^+$  el principal ion tóxico, es vital un sistema de exclusión y compartimentación de este catión. Se han estudiado sistemas de transportadores de  $Na^+$  en la membrana plasmática (Gupta y Huang 2014). En estudios con *A. thaliana* estos transportadores están codificados por genes pertenecientes a la familia SOS (Salt Overly sensitive). La ruta de señalización SOS consta de tres proteínas, una de ellas (SOS1) es un transportador antiporte  $Na^+/H^+$ , encargado de la expulsión de  $Na^+$  del citoplasma. Se ha especulado con la posibilidad de que SOS1 además de actuar como transportador sea un sensor para el  $Na^+$ , debido a su larga cola citosólica de más de 700 aa (Zhu 2003), siendo esta ruta de señalización la que confiere tolerancia frente a la salinidad.

El  $Na^+$  puede ser almacenado en la vacuola de las células radicales o exportado a la parte aérea. En el tonoplasto se encuentran transportadores codificados por la familia de genes NHX, estos transportadores son similares a los transportadores antiporte  $Na^+/H^+$  y  $K^+/H^+$  de la membrana plasmática. Su función es la de secuestrar iones  $Na^+$  a la vacuola para mitigar su efecto



tóxico en el citoplasma. Así mismo, los transportadores  $K^+/H^+$  del tonoplasto pueden transportar iones  $K^+$  al citosol en caso de que se produzca una deficiente captación de los mismos a causa de un exceso de  $Na^+$  que saturan los transportadores HKT de la membrana plasmática (Pardo et al. 2006).

### **3.3.3. Sistemas antioxidantes**

Para la detoxificación de EROs inducidos por la salinidad, las células vegetales presentan sistemas antioxidantes que incluyen enzimas y compuestos no enzimáticos. Estos sistemas aumentan su actividad en situaciones de estrés salino (Miller et al. 2008).

#### **3.3.3.1 Antioxidantes enzimáticos.**

Para regular los niveles de EROs existe una gran variedad de enzimas con múltiples formas y localizadas en diferentes compartimentos celulares. Este grupo de enzimas mantendrán un equilibrio entre la formación y la eliminación de EROs, manteniendo además los niveles óptimos de  $H_2O_2$  para su función como señalizador molecular (Munns y Tester 2008) Entre estos sistemas enzimáticos los más importantes son Superóxido dismutasa (SOD), Catalasa (CAT), diferentes peroxidasas (POX) que se integran en el ciclo Halliwell-Asada.

-**Superóxido dismutasa (SOD)**, es una familia de metaloenzimas que catalizan la reacción de dismutación de  $O_2^-$  a  $O_2$  y  $H_2O_2$ . Según el cofactor metálico que presente en el sitio activo de la enzima se distinguen tres tipos de SOD. CuZnSOD, presenta Cu y Zn; MnSOD, contiene manganeso; FeSOD, hierro. Los tres tipos son sintetizados en el citosol y todas pueden encontrarse en nódulos de leguminosas. La actividad de estas enzimas se localiza en cloroplastos, peroxisomas y citoplasma para CuZnSOD; MnSOD se encuentra en mitocondrias, peroxisomas y en el bacteroide; y por su parte, FeSOD en cloroplastos (Rubio et al. 2007).

-**Catalasa (CAT)**, es una oxidoreductasa tetramérica que contiene un grupo hemo. Al contrario que las peroxidasas, las catalasas degradan rápidamente el  $H_2O_2$  con la ventaja de no utilizar poder reductor. Su localización es en los peroxisomas donde las concentraciones de  $H_2O_2$  son

muy altas, siendo un mecanismo energéticamente muy eficiente en condiciones de estrés, donde el  $H_2O_2$  se genera muy rápidamente (Feierabend 2007).

**-Peroxidasas (POX)**, son hemoproteínas que catalizan la oxidación de diferentes sustratos orgánicos por el  $H_2O_2$ . Entre los sustratos utilizados destacan ascorbato, citocromo C o glutatión reducido. Las peroxidasas necesitan poder reductor para llevar a cabo la destrucción de  $H_2O_2$  (Gagné 2014). Entre las POX más importantes destacan la glutatión peroxidasa (GPX), que reduce  $H_2O_2$  utilizando glutatión reducido (GSH) como poder reductor, y la ascorbato peroxidasa (APX). La mayoría de las peroxidasas se encuentran en el citosol, apoplasto, pared celular y vacuola (Ghamsari et al. 2007).

**-Ciclo ascorbato-glutatión**, es el principal sistema antioxidante en plantas, también conocido como ciclo Halliwell-Asada. Este sistema enzimático elimina  $H_2O_2$  utilizando poder reductor (NADPH, NADH).

La reacción se inicia con la reducción del  $H_2O_2$  a agua gracias a la oxidación del ascorbato (ASC) por la ascorbato peroxidasa (APX). El resto del ciclo está destinado a regenerar las moléculas antioxidantes utilizadas en la reducción del  $H_2O_2$ . El ascorbato es oxidado a monodehidroascorbato (MDHA) el cuál puede formar espontáneamente dehidroascorbato (DHA) o regenerar ASC mediante la enzima monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) consumiendo poder reductor. A partir del DHA, que además reacciona con  $O_2^-$ ,  $OH^-$  y otros hidroxidos de lípidos (Latowski et al. 2010), también se regenera ASC gracias a la dehidroascorbato reductasa que utiliza el glutatión reducido (GSH) como molécula reductora. Este GSH proviene de otra enzima acoplada a este ciclo, la glutatión reductasa (GR) que gracias a NADPH regenera GSH a partir del glutatión oxidado (GSSG) producido por la acción de DHAR.

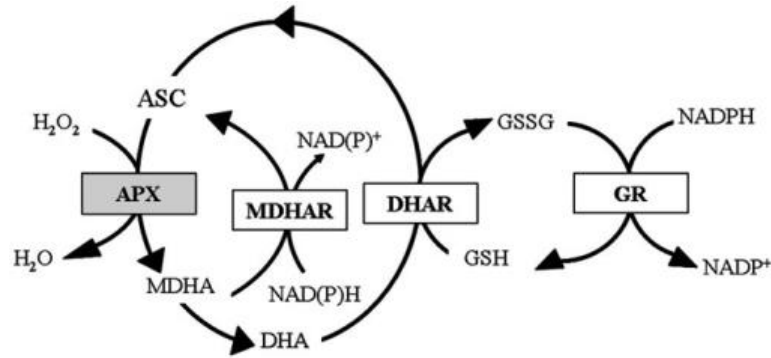


Figura 3.3.3.1. Ciclo Halliwell-Asada

### 3.3.3.2 Antioxidantes no enzimáticos.

Además de los antioxidantes enzimáticos, existen moléculas orgánicas con capacidad antioxidante o con función de cofactores de distintas enzimas antioxidantes. Entre estos componentes no enzimáticos se destacan flavonoides, ascorbato, glutatión, tocoferoles o carotenoides (Shao et al. 2007).

- **Ascorbato**, también conocido como vitamina C, en su forma reducida (ASC) es uno de los mayores antioxidantes celulares. Se sintetiza en las mitocondrias y es transportado al resto de la célula. Se ha detectado en la mayoría de los tipos celulares, orgánulos y en el apoplasto (Ishikawa y Shigeoka 2008). El ascorbato es utilizado por la APX en el ciclo ascorbato-glutatión para reducir  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Además, es capaz de reaccionar de forma no enzimática con otras EROs como  $\text{OH}^-$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $^1\text{O}_2$  e hidroperóxidos lipídicos. Otra de sus funciones consiste en proteger y regenerar carotenoides y tocoferoles oxidados (Shao et al. 2006).

-  **$\alpha$ -tocoferol** o vitamina E, es un antioxidante liposoluble que se acumula especialmente en tejidos fotosintéticos. Interactúa con los ácidos grasos y otros componentes de membrana. Elimina los peróxidos lipídicos producidos durante un estrés oxidativo, dando estabilidad a las membranas del aparato fotosintético, lo que revierte en una protección del fotosistema II (Krieger-Liszkay y Trebst 2006). Además son muy eficientes neutralizando oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) producidos en los cloroplastos (Yu y Tang 2004).

- **Glutathion**, es un tiol tripéptido (ácido glutámico-glicina-cisteína) presente en todos los compartimentos celulares. Presenta un amplio rango de funciones bioquímicas en las células debido a la gran reactividad del grupo tiol. Esta reactividad, junto con su estabilidad y su alta solubilidad en agua hacen del glutathion un buen protector frente al estrés oxidativo (Foyer y Noctor 2005). En su forma reducida elimina EROs a través de ciclo ascorbato-glutathion, donde participa reduciendo DHA a ASC, aunque puede degradar OH<sup>•</sup>, O<sub>2</sub><sup>-</sup> y otros radicales de forma directa actuando como reductor, convirtiéndose a su forma oxidada (GSSG). Cambios en el equilibrio GSH/GSSG resulta importante para el control del estado redox de la célula, actuando como sensor en la percepción de EROs (Shao et al. 2007).

-Otros compuestos antioxidantes no enzimáticos juegan papeles esenciales frente al estrés oxidativo, como la **Pro** que aparte de actuar como osmoprotector tiene capacidad para proteger el aparato fotosintético eliminando <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (Heuer 2003) y estabilizando cadenas de transporte de electrones, membranas y proteínas como la RuBisCo (Hamilton y Heckathorn 2001). Flavonoides como la **antocianina**, se acumulan en condiciones de estrés salino confiriéndole un papel en la tolerancia a la salinidad (Van Oosten et al. 2013). Las poliaminas (**PAs**) también tienen importancia como moléculas antioxidantes; en su forma conjugada, las PAs pueden ser más eficientes como antioxidantes que otras enzimas y complejos antioxidantes (Edreva et al. 2007).

#### **3.4. Efecto del estrés salino sobre la simbiosis rizobio-leguminosa.**

Una de las estrategias con más éxito de las plantas para hacer frente a los cambios ambientales consiste en establecer relaciones simbióticas con microorganismos del suelo. Sin embargo, las leguminosas están consideradas especies sensibles a la salinidad (Aranjuelo et al. 2014). El establecimiento de la simbiosis engloba complejas interacciones entre la raíz de la planta hospedadora, el rizobio y las condiciones ambientales. El estrés salino puede afectar a diferentes etapas de la simbiosis rizobio – leguminosa como: **a)** a la supervivencia y crecimiento del rizobio en la rizosfera, **b)** a la infección de la raíz por parte del rizobio, **c)** al desarrollo del nódulo o **d)** al funcionamiento del nódulo y crecimiento de la planta hospedadora, siendo difícil distinguir a

que fase afecta primordialmente debido a la independencia de las mismas (Borucki y Sujkowska 2008).

La **actividad nitrogenasa** se ve afectada por la salinidad debido a una baja disponibilidad de moléculas carbonadas y por tanto una reducción de la respiración (Walsh 1995). La sacarosa es la fuente de carbono principal que requiere el nódulo, por tanto, la sacarosa sintasa (SS) es una enzima clave para el funcionamiento de la nitrogenasa (Gordon et al. 1999) y se ha demostrado que es sensible a diferentes estreses, entre ellos la salinidad (Lopez et al. 2008). Un descenso en la actividad de esta enzima puede ser el factor principal para la inhibición de la actividad nitrogenasa en condiciones salinas (Baier et al. 2007). La salinidad también afecta a otras enzimas del metabolismo carbonado del nódulo como la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y la malato deshidrogenasa (MDH) (Lopez et al. 2008).

La **toxicidad por Na<sup>+</sup>** reduce la homeostasis y la captación de nutrientes esenciales, entre ellos Ca, K y P, lo que reduce el **crecimiento del nódulo** y su correcto funcionamiento (Ben Salah et al. 2010).

Otro punto a tener en cuenta es el **daño oxidativo** causado por la salinidad, que provoca perturbaciones en los mecanismos antioxidantes del nódulo. Esto conllevaría una reducción en el contenido de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), dehidroascorbato reductasa (DHAR) y peroxidasa, y por tanto una degradación de la membrana peribacteroidal y de proteínas citosólicas como la Leghemoglobina (Ben Salah et al. 2010).

### **3.5. Tolerancia a la salinidad en la simbiosis rizobio-leguminosa.**

Las leguminosas en simbiosis han adoptado cambios fisiológicos, morfológicos y moleculares para tolerar el estrés salino, tanto en el nódulo como en el resto de la planta. Estos incluyen los mecanismos de respuesta mencionados anteriormente: síntesis de osmolitos (como Pro y azúcares) para contrarrestar el estrés osmótico (López-Gómez et al. 2011), exclusión de iones tóxicos (Tejera et al. 2006) para mejorar el balance de nutrientes y respuestas antioxidantes relacionadas con el ciclo ascorbato-glutation que protegen la estructura nodular de los EROs, así como proteínas y ADN (Rubio et al. 2009).

Frente al efecto osmótico, en las células nodulares se promueve la **síntesis de osmolitos**, como azúcares solubles, entre los que destaca la trehalosa. En nódulos de *M. truncatula* se inhibe la expresión del gen de la trehalasa, enzima que degrada este disacárido (Lopez et al. 2008), dato que corrobora las altas concentraciones de trehalosa encontradas en nódulos de *L. japonicus* durante un estrés salino (Lopez et al. 2006). También se ha observado un aumento de aminoácidos en nódulos de *P.vulgaris* y *M. truncatula*, en especial la Pro, relacionados con el ajuste osmótico (Garcia et al. 2007).

La **homeostasis iónica** es un factor esencial para la adaptación al estrés salino. En *M. truncatula* TN1.11, genotipo adaptado a la salinidad, se ha comprobado un aumento del crecimiento de la raíz en condiciones de salinidad y una mayor acumulación de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en la parte aérea que en raíces, en comparación con el genotipo Jemalong A17 que presenta cierta sensibilidad a la salinidad. Estos datos sugieren que existe un vínculo entre el crecimiento y transporte de iones (Zahaf et al. 2012). En soja se ha comprobado que una compartimentación de  $\text{Na}^+$  en las vacuolas de las células radicales evitan su acumulación en las hojas, lo que confiere tolerancia al estrés salino (Luo et al. 2005). Sin embargo, en estas mismas leguminosas los iones  $\text{Cl}^-$  si son transportados a las hojas en genotipos tolerantes, lo que indica un transporte diferencial de iones entre los mecanismos de tolerancia.

La salinidad causa un incremento en los **sistemas antioxidantes** de la planta, principalmente en nódulos, donde la tolerancia al estrés oxidativo está relacionada con las defensas antioxidantes (Arrese-Igor et al. 2011). En genotipos tolerantes de garbanzos se ha relacionado la eficiencia de las enzimas antioxidantes SOD, CAT, APX y GR con la homeostasis redox y la integridad de los componentes celulares (Liu et al. 2014)

Todas estas respuestas adaptativas frente al estrés salino están dirigidas por una **regulación hormonal** específica en la que estarían involucrados el ácido abscísico (ABA) (Palma et al. 2014) junto con el ácido salicílico (SA), que regulan de forma sinérgica y antagonista la expresión de diferentes grupos de genes.

En un análisis a nivel transcriptómico llevado a cabo en *Lotus japonicus* y *M. truncatula* en simbiosis con sus respectivos microsimbiontes, se observaron distintas estrategias frente a estrés hídrico dependiendo de si el

tipo de simbiosis da lugar a la formación de nódulos determinados o indeterminados, demostrándose además que diferentes especies de rizobios participan en distintas respuestas frente al estrés en la simbiosis (Sańko-Sawczenko et al. 2019).

#### **4. Poliaminas.**

##### **4.1. Características, funciones y tipos.**

Las poliaminas (PAs) son compuestos orgánicos nitrogenados de bajo peso molecular, naturaleza alifática, que presentan carácter policatiónico a pH fisiológico y están presentes en casi todos los seres vivos (Haitao y Zhulong 2014).

Las PAs están implicadas en el crecimiento y desarrollo de las plantas: intervienen en la división y diferenciación celular, elongación radicular, desarrollo floral, maduración de frutos, senescencia foliar, muerte celular programada, síntesis de ADN, transcripción génica y organización de las cromátidas (Tavladoraki et al. 2012; Tiburcio and Alcázar 2018). Además, participan en las respuestas frente a la mayoría de los estreses ambientales, como salinidad, sequía, exceso de agua, altas y bajas temperaturas, heridas, ozono, metales pesados y estrés oxidativo (Wimalasekera et al. 2011).

Las PAs más comunes en la naturaleza son la diamina putrescina (Put), la trimina espermidina (Spd) y las tetraminas espermidina (Spm) y termoespermina (tSpm), así como otras diaminas como 1-3 diaminopropano (Dap) y cadaverina (Cad).

Existen también PAs poco comunes que presentan una distribución muy limitada en la naturaleza, contrándose principalmente en procariontes (Terui et al. 2005). Estas consisten en moléculas derivadas o relacionadas con la Spd y Spm, entre las que destacan la Homoespermidina (Homspd), Homoespermina (Homspm), Norespermidina (Norspd) y otras pentaminas y hexaminas (Sagor et al. 2013).

En tejidos vegetales, los niveles de PAs dependen de la especie y su etapa de desarrollo, siendo más abundantes en tejidos en crecimiento o en plantas expuestas a diferentes condiciones de estrés (Jiménez Bremont et al. 2014). En general, los niveles de Put son mayores que el resto de PAs. Sin

embargo, en leguminosas se pueden encontrar Cad en altas concentraciones (Tomar et al. 2013).

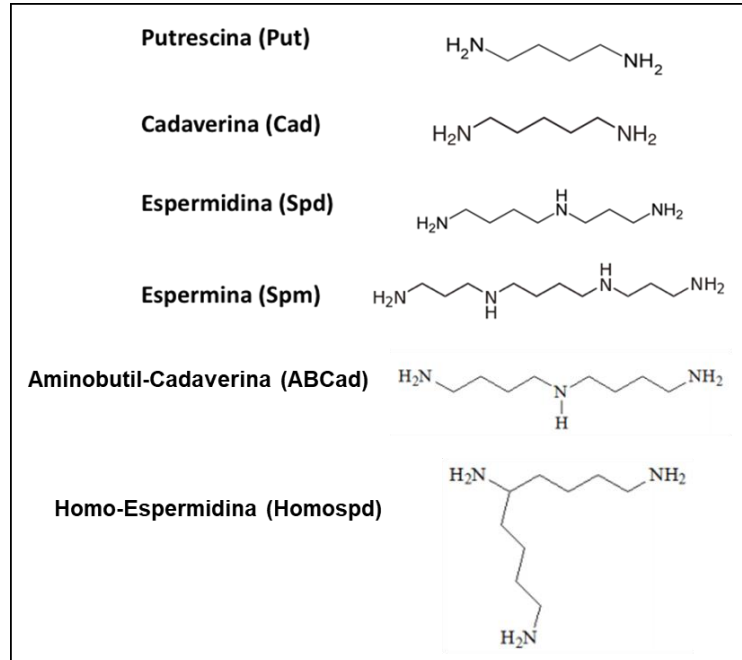


Figura 4.1. Estructura química de las principales PAs.

#### 4.2. Biosíntesis de PAs.

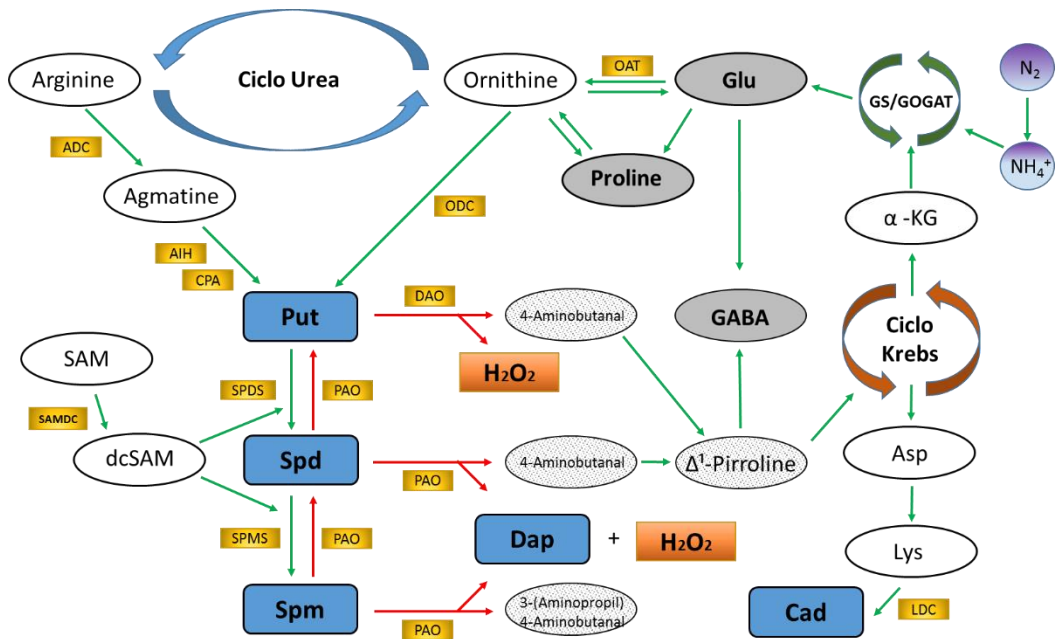
En plantas, la síntesis de Put se puede realizar por dos vías (Espasandin et al. 2018). Una de estas rutas metabólicas es la llamada vía indirecta, que comienza con la descarboxilación de la arginina por la enzima arginina descarboxilasa (ADC; EC 4.1.1.19), localizada en cloroplastos de células fotosintéticas o en el núcleo del resto de células (Cristina et al. 2004). En esta reacción se produce agmatina, la cual es metabolizada a N-carbamilputrescina por la agmatina iminohidrolasa (AIH; EC 3.5.3.12) y este compuesto se transforma finalmente en Put por la acción de la N-carbamilputrescina amidohidrolasa (CPA; EC 3.5.1.53). La otra ruta es la vía directa, donde en un solo paso se obtiene Put a partir de ornitina, catalizado por la ornitina descarboxilasa (ODC; EC 4.1.1.17), que actúa en el citosol celular (Minocha et al. 2014).

La biosíntesis del resto de PAs requiere S-adenosil metionina descarboxilada (dcSAM) como donador de grupos aminopropilo, este



dcSAM se obtiene a partir de S-adenosil metionina (SAM) por la S-adenosil metionina descarboxilasa (SAMDC; EC 4.1.1.50). Estas moléculas de dcSAM son utilizadas por diferentes sintasas para formar el resto de PAs mediante una reacción de aminopropilación. Espermidina sintasa (SPDS; EC 2.5.1.16) añade un grupo aminopropilo a la Put para formar Spd, y de forma consecutiva, otra enzima, espermina sintasa (SPMS; EC 2.5.1.22), adiciona otro grupo aminopropilo a la Spd convirtiéndola en Spm (Handa et al. 2018). El resto de PAs poco comunes se sintetiza a partir de las anteriores mediante sintasas específicas.

Mención especial para la Cad, que en leguminosas se sintetiza a partir de una dscarboxilización del aminoácido lisina mediante la lisina descarboxilasa (LDC; EC 4.1.1.18) en el estroma de los cloroplastos o en los plastidios de células no fotosintéticas (Jancewicz et al. 2016).



**Figura 4.2.** Esquema del metabolismo de las principales PAs. En azul las PAs: Putrescina (Put), Espermidina (Spd), Espermina (Spm), 1,3-Diaminopropano (Dap), Cadaverina (Cad). En amarillo enzimas del metabolismo de PAs. En blanco y gris compuestos del metabolismo PAs.

### 4.3. Catabolismo de PAs.

El catabolismo de PAs regula de forma eficiente los niveles de PAs libres en la célula. La degradación de PAs está mediado por oxidasas:

**-Diamino oxidasa** (DAO; EC 1.4.3.6): son homodímeros, cada subunidad tiene un tamaño entre 70 y 90 KDa, con iones cobre como grupos prostéticos y una quinona como cofactor. Tienen preferencia por las diaminas como Put y Cad, actuando a nivel del primer grupo amino. La oxidación de la Put libera  $H_2O_2$ ,  $NH_4^+$  y  $\gamma$ -aminobutanal, que de forma espontánea se convierte en  $\Delta^1$ -pirrolina y finalmente en ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) (Xing et al. 2007). En leguminosas se encuentra en el espacio extracelular ligadas débilmente a la pared celular (Cona et al. 2006).

**-Poliamino oxidasa** (PAO; EC 1.5.3.11): enzimas monoméricas de 53-60 KDa, utilizan FAD como cofactor, oxidando preferentemente Spd y Spm. Estas enzimas están implicadas en 2 rutas catabólicas de PAs:

1- Catabolismo terminal: PAO oxida Spd y Spm utilizando  $O_2$  como donador de electrones, obteniéndose como productos finales 1-3 diaminopropano (Dap) y  $H_2O_2$ , junto con 4-aminobutanal o 3 (aminopropil) 4-aminobutanal, si el sustrato es Spd o Spm respectivamente. Finalmente Dap puede catabolizarse a  $\beta$ -alanina (Bordenave et al. 2019).

2- Catabolismo de retroconversión: en este tipo de catabolismo, PAO transforma la Spm en Spd y la Spd en Put junto con la formación de 3-aminopropal y  $H_2O_2$  (Takahashi et al. 2018).

El catabolismo de PAs no solo es un proceso degradativo, sino que contribuye a mantener la homeostasis de PAs y sus productos además actúan como importantes mediadores en diferentes procesos fisiológicos, como la síntesis de GABA o formación de  $H_2O_2$ , incluidos en respuestas frente a estreses biótico y abióticos (Podlešáková et al. 2019).

### 4.4. Regulación de los niveles de PAs.

Los niveles de PAs libres en plantas no dependen solo de su síntesis, sino que su transporte, degradación, alteración química y conjugación regulan sus niveles en las células vegetales (Wang et al 2019). En condiciones de

estrés abiótico la regulación del metabolismo de PAs juega un papel crucial en las respuestas de tolerancia.

Las rutas de **biosíntesis** de PAs y sus principales enzimas están bajo un complejo control metabólico, imprescindible para el correcto funcionamiento celular. Las enzimas de la síntesis de PAs (ODC, ADC, SAMDC) están controladas a nivel transcripcional, traduccional y postraduccional (Kuznetsov y Shevyakova 2007). Inicialmente las enzimas de biosíntesis de PAs se sintetizan en forma de proenzimas, lo que las deja sujetas a un proceso de regulación postraduccional (Xiong 1997).

El **catabolismo** de PAs es el principal regulador de los niveles de PAs libres en las células, sus productos tienen importantes funciones en condiciones normales y de estrés. Sin embargo, tanto las enzimas de biosíntesis como las de degradación tienen peso en la regulación de PAs durante el ciclo celular y en los procesos de división y expansión celular (Paschalidis y Roubelakis-Angelakis 2005).

La **conjugación** de PAs es un mecanismo utilizado por las células vegetales para regular la concentración intracelular de PAs libres. Las PAs pueden conjugarse con ácidos fenólicos (fracción soluble de PAs junto con las PAs libres) o con macromoléculas como proteínas (fracción insoluble de PAs) (Martin-Tanguy 2001). Las PAs conjugadas solubles están envueltas, al igual que las PAs libres, en el control de diversos procesos biológicos como el crecimiento y desarrollo de la planta, así como la defensa frente a diferentes estreses (Bagni y Tassoni 2001). Además, las PAs conjugadas son importantes para la homeostasis celular, ya que sirven de sustrato para el transporte de PAs (Havelange et al. 1996).

Existen evidencias de la existencia del **transporte de PAs** entre órganos a larga distancia o de incorporación de PAs exógenas. La presencia de grandes cantidades de PAs en los exudados floemáticos o en el xilema confirma la existencia de transporte a larga distancia (Kuznetsov et al. 2002). Así mismo, entre diferentes PAs hay restricciones de transporte según su carga, siendo la Put más fácilmente transportada por el floema que la Spd y la Spm ya que éstas dos poseen más grupos amino que la Put (Mulangi et al. 2012).

Las células vegetales están equipadas con eficientes sistemas de transportadores para PAs exógenas. Estos transportadores son muy rápidos,

llegando a saturarse a los 2 minutos. Tanto el citosol como la vacuola acumulan PAs de forma inmediata, lo que sugiere un transporte pasivo por diferencia de gradiente eléctrico a través de la membrana plasmática gracias a un mecanismo de antiporte (Fujita y Shinozaki 2015).

#### **4.5. Participación de las PAs frente al estrés salino.**

Numerosos estudios han demostrado la participación de las PAs en procesos de tolerancia frente a estreses abióticos en plantas. Entre los estreses abióticos en los que intervienen las PAs encontramos estrés por bajas temperaturas (Alet et al. 2011), salinidad (Shevyakova et al. 2006), sequía (Yamaguchi et al. 2007), metales pesados (Shevyakova et al. 2011) o herbicidas (Benavides et al. 2000), entre otros.

La acumulación de PAs es una de las estrategias de las plantas para adquirir tolerancia frente a un estrés, sin embargo, los niveles de PAs cambian dependiendo de varios factores como la especie, el órgano analizado, su tolerancia o sensibilidad al estrés o la duración del mismo (Groppa y Benavides 2008), incluso en un mismo órgano, los niveles de PAs cambian constantemente debido a su rápida interconversión (Pal et al. 2015). De forma general, los cultivos tolerantes a la salinidad tienden a aumentar los niveles de Spd y Spm, mientras que los de Put se mantienen altos en cultivos sensibles a este estrés. Existen estudios donde se ha especulado con que los reservorios de Put servirían como fuente para la síntesis de Spd y Spm, aumentando así la relación  $\text{Spd+Spm} / \text{Put}$  en condiciones de salinidad, lo que indica la mayor incidencia en la tolerancia al estrés salino por parte de las PAs con más carga (Fariduddin et al. 2013b).

Se han detectado elementos de respuesta al estrés en los promotores de genes de biosíntesis de PAs lo que conlleva a una temprana activación de la síntesis de PAs como respuesta a las condiciones desfavorables (Pottosin y Shabala 2014). La relación entre catabolismo y anabolismo de PAs es un factor crucial para la tolerancia al estrés (Moschou et al. 2008). En estudios con plantas transgénicas que sobreexpresan enzimas de biosíntesis de PAs, se han observado cambios en la expresión de varios genes relacionados con la tolerancia a estrés, lo que sugiere su implicación como moléculas de señalización en las respuestas a estrés (Gupta et al. 2013).

Se ha comprobado que las PAs durante un periodo de salinidad actúan como reguladores de los niveles de  $\text{Na}^+$ , evitando la **toxicidad iónica** causada por este catión (Zhu et al. 2006). Las PAs son capaces de bloquear transportadores catiónicos no específicos para mantener la homeostasis  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  en el citoplasma y mitigar los daños causados por el  $\text{Na}^+$  (Zhao et al. 2007). Este efecto de bloqueo es proporcional a la carga de las PAs, siendo mayor en Spm ( $4^+$ ) que en Spd ( $3^+$ ) y en esta mayor que en Put ( $2^+$ ). Las PAs y en especial la Spm en células de raíz, interactúan con radicales hidroxilos activando transportadores para  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^+$  (Zepeda-Jazo et al. 2011). Al incrementar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma, se controla a su vez el equilibrio  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ , porque los iones  $\text{Ca}^{2+}$  van a iniciar rutas de señalización que acabarán activando transportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de la membrana plasmática y vacuolar, manteniendo así el balance  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  citoplasmático (Yamaguchi et al. 2007).

Una de las funciones específicas de Spd y Spm es la **protección de membranas** frente a daños provocados por la salinidad. Se ha demostrado que, incluso a bajas concentraciones, Spd y Spm mitigan el daño celular causado por la sal, mientras que la Put no ofrece protección alguna a las membranas (Mansour y Al-Mutawa 1999). Así mismo, en trabajos con mutantes de *A. thaliana* incapaces de producir Spm, se mostró un aumento de la sensibilidad a la sal mayor que en plantas de fenotipo silvestre. Esta sensibilidad se revertía al agregar de forma exógena Spm, pero no Put ni Spd, lo que demuestra la fuerte relación entre la Spm y la adquisición de tolerancia frente a la salinidad (Yamaguchi et al. 2006).

Las PAs debido a su naturaleza policatiónica son capaces de actuar como moléculas **antioxidantes**, eliminando radicales libres y estabilizando membranas y otras macromoléculas como ADN, ARN y proteínas (Hussain et al. 2011); (Baniasadi et al. 2018). Contradictoriamente, la degradación de PAs genera EROS, en concreto  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sin embargo, esta molécula está implicada en la señalización de procesos de defensa frente a patógenos y en respuestas a estrés abióticos (Su et al. 2005).

La aplicación de PAs exógenas ha resultado una herramienta útil en el estudio su implicación en la resistencia frente a diferentes estreses abióticos, ya que se ha comprobado que su aplicación aumenta la tolerancia de las plantas en condiciones de salinidad, sequía, estrés osmótico, metales pesados

y temperaturas extremas (Nguyen et al. 2018; Tiburcio y Alcázar 2018; Yin et al. 2019; Wang et al. 2019)

#### **4.6. Interacción entre PAs y otros reguladores de respuestas a estrés abiótico.**

Las PAs juegan un papel clave en la adaptación de las plantas a las condiciones de estrés, y lo hacen a través de un intrincado sistema de comunicación con otros reguladores de crecimiento y moléculas señal, el cual queda evidenciado por el hecho de que las rutas metabólicas que regulan los niveles de PAs, comparten sustratos comunes con otras moléculas durante la respuesta al estrés como **GABA**, **Pro**, **NO**, **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** o **etileno**; siendo difícil discernir las relaciones entre PAs y estas moléculas durante la respuesta al estrés abiótico (Shi et al. 2013).

La alteración del metabolismo de PAs se ha utilizado como estrategia para poner de manifiesto sus relaciones con otras moléculas involucradas en la defensa frente al estrés abiótico (Duque et al. 2016). La inhibición del catabolismo de PAs reduce el nivel de osmoprotectores como Pro y GABA (Su y Bai 2008); (Xing et al. 2007), sugiriendo que las PAs actúan como mitigadores del estrés a través de la modulación de los niveles de estos aminoácidos. Sin embargo, la inhibición de PAO en *A. thaliana* incrementa la tolerancia a la salinidad y a la sequía, reduciendo la producción de EROs e induciendo genes de respuesta al estrés (Sagor et al. 2016). Por otro lado, Glu es un precursor común para la biosíntesis de Pro y PAs, por lo que los niveles de ambos tipos de compuestos están condicionados por los de Glu.

Los resultados anteriores sugieren que las PAs podrían estar en el centro de una compleja red de regulación, en la que los niveles moléculas osmoprotectoras, como GABA y Pro, dependerían de las alteraciones metabólicas de la síntesis y degradación de PAs. Además, la producción de moléculas señal como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por el catabolismo de PAs ha sido relacionado con la inducción de respuestas defensivas de hipersensibilidad (Jasso-Robles et al. 2016), incluyendo la activación y señalización de respuestas a estreses abióticos (Moschou et al. 2008).

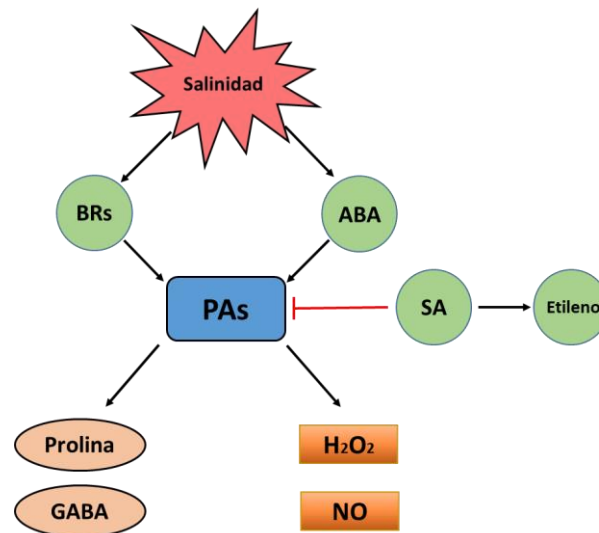
El **NO** también participa en las rutas de señalización por PAs, al estar relacionada su síntesis y el metabolismo de PAs y ser una molécula señal

clave que media en una gran variedad de procesos fisiológicos, incluyendo tolerancia al estrés abiótico en plantas (Diao et al. 2017). Las PAs tienen un efecto positivo sobre la producción de NO, existiendo una correlación inversa entre la presencia de NO y etileno en tejidos senescentes (Parra-Lobato y Gomez-Jimenez 2011). Estudios recientes sugieren que las PAs y el NO ejercen funciones fisiológicas superpuestas, por lo que un aumento en la biodisponibilidad de NO resultaría en una modificación en la homeostasis de PAs (Nguyen et al. 2018).

Se ha observado que el catabolismo terminal de PAs es muy importante en los mecanismos de tolerancia frente a la salinidad, ya que en estudios con inhibidores de PAO disminuyen los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y NO en estas condiciones, lo que indica que PAO contribuiría en la producción de estas moléculas para hacer frente a la salinidad (Takacs et al. 2016).

Por lo tanto, el mantenimiento de un balance adecuado entre el catabolismo de PAs con la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es necesario para mejorar los mecanismos de defensa frente a estrés (Wang et al. 2019).

Mediante la utilización de inhibidores de la actividad DAO, se ha observado que en condiciones de estrés osmótico, el catabolismo de PAs influye en la síntesis de ácido abscísico (ABA) al producirse una reducción en la expresión de genes de síntesis (Hatmi et al. 2018). De esta forma se



**Figura 4.6.** Esquema de la relación de PAs con otras hormonas, aminoácidos y moléculas de señalización en respuesta al estrés salino

evidencia el papel de las PAs en el control de respuestas al estrés abiótico a través del ABA. Otros estudios basados en la utilización de pre-tratamientos con ABA confirman la relación entre ABA y PAs, al observarse un alivio en el efecto negativo de la salinidad en *M. sativa* mediante el incremento de respuestas antioxidantes y de los niveles de Spd y Spm (Palma et al. 2014). Existen datos que indican que el ABA estaría involucrado en la modulación del metabolismo de PAs a nivel transcripcional ya que desencadena la síntesis de PAs a través de una regulación de genes que codifican SPDS, SAMDC y ADC (Jiménez-Bremont et al. 2007); (Seifi y Shelp 2019).

Por el contrario, el ácido salicílico (SA), que participa en la señalización del estrés salino en leguminosas (Palma et al. 2009), previene la acumulación de PAs en salinidad (Palma et al. 2013). Este antagonismo entre ambas moléculas ha sido relacionado con el vínculo existente entre la síntesis de PAs y etileno, que está favorecido por SA a través de un precursor común (SAM).

#### **4.7. PAs en la simbiosis rizobio-leguminosa.**

Los niveles de PAs en plantas dependen de la especie y el estado de desarrollo, siendo más abundantes en tejidos en crecimiento de plantas expuestas a diferentes estreses abióticos, además de en relaciones bióticas (Jimenez-Bremont et al. 2014). Durante el establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa, se han descrito alteraciones en las concentraciones de PAs (Jimenez-Bremont et al. 2014), sugiriendo un papel activo de las mismas en la interacción simbiótica. La producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por el catabolismo de PAs es un requerimiento esencial para la infección de la raíz en *M. truncatula* durante el establecimiento de la simbiosis (Jamet et al. 2007), así como durante su funcionamiento (Andrio et al. 2013).

El NO también es necesario para el establecimiento de la simbiosis *M. truncatula*-*S. meliloti*, pudiendo ejercer varias funciones en la etapa de infección y en el desarrollo del nódulo (del Giudice et al. 2011). La interacción entre el metabolismo de PAs y el NO ha sido demostrada mediante aplicación exógena de Spd y Spm que inducen la generación de NO por la ruta de la nitrato reductasa (Diao et al. 2017). Por lo tanto, el metabolismo de las PAs participa activamente en la simbiosis rizobio-



leguminosa proporcionando las señales necesarias para la formación del cordón de infección y para la organogénesis del nódulo.

Las PAs son también necesarias para el crecimiento y división en micro-organismos, entre ellos los rizobios (Becerra-Rivera et al. 2018). Además de las PAs habituales (Put, Spd y Spm) presentes en los rizobios, también se han identificado PAs poco comunes, que son análogos estructurales de las principales PAs (Tomar et al. 2013). La composición de PAs en nódulos de leguminosas es por tanto el resultado de la mezcla y colaboración del metabolismo de planta y rizobio.

Los nódulos acumulan PAs en niveles 5-10 veces superiores a cualquier otro órgano de la planta, incluso la proporción de estas PAs puede variar mucho dependiendo de la especie de leguminosa. La mayoría de estas PAs son específicas del nódulo, al ser sintetizadas por los bacteroides (Fujihara 2009). Entre estas PAs inusuales destaca la Homoespermidina (HomSpd) que es la más abundante en nódulos de *P. vulgaris* (Smith 1977). En nódulos de *P. vulgaris* también se ha encontrado aminobutylcadaverina (4-Abcad), poliamina exclusiva de los bacteroides, cuya síntesis depende de la enzima homoespermidina sintasa de los bacteroides (López-Gómez et al. 2016). La presencia de ambas PAs en nódulos es posible gracias al aporte de Cad por parte del citosol a los bacteroides, ya que la Cad no se produce ni en rizobios de vida libre ni en bacteroides (Fujihara 2009).

Durante la formación del nódulo en *L. japonicus*, se induce la expresión de genes de síntesis de PAs y descienden durante la senescencia (Efrose et al. 2008). De hecho, existe una correlación lineal entre los niveles de PAs libres en el nódulo, la actividad nitrogenasa y el contenido de leghemoglobina, lo que sugiere su implicación en funciones relacionadas con la fijación biológica de N<sub>2</sub> (Lahiri et al. 2004). Las PAs también participan en el control de la biomasa y número de nódulos a través de un diálogo molecular con brasinoesteroides (BRs) (Terakado et al. 2006).

## 5. Brasinoesteroides.

Los brasinoesteroides (BRs) son un grupo de hormonas vegetales esteroideas polihidroxiladas de 27-29 carbonos, que se sintetizan a muy bajas concentraciones y están presentes en todos los tejidos vegetales. La estructura

molecular de los BRs está formada por cuatro anillos carbonados (A, B, C, D) y una cadena lateral, y se forman a partir de la condensación de isoprenos (Hernández Silva y García-Martínez 2016). Se han aislado y descrito más de 70 tipos de BRs naturales en plantas, siendo el brasinolido (BL) el BR con más actividad biológica (Bajguz 2011). Los BRs desempeñan funciones clave en un amplio rango de procesos fisiológicos en el desarrollo vegetal, que incluyen división y elongación celular, diferenciación vascular (Gudesblat y Russinova 2011), estimulan el gravitropismo, retrasan la abscisión foliar, reorientan las microfibrillas de celulosa, inducen el crecimiento del tubo polínico, regulan de expresión génica, síntesis de proteínas y ácidos nucleicos (Cao et al. 2005). Además, los BRs participan en las respuestas a diferentes estreses abióticos (Bajguz 2011), entre ellos el estrés salino. La ruta de señalización de la BRs es de las mejores conocidas entre las hormonas vegetales estando bien caracterizados los receptores que la inician (Planas-Riverola et al. 2019).

### **5.1. Metabolismo de BRs.**

La obtención de numerosos mutantes deficientes en BRs (*det2*, *cpd*, *dwaf4*) y mutantes insensibles a los BRs (*bri1*) han sido herramientas clave para dilucidar los mecanismos de biosíntesis y señalización por BRs (Divi y Krishna 2009).

La biosíntesis de BRs sigue diferentes pasos de oxidación, que están catalizados por monooxigenasas tipo citocromo P450, entre las que podemos destacar DET2, CPD, la familia CYP, DWARF4, *AtBr6ox* (Sirhindi 2013). La biosíntesis de BL se inicia a partir del campesterol mediante sucesivas reacciones de oxidación. La síntesis comienza con el paso de campesterol a campestanol mediada por la enzima DET2. Existen dos rutas paralelas entre el campestanol a la castasterona llamadas ruta de oxidación temprana C-6 y ruta de oxidación tardía C-6. Entre estas dos vías paralelas existen numerosas conexiones catalizadas por numerosos genes de síntesis (Divi y Krishna 2009).

Las rutas de señalización de BRs no solo promueven la transcripción de genes relacionados con los efectos de los BRs y la interacción con las rutas metabólicas de otras fitohormonas, sino que reprimen los genes de biosíntesis

de BRs, estableciendo un sistema de retroalimentación negativa para el mantenimiento de los niveles de BRs (Fariduddin et al. 2014).

## 5.2. Participación de los BRs en estrés salino.

La aplicación exógena de BRs reduce los efectos negativos de la salinidad o induce tolerancia de la planta frente al estrés (Núñez et al. 2019). Los BRs activan enzimas antioxidantes clave como la CAT (Shahbaz et al. 2008), restauran los niveles de clorofila e incrementan la actividad de la nitrato reductasa (NR) favoreciendo así el suministro de nitrógeno para el crecimiento y la productividad de la planta (Anuradha y Seeta Ram Rao 2003). También son capaces de reducir los daños inducidos por la sal en cloroplastos y núcleo (Fariduddin et al. 2013a).

Los BRs tienen gran potencial para regular los sistemas antioxidantes a nivel bioquímico (Sharma et al. 2017). Plantas de *Arabidopsis* sometidas a estrés salino y tratadas con homobrasinolido (HBL) redujeron el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la peroxidación lipídica, mediante la regulación de la expresión de genes que codifican para peroxidasas (POX) (Goda et al. 2002). Se ha comprobado que el incremento de diferentes enzimas antioxidantes es consecuencia de un aumento de expresión del gen *DET2*, implicado en la síntesis de BRs, que confiere resistencia en *Arabidopsis* frente al estrés salino (Cao et al. 2005). Los BRs utilizan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como mediador para la inducción transcripcional de genes antioxidantes (Kang y Guo 2011).

El mantenimiento de la homeostasis iónica es un proceso que confiere tolerancia a la planta en condiciones salinas, y los BRs, de forma directa o indirecta, participan en la capacidad de los vegetales de conseguir este equilibrio iónico. Para un funcionamiento celular óptimo deben existir concentraciones bajas de Na<sup>+</sup> y altas de K<sup>+</sup> o Ca<sup>2+</sup>. Los BRs tienen un efecto positivo sobre los transportadores de alta afinidad para el K<sup>+</sup>, lo que está relacionado con una reducción de los iones Na<sup>+</sup> y un incremento de K<sup>+</sup>, siendo el resultado un incremento del radio K<sup>+</sup> / Na<sup>+</sup> (Fariduddin et al. 2013a). De la misma forma incrementan el radio K<sup>+</sup> / Na<sup>+</sup>, aumentando la toma de Ca<sup>2+</sup> y bloqueando la toma de Na<sup>+</sup> (Ali et al. 2006).

Al igual que las PAs, los BRs ejercen su función de tolerancia al estrés salino a través de una compleja red de comunicación con otras hormonas y reguladores del crecimiento. Existen estudios que confirman que una

intercomunicación entre BRs y SA regulan respuestas frente al estrés salino. Se puede observar este efecto en mutantes de *Arabidopsis* insensibles al SA, donde la aplicación exógena de BRs no confirió tolerancia a la salinidad en estas plantas (Divi y Krishna 2009). Por otro lado, aplicaciones exógenas de SA (Szepesi 2008) o en combinación con BRs (Hayat et al. 2012) incrementaron la tolerancia a la salinidad, siendo más efectiva la combinación de ambas hormonas. Como consecuencia, el SA desencadena la acumulación de ABA mediante un aumento de la actividad aldehído oxidasa (AO1), la cual es responsable de la conversión de ABA-aldehído a ABA (Szepesi et al. 2009). También se ha comprobado que los BRs son capaces de inhibir la elongación radicular a través de la activación de la síntesis de ACC, precursor del etileno (Bingsheng et al. 2018).

### **5.3. BRs en la simbiosis rizobio - leguminosa.**

Los BRs ejercen una regulación sistémica de la nodulación a través de sus receptores (Wei y Li 2016) y su relación con otras hormonas. El proceso de nodulación está controlado tanto a nivel local como sistémico a través de la llamada vía de autorregulación de la nodulación (AON) (Foo et al. 2014).

Con respecto a la nodulación, se ha comprobado que la aplicación exógena de BRs incrementa la nodulación y la actividad nitrogenasa en cacahuete (Vardhini y Rao 1998). El mismo efecto se ha visto en guisante (Shahid et al. 2011). Por el contrario, se ha observado que la aplicación de BRs inhiben la nodulación, dependiendo de la dosis, en mutantes hipernodulantes de soja, así como con aplicaciones de brasinazole (BZ), un potente inhibidor de la biosíntesis de BRs, que incrementa el número de nódulos en fenotipos salvajes de soja (Terakado et al. 2006), teniendo, por tanto, un papel negativo en la regulación de la nodulación en soja. Los BRs también contribuyen a la regulación de la nodulación en leguminosas a través de las PAs, en tratamientos foliares con BRs se induce la síntesis de PAs y se reduce la nodulación, ya que se ha comprobado que la aplicación de PAs en la parte aérea reduce de forma sistémica el número de nódulos en soja (Terakado-Tonooka and Fujihara 2008). Por tanto, queda evidenciada la existencia de una compleja red de comunicación entre hormonas y reguladores del crecimiento, incluidas los BRs y PAs, que interactuarían en respuesta a estreses abióticos y en las interacciones bióticas de las plantas.

## ***II- OBJETIVOS***



La salinidad del suelo afecta negativamente a la fisiología y metabolismo de las plantas, siendo uno de los factores ambientales que limita en mayor medida la productividad agrícola. Una de las estrategias con más éxito de las plantas para hacer frente a cambios ambientales consiste en establecer relaciones simbióticas con microorganismos del suelo. Un ejemplo lo representan las leguminosas, capaces de establecer simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico denominadas rizobios, que les permiten ser menos dependientes del nitrógeno del suelo mediante el proceso de fijación biológica de nitrógeno. El establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa y la eficiencia de la fijación de nitrógeno, son procesos muy sensibles a la salinidad, frente a la cual se inducen mecanismos de protección en los que participan compuestos hormonales y reguladores del crecimiento como las poliaminas (PAs), presentes en diferentes tipos de organismos y particularmente en plantas. En interacciones planta-microorganismo, y concretamente en la simbiosis rizobio-leguminosa, se producen alteraciones en los niveles de PAs debido a variaciones en su biosíntesis y degradación, por lo que estarían implicadas tanto en el establecimiento de la simbiosis, como en las respuestas frente a estrés salino, siendo el contenido de PAs nodulares el resultado de la interacción entre el metabolismo de la planta y la bacteria.

El **objetivo general** de esta Tesis Doctoral es dilucidar el papel que desempeñan las PAs en los mecanismos de tolerancia frente al estrés salino en la fijación biológica de nitrógeno llevada a cabo en la simbiosis rizobio-leguminosa. Además, se estudiará la posible interacción entre PAs y otras hormonas vegetales como brasinoesteroides (BRs), cuya participación en los mecanismos de respuesta a la salinidad, así como en la regulación de la nodulación, ha sido descrita.

Los **objetivos específicos** con los que se pretende alcanzar el objetivo general son:

1. Estudiar la implicación de las PAs en los mecanismos de tolerancia a la salinidad de la simbiosis rizobio-leguminosa, mediante la comparación de dos modelos de nódulos:

## Objetivo

---

- Indeterminados en la simbiosis *Medicago sativa*-*Sinorhizobium meliloti*.
  - Determinados en la simbiosis *Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium tropici*.
2. Determinar la interacción entre PAs y BRs, considerados ambos como elementos clave en las respuestas de las plantas frente a estreses abióticos, en la respuesta a la salinidad de la simbiosis rizobio-leguminosa. Además, se estudiará el efecto de ambos reguladores del crecimiento de forma independiente en el establecimiento de la simbiosis *M. truncatula*-*S. meliloti*.
  3. Comprobar el efecto de la alteración del metabolismo de la PAs en la respuesta a la salinidad en la simbiosis *M. truncatula*-*S. meliloti*, mediante la utilización de inhibidores específicos del catabolismo de PAs y plantas transgénicas que sobreexpresan uno de los genes de biosíntesis de PAs. Así mismo, se evaluarán los efectos de la alteración del metabolismo de PAs sobre la formación de nódulos en plantas de *M. truncatula* inoculadas con *S. meliloti*.



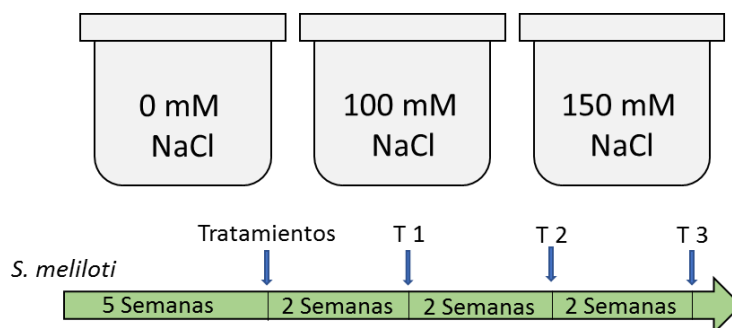
***III- DISEÑO  
EXPERIMENTAL***



## 1. Estudio comparativo de la implicación de las PAs en la respuesta a la salinidad de la simbiosis rizobio-leguminosa en nódulos determinados e indeterminados.

### 1.1. Implicación de las PAs en la respuesta a la salinidad en nódulos indeterminados de la simbiosis *M. sativa*-*S. meliloti*.

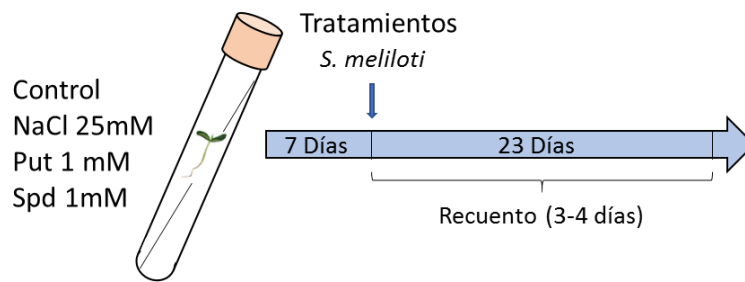
Se estudió la respuesta de la simbiosis y la implicación de las PAs a diferentes dosis de sal (0, 100 y 150 mM NaCl) en tres estados fenológicos de la planta: estado vegetativo, periodo de floración y periodo de fructificación.



En este experimento se determinaron los siguientes parámetros:

- Análisis de crecimiento: peso seco de parte aérea (PSPA), raíz (PSR) y total por planta (PSP), relación raíz/parte aérea (RPA).
- Fijación de nitrógeno y nodulación: actividad nitrogenasa aparente (ANA) y total (ANT), tasa de fijación de nitrógeno (TFN), coeficiente de transporte electrónico (CTE) y peso fresco de nódulos (PFN).
- Determinación cuantitativa de PAs solubles en hoja, raíz, nódulo, así como en las diferentes fracciones nodulares (bacteroides y citosol nodular) y bacterias en vida libre de *S. meliloti*.
- Actividades enzimáticas del catabolismo de PAs: DAO y PAO en nódulos.
- Contenido de Pro en nódulos.
- Peroxidación de lípidos de membrana en nódulos.

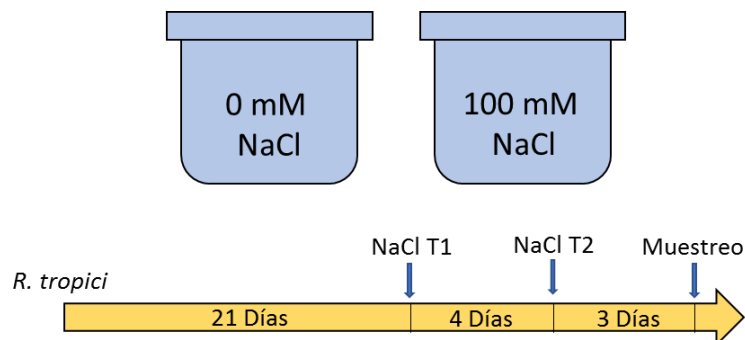
La **cinética de nodulación** para evaluar el efecto de la salinidad y de las PAs exógenas sobre el establecimiento de la simbiosis se llevó a cabo durante 23 días a partir del inicio de los tratamientos con PAs (Put 1 mM, Spd 1 mM) y con NaCl 25 mM, los cuales se aplicaron en plántulas de una semana, al mismo tiempo que el inóculo. Cada tratamiento constaba de 20 plantas.



También se llevó a cabo una **curva de crecimiento** de *S. meliloti* 1021, cultivadas en medio TY líquido y tratadas con NaCl 25 mM, Put 1 mM y Spd 1 mM durante 48 h. Las mediciones por densidad óptica a 60 nm se realizaron a las 12, 24, 30 y 48 h.

## 1.2. Implicación de las PAs en la respuesta a la salinidad en nódulos determinados de la simbiosis *P. vulgaris-R. tropici*.

En este experimento, plantas individuales fueron cultivadas durante 4 semanas (estadio vegetativo) iniciándose los tratamientos salinos (100mM NaCl) 3 y 7 días antes del muestreo.



Se determinaron los siguientes parámetros:

- Análisis de crecimiento: peso seco de parte aérea (PSPA), raíz (PSR) y total por planta (PSP), relación raíz/parte aérea (RPA).
- Fijación de nitrógeno y nodulación: actividad nitrogenasa aparente (ANA) y total (ANT), tasa de fijación de nitrógeno (TFN) y peso fresco nódulos (PFN).
- Determinación cuantitativa de PAs solubles en hoja, raíz, nódulo, así como en las diferentes fracciones nodulares (bacteroides y citosol nodular) y en bacterias en vida libre de *R. tropici*.
- Determinación cuantitativa de PAs conjugadas en nódulos.
- Análisis e identificación de PAs dansiladas por cromatografía y detección por espectrometría de masas (UPLC-MS).
- Actividad enzimática de enzimas de síntesis de PAs: ADC y ODC en nódulos.
- Análisis de expresión génica de genes implicados en la síntesis de PAs.

## **2. Interacción entre PAs y BRs en la respuesta a la salinidad de la simbiosis *M. truncatula*-*S. meliloti*.**

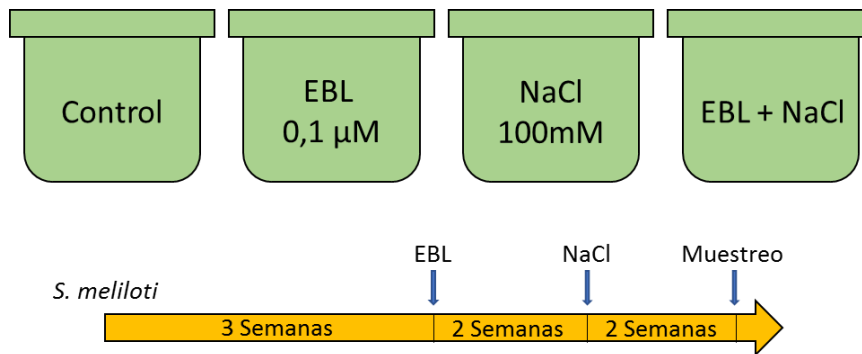
Se realizaron dos tipos de experimentos en los que se determinaron los siguientes parámetros:

- Crecimiento: peso seco de parte aérea (PSPA), raíz (PSR) y total por planta (PSP), relación raíz/parte aérea (RPA).
- Fijación de nitrógeno y nodulación: actividad nitrogenasa aparente (ANA) y total (ANT), tasa de fijación de nitrógeno (TFN), coeficiente de transporte electrónico (CTE) y peso fresco nódulos (PFN).
- PAs solubles en hoja y nódulo.
- Contenido de Pro en hojas.
- Peroxidación de lípidos de membrana.
- Determinación cuantitativa e histoquímica de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en hojas.
- Expresión génica en hojas de enzimas relacionadas con la síntesis de BRs y PAs.

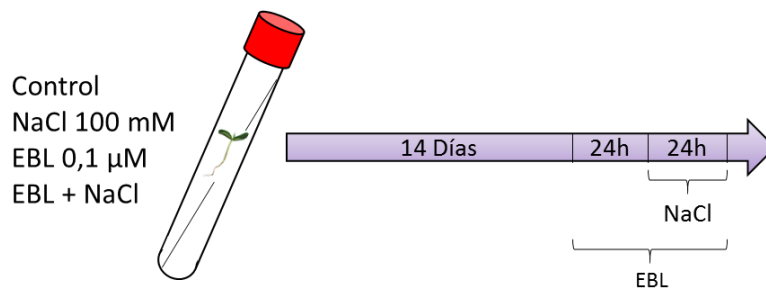
- Cinéticas de nodulación para evaluar el efecto de los BRs exógenos sobre el establecimiento de la simbiosis.

### 2.1. Efecto de la aplicación exógena de 24-Epibrassinolide (EBL) en la respuesta a la salinidad de la simbiosis *M. truncatula*-*S. meliloti* y su interacción sobre el metabolismo de PAs.

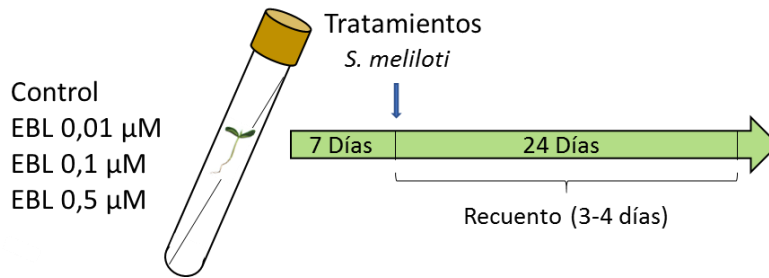
El experimento consistió en 4 tratamientos: control, NaCl 100 mM, EBL 0.1  $\mu$ M, EBL 0.1  $\mu$ M + NaCl 100 mM. A las 3 semanas se aplicó mediante spray foliar el EBL (2 aplicaciones semanales), comenzando a las 5 semanas el tratamiento salino a través de la solución nutritiva. Las plantas se muestrearon en la 7<sup>o</sup> semana.



El estudio de la expresión génica, se llevó a cabo un en hojas de plántulas de 2 semanas pre-tratadas con EBL 0,1  $\mu$ M durante 24 horas, a las que posteriormente se añadió NaCl a una concentración final de 100 mM. A las 48 h y 24 h de tratamiento con EBL y NaCl, respectivamente, las plantas se cosecharon y congelaron a -80 °C. Se utilizaron 6 plantas por repetición y tratamiento para la preparación de ARN.

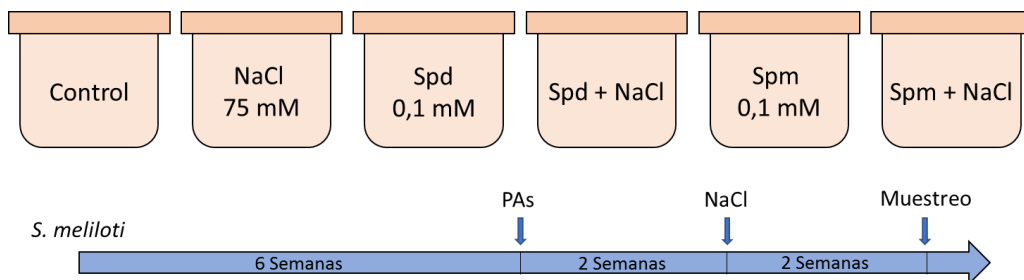


La **cinética de nodulación** para evaluar el efecto de los BRs exógenos sobre el establecimiento de la simbiosis se llevó a cabo durante 24 días a partir del inicio de los tratamientos con EBL (0,01  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$  y 0,5  $\mu\text{M}$ ), los cuales se aplicaron en plántulas de una semana, al mismo tiempo que el inóculo. Cada tratamiento constaba de 20 plantas.



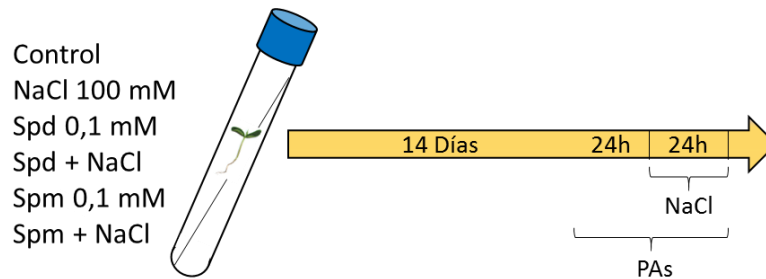
## 2.2. Efecto de la aplicación exógena de PAs en la respuesta a la salinidad de la simbiosis *M. truncatula* - *S. meliloti* y su interacción sobre el metabolismo de BRs.

En este experimento las plantas se cultivaron durante 10 semanas, iniciándose a las 6 semanas los tratamientos con PAs: 0,1 mM Spd y 0,1 mM Spm. El tratamiento con sal se aplicó 2 semanas más tarde (NaCl 75 mM) en la solución nutritiva.



El **estudio de la expresión génica** en hojas se realizó en plántulas de 2 semanas pre-tratadas con Spd y Spm 0,1 mM durante 24h. Posteriormente se añadió NaCl en una concentración final de 100 mM. A las 48 h y 24 h de tratamiento con PAs y NaCl, respectivamente, las plantas se cosecharon y

congelaron a -80 °C. Se utilizaron 6 plantas por repetición y tratamiento para la preparación de ARN.



### **3. Estudio de la implicación de las PAs en la respuesta al estrés salino en la simbiosis *M. truncatula* – *S. meliloti*, mediante alteraciones en las rutas metabólicas de biosíntesis y oxidación.**

Se realizaron dos tipos de experimentos en los que se determinaron los siguientes parámetros:

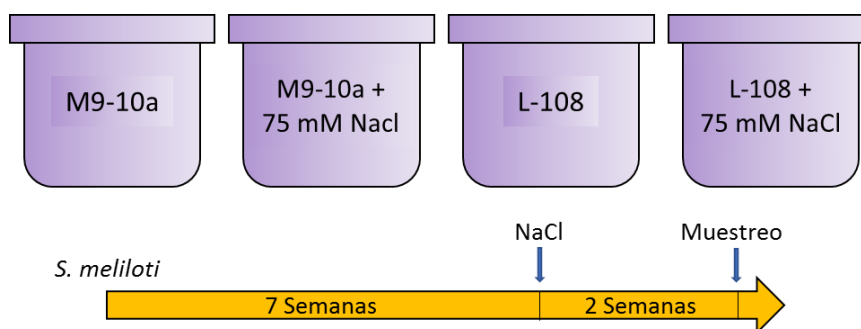
- Análisis de crecimiento: peso seco de parte aérea (PSPA), raíz (PSR) y total por planta (PSP), relación raíz/parte aérea (RPA).
- Fijación de nitrógeno y nodulación: tasa de fijación de nitrógeno (TFN), número de nódulos y peso fresco nódulos (PFN).
- Cuantificación de PAs solubles en hoja y nódulo.
- Peroxidación de lípidos de membrana.
- Determinación cuantitativa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en hojas y nódulos.
- Actividad de la enzima CAT en hoja y nódulo.
- Actividad enzimática del catabolismo de PAs: DAO y PAO en hojas y nódulos.
- Determinación de la concentración de aminoácidos en nódulo: Glu, Pro, GABA y ACC.
- Cinéticas de nodulación para evaluar el efecto de la alteración del metabolismo de las PAs sobre el establecimiento de la simbiosis.



### 3.1. Efecto de la alteración de la biosíntesis de PAs en la respuesta a la salinidad en la simbiosis *M. truncatula*-*S. meliloti*.

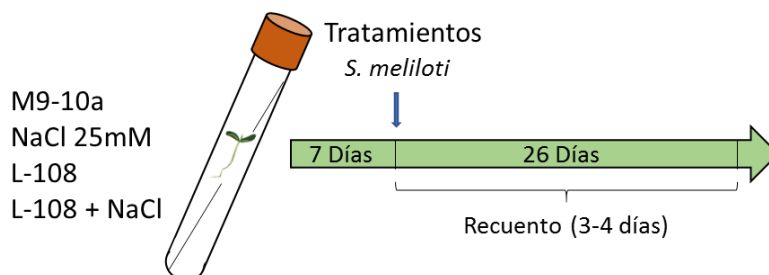
En este experimento se estudiaron los efectos de la sal y las respuestas frente a este estrés en la simbiosis *M. truncatula*-*S. meliloti* utilizando plantas de *M. truncatula* (cv. Jemalong) transgénicas homocigóticas T<sub>2</sub>, que sobreexpresan el gen de la arginina descarboxilasa de avena (*ADC*, GeneBank Accession No. X56802), y como control se utilizó una línea M9-10a poliembriónica (Araujo et al. 2004). Estas plantas fueron cedidas por el laboratorio del Prof. Fevereiro de la Universidade Nova de Lisboa.

Las plantas se cultivaron durante 9 semanas aplicando los siguientes tratamientos: control de plantas de genotipo silvestre (Wt, M9-10a), M9-10a + 75 mM NaCl, plantas transgénicas control (L-108) y L-108 + 75 mM NaCl. La sal se adicionó a la solución nutritiva a las 7 semanas del inicio del cultivo.



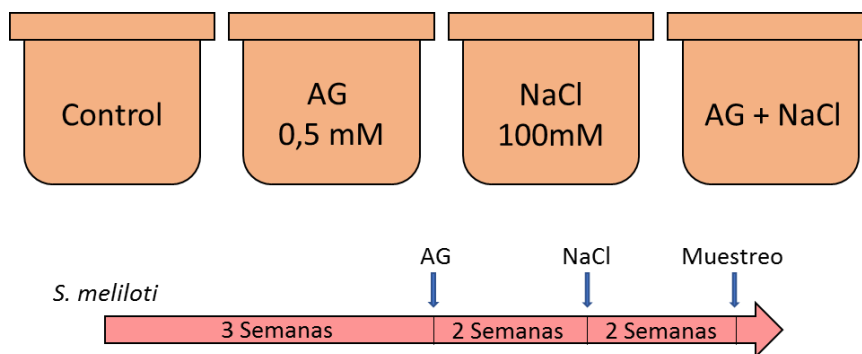
En este experimento, además de los parámetros arriba indicados, se realizó un análisis histológico de nódulos de ambos genotipos.

La **cinética de nodulación** con plantas control (M9-10a) y plantas mutantes (L-108) se llevó a cabo durante 26 días a partir del inicio de los tratamientos con NaCl (25 mM), los cuales se aplicaron en plántulas de una semana, al mismo tiempo que el inóculo. Cada tratamiento constaba de 20 plantas.



### 3.2. Efecto de la inhibición de la oxidación de PAs en la respuesta a la salinidad en la simbiosis *M. truncatula-S. meliloti*.

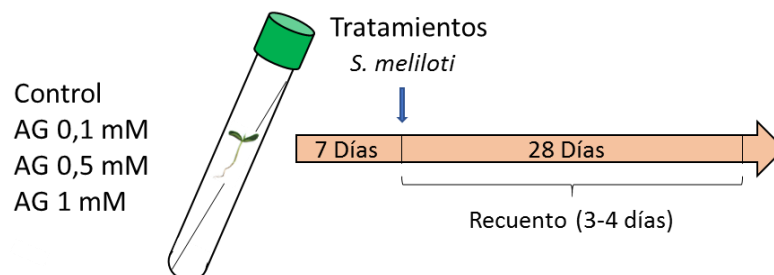
En este experimento se estudió el efecto de la adición de aminoguanidina (AG), inhibidor de la actividad DAO, en la respuesta al estrés salino en la simbiosis *M. truncatula-S.meliloti*. Para ello se utilizaron 4 tratamientos: control, 75 mM NaCl, 0,5 mM AG y 0,5 mM AG + 75 mM NaCl. La AG se añadió a la solución nutritiva a las 3 semanas de la siembra y la sal a las 5 semanas. La cosecha de las plantas se realizó a las 7 semanas de cultivo.



Además de los parámetros indicados anteriormente, se llevaron a cabo las siguientes determinaciones:

- Determinación histoquímica de  $O_2^-$  en hojas.
- Actividad de la enzima SOD en hoja y nódulo.

La **cinética de nodulación** se llevó a cabo durante 28 días a partir del inicio de los tratamientos, los cuales se aplicaron en plántulas de una semana, al mismo tiempo que el inóculo. Los tratamientos consistieron en solución nutritiva como control, AG 0,1 mM, AG 0,5 mM y AG 1 mM. Cada tratamiento constaba de 20 plantas.



***IV- MATERIAL Y  
MÉTODOS***



## 1. Material Biológico.

### 1.1 Microorganismos.

Se utilizó la cepa modelo *Sinorhizobium meliloti* 1021 para inocular las plantas de *Medicago truncatula* y *Medicago sativa*. Las plantas de *Phaseolus vulgaris* se inocularon con la cepa de *Rhizobium tropici* CIAT899, originaria del CIAT (Colombia), la cual fue seleccionada según trabajos previos de (Zúñiga 1997).

#### 1.1.1. Medios de cultivo.

El medio de cultivo empleado en el crecimiento, preparación de los inóculos y conservación de las cepas de *S. meliloti*, (1021) y *R. tropici* (CIAT 899) fue TY (Beringer 1974), cuya composición es la siguiente:

Medio TY		
Triptona	5.0	g
Extracto de levadura	3.0	g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.9	g
Agar (medio sólido)	15.0	g
Agua destilada	1000	ml
pH	7.0	

El pH se ajustó con NaOH 4N y la esterilización se llevó a cabo en autoclave, a 115 °C durante 30 min.

#### 1.1.2. Crecimiento de las cepas bacterianas.

Para obtener los **inóculos bacterianos** los rizobios fueron cultivados en medio TY líquido a 28 °C y en agitación hasta obtener una densidad de 10<sup>9</sup> células viables por mililitro, la cual se determinó mediante lectura de la absorbancia (D.O.) a 600 nm de longitud de onda.

Las **curvas de crecimiento** en bacterias de vida libre se llevaron a cabo durante un periodo de 48 horas en medios de TY líquido a 28°C. Los tratamientos fueron aplicados a las 12 horas del inicio del cultivo. Las mediciones por densidad óptica a 600 nm, se realizaron a las 12, 24, 30 y 48 h del inicio el cultivo.

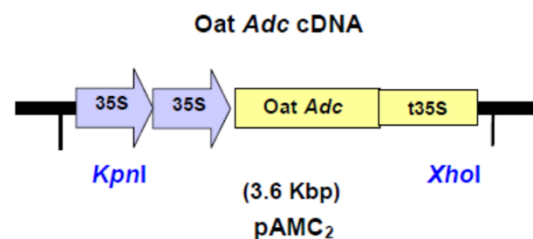
### 1.1.3. Conservación de las cepas bacterianas.

En la conservación de las bacterias para uso rutinario se utilizaron placas de Petri con medio TY sólido, las cuales se mantuvieron a 4°C y se resembraron cada 2 meses. Para evitar la pérdida de caracteres genéticos por sucesivas resiembras, los cultivos líquidos microbianos en fase logarítmica de crecimiento, se guardaron a -80°C en glicerol al 20 % (v/v).

### 1.2. Material vegetal.

Las especies vegetales utilizadas fueron *Medicago sativa* (var. Aragón), *Medicago truncatula* (var. Jemalong), y *Phaseolus vulgaris* (var. Contender). Tanto las semillas de *Medicago sativa* como de *Phaseolus vulgaris* fueron adquiridas en Abonos Bolivar (Granada, España), mientras que las semillas de *Medicago truncatula* (var. Jemalong) fueron suministradas por el Dr. A. Kondorosi (INRA París, Francia) y posteriormente reproducidas en el laboratorio.

En el estudio del efecto de la alteración de la biosíntesis de PAs en la respuesta a la salinidad en la simbiosis *M. truncatula*-*S. meliloti*, se utilizaron semillas de *M. truncatula* (cv. Jemalong) transgénicas homocigóticas T<sub>2</sub>, que sobreexpresan el gen de la arginina descarboxilasa de avena (*ADC*, GeneBank Accession No. X56802) bajo el control del promotor 35S CaMV (Fig. 1.2.). Estas plantas se corresponden con la línea L-108, y fueron cedidas por el laboratorio del Prof. Fevereiro de la Universidade Nova de Lisboa. La descripción detallada de la construcción de este mutante a partir de la línea embrionaria M9-10a mediada por *Agrobacterium* se puede consultar en Araujo et al. (2004). Las plantas transgénicas de *M. truncatula* L-108 presentan mayor acumulación de Put, Spd, Spm y Norspm que las plantas control M9-10.



**Fig. 1.2.** Construcción empleada para la obtención de plantas transgénicas de *M. truncatula* L-108.

### 1.2.1. Solución nutritiva para plantas.

La solución nutritiva con la que se regaron los cultivos de *M. truncatula*, *M. sativa* y *P. vulgaris* fue una modificada a partir de la descrita por Rigaud y Puppo (Rigaud and Puppo 1975) con la siguiente composición:

Macronutrientes		Micronutrientes	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.068 g	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.11 mg
MgSO <sub>4</sub>	0.123 g	MnSO <sub>4</sub>	3.07 mg
CaCl <sub>2</sub>	0.134 g	CuSO <sub>4</sub>	0.2 mg
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.174 g	ZnSO <sub>4</sub>	0.55 mg
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.044 g	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.85 mg
Secuestrene	0.025 g	CoCl <sub>2</sub>	0.120 mg
Agua	1000 ml		

El pH se ajustó con NaOH 4N a 6.8-7.0. Posteriormente se esterilizó a 115 °C durante 30 min.

## 2. Cultivo de plantas.

El cultivo de plantas de *M. truncatula* y *M. sativa* se realizó en semilleros con 60 pocillos de 200 ml de capacidad cada uno utilizando vermiculita fina y perlita (relación 3:1) como sustrato inerte, que permite un adecuado desarrollo radical gracias a su porosidad. El sustrato se humedeció previamente y se esterilizó en autoclave a 115°C durante 1 h, mientras que los semilleros y las bandejas se esterizaron en una solución de lejía al 20%. Los semilleros se colocaron sobre bandejas en las que se vertía la solución nutritiva que ascendía por capilaridad.

Las plantas de *P. vulgaris* se cultivaron en jarras Leonard (Leonard 1943) de 0.5 l de capacidad, con vermiculita y perlita como sustrato inerte (relación 2:1). Las jarras constan de dos partes de vidrio que encajan perfectamente: la parte superior contiene el sustrato y la inferior la solución nutritiva. A través de una mecha de papel secante asciende la solución por capilaridad manteniéndose de esta forma el grado de humedad del sustrato. Una vez preparadas las jarras se esterizaron en autoclave a 115°C durante 1 h. En cada jarra se sembró una semilla pregerminada.

Para los ensayos de **cinética de nodulación**, plántulas individuales de *M. truncatula* y *M. sativa* se cultivaron en tubos de vidrio de 20 x 2 cm, sobre papel de filtro y con 10 ml de solución nutritiva libre de nitrógeno previamente esterilizados en autoclave a 115°C durante 30 min. Los tubos se recubrieron con cartulina negra en  $\frac{3}{4}$  partes de su longitud para mantener la raíz en oscuridad. Los tubos se cubrieron con algodón para evitar contaminaciones y permitir el intercambio gaseoso. Cada cinética de nodulación se realizó en 20 plantas por tratamiento.

Los **cultivos para análisis de la expresión génica** se llevaron a cabo en las mismas condiciones que para las cinéticas de nodulación con la única diferencia de que las plantas no se inocularon y por tanto se empleó solución nutritiva con nitrógeno (KNO<sub>3</sub> 10 mM).

### **2.1. Desinfección y germinación de las semillas.**

Las semillas de *M. truncatula* se **escarificaron** previamente mediante inmersión en ácido sulfúrico concentrado (95%) durante 5 min y en agitación, posteriormente se lavaron cinco veces con abundante agua y se desinfectaron con hipoclorito de sodio comercial diluido al 50% (v/v) durante 5 min. A continuación, se lavaron varias veces con abundante agua destilada estéril, con objeto de eliminar los restos de la solución desinfectante. Posteriormente se colocaron en placas de agar-agua al 1% y se mantuvieron a 4 °C durante cinco días para sincronizar la germinación de las semillas. Posteriormente se mantuvieron en oscuridad 24 h a 25°C.

La desinfección de las semillas de *M. sativa* se realizó tal y como se ha descrito para *M. truncatula* sin escarificación previa. Posteriormente se dejaron en imbibición durante 2 h realizándose la pregerminación a 25°C durante 48 h en oscuridad.

Las semillas de *P. vulgaris* se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5% (v/v) durante 5 min, a continuación se lavaron varias veces con abundante agua destilada. Tras este proceso se dejaron en imbibición durante 2 h y posteriormente se trasladaron a semilleros de vermiculita estéril convenientemente humedecida. Los semilleros se cubrieron con bolsas de polietileno a fin de evitar la pérdida de humedad, y se mantuvieron en oscuridad durante 48 h a 28°C en estufa de germinación.



## 2.2. Preparación del inóculo.

Los inóculos de *S. meliloti* (1021) y *R. tropici* (CIAT 899), se obtuvieron a partir de cultivos frescos crecidos en medio TY sólido durante 48-72 h a 28°C. Los rizobios fueron posteriormente crecidos en medio TY líquido a 28°C y en agitación hasta alcanzar una densidad óptica equivalente a una suspensión bacteriana de aproximadamente  $10^9$  células viables  $\text{ml}^{-1}$ . Las plantas se inocularon con 1 ml de esta suspensión en el momento de la siembra.

## 2.3. Siembra e inoculación.

Las semillas pregerminadas de *M. truncatula* y *M. sativa* se colocaron de una en una en cada pocillo del semillero con sustrato de vermiculita y perlita, aplicándose a cada una de ellas 1 ml del inóculo de *S. meliloti*. Se realizaron reinoculaciones durante las 2 semanas sucesivas al inicio del cultivo.

Las semillas pregerminadas de *P. vulgaris* se colocaron en las jarras Leonard, cubriéndose con sustrato vermiculita y perlita estéril, cada semilla se inoculó con 1 ml de cultivo de *R. tropici* CIAT 899.

## 2.4. Condiciones de la cámara de cultivo.

En todos los experimentos realizados, excepto los de cinética de nodulación, las plantas se cultivaron en una cámara KOXKA (SA8/17-27/R) con las siguientes condiciones ambientales:

- Fotoperiodo: 16 h luz/ 8 h oscuridad.
- Temperatura: 23 °C día/ 18 °C noche  $\pm$  1°C.
- Humedad relativa: 55 % día/ 75 % noche.
- Intensidad luminosa:  $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (400-700 nm) en la superficie de las macetas, suministrada por lámparas fluorescentes Sylvania Cool-White (F72T12-CW-VHO).

Los semilleros y las jarras se distribuyeron sobre la mesa de cultivo completamente al azar, cambiándose de forma periódica de lugar. En las bandejas se añadió solución nutritiva estéril cada 3-4 días.

### **3. Metodología empleada.**

#### **3.1. Recolección de las plantas.**

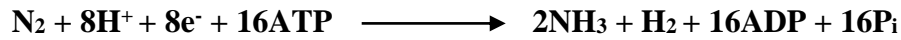
En los ensayos con plantas de *M. truncatula* y *M. sativa*, se escogieron 12 plantas, de las 60 existentes por tratamiento, de forma aleatoria para la determinación de la actividad nitrogenasa (ANA, ANT, TFN, CTE, peso fresco y número de nódulos) y se determinaron además los parámetros relacionados con el crecimiento. Para ello, se aislaron los nódulos de cada planta, se separó la raíz de la parte aérea, se registró su peso fresco, y a continuación, se procedió al secado del material vegetal en estufa de corriente forzada de aire a 70°C durante 24 h, pasado este tiempo, se determinó el peso seco de cada órgano.

El resto de plantas se extrajeron de los semilleros, se lavaron las raíces con abundante agua para eliminar los restos de sustrato, de cada tratamiento se separaron tres grupos de plantas de forma aleatoria para realizar repeticiones biológicas y se separaron parte aérea, raíz y nódulos que se conservaron a -80°C hasta su posterior utilización en las determinaciones metabólicas y analíticas.

La recolección de plantas de *P. vulgaris* se realizó por el mismo procedimiento descrito, sin embargo, al haber un menor número de plantas, para la determinación de los parámetros de crecimiento se utilizó cada una de las plantas separándose previamente una fracción de la parte aérea y de la raíz, así como la totalidad de los nódulos que se conservaron a -80°C hasta su posterior utilización en las determinaciones metabólicas y analíticas.

#### **3.2. Actividad nitrogenasa.**

La determinación de la actividad nitrogenasa (EC 1.7.9.92) se realizó mediante el análisis de intercambio de gases (Witty y Minchin 1998), consistente en la medición de la evolución de H<sub>2</sub> que se produce junto con la reducción de N<sub>2</sub> a NH<sub>3</sub> de acuerdo con la siguiente ecuación:



La medida del H<sub>2</sub> producido por los nódulos en una corriente de aire proporciona la actividad nitrogenasa aparente (ANA), ya que solo dos de los ocho electrones son empleados para la producción de H<sub>2</sub>, mientras que el resto se utiliza para reducir el N<sub>2</sub> a NH<sub>3</sub>. Para medir la actividad total de la nitrogenasa (ANT), se hace pasar una corriente de Ar/O<sub>2</sub> en una proporción 80/20% a través de la raíz nódulada. En este caso todos los electrones son utilizados para la producción de H<sub>2</sub>. Para determinar la tasa de fijación de N<sub>2</sub> se utiliza la ecuación:

$$\text{Tasa de fijación de N}_2 = (\text{ANT} - \text{ANA})/3$$

Se pone 3 en el denominador porque para reducir N<sub>2</sub> a NH<sub>3</sub> se requieren tres pares de electrones, mientras que la reducción de H<sup>+</sup> a H<sub>2</sub> requiere solo de un par de electrones.

### 3.3. Aislamiento de bacteroides.

La obtención de las diferentes fracciones nodulares se realizó según el método descrito por Trinchant et al. (2004). Se homogeneizó 1 g de nódulos en 10 ml de tampón fosfato sódico 100 mM pH 7.5 con manitol 150 mM, DTT 2 mM y EDTA 1 mM. El homogenado se filtró con gasas y se centrifugó a 500xg 10 min, para eliminar restos de tejido vegetal. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se centrifugó a 6,000xg durante 10 min, el pellet resultante contenía los bacteroides. El sobrenadante fue de nuevo centrifugado a 48,000xg para su utilización como **extracto crudo de proteína del citosol nodular**.

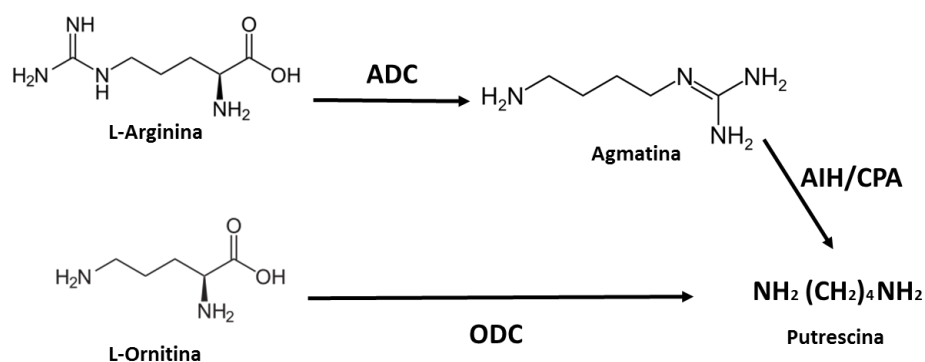
Los bacteroides se lavaron dos veces mediante su resuspensión en el mismo tampón de extracción (tampón fosfato sódico 100 mM pH 7.5 con manitol 150 mM, DTT 2 mM y EDTA 1 mM), y se volvieron a recoger por centrifugación a 6,000xg durante 10 min. Por último, los bacteroides se resuspendieron en tampón Tris 10 mM pH 7.5 (MgCl<sub>2</sub> 40 mM, KCl 10 mM,

EDTA 3 mM y DTT 1mM). La suspensión de bacteroides se sonicó en un baño de hielo usando un sonicador Branson (modelo 350) con un 50% de pulso durante 10 min, para lo que se añadió 50 µl de Triton X-100 al 1% y facilitar así la ruptura de las membranas. La mezcla sonicada se centrifugó a 48,000xg durante 10 min, usándose el sobrenadante como **extracto crudo de proteína del bacteroide**.

### 3.4. Actividades enzimáticas.

#### 3.4.1. Arginina descarboxilasa y Ornitina descarboxilasa.

La actividad de las enzimas de síntesis de la Put, ADC (EC 4.1.1.19) y ODC (EC 4.1.1.17) se determinó en nódulos de *Phaseolus vulgaris* mediante el protocolo descrito por (Birecka et al. 1984). Se cuantificó la cantidad de putrescina producida por ambas enzimas a partir de L-Arginina y L-Ornitina respectivamente, sustratos de ambas enzimas.



**Figura 3.4.1.** Biosíntesis de putrescina. Vía argina descarboxilasa (ADC), que incluye la acción de la agmatina iminohidrolasa (AIH) y la carbamilputrescina amidohidrolasa (CPA). Vía ornitina descarboxilasa (ODC).

#### 3.4.1.1. Preparación de extractos.

Los nódulos se homogeneizaron a 4°C en tampón Tris-HCl 200 mM pH 8 que contenía DTT 10 mM, fosfato de piridoxal y EDTA 0,1 mM, se centrifugó a 20,000xg durante 20 min a 4°C. La proteína de los extractos crudos de nódulos se precipitó con (NH<sub>4</sub>) SO<sub>4</sub> añadido hasta saturación y se centrifugó a 20,000xg durante 10 min. El pellet se resuspendió en tampón de reacción Tris-HCl 100 mM pH 7.5 que contenía DTT 5 mM, piridoxal fosfato

40  $\mu$ M y EDTA 5 mM. La suspensión de proteínas se dializó en columna de diálisis (Millipore) para eliminar el exceso de  $(\text{NH}_4) \text{SO}_4$  frente al tampón de reacción durante 24 h a 4°C en oscuridad. El extracto dializado se utilizó para el ensayo enzimático.

#### **3.4.1.2. Determinación enzimática.**

La mezcla de reacción se componía del extracto proteico al que se adicionó L-Arg y L-Orn hasta una concentración final 40 mM, respectivamente, en un volumen de 220  $\mu$ l. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 4 h. Los blancos no se incubaron. Después, la reacción se derivatizó para determinar la Put formada como se indica en el apartado de determinación de PAs.

#### **3.4.2. Cuantificación de la actividad diamino oxidasa y poliamino oxidasa.**

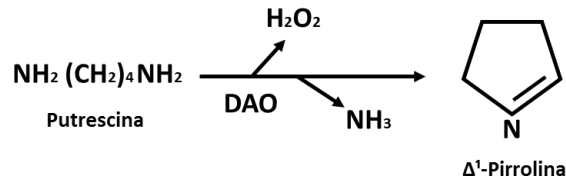
Se determinaron dos enzimas del catabolismo de PAs, la diamina oxidasa (DAO, EC 1.4.3.6) y la poliamina oxidasa (PAO, EC 1.5.3.3) en distintos órganos de *Medicago sativa* y *Medicago truncatula*.

##### **3.4.2.1. Preparación de extractos.**

El material vegetal (0,5 g) se homogeneizó en 4 ml tampón de fosfato potásico 100 mM (pH 6,5). El extracto se centrifugó a 10,000xg durante 20 min a 4°C. El sobrenadante se utilizó para el ensayo enzimático.

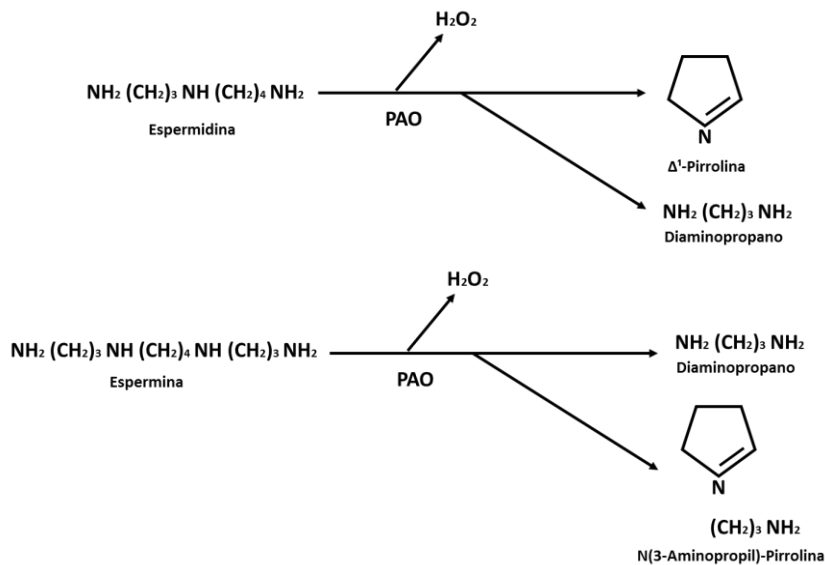
##### **3.4.2.2 Determinación enzimática.**

Las actividades DAO y PAO, se determinaron midiendo la generación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , producto de la oxidación de PAs (Xu et al. 2011)



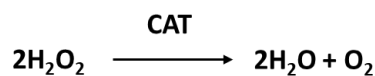
La mezcla de reacción contenía: tampón fosfato sódico pH 6.5 100 mM, 4-aminoantipirina 0.02  $\mu\text{M}$  y N, N dimetilanilina 0.09  $\mu\text{M}$ , peroxidasa (250 U / ml), extracto.

La reacción se inició mediante la adición de 0,1 ml Put 20 mM para la determinación de DAO y de 0,1 ml de Spd + Spm 20 mM para la determinación de PAO. La actividad enzimática se expresó en unidades de enzima por mg de proteína y por minuto. Cambios de 0,001 en la absorbancia de la densidad óptica a 555 nm por minuto se consideró una unidad de actividad enzimática.



### 3.4.3. Catalasa.

La actividad catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6) se determinó mediante el método de Aebi (Aebi 1984). Esta enzima cataliza la degradación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  formando agua y oxígeno. Este método está basado en la disminución de absorbancia, medida a 240 nm y 30  $^\circ\text{C}$ , debida a la extinción del  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



### 3.4.3.1 Preparación de extractos.

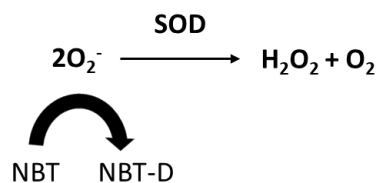
Se homogenizó 0,4 g de material vegetal en 5 ml de tampón de fosfato potásico 100 mM (pH 7), que contenía EDTA 100 mM y tritón X-100 al 0,1%. El homogeneizado se filtró por gasa y se centrifugó durante 20 min a 27,000xg y 4 °C. El sobrenadante se utilizó para la determinación de la actividad enzimática.

### 3.4.3.2 Determinación enzimática.

La actividad enzimática se determinó mediante la siguiente mezcla de reacción: tampón fosfato sódico 50 mM pH 7, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100mM. La reacción se inició al añadir 50 µl de extracto para completar un volumen final de 1 ml. La actividad CAT se expresó como µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mg<sup>-1</sup> prot min<sup>-1</sup>.

### 3.4.4. Superóxido dismutasa.

La actividad superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1) se determinó por su capacidad de inhibir la reducción fotoquímica del NBT a 560 nm según Beyer y Fridovich (1987). SOD cataliza la reacción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>.



### 3.4.4.1 Preparación de extractos.

Se maceraron 0,2 g de material vegetal en 1,6 ml de de tampón de fosfato potásico 50 mM (pH 7,8), que contenía EDTA 0,1 mM y mercaptoetanol 10 mM. Al homogeneizado se le añadió 80 mg de PVPP y 16 mg de PEG. Se centrifugó a 15,000xg 15 min, 4 °C y se obtuvo el sobrenadante como extracto.

#### **3.4.4.2 Determinación enzimática.**

La actividad enzimática se determinó mediante la siguiente mezcla de reacción: tampón fosfato sódico 50 mM pH 7,8 (EDTA 0,1 mM), riboflavina 2 $\mu$ M, NBT 75  $\mu$ M y metionina 13 mM. La reacción se inició al añadir 50  $\mu$ l de extracto para completar un volumen final de 2 ml.

La actividad SOD se determinó midiendo la absorbancia de la mezcla de reacción después de haber sido expuesta a la luz en intervalos de 10 min. Los blancos se mantuvieron en oscuridad y los controles carecían de extracto vegetal. La actividad SOD se expresó como unidades de actividad SOD min<sup>-1</sup>.

### **3.5. Determinaciones analíticas de PAs, aminoácidos y proteína total.**

#### **3.5.1 PAs.**

##### **3.5.1.1. Preparación de extractos.**

Los extractos de hoja, raíz y nódulo se obtuvieron homogeneizando 0,2 gramos de material vegetal en 0,6 ml de ácido perclórico (PCA) al 5% y se incubaron durante 24 h a 4°C. El homogeneizado se centrifugó a 3,000xg, 5 min, 4°C y se recogieron fracciones de 0,2 ml del sobrenadante para su dansilación.

Para determinar la PAs de las fracciones nodulares, estas se aislaron como se describe en el apartado 3.3 (Trinchant et al. 2004). Posteriormente se secaron por evaporación en corriente de nitrógeno y se resuspendieron las muestras en 0,6 ml de PCA al 5% para proceder a la dansilación.

Con respecto a los extractos de rizobios de vida libre, se obtuvieron a partir 50 ml de cultivos estacionarios crecidos durante 24 h en medio TY. Las células se recogieron por centrifugación a 20,000xg durante 10 min. Después de descartar el sobrenadante, las células se lavaron dos veces con agua, se sonicaron durante 10 min y se centrifugaron a 48,000xg 10 min, el sobrenadante resultante se utilizó como extracto bacteriano. Después de secó



por evaporación, el extracto se resuspendió en 0,6 ml de PCA al 5% para la determinación de PAs por dansilación.

### 3.5.1.2. Determinación de PAs por dansilación.

Alícuotas de 0,2 ml de cada extracto se sometieron a derivatización por dansilación. Para ello, se agregó 0,4 ml de cloruro de dansilo (preparado en acetona, 10 mg / ml), 0,2 ml de carbonato de sodio saturado y 6  $\mu$ l de 1,7-diaminoheptano 1 mM (HTD), como estándar interno. La mezcla se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante la noche. El exceso de cloruro de dansilo se eliminó con 0,1 ml (100 mg / ml) de Pro añadida a la mezcla, y se incubó durante 30 min. Las PAs dansiladas se extrajeron en 0,5 ml de tolueno. La fase orgánica se recogió y se secó por evaporación, el pellet resultante se resuspendió en 0,1 ml de acetonitrilo.

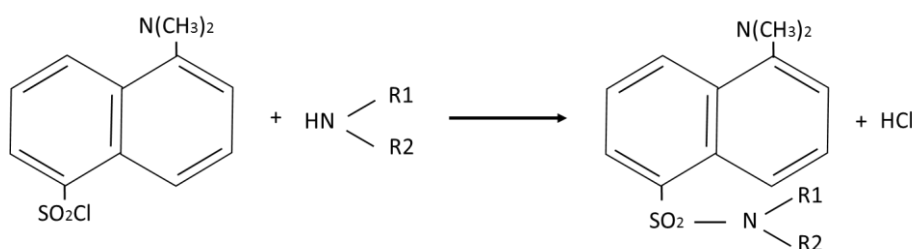


Figura 3.5.1.2. Reacción del Cloruro de dansilo con aminas

El análisis de PAs libres se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con un equipo Agilent Technologies 1260 equipado con una columna de fase inversa (4,6 x 250 mm C18) después de la derivatización con cloruro de dansilo. El flujo de la fase móvil a través de la columna fue de 1,5 ml min<sup>-1</sup> y constaba de eluyente A (agua) y eluyente B (acetonitrilo). La columna se equilibró con un 70% de B y un 30% de A antes de inyectar muestras de 0,01 ml. Esto fue seguido por un gradiente lineal que termina con 100% B después de 9 min. El paso final se llevó a cabo durante 4 minutos antes de regenerar la columna. La detección se realizó con un detector de fluorescencia con longitudes de onda de emisión y excitación de 415 y 510 nm, respectivamente (Flores and Galston 1982). Se utilizó un procedimiento de calibración relativa para determinar las PAs en las muestras, utilizando 1,7-diaminoheptano (HTD) como estándar interno y

cantidades de estándares de PAs que varían de 0,3 a 1,5 nmol, adquiridos de Sigma. Los resultados se expresaron como nmol g<sup>-1</sup> peso fresco.

### **3.5.1.3. Determinación PAs totales y conjugadas.**

Para la determinación de PAs totales, se sometieron a hidrólisis ácida los extractos descritos en el apartado 3.5.1.1, para ello, se mezclaron 0,2 ml del extracto con 0,2 ml HCl 12 M y se calentaron a 110°C durante 18 h en ampollas de vidrio selladas. Después de la hidrólisis ácida, el HCl se evaporó mediante calentamiento adicional a 80°C y el residuo resultante se resuspendió en 0,2 ml de PCA al 5% (v / v). Esta solución se utilizó como fuente de PAs totales para su derivatización de la misma forma que para las PAs solubles.

Las PAs conjugadas se obtuvieron restando las PAs solubles a las PAs totales.

### **3.5.1.4. Caracterización PAs.**

La caracterización de PAs se realizó por espectrometría de masas utilizando un sistema Acquity UPLC acoplado con un detector Q-TOF SYNAPT G2 (Waters Micromass) equipado con ionización por electrospray. Se inyectaron 2 µl de la muestra disuelta en acetonitrilo en una columna ACQUITY UPLC BEH C18 (1,7 µm x 2,1 mm x 50 mm, Waters) equipada con una columna previa VanGuard (2,5 mm x 5 mm, Waters). La fase móvil para la elución consistió en un gradiente constituido por agua + 0,1% (v/v) de ácido fórmico (disolvente A) y acetonitrilo + 0,1% (v/v) de ácido fórmico (disolvente B). El gradiente de elución fue el siguiente: inicial 50% B, después de 10 min 100% B y de 11 a 15 min 50% B. El caudal de disolvente fue 0,221 ml / min. El efluente se introdujo en la fuente de electrospray (modo positivo) a una temperatura de 100 °C y se operó a una tensión capilar de 2,7 Kv. El gas de desolvatación era nitrógeno con una temperatura de 400°C. Los caudales de gas de cono y de desolvatación se establecieron a 25 l/h y 800 l/h, respectivamente. El voltaje del cono en modo de iones positivos se estableció en 40 V.

Para identificar los compuestos estándar, la fórmula molecular se estableció por “ion cuasi-molecular” de alta precisión como [M + H]<sup>+</sup> dentro

de un error de masa de 5 ppm. Luego, se buscó la fórmula molecular más racional en bases de datos químicas ([www.chemspider.com](http://www.chemspider.com)).

### 3.5.2. Aminoácidos.

#### 3.5.2.1 Preparación de extractos.

Los extractos se prepararon a partir de 0,1 g de nódulos homogeneizados en una solución de etanol:cloroformo:agua en proporción 12:5:1 (v/v). El homogeneizado se centrifugó a 5,500xg a 4°C durante 10 min. Se extrajo la fase acuosa y se secó mediante corriente de N<sub>2</sub>. Posteriormente se resuspendieron las muestras en una solución metanol-agua al 50% (v/v).

La derivatización de los aminoácidos se llevó a cabo utilizando un kit de derivatización AccQ Tag (Waters) siguiendo los protocolos de dicho fabricante.

Se mezclaron 10 µl de una solución estándar de aminoácidos para el patrón o 10 µl de extracto biológico con 70 µl de tampón borato sódico 0,4 M y 20 µl de reactivo AccQ•Tag previamente disuelto en 1 ml de diluyente *ultra-reactivo*. La reacción se incubó durante 10 min a 55°C. El análisis por cromatografía de líquidos se realizó en un sistema Waters Acquity UPLC, equipado con un administrador binario de disolventes, un muestreador automático, un calentador de columna, un detector de fotodiodo array (PDA) e interconectado a un detector de cuadrupolo en tándem. La columna de separación era una columna Waters AccQ•Tag Ultra (2,1 mm i.d. × 100 mm, partículas de 1,7 µm). El calentador de columna se ajustó a 55°C y la velocidad de flujo de la fase móvil se mantuvo a 0,7 ml / min. El eluyente A fue disolvente A al 10% AccQ•Tag, y el eluyente B disolvente 100% AccQ•Tag. El gradiente de separación no lineal fue 0-0.54 min (99.9% A), 5.74 min (90.0% A), 7,74 min (78,8% A), 8,04 - 8,64 min (40,4% A), 8,73 - 10 min (99,9% A). Se utilizó una columna VanGuard™ Waters (partículas de 2,1 mm i.d. × 5 mm, 1,7 µm) como columna de protección. Se inyectó 1 µl de muestra para el análisis. El detector de PDA se estableció a 260 nm, con una velocidad de muestreo de 20 puntos / seg. Para la cuantificación se utilizaron aminoácidos standards (Sigma) en rangos de 1 a 50 µmol.

### **3.5.3. Prolina.**

La Pro se determinó por el método de la ninhidrina (Troll and Lindsley 1955). Se homogeneizaron 250 mg de material vegetal en 3 ml de etanol al 95% (v/v) y se centrifugó a 2,000xg durante 5 min a temperatura ambiente. Del sobrenadante se hicieron alícuotas de 0,2 ml de extracto. A cada alícuota se añadieron 0,3 ml de agua destilada y 2 ml de reactivo de ninhidrina. Esta mezcla se incubó durante 60 min a 100°C, la reacción se detuvo enfriando las muestras en hielo y a continuación el cromóforo resultante se extrajo con 6 ml de tolueno mediante agitación durante 20 seg. La absorbancia de la fase orgánica resultante se midió a 520 nm con un espectrofotómetro Varian UV-VIS. La calibración se realizó utilizando L-Pro como estándar, en cantidades comprendidas entre 2,5 y 20 µg siguiendo el procedimiento ya descrito. El contenido se expresó como µg de Pro en g<sup>-1</sup> PF y nanomoles de Pro en g<sup>-1</sup> PF.

### **3.5.4. Proteína soluble.**

El contenido de proteínas solubles en los extractos utilizados para determinar las actividades enzimáticas, se estimó mediante el método de (Lowry et al. 1951), con las modificaciones introducidas por (Markwell et al. 1978). A 50 µl de muestra se adicionaron 950 µl de NaOH 0.4 M y 3 ml de reactivo A. Se agitaron los tubos e incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. A continuación, se adicionó 0.3 ml de reactivo de Folin-Cicolteau (reactivo de fenol) diluido 1:1 en agua destilada y se incubó a temperatura ambiente 30 min midiéndose la D.O. a 660 nm. Los resultados, expresados como mg g<sup>-1</sup> PF, se obtuvieron a partir de una curva patrón de albúmina de concentraciones comprendidas entre 10 y 80 µg ml<sup>-1</sup>.

El reactivo A presentó 100 partes de reactivo B y una de reactivo C. El reactivo B está formado por: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2.0% (p/v), NaOH 0.4% (p/v), tartrato de sodio y potasio 0.16% (p/v), dodecil sulfato sódico (SDS) 1% (p/v). El reactivo C contiene CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O 4.0% (p/v).

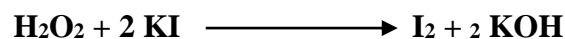
## **3.6 Detección de peróxido de hidrógeno.**

El análisis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se realizó en hojas de plantas de *M. truncatula* de dos semanas de edad cultivadas en tubos de ensayo de vidrio tal y como se describe en el apartado 2. Las plantas se pre-trataron con Spm 0,1 mM o con

aminoguanidina (AG) 0,5 mM y con NaCl 150 mM durante 24 h y 48 h respectivamente antes de la cosecha. Posteriormente se procedió a la detección cuantitativa e histoquímica de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 3.6.1. Detección cuantitativa de peróxido de hidrógeno.

La determinación cuantitativa de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se realizó por espectrofotometría (Alexieva et al. 2001). Esta técnica se basa en la reacción que se produce en medio ácido del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con KI, liberando iodo que virará la reacción hacia un color amarillo medible por colorimetría a 390 nm.



El extracto se obtuvo utilizando 0,1 g de hoja de *M. truncatula* homogeneizados en 1,2 ml de ácido tricloroacético (TCA) 0.1% (p/v), el cual se centrifugó a 12000xg 15 min a 4°C. La mezcla de reacción consistió en 0,5 ml de extracto, 0,5 ml de tampón fosfato potásico 100 mM pH 7 y 1 ml de KI 1 M. Los blancos consistieron en 0,1% de TCA en lugar de extracto de hoja. La reacción se desarrolló durante 1 h en oscuridad y la absorbancia se midió a 390 nm. La cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se calculó utilizando una curva estándar preparada con concentraciones 0, 25, 50 100 y 150 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 3.6.2. Detección histoquímica de peróxido de hidrógeno.

El análisis histoquímico de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se realizó en hojas de plantas de *M. truncatula*. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se localizó histoquímicamente mediante tinción de las hojas con solución de 3,3-diaminobencidina (DAB) al 1% que contenía fosfato sódico 10 mM, Tween 20 (0,05% v/v) de acuerdo con Romero-Puertas et al. (2004). Las hojas se sumergieron completamente en la solución de tinción (DAB) y las plantas control en una solución de fosfato sódico 10 mM. Para mejorar la infiltración se aplicó vacío durante 5 min. Las muestras se agitaron durante 5 h en oscuridad, ya que DAB es sensible a la luz. Transcurrido ese tiempo, la DAB reacciona con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apareciendo manchas marrones. Se reemplazó la solución de tinción por etanol 96% y se pusieron las muestras en baño térmico para eliminar la clorofila.

### **3.7. Detección histoquímica de anión superóxido ( $O_2^-$ ).**

El revelado histoquímico de  $O_2^-$  en hojas de *M. truncatula* se realizó mediante una tinción con cloruro de nitrotetrazolio azul (NBT) (Kumar et al. 2014). El material vegetal fue sumergido en la solución de tinción NBT al 0,1% (p/v) que contenía tampón fosfato sódico 50 mM a pH 7,5. Para mejorar la infiltración se aplicó vacío durante 5 min. Se dejó incubar 12h en oscuridad y a temperatura ambiente. Durante la incubación el NBT reacciona con  $O_2^-$  para formar un compuesto azul oscuro (NBT-Diformazan) que revela la presencia y distribución de  $O_2^-$  en las células vegetales. Se reemplazó la solución de tinción por etanol 96% y se pusieron las muestras en baño térmico para eliminar la clorofila, con el fin de obtener una visualización óptima.

### **3.8. Peroxidación de lípidos de membrana.**

La peroxidación lipídica se determinó midiendo el nivel de malondialdehído (MDA), producto de la peroxidación lipídica, mediante la reacción con ácido tiobarbitúrico (TBA) (Hodges et al. 1999).

Se maceraron 0,1 g de material vegetal en 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) (20% p/v) y 0,2 ml de butilhidroxitolueno (BHT) al 4% (p/v) en etanol a 4°C. El homogenado se centrifugó a 10,000xg durante 15 min a 4°C. Se procedió a hacer la mezcla de reacción de alícuotas de 0,25 ml del sobrenadante con 0,75 ml de TBA al 0,5% (p/v) en TCA al 20% y la mezcla se incubó a 94°C durante 30 min. La reacción se detuvo por enfriamiento en un baño de hielo durante 15 min. Se volvió centrifugar a 10,000xg durante 15 min y los sobrenadantes se utilizaron para determinar la absorbancia a 532 nm (absorbancia específica) y a 600 nm (absorbancia no específica). Para el cálculo de MDA producido, se restó al valor de la absorbancia a 532 nm el valor de la absorbancia a 600 nm y se comparó con una curva estándar preparada con concentraciones de 0, 4, 8, 16 y 32  $\mu$ M de MDA.

### **3.9. Técnicas moleculares.**

#### **3.9.1. Análisis de la expresión génica.**

##### **3.9.1.1. Obtención de ARN total.**

A partir de 0,1 g de material vegetal se procedió a la extracción de ARN total utilizando un kit para plantas RNeasy (Macherey-Nagel, Düren, Alemania). Posteriormente se realizó un tratamiento con ADNasa I (Ambion, Austin Texas, EE. UU.), para la eliminación de ADN genómico según las instrucciones de los proveedores.

### 3.9.1.2. Síntesis de ADNc.

El ADNc se sintetizó a partir de 1,5 µg de ARN total mediante retrotranscripción *in vitro* usando un oligo-dT<sub>17</sub> y la enzima reversotranscriptasa proporcionada por el kit RT-PCR iScript (Bio-Rad, California, EE. UU) de acuerdo a las indicaciones incluidas en el mismo:

1. Mezclar en un tubo de microcentrífuga:

1.5 µg de ARN total

1 µl de dNTPs 10 mM

0.5 µg de oligo-dT.

Agua-DEPC hasta 12 µl

2. Mezclar por pipeteo e incubar la mezcla a 65°C durante 5 min.

3. Poner los tubos en hielo y añadir:

4 µl Tampón (5x)

2 µl DTT 0.1 M

1 µl Inhibidor de RNasa RNaseOUT (40 U/µl)

4. Mezclar suavemente e incubar a 37°C durante 3 min.

5. Añadir 1 µl (200 U) de transcriptasa inversa de iScript (Bio-Rad, California, EE. UU) y mezclar pipeteando.

6. Incubar a 42°C durante 50 min.

7. Inactivar la reacción incubando a 70°C durante 15 min.

8. Guardar el ADNc a -20°C hasta su uso.

### **3.9.1.3. Amplificación del ADNc por PCR.**

El ADNc de la primera cadena resultante se amplificó utilizando cebadores específicos diseñados a partir de la región transcrita de cada gen y para tener una temperatura de apareamiento similar. Como control de carga se utilizó el gen que codifica actina (Gene Bank KF033666.1).

Las amplificaciones por PCR se realizaron en una mezcla de reacción de 20  $\mu$ l en un termociclador ThermoHybaid PX2 según el protocolo que se describe a continuación:

- 1- Ciclo de 2 min a 94°C.
- 2- 35 ciclos de 30 seg a 94°C.
- 3- 30 seg a 56°C.
- 4- 1 min a 72°C.
- 5- Una extensión final a 72°C durante 10 min.
- 6- Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v).

### **3.9.1.4. Amplificación por PCR en tiempo real.**

La PCR en tiempo real (qPCR) se realizó usando un kit SYBR Green PCR Master que contiene ADN polimerasa Platinum Taq (Invitrogen) en un termociclador iCycler IQ (Bio-Rad). La mezcla para amplificación de PCR contenía:

- 10 ng de molde de ADNc.
- 0,5 U de polimerasa.

Los ciclos para la qPCR fueron elegidos de acuerdo con el fabricante:

- 1- Activación de polimerasa, 10 min a 95°C
- 2- 35 ciclos a 95°C durante 15 sg,
- 3- 55°C durante 30 sg
- 4- 72°C durante 20 sg.

Los resultados se cuantificaron utilizando el método  $\Delta\Delta C_t$  (Livak and Schmittgen 2001). Los niveles de transcripción se normalizaron con la



expresión del gen de actina. Las secuencias de cebador para el análisis de qPCR se proporcionan a continuación

### 3.9.1.5. Secuencias de nucleótidos específicos para la expresión génica y qPCR.

1-Oligos para *Phaseolus vulgaris*.

Gen	Secuencia de Oligonucleotidos	Tamaño producto
<i>Pv ADC</i>	Fw 5'-CTTATCTGGTTCCCCTGTCTT-3' Rv 5'-CGAACGACAACAACAAGCAAC-3'	161 bp
<i>Pv ODC</i>	Fw 5'-GTAGAATCCCAAGCTGAAGATG-3' Rv 5'-GATATTGAAGGGAGAAACCACG-3'	132 bp
<i>Pv SAMDC</i>	Fw 5'-GATCAACTCTGAAGTGCTGG-3' Rv 5'-CAAACGCCATAGAGACATTACG-3'	149 bp
<i>Pv SPDS</i>	Fw 5'-CGGCTTTCTGTTTGCCATCTT-3' Rv 5'-CCTTGAAGCTCTTAACTTATTCCAC-3'	163 bp
<i>Pv SPMS</i>	Fw 5'-GTGAAGAGAGAAGTGAGTCTG-3' Rv 5'-GAGAGGACAAAGCTATTCAACC-3'	132 bp
<i>Pv Actin</i>	Fw 5'-GTCAGTCACACGGTTCCTATC-3' Rv 5'-CACGCTCGGTCAGGATTT-3'	115 bp

## Material y Métodos

### 2-Oligos para *Medicago truncatula*..

Gen	Secuencia de Oligonucleotidos	Tamaño producto
<i>Mt DWF4</i>	Fw 5'-TTCCATGTGGGTGGAAAGTC-3' Rv 5'-GATCCTGCGCATAATCTTGG-3'	171 bp
<i>Mt CYP85</i>	Fw 5'-CTGTGAAGTACCTCCATGAC-3' Rv 5'-GTGGCCAATCTAGTTGTCTC-3'	162 bp
<i>Mt ADC</i>	Fw 5'-GTGACAGTGATGGGAAGATTGA-3' Rv 5'-CACCCAAGAACATTCCCAGATA-3'	108 bp
<i>Mt SPDS</i>	Fw 5'-CACGGTTCCTACATACCCAAG-3' Rv 5'-TGCTGGCTATCATTCTCATCAA-3'	163 bp
<i>Mt SPMS</i>	Fw 5'-TATGCATGGGCAAGTGTTC-3' Rv 5'-GCAACCTCACCTCATTCTTC-3'	216 bp
<i>Mt PAO1</i>	Fw 5'-GGCCTGACGTAGAACTTATG-3' Rv 5'-GCACGTAGCTTGTCATACAC-3'	312 bp
<i>Mt Actin</i>	Fw 5'-ATGGGGCAGAAGGATGCGTATG-3' Rv 5'-AGCCTTCATAGATGGGGACCGT-3'	115 bp

### 3.10. Análisis estadístico

Los experimentos se organizaron en un diseño completamente al azar con un total de 60 plantas por tratamiento, excepto con *P. vulgaris* que se utilizaron 12 plantas. Se utilizaron 20 plantas por tratamiento para las cinéticas de nodulación y 3 grupos de 6 plantas por tratamiento para los análisis de expresión. Los datos se sometieron a un análisis de ANOVA de dos vías utilizando como factores los distintos tratamientos de cada experimento el software SPSS 24.0. Las diferencias significativas entre los tratamientos se determinaron mediante el test de mínima diferencia significativa (MDS) ( $P \leq 0.05$ ). Los análisis se realizaron por triplicado ( $n=3$ ). Los valores medios  $\pm$  barras de error estándar están representados en gráficas o tablas con letras que indican diferencias significativas incluidas, en el apartado de resultados.

# ***V- RESULTADOS***



## **1. Estudio comparativo de la implicación de las PAs en la respuesta a la salinidad de la simbiosis rizobio-leguminosa en nódulos determinados e indeterminados.**

La finalidad de este estudio es comparar la implicación de las PAs en los mecanismos de tolerancia a la salinidad de la simbiosis rizobio-leguminosa, tanto en nódulos indeterminados (*M. sativa* – *S. meliloti*) como en determinados (*P. vulgaris* – *R. tropici*). Además, dado el papel de las PAs como reguladores del crecimiento y de la respuesta defensiva de la planta, analizaremos su participación en el establecimiento de la simbiosis *M. sativa* – *S. meliloti*.

### **1.1. Experimento 1: Implicación de las PAs en la respuesta a la salinidad en nódulos indeterminados de la simbiosis *M. sativa*-*S. meliloti*.**

Se estudió la respuesta de la simbiosis con diferentes dosis de sal (0, 100 y 150 mM NaCl) y en tres etapas de desarrollo de la planta. Los tratamientos salinos se aplicaron a la solución nutritiva durante el crecimiento vegetativo (5ª semana). Las plantas control se regaron con solución nutritiva sin NaCl. Los muestreos se realizaron en tres tiempos diferentes: a las dos semanas de adicionar el tratamiento salino (estado vegetativo), a las 4 semanas de tratamiento (periodo de floración) y durante el periodo inicial de fructificación que correspondió con la 6ª semana después del tratamiento. Muestras de hojas, nódulos y raíces se conservaron a -80°C para posteriores determinaciones.

#### **1.1.1. Análisis de crecimiento.**

Se estudiaron los parámetros de peso seco de la parte aérea y raíz como principales indicadores del crecimiento vegetal, como se refleja en la **figura 1.1.1**.

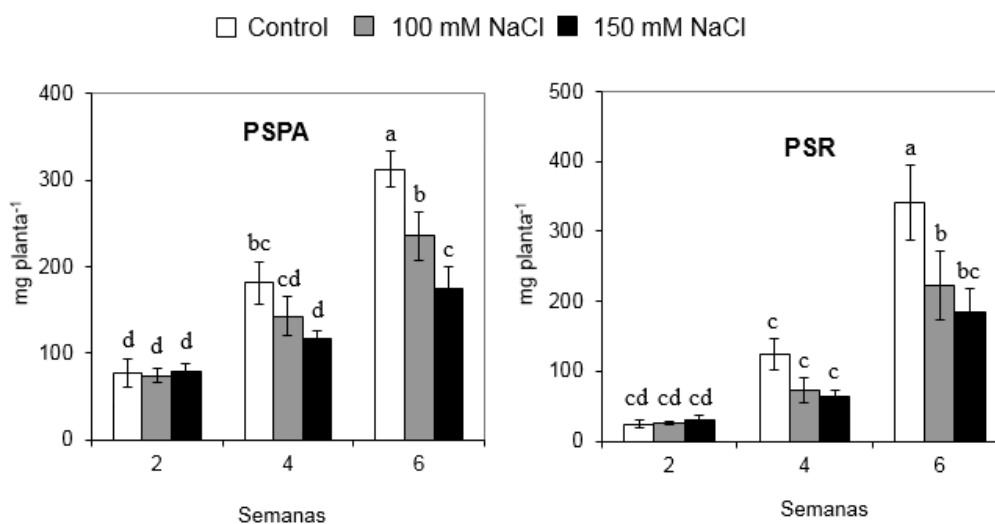
El peso seco de parte aérea (PSPA) a las dos semanas del inicio del tratamiento salino no mostró diferencias con respecto a las plantas control. Sin embargo, la salinidad provocó un descenso notable en este parámetro a las 4 semanas de tratamiento 100 mM y 150 mM cuando disminuyó un 20% y 35% respectivamente, siendo a las 6 semanas el descenso más acusado,

## Resultados

sobre todo con la mayor concentración salina, con hasta un 45 % de inhibición de crecimiento.

El peso seco raíces (PSR) mostró resultados muy similares a los obtenidos en el PSPA, alcanzándose a la 4<sup>o</sup> semana una reducción del crecimiento del 40% con 100 mM de NaCl y 50% con 150 mM. Estas variaciones de crecimiento radicular se mantuvieron durante la 6<sup>o</sup> semana de tratamiento.

Tanto en parte aérea como en raíz la reducción de crecimiento fue proporcional a la dosis de sal.



**Figura 1.1.1.** Parámetros de crecimiento: peso seco de parte aérea (PSPA, mg planta<sup>-1</sup>) y peso seco de raíz (PSR, mg planta<sup>-1</sup>) de plantas de *M. sativa* inoculadas con *S. meliloti* 1021, tratadas con NaCl 2, 4 y 6 semanas. Los datos representan medias + E.E. (n = 12). Los valores medios con la misma letra no difieren (P < 0.05) utilizando el test de MDS.

### 1.1.2. Fijación de nitrógeno.

En la **tabla 1.1.2.** se muestran parámetros relacionados con la fijación de nitrógeno, entre los que se encuentran: actividad nitrogenasa aparente (ANA), actividad nitrogenasa total (ANT), tasa de fijación de nitrógeno (TFN), coeficiente de transporte de electrones (CTE) y peso seco de nódulos (PSN) por planta.

**Tabla 1.1.2.** Parámetros de fijación de nitrógeno: actividad nitrogenasa aparente (ANA,  $\mu\text{mol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ); actividad nitrogenasa total (ANT,  $\mu\text{mol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), tasa de fijación de nitrógeno (TFN,  $\mu\text{mol N}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), coeficiente de transporte de electrones (CTE) y peso seco de nódulos (PSN, mg) de plantas de *M. sativa* inoculadas con *S. meliloti* 1021, tratadas con NaCl 2, 4 y 6 semanas. Los datos representan medias + E.E. (n = 12). Los valores medios con la misma letra no difieren ( $P < 0.05$ ) utilizando el test de MDS.

Semanas	NaCl (mM)	ANA	ANT	TFN	CTE	PSN
2	0	1.95 <sup>b</sup>	9.82 <sup>b</sup>	2.62 <sup>a</sup>	0.80 <sup>ab</sup>	9.40 <sup>cd</sup>
	100	1.09 <sup>cd</sup>	4.74 <sup>d</sup>	1.22 <sup>d</sup>	0.77 <sup>b</sup>	6.00 <sup>d</sup>
	150	0.58 <sup>d</sup>	3.04 <sup>de</sup>	0.82 <sup>e</sup>	0.81 <sup>ab</sup>	4.80 <sup>d</sup>
4	0	2.35 <sup>b</sup>	9.62 <sup>b</sup>	2.42 <sup>b</sup>	0.76 <sup>b</sup>	19.20 <sup>b</sup>
	100	1.53 <sup>bc</sup>	6.92 <sup>c</sup>	1.80 <sup>c</sup>	0.78 <sup>ab</sup>	16.40 <sup>bc</sup>
	150	0.67 <sup>d</sup>	4.03 <sup>d</sup>	1.12 <sup>d</sup>	0.83 <sup>a</sup>	10.40 <sup>c</sup>
6	0	4.98 <sup>a</sup>	12.18 <sup>a</sup>	2.40 <sup>b</sup>	0.59 <sup>d</sup>	31.20 <sup>a</sup>
	100	0.78 <sup>d</sup>	2.30 <sup>de</sup>	0.50 <sup>f</sup>	0.66 <sup>c</sup>	12.40 <sup>c</sup>
	150	0.41 <sup>d</sup>	1.57 <sup>e</sup>	0.39 <sup>f</sup>	0.74 <sup>b</sup>	9.80 <sup>cd</sup>
MSD (0.05)		0.99	1.82	0.17	0.03	4.88

La actividad nitrogenasa se inhibió fuertemente con el tratamiento 150 mM de NaCl a las dos semanas, con aproximadamente un 70% de reducción en todos los parámetros determinados (ANA, ANT y TFN). A las seis semanas la reducción fue de entorno el 90%. Con la dosis 100 mM de sal se observa una reducción menor en las primeras semanas, sin embargo, hacia el final del experimento estos parámetros alcanzaron una reducción similar a la dosis más elevada (80%).

De forma similar a la actividad de nitrogenasa, el peso seco de nódulos (PSN) también se redujo por los tratamientos salinos de manera proporcional a la dosis y el tiempo, observándose un 35% y 50% de reducción con 100 mM y 150 mM NaCl a las 2 semanas de tratamiento, respectivamente, y un 60% y 70% a las 6 semanas.

El coeficiente de transporte de electrones (CTE) no cambió en el primer tiempo debido a la salinidad, pero al cabo de 4 y 6 semanas de tratamiento aumentó un 10% y 25%, con el tratamiento 100mM y 150 mM de NaCl, respectivamente.

### **1.1.3. Contenido de PAs en nódulo.**

Se analizó el contenido de PAs solubles en nódulo, cuyos resultados se exponen en la **figura 1.1.3**. En general las PAs solubles descendieron debido a los tratamientos salinos independientemente de la duración del tratamiento.

Los niveles de Put fueron los más sensibles a la salinidad con reducciones comprendidas entre el 50% y el 70 % entre el control y las plantas tratadas con 100 mM y 150 mM NaCl.

Los niveles de Spd disminuyeron de manera proporcional a la dosis de sal en todos los tiempos un 10% a 30%, respectivamente.

La Homspd mostró diferentes respuestas a la salinidad según la duración del tratamiento: 2 semanas después del inicio se observó una reducción de aproximadamente 30% con salinidad, sin embargo, a las 4 y 6 semanas, solo se detectaron pequeñas diferencias no significativas.

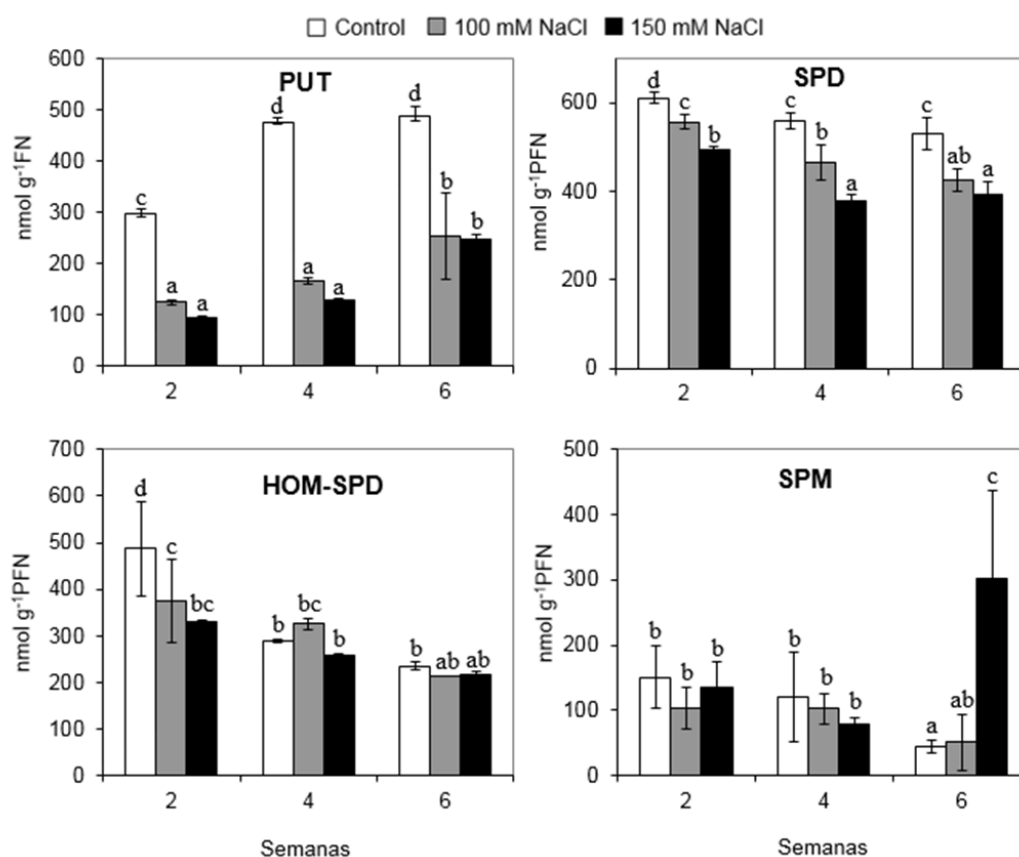
En cuanto a la Spm, la variación de sus niveles también fue diferente dependiendo de la duración de los tratamientos con sal. Al cabo de 2 y 4 semanas no se detectaron diferencias significativas con respecto a los controles, pero después de 6 semanas, se observó un aumento en la concentración de esta poliamina, aproximadamente 7 veces mayor que el control en las plantas tratadas con 150 mM NaCl.

En general, con la excepción de Put, los niveles de PAs disminuyeron durante la ontogenia del nódulo, con las concentraciones más altas correspondiendo a plantas en etapa de crecimiento vegetativo y las inferiores a plantas al inicio de la etapa de floración.

### **1.1.4. Contenido de PAs en las diferentes fracciones nodulares y en bacterias de vida libre.**

Los niveles de PAs se examinaron en diferentes fracciones nodulares y se compararon con las bacterias en vida libre para determinar su origen vegetal o bacteriano en el nódulo (**Tabla 1.1.4**). La mayoría de las PAs detectadas en el nódulo fueron producidas por los bacteroides, donde sus concentraciones eran mucho más altas en comparación con la fracción citosólica. La Homspd no se detectó en la fracción citosólica, a pesar de ser una de las PAs más abundantes en el nódulo (**Fig. 1.1.3**), mientras que en bacteroides tampoco se detectó Put. Los niveles de todas las PAs detectadas fueron mayores en las bacterias en vida libre, con la excepción de Spm que fue 3 veces mayor en bacteroides que en la bacteria en vida libre.





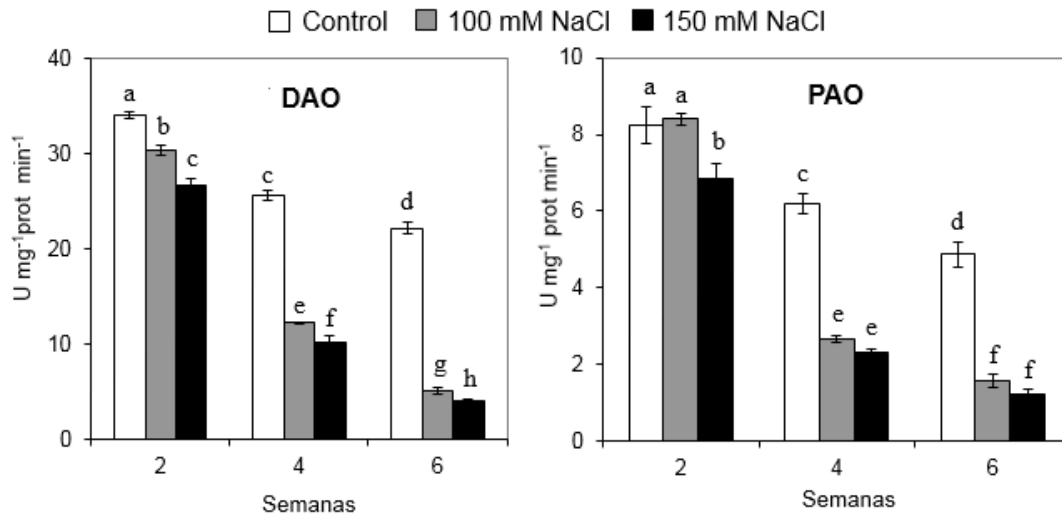
**Figura 1.1.3.** Contenido de putrescina (PUT), espermidina (SPD), homospermidina (HOM-SPD) y espermina (SPM) (nmol g<sup>-1</sup>PFN) en nódulos de plantas de *M. sativa* inoculadas con *S. meliloti* 1021, tratadas con NaCl 2, 4 y 6 semanas. Los datos son medias + E.E. (n = 3). Los valores medios con la misma letra no difieren (P < 0.05) utilizando el test de MDS.

**Tabla 1.1.4.** Contenido de poliaminas en bacterias en vida libre *S. meliloti*, bacteroides y fracción citosólica de nódulos de plantas de *M. sativa* inoculadas con *S. meliloti* 1021. El contenido de poliaminas está expresado como nmol mg<sup>-1</sup> prot. Los valores son medias + E.E. de 3 experimentos independientes.

Fraction	Put	Spd	Homspd	Spm
Bacteria	2.82±0.16	2.38±0.10	4.50±0.17	0.38±0.01
Bacteroides	0.00±0.00	1.87±0.25	3.65±0.20	1.01±0.01
Citosol	0.21±0.03	0.40±0.40	0.00±0.00	0.14±0.01

### 1.1.5. Catabolismo de PAs.

Las actividades enzimáticas diamina oxidasa (DAO) y poliamina oxidasa (PAO), responsables del catabolismo de PAs, sufrieron una inhibición significativa en condiciones de estrés salino (**Fig. 1.1.5.**).



**Figura 1.1.5.** Actividad diamino oxidasa (DAO) y poliamino oxidasa (PAO) (U mg<sup>-1</sup> prot min<sup>-1</sup>) en nódulos de plantas de *M. sativa* inoculadas con *S. meliloti* 1021, tratadas con NaCl 2, 4 y 6 semanas. Los datos son medias + E.E. (n = 3). Los valores medios seguidos por la misma letra no difieren (P < 0.05) utilizando el test de MDS.

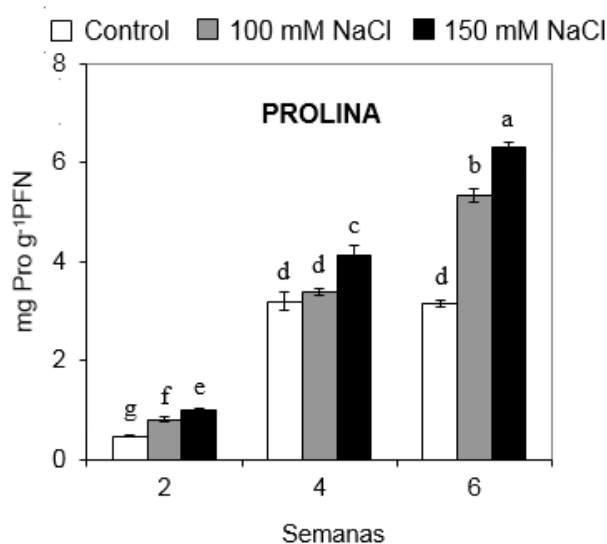
En la actividad DAO, la inhibición por los tratamientos salinos fue proporcional a la duración del tratamiento. Con la dosis 100 mM las tasas de inhibición fueron del 10%, 50% y 75% a las 2, 4 y 6 semanas después del inicio del tratamiento, respectivamente. Con la dosis 150 mM, la disminución de la actividad fue ligeramente mayor, 20%, 60% y 80% para los mismos tiempos, respectivamente.

En la actividad PAO los resultados obtenidos fueron muy similares a los de DAO. Con los tratamientos de 100 mM NaCl hasta la 4ª semana no se observaron diferencias, reduciéndose un 70% a las 6 semanas. Con concentraciones salinas de 150 mM, la disminución fue casi idéntica, detectándose el efecto de la sal desde la 2ª semana.

### 1.1.6. Contenido de Pro.

La concentración de Pro se ha relacionado con el metabolismo de PAs, puesto que la síntesis de este aminoácido se realiza a partir de la degradación de PAs o bien a partir del Glu, por lo que se determinó la concentración Pro en nódulos.

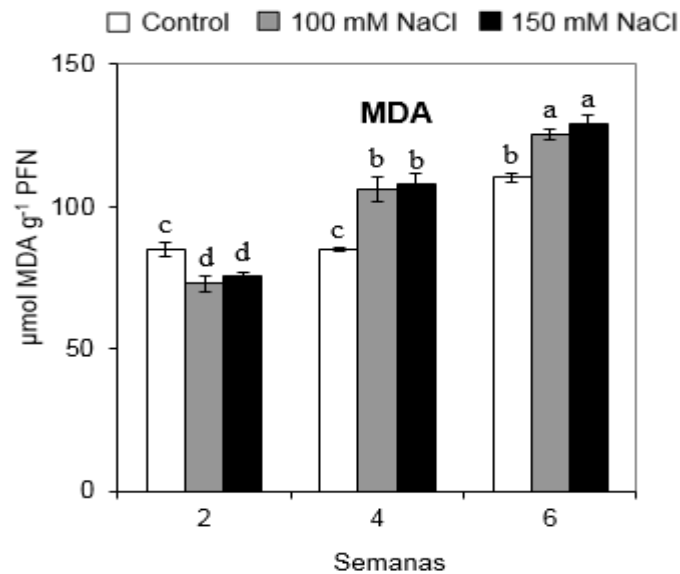
La concentración Pro en nódulo mostró un aumento significativo en condiciones de salinidad (**Fig. 1.1.6.**). La dosis 150 mM de NaCl produjo un aumento a las 2 y 6 semanas alcanzando aproximadamente el doble que la concentración de las plantas control, mientras que con 100 mM NaCl solo indujo un aumento del 70% en el mismo tiempo.



**Figura 1.1.6.** Contenido de Pro (mg Pro g<sup>-1</sup> PFN) en nódulos de plantas de *M. sativa* inoculadas con *S. meliloti* 1021, tratadas con NaCl 2, 4 y 6 semanas. Los datos son medias + E.E. (n = 3). Los valores medios seguidos por la misma letra no difieren (P < 0.05) utilizando el test de MDS.

### 1.1.7. Peroxidación lipídica.

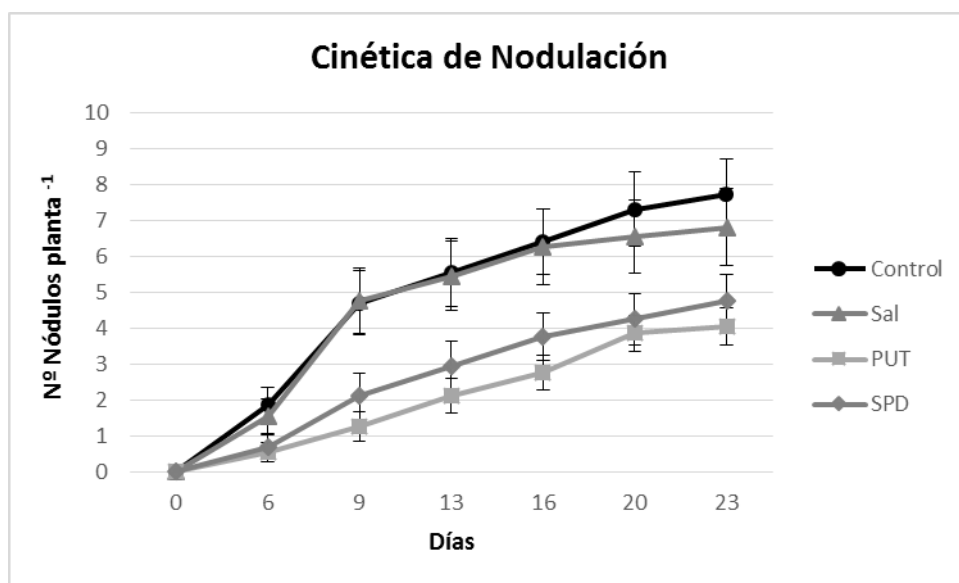
La peroxidación lipídica, estimada a partir de la concentración de malondialdehído (MDA), se determinó como marcador de estrés oxidativo en el nódulo (**Fig. 1.1.7.**). A las 2 semanas del inicio del tratamiento no se incrementó por la salinidad, sin embargo, después de 4 y 6 semanas se observó un aumento de aproximadamente el 30% y 20% en la concentración de este compuesto, independientemente de la dosis de NaCl.



**Figura 1.1.7.** Contenido de MDA ( $\mu\text{mol MDA g}^{-1}$  PFN) en nódulos de plantas de *M. sativa* inoculados con *S. meliloti* 1021, tratadas con NaCl 2, 4 y 6 semanas. Los datos son medias + E.E. ( $n = 3$ ). Los valores medios seguidos por la misma letra no difieren ( $P < 0.05$ ) utilizando el test de MSD.

### 1.1.8. Efecto de las PAs y salinidad en el establecimiento de la simbiosis.

A fin de determinar el efecto de PAs exógenas y salinidad sobre el establecimiento de la simbiosis entre *M. sativa* y *S. meliloti* 1021, se realizaron cinéticas de nodulación en presencia de Put y Spd 1 mM, y NaCl 25 mM (**Fig. 1.1.8**). El número de nódulos por planta se cuantificó durante 3 semanas después de la inoculación. Los primeros nódulos se observaron 6 días después de la inoculación en todos los tratamientos, sin embargo, el número de nódulos se redujo un 75% por los tratamientos con PAs. Se obtuvieron resultados similares a lo largo de toda la cinética de nodulación con una reducción de aproximadamente el 15% a 20% en el número de nódulos debido a la salinidad, mientras que el efecto de las PAs fue más significativo, con un número de nódulos 2 veces inferior en todos los muestreos.

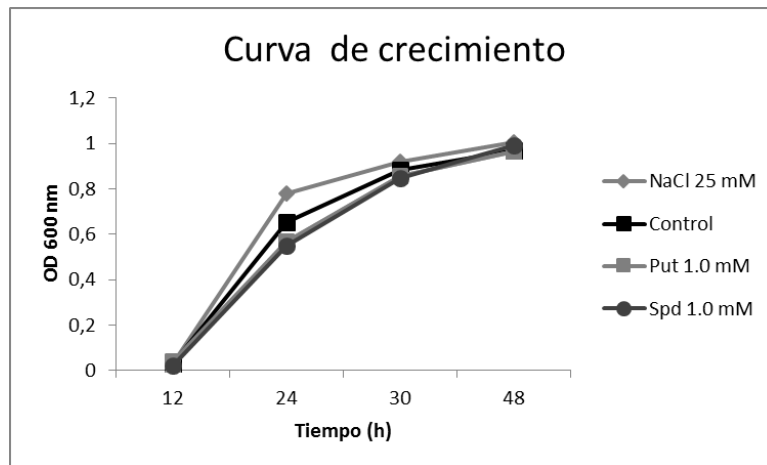


**Figura 1.1.8.** Número de nódulos de plantas de *M. sativa* inoculadas con *S. meliloti* 1021, tratadas con NaCl (25 mM), putrescina (Put 1 mM) y espermidina (Spd 1 mM) y espermidina (Spd 1 mM). Los datos son medias + E.E. (n = 20).

### 1.1.9. Efecto de las PAs y salinidad en el crecimiento de *S. meliloti*.

Con la finalidad de descartar que el efecto de las PAs exógenas y la salinidad sobre el establecimiento de la simbiosis se debiera a una posible reducción de la viabilidad de la bacteria, se estudió el efecto de Put y Spd, 1 mM, así como NaCl 25 mM sobre el crecimiento de *S. meliloti* 1021, utilizada para la cinética de nodulación, mediante curvas de crecimiento (**Fig. 1.1.9.**).

Los tratamientos con Put y Spd redujeron el crecimiento de las bacterias en un 25% después de 24 h, mientras que la salinidad solo provocó una reducción del 15%. Sin embargo, después de 48 h cuando los cultivos alcanzaron la etapa estacionaria, no se detectaron diferencias significativas en el crecimiento de las bacterias.



**Figura 1.1.9.** Curva de crecimiento de *S. meliloti* 1021, en medio TY con cloruro sódico (NaCl 25 mM), putrescina (Put 1 mM) y espermidina (Spd 1 mM). Los datos son medias ( $n = 3$ ). El crecimiento se midió por densidad óptica a 600 nm ( $OD_{600}$ ). No se muestran barras de error.

## **1.2. Experimento 2: Implicación de las PAs en la respuesta a la salinidad en nódulos determinados de la simbiosis *P. vulgaris*- *R. tropici*.**

En este experimento, se cultivaron plantas de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con *Rhizobium tropici*, aplicándose el tratamiento salino (100 mM NaCl) a las 3 semanas de la siembra durante 3 y 7 días antes de la cosecha, que coincidió con el inicio de la floración.

### **1.2.1. Análisis de crecimiento.**

Se determinaron los parámetros relacionados con el crecimiento vegetal que se muestran en la **figura 1.2.1**.

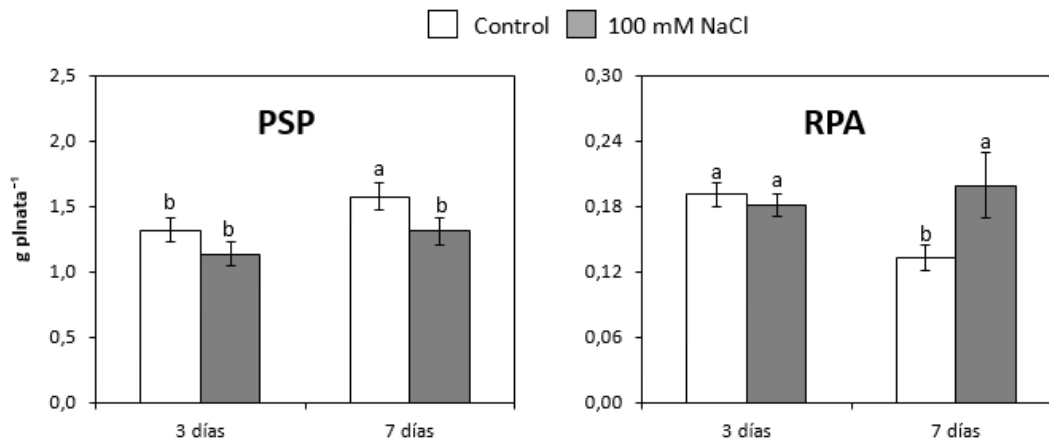
Se detectó una disminución en la producción de biomasa vegetal con una reducción del 20 % del peso seco de la planta (PSP) 7 días después del inicio del tratamiento con sal, mientras que a los 3 días, las diferencias no fueron significativas entre tratamientos.

La inhibición del crecimiento a los 7 días de aplicar el tratamiento salino en *P. vulgaris*, no afectó por igual a la parte aérea y las raíces, como demuestra el aumento de alrededor del 55% en la relación raíz/parte aérea (RPA), indicando un mayor desarrollo radicular, el cuál no se apreció en las plantas tratadas con sal durante 3 días.

### **1.2.2. Fijación de nitrógeno.**

Con el fin de evaluar la capacidad del nódulo de fijar nitrógeno en condiciones de estrés salino, se determinaron varios parámetros relacionados con la actividad nitrogenasa como se muestra en la **figura 1.2.2**.

La actividad nitrogenasa se inhibió por la salinidad de forma proporcional a la duración del tratamiento, con más de un 50% de reducción de la tasa de fijación de nitrógeno (TFN) a los 3 días de tratamiento con sal, y un 90% de reducción a los 7 días. Los resultados de actividad nitrogenasa aparente (ANA) y actividad nitrogenasa total (TNA) presentaron un comportamiento similar en respuesta a la salinidad al de la tasa de fijación de nitrógeno.



**Figura 1.2.1.** Peso seco de la planta (PSP) y relación raíz-parte aérea (RPA) en plantas de *P. vulgaris* inoculadas con *R. tropici* CIAT 899 tratadas con 0 y 100 mM de NaCl durante 3 y 7 días. Los datos son medias + E.E. (n=8). Los valores medios con la misma letra no difieren ( $P < 0.05$ ) utilizando el test de MDS.

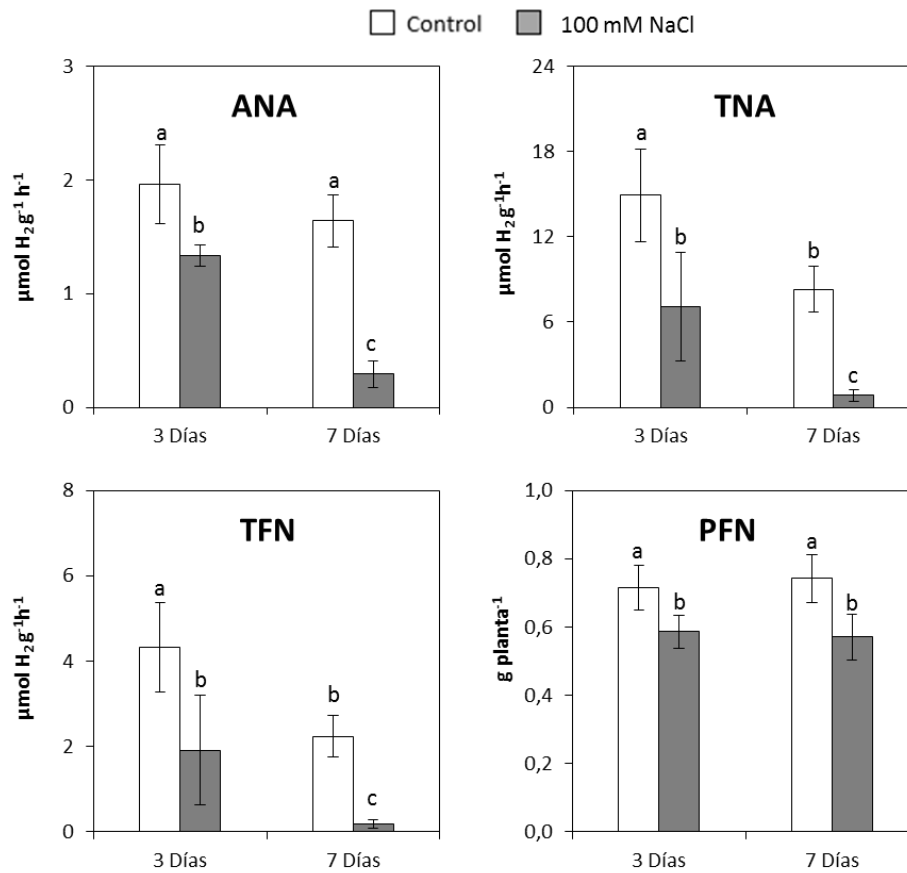
La actividad nitrogenasa (TNA y TFN) disminuyó de forma significativa con el inicio de la floración, mientras que la biomasa nodular se mantuvo, lo que indicaría una reducción en la eficiencia a nivel metabólico del nódulo.

Con respecto a la biomasa de nódulos, solo se observó una inhibición del 20% en peso fresco de nódulo (PFN) por la salinidad en ambos tratamientos.

### 1.2.3. Identificación y análisis de PAs en diferentes órganos de la planta.

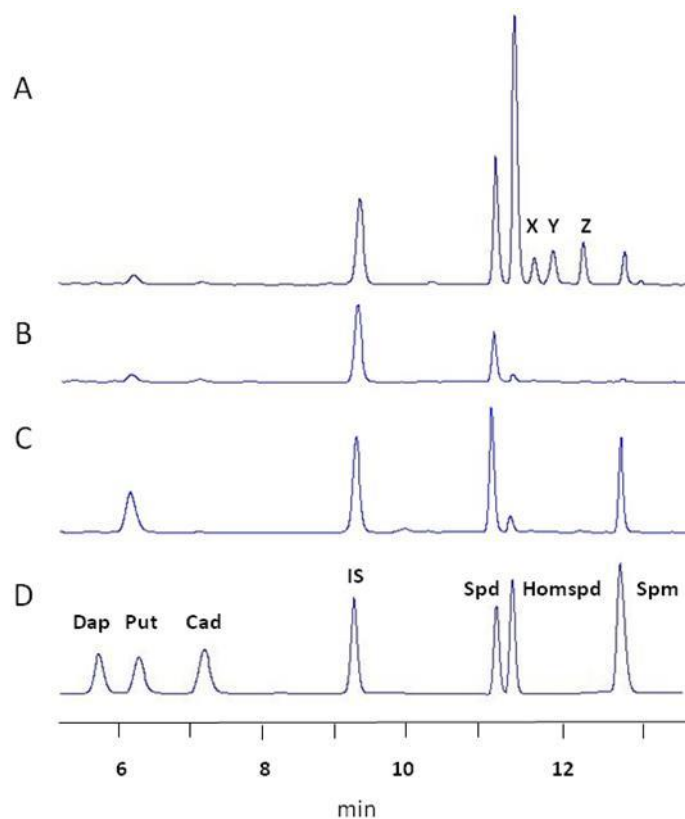
En la **figura 1.2.3.** se muestra un análisis cualitativo de los perfiles de PAs correspondientes a los diferentes órganos de la planta y como se puede observar, el número de PAs detectadas fue mayor en los nódulos en comparación con hojas y raíces. En el cromatograma correspondiente a los nódulos, se detectaron cuatro picos entre Spd y Spm que no pudieron asignarse a ninguna de las PAs comunes (Put, Spd y Spm). En hojas y raíces solo se encontraron PAs comunes como Put, Spd y Spm. El pico posterior a





**Figura 1.2.2.** Actividad nitrogenasa aparente (ANA), actividad nitrogenasa total (ANT), tasa fijación de nitrógeno (TFN) y peso fresco de nódulos (PFN) en plantas de *P. vulgaris* inoculadas con *R. tropici* CIAT 899 tratadas con 0 y 100 mM de NaCl durante 3 y 7 días. Los datos son medias + E.E. (n=8). Los valores medios con la misma letra no difieren ( $P < 0.05$ ) utilizando el test de MDS.

Spd correspondió a la Homspd, mientras que los siguientes tres picos no coincidieron con ninguna de las PAs estándar utilizadas. La Homspd parece ser la poliamina más abundante en nódulos, como lo confirma el ensayo cuantitativo que se muestra en la **tabla 1.2.3**. Por el contrario, PAs comunes como Put y Spm fueron mayoritarias en hojas, en comparación con raíces y nódulos, mientras que la cadaverina (Cad), fue minoritaria en todos los órganos de la planta, sin niveles detectables en hojas.



**Figura 1.2.3.** Perfil de elución de PAs en *P. vulgaris*: nódulos (A), raíces (B), hojas (C) y patrón de PAs (D). Las PAs se extrajeron y se derivatizaron con cloruro de dansilo antes de someterse a análisis por HPLC. 1,7-diaminoheptano se utilizó como estándar interno (IS). Los picos X, Y y Z en el panel A se refieren a compuestos desconocidos. Picos en el panel D: Dap, diaminopropano; Put, putrescina; Cad, cadaverina; Spd, espermidina; Homspd, homoespermidina, Spm, espermina.

Para identificar los compuestos del cromatograma (X, Y, Z) (**Fig. 1.2.3.**), los extractos de nódulos dansilados se analizaron mediante UPLC-MS y la fórmula molecular se estableció por la técnica “ion cuasi-molecular de alta precisión” como  $[M+H]^+$  dentro de un error de masa de 5 ppm. A continuación, se buscó la fórmula molecular más lógica en bases de datos químicas ([www.chemspider.com](http://www.chemspider.com)). El patrón de fragmentación de masa del compuesto X mostró ion en  $m/z$  873 con un error de masa de 0,3 ppm que coincidía con 4-Aminobutylcadaverina (4-ABcad). Por el contrario, no se encontraron coincidencias para los picos Y y Z con ninguna poliamina conocida.

**Tabla 1.2.3.** Contenido de PAs solubles expresado en nmol mg<sup>-1</sup> PF en diferentes órganos de plantas de *P. vulgaris* cultivadas en condiciones de control e inoculadas con *R. tropici* CIAT 899.

Órgano	Put	Cad	Spd	Homspd	Spm
Nódulo	51.16±0.16	21.72±0.14	282.47±6.04	424.91±12.18	48.81±1.45
Raíz	54.00±1.86	27.84±0.26	82.83±3.12	21.44±3.27	17.06±1.95
Hoja	186.14±5.77	nd	184.50±5.60	29.67±2.03	81.63±6.05

Valores son medias ± EE de tres experimentos independientes.  
nd: no detectado.

#### 1.2.4. Contenido de PAs en diferentes fracciones nodulares y en bacterias en vida libre.

Se analizó el contenido de PAs en diferentes fracciones nodulares y se compararon con las bacterias en vida libre para determinar el origen vegetal o bacteriano de las PAs en el tejido nodular (**Tabla 1.2.4.**).

La Homspd fue la poliamina más abundante en bacterias de vida libre y en bacteroides, confirmando el origen bacteroidal de esta poliamina en los nódulos. Por el contrario, solo se detectaron bajas concentraciones de Cad en la fracción citosólica de la planta, lo que sugiere su origen vegetal.

En cuanto a la 4-ABcad, presentó un nivel relativo más alto en bacteroides que en citosol, mientras que no se detectó en las bacterias de vida libre.

Las PAs comunes (Put, Spd, Spm) también fueron analizadas, presentando los rizobios en vida libre mayores niveles de Put. La Spd fue más abundante en la fracción citosólica del nódulo y la Spm se acumuló en mayor cantidad en bacteroides.

## Resultados

**Tabla 1.2.4.** Contenido de PAs expresado en nmol mg<sup>-1</sup>Prot excepto 4-ABcad que se expresa como valores relativos (%) en *R. tropici* en vida libre, bacteroides y fracción citosólica de nódulos de *P. vulgaris* cultivadas en condiciones de control e inoculadas con *R. tropici* CIAT 899.

Fracción	Put	Cad	Spd	Homspd	Spm	ABcad
Bacteria	1.40±002	nd	0.63±0.01	2.14±0.04	0.32±0.01	nd
Bacteroides	0.77±0.01	nd	1.24±0.02	11.70±0.12	0.82±0.01	100±1
Citosol	0.45±0.01	0.36±0.01	2.09±0.07	3.09±0.08	0.32±0.02	39±1

Valores son medias + E.E. de tres experimentos independientes.  
nd: no detectados

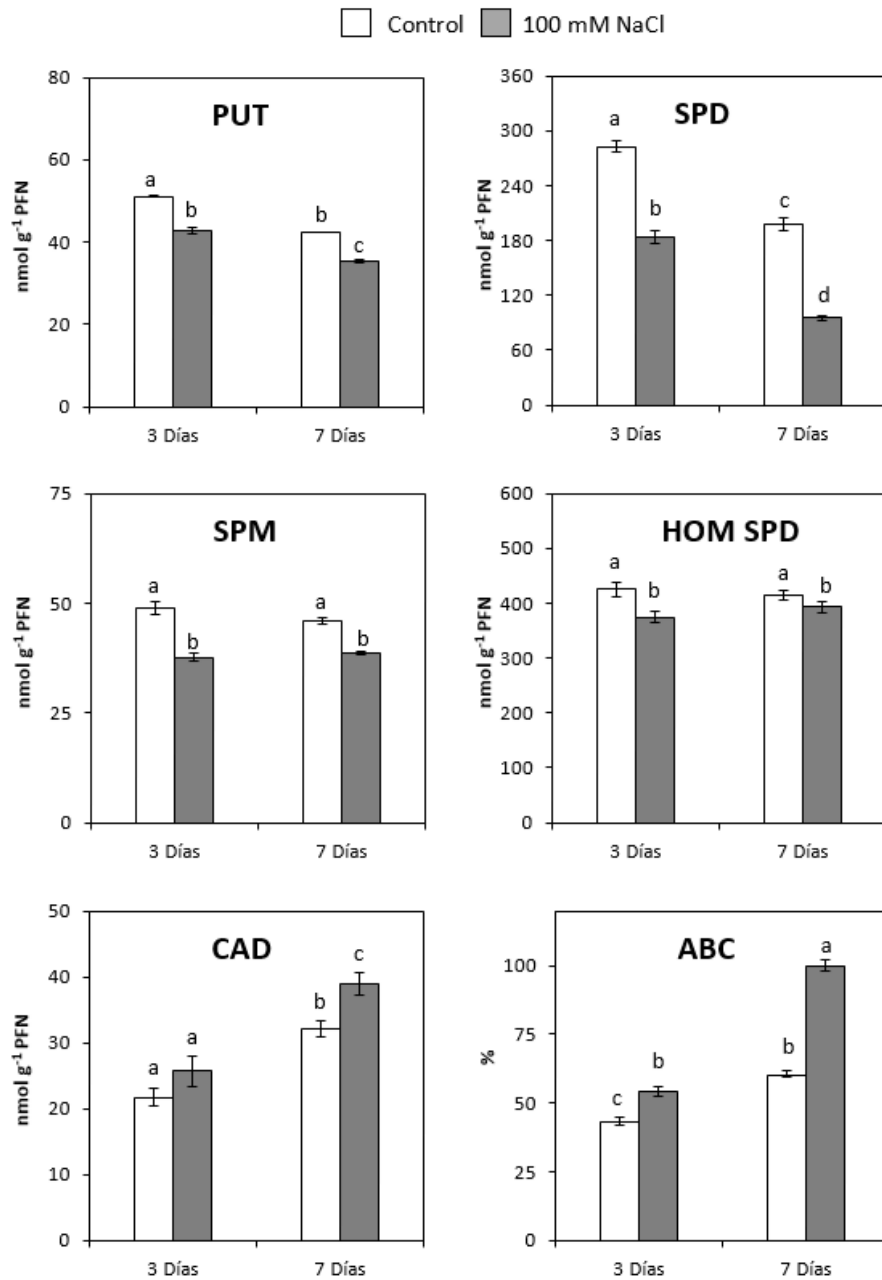
### 1.2.5. Contenido de PAs solubles en nódulos.

La cuantificación de PAs solubles en nódulos se muestra en la **figura 1.2.5.**, observándose una reducción en la cantidad de Put y Spm en los tratamientos salinos para ambos tiempos de en torno al 20%, mientras que la Homspd sólo se vio disminuida en un 10%. Para la Spd la reducción por la salinidad fue más notable con reducciones del 40% a los 3 días de tratamiento y del 50 % a los 7 días. Por otra parte, la Cad aumentó un 20% en estrés salino en los dos tiempos con respecto al control.

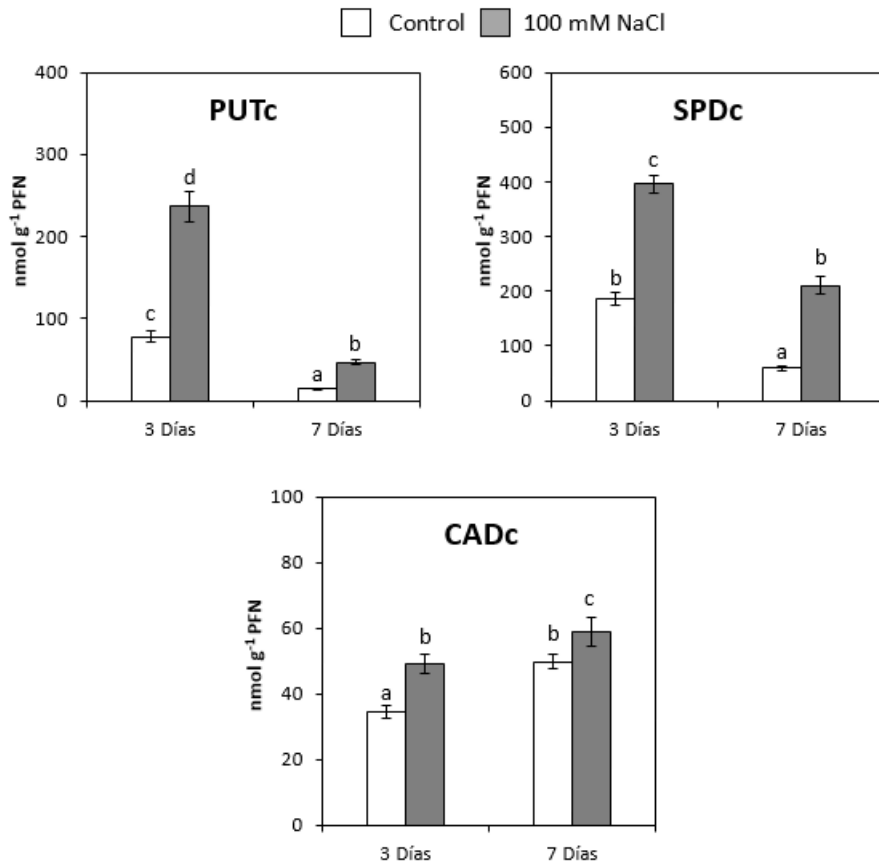
En cuanto a la PA específica del nódulo, 4-ABcad, mostró una respuesta similar al estrés salino que la Cad con un incremento en su concentración de aproximadamente 25% y 70% a los 3 y 7 días, respectivamente.

### 1.2.6. Contenido de PAs conjugadas en nódulos.

El análisis de PAs conjugadas en nódulos revela un incremento en su concentración en condiciones de estrés salino (**Fig. 1.2.6.**), triplicándose y duplicándose los niveles de Put y Spd, respectivamente. Por el contrario, la forma conjugada de Cad mostró el mismo patrón que la forma libre, mientras que no se detectaron formas conjugadas de Spm y Homspd.



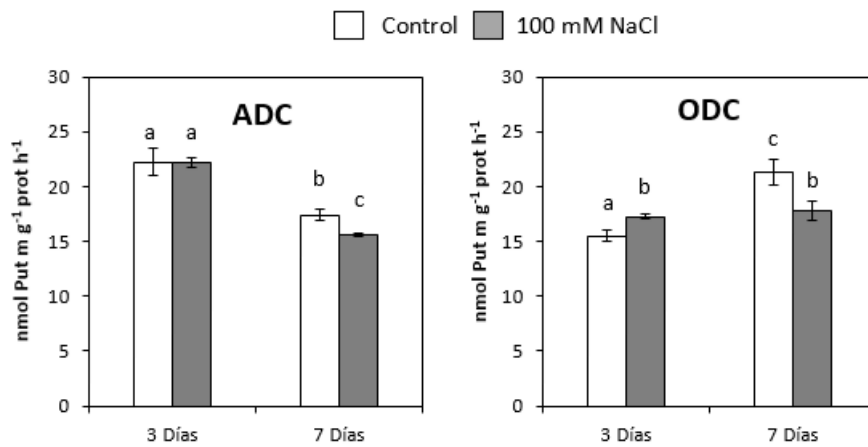
**Figura 1.2.5.** Contenido de PAs solubles en nódulos de *P. vulgaris* inoculadas con *R. tropici* CIAT 899 tratadas con 0 y 100 mM de NaCl durante 3 y 7 días. Put, putrescina; Spd, espermidina; Spm, espermina; Homspd, homoespermidina; Cad, cadaverina; Abc, 4-aminobutilcadaverina. Los datos son medias + E.E. (n=3). Los valores medios con la misma letra no difieren ( $P < 0.05$ ) utilizando el test de MDS.



**Figura 1.2.6.** Contenido de PAs conjugadas en nódulos de *P. vulgaris* inoculada con *R. tropici* CIAT 899 tratadas con 0 y 100 mM de NaCl durante 3 y 7 días. Putc, putrescina; Spdc, espermidina; Cadc, cadaverina. Los datos son medias + E.E. (n=3). Los valores medios con la misma letra no difieren ( $P < 0.05$ ) utilizando el test de MDS.

### 1.2.7. Biosíntesis de PAs en nódulos: actividades ADC y ODC.

La actividad de ADC no mostró respuesta a la salinidad después de 3 días de tratamiento y se detectó una leve inhibición del 10% después de 7 días. Por otro lado, la actividad ODC mostró una inducción del 10% por salinidad a los 3 días y una reducción del 17% a los 7 días de tratamiento.



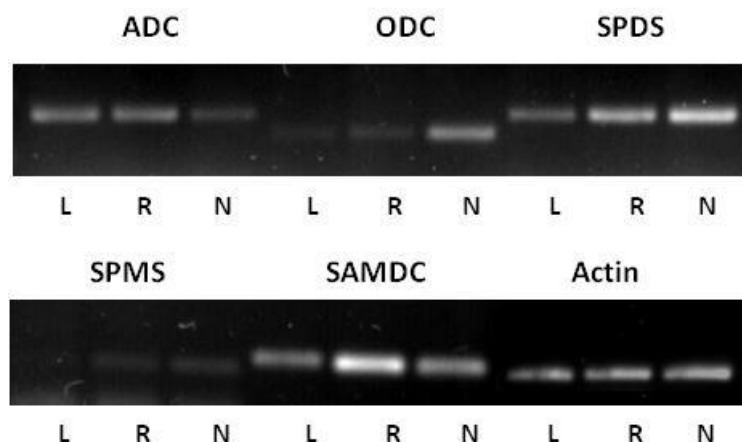
**Figura 1.2.7.** Actividad enzimática arginina descarboxilasa (ADC) y ornitina descarboxilasa (ODC) en nódulos de *P. vulgaris* inoculada con *R. tropici* CIAT 899 tratada con 0 y 100 mM NaCl durante 3 y 7 días. Los datos son medias + E.E. (n=3). Los valores medios con la misma letra no difieren ( $P < 0.05$ ) utilizando el test de MDS.

### 1.2.8. Análisis de expresión de genes implicados en la síntesis de PAs.

Los niveles de transcripción de los genes *Adc*, *Odc*, *Spds*, *Spms* y *Samdc* se analizaron mediante RT-PCR en diferentes tejidos de *P. vulgaris* (Fig. 1.2.8.).

El nivel de expresión del gen *Adc* en el tejido nodular fue muy bajo en comparación con el de hojas y raíces. Sin embargo, la transcripción del gen *Odc* fue mayoritaria en el tejido nodular, y no se detectó en hojas.

La transcripción de *Spds* fue superior en el tejido nodular, teniendo un nivel de expresión intermedio y bajo en raíces y hojas, respectivamente. La transcripción de *Samdc* se produce en hojas y nódulos en niveles similares, mientras que en las raíces se observó que la expresión era más alta. Finalmente, la expresión de *Spms* fue bastante baja en todos los órganos, lo que es consistente con los bajos niveles de Spm detectados en nódulos.

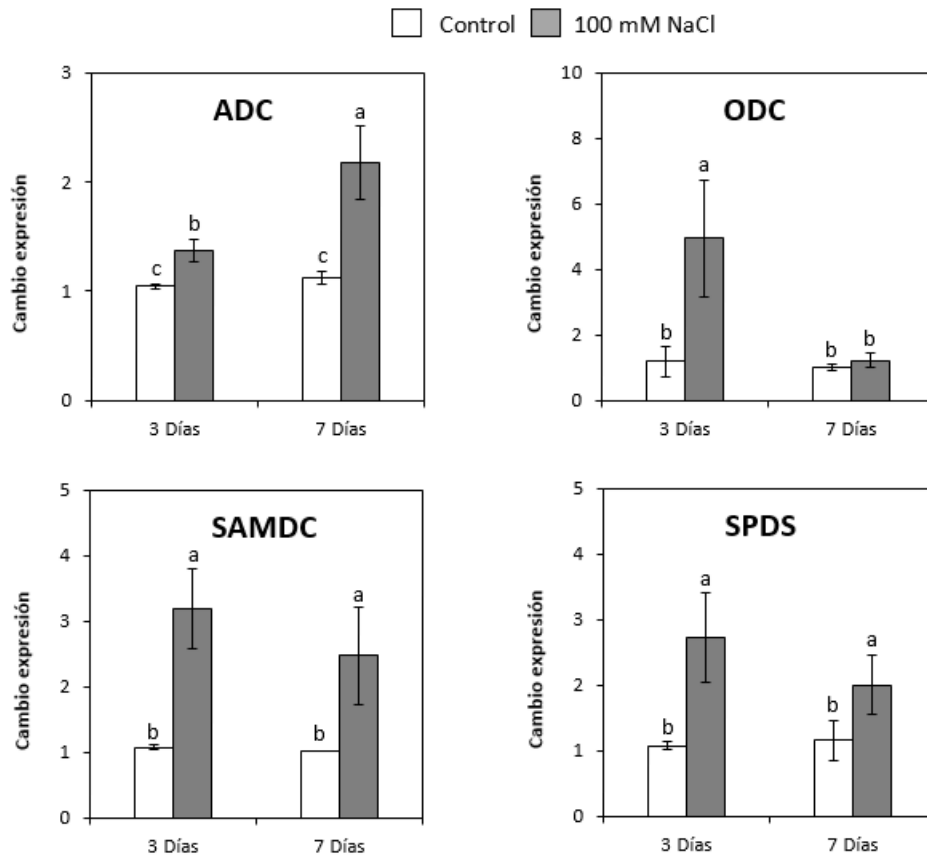


**Figura 1.2.8.** Análisis semicuantitativo de expresión de arginina descarboxilasa (*ADC*), ornitina descarboxilasa (*ODC*), espermidina sintasa (*SPDS*), espermina sintasa (*SPMS*) y S-adenosil-metionina descarboxilasa (*SAMDC*) en hojas (L), raíz (R) y nódulos (N) de plantas de *P. vulgaris* inoculadas con *R. tropici* CIAT 899. La expresión del gen de actina fue utilizada como control constitutivo.

### 1.2.9. Efecto del estrés salino en la expresión de genes implicados en la biosíntesis de PAs en nódulos.

El efecto del estrés salino sobre la expresión de los genes implicados en la síntesis de PAs en nódulos se evaluó mediante qRT-PCR como se muestra en la **figura 1.2.9**. Los genes *Adc* y *Odc*, implicados en la síntesis de Put, se regularon positivamente debido al estrés salino después de 3 y 7 días, sin embargo *Odc* no mostró una variación significativa después de 7 días, aunque su nivel de inducción por la salinidad después de 3 días fue mayor en comparación con *Adc*. De forma similar a *Adc* y *Odc*, los genes *Samdc* y *Spds* mostraron un nivel de expresión 3 y 2 veces mayor por NaCl 100 mM después de 3 y 7 días, respectivamente.





**Figura 1.2.9.** Análisis cuantitativo por RT-PCR de la expresión de arginina descarboxilasa (*ADC*), ornitina descarboxilasa (*ODC*), espermidina sintasa (*SPDS*) y S-adenosil-metionina descarboxilasa (*SAMDC*) en nódulos de *P. vulgaris* inoculada con *R. tropici* CIAT 899 tratada con 0 y 100 mM NaCl durante 3 y 7 días. Los niveles de expresión se normalizaron con el gen constitutivo de la actina y se representan como relativos a las plantas no tratadas. Los datos se expresan como medias y E.E. (n=3). Los valores medios con la misma letra no difieren ( $P < 0.05$ ) utilizando el test de MDS.



## **2. Interacción entre PAs y BRs en la respuesta a la salinidad de la simbiosis *M. truncatula*-*S. meliloti*.**

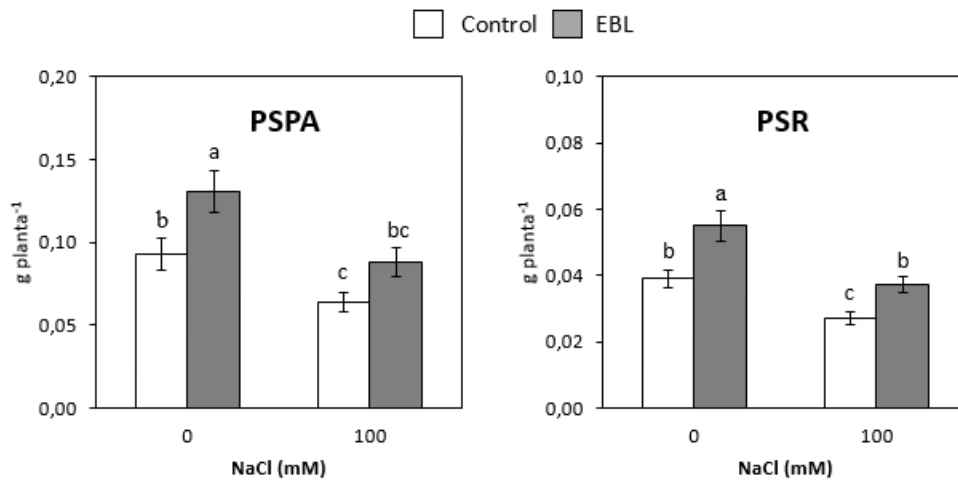
El objetivo principal es profundizar en el mecanismo de acción de las PAs en el que podrían estar diferentes hormonas vegetales, como los BRs, ya que son elementos clave en las respuestas de las plantas frente a estreses abióticos. Por tanto, en este objetivo se estudiará la interacción entre PAs y BRs en las respuestas de *M. truncatula* en simbiosis con *S. meliloti* en condiciones de estrés salino. Para ello, se han realizado dos tipos de experimentos consistentes en la aplicación de ambos tipos de reguladores del crecimiento, determinándose parámetros relacionados con la fijación de nitrógeno, niveles de PAs y expresión de genes implicados en el metabolismo tanto de PAs como de BRs.

### **2.1. Experimento 1: Efecto de la aplicación exógena de 24-Epibrassinolide en la respuesta a la salinidad de la simbiosis *M. truncatula*-*S. meliloti* y su interacción sobre el metabolismo de PAs.**

En este experimento se aplicaron 4 tratamientos: control, NaCl 100 mM, 24-Epibrassinolide 0,1  $\mu$ M (EBL), EBL 0,1  $\mu$ M + NaCl 100 mM. A las 3 semanas de la siembra se inició el tratamiento con EBL mediante spray foliar (2 aplicaciones semanales), comenzando a las 5 semanas el tratamiento salino mediante la solución nutritiva. Las plantas se cosecharon a las 7 semanas de cultivo. Muestras de hojas, nódulos y raíces se conservaron -80°C para posteriores determinaciones.

#### **2.1.1. Análisis de crecimiento.**

Los parámetros de crecimiento analizados, peso seco de parte aérea (PSPA) y peso seco de raíz (PSR), mostraron la misma respuesta tanto a los tratamientos salinos como al EBL (**Fig. 2.1.1.**). En ambos casos, se observó un incremento del 30% por el tratamiento con EBL en condiciones control y de estrés salino, mientras que las plantas control sin EBL mostraron una reducción de aproximadamente 30% por la salinidad. El efecto más notable fue que el tratamiento con EBL restauró completamente el PSPA y el PSR en plantas sometidas a tratamiento de estrés salino, ya que mostraron los mismos niveles de crecimiento que las plantas control.



**Figura 2.1.1.** Peso seco de parte aérea (PSPA) y peso seco de raíz (PSR) de plantas de *M. truncatula* inoculadas con *S. meliloti* 1021, tratadas con 0 y 0,1  $\mu$ M EBL, y 0 y 100 mM NaCl. Los datos son medias + E.E. (n=12). Los valores medios con la misma letra no difieren ( $P < 0.05$ ) utilizando el test de MDS.

### 2.1.2. Fijación de nitrógeno.

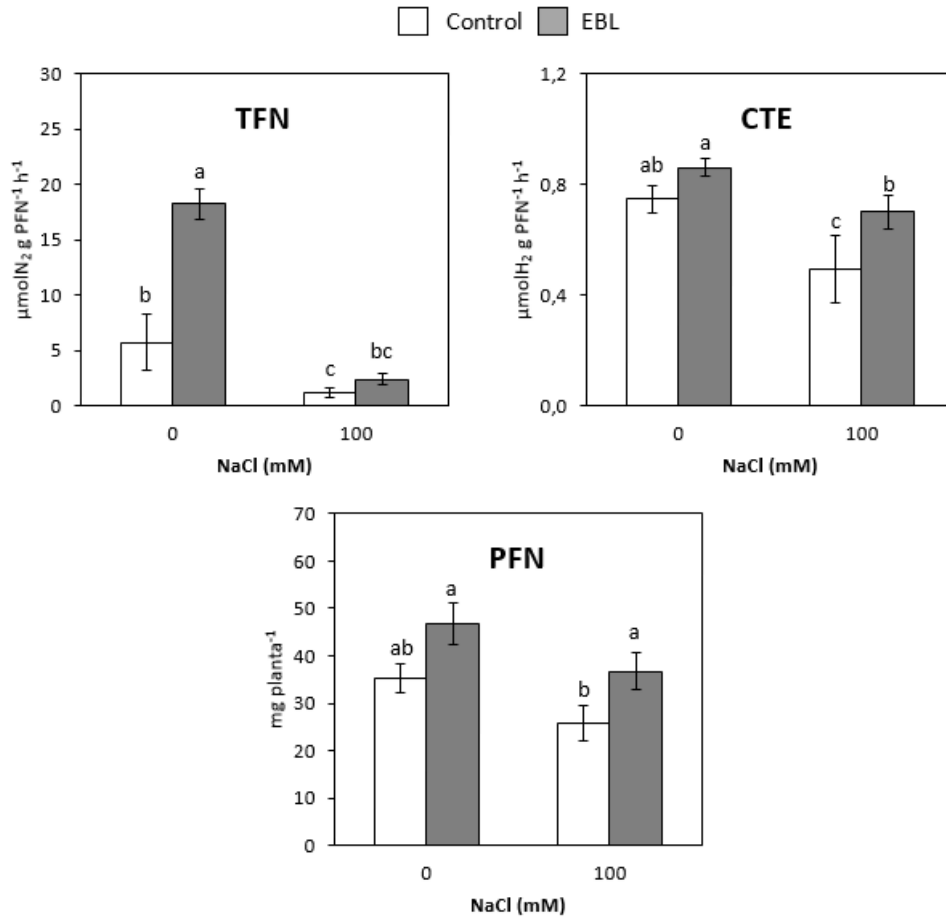
La actividad nitrogenasa se evaluó a través de la tasa de fijación de nitrógeno (TFN) y el coeficiente de transporte de electrones (CTE), adicionalmente, se determinó el peso fresco de nódulo por planta (PFN) (**Fig. 2.1.2.**).

La TFN se incrementó notablemente con el tratamiento de EBL (x3.5), aunque en condiciones de estrés por salinidad, esta inducción fue menor (x2). La TFN sufrió una fuerte inhibición de aproximadamente el 78% por la salinidad, sin embargo, el co-tratamiento con EBL redujo esta inhibición a un 58%, no mostrando diferencias estadísticamente significativas con el control.

El CTE mostró un patrón similar a la TFN, aunque las diferencias producidas por el EBL y los tratamientos salinos fueron menores con una inducción del 13% por EBL con respecto al control y una inhibición del 35% con salinidad. Los tratamientos conjuntos de EBL y sal mantuvieron valores similares de ambos parámetros al control.

La biomasa nodular (PFN) también fue inducida por el tratamiento con EBL con un incremento no significativo del 24%, que en condiciones de estrés salino fue algo mayor (27%). La salinidad provocó una disminución

en el PFN, aunque las diferencias observadas en las plantas tratadas con sal no fueron significativas.

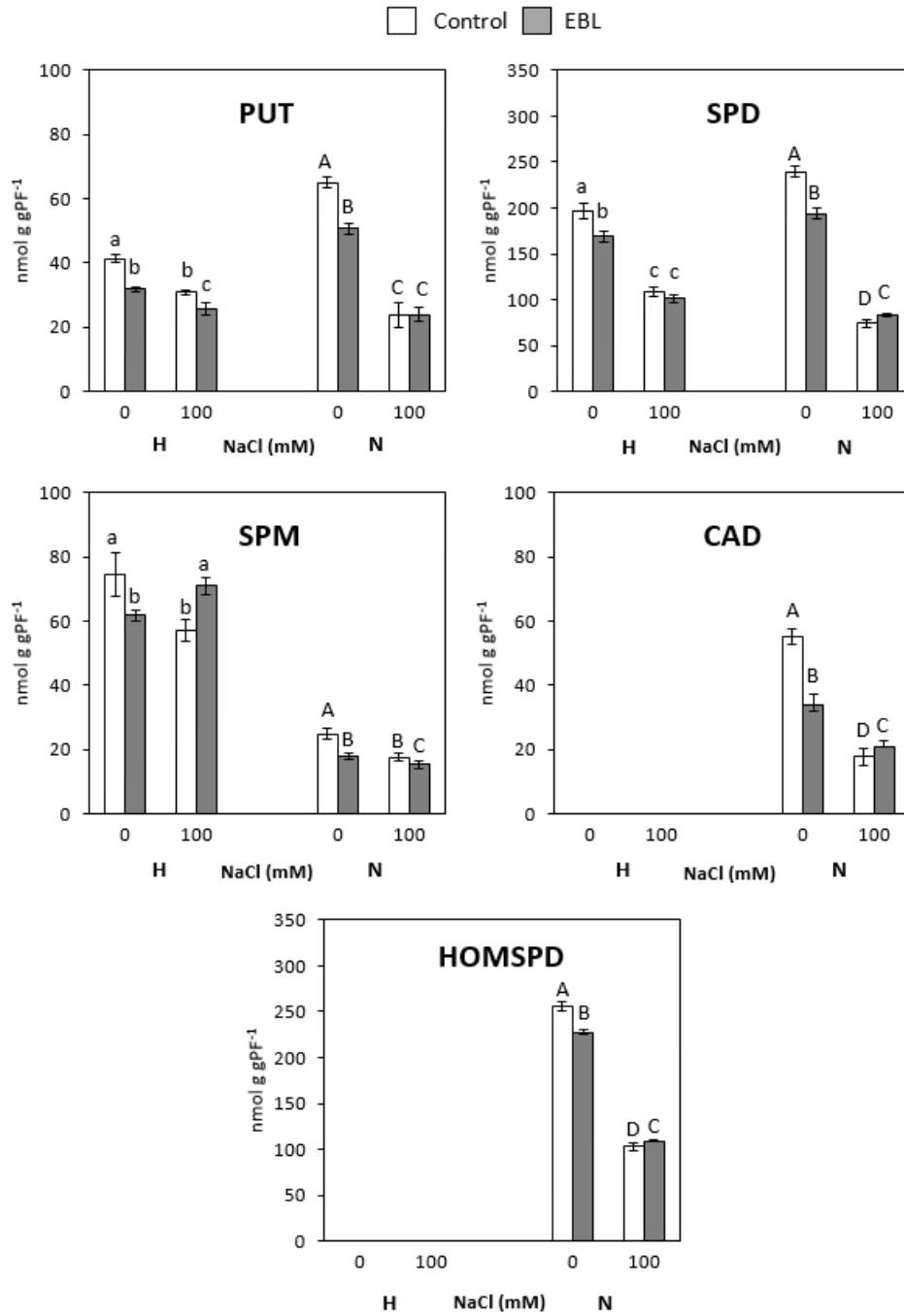


**Figura 2.1.2.** Tasa fijación de nitrógeno (TFN), coeficiente de transporte de electrones (CTE) y peso fresco de nódulos (PFN) en plantas de *M. truncatula* inoculadas con *S. meliloti* 1021, tratadas con 0 y 0,1 μM EBL, y 0 y 100 mM NaCl. Los datos son medias + E.E. (n=12). Los valores medios con la misma letra no difieren (P < 0.05) utilizando el test de MDS.

### 2.1.3. Niveles de PAs en nódulos y hojas.

Los niveles de PAs se determinaron en nódulos y hojas (**Fig. 2.1.3.**) con el fin de evaluar si el tratamiento con EBL tiene un efecto sistémico sobre la concentración de estos compuestos.

Resultado



**Figura 2.1.3.** Contenido de putrescina (PUT), espermidina (SPD), cadaverina (CAD), espermina (SPM) y homospermidina (HOM-SPD) en hojas (H) y nódulos (N) de plantas de *M. truncatula* inoculadas con *S. meliloti* 1021, tratadas con 0 y 0,1  $\mu$ M EBL, y 0 y 100 mM NaCl. Los datos son medias + E.E. (n=4). Los valores medios con la misma letra no difieren ( $P < 0.05$ ) utilizando el test de MDS.

En general, los niveles de PAs nodulares disminuyeron con el tratamiento de EBL mostrando una reducción del 38% la Cad, 28% la Spm, 22% la Put, 19% la Spd y 11% la Homspd. En condiciones de estrés salino, el tratamiento con EBL produjo ligeras diferencias en las PAs nodulares que experimentaron aumentos pequeños pero significativos en los niveles de Cad, Spd y Homspd; o disminuyeron en el caso de Spm.

El tratamiento con NaCl provocó una reducción del 60% al 70% en todas las PAs en nódulos, excepto en el caso de la Spm, que disminuyó únicamente un 30%. El co-tratamiento con EBL redujo ligeramente el efecto negativo de la salinidad sobre los niveles de PAs en nódulos, que mostraron una reducción menor.

En las hojas, los niveles de PAs exhibieron una respuesta similar a los tratamientos con EBL y NaCl que en nódulos, con la excepción de Spm, que no mostró inhibición en condiciones de estrés salino con el co-tratamiento con EBL, sino un aumento del 15% con respecto al tratamiento salino, llegando a igualar los niveles del tratamiento control.

En general, la reducción observada por la salinidad en los niveles de PAs en hojas fue menor que la reducción detectada en nódulos. El nivel de PAs fue mayor en nódulos que en hojas por la presencia de PAs poco comunes como Cad y Homspd, y con una mayor concentración de todas las PAs, excepto de Spm, que fue más abundante en hojas.

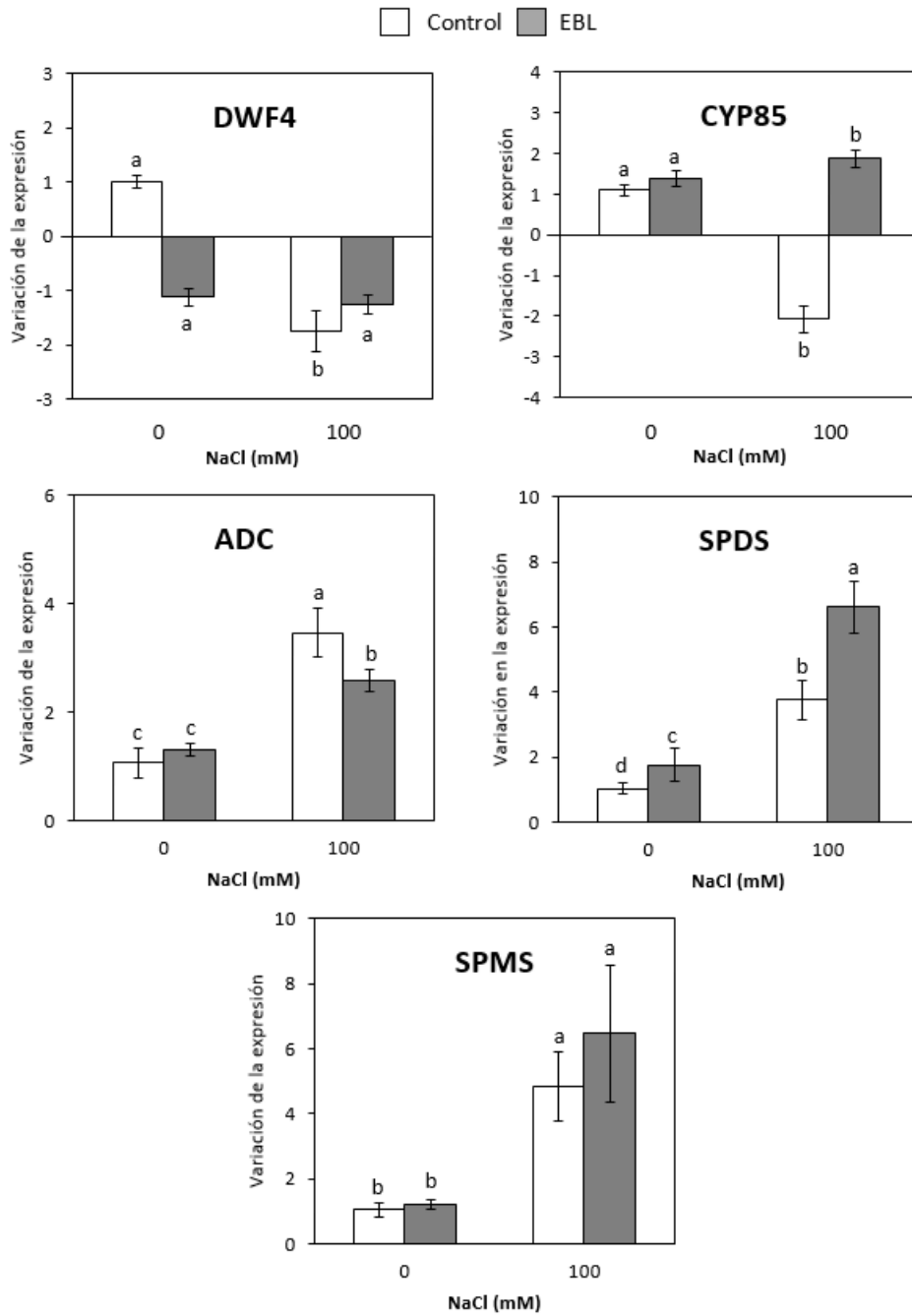
#### **2.1.4. Expresión de genes involucrados en la biosíntesis de PAs y BRs.**

Los niveles de transcripción de genes implicados en la biosíntesis de BR y PAs se analizaron mediante qRT-PCR en hojas utilizando cebadores específicos para *M. truncatula*. Los cambios en los niveles de expresión se muestran en la **figura 2.1.4**.

El gen *DWF4* (que codifica una hidroxilasa responsable de la hidroxilación de C-22 en la ruta biosintética de BRs) experimentó una inhibición del 50% en hojas de plantas tratadas con EBL y con EBL más sal, al igual que en los tratamientos con sal con una reducción del 75%.

El nivel de expresión de *CYP85* (que codifica una oxidasa responsable de la oxidación en C-6), sólo mostró una variación significativa en estrés salino, estando 2 veces inhibido con respecto al control. Sin

Resultado



**Figura 2.1.4.** RT-PCR cuantitativa de los transcritos de *DWF4*, *CYP85*, *ADC*, *SPDS* y *SPMS* en hojas de plantas de *M. truncatula* inoculadas con *S. meliloti* 1021, tratadas con 0 y 0,1  $\mu$ M EBL, y 0 y 100 mM NaCl. Los datos son medias + E.E. (n=4). Los valores medios con la misma letra no difieren ( $P < 0.05$ ) utilizando el test de MDS.



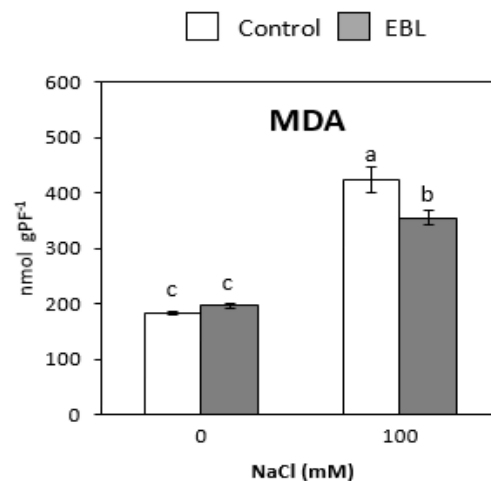
embargo, en el co-tratamiento con EBL y NaCl se observó una inducción del 27%.

En general, la expresión de todos los genes de la biosíntesis de PAs analizados presentaron una inducción significativa debido al tratamiento salino, con incrementos que varían entre 3,5 veces para *ADC* y *SPDS*, y hasta 5 veces para *SPMS*.

Estos niveles de inducción de la expresión fueron mayores para *SPDS* y *SPMS* con el co-tratamiento con EBL, con niveles de inducción de 6,4 y 5,3 veces, respectivamente. Únicamente el gen de *SPDS* fue significativamente inducido por EBL (40%) en plantas no estresadas con sal.

### 2.1.5. Peroxidación lipídica.

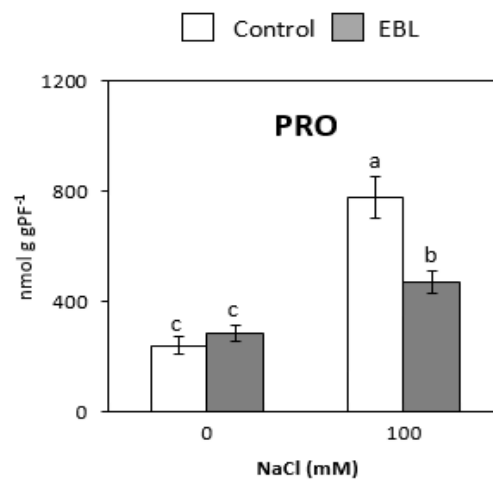
La peroxidación lipídica se estimó en base a la concentración de malondialdehído (MDA) en hojas (**Fig. 2.1.5.**). En condiciones de estrés salino se incrementó alcanzando 2,3 veces más concentración que la detectada en las plantas control. El pre-tratamiento con EBL redujo la peroxidación de lípidos producida por la salinidad con un nivel de MDA un 16% más bajo que en plantas tratadas con sal.



**Figura 2.1.5.** Contenido de MDA en hojas de *M. truncatula* inoculada con *S. meliloti* 1021, tratadas con 0 y 0,1 μM EBL, y 0 y 100 mM NaCl. Los datos son medias + E.E. (n=4). Los valores medios con la misma letra no difieren ( $P < 0.05$ ) utilizando el test de MDS.

### 2.1.6. Contenido de Pro.

La concentración de Pro se determinó en las hojas como un marcador del nivel de estrés (**Fig. 2.1.6.**). De forma similar al MDA, el nivel de Pro aumentó en condiciones de estrés salino con una concentración 3,2 veces mayor que en las plantas control. Sin embargo, el pre-tratamiento con EBL limitó la acumulación de Pro en las hojas de forma significativa, mostrando una inducción del 60% por la salinidad.



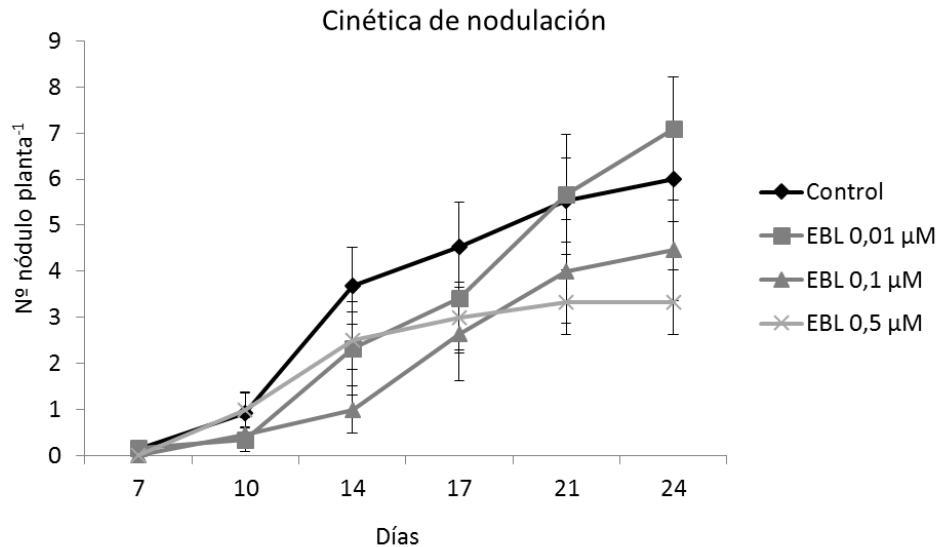
**Figura 2.1.6.** Contenido de prolina en hojas de *M. truncatula* inoculada con *S. meliloti* 1021, tratadas con 0 y 0,1  $\mu$ M EBL, y 0 y 100 mM NaCl. Los datos son medias + E.E. (n=4). Los valores medios con la misma letra no difieren ( $P < 0.05$ ) utilizando el test de MDS.

### 2.1.7. Efecto de BRs en el establecimiento de la simbiosis.

Se analizó el efecto de EBL en el proceso de nodulación tras la inoculación con *S. meliloti* realizando cinéticas de nodulación con distintas concentraciones de EBL (0,01, 0,1 y 0,5  $\mu$ M) añadidos a la solución nutritiva (**Fig. 2.1.7.a.**).

El número de nódulos por planta se contabilizó durante 24 días después de la inoculación. Los primeros nódulos se hicieron visibles 7 días después de la inoculación en el control y las plantas tratadas con EBL 0,01  $\mu$ M. Después de 10 días, los nódulos eran visibles en todos los tratamientos, aunque se detectó una reducción en el número de nódulos en las plantas tratadas con 0,01 y 0,1  $\mu$ M EBL. A los 14 y 17 días de inoculación, el número de nódulos fue menor en las plantas tratadas con todas las dosis de

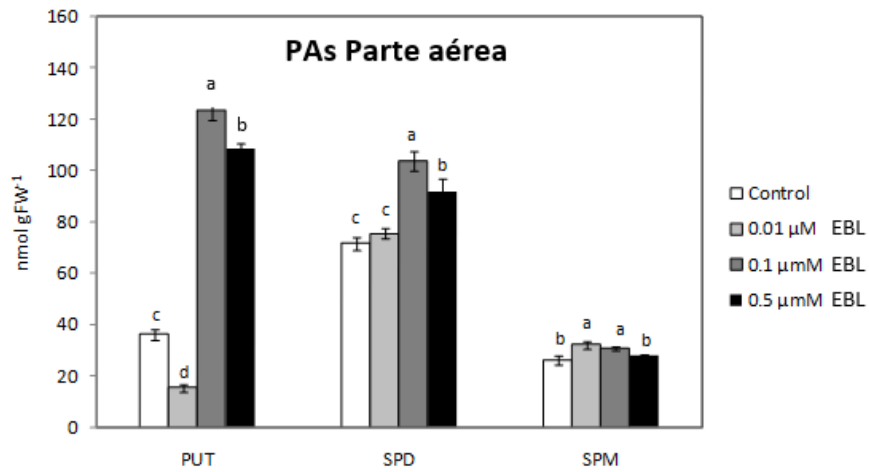
EBL en comparación con las plantas control. 21 días después de la inoculación, el número de nódulos disminuyó de una manera proporcional a la dosis en las plantas tratadas con 0,1 y 0,5  $\mu\text{M}$  EBL en relación con las plantas control, mientras que en las plantas con 0,01  $\mu\text{M}$  EBL, el número de nódulos fue ligeramente mayor.



**Figura 2.1.7.a.** Efecto de la aplicación EBL (0,01  $\mu\text{M}$ ; 0,1  $\mu\text{M}$ ; 0,5  $\mu\text{M}$ ) en el número de nódulos de *M. truncatula* inoculados con *S. meliloti* 1021. Los datos son medias + E.E. (n = 30).

Se analizó el contenido de PAs en la parte aérea de las plántulas de *M. truncatula* utilizadas en la cinética de nodulación (**Fig. 2.1.7.b.**), con el fin de comprobar un posible efecto de EBL sobre el contenido de PAs a larga distancia, así como una posible relación entre el contenido de PAs y el número de nódulos.

Las concentraciones de Put y Spd se incrementaron significativamente con 0,1  $\mu\text{M}$  y 0,5  $\mu\text{M}$  de EBL, con un aumento de tres veces para la Put y un 30 % para la Spd. La Spm solo aumentó en con dosis bajas de EBL, alrededor de un 20%



**Figura 2.1.7.b.** Poliaminas (Put, Spd, Spm) en la parte aérea de *M. truncatula* inoculadas con *S. meliloti* 1021, y tratadas con 0, 0,01, 0,1 y 0,5 μM 24-Epibrasinolide. Los datos son medias + E.E. (n=4). Los valores medios con la misma letra no difieren (P <0.05) utilizando el test de MDS.

## **2.2. Experimento 2: Efecto de la aplicación exógena de PAs en la respuesta a la salinidad de la simbiosis *M. truncatula* - *S. meliloti* y su interacción sobre el metabolismo de BRs.**

En este experimento se estudiaron los efectos de la aplicación de Spd y Spm exógenas en la adaptación al estrés salino de la simbiosis *M. truncatula*-*S.meliloti* y su interrelación con BRs en la respuesta a la salinidad. Las plantas se cultivaron durante 10 semanas, iniciándose a las 6 semanas los tratamientos con 0,1 mM Spd y 0,1mM Spm. El tratamiento con sal se inició 2 semanas más tarde añadiendo NaCl 75 mM a la solución de riego. Las plantas se cosecharon a las 10 semanas.

### **2.2.1. Análisis de crecimiento.**

El tratamiento con Spd y Spm aumentó la biomasa de la planta alrededor del 43% con el mismo efecto en la parte aérea y raíces (**Fig. 2.2.1.**). En condiciones de estrés salino, el efecto del tratamiento con PAs fue similar en la parte aérea y mayor en el peso seco de raíz, que aumentó un 57% con respecto al control con sal.

El tratamiento con sal provocó una inhibición del crecimiento de la planta más significativo en las raíces que en la parte aérea con una reducción del 40% y 20%, respectivamente. Los tratamientos previos con PAs no modificaron la respuesta a la salinidad en ambos órganos, aunque en la parte aérea no se observaron diferencias significativas con respecto de las plantas control.

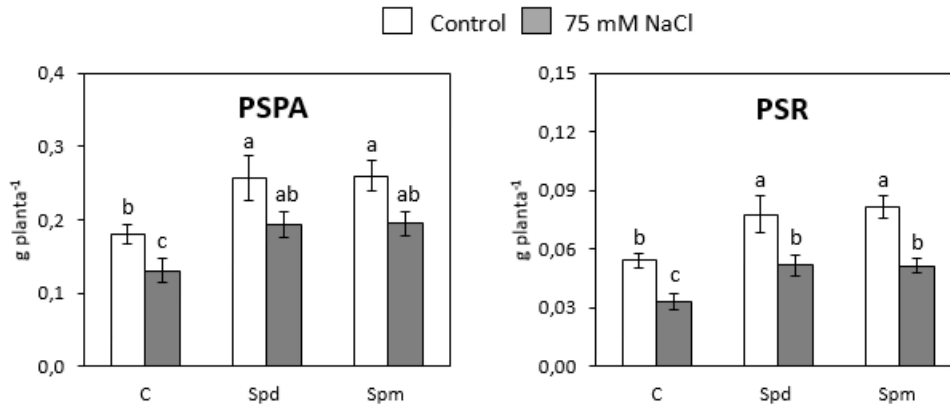
### **2.2.2. Fijación de nitrógeno.**

La tasa de fijación de nitrógeno (TFN), evaluada a través de la actividad nitrogenasa y el peso fresco de nódulos (PFN) se muestra en la **figura 2.2.2.**

En general, el tratamiento con Spd incrementó significativamente la TFN con un aumento de 2,6 veces respecto al control, mientras que las plantas tratadas con Spm no mostraron diferencias significativas. En condiciones de estrés salino, los tratamientos con Spd y Spm produjeron una reducción del efecto inhibitor de la sal, que fue de 11 veces en plantas control, a 8 veces en plantas tratadas con Spd y sal y de tan sólo 3 veces en los tratamientos de Spm y sal. La biomasa de nódulos también se

## Resultados

incrementó por los tratamientos de Spd y Spm un 44% y 32%, respectivamente. Este efecto fue incluso mayor en estrés salino con un aumento en el PFN del 100% en plantas co-tratadas con PAs y NaCl frente a las plantas tratadas únicamente con sal. La salinidad provocó una reducción del PFN del 40% en plantas control, mientras que este efecto se redujo al 20% con Spd y no fue significativo con Spm.



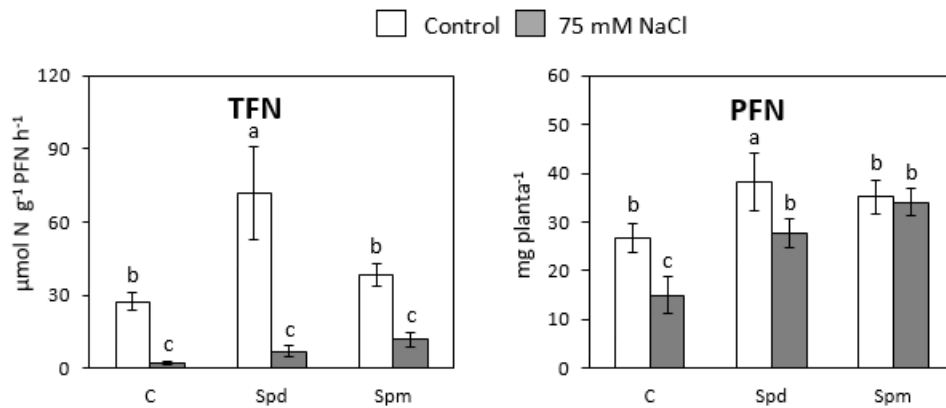
**Figura 2.2.1.** Peso seco de parte aérea (PSPA) y raíz (PSR) de plantas de *M. truncatula* inoculadas con *S. meliloti* 1021, en condiciones control y tratadas con NaCl 75 mM, 0,1 mM Spd y 0,1mM Spm. Los datos son medias + E.E. (n=12). Los valores medios con la misma letra no difieren ( $P < 0.05$ ) utilizando el test de MDS.

### 2.2.3. Niveles de PAs en nódulos y hojas.

El contenido de PAs en hojas y nódulos se analizó con el fin de comparar el efecto de Spd y Spm exógenos en ambos tejidos en estrés salino, como se muestra en la **figura 2.2.3**.

En general, los niveles de PAs fueron más altos en nódulos, que también mostraron un mayor número de PAs ya que contienen algunas específicas como Cad y Homspd.

En hojas, los tratamientos exógenos de Spd y Spm provocaron un incremento del 40% de ambas PAs con respecto al control. En condiciones de estrés salino, Spm fue la única PA que se acumuló en las hojas, con un incremento del 30% en las plantas control y 46% en las tratadas con Spm con respecto a los mismos tratamientos sin sal.

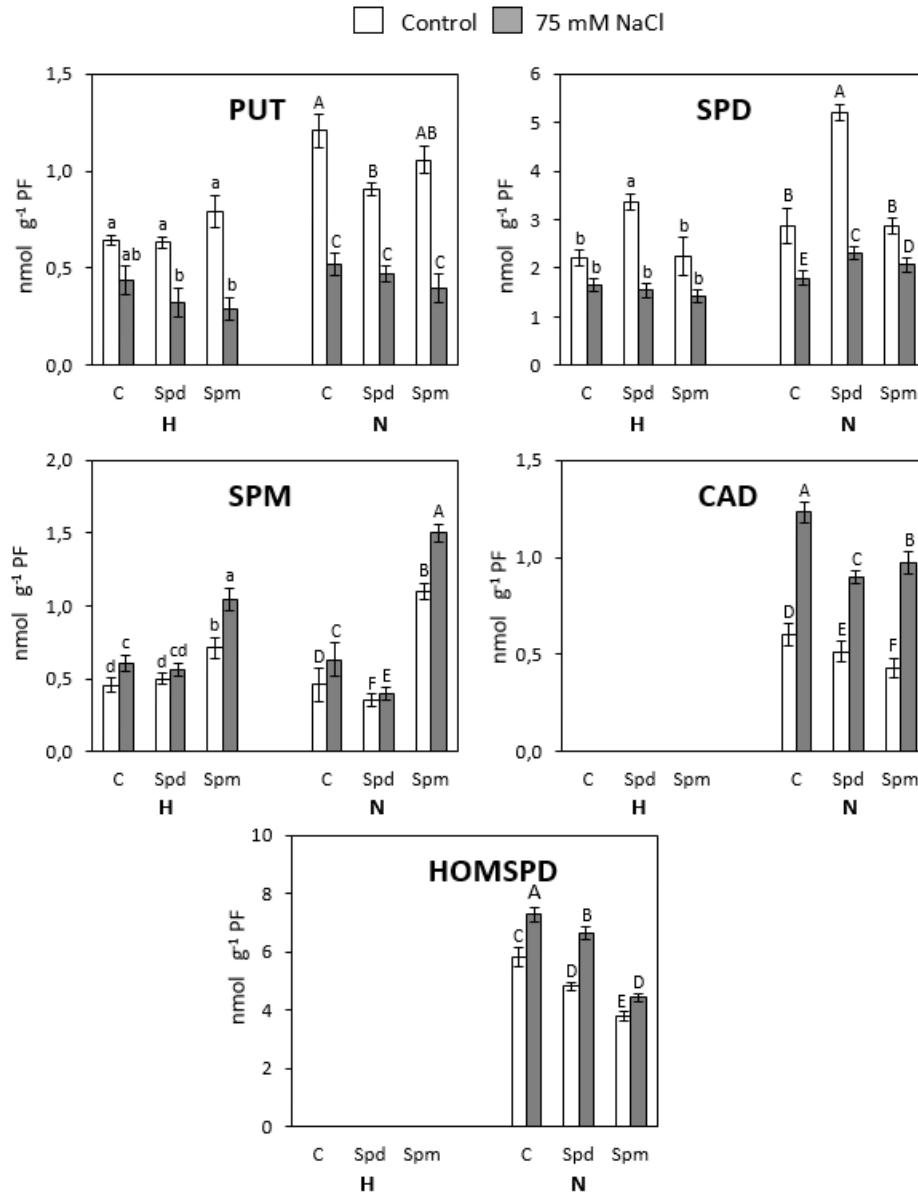


**Figura 2.2.2.** Tasa de fijación de nitrógeno (TFN) y peso fresco de nódulos (PFN) de plantas de *M. truncatula* inoculadas con *S. meliloti* 1021, en condiciones de control y tratadas con NaCl 75 mM, 0,1 mM Spd y 0,1mM Spm. Los datos son medias + E.E. (n=12). Los valores medios con la misma letra no difieren (P <0.05) utilizando el test de MDS.

Los niveles de Put no mostraron diferencias en los tratamientos con PAs en las hojas, pero la sal provocó una reducción del 50% en plantas co-tratadas con Spd y sal, y una disminución de 2,7 veces en plantas tratadas con Spm y sal con respecto a las plantas tratadas sólo con Spd y Spm, respectivamente.

La Spd en hoja mostró una respuesta similar a la Put en estrés salino, con una reducción del 60% en plantas tratadas con Spd y sal en comparación con las tratadas solamente con Spd. Para el resto de tratamientos, la Spd también presentó cierto grado de inhibición, aunque estas diferencias no fueron significativas.

Los niveles de Spm en nódulos presentaron una tendencia similar a los de hoja aumentando su concentración en condiciones de salinidad, aunque la Cad también duplicó su concentración, independientemente del co-tratamiento con Spd y Spm exógenos. La Homspd fue la poliamina más abundante en nódulos y en estrés salino aumentó entre 37% y 16% dependiendo del tratamiento con Spd o Spm. Las respuestas de Put y Spd a la salinidad en los nódulos fueron similares a las observadas en hojas, con reducciones significativas en condiciones de estrés salino.



**Figura 2.2.3.** Contenido de PAs en hojas (H) y nódulos (N) de plantas de *M. truncatula* inoculadas con *S. meliloti* 1021, en condiciones control y tratadas con NaCl 75 mM, 0,1 mM Spd y 0,1mM Spm. Los datos son medias + E.E. (n=4). Los valores medios con la misma letra no difieren ( $P < 0.05$ ) utilizando el test MDS.

#### 2.2.4. Expresión de genes involucrados en la biosíntesis de BRs.

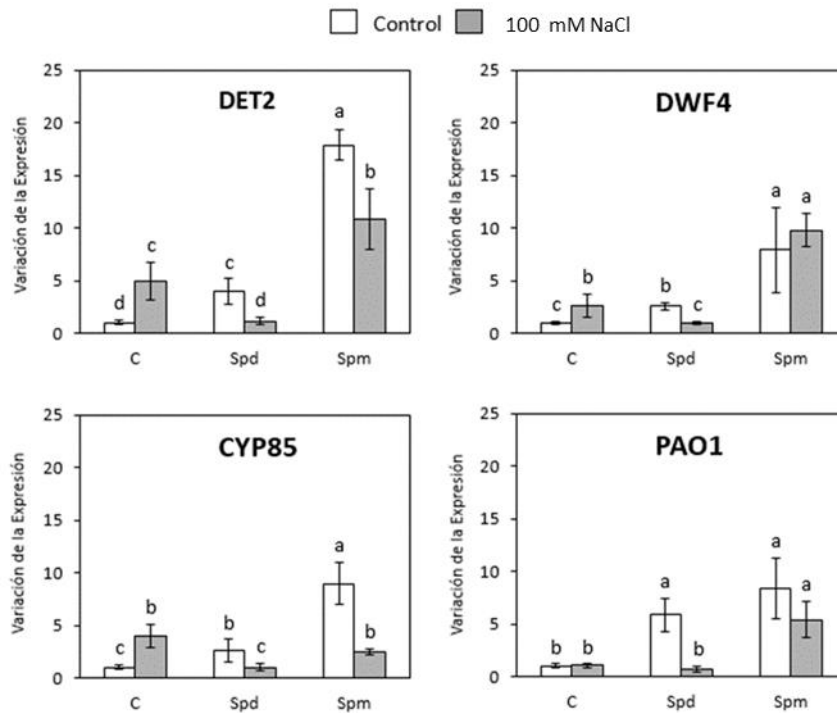
El nivel de expresión de los genes implicados en la síntesis de BRs, *DET2*, *DWF4* y *CYP85*, se analizó en las hojas con el fin de determinar una



posible interacción entre PAs y el metabolismo de BRs (**Fig. 2.2.4**). Además, se analizó la expresión de *PAOI* (poliamina oxidasa 1) responsable del catabolismo de Spd y Spm.

En general, la expresión de todos los genes implicados en la síntesis de BRs se incrementó en condiciones de estrés salino con aumentos de 2 a 5 veces con respecto al control. Los tratamientos con PAs también indujeron el nivel de transcripción de los genes de biosíntesis de BRs en un mayor grado con Spm, que incrementó de 8 a 17 veces la expresión de los tres genes analizados.

Sin embargo, el efecto positivo de Spd en los niveles de expresión fue completamente inhibido por el estrés salino y parcialmente por el tratamiento con Spm, a excepción de *DWF4* que no mostró diferencia significativa. El nivel de transcripción de *PAOI* también fue inducido por Spd y Spm, mientras que el tratamiento con sal no produjo diferencias significativas.

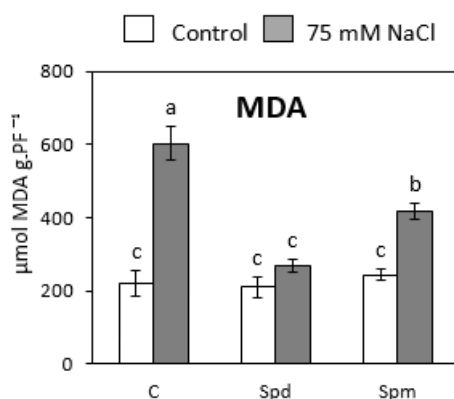


**Figura 2.2.4.** Nivel de expresión de los genes *DET2*, *DWF4*, *CYP85* y *PAO1* en hojas de *M. truncatula* inoculada con *S. meliloti* 1021, en condiciones control y tratadas con NaCl 100 mM, 0,1 mM Spd y 0,1mM Spm. Los datos son medias + E.E. (n=4). Los valores medios con la misma letra no difieren ( $P < 0.05$ ) utilizando el test MDS.

### 2.2.5. Peroxidación lipídica.

La peroxidación lipídica fue estimada como la concentración de malondialdehído (MDA) en hojas (**Fig. 2.2.5.**).

En condiciones control, no se observaron diferencias en los niveles de MDA por los tratamientos con PAs exógenas. Sin embargo, el estrés salino provocó un incremento de 2,5 veces en los niveles de MDA con respecto a las plantas control, aunque con el tratamiento con Spm exógena, este incremento fue únicamente del 43%, quedando casi extinguido por el tratamiento con Spd el efecto de la sal.



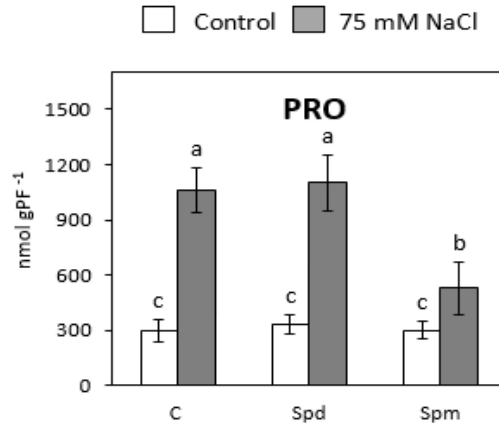
**Figura 2.2.5.** Peroxidación de lípidos en plantas de *M. truncatula* inoculadas con *S. meliloti* 1021, en condiciones de control y tratadas con NaCl 75 mM, 0,1 mM Spd y 0,1mM Spm. Los datos son medias + E.E. (n=4). Los valores medios con la misma letra no difieren (P <0.05) utilizando el test MDS.

### 2.2.6. Contenido de prolina.

La acumulación de Pro en hojas se cuantificó debido a la estrecha relación entre el metabolismo de las PAs y la síntesis de este aminoácido (**Fig. 2.2.6.**).

Los tratamientos con PAs exógenas no alteraron el contenido de Pro en hojas, pero el estrés salino sí que indujo un aumento significativo en sus niveles con una concentración 3,6 veces mayor en tales condiciones tanto en plantas sólo tratadas con sal como en plantas co-tratadas con Spd y sal. Sin embargo, el co-tratamiento con Spm inhibió parcialmente la acumulación de Pro, que solo mostró una inducción del 76% por la salinidad en

comparación con la inducción de 3,6 veces observada en los otros dos tratamientos salinos.



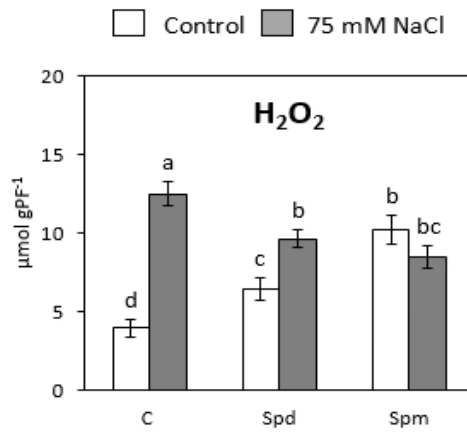
**Figura 2.2.6.** Contenido de prolina en hojas de plantas de *M. truncatula* inoculadas con *S. meliloti* 1021, en condiciones de control y tratadas con NaCl 75 mM, 0,1 mM Spd y 0,1mM Spm. Los datos son medias + E.E. (n=4). Los valores medios con la misma letra no difieren ( $P < 0.05$ ) utilizando el test MDS.

### 2.2.7. Producción de peróxido de hidrógeno.

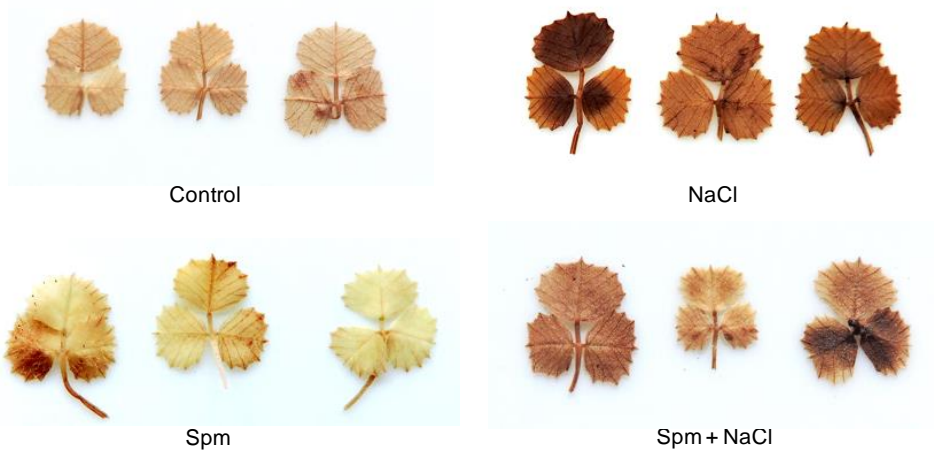
El contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las hojas se evaluó de forma cuantitativa y cualitativa mediante análisis histoquímico, como se muestra en la **figura 2.2.7a** y en la **figura 2.2.7b**, respectivamente.

El ensayo cuantitativo reveló que el nivel de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se incrementó 3 veces en condiciones de estrés salino. Sin embargo, los tratamientos previos con PAs redujeron este incremento al 30% con Spd e incluso se inhibió por completo con Spm. El tratamiento con Spd y Spm produjo una inducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> del 40% y 2,5 veces, respectivamente, en comparación con el control.

El ensayo histoquímico mostró resultados similares al ensayo cuantitativo, con un incremento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las hojas estresadas con sal y una ligera reducción de este efecto mediante el co-tratamiento con Spd.



**Figura 2.2.7.a.** Contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en hojas de plantas de *M. truncatula* inoculadas con *S. meliloti* 1021, en condiciones de control y tratadas con NaCl 75 mM, 0,1 mM Spd y 0,1mM Spm. Los datos son medias + E.E. (n=4). Los valores medios con la misma letra no difieren (P <0.05) utilizando el test MDS.



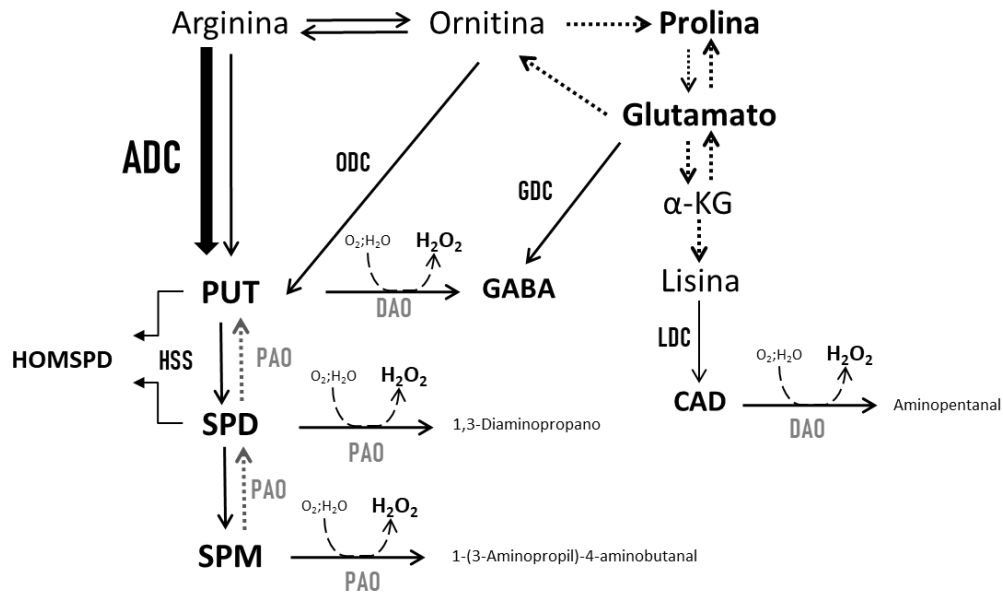
**Figura 2.2.7.b.** Tinción con DAB del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en hojas de plantas de *M. truncatula* inoculadas con *S. meliloti* 1021, en condiciones de control, tratadas con NaCl 75 mM, con Spm 1 mM y con NaCl + Spm.

### **3. Estudio de la implicación de las PAs en la respuesta al estrés salino en la simbiosis *M. truncatula* – *S. meliloti*, mediante alteraciones en las rutas metabólicas de biosíntesis y oxidación.**

En este objetivo se estudia el efecto de la alteración del metabolismo de las PAs en la respuesta a la salinidad en la simbiosis *M. truncatula* – *S. meliloti*. Para ello, se han realizado dos experimentos en los que, mediante diferentes estrategias, se modifica la actividad de enzimas implicadas en la síntesis y degradación de PAs. En el primero de ellos, se han utilizado plantas transgénicas de *M. truncatula* que sobreexpresan de forma constitutiva el gen *Adc* de avena (descritas en material y métodos). Dichas plantas se obtuvieron a través de la colaboración con el laboratorio del Prof. Pedro Fevereiro de la Universidade Nova de Lisboa. En el segundo experimento, se utilizó un inhibidor específico de una de las enzimas responsable del catabolismo de PAs. En ambos experimentos se determinó el efecto de la alteración del metabolismo de PAs y la salinidad sobre el establecimiento de la simbiosis *M. truncatula* – *S. meliloti* y fijación de nitrógeno.

#### **3.1. Experimento 1: Efecto de la alteración de la biosíntesis de PAs en la respuesta a la salinidad de la simbiosis *M. truncatula*-*S. meliloti*.**

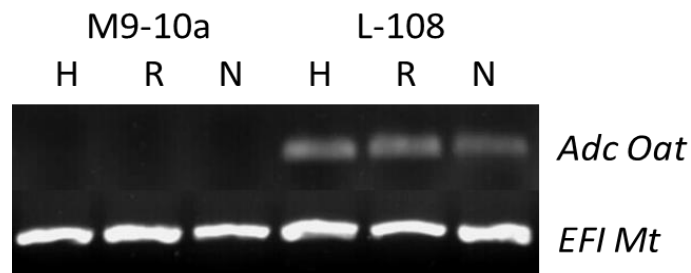
Este experimento consistió en la caracterización de la respuesta a la salinidad de la simbiosis en plantas de *M. truncatula* que sobreexpresan de forma constitutiva el gen que codifica para la enzima arginina descarboxilasa (*Adc*). Para ello, se utilizó una línea transgénica de *M. truncatula* (L-108) que contenía una construcción con la región codificante del gen *Adc* de avena (2x35S-*Adc*-t35S). Como control (wt), se utilizó una línea embriogénica (M9-10a) no transformada. Los detalles de la construcción empleada para la transformación mediante *Agrobacterium* de la línea embriogénica M9-10a se encuentran descritos por Araujo et al. (2004). Las plantas se cultivaron durante 9 semanas aplicándose los siguientes tratamientos: control de fenotipo silvestre (wt), wt + 75 mM NaCl, plantas transgénicas (L-108) y L-108 + 75 mM NaCl. La sal se adicionó a la solución nutritiva durante las 2 semanas previas al muestreo.



**Figura 3.1.** Esquema del metabolismo de PAs y su interacción con otras rutas metabólicas como la prolina, ácido  $\alpha$ -aminobutírico (**GABA**), y glutamato. Las abreviaturas en negrita representan los metabolitos determinados en este estudio: **PUT** (putrescina), **SPD** (espermidina), **SPM** (espermina), **CAD** (cadaverina) y **HOMSPD** (homospermidina); y Aminoácidos **Glutamato**, **Prolina**, y **GABA**. Las abreviaturas en gris negrita representan las enzimas determinadas en este experimento: **DAO** (diamino oxidasa) y **PAO** (poliamino oxidasa). Las otras abreviaturas se corresponden con las enzimas ADC (arginina descarboxilasa), ODC (ornitina descarboxilasa), GDC (glutamato descarboxilasa), LDC (lisine descarboxilasa), HSS (homospermidina sintasa) y  $\alpha$ -KG ( $\alpha$ -ketoglutarato).

### 3.1.1 Expresión del gen *Adc* de avena en plantas transformadas.

La expresión del gen *Adc* de la avena se analizó mediante RT-PCR en hojas (H), raíces (R) y nódulos (N) de plantas *M. truncatula* wt (M9-10a) y transgénicas (L-108) con el fin de confirmar que se expresa en todos los órganos de la planta. Como se muestra en la **figura 3.1.1**, el nivel de expresión es similar en todos los órganos analizados.



**Figura 3.1.1.** Expresión del gen *Adc* en plantas *M. truncatula* wt (M9-10a) y transgénicas (L-108), en diferentes órganos: hojas (H), raíces (R) y nódulos (N).

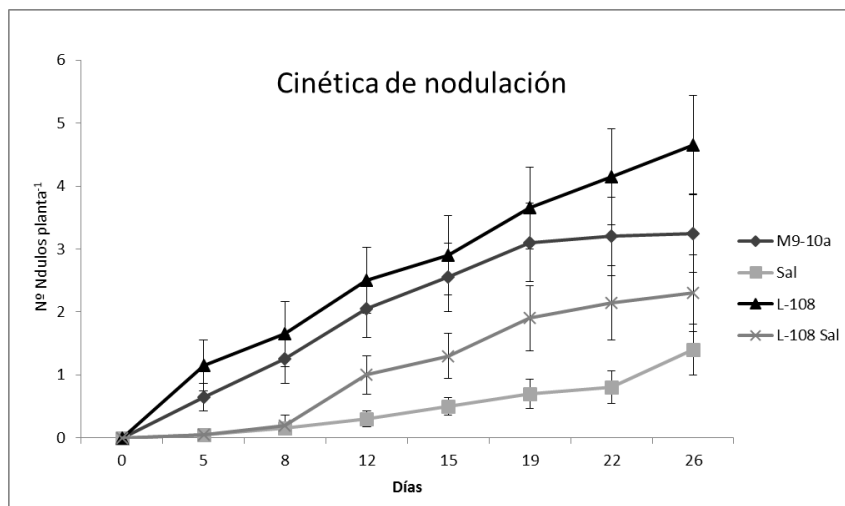
### 3.1.2. Efecto de la sobreexpresión del gen *Adc* y la salinidad sobre el establecimiento de la simbiosis.

Se comparó el establecimiento de la simbiosis en plantas wt y L-108 en condiciones de estrés salino realizando una cinética de nodulación (**Fig. 3.1.2.**). Se contabilizó el número de nódulos tras la inoculación con *S. meliloti* 1021 durante 26 días, siendo los primeros nódulos visibles después de 5 días. Durante los 26 días de la cinética, el número de nódulos fue más alto en las plantas L-108 con diferencias significativas del 50% a los 5 días y del 30% a los 26 días. En condiciones de estrés salino, la nodulación se retrasó con nódulos apenas visibles después de 5 días y una reducción de aproximadamente el 50% en el número de nódulos en ambos genotipos. Sin embargo, del día 12 en adelante en condiciones de estrés salino el número de nódulos en plantas L-108 fue superior al de plantas wt.

### 3.1.3. Análisis histológico de secciones transversales y longitudinales de nódulos.

A fin de detectar posibles alteraciones en la formación y estructura de los nódulos en plantas transformadas con el gen *Adc* de avena, se analizaron histológicamente secciones longitudinales y transversales de nódulos mediante microscopía óptica (**Fig. 3.1.3.**). Los nódulos maduros en ambos genotipos mostraron todas las zonas de desarrollo características de nódulos indeterminados a lo largo del eje longitudinal: meristemo apical, zona de infección, zona de fijación y zona de senescencia; sin embargo, las regiones

meristemáticas y de infección constituyen una mayor proporción en nódulos de plantas L-108 en comparación con las M9-10a.



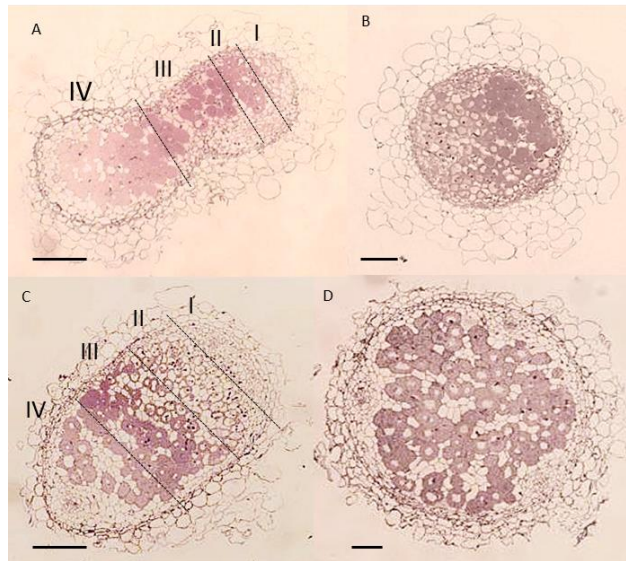
**Figura 3.1.2.** Cinética de nodulación en plantas de *M. truncatula* inoculadas con *S. meliloti* 1021 tratadas con NaCl 25 mM. Los datos son medias + EE (n = 20).

En cuanto a las secciones transversales de los nódulos, se observa una densidad bacteroidal similar en la zona de fijación de los nódulos M9-10a en comparación con los de plantas L-108.

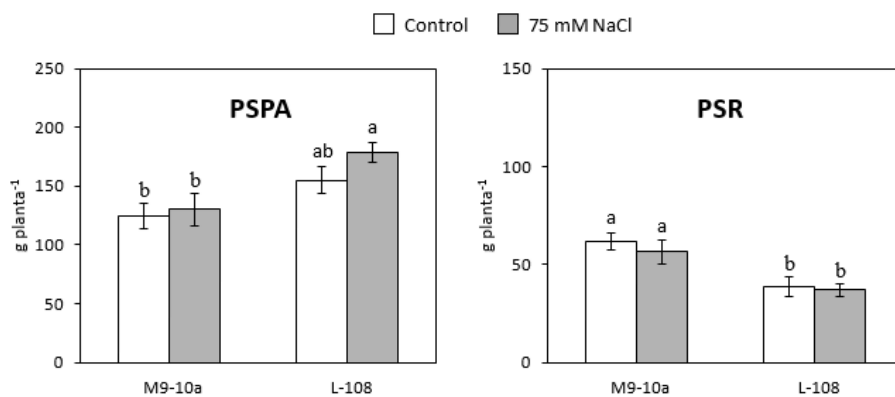
### 3.1.4. Análisis de crecimiento.

Los parámetros de crecimiento peso seco de parte aérea (PSPA) y peso seco de raíz (PSR) (**Fig. 3.1.4.**) muestran un efecto diferente debido a la sobreexpresión del gen *Adc* en parte aérea y raíz, ya que PSPA se incrementó un 20% en las plantas L-108, mientras que el PSR disminuyó un 37%. En condiciones de estrés salino, el efecto promotor del crecimiento detectado en el PSPA fue aún mayor con un incremento del 24%. Sin embargo, en el crecimiento de la raíz no se observó ningún efecto de la sal en ninguno de los genotipos.





**Figura 3.1.3.** Microfotografías de secciones de nódulos de *M. truncatula* M9-10a y L-108 inoculados con *S. meliloti* 1021. En las secciones longitudinales de los nódulos de M9-10a (A) y L-108 (C) se distinguen la región meristémica (I), región de infección (II), zona de fijación (III) y área de senescencia (IV). B y D corresponden a la sección transversal de la zona de fijación de nódulos de M9-10a y L-108, respectivamente. Barras = 500  $\mu\text{m}$ .



**Figura 3.1.4.** Peso seco de arte aérea (PSPA) y raíz (PSR) de plantas de *M. truncatula* M9-10a y L-108 inoculadas con *S. meliloti* 1021, en condiciones control y tratadas con NaCl 75 mM. Los datos son medias + E.E. (n=12). Los valores medios con la misma letra no difieren ( $P < 0.05$ ) utilizando el test de MDS.

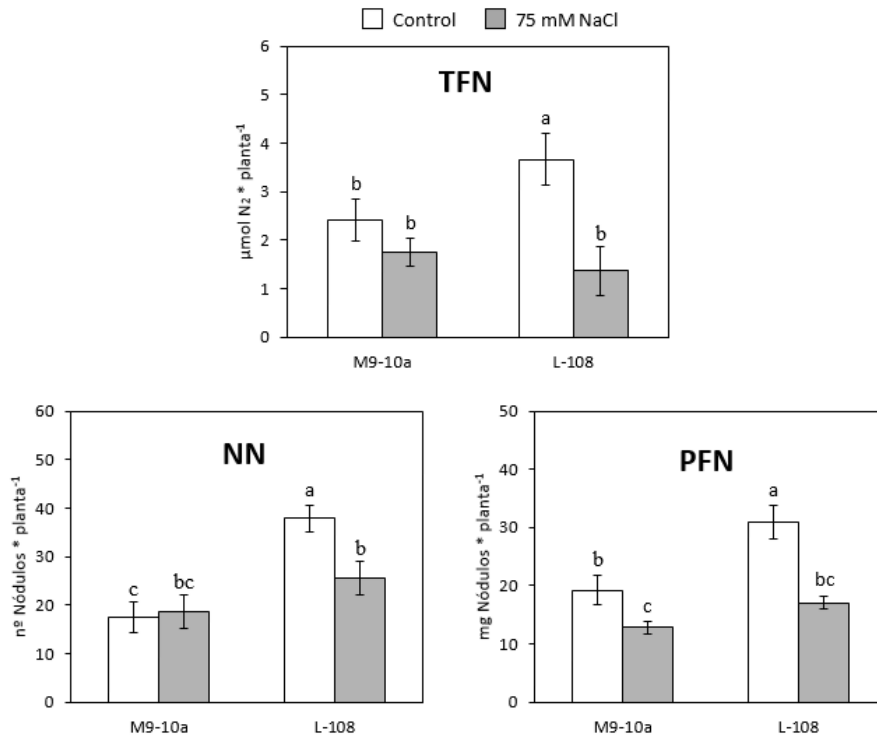
### 3.1.5. Fijación de nitrógeno.

Tanto la biomasa nodular (PFN) como la tasa de fijación de nitrógeno (TFN) (**Fig. 3.1.5.**) mostraron un incremento en las plantas L-108 que sobreexpresan el gen *Adc*. El número de nódulos (NN) se duplicó en la línea mutante L-108 mientras que el peso fresco del nódulo (PFN) aumentó en un 40%, lo que indica un tamaño de nódulo inferior en el mutante. La actividad nitrogenasa por planta expresada como tasa de fijación de nitrógeno (TFN), también se incrementó un 35% en plantas L-108. Sin embargo, en condiciones de estrés salino, la TFN disminuyó en mayor medida en plantas L-108 con 2,6 veces menos actividad, mientras que en la wt la inhibición no fue significativa (30%). El PFN mostró un patrón similar al de la actividad de nitrogenasa en estrés salino, con una reducción del 32% y 45% por la salinidad en M9-10a y L-108, respectivamente.

### 3.1.6. Contenido de PAs.

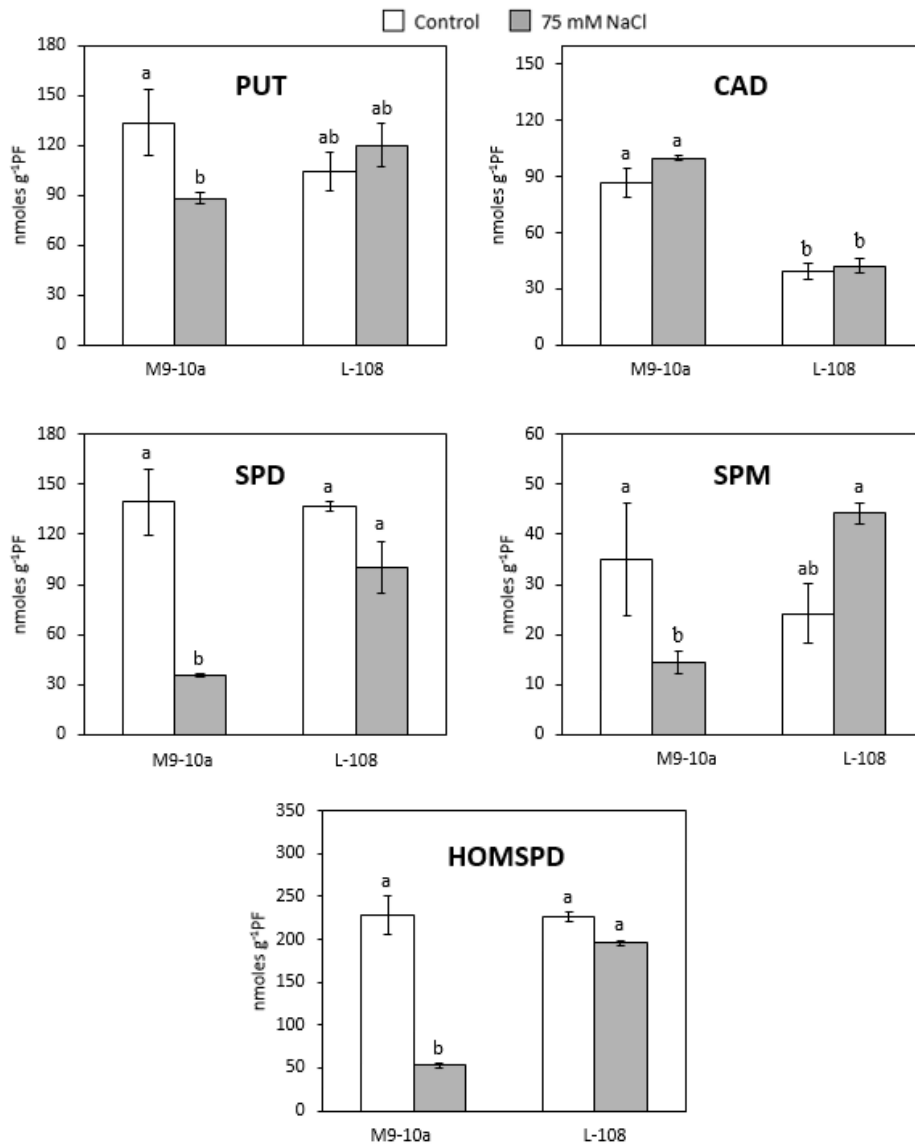
El nivel de PAs en nódulos no mostró diferencias significativas entre plantas wt y L-108, excepto para la Cad que fue la mitad en las plantas transgénicas (**Fig 3.1.6.a.**). Por el contrario, en condiciones de estrés salino los niveles de Spd, Spm y Homspd se incrementaron 3 veces en nódulos de plantas L-108 en comparación con los de wt en las mismas condiciones, con la excepción de la Put que no mostró diferencias significativas y la Cad que disminuyó 2.4 veces. En general, el contenido de PAs en nódulos de wt disminuyó en condiciones de salinidad, con unas 1.5, 4, 2.5 y 4.3 veces menos Put, Spd, Spm y Homspd. Por el contrario, en la línea L-108, el estrés salino, no disminuyó el nivel de Homspd, mientras que incrementó el de Spm 1.8 veces.

En hojas de las plantas L-108, los niveles de Spd fueron un 12% superiores, mientras que los de Spm disminuyeron un 34% en comparación con las wt (**Fig 3.1.6.b.**). En condiciones de estrés por salinidad, los niveles de Put fueron un 70% superior en nódulos de plantas L-108 en comparación con los de wt, mientras que en la Spd se observa una disminución del 25% en las mismas condiciones.

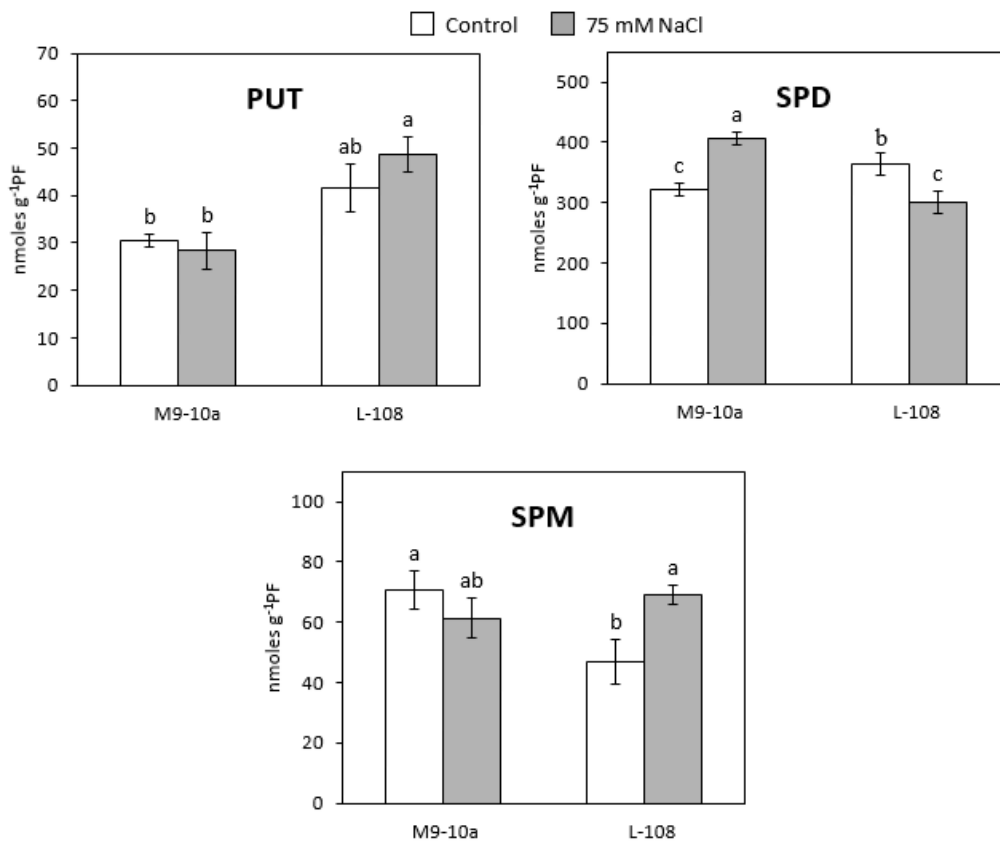


**Figura 3.1.5.** Tasa fijación de nitrógeno (TFN), número de nódulos (NN) y peso fresco de nódulos (PFN) de plantas de *M. truncatula* M9-10a y L-108 inoculadas con *S. meliloti* 1021, en condiciones control y tratadas con NaCl 75 mM. Los datos son medias + E.E. (n=10). Los valores medios con la misma letra no difieren ( $P < 0.05$ ) utilizando el test de MDS.

## Resultados



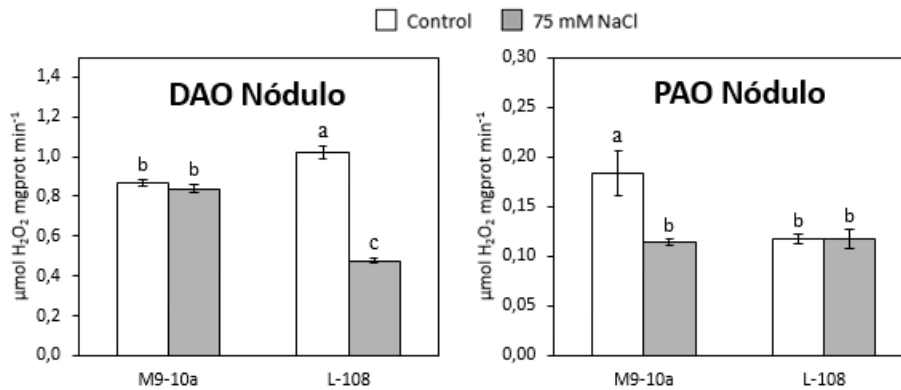
**Figura 3.1.6.a.** Niveles putrescina (PUT), cadaverina (CAD), espermidina (SPD), espermina (SPM) y homoespermidina (HOMSPD) en nódulos de plantas de *M. truncatula* M9-10a y L-108 inoculadas con *S. meliloti* 1021, en condiciones control y tratadas con NaCl 75 mM. Los datos son medias + E.E. (n=3). Los valores medios con la misma letra no difieren ( $P < 0.05$ ) utilizando el test de MDS.



**Figura 3.1.6.b.** Niveles putrescina (PUT), espermidina (SPD), espermina (SPM) en hojas de plantas de *M. truncatula* M9-10a y L-108 inoculadas con *S. meliloti* 1021, en condiciones control y tratadas con NaCl 75 mM. Los datos son medias + E.E. (n=3). Los valores medios con la misma letra no difieren ( $P < 0.05$ ) utilizando el test de MDS.

### 3.1.7. Catabolismo de PAs.

Se estudió el catabolismo de PAs para determinar su contribución en la homeostasis de las PAs en nódulos (**Fig. 3.1.7.**). La actividad diamina oxidasa (DAO) aumentó significativamente en nódulos de las plantas L-108 (15%), sin embargo, la poliamina oxidasa (PAO) disminuyó alrededor del 40% en comparación con las plantas wt. En condiciones de estrés salino, DAO y PAO se comportaron de forma diferente en plantas wt y L-108, ya que DAO se inhibió 2 veces en L-108 mientras que PAO se inhibió 38% en M9-10a.



**Figura 3.1.7.** Actividades diamina oxidasa (DAO) y poliamina oxidasa (PAO) ( $\mu\text{moles H}_2\text{O}_2 \text{ mg prot min}^{-1}$ ) en nódulos de *M. truncatula* M9-10a y L-108 inoculadas con *S. meliloti* 1021 en condiciones control y tratadas con NaCl 75 mM. Los datos son medias + EE ( $n = 3$ ). Los valores medios seguidos por la misma letra no difieren ( $P < 0.05$ ) utilizando el test de MDS.

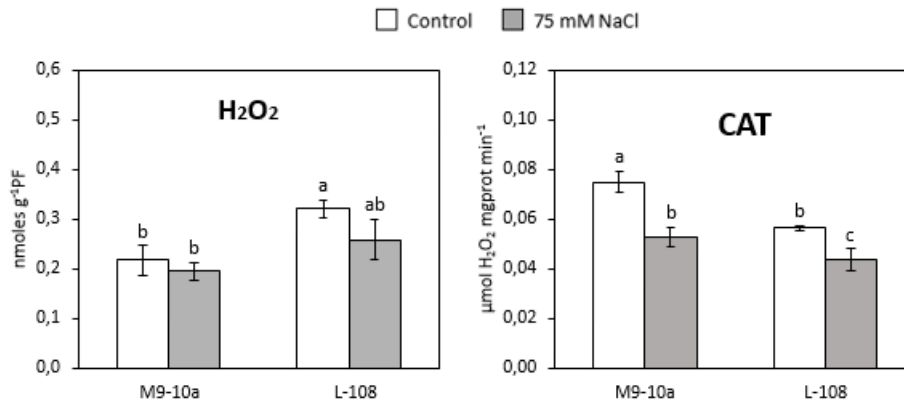
### 3.1.8 Contenido de peróxido de hidrógeno y actividad catalasa.

El contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se analizó en nódulos (**Fig 3.1.8.**) ya que es un producto secundario del catabolismo de las PAs y está involucrado como molécula señal en respuestas defensivas frente a estreses bióticos y abióticos. La sobreexpresión de *Adc* provocó un incremento del 32% en los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pero en condiciones de estrés salino, se observó una ligera aunque no significativa reducción de la concentración tanto en plantas wt y como en L-108. Este incremento de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue simultáneo a una reducción del 25 % en la actividad catalasa (**Fig 3.1.8.**) en las plantas L-108 y por la salinidad en ambos genotipos.

### 3.1.9. Contenido de aminoácidos en nódulo.

Se determinó la concentración nodular de algunos de los aminoácidos que participan en el metabolismo de PAs (**Tabla 3.1.9.**) con el fin de evaluar el efecto de la sobreexpresión del gen *Adc* en la distribución de nitrógeno. El nivel de **Glu** aumentó en un 35% en nódulos de las plantas L-108 en comparación con plantas wt, y en condiciones de estrés salino no mostró variaciones significativas en L-108 (solo una reducción del 5%). Por el

contrario, en plantas wt (M9-10a) la concentración de **Glu** aumentó un 20% en estrés salino.



**Figura 3.1.8.** Contenido H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y actividad catalasa (CAT) (μmoles H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mg prot min<sup>-1</sup>) en nódulos de *M. truncatula* M9-10a y L-108 inoculadas con *S. meliloti* 1021, en condiciones control y tratadas con NaCl 75 mM. Los datos son medias + EE (n = 3). Los valores medios seguidos por la misma letra no difieren (P < 0.05) utilizando el test de MDS.

La concentración de **GABA** no mostró variaciones entre las plantas transgénicas y wt y, solo en estas últimas se pudo detectar un incremento del 32% en condiciones de salinidad. Por el contrario, la concentración de **Pro** si mostró una inducción importante en estrés salino en el mutante L-108 con incremento de 2,8 veces, mientras que en las plantas wt no se detectó variación por la salinidad, aunque la concentración fue casi el doble que en la L-108.

Además, se estudió la concentración del precursor del etileno (ET), 1-aminociclopropano carboxilato (**ACC**), ya que ET y PAs (Spd y Spm) comparten un precursor común (S-adenosilmetionina). De forma similar al GABA, la concentración de ACC solo se incrementó por la salinidad (32%) en nódulos de plantas wt, mientras que no se detectaron diferencias significativas en los de L-108.

## Resultados

---

**Tabla 3.1.9.** Concentración de aminoácidos glutamato (Glu), prolina (Pro), ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) y ácido 1-aminociclopropano carboxílico (ACC) en nódulos de *M. truncatula* expresados en  $\mu\text{mol gPF}^{-1}$ . Los valores medios con la misma letra no difieren ( $P < 0.05$ ) utilizando el test de MDS.

	NaCl (mM)	Glu	Pro	GABA	ACC
<b>M9-10a</b>	0	1588 c	1398 b	1219 b	640 c
	75	2008 b	1493 b	1803 a	891 a
<b>L-108</b>	0	2483 a	758 c	1248 b	676 bc
	75	2358 a	2101 a	1251 b	710 b

---

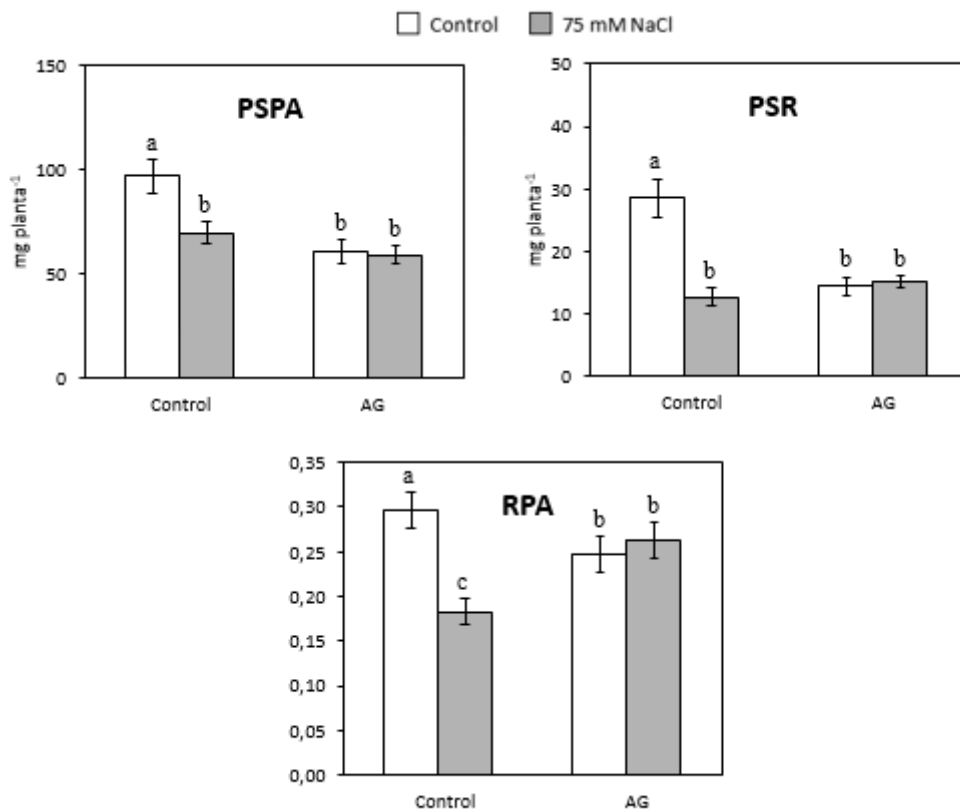




### 3.2.1. Análisis de crecimiento

Tal y como se observa en la **figura 3.2.1**, el tratamiento con AG ejerce el mismo efecto inhibitorio sobre el crecimiento que el tratamiento salino, lo que se refleja en una disminución del PSPA entorno al 35% con respecto a las plantas control, llegando al 50% de pérdida de peso en las raíces (PSR).

La relación raíz/parte aérea (RPA) sin embargo, es significativamente mayor (20%) en plantas tratadas con AG en condiciones de estrés salino respecto de las control, lo que sugiere un efecto positivo de la AG sobre el desarrollo radicular en condiciones de salinidad.

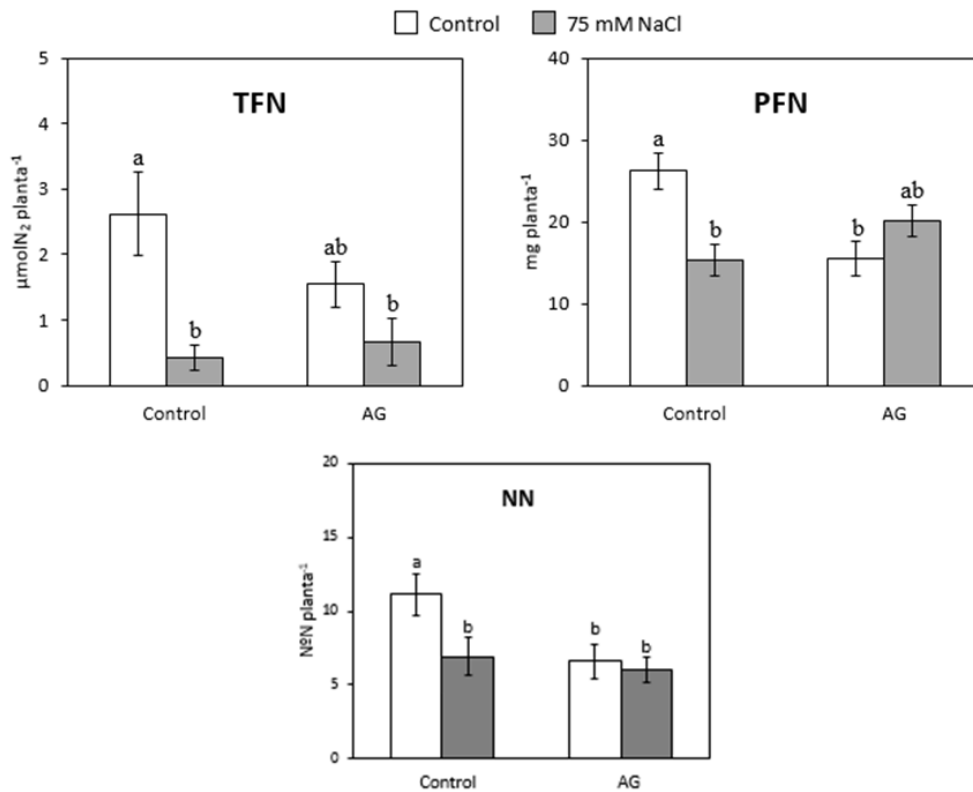


**Figura 3.2.1.** Peso seco de parte aérea (PSPA), raíz (PSR) y relación raíz/parte aérea (RPA) de plantas de *M. truncatula* inoculadas con *S. meliloti* 1021, tratadas con 0 y 0,5 mM de aminoguanidina (AG), y 0 y 75 mM NaCl. Los datos son medias + E.E. (n=12). Los valores medios con la misma letra no difieren ( $P < 0.05$ ) utilizando el test de MDS.

### 3.2.2. Fijación de nitrógeno.

La tasa de fijación de nitrógeno (TFN) por planta (**Fig. 3.2.2.**), experimentó una reducción cercana al 40% en el tratamiento con AG respecto al control, no siendo esta estadísticamente significativa, aunque en condiciones de estrés salino la reducción de TFN fue aún más acusada (disminución del 80%). Sin embargo, en plantas pre-tratadas con AG se observa un efecto menor de la salinidad, con una reducción no significativa (75%) de la TFN.

La biomasa nodular experimentó un descenso del 45% por efecto de la salinidad y la inhibición del catabolismo de PAs, sin embargo, en plantas sometidas a estrés salino y pre-tratadas con AG esta disminución de biomasa no fue significativa (inferior al 25%).



**Figura 3.2.2.** Tasa fijación de nitrógeno (TFN), peso fresco de nódulos (PFN) y n° nódulos (NN) en plantas de *M. truncatula* inoculadas con *S. meliloti* 1021, tratadas con 0 y 0,5 mM de aminoguanidina (AG), y 0 y 75 mM NaCl. Los datos son medias + E.E. (n=12). Los valores medios con la misma letra no difieren (P < 0.05) utilizando el test de MDS.

### 3.2.3. Contenido de PAs en hojas y nódulos.

Con el fin de evaluar el efecto de la inhibición del catabolismo de PAs sobre los niveles de las mismas en condiciones salinas, se analizó el contenido de PAs solubles en hojas y nódulos (**Fig. 3.2.3.a y b**).

En hojas (**Fig. 3.2.3.a**), el pre-tratamiento con AG provocó un incremento significativo del 25% en las concentraciones de Spd y Spm, mientras que los niveles de Put experimentaron una reducción del 20%. En condiciones de salinidad, los niveles de todas las PAs se redujeron a la mitad de los controles, independientemente del pre-tratamiento con AG, excepto en la Spm que presentó una reducción del 25% con el doble tratamiento.

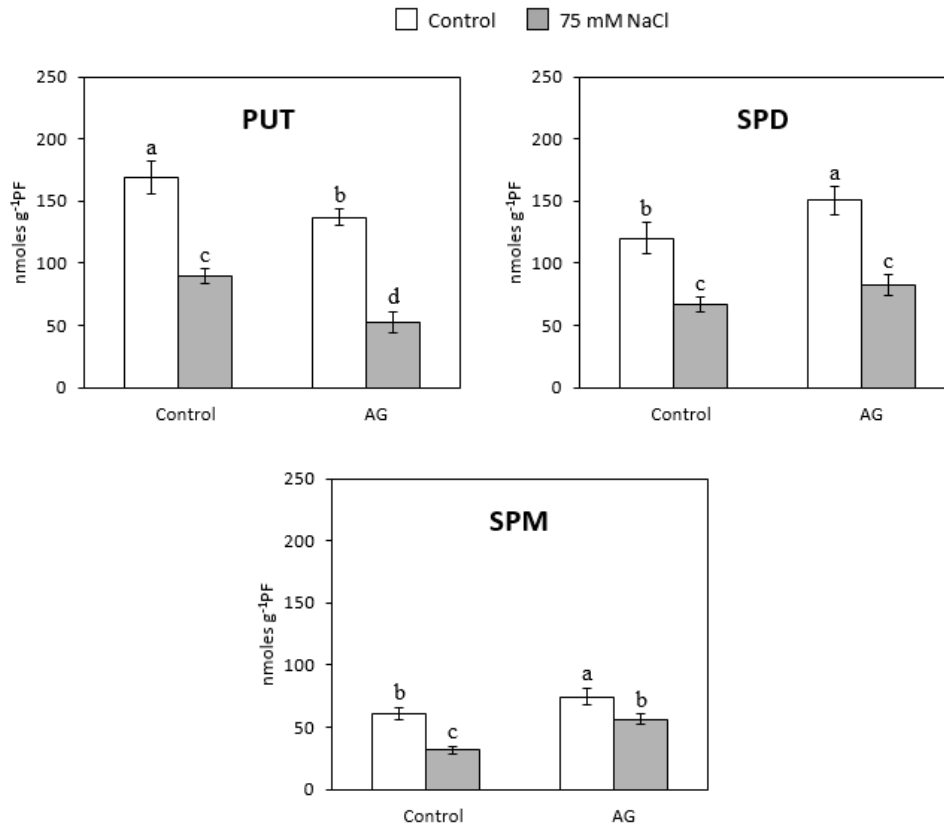
En nódulos (**Fig. 3.2.3.b**), destaca el aumento significativo en la concentración de Put y Cad en plantas tratadas con AG, siendo la concentración de Put cuatro veces superior a la de plantas control y el doble (100%) la de Cad. Sin embargo, los niveles de Spd y Spm disminuyeron un 30% y 20% respectivamente en respuesta al pre-tratamiento con AG. En condiciones de estrés salino, la concentración de todas las PAs experimentó un descenso hasta niveles inferiores al 50% del control, solo en la Put este descenso fue inferior, siendo del 100% en el caso de la Spm

En todas las PAs detectadas, excepto en la Put, el pre-tratamiento con AG amortiguó el efecto inhibitor de la salinidad, hasta el punto de que los niveles de las dos PAs específicas del nódulo (Cad y Homspd) mantuvieron las mismas concentraciones que en el control. Los niveles de Spd y Spm también fueron superiores en condiciones de salinidad en plantas pre-tratadas con AG, aunque no alcanzaron los niveles obtenidos en condiciones control, no mostrando diferencias significativas respecto del tratamiento con AG.

### 3.2.4. Catabolismo de PAs.

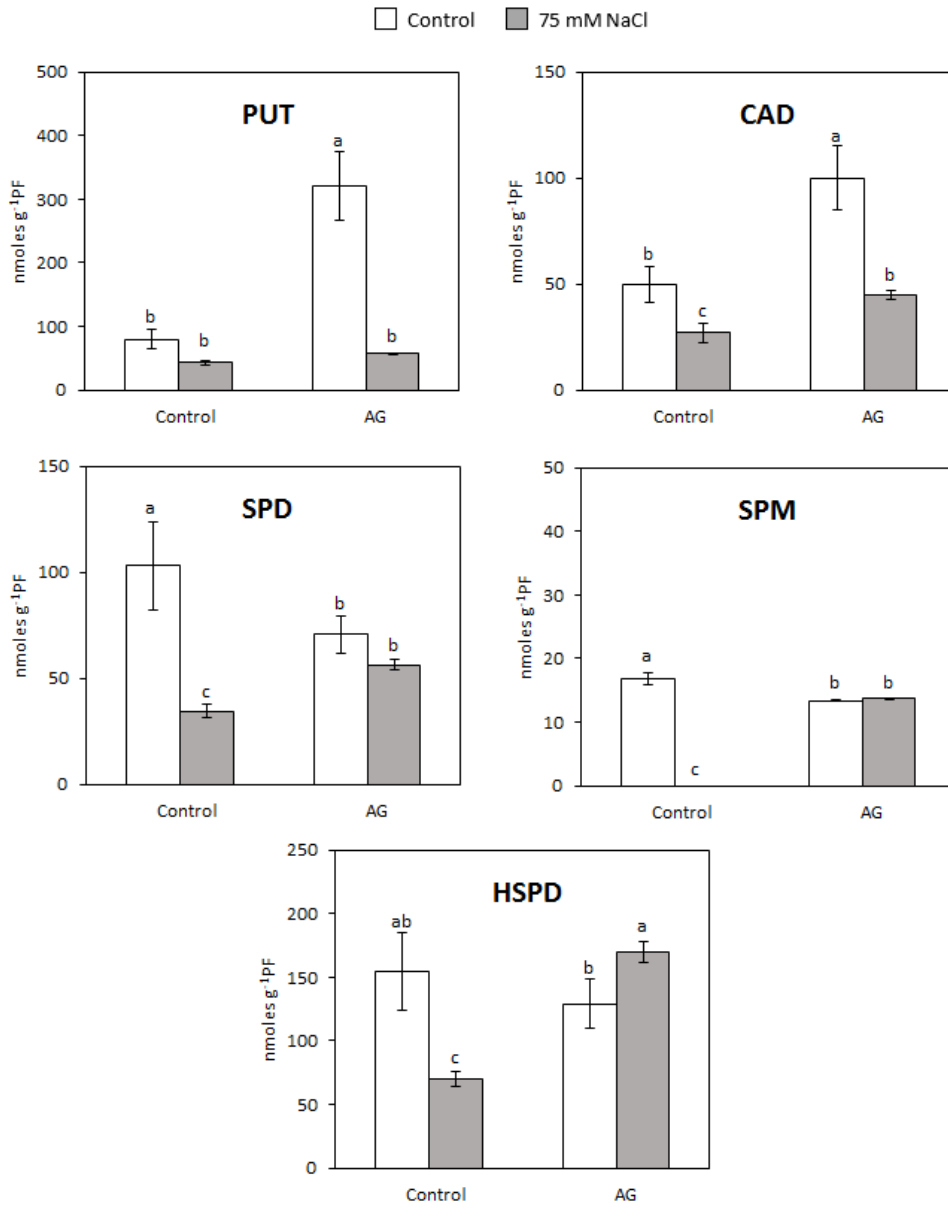
La AG se comportó como un potente inhibidor del catabolismo de las PAs (**Fig. 3.2.4**), provocando una reducción del 95 % en las actividades DAO y PAO tanto en hoja como en nódulo.

La salinidad también provocó una reducción de la actividad de estas enzimas, siendo del 35% en tejidos foliares y de entorno al 15% en los nódulos.

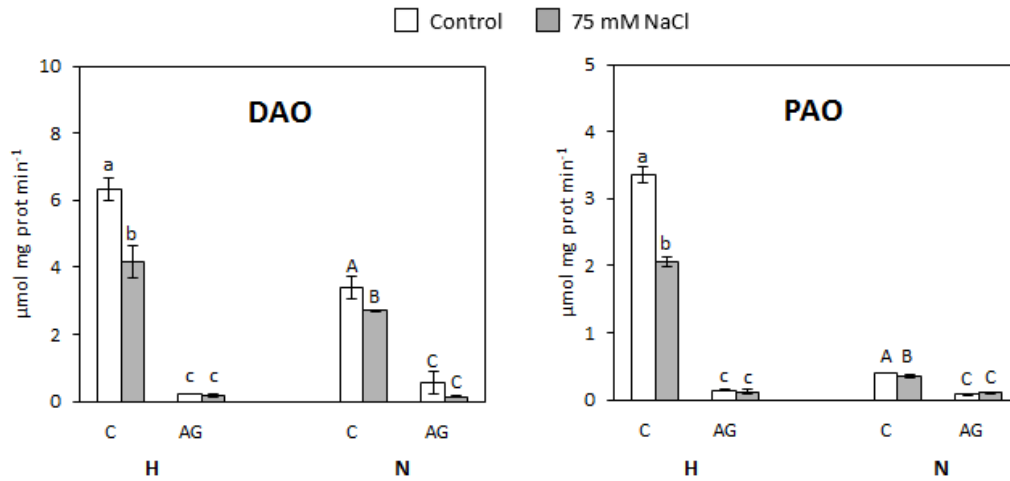


**Figura 3.2.3.a.** Contenido de PAs: putrescina (PUT), espermidina (SPD), espermina (SPM) en hojas de plantas de *M. truncatula* inoculadas con *S. meliloti* 1021, tratadas con 0 y 0,5 mM de aminoguanidina (AG), y 0 y 75 mM NaCl. Los datos son medias + E.E. (n=3). Los valores medios con la misma letra no difieren ( $P < 0.05$ ) utilizando el test de MDS.

## Resultados



**Figura 3.2.3.b.** Contenido de PAs: putrescina (PUT), cadaverina (CAD), espermidina (SPD), espermina (SPM), homoespermidina (HOMSPD) en nódulos de plantas de *M. truncatula* inoculadas con *S. meliloti* 1021, tratadas con 0 y 0,5 mM de aminoguanidina (AG), y 0 y 75 mM NaCl. Los datos son medias + E.E. (n=3). Los valores medios con la misma letra no difieren ( $P < 0.05$ ) utilizando el test de MDS.



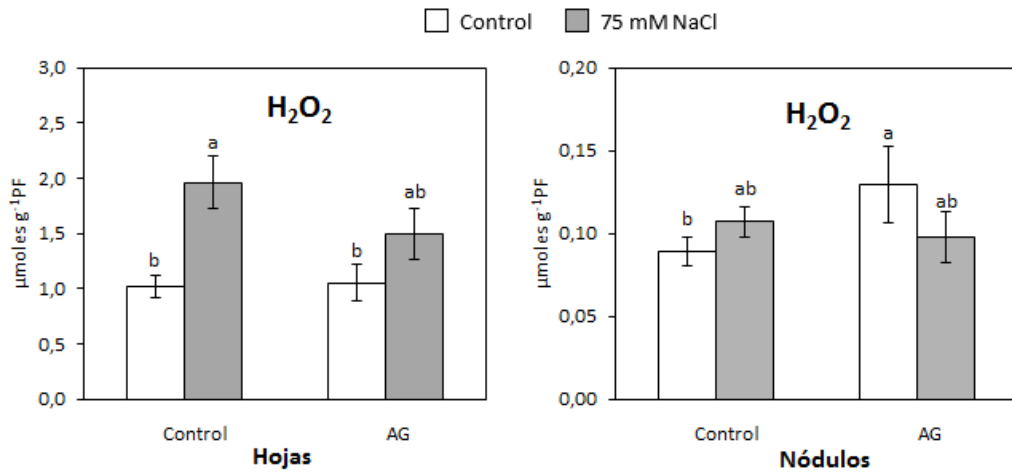
**Figura 3.2.4.** Diamino oxidasa (DAO) y poliamino oxidasa (PAO) en hoja (H) y nódulos (N) de *M. truncatula* inoculados con *S. meliloti* 1021, tratadas con 0 y 0,5 mM de aminoguanidina (AG), y 0 y 75 mM NaCl. Los datos son medias + E.E. (n = 3). Los valores medios seguidos por la misma letra no difieren (P < 0.05) utilizando el test de MDS.

### 3.2.5. Peróxido de hidrógeno.

Debido a la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> asociada a las actividades DAO y PAO, se analizó el contenido de este compuesto tanto en hoja como en nódulo con el fin de detectar la implicación del catabolismo de las PAs en su acumulación. En hojas pretratadas con AG la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por la salinidad se redujo ligeramente, como se muestra en la en el análisis histoquímico (**Fig. 3.2.5.a.**) y en el análisis cuantitativo (**Fig. 3.2.5.b.**), donde no se aprecian diferencias significativas entre el control y las plantas sometidas a salinidad y a tratamientos con AG. En nódulos, por el contrario, el efecto de la inhibición de las actividades DAO y PAO no se manifestó con una disminución de los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Fig. 3.2.5.b.**), ya que se detectaron concentraciones un 30% superiores en plantas pre-tratadas con AG respecto de los controles. En condiciones salinas no se detectaron diferencias en ninguno de los tratamientos (**Fig. 3.2.5.b.**). La combinación de salinidad y AG tampoco produjo diferencias significativas respecto del control.



**Figura 3.2.5.a.** Análisis histoquímico del contenido de  $H_2O_2$  en hojas de *M. truncatula* inoculadas con *S. meliloti* 1021, tratadas con aminoguanidina (AG) (0,5 mM) y NaCl (75 mM).



**Figura 3.2.5.b.** Niveles de  $H_2O_2$  en hoja y nódulos de *M. truncatula* inoculados con *S. meliloti* 1021, tratadas con 0 y 0,5 mM de aminoguanidina (AG), y 0 y 75 mM NaCl. Los datos son medias + E.E. (n = 3). Los valores medios seguidos por la misma letra no difieren ( $P < 0.05$ ) usando el test de MDS.



### 3.2.6. Anión superóxido.

Se realizó una tinción histoquímica específica para detectar el anión superóxido ( $O_2^-$ ) *in situ* en hojas de *M. truncatula*. La tinción mostró una acumulación de este anión debido a la salinidad, sin embargo, el co-tratamiento con AG redujo el efecto de la salinidad (**Fig. 3.2.6.**).

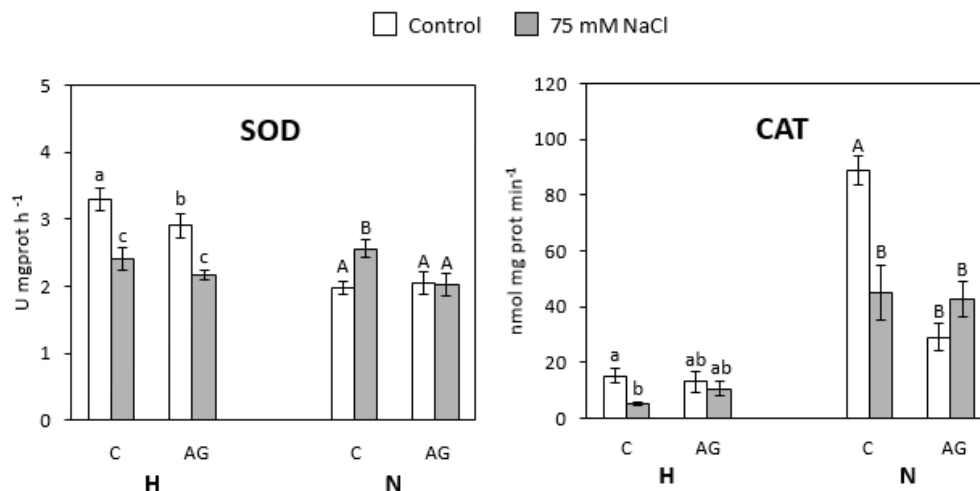


**Figura 3.2.6.** Análisis histoquímico del contenido de  $O_2^-$  en hojas de *M. truncatula* inoculadas con *S. meliloti* 1021, tratadas con aminoguanidina (AG) (0,5 mM) y NaCl (75 mM).

### 3.2.7. Actividad catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD).

Con el objetivo de determinar la implicación de los sistemas antioxidantes en los niveles de  $H_2O_2$  y anión  $O_2^-$  detectados en nódulos y hojas, se analizaron las actividades CAT y SOD en ambos órganos (**Fig. 3.2.7.**). En hojas, se observa una inhibición de hasta 3 veces en la actividad CAT por la salinidad, mientras que el pre-tratamiento con AG amortiguó esta inhibición. Sin embargo, en nódulos la AG inhibió la actividad CAT a niveles similares a los obtenidos en condiciones salinas.

La actividad SOD en hojas se redujo alrededor de un 30% por la salinidad, mientras que el pre-tratamiento con AG solo produjo una leve, aunque significativa inhibición. Por el contrario, en nódulos la salinidad produjo un incremento del 30 % en la actividad de esta enzima, mientras que los tratamientos con AG inhibieron el efecto de la sal y no varió la actividad SOD comparada con los controles.



**Figura 3.2.7.** Actividad CAT y SOD en hoja (H) y nódulos (N) de *M. truncatula* inoculados con *S. meliloti* 1021, tratadas con 0 y 0,5 mM de aminoguanidina (AG), y 0 y 75 mM NaCl. Los datos son medias + E.E. (n = 3). Los valores medios seguidos por la misma letra no difieren (P < 0.05) utilizando el test de MDS.

### 3.2.8. Contenido de aminoácidos en nódulo.

Se analizó el contenido de los aminoácidos que están en estrecha relación con el catabolismo de PAs (**Tabla 3.2.8.**) con el fin de evaluar el efecto de la inhibición de la degradación de PAs sobre su acumulación. Glu, junto con la Pro no mostraron diferencias significativas por el tratamiento con AG ni por la salinidad, mientras que en el GABA se evidenció un descenso del 27% por efecto de la AG. La salinidad provocó una reducción del 37% en los niveles nodulares de Glu y un incremento no significativo de alrededor del 20% en la concentración de GABA, independientemente del tratamiento con AG.

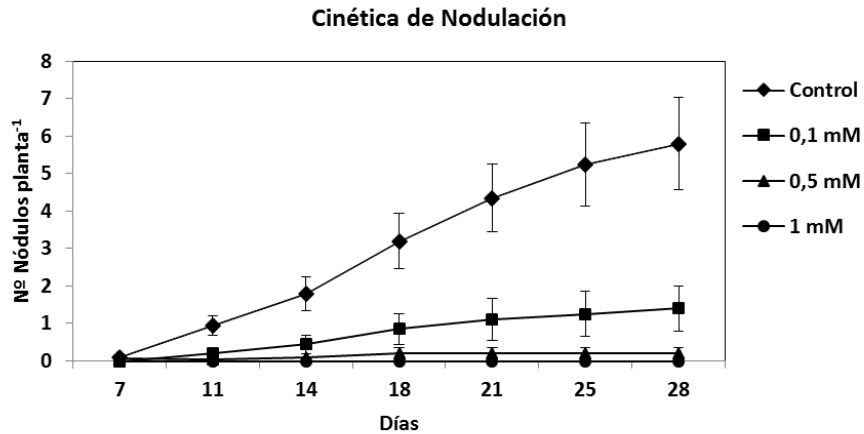
### 3.2.9. Cinética nodulación.

Se estudió el efecto de diferentes concentraciones de AG (0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM) sobre el proceso de nodulación mediante la realización de una cinética de nodulación (**Fig. 3.2.9.**). Para ello, se contaron los nódulos por planta durante 28 días, observándose una clara reducción del número de nódulos con el aumento de la concentración de AG en el medio.

**Tabla 3.2.8.** Concentración de aminoácidos glutamato (Glu), prolina (Pro), ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) y arginina (Arg) en nódulos de *M. truncatula* expresados en  $\mu\text{mol gPF}^{-1}$ . Los valores medios con la misma letra no difieren ( $P < 0.05$ ) usando el test de MDS.

	NaCl (mM)	Glu	Pro	GABA	Arg
<b>Control</b>	0	305 a	48 a	91 ab	206 a
	75	192 b	44 a	110 a	187 ab
<b>AG</b>	0	345 a	42 a	67 c	182 b
	75	223 ab	45 a	82 b	193 ab

Así, en plantas tratadas con AG 0,1 mM se cuantificaron cuatro veces menos nódulos que en plantas control, mientras que con dosis 0,5 mM de AG, el establecimiento de la simbiosis y posterior formación del nódulo fue indetectable, inhibiéndose completamente la formación de nódulos en los tratamientos de 1 mM AG.



**Figura 3.2.9.** Número de nódulos de plantas de *M. truncatula* inoculadas con *S. meliloti* 1021, tratadas con NaCl (25 mM), 0,1 mM, 0,5 mM y 1 mM de aminoguanidina (AG). Los datos son medias + E.E. (n = 20).



## ***VI- DISCUSIÓN***



## **1. Estudio comparativo de la implicación de las PAs en la respuesta a la salinidad de la simbiosis rizobio-leguminosa en nódulos determinados e indeterminados.**

Las PAs son compuestos reguladores del crecimiento en plantas, aunque se encuentran presentes en la mayor parte de seres vivos, incluyendo microorganismos procariotas, en los que participan en los mecanismos de adaptación a los estreses abióticos, y más concretamente al estrés salino (Anjali et al. 2018; Sagor et al. 2016; Campestre et al. 2011). Dependiendo de la especie, el tipo de tejido analizado y de la intensidad o duración del estrés, se han obtenido resultados contradictorios en cuanto a las concentraciones de PAs detectadas (Bouchereau et al. 1999). Estas diferencias podrían estar relacionadas con las interconversiones que experimentan estos compuestos, cuyo metabolismo se encuentra ligado al de aminoácidos y otros compuestos reguladores del crecimiento, también implicados en los mecanismos de respuesta al estrés.

Los nódulos de las raíces de leguminosas contienen una mayor variedad de PAs de las que se observan en el resto de la planta como resultado de la infección bacteriana, y acumulan PAs en niveles que son generalmente de cinco a diez veces más altos que en otros órganos de la planta (Fujihara et al. 1994). Sin embargo, se sabe poco acerca del significado fisiológico de las PAs en este órgano y su posible implicación en la respuesta a la salinidad de la simbiosis rizobio-leguminosa, por lo que se ha realizado un estudio comparativo en dos tipos de simbiosis en las que se forman nódulos determinados e indeterminados.

### **1.1. Análisis de PAs en nódulos.**

En *M. sativa*, con capacidad de formar nódulos indeterminados, una particularidad del nódulo es la presencia de una PA poco común llamada Homspd, como se ha descrito en nódulos de varias especies de leguminosas (Fujihara 2009). Esta característica es debida al hecho de que los rizobios sintetizan Homspd como PA principal, así como cantidades más pequeñas de Put, Spd y Spm (**Tabla 1.1.4.**). La presencia de Homspd en el nódulo de *M. sativa* se debe por tanto a la fracción bacteroidal que contiene las mayores concentraciones de PAs dentro del nódulo (**Tabla 1.1.4.**). Este hallazgo puede estar relacionado con la versatilidad de los rizobios para sobrevivir como

formas de vida libre en los suelos o como formas simbióticas dentro de las raíces de leguminosas huésped en condiciones de estrés.

Al comparar los niveles de PAs en hojas, raíces y nódulos tanto de *M. sativa* como de *P. vulgaris*, formadora de nódulos determinados, se observaron mayores niveles en nódulos que en el resto de órganos de la planta (**Tabla 1.2.3.**), siendo Homspd la PA más abundante, como se ha descrito en otros estudios con *P. vulgaris* (Smith 1977) y con *V. angularis* (Fujihara et al. 1995). Esto confirma su origen bacteriano (Fujihara 2009), al ser también encontrada como la PA más abundante en bacterias de *Rhizobium tropici* de vida libre y en la fracción bacteroidal del nódulo (**Tabla 1.2.4.**).

Además de la Homspd (**Fig. 1.2.3.**), en *P. vulgaris* se identificó la presencia de 4-aminobutilcadaverina (4-ABcad) que solo ha sido descrita en nódulos de *V. angularis* (Fujihara et al. 1995) bajo ciertas condiciones ambientales. Los bacteroides presentaron mayores niveles de esta PA que el citosol (**Tabla 1.2.4.**), detectándose también en bacterias de vida libre, lo que sugiere que 4-ABcad es sintetizada por los bacteroides para contrarrestar las condiciones hiperosmóticas existentes en el nódulo. Es posible que exista un aporte continuo de Cad a los bacteroides, ya que es un precursor de la síntesis de 4-ABcad, tal y como ha sido descrito en nódulos de *V. angularis* inoculados con *Bradyrhizobium japonicum* (Fujihara et al. 1995) y en *P. vulgaris* (López et al. 2016). Esta posibilidad se apoya en los bajos niveles de Cad en el citosol nodular, lo que indica la utilización de esta PA para la síntesis de 4-ABcad.

Se cuantificaron las concentraciones de PAs en ambos tipos de nódulos en condiciones de salinidad, observándose que los niveles de PAs libres descendieron tanto en los nódulos indeterminados como en nódulos determinados en respuesta al estrés salino (**Fig. 1.1.3.**) (**Fig. 1.2.5.**), contrariamente a lo descrito en otros trabajos donde se produce un aumento en los niveles de PAs como respuesta a diferentes estreses abióticos, incluida la salinidad (Jiménez-Bremont et al. 2007; Alcázar et al. 2010). Este resultado podría estar relacionado con el hecho de que las PAs se sintetizan a partir de L-Arg (a través de L-Orn) y L-metionina (Alcázar et al. 2010) que pueden ser limitantes en el nódulo en condiciones de estrés. Sin embargo, en nódulos de *M. sativa*, la concentración de Spm aumentó a altas concentraciones de sal, coincidiendo con la senescencia nodular, pudiendo contribuir a la tolerancia del nódulo en detrimento de la Put que tendría un papel menos determinante,



como se ha descrito en otras especies vegetales (Benavides et al. 1997; Lefevre et al. 2001). Se ha postulado que la acumulación de Spm en las superficies de las membranas puede jugar un importante papel en condiciones de estrés salino, al ser capaz de controlar la permeabilidad y estabilidad de las mismas (Roy et al. 2005).

En nódulos determinados de *P. vulgaris* la Cad fue una excepción a la reducción general de PAs libres con la salinidad, lo que puede ser debido al hecho de que la Cad, a diferencia de las PAs pertenecientes a la familia de la Put (Spd, Spm), es producto de una ruta metabólica diferente, que parte del Asp y se forma por descarboxilación de la Lys (Kuznetsov y Shevyakova 2007). De esta manera no debería competir con la Put, que deriva del Glu, por lo tanto, la acumulación de Cad compensaría el descenso de las PAs derivadas de la Put en condiciones salinas (Kuznetsov et al. 2007).

La reducción de los niveles de Homspd por la salinidad observados en nódulos de *P. vulgaris* (**Fig. 1.2.5.**), coincide con estudios previos en cepas de rizobios sometidos a estrés salino, donde también descendieron los niveles de Homspd (Fujihara and Yoneyama 1993). Por otra parte, 4-ABcad mostró una respuesta similar a la Cad, aumentando sus niveles con el tratamiento salino, lo que corrobora el aporte de Cad por parte de la planta al bacteroide para la síntesis de 4-ABcad, como se mencionaba anteriormente. El hecho de que esta inusual PA se produzca solo en condiciones ambientales específicas, justifica su presencia en el tejido nodular, así como su incremento en condiciones de estrés salino que apoyaría su participación en la respuesta a la salinidad inducida por los bacteroides.

En nódulos de *M. sativa* el contenido de PAs conjugadas fue analizado, no detectándose diferencias respecto de las PAs libres en respuesta a la salinidad (datos no mostrados). Éstos resultados por tanto, no indican que la transformación de PAs solubles en conjugadas y viceversa constituya un mecanismo de respuesta a la salinidad. Por el contrario, en nódulos de *P. vulgaris*, la conversión de PAs libres a PAs conjugadas solubles puede ser la causa del descenso de los niveles de PAs libres en condiciones salinas, ya que en nódulos determinados, las PAs conjugadas aumentan en estas condiciones (**Fig. 1.2.6.**). Sin embargo, la Cad conjugada siguió el mismo patrón que la Cad libre y no se detectaron ni Spm ni Homspd conjugadas, por lo que estas PAs libres participarían en la respuesta a la salinidad. Las PAs conjugadas son importantes para el control intracelular de los niveles de PAs (Bagni y

Tassoni 2001), interactúan con componentes de la pared celular brindándoles protección (Bach Tuyet Lam et al. 1992) e incluso pueden servir para el transporte o como sustrato para peroxidasas (Havelange et al. 1996), lo que no excluye que actúen como reservorio de PAs para ser utilizadas en condiciones extremas (Kuznetsov y Shevyakova 2007). Considerando la suma de PAs libres y conjugadas en nódulos *P. vulgaris*, la cantidad de Put, Spd y Cad aumentan en condiciones salinas, lo que está en consonancia con otros estudios (Jiménez-Bremont et al. 2007; Hernández-Lucero et al. 2008; Alcázar et al. 2010).

### 1.2. Catabolismo de PAs.

El catabolismo de las PAs por desaminación oxidativa en reacciones catalizadas por las amino oxidasas, diamino oxidasa (DAO) y poliamino oxidasa (PAO), es crucial para regular sus niveles en las células (Cona et al. 2006). En *M. sativa*, las actividades nodulares de DAO y PAO se inhibieron por la salinidad (**Fig. 1.1.5.**), contrariamente a lo esperado, ya que en varios estudios previos se muestra un aumento de la expresión de PAO y DAO en diversas condiciones de estrés abiótico (Xue et al. 2009; Quinet et al. 2010; Toumi et al. 2010). Según estos autores, el estrés abiótico induce la degradación de PAs y, por lo tanto, la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que desencadena una cascada de señalización que activa varias proteínas sensibles al estrés (Moschou et al. 2008) o aumenta la acumulación de GABA (Xing et al. 2007), involucrado en mecanismos de defensa frente al estrés salino. En este caso, la limitación del sustrato para la síntesis de PAs producida por el estrés salino, en lugar de inducir el catabolismo de las mismas, provocó la inhibición de las actividades DAO y PAO en nódulo.

### 1.3. Expresión de los genes de biosíntesis de PAs.

Al analizar los niveles de transcripción de los genes involucrados en la biosíntesis de PAs en diferentes tejidos de *P. vulgaris* (**Fig. 1.2.8.**), se observa que los niveles de expresión de *Adc* en nódulos son muy bajos comparados con los encontrados en hojas y raíces. Sin embargo, los transcritos para *Odc* se detectaron principalmente en el nódulo, lo que sugiere que la actividad ODC es esencial para la síntesis de PAs en este órgano. La

acumulación de transcritos de *Adc* ha sido descrita como específica de órganos en desarrollo, como meristemos, hojas jóvenes y botones florales (Perez-Amador et al. 1995). En *P. vulgaris*, los nódulos analizados estaban completamente desarrollados y carecían de meristemos persistentes, lo que contribuye a la baja expresión de los genes *Adc*. Por otro lado, los genes *Odc*, se han asociado al crecimiento y proliferación celular en raíces, al contrario que en hojas y vasos, donde la división celular es limitada (Kwak y Lee 2001). Es por esto, que la mayor expresión de *Odc* en el tejido nodular pueda estar relacionada con la proliferación celular existente en el córtex radical para la formación del nódulo, y justifica la ausencia de expresión de este gen en hojas (Jimenez-Bremont et al. 2006b).

La mayor expresión de *Spds* en nódulos es debida a una mayor actividad del metabolismo biosintético de PAs en este órgano que en el resto de la planta, además, es consecuente con las mayores concentraciones de PAs detectadas en nódulos en comparación con hojas y raíces (**Tabla 1.2.3.**) (Fujihara et al. 1994). Los niveles de expresión de *Samdc*, fueron similares en hojas y nódulos, pero más altos en raíces, tal y como se ha observado en *P. sativum*, lo que sugiere una expresión dependiente del órgano, y resalta la importancia de las PAs en las células vegetales de tejidos en crecimiento (Marco and Carrasco 2002). Los niveles de expresión de *Spms* fueron bajos en todos los tejidos y se correlacionan con las bajas concentraciones de Spm detectadas. En general, los niveles de expresión de los genes implicados en la biosíntesis de PAs son específicos de tejidos y no siguen un patrón común entre distintas especies, como resultado de diferentes mecanismos de regulación (Jimenez-Bremont et al. 2006b).

En *P. vulgaris*, en condiciones de estrés salino (**Fig. 1.2.9.**) aumentaron los niveles de expresión de *Adc* tanto a los 3 como a los 7 días, mientras que los niveles de *Odc* solo aumentaron a los 3 días de tratamiento salino, siendo esta inducción mayor que para el gen *Adc*. Estos resultados sugieren que *Odc* juega un papel importante en la respuesta temprana a la salinidad en nódulos de *P. vulgaris*. Sin embargo, en otros estudios, con otras especies sometidas a condiciones de estrés salino, la respuesta de las PAs a la salinidad está principalmente relacionada con la activación de *Adc* (Bouchereau et al. 1999). En cuanto al aumento que, con ambos tratamientos salinos, se produce en *Spds* y *Samdc*, se correlaciona ( $R= 0.88$ ) con la inducción de los niveles de Spd conjugada observados en la **figura 1.2.6.**

Para comprobar si había mecanismos de regulación post transcripcional en las actividades de las enzimas ADC y ODC en nódulos de *P. vulgaris*, se analizaron ambas (**Fig. 1.2.7.**). El incremento de la actividad ODC a los 3 días de tratamiento salino confirma la implicación de esta ruta metabólica en la respuesta temprana al estrés salino en nódulos. Sin embargo, la actividad de ambas enzimas no se correlaciona con la cantidad de PAs libres acumuladas a los 3 días (**Fig. 1.2.5.**), lo que sugiere que la transformación de Put y Spd a sus formas conjugadas, sería el mecanismo responsable del descenso de los niveles de estas PAs en nódulos de *P. vulgaris*.

#### 1.4. Fijación de nitrógeno.

Los parámetros de fijación de nitrógeno (ANA, ANT y TFN) en *M. sativa* (**Tabla 1.1.2**) mostraron una alta sensibilidad a la salinidad, y una reducción del peso seco del nódulo (PSN) como se ha descrito en otras leguminosas formadoras de nódulos indeterminados como *M. truncatula* (López et al. 2008) o *P. sativum* (Cordovilla et al. 1999). Esta reducción en la actividad nitrogenasa debida a la salinidad se ha atribuido a su efecto negativo sobre la infección por parte del rizobio, la formación y crecimiento de nuevos nódulos, la eficiencia de los nódulos completamente formados o sobre la diferenciación de los rizobios a bacteroides fijadores activos (Aranjuelo et al. 2014). En *M. sativa* se observa, además, una tendencia similar en respuesta a la salinidad en la actividad nitrogenasa y la concentración de PAs nodulares.

En *P. vulgaris* la inhibición de la actividad nitrogenasa (**Fig. 1.2.2.**), proporcional a la duración del estrés, ya había sido descrita en otras leguminosas (Khadri et al. 2006). En este caso, la inhibición de la nitrogenasa no está asociada a la formación del nódulo, ya que la aplicación de los tratamientos salinos se realizó cuando la simbiosis ya estaba bien establecida y los nódulos eran activos. La biomasa de los nódulos solo se redujo un 20% debido a la salinidad, por tanto, la reducción de la actividad nitrogenasa es debida más bien a un efecto negativo sobre el metabolismo nodular que a la formación del nódulo. Esta reducción de la nitrogenasa es un factor limitante para la síntesis de PAs en el nódulo de *P. vulgaris*, al igual que ocurrió en nódulos de *M. sativa*.

### 1.5. Crecimiento.

Tanto en *M. sativa* como en *P. vulgaris*, los parámetros de crecimiento (PSPA y PSR) (**Fig. 1.1.1.**) mostraron un comportamiento consistente con la inhibición en la fijación de nitrógeno por la salinidad, estando, posiblemente relacionado este descenso con la limitación de nitrógeno, ya que el suministro de N<sub>2</sub> a la planta depende exclusivamente de la capacidad de los nódulos de fijar N<sub>2</sub> atmosférico. El efecto inhibitorio de la salinidad sobre el crecimiento vegetal ha sido descrito en varias leguminosas de interés agrario como *P. sativum*, *V. faba*, *G. max* (Delgado et al. 1994) y *C. arietinum* (Tejera et al. 2006). Sin embargo, en *P. vulgaris* la inhibición del crecimiento no afecta de la misma manera a la parte aérea que a las raíces, mostrando un incremento de la relación raíz/parte aérea. Este comportamiento está destinado a mejorar la captación hídrica, al aumentar la superficie y extensión radical (Khadri et al. 2006).

### 1.6. Contenido de prolina.

En general, el incremento en los niveles de Pro por efecto de la salinidad (**Fig. 1.1.6.**) podría estar asociado a la disminución de los niveles de Put y Spd en nódulos de *M. sativa*, lo que sugiere que la degradación de estas PAs contribuye a la síntesis y acumulación de este aminoácido, tal y como ha sido previamente publicado (Aziz et al. 1998; Su y Bai 2008). Sin embargo, debido a la inhibición de las actividades DAO y PAO, no se puede concluir que el catabolismo de las PAs contribuya a la acumulación de Pro. Este efecto puede estar producido por la relación existente entre dos vías metabólicas que se derivan del Glu como precursor común en la formación de Pro y PAs y que, por lo tanto, debe coordinarse de manera estrecha y recíproca. En ese sentido, se ha observado que cuando *V. aconitifolia* se somete a estrés salino, se favorece la síntesis de Pro a partir del Glu, compitiendo con la síntesis de PAs (Delauney y Verma 1993).

A diferencia de lo encontrado en nódulos de *M. sativa*, en nódulos de *P. vulgaris*, se observa una acumulación de Cad y 4-ABcad como respuesta frente al estrés osmótico. La Cad es utilizada por el bacteroide para formar 4-ABcad (López-Gómez et al. 2016), confirmando la participación del microsimbionte en la tolerancia al estrés salino.

### 1.7. Estrés oxidativo.

Los nódulos tienen un alto potencial para la producción de EROS debido a, entre otros factores, las elevadas tasas de respiración del bacteroide y las condiciones altamente reductoras requeridas para la fijación de N<sub>2</sub> (Dalton et al. 1998). Se sabe además que el daño oxidativo está asociado a un estrés secundario provocado por la salinidad, lo que llevó a analizar los niveles de malonedialdehído (MDA), considerado un buen marcador para determinar el daño oxidativo provocado por la peroxidación de lípidos. En nódulos de *M. sativa* se detectó un incremento en los niveles de este compuesto por la salinidad (**Fig. 1.1.7.**), lo que podría estar relacionado con el efecto negativo de la salinidad en el funcionamiento del nódulo. Las PAs tienen un papel protector contra el estrés oxidativo debido a su capacidad de eliminar radicales libres e inhibir la peroxidación lipídica (Tang y Newton 2005). Por tanto, la disminución de la concentración de PAs y el incremento de la peroxidación de lípidos puede ser indicativa del papel de las PAs como antioxidantes.

En nódulos de *P. vulgaris*, se ha observado que las condiciones salinas también provocan un aumento de la peroxidación lipídica en nódulos, a pesar del incremento general de todas las actividades enzimáticas antioxidantes, a excepción de la CAT que se mantiene constante en hojas (Palma et al. 2009). Debido a las fuertes condiciones reductoras del nódulo, es necesario mantener constante su actividad debido a su gran potencial para detoxificar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en este órgano, sin embargo, esta enzima resultó ser más sensible a la salinidad en nódulos determinados de *P. vulgaris* que en nódulos indeterminados de *M. sativa* (Tejera García et al. 2007).

### 1.8. Cinética de nodulación.

En el ensayo de cinética de nodulación realizado con plántulas de *M. sativa*, se determinó el efecto de las PAs exógenas sobre el establecimiento de la simbiosis y la formación de los nódulos. Se observó un retraso en el proceso de nodulación (**Fig. 1.1.8.**) que podría estar relacionado con la inducción de actividades de DAO y PAO que determinarían el incremento de los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, implicado en la insolubilización de las glicoproteínas de extensión que contrarrestan la formación del canal de infección (Wisniewski y Brewin 2000). Por otro lado, el efecto inhibitorio de las PAs en la

nodulación se podría deber a la inhibición del crecimiento de las bacterias en las primeras etapas del establecimiento de la simbiosis (Vassileva y Ignatov 1999), sin embargo, mediante la realización de curvas de crecimiento bacteriano (**Fig. 1.1.9.**) se descartó esta posibilidad.

## **2. Interacción entre PAs y BRs en la respuesta a la salinidad de la simbiosis *M. truncatula*-*S. meliloti*.**

Los BRs son un grupo de hormonas esteroideas que desempeñan funciones fundamentales en una amplia gama de actividades fisiológicas, incluidas las respuestas al estrés (Fariduddin et al. 2014). Sin embargo, se ha demostrado que la acción de los BRs se produce en interacción con otros reguladores del crecimiento de las plantas (Choudhary et al. 2012b) entre los que se incluyen las PAs (Fariduddin et al. 2013a). Se ha demostrado que tanto los BRs como las PAs están involucrados en las respuestas adaptativas de las plantas al estrés salino (Choudhary et al. 2012c).

Por otro lado, se ha observado que la aplicación exógena de PAs aumenta la tolerancia al estrés salino en plantas, ya sea eliminando radicales libres, estabilizando membranas y estructuras celulares o modulando canales de transporte iónico (Li et al. 2016; Alcázar et al. 2010). El efecto positivo de las PAs se ha asociado a una interacción con otras hormonas antiestrés como el ácido abscísico (ABA) (Palma et al. 2014), ácido salicílico (SA) (Palma et al. 2013), etileno (Galston et al. 1997) o BRs (Zheng et al. 2016). Por otro lado, existen evidencias que indican que la regulación del proceso de nodulación en leguminosas está influenciado por un efecto sistémico de los BRs en la formación de los nódulos de la raíz debido a un incremento de los niveles de PAs (Terakado-Tonooka and Fujihara 2008).

Todos estos estudios previos hacen que sea de interés estudiar el efecto de PAs y BRs aplicados de forma exógena en la respuesta a la salinidad de la simbiosis *M. truncatula* – *S. meliloti*, determinando la posible interacción entre los genes de biosíntesis de ambos grupos de moléculas.

### **2.1. Crecimiento.**

La aplicación foliar de la EBL tiene un efecto sistémico sobre los parámetros de crecimiento en *M. truncatula* (**Fig. 2.1.1.**) al incrementar tanto

en raíces como en parte aérea, lo que puede estar relacionado con la capacidad de los BRs para promover la elongación celular a través de un aumento de actividad de la enzima xiloglucano endotransglicosilasa y la progresión del ciclo celular (Fridman y Savaldi-Goldstein 2013). En plantas tratadas con Spd y Spm (**Fig. 2.2.1.**) también se produjo un incremento de la biomasa, similar al producido por el tratamiento con EBL, pudiendo estar relacionado con la capacidad de las PAs de actuar como reguladores del crecimiento, promoviendo la replicación de ADN, la división celular y la elongación de la raíz (Alcázar et al. 2010).

En condiciones de estrés salino, el PSP de ambos experimentos se redujo, relacionado con la inhibición observada en tales condiciones de la tasa de fijación de nitrógeno (Lopez et al. 2008). Sin embargo, el tratamiento conjunto con NaCl y EBL restableció estos parámetros, así como los de fijación de nitrógeno a niveles similares a las plantas de control (**Fig. 2.1.2.**), lo que confirma el efecto beneficioso de EBL en la respuesta a las condiciones de estrés salino del metabolismo nodular. En las plantas tratadas con PAs, la biomasa producida en condiciones de salinidad estaba en niveles similares al de plantas control (**Fig. 2.2.1.**), lo que indica la capacidad de las PAs para inducir el crecimiento, incluso en condiciones adversas, sugiriendo su implicación en la tolerancia al estrés salino.

## **2.2. Fijación de nitrógeno.**

Tanto la biomasa de nódulos como la actividad de la nitrogenasa (**Fig. 2.1.2.**) se vieron afectadas positivamente por la aplicación de EBL, lo que indica que existe un efecto positivo sobre la actividad metabólica nodular por el tratamiento con EBL, tal y como lo confirma una mayor TFN. En ese sentido, se ha correlacionado un incremento en la actividad sacarosa sintasa con la actividad de la nitrogenasa (Gordon et al. 1997), que podría ser el factor que mejore la fijación de nitrógeno (Zabalza et al. 2004). Por otro lado, la aplicación exógena de PAs incrementó también la actividad nitrogenasa en los nódulos (**Fig. 2.2.2.**), lo que justifica la promoción del crecimiento inducido por las PAs debido a un mayor aporte de nitrógeno a la planta. De hecho, se ha observado una correlación lineal ( $r= 0.96$ ) entre la concentración de Spd en nódulos y la actividad nitrogenasa (Lahiri et al. 2004). El incremento de la actividad nitrogenasa estuvo acompañada de un aumento en el peso fresco de los nódulos, como se ha visto previamente en la leguminosa



*Galega orientalis* en simbiosis con *Rhizobium galegae* (Vassileva y Ignatov 1999). Este efecto está estrechamente relacionado con el papel regulador de las PAs en los procesos de nodulación, como se ha observado en *L. japonicus*, donde la máxima expresión de genes relacionados con la biosíntesis de PAs se dio en las primeras etapas del desarrollo nodular (Efroze et al. 2008).

### 2.3. Contenido de PAs.

La aplicación foliar de EBL provocó una reducción generalizada de los niveles de PAs en hojas y nódulos (**Fig. 2.1.3.**). Sin embargo, en condiciones de estrés salino, los niveles foliares de Spm aumentaron inducidos por EBL; al mismo tiempo que en el nódulo se observó un ligero pero significativo incremento en las PAs más abundantes (Spd, Homspd y Cad). Estos resultados están de acuerdo con observaciones previas en *Raphanus sativus* (Choudhary et al. 2012a), donde se ha descrito un incremento significativo de los niveles de PAs por el tratamiento con EBL en estrés por cobre y cromo. Así mismo, en tomate se ha observado acumulación de Spm en estrés salino por tratamientos con EBL (Zheng et al. 2016). Además, se ha demostrado que muchas plantas tienen capacidad de promover la conversión de Put en Spm en estrés salino, lo que determina su tolerancia (Sannazzaro et al. 2007).

En las plantas tratadas con PAs exógenas, se observó que, en condiciones de estrés salino, los niveles de Put y Spd fueron menores, tanto en hojas como en nódulos, independientemente de los tratamientos con PAs, mientras que la Spm aumentó, tanto en plantas control como en las tratadas con PAs (**Fig. 2.2.3.**). De forma general, un incremento de la relación  $(\text{Spd} + \text{Spm}) / \text{Put}$  está relacionado con la tolerancia a la salinidad en la mayoría de los casos (Zapata et al. 2004). Además, la Spm participa en la modulación de la permeabilidad y estabilización de membranas (Roy et al. 2005), reduciendo la generación de EROs (Cuevas et al. 2004), por lo que la acumulación de Spm, ha sido considerada una característica general de la planta en la respuesta a la salinidad (Sanchez et al. 2005). Por otro lado, la acumulación de Spd y Spm en hojas de plantas tratadas con cada PA indica un transporte de las mismas desde las raíces a la parte aérea, debido a la existencia de transportadores específicos (Kuznetsov et al. 2002).

En el nódulo en plantas tratadas con PAs exógenas, se observa la presencia de PAs poco comunes pero características del nódulo de

leguminosas, como Cad y Homspd, al igual que en los nódulos de plantas tratadas con EBL. Los niveles de todas las PAs fueron mayores en nódulo que en hoja, siendo la Homspd la PA más abundante de las sintetizadas por el bacteroide (López-Gómez et al. 2016). Los tratamientos con Spd y Spm incrementaron el contenido nodular de ambas PAs, lo que se correlacionó con un incremento de la biomasa nodular ( $r=0.69$ ) y de la actividad nitrogenasa ( $r=0.96$ ), sugiriendo la implicación de Spd y Spm en la efectividad de la simbiosis. Sin embargo, los niveles de Cad y Homspd descendieron por la aplicación exógena de PAs, lo cual puede ser debido a que Spd y Spm reemplazan a las PAs poco comunes, ya que se ha demostrado que la estructura exacta de las PAs no es un requisito crítico para poder ejercer su función (Shaw et al. 2010). Por el contrario, la concentración de las PAs específicas del nódulo (Homspd y Cad) y Spm aumentó en condiciones de estrés salino debido a su implicación en la tolerancia al estrés, destacando la Homspd debido a su participación en la respuesta al estrés abiótico en los rizobios (Fujihara 2009).

#### 2.4. Expresión de genes del metabolismo de PAs y BRs.

El aumento de los niveles de PAs por EBL en condiciones de salinidad podría estar relacionado con un aumento de la expresión de los genes de biosíntesis de PAs (**Fig. 2.1.4.**). El análisis de la expresión de los genes *Adc*, *Spds* y *Spms* en hojas mostró una inducción de *Spds* y *Spms* por el tratamiento conjunto con EBL y sal, lo que coincide con el incremento de los niveles de Spm en las hojas en las mismas condiciones. Sin embargo, no se detectó correlación entre el incremento del nivel de expresión de los genes biosintéticos de PAs por la salinidad y los niveles de PAs, lo que podría estar relacionado con la existencia de mecanismos de regulación postranscripcional y/o traduccional. De forma similar, en las plantas tratadas con PAs exógenas, se promovió la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de BRs (**Fig. 2.2.4.**) tanto en condiciones control como de salinidad, lo que apoya una comunicación entre PAs y BRs en la respuesta al estrés salino en la simbiosis *M. truncatula* – *S. meliloti*.

## **2.5. Estrés oxidativo.**

La salinidad provoca estrés oxidativo a través del incremento de EROs como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que en exceso causa peroxidación lipídica y la consiguiente alteración en el funcionamiento de las membranas celulares. Como indicador del daño oxidativo producido en las membranas, se determinó el contenido de malondialdehído (MDA), producto de la peroxidación lipídica, (**Fig. 2.1.5.**). El tratamiento previo con EBL redujo los niveles de MDA en plantas con estrés salino, lo que indica un efecto protector de membrana de EBL también detectado en estrés por cromo (Choudhary et al. 2011; Choudhary et al. 2012a).

En las plantas tratadas con PAs exógenas, los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Fig. 2.2.7.a**) aumentaron respecto al control, sin embargo, este aumento no afectó a los niveles de MDA (**Fig. 2.2.5.**), ya que fueron idénticos para los tratamientos con Spd y Spm control, estando este aumento de peróxido ligado probablemente al catabolismo de PAs. En estrés salino, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentó significativamente indicando un mayor estrés oxidativo en estas plantas. Sin embargo, los pretratamientos con Spd y Spm redujeron los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en condiciones de salinidad; al igual que el MDA, obteniéndose niveles similares a los encontrados en plantas no sometidas a estrés salino, confirmando el beneficio de las PAs exógenas en la protección de membranas durante el estrés abiótico (Li et al. 2014). Estos datos confirman los resultados de otros estudios (Li et al. 2016; Nahar et al. 2016), que muestran el papel de las PAs como eficientes destructores de EROs y como estabilizadores de membranas en condiciones salinas. Sin embargo, a bajas concentraciones, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> previene el daño oxidativo promoviendo la síntesis de enzimas antioxidantes y restaurando la homeostasis redox (Bhattacharjee 2012), siendo de vital importancia mantener los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> óptimos. De esta manera, tanto el análisis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante tinción histoquímica (**Fig. 2.2.7.b**), como el análisis cuantitativo mostraron un moderado incremento del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en plantas pretratadas con Spd y Spm.

## **2.6. Contenido de prolina.**

La acumulación de Pro está considerada como una de las respuestas adaptativas más comunes de las plantas frente a la salinidad, debido a sus propiedades antioxidantes y capacidad de actuar como soluto compatible para

mantener la osmosis celular (Aziz et al. 1999). Así mismo, el metabolismo de PAs ejerce una acción directa o indirecta sobre el metabolismo de la Pro, ya sea a través de la degradación de PAs, que contribuiría a su acumulación (Su y Bai 2008), o mediante competencia de ambas por el glutamato como precursor común (como se mencionó en la discusión del objetivo 1). En hojas de *M. truncatula* la salinidad indujo una fuerte acumulación de Pro (**Fig. 2.1.6.**); (**Fig. 2.2.6.**), lo que sugiere la preferencia de este aminoácido sobre las PAs en la respuesta a la salinidad, al igual que se observó en nódulos de *M. sativa* en el objetivo 1.

La acumulación de Pro en hojas, aumentó el triple en condiciones de estrés salino respecto al control en ambos experimentos, sin embargo, en el tratamiento conjunto con sal y EBL (**Fig 2.1.6.**) y sal y Spm (**Fig 2.2.6.**) provocaron una reducción en la acumulación de Pro, lo que podría deberse a la reducción de las condiciones de estrés y al daño producido por este, ya que la acumulación de Pro también se ha considerado una consecuencia del daño, más que una estrategia protectora (Pérez-Alfocea et al. 1996). En general, se ha cuestionado el papel de la Pro en la osmorregulación y la tolerancia al estrés, y su acumulación a veces se ha asociado a una estrategia protectora o a una consecuencia del daño (Ashraf y Harris 2004). La acumulación de Spm observada en condiciones salinas (**Fig. 2.1.3.**); (**Fig. 2.2.3.**), indica que esta PA podría sustituir a la Pro en la respuesta al estrés salino. Este resultado además está apoyado por algunos autores, que observaron que la aplicación de PAs exógenas supuso un descenso en los niveles de Pro en plantas de *P. vulgaris* sometidas a un estrés salino (Jimenez-Bremont et al. 2006a).

## 2.7. Cinética de nodulación.

Se evaluó el efecto de los BRs en el establecimiento de la simbiosis mediante la realización de una cinética de nodulación en la que se detectó una reducción del número de nódulos por planta (**Fig. 2.1.7.a.**). Este resultado no coincidió con el incremento del peso fresco en nódulos detectado con la aplicación foliar de EBL (**Fig. 2.1.2.**), por lo que la reducción de la nodulación podría estar relacionada con el incremento del nivel de PAs en la parte aérea (**Fig. 2.1.7.b.**), que se ha asociado previamente al mecanismo de supresión de la formación de nódulos en un mutante de soja supernodulante (Terakado et al. 2006). Por lo tanto, estos resultados muestran diferentes respuestas de la

simbiosis al tratamiento con EBL, dependiendo de si la aplicación del mismo es foliar o en la solución de riego.

### **3. Estudio de la implicación de las PAs en la respuesta al estrés salino en la simbiosis *M. truncatula* – *S. meliloti*, mediante alteraciones en las rutas metabólicas de biosíntesis y de oxidación.**

La implicación de las PAs en la adaptación al estrés salino ha sido muy discutida, habiéndose estudiado en muchos trabajos la relación entre los niveles de PAs y la capacidad de las plantas de tolerar el estrés salino (Campestre et al. 2011; Espasandin et al. 2018; Podlešáková et al. 2019). Uno de los enfoques empleados consiste en la sobreexpresión de genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de PAs (Minocha et al. 2014), lo que conlleva un aumento de la tolerancia de las plantas a varios estreses y sugiere que un incremento en la síntesis de PAs es efectivo contra diferentes tipos de estrés (Fariduddin et al. 2013b). Otra estrategia de estudio es la alteración de la oxidación de PAs para modular los niveles de éstas, lo que permite comprobar el grado de implicación de las PAs en la respuesta a la salinidad (Sagor et al. 2016). En este caso, se ha estudiado el efecto de la inhibición del catabolismo de PAs mediante aminoguanidina (AG), descrita como un potente inhibidor de la oxidación de PAs (Aziz et al. 1998), así como la sobreexpresión del gen *Adc* en plantas transgénicas (L-108), en la simbiosis *M. truncatula*-*S. meliloti*.

Las complejas interacciones entre los niveles de PAs, aminoácidos y otras hormonas y moléculas señal entre las que se encuentra el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que participa en un complejo sistema de señalización, hace que no se pueda establecer una relación directa entre el incremento de los niveles de PAs y la tolerancia a estrés abiótico (Gupta et al. 2016).

#### **3.1. Crecimiento y fijación de nitrógeno.**

En plantas transformadas que sobreexpresan el gen de biosíntesis de Put *Adc*, (L-108), se observó un incremento en el crecimiento, incluso en condiciones de salinidad, con respecto a las plantas control (M9-10a) (**Fig. 3.1.4.**), estando este hecho relacionado con un aumento en los niveles de Put en las hojas, que actúa como regulador del crecimiento, promoviendo la

replicación de ADN y división celular (Alcázar et al. 2010). En condiciones de estrés hídrico, la mejora en los parámetros fotosintéticos observados previamente en *M. truncatula* L-108 (Duque et al. 2016) pueden contribuir al crecimiento de la parte aérea detectados en condiciones de salinidad.

En plantas en las que se inhibió la oxidación de PAs con AG, la producción de biomasa de la planta (**Fig. 3.2.1.**) disminuyó, lo que podría estar relacionado con la implicación de la oxidación de PAs en la elongación celular, como previamente observó (Rodríguez et al. 2009). Por otro lado, se observó una correlación entre la biomasa de la planta y la biomasa nodular ( $r=0.98$ ) (**Fig. 3.2.2.**), apoyando el hecho de que la limitación en el suministro de  $N_2$  es la razón del efecto inhibitorio de la salinidad sobre el crecimiento vegetal.

En condiciones de salinidad, el pretratamiento con AG evitó la pérdida de biomasa en los nódulos provocada por la salinidad (**Fig. 3.2.1.**), lo que puede estar relacionado con el papel que juega el catabolismo de PAs en el crecimiento y elongación celular, como ha sido comprobado en maíz (Rodríguez et al. 2009).

En las plantas L-108, junto con el aumento de la biomasa nodular, se produjo un incremento de la tasa de fijación de nitrógeno (TFN) (**Fig. 3.1.5.**) por planta, que está asociada más bien al mayor peso nodular que a un aumento de la eficiencia de la nitrogenasa. En este sentido, se ha mencionado la existencia de una correlación entre la concentración de PAs en nódulos y la actividad nitrogenasa (Lahiri et al. 2004), lo que confirma los datos obtenidos en este experimento, ya que no se observó un incremento de los niveles de PAs en nódulos de las plantas L-108 con respecto a plantas M9-10a (**Fig. 3.1.6.a.**). En condiciones de salinidad, todos los parámetros simbióticos mostrados en la **Fig 3.1.5**, fueron negativamente afectados con mayor intensidad en las plantas L-108 que en las plantas control; a pesar del incremento de los niveles de Spm encontrados en nódulos. Esto podría indicar que los altos niveles de PAs en nódulos contribuyen a mejorar el establecimiento de la simbiosis y la organogénesis del nódulo en condiciones normales, en lugar de tomar parte en la mejora de la tolerancia a la salinidad en el metabolismo nodular. Estos resultados apuntan a un aumento en la oxidación y reciclaje de las PAs como factor principal responsable de la tolerancia al estrés, en lugar de deberse a un incremento en los niveles de PAs

(Zapata et al. 2004), lo cual ha sido comprobado en respuestas al estrés por frío (Zhuo et al. 2018).

El **análisis histológico** de nódulos de plantas M9-10a y L-108, muestra un incremento en la región meristemática (**Fig. 3.1.3.**), siendo debido a un aumento de los niveles de Put en el córtex radical que induce a la división celular (Alcázar et al. 2010). De hecho, un incremento en la expresión de *Adc* y los niveles de PAs, han sido asociados con una mayor actividad meristemática en raíces de *A. thaliana* (Watson et al. 1998).

### 3.2. Cinética nodulación.

Se estudió el efecto de la alteración del metabolismo de PAs sobre el establecimiento de la simbiosis *M. truncatula* – *S. meliloti* en condiciones de salinidad, mediante la realización de cinéticas de nodulación, observándose que el número de nódulos era mayor en plantas que expresaban constitutivamente el gen *Adc* (**Fig. 3.1.2.**) con respecto a las plantas control. Este incremento en el número de nódulos fue acompañado de un incremento de los niveles de PAs en hoja (**Fig. 3.1.6.b.**), que se ha asociado con la participación de la parte aérea en la regulación del número de nódulos en plantas de soja (Terakado-Tonooka and Fujihara 2008b; Terakado et al. 2006). En condiciones salinas, a partir del día 12, las plantas L-108 presentaron siempre más nódulos que el control (**Fig. 3.1.2.**), lo cual puede ser explicado por el incremento de los niveles de PAs en nódulos de L-108, así como el aumento de Put y Spm detectados en hojas en comparación con el control, en estas condiciones. Este incremento en el número de nódulos de L-108 fue confirmado por el experimento en macetas, donde se aprecia un aumento tanto en el número de nódulos (NN) como en su biomasa (PFN) (**Fig. 3.1.5.**).

En cuanto al efecto del inhibidor del catabolismo de PAs sobre la simbiosis, todos los parámetros analizados se vieron reducidos (**Fig. 3.2.2.**), incluyendo el establecimiento de la simbiosis, como se observa en la cinética de nodulación (**Fig. 3.2.9.**). Este efecto negativo puede estar asociado a la inhibición de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derivado de la oxidación de PAs, el cual está involucrado en el establecimiento de la simbiosis en *M. sativa* (Jamet et al. 2007) y en el funcionamiento de la misma en *M. truncatula* (Andrio et al. 2013). De hecho, la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es una característica común durante

los procesos de infección inducidos por microorganismos tanto patógenos como simbióticos (Cao et al. 2017). Por ejemplo, durante la interacción entre plantas de guisante y *R. leguminosarum*, la inducción en la expresión de DAO se ha asociado a la formación de los cordones de infección y a la colonización bacteriana (Wisniewski y Brewin 2000), lo que explicaría la inhibición de la nodulación por la AG.

### 3.3. Contenido de PAs.

Los niveles de PAs en nódulos mostraron una respuesta más evidente a los tratamientos de AG que en las hojas (**Fig. 3.2.3.a. y Fig. 3.2.3.b.**), observándose notables incrementos en las concentraciones de diaminas como Put y Cad, mientras que los niveles de Spd y Spm se redujeron. Un resultado similar se encontró en raíces de soja (Xing et al. 2007) lo que sugiere un efecto local, más que sistémico, de la AG. Además, el metabolismo bacteroidal estaría también afectado por el tratamiento con AG, ya que las aminoxidasas están involucradas en la desaminación oxidativa de PAs en *S. meliloti* (Dunn 2017).

Los tratamientos con AG favorecieron la acumulación de triaminas (Spd) y tetraminas (Spm) en hojas, tanto en condiciones normales como de salinidad mientras que los niveles de Put descendieron, mostrando una prevalencia de la síntesis de Spm, más eficiente en la estabilidad y modulación de la permeabilidad de las membranas en condiciones de estrés. Una respuesta parecida se puede observar en nódulos, donde la concentración de Homspd, junto con Spd y Spm se incrementó debido al tratamiento con AG en estrés salino. Estos resultados sugieren un efecto positivo en la inhibición de PAO en la respuesta a la salinidad, asumiendo el papel beneficioso que ejercen estas PAs en tales condiciones (López-Gómez et al. 2016).

### 3.4. Catabolismo PAs.

Debido a que la oxidación de las PAs podría actuar como factor clave en la tolerancia al estrés, en lugar de un incremento en sus niveles, se analizaron las enzimas encargadas del catabolismo de PAs, DAO y PAO, detectándose en nódulos de plantas L-108 un incremento de las PAs debido a



la inhibición de la actividad DAO por la salinidad (**Fig. 3.1.7.**). Además de la contribución a la homeostasis de PAs, el catabolismo de las mismas está involucrado en la formación de moléculas que contribuyen de forma importante en las respuestas al estrés abiótico, como son GABA (Xing et al. 2007) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Campestre et al. 2011), siendo el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> el que muestra un incremento en plantas transgénicas L-108 (**Fig. 3.1.8.**).

El tratamiento con AG provocó una inhibición tanto de la actividad DAO como PAO en hojas y nódulos (**Fig. 3.2.4.**), lo que implica que la actividad PAO estaría más bien involucrada en la retroconversión de Spd y Spm a Put que en su catabolismo terminal, lo que favorece la acumulación de Put (Cona et al. 2006).

En condiciones de salinidad, la inhibición de DAO y PAO en nódulos (**Fig. 3.2.4.**) se correlaciona ( $r=0.86$  Spd/PAO;  $r=0.89$  Spd/DAO) con una reducción de los niveles de PAs, indicando que además del catabolismo de PAs, la actividad biosintética de PAs sería responsable de la regulación de los niveles de las mismas. Esta hipótesis se apoya además por los niveles de aminoácidos precursores de la síntesis de PAs en nódulos, ya que una reducción de Glu y Arg (**Tabla 3.2.8.**) en condiciones salinas limitan su síntesis.

### 3.5. Peróxido de hidrógeno.

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> actúa como molécula señal involucrada en la tolerancia a varios estreses abióticos además de contribuir al crecimiento de la planta en condiciones de salinidad (Georgia et al. 2014). En nódulos de plantas L-108, la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, estaría más bien relacionada con la reducción de la actividad CAT (**Fig. 3.1.8.**), la cual también resulta inhibida por la sal como se ha comprobado en nódulos de *M. sativa* y *P. vulgaris* (Garcia et al. 2007).

En el caso de nódulos de plantas tratadas con el inhibidor de DAO, también se observa un incremento de los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Fig. 3.2.5.b.**), lo que sugiere que al igual que en nódulos de plantas L-108, la actividad de enzimas antioxidantes como CAT estaría implicada en la regulación de esta molécula señal en el nódulo. El hecho de que tanto la AG como NaCl provoquen una inhibición de la actividad CAT mientras SOD se incrementa, con el consiguiente aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, indica que enzimas antioxidantes del

nódulo como CAT y SOD, que están directamente involucradas en la en la regulación de los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Fig. 3.2.7.**). Un resultado similar fue descrito en nódulos de *M. sativa* (Palma et al. 2013) donde la CAT se inhibía y la SOD aumentaba en condiciones salinas.

De forma opuesta, en hojas la actividad CAT no parece verse afectada por la AG (**Fig. 3.2.7.**), aunque la salinidad si redujo su actividad, aumentando los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Fig. 3.2.5.a.**). Sin embargo, la AG provocó una ligera reducción en la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub><sup>-</sup> (**Fig. 3.2.5.a.**) (**Fig. 3.2.6**) provocada por la sal, lo que está relacionado con una reducción de la actividad SOD y una mayor actividad CAT en estas condiciones en hojas.

### 3.6. Aminoácidos relacionados con el metabolismo de PAs.

El **Glu** está considerado un metabolito clave en el metabolismo durante la fijación de N<sub>2</sub> atmosférico del nódulo, ya que la mayoría de este N<sub>2</sub> asimilado se incorpora a este aminoácido antes de ser redistribuido para formar otros aminoácidos y compuestos nitrogenados, como las PAs (Majumdar et al. 2016). Por esta razón, se analizaron los niveles de aminoácidos relacionados con el metabolismo de PAs tanto en plantas que sobreexpresan el gen *Adc* como en plantas con la oxidación de PAs inhibida.

Se observaron diferentes patrones de acumulación de **Glu** en nódulos de M9-10a y en nódulos de L-108, donde fueron más altas las concentraciones, pero sin haber diferencias entre las condiciones normales y las condiciones de salinidad (**Tabla 3.1.9.**). Durante el periodo de estrés salino, el N<sub>2</sub> parece dirigirse hacia la formación de **Pro**, lo que favorece una acumulación de este aminoácido en plantas L-108, al igual que ocurre en plantas de *L. tenuis* que sobreexpresan el gen *Adc* (Espasandin et al. 2018); mientras que el **GABA** tiende a acumularse en plantas de la línea M9-10a en condiciones salinas. Estas diferencias pueden estar relacionadas con la competencia que se establece entre ambos aminoácidos (GABA y Pro) por el **Glu** como precursor común, lo que sugiere que la acumulación de **GABA** y **Pro** juegan un papel más determinante en los mecanismos de defensa frente al estrés salino que la acumulación de PAs (Hatmi et al. 2015). Se analizó también el contenido de aminociclopropanocarboxilato (**ACC**), precursor del etileno, ya que tanto PAs como etileno compiten por el mismo sustrato para su síntesis: S-adenosil metionina (SAM). Solo en plantas M9-10a aumentaron

los niveles de ACC por la sal, mientras que en las plantas L-108 no hubo variación en las mismas condiciones, lo que estaría relacionado con una mayor competencia, en salinidad, entre la biosíntesis de PAs y etileno, debido a cambios en los niveles de Spm en nódulos que podrían ejercer un efecto antagonista sobre la acumulación de ACC (Palma et al. 2013).

Por otro lado, la inhibición de la actividad DAO por la AG provocó una reducción de **GABA (Tabla 3.2.8.)**, cuya síntesis ha sido asociada previamente a la actividad de esta enzima en la respuesta a la salinidad (Xing et al. 2007). De manera similar, la acumulación de **Pro** en salinidad está parcialmente asociada a la actividad DAO (Su y Bai 2008), sin embargo, no se detectó efecto del tratamiento con AG ni en los niveles de **Pro** ni en los de **Glu**, lo que indica que en lugar de Put, sería el **Glu** el precursor de la síntesis de **Pro**, como se observó en nódulos de *M. sativa* en el objetivo 1 y en plantas de *M. truncatula* L-108.



## ***VII- CONCLUSIONES***



1. El contenido de PAs es superior tanto en nódulos determinados como indeterminados respecto de hojas y raíces, siendo la Homspd la poliamina más abundantemente sintetizada en los bacteroides de ambos tipos de nódulos. En condiciones de estrés salino, en nódulos indeterminados prevalece la síntesis de Pro sobre la de PAs como mecanismo de defensa, mientras que en nódulos determinados, se incrementaron los niveles de 4-aminobutilcadaverina, lo que sugiere la participación del metabolismo bacteroidal en los mecanismos de adaptación a la salinidad. En ambos tipos de nódulos, la inhibición de la actividad nitrogenasa por la salinidad impidió la acumulación de PAs solubles en el nódulo, a pesar del incremento en la expresión de los genes de biosíntesis en nódulos determinados.

2. Los BRs tienen un efecto protector frente a la salinidad de la simbiosis *M. truncatula-S. meliloti* mediante el incremento de los niveles de Spm en hojas, y evitando la disminución de las PAs nodulares en condiciones de salinidad, lo que reduce la peroxidación lipídica y la acumulación de Pro. La interacción observada entre PAs y BR se produce a nivel transcripcional, dado el incremento en la expresión de genes de síntesis de PAs inducido por el tratamiento con EBL.

3. Los BRs participan en la regulación de la nodulación, provocando una reducción en el número de nódulos por un mecanismo en el que participan las PAs, cuya concentración en hojas se incrementa en respuesta a los BRs. La aplicación exógena de PAs también inhibe la nodulación, lo que podría estar relacionado con un aumento de su oxidación con la consiguiente producción de un exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

4. Las PAs exógenas mejoran la respuesta a la salinidad de la simbiosis *M. truncatula-S. meliloti*, debido al incremento en la biomasa nodular y la actividad nitrogenasa, junto a una disminución del daño oxidativo. Las PAs inducen además la expresión de genes implicados en la biosíntesis de BRs, lo que sugiere una interacción entre ambos tipos de reguladores del crecimiento en la respuesta al estrés salino en la simbiosis.

5. La sobreexpresión del gen *Adc*, que codifica una enzima responsable de la síntesis de PAs, favorece la simbiosis *M. truncatula-S.*

*meliloti* en condiciones de salinidad, ya que incrementó la biomasa nodular y el contenido de PAs en nódulos. Además de los niveles de PAs se incrementó el contenido de Pro mientras que en nódulos de plantas wt, el incremento de los niveles de GABA y la activación de la vía de señalización de etileno (ET) fueron las respuestas inducidas por la salinidad.

**6.** La inhibición de la oxidación de PAs durante el establecimiento de la simbiosis provoca una reducción en la nodulación, probablemente debida a la disminución de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sin embargo, la inhibición de la oxidación de PAs una vez establecida la simbiosis, indica que la disminución de los niveles de PAs por efecto de la salinidad se debe más bien a la inhibición de su síntesis teniendo en cuenta los niveles de Glu y la actividad nitrogenasa en nódulos activos, en los que los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> están más bien relacionados con las enzimas antioxidantes del nódulo CAT y SOD.



## ***VIII- BIBLIOGRAFÍA***



- Abiala MA, Abdelrahman M, Burritt DJ, Tran L-SP (2018) Salt stress tolerance mechanisms and potential applications of legumes for sustainable reclamation of salt-degraded soils. *Land Degradation & Development* 29: 3812-3822. doi: 10.1002/ldr.3095.
- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126. doi: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3
- Alcázar R, Altabella T, Marco F, Bortolotti C, Reymond M, Koncz C, Carrasco P, Tiburcio AF (2010) Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta* 231: 1237-1249.
- Alet AI, Sanchez DH, Cuevas JC, Del Valle S, Altabella T, Tiburcio AF, Marco F, Ferrando A, Espasandin FD, Gonzalez ME, Ruiz OA, Carrasco P (2011) Putrescine accumulation in *Arabidopsis thaliana* transgenic lines enhances tolerance to dehydration and freezing stress. *Plant signaling & behavior* 6: 278-286.
- Alexieva V, Sergiev I, Mapelli S, Karanov E (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell and Environment* 24: 1337-1344. doi: 10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x.
- Ali Q, Athar HUR, Ashraf M (2006) Influence of exogenously applied brassinosteroids on the mineral nutrient status of two wheat cultivars grown under saline conditions. *Pakistan Journal of Botany* 38: 1621-1632.
- Anamul Hoque M, Okuma E, Nasrin Akhter Banu M, Nakamura Y, Shimoishi Y, Murata Y (2007) Exogenous proline mitigates the detrimental effects of salt stress more than exogenous betaine by increasing antioxidant enzyme activities. *Journal of Plant Physiology* 164: 553-561. doi: 10.1016/j.jplph.2006.03.010.
- Andrio E, Marino D, Marmeys A, de Segonzac MD, Damiani I, Genre A, Huguet S, Frendo P, Puppo A, Pauly N (2013) Hydrogen peroxide-regulated genes in the *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *New Phytologist* 198: 190-202. doi: 10.1111/nph.12120.
- Anjali K, Nandni S, Renu B, Puja O (2018) Emerging Role of Polyamines in Plant Stress Tolerance. *Current Protein & Peptide Science* 19: 1114-1123. doi: 10.2174/1389203719666180718124211.
- Anjum N, Umar S, Ahmad A (2012) *Oxidative Stress in Plants: Causes, Consequences and Tolerance*. IK International Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi, India. ISBN: 9789381141021.
- Anuradha S, Seeta Ram Rao S (2003) Application of brassinosteroids to rice seeds (*Oryza sativa* L.) reduced the impact of salt stress on growth, prevented photosynthetic pigment loss and increased nitrate reductase activity. *Plant Growth Regulation* 40(1):29-32. doi: 10.1023/A:1023080720374

## Bibliografía

---

- Aranjuelo I, Arrese-Igor C, Molero G (2014) Nodule performance within a changing environmental context. *Journal of Plant Physiology* 171: 1076-1090. doi: 10.1016/j.jplph.2014.04.002.
- Araujo SD, Duque A, dos Santos D, Fevereiro MPS (2004) An efficient transformation method to regenerate a high number of transgenic plants using a new embryogenic line of *Medicago truncatula* cv. Jemalong. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 78: 123-131. doi: 10.1023/B:TICU.0000022540.98231.f8.
- Arrese-Igor C, González EM, Marino D, Ladrera R, Larrainzar E, Gil-Quintana E (2011) Physiological responses of legume nodules to drought. *Plant Stress* 5: 24-31.
- Ashraf M, Harris PJC (2004) Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science* 166: 3-16. doi: 10.1016/j.plantsci.2003.10.024.
- Aziz A, Martin-Tanguy J, Larher F (1998) Stress-induced changes in polyamine and tyramine levels can regulate proline accumulation in tomato leaf discs treated with sodium chloride. *Physiologia Plantarum* 104: 195-202. doi: 10.1034/j.1399-3054.1998.1040207.x.
- Aziz A, Martin-Tanguy J, Larher F (1999) Salt stress-induced proline accumulation and changes in tyramine and polyamine levels are linked to ionic adjustment in tomato leaf discs. *Plant Science* 145: 83-91. doi: 10.1016/s0168-9452(99)00071-0.
- Bach Tuyet Lam T, Iiyama K, A Stone B (1992) Cinnamic acid bridges between cell wall polymers in wheat and *Phalaris* internodes. *Phytochemistry* 31(4):1179-1183. doi: 10.1016/0031-9422(92)80256-E
- Bagni N, Tassoni A (2001) Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids* 20: 301-317. doi: 10.1007/s007260170046.
- Baier MC, Barsch A, Kuester H, Hohnjec N (2007) Antisense repression of the *Medicago truncatula* nodule-enhanced sucrose synthase leads to a handicapped nitrogen fixation mirrored by specific alterations in the symbiotic transcriptome and metabolome(1 W ). *Plant Physiology* 145: 1600-1618. doi: 10.1104/pp.107.106955.
- Bajguz A (2011) Brassinosteroids - Occurrence and chemical structures in plants. *Brassinosteroids: A Class of Plant Hormone*. Springer, Dordrech. doi: 10.1007/978-94-007-0189-2\_1
- Baniasadi F, Saffari VR, Maghsoudi Moud AA (2018) Physiological and growth responses of *Calendula officinalis* L. plants to the interaction effects of polyamines and salt stress. *Scientia Horticulturae* 234: 312-317. doi: 10.1016/j.scienta.2018.02.069.
- Becana MN, J. et al (2015) Leghemoglobins with Nitrated Hemes in Legume Root Nodules. In: FJd Bruijn (ed) *Biological Nitrogen Fixation*.
- Becerra-Rivera VA, Bergström E, Thomas-Oates J, Dunn MF (2018) Polyamines are required for normal growth in *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology* 164: 600-613. doi: doi:10.1099/mic.0.000615.

- Bedmar G, Lluch, Rodelas (2006) Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones. Sociedad Española de Fijación de Nitrogeno (SEFIN). ISBN: 84-611-1198-5
- Ben Salah I, Slatni T, Albacete A, Gandour M, Martínez Andújar C, Houmani H, Ben Hamed K, Martinez V, Pérez-Alfocea F, Abdelly C (2010) Salt tolerance of nitrogen fixation in *Medicago ciliaris* is related to nodule sucrose metabolism performance rather than antioxidant system. *Symbiosis* 51: 187-195. doi: 10.1007/s13199-010-0073-3.
- Benavides MP, Aizencang G, Tomaro ML (1997) Polyamines in *Helianthus annuus* L. during Germination under Salt Stress. *Journal of Plant Growth Regulation* 16: 205-211. doi: 10.1007/pl00006997.
- Benavides MP, Gallego S, E. Comba M, Tomaro M (2000) Relationship between Polyamines and Paraquat Toxicity in Sunflower Leaf Discs. *Plant Growth Regulation* 31(3). doi: 10.1023/A:1006316926002
- Beringer JE (1974) R Factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology* 84: 188-198.
- Berrabah F, Salem EHA, Garmier M, Ratet P (2018) The Multiple Faces of the *Medicago-Sinorhizobium* Symbiosis. In: LA Cañas, JP Beltrán (eds) *Functional Genomics in Medicago truncatula: Methods and Protocols*. Springer New York, New York, NY.
- Beyer WF, Fridovich I (1987) Assaying for superoxide dismutase activity. Some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry* 161: 559-566. doi: 10.1016/0003-2697(87)90489-1.
- Bhattacharjee S (2012) An inductive pulse of hydrogen peroxide pretreatment restores redox-homeostasis and oxidative membrane damage under extremes of temperature in two rice cultivars. *Plant Growth Regulation* 68: 395-410. doi: 10.1007/s10725-012-9728-9.
- Bingsheng L, Tian H, Zhang F, Liu J, Lu S, Bai M, Li C, Ding Z (2018) Brassinosteroids regulate root growth by controlling reactive oxygen species homeostasis and dual effect on ethylene synthesis in *Arabidopsis*. *PLOS Genetics* 14: e1007144. doi: 10.1371/journal.pgen.1007144.
- Birecka H, DiNolfo TE, Martin WB, Frohlich MW (1984) Polyamines and leaf senescence in pyrrolizidine alkaloid-bearing *Heliotropium* plants. *Phytochemistry* 23: 991-997. doi: 10.1016/s0031-9422(00)82598-4.
- Bordenave CD, Granados Mendoza C, Jiménez Bremont JF, Gárriz A, Rodríguez AA (2019) Defining novel plant polyamine oxidase subfamilies through molecular modeling and sequence analysis. *BMC Evolutionary Biology* 19: 28. doi: 10.1186/s12862-019-1361-z.
- Borucki W, Sujkowska M (2008) The effects of sodium chloride-salinity upon growth, nodulation, and root nodule structure of pea (*Pisum sativum* L.) plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 30: 293-301. doi: 10.1007/s11738-007-0120-8.

## *Bibliografía*

---

- Bouchereau A, Aziz A, Larher F, Martin-Tanguy J (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science* 140: 103-125. doi: 10.1016/S0168-9452(98)00218-0.
- Broadley MR, White PJ (2001) Chloride in Soils and its Uptake and Movement within the Plant: A Review. *Annals of Botany* 88: 967-988. doi: 10.1006/anbo.2001.1540.
- Campestre MP, Bordenave CD, Origone AC, Menéndez AB, Ruiz OA, Rodríguez AA, Maiale SJ (2011) Polyamine catabolism is involved in response to salt stress in soybean hypocotyls. *Journal of Plant Physiology* 168: 1234-1240. doi: 10.1016/j.jplph.2011.01.007.
- Cao S, Xu Q, Cao Y, Qian K, An K, Zhu Y, Binzeng H, Zhao H, Kuai B (2005) Loss-of-function mutations in DET2 gene lead to an enhanced resistance to oxidative stress in Arabidopsis. *Physiologia Plantarum* 123: 57-66. doi: 10.1111/j.1399-3054.2004.00432.x.
- Cao YR, Halane MK, Gassmann W, Stacey G (2017) The Role of Plant Innate Immunity in the Legume-Rhizobium Symbiosis. In: SS Merchant (ed) *Annual Review of Plant Biology*, Vol 68.
- Castro-Guerrero NA, Isidra-Arellano MC, Mendoza-Cozatl DG, Valdés-López O (2016) Common Bean: A Legume Model on the Rise for Unraveling Responses and Adaptations to Iron, Zinc, and Phosphate Deficiencies. *Frontiers in Plant Science* 7. doi: 10.3389/fpls.2016.00600.
- Charon C, Sousa C, Crespi M, Kondorosi A (1999) Alteration of enod40 expression modifies medicago truncatula root nodule development induced by sinorhizobium meliloti. *The Plant cell* 11: 1953-1966.
- Choudhary SP, Kanwar M, Bhardwaj R, Gupta BD, Gupta RK (2011) Epibrassinolide ameliorates Cr (VI) stress via influencing the levels of indole-3-acetic acid, abscisic acid, polyamines and antioxidant system of radish seedlings. *Chemosphere* 84: 592-600. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.03.056.
- Choudhary SP, Kanwar M, Bhardwaj R, Yu J-Q, Tran L-SP (2012a) Chromium Stress Mitigation by Polyamine-Brassinosteroid Application Involves Phytohormonal and Physiological Strategies in Raphanus sativus L. *PLoS ONE* 7: e33210. doi: 10.1371/journal.pone.0033210.
- Choudhary SP, Oral HV, Bhardwaj R, Yu J-Q, Tran L-SP (2012b) Interaction of Brassinosteroids and Polyamines Enhances Copper Stress Tolerance in Raphanus Sativus. *Journal of Experimental Botany* 63: 5659-5675. doi: 10.1093/jxb/ers219.
- Choudhary SP, Yu J-Q, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran L-SP (2012c) Benefits of brassinosteroid crosstalk. *Trends in Plant Science* 17: 594-605. doi:10.1016/j.tplants.2012.05.012.
- Coba de la Peña T, Fedorova E, Pueyo JJ, Lucas MM (2018) The Symbiosome: Legume and Rhizobia Co-evolution toward a Nitrogen-Fixing Organelle? *Frontiers in plant science* 8: 2229-2229. doi: 10.3389/fpls.2017.02229.

- Cona A, Rea G, Angelini R, Federico R, Tavladoraki P (2006) Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends in Plant Science* 11: 80-88. doi: 10.1016/j.tplants.2005.12.009.
- Cona A, Rea G, Angelini R, Federico R, Tavladoraki P (2006) Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends in Plant Science* 11: 80-88. doi: 10.1016/j.tplants.2005.12.009.
- Cordovilla MD, Berrido SI, Ligeró F, Lluch C (1999) Rhizobium strain effects on the growth and nitrogen assimilation in *Pisum sativum* and *Vicia faba* plant growth under salt stress. *Journal of Plant Physiology* 154: 127-131.
- Cristina B, Alexandra C, Rubén A, Antoni B, A. C-MF, F. TA, Teresa A (2004) Localization of arginine decarboxylase in tobacco plants. *Physiologia Plantarum* 120: 84-92. doi:10.1111/j.0031-9317.2004.0216.x.
- Cuevas JC, Sánchez DH, Marina M, Ruiz OA (2004) Do polyamines modulate the *Lotus glaber* NADPH oxidation activity induced by the herbicide methyl viologen? *Functional Plant Biology* 31: 921-928. doi: 10.1071/fp04007.
- Curatti L, Rubio LM (2014) Challenges to develop nitrogen-fixing cereals by direct nif-gene transfer. *Plant Science* 225: 130-137. doi: 10.1016/j.plantsci.2014.06.003.
- Dalton DA, Joyner SL, Becana M, Iturbe-Ormaetxe I, Chatfield JM (1998) Antioxidant defenses in the peripheral cell layers of legume root nodules. *Plant Physiology* 116: 37-43. doi: 10.1104/pp.116.1.37.
- del Cerro P, Pérez-Montaño F, Gil-Serrano A, López-Baena FJ, Megías M, Hungria M, Ollero FJ (2017) The *Rhizobium tropici* CIAT 899 NodD2 protein regulates the production of Nod factors under salt stress in a flavonoid-independent manner. *Scientific Reports* 7: 46712. doi: 10.1038/srep46712
- del Giudice J, Cam Y, Damiani I, Fung-Chat F, Meilhoc E, Bruand C, Brouquisse R, Puppo A, Boscari A (2011) Nitric oxide is required for an optimal establishment of the *Medicago truncatula*–*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *The New Phytologist* 191: 405-417. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03693.x.
- Delauney AJ, Verma DPS (1993) Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant Journal* 4: 215-223. doi: 10.1046/j.1365-313X.1993.04020215.x.
- Delgado MJ, Ligeró F, Lluch C (1994) Effects of salt stress on growth and nitrogen-fixation by pea, faba-bean, common bean and soybean plants. *Soil Biology & Biochemistry* 26: 371-376. doi: 10.1016/0038-0717(94)90286-0.
- Demir Y, Oztürk L (2003) Influence of Ethephon and 2,5-Norbornadiene on Antioxidative Enzymes and Proline Content in Salt-Stressed Spinach Leaves. *Biologia Plantarum* 47: 609-612. doi: 10.1023/B:BIOP.0000041072.83780.0d.
- Diao QN, Song YJ, Shi DM, Qi HY (2017) Interaction of Polyamines, Abscisic Acid, Nitric Oxide, and Hydrogen Peroxide under Chilling Stress in Tomato (*Lycopersicon*

## *Bibliografía*

---

- esculentum Mill.) Seedlings. *Frontiers in Plant Science* 8. doi: 10.3389/fpls.2017.00203.
- Dimkpa C, Weinand T, Asch F (2009) Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant Cell and Environment* 32: 1682-1694. doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.02028.x.
- Divi UK, Krishna P (2009) Brassinosteroid: a biotechnological target for enhancing crop yield and stress tolerance. *New Biotechnology* 26: 131-136. doi: 10.1016/j.nbt.2009.07.006.
- Djordjevic MA, Chen HC, Natera S, Van Noorden G, Menzel C, Taylor S, Renard C, Geiger O, Weiller GF (2003) A Global Analysis of Protein Expression Profiles in *Sinorhizobium meliloti*: Discovery of New Genes for Nodule Occupancy and Stress Adaptation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16: 508-524. doi: 10.1094/mpmi.2003.16.6.508.
- Doyle JJ, Luckow MA (2003) The Rest of the Iceberg. Legume Diversity and Evolution in a Phylogenetic Context. *Plant Physiology* 131: 900-910. doi: 10.1104/pp.102.018150.
- Du S-t, Zhang Y-s, Lin X-y (2007) Accumulation of nitrate in vegetables and its possible implications to human health. *Agricultural Sciences in China* 6: 1246-1255. doi: 10.1016/s1671-2927(07)60169-2.
- Dunn M (2017) Rhizobial Amino Acid Metabolism: Polyamine Biosynthesis and Functions. *The Handbook of Microbial Metabolism of Amino Acids*. Publisher: CABI International. Doi: [10.1079/9781780647234.0352](https://doi.org/10.1079/9781780647234.0352)
- Duque AS, López-Gómez M, Kráčmarová J, Gomes CN, Araújo SS, Lluch C, Fevereiro P (2016) Genetic engineering of polyamine metabolism changes *Medicago truncatula* responses to water deficit. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 127: 681-690. doi: 10.1007/s11240-016-1107-1.
- Edreva AM, Velikova V, Tsonev T (2007) Phenylamides in plants. *Russ J Plant Physiol* 54: 287. Doi: 10.1134/S1021443707030016
- Efrose RC, Flemetakis E, Sfichi L, Stedel C, Kouri ED, Udvardi MK, Kotzabasis K, Katinakis P (2008) Characterization of spermidine and spermine synthases in *Lotus japonicus*: induction and spatial organization of polyamine biosynthesis in nitrogen fixing nodules. *Planta* 228: 37-49. doi: 10.1007/s00425-008-0717-1.
- Espasandin FD, Calzadilla PI, Maiale SJ, Ruiz OA, Sansberro PA (2018) Overexpression of the Arginine Decarboxylase Gene Improves Tolerance to Salt Stress in *Lotus tenuis* Plants. *Journal of Plant Growth Regulation* 37: 156-165. doi: 10.1007/s00344-017-9713-7.
- FAO (2009) How to Feed the World in 2050. *Population and Development Review* 35: 837-839. doi: 10.1111/j.1728-4457.2009.00312.x.



- Fariduddin Q, Mir BA, Yusuf M, Ahmad A (2013a) Comparative roles of brassinosteroids and polyamines in salt stress tolerance. *Acta Physiologiae Plantarum* 35: 2037-2053. doi: 10.1007/s11738-013-1263-4.
- Fariduddin Q, Varshney P, Yusuf M, Ahmad A (2013b) Polyamines: potent modulators of plant responses to stress. *Journal of Plant Interactions* 8: 1-16. doi: 10.1080/17429145.2012.716455.
- Fariduddin Q, Yusuf M, Ahmad I, Ahmad A (2014) Brassinosteroids and their role in response of plants to abiotic stresses. *Biologia Plantarum* 58: 9-17. doi: 10.1007/s10535-013-0374-5.
- Feierabend J (2007) *Catalases in Plants: Molecular and Functional Properties and Role in Stress Defence. Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. Blackwell Publishing Ltd. doi: 10.1002/9780470988565.ch5
- Ferguson B, Lin M-H, Gresshoff PM (2013) Regulation of legume nodulation by acidic growth conditions. *Plant Signaling & Behavior* 8: e23426. doi: 10.4161/psb.23426.
- Ferguson BJ, Indrasumunar A, Hayashi S, Lin M-H, Lin Y-H, Reid DE, Gresshoff PM (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.
- Flores HE, Galston AW (1982) Analysis of Polyamines in Higher Plants by High Performance Liquid Chromatography. *Plant Physiology* 69: 701-706. doi: 10.1104/pp.69.3.701.
- Foo E, Ferguson BJ, Reid JB (2014) The potential roles of strigolactones and brassinosteroids in the autoregulation of nodulation pathway. *Annals of Botany* 113: 1037-1045. doi: 10.1093/aob/mcu030.
- Fournier J, Teillet A, Chabaud M, Ivanov S, Genre A, Limpens E, de Carvalho-Niebel F, Barker DG (2015) Remodeling of the Infection Chamber before Infection Thread Formation Reveals a Two-Step Mechanism for Rhizobial Entry into the Host Legume Root Hair. *Plant Physiology* 167: 1233-1242. doi: 10.1104/pp.114.253302.
- Fowler D, Coyle M, Skiba U, Sutton MA, Cape JN, Reis S, Sheppard LJ, Jenkins A, Grizzetti B, Galloway JN, Vitousek P, Leach A, Bouwman AF, Butterbach-Bahl K, Dentener F, Stevenson D, Amann M, Voss M (2013) The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368. doi: 10.1098/rstb.2013.0164.
- Foyer CH, Noctor G (2005) Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell and Environment* 28: 1056-1071. doi: 10.1111/j.1365-3040.2005.01327.x.
- Fridman Y, Savaldi-Goldstein S (2013) Brassinosteroids in growth control: How, when and where. *Plant Science* 209: 24-31. doi: 10.1016/j.plantsci.2013.04.002.
- Fujihara S (2009) Biogenic Amines in Rhizobia and Legume Root Nodules. *Microbes and Environments* 24: 1-13. doi: 10.1264/jsme2.ME08557.

- Fujihara S (2009) Biogenic Amines in Rhizobia and Legume Root Nodules. *Microbes and Environments* 24: 1-13. doi: 10.1264/jsme2.ME08557.
- Fujihara S, Abe H, Minakawa Y, Akao S, Yoneyama T (1994) Polyamines in nodules from various plant-microbe symbiotic associations. *Plant and Cell Physiology* 35: 1127-1134.
- Fujihara S, Abe H, Yoneyama T (1995) A new polyamine 4-aminobutylcadaverine - occurrence and its biosynthesis in root-nodules of adzuki bean plant vigna-angularis. *Journal of Biological Chemistry* 270: 9932-9938.
- Fujihara S, Yoneyama T (1993) Effects of pH and Osmotic Stress on Cellular Polyamine Contents in the Soybean Rhizobia *Rhizobium fredii* P220 and *Bradyrhizobium japonicum* A1017. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 1104-1109.
- Fujita M, Shinozaki K (2015) Polyamine Transport Systems in Plants. In: T Kusano, H Suzuki (eds) *Polyamines: A Universal Molecular Nexus for Growth, Survival, and Specialized Metabolism*. Springer Japan, Tokyo. doi: 10.1007 /978-4-431-55212-3\_15
- Gagné F (2014) Chapter 6 - Oxidative Stress. In: F Gagné (ed) *Biochemical Ecotoxicology*. Academic Press, Oxford. ISBN: 9780124116047.
- Galibert F, Finan TM, Long SR, Pühler A, Abola P, Ampe F, Barloy-Hubler F, Barnett MJ, Becker A, Boistard P, Bothe G, Boutry M, Bowser L, Buhrmester J, Cadieu E, Capela D, Chain P, Cowie A, Davis RW, Dréano S, Federspiel NA, Fisher RF, Gloux S, Godrie T, Goffeau A, Golding B, Gouzy J, Gurjal M, Hernandez-Lucas I, Hong A, Huizar L, Hyman RW, Jones T, Kahn D, Kahn ML, Kalman S, Keating DH, Kiss E, Komp C, Lelaure V, Masuy D, Palm C, Peck MC, Pohl TM, Portetelle D, Purnelle B, Ramsperger U, Surzycki R, Thébault P, Vandenberg M, Vorholter F-J, Weidner S, Wells DH, Wong K, Yeh K-C, Batut J (2001) The Composite Genome of the Legume Symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* 293: 668-672. doi: 10.1126/science.1060966.
- Galston AW, Kaur-Sawhney R, Altabella T, Tiburcio AF (1997) Plant polyamines in reproductive activity and response to abiotic stress. *Botanica acta* 110: 197-207.
- Garcia NAT, Iribarne C, Palma F, Lluch C (2007) Inhibition of the catalase activity from *Phaseolus vulgaris* and *Medicago sativa* by sodium chloride. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 535-541. doi: 10.1016/j.plaphy.2007.04.008.
- Geissler N, Hussin S, Koyro H-W (2009) Elevated atmospheric CO<sub>2</sub> concentration ameliorates effects of NaCl salinity on photosynthesis and leaf structure of *Aster tripolium* L. *Journal of Experimental Botany* 60: 137-151. doi: 10.1093/jxb/ern271.
- Georgia T, Vasileios Z, MAYA B, ANASTASIS C, PANAGIOTA F, DOMINIQUE J, VASILEIOS F, ATHANASSIOS M (2014) Polyamines reprogram oxidative and nitrosative status and the proteome of citrus plants exposed to salinity stress. *Plant, Cell & Environment* 37: 864-885. doi:10.1111/pce.12204.

- Gepts P, Beavis WD, Brummer EC, Shoemaker RC, Stalker HT, Weeden NF, Young ND (2005) Legumes as a Model Plant Family. Genomics for Food and Feed Report of the Cross-Legume Advances through Genomics Conference. *Plant Physiology* 137: 1228-1235. doi: 10.1104/pp.105.060871.
- Ghamsari L, Keyhani E, Golkhoo S (2007) Kinetics Properties of Guaiacol Peroxidase Activity in *Crocus sativus* L. Corm during Rooting. *Iranian biomedical journal* 11(3):137-46.
- Goda H, Shimada Y, Asami T, Fujioka S, Yoshida S (2002) Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 130: 1319-1334. doi: 10.1104/pp.011254.
- Gordon AJ, Minchin FR, James CL, Komina O (1999) Sucrose Synthase in Legume Nodules Is Essential for Nitrogen Fixation. *Plant Physiology* 120: 867-878. doi: 10.1104/pp.120.3.867.
- Gordon AJ, Minchin FR, Skot L, James CL (1997) Stress-Induced Declines in Soybean N<sub>2</sub> Fixation Are Related to Nodule Sucrose Synthase Activity. *Plant Physiology* 114: 937-946. doi: 10.1104/pp.114.3.937.
- Groppa MD, Benavides MP (2008) Polyamines and abiotic stress: Recent advances. *Amino Acids* 34: 35-45. doi: 10.1007/s00726-007-0501-8.
- Gudesblat GE, Russinova E (2011) Plants grow on brassinosteroids. *Current Opinion in Plant Biology* 14: 530-537. doi: 10.1016/j.pbi.2011.05.004.
- Gupta B, Huang B (2014) Mechanism of Salinity Tolerance in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Characterization. *International Journal of Genomics* 2014: 18. doi: 10.1155/2014/701596.
- Gupta K, Dey A, Gupta B (2013) Plant polyamines in abiotic stress responses. *Acta Physiologiae Plantarum* 35: 2015-2036. doi: 10.1007/s11738-013-1239-4.
- Gupta K, Sengupta A, Chakraborty M, Gupta B (2016) Hydrogen Peroxide and Polyamines Act as Double Edged Swords in Plant Abiotic Stress Responses. *Frontiers in Plant Science* 7. doi: 10.3389/fpls.2016.01343.
- Haitao S, Zhulong C (2014) Improvement of plant abiotic stress tolerance through modulation of the polyamine pathway. *Journal of Integrative Plant Biology* 56: 114-121. doi: 10.1111/jipb.12128.
- Hamilton EW, 3rd, Heckathorn SA (2001) Mitochondrial adaptations to NaCl. Complex I is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine. *Plant Physiology* 126: 1266-1274.
- Handa AK, Fatima T, Mattoo AK (2018) Polyamines: Bio-Molecules with Diverse Functions in Plant and Human Health and Disease. *Frontiers in Chemistry* 6. doi: 10.3389/fchem.2018.00010.

- Hasanuzzaman M, Nahar K, Fujita M (2013) Plant Response to Salt Stress and Role of Exogenous Protectants to Mitigate Salt-Induced Damages. In: P Ahmad, MM Azooz, MNV Prasad (eds) *Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress*. Springer New York, New York, NY.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu J-K, Bohnert HJ (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Biology* 51: 463-499.
- Hatmi S, Gruau C, Trotel-Aziz P, Villaume S, Rabenoelina F, Baillieul F, Eullaffroy P, Clément C, Ferchichi A, Aziz A (2015) Drought stress tolerance in grapevine involves activation of polyamine oxidation contributing to improved immune response and low susceptibility to *Botrytis cinerea*. *Journal of Experimental Botany* 66: 775-787. doi: 10.1093/jxb/eru436.
- Hatmi S, Villaume S, Trotel-Aziz P, Barka EA, Clément C, Aziz A (2018) Osmotic Stress and ABA Affect Immune Response and Susceptibility of Grapevine Berries to Gray Mold by Priming Polyamine Accumulation. *Frontiers in Plant Science* 9. doi: 10.3389/fpls.2018.01010.
- Havelange A, Lejeune P, Bernier G, Kaur-Sawhney R, W. Galston A (1996) Putrescine export from leaves in relation to floral transition in *Sinapis alba*. *Physiologia plantarum*. 96: 59-65. doi: 10.1111/j.1399-3054.1996.tb00183.x
- Hayat S, Maheshwari P, Wani AS, Irfan M, Alyemini MN, Ahmad A (2012) Comparative effect of 28 homobrassinolide and salicylic acid in the amelioration of NaCl stress in *Brassica juncea* L. *Plant Physiology and Biochemistry* 53: 61-68. doi: 10.1016/j.plaphy.2012.01.011.
- Hernández Silva E, García-Martínez I (2016) Brasinoesteroides en la agricultura. I. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7: 441-450.
- Hernández-Lucero E, Ruiz O, Jiménez-Bremont JF (2008) Effect of salt stress on polyamine metabolism in two bean cultivars. *Plant Stress* 2: 96-102.
- Heuer B (2003) Influence of exogenous application of proline and glycinebetaine on growth of salt-stressed tomato plants. *Plant Science* 165: 693-699. doi: 10.1016/s0168-9452(03)00222-x.
- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207: 604-611. doi: 10.1007/s004250050524.
- Hu Y, Schmidhalter U (2004) Limitation of Salt Stress to Plant Growth. *Plant Toxicology*, Fourth Edition, Eds Hock and Elstner, Marcel Dekker Inc, New York, 191-224. doi: 10.1201/9780203023884.ch5
- Hungria M, Andrade DdS, Chueire LMdO, Probanza A, Gutierrez-Mañero FJ, Megías M (2000) Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biology and Biochemistry* 32: 1515-1528. doi: 10.1016/S0038-0717(00)00063-8.

- Hussain SS, Ali M, Ahmad M, Siddique KHM (2011) Polyamines: Natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Biotechnology Advances* 29: 300-311. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.01.003.
- Ishikawa T, Shigeoka S (2008) Recent Advances in Ascorbate Biosynthesis and the Physiological Significance of Ascorbate Peroxidase in Photosynthesizing Organisms. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 72: 1143-1154. doi: 10.1271/bbb.80062.
- Jamet A, Mandon K, Puppo A, Herouart D (2007) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is required for optimal establishment of the *Medicago sativa*/Sinorhizobium meliloti symbiosis. *Journal of Bacteriology* 189: 8741-8745. doi: 10.1128/jb.01130-07.
- Jasso-Robles FI, Jiménez-Bremont JF, Becerra-Flora A, Juárez-Montiel M, Gonzalez ME, Pieckenstain FL, García de la Cruz RF, Rodríguez-Kessler M (2016) Inhibition of polyamine oxidase activity affects tumor development during the maize-*Ustilago maydis* interaction. *Plant Physiology and Biochemistry* 102: 115-124. doi: 10.1016/j.plaphy.2016.02.019.
- Jensen ES, Hauggaard-Nielsen H (2003) How can increased use of biological N<sub>2</sub> fixation in agriculture benefit the environment? *Plant and Soil* 252: 177-186. doi: 10.1023/a:1024189029226.
- Jensen ES, Peoples MB, Boddey RM, Gresshoff PM, Hauggaard-Nielsen H, J.R. Alves B, Morrison MJ (2012) Legumes for mitigation of climate change and the provision of feedstock for biofuels and biorefineries. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 32: 329-364. doi: 10.1007/s13593-011-0056-7.
- Jiménez Bremont J, Marina M, Guerrero-González MdL, Rossi F, Sánchez-Rangel D, Rodríguez-Kessler M, Ruiz O, Garriz A (2014) Physiological and molecular implications of plant polyamine metabolism during biotic interactions. *Frontiers in Plant Science* 5. doi: 10.3389/fpls.2014.00095.
- Jimenez-Bremont JF, Becerra-Flora A, Hernandez-Lucero E, Rodriguez-Kessler M, Acosta-Gallegos JA, Ramirez-Pimentel JG (2006a) Proline accumulation in two bean cultivars under salt stress and the effect of polyamines and ornithine. *Biologia Plantarum* 50: 763-766. doi: 10.1007/s10535-006-0126-x.
- Jimenez-Bremont JF, Hernandez-Lucero E, Alpuche-Solis AG, Casas-Flores S, De la Rosa APB (2006b) Differential distribution of transcripts from genes involved in polyamine biosynthesis in bean plants. *Biologia Plantarum* 50: 551-558. doi: 10.1007/s10535-006-0087-0.
- Jimenez-Bremont JF, Marina M, Guerrero-Gonzalez MD, Rossi FR, Sanchez-Rangel D, Rodriguez-Kessler M, Ruiz O, Garriz A (2014) Physiological and molecular implications of plant polyamine metabolism during biotic interactions. *Frontiers in Plant Science* 5. doi: 10.3389/fpls.2014.00095.
- Jiménez-Bremont JF, Ruiz OA, Rodríguez-Kessler M (2007) Modulation of spermidine and spermine levels in maize seedlings subjected to long-term salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 812-821.

## *Bibliografía*

---

- K. Leary JS, Paul & G. Scowcroft, Paul & Borthakur, Dulal. (2006) Symbiotic diversity in the cosmopolitan genus *Acacia*. *Symbiosis* 41, 107–117. Balaban Publishers. ISSN 0334-5114
- Kang YY, Guo SR (2011) Role of brassinosteroids on horticultural crops. In: S Hayat, A Ahmad (eds) *Brassinosteroids: A Class of Plant Hormone*. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Khadri M, Tejera N, Lluch C (2006) Alleviation of Salt Stress in Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) by Exogenous Abscisic Acid Supply. *Journal of Plant Growth Regulation* 25: 110-119. doi: 10.1007/s00344-005-0004-3.
- Koca H, Bor M, Ozdemir F, Turkan I (2007) The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. *Environmental and Experimental Botany* 60: 344-351. doi: 10.1016/j.envexpbot.2006.12.005
- Krieger-Liszak A, Trebst A (2006) Tocopherol is the scavenger of singlet oxygen produced by the triplet states of chlorophyll in the PSII reaction centre. *Journal of Experimental Botany* 57: 1677-1684. doi: 10.1093/jxb/er1002.
- Kudapa H, Ramalingam A, Nayakoti S, Chen X, Zhuang W-J, Liang X, Kahl G, Edwards D, Varshney RK (2013) Functional genomics to study stress responses in crop legumes: progress and prospects. *Functional Plant Biology* 40: 1221-1233. doi: 10.1071/FP13191.
- Kumar D, Yusuf M, Singh P, Sardar M, Sarin N (2014) Histochemical Detection of Superoxide and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Accumulation in *Brassica juncea* Seedlings. *Bio-protocol* 4: 1108. DOI: 10.21769/BioProtoc.1108
- Kuznetsov V, Shorina M, Aronova E, Stetsenko L, Rakitin V, Shevyakova N (2007) NaCl- and ethylene-dependent cadaverine accumulation and its possible protective role in the adaptation of the common ice plant to salt stress. *Plant Science* 172: 363-370. doi: 10.1016/j.plantsci.2006.09.012.
- Kuznetsov VV, Rakitin VY, Sadomov NG, Dam DV, Stetsenko LA, Shevyakova NI (2002) Do Polyamines Participate in the Long-Distance Translocation of Stress Signals in Plants? *Russian Journal of Plant Physiology* 49: 120-130. doi: 10.1023/a:1013776631284.
- Kuznetsov VV, Shevyakova NI (2007) Polyamines and stress tolerance of plants. *Plant Stress* 1(1), 50-71.
- Kwak SH, Lee SH (2001) The regulation of ornithine decarboxylase gene expression by sucrose and small upstream open reading frame in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Plant and Cell Physiology* 42: 314-323. doi: 10.1093/pcp/pce040.
- Lahiri K, Chattopadhyay S, Ghosh B (2004) Correlation of endogenous free polyamine levels with root nodule senescence in different genotypes in *Vigna mungo* L. *Journal of Plant Physiology* 161: 563-571. doi: 10.1078/0176-1617-01057.

- Latowski D, Surówka E, Strzałka K (2010) Regulatory role of components of ascorbate-glutathione pathway in plant stress tolerance. *Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants*.
- Le BH, Wagmaister JA, Kawashima T, Bui AQ, Harada JJ, Goldberg RB (2007) Using Genomics to Study Legume Seed Development. *Plant Physiology* 144: 562-574. doi: 10.1104/pp.107.100362.
- Lefevre I, Gratia E, Lutts S (2001) Discrimination between the ionic and osmotic components of salt stress in relation to free polyamine level in rice (*Oryza sativa*). *Plant Science* 161: 943-952. doi: 10.1016/s0168-9452(01)00485-x.
- Leonard LT (1943) A simple assembly for use in the testing of cultures of *Rhizobia*. *Journal of Bacteriology* 45: 523-527.
- Li S, Jin H, Zhang Q (2016) The effect of exogenous spermidine concentration on polyamine metabolism and salt tolerance in zoysiagrass (*Zoysia japonica* steud) subjected to short-term salinity stress. *Frontiers in Plant Science* 7. doi: 10.3389/fpls.2016.01221.
- Li Z, Peng Y, Zhang X, Pan M, Ma X, Huang L, Yan Y (2014) Exogenous spermidine improves water stress tolerance of white clover (*Trifolium repens* L.) involved in antioxidant defence, gene expression and proline metabolism. *Plant Omics* 7: 517-526.
- Liu N, Lin Z, Guan L, Gaughan G, Lin G (2014) Antioxidant enzymes regulate reactive oxygen species during pod elongation in *Pisum sativum* and *Brassica chinensis*. *PLoS one* 9: e87588-e87588. doi: 10.1371/journal.pone.0087588.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods* 25: 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- Lopez M, Herrera-Cervera JA, Iribarne C, Tejera NA, Lluch C (2008) Growth and nitrogen fixation in *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula* under NaCl stress: Nodule carbon metabolism. *Journal of Plant Physiology* 165: 641-650. doi: 10.1016/j.jplph.2007.05.009.
- Lopez M, Herrera-Cervera JA, Lluch C, Tejera NA (2006) Trehalose metabolism in root nodules of the model legume *Lotus japonicus* in response to salt stress. *Physiologia Plantarum* 128: 701-709. doi: 10.1111/j.1399-3054.2006.00802.x.
- López-Gómez M, Cobos-Porras L, Prell J, Lluch C (2016) Homospermidine synthase contributes to salt tolerance in free-living *Rhizobium tropici* and in symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Plant and Soil* 404: 413-425. doi: 10.1007/s11104-016-2848-7.
- López-Gómez M, Tejera NA, Iribarne C, Herrera-Cervera JA, Lluch C (2011) Different strategies for salt tolerance in determined and indeterminate nodules of *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula*. *Archives of Agronomy and Soil Science* 58: 1061-1073. doi: 10.1080/03650340.2011.561836.

## *Bibliografía*

---

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Luo Q, Yu B, Liu Y (2005) Differential sensitivity to chloride and sodium ions in seedlings of *Glycine max* and *G. soja* under NaCl stress. *Journal of Plant Physiology* 162: 1003-1012. doi: 10.1016/j.jplph.2004.11.008.
- Maathuis FJM (2006) The role of monovalent cation transporters in plant responses to salinity. *Journal of Experimental Botany* 57: 1137-1147. doi: 10.1093/jxb/erj001.
- Maggio A, Miyazaki S, Veronese P, Fujita T, Ibeas J, Damsz B, L Narasimhan M, Hasegawa P, J Joly R, Bressan R (2002) Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? *Plant Journal* 31 (6): 699-712. doi: 10.1046/j.1365-313X.2002.01389.x.
- Maj D, Wielbo J, Marek-Kozaczuk M, Skorupska A (2010) Response to flavonoids as a factor influencing competitiveness and symbiotic activity of *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiological Research* 165: 50-60. doi: 10.1016/j.micres.2008.06.002.
- Majumdar R, Barchi B, Turlapati SA, Gagne M, Minocha R, Long S, Minocha SC (2016) Glutamate, Ornithine, Arginine, Proline, and Polyamine Metabolic Interactions: The Pathway Is Regulated at the Post-Transcriptional Level. *Frontiers in Plant Science* 7. doi: 10.3389/fpls.2016.00078.
- Manchanda G, Garg N (2008) Salinity and its effects on the functional biology of legumes. *Acta Physiologiae Plantarum* 30: 595-618. doi: 10.1007/s11738-008-0173-3.
- Mansour M, Al-Mutawa MM (1999) Stabilization of plasma membrane by polyamines against salt stress, *Cytobios* (393).
- Mantri N, Basker N, Ford R, Pang E, Pardeshi V (2013) The Role of Micro-Ribonucleic Acids in Legumes with a Focus on Abiotic Stress Response. *The Plant Genome* 6. doi: 10.3835/plantgenome2013.05.0013.
- Marco F, Carrasco P (2002) Expression of the pea S-adenosylmethionine decarboxylase gene is involved in developmental and environmental responses. *Planta* 214: 641-647. doi: 10.1007/s004250100653.
- Markwell MAK, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE (1978) Modification of Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry* 87: 206-210. doi: 10.1016/0003-2697(78)90586-9.
- Mart, xed, nez-Romero E (2003) Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. *Plant and Soil* 252: 11-23.
- Martin-Tanguy J (2001) Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). *Plant Growth Regulation* 34: 135-148. doi: 10.1023/a:1013343106574.



- Maunoury N, Kondorosi A, Kondorosi E, Mergaert P (2008) Cell Biology Of Nodule Infection And Development. In: MJ Dilworth, EK James, JI Sprent, WE Newton (eds) Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses. Springer Netherlands, Dordrecht.
- McDonald GK, Rengasamy P, Tavakkoli E (2010) High concentrations of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> ions in soil solution have simultaneous detrimental effects on growth of faba bean under salinity stress. *Journal of Experimental Botany* 61: 4449-4459. doi: 10.1093/jxb/erq251.
- Miller G, Shulaev V, Mittler R (2008) Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiologia Plantarum* 133: 481-489. doi:10.1111/j.1399-3054.2008.01090.x.
- Minocha R, Majumdar R, Minocha SC (2014) Polyamines and abiotic stress in plants: a complex relationship. *Frontiers in Plant Science* 5. doi: 10.3389/fpls.2014.00175.
- Minocha R, Majumdar R, Minocha SC (2014) Polyamines and abiotic stress in plants: a complex relationship1. *Frontiers in Plant Science* 5. doi: 10.3389/fpls.2014.00175.
- Møller I, Jensen P, Hansson A (2007) Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. *Annual Review of Plant Biology* 58: 459-481. Doi: 10.1146/annurev.arplant.58.032806.103946.
- Moschou PN, Paschalidis KA, Roubelakis-Angelakis KA (2008) Plant polyamine catabolism: The state of the art. *Plant signaling & behavior* 3: 1061-1066.
- Mulangi V, Chibucos MC, Phuntumart V, Morris PF (2012) Kinetic and phylogenetic analysis of plant polyamine uptake transporters. *Planta* 236: 1261-1273. doi: 10.1007/s00425-012-1668-0.
- Munns R (2009) Strategies for Crop Improvement in Saline Soils. In: M Ashraf, M Ozturk, HR Athar (eds) Salinity and Water Stress. Springer Netherlands.
- Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651-681. doi:10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911.
- Nahar K, Hasanuzzaman M, Rahman A, Alam M, Mahmud JA, Suzuki T, Fujita M (2016) Polyamines confer salt tolerance in mung bean (*Vigna Radiata* L.) by reducing sodium uptake, improving nutrient homeostasis, antioxidant defense, and Methylglyoxal detoxification systems. *Frontiers in Plant Science* 7. doi: 10.3389/fpls.2016.01104.
- Nguyen H-C, Lin K-H, Ho S-L, Chiang C-M, Yang C-M (2018) Enhancing the abiotic stress tolerance of plants: from chemical treatment to biotechnological approaches. *Physiologia Plantarum* 164: 452-466. doi: 10.1111/ppl.12812.
- Núñez M, Reyes Y, Torres de la Noval W, Martínez González L, Zullo M (2019) Advances on exogenous applications of brassinosteroids and their analogs to enhance plant tolerance to salinity: A review. *Australian Journal of Crop Science* 13(01): 115-121. doi: 10.21475/ajcs.19.13.01p1404.

- Oldroyd GED (2013) Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology* 11: 252. doi: 10.1038/nrmicro2990.
- Oldroyd GED, Dixon R (2014) Biotechnological solutions to the nitrogen problem. *Current Opinion in Biotechnology* 26: 19-24. doi: 10.1016/j.copbio.2013.08.006.
- Oldroyd GED, Downie JA (2008) Coordinating Nodule Morphogenesis with Rhizobial Infection in Legumes. *Annual Review of Plant Biology* 59: 519-546. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839.
- Olivares J, Bedmar EJ, Sanjuán J (2013) Biological Nitrogen Fixation in the Context of Global Change. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26: 486-494. doi: 10.1094/mpmi-12-12-0293-cr.
- Pal M, Szalai G, Janda T (2015) Speculation: Polyamines are important in abiotic stress signaling. *Plant Science* 237: 16-23. doi: 10.1016/j.plantsci.2015.05.003.
- Palacios JM, Manyani H, Martínez M, Ureta AC, Brito B, Bascónes E, Rey L, Imperial J, Ruiz-Argüeso T (2005) Genetics and biotechnology of the H<sub>2</sub> sub-uptake [NiFe] hydrogenase from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, a legume endosymbiotic bacterium. *Biochemical Society Transactions* 33: 94-96. doi: 10.1042/bst0330094.
- Palma F, Lluch C, Iribarne C, Garcia-Garrido JM, Tejera Garcia NA (2009) Combined effect of salicylic acid and salinity on some antioxidant activities, oxidative stress and metabolite accumulation in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Growth Regulation* 58: 307-316. doi: 10.1007/s10725-009-9380-1.
- Palma F, López-Gómez M, Tejera NA, Lluch C (2013) Salicylic acid improves the salinity tolerance of *Medicago sativa* in symbiosis with *Sinorhizobium meliloti* by preventing nitrogen fixation inhibition. *Plant Science* 208: 75-82. doi: 10.1016/j.plantsci.2013.03.015.
- Palma F, López-Gómez M, Tejera NA, Lluch C (2013) Salicylic acid improves the salinity tolerance of *Medicago sativa* in symbiosis with *Sinorhizobium meliloti* by preventing nitrogen fixation inhibition. *Plant Science* 208: 75-82. doi: 10.1016/j.plantsci.2013.03.015.
- Palma F, López-Gómez M, Tejera NA, Lluch C (2014) Involvement of abscisic acid in the response of *Medicago sativa* plants in symbiosis with *Sinorhizobium meliloti* to salinity. *Plant Science* 223: 16-24. doi: 10.1016/j.plantsci.2014.02.005.
- Pardo JM, Cubero B, Leidi EO, Quintero FJ (2006) Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *Journal of Experimental Botany* 57: 1181-1199. doi: 10.1093/jxb/erj114.
- Parra-Lobato MC, Gomez-Jimenez MC (2011) Polyamine-induced modulation of genes involved in ethylene biosynthesis and signalling pathways and nitric oxide

- production during olive mature fruit abscission. *Journal of Experimental Botany* 62: 4447-4465. doi: 10.1093/jxb/err124.
- Paschalidis KA, Roubelakis-Angelakis KA (2005) Sites and regulation of polyamine catabolism in the tobacco plant. Correlations with cell division/expansion, cell cycle progression, and vascular development. *Plant Physiology* 138: 2174-2184. doi: 10.1104/pp.105.063941.
- Peoples MB, Brockwell J, Herridge DF, Rochester IJ, Alves BJR, Urquiaga S, Boddey RM, Dakora FD, Bhattarai S, Maskey SL, Sampet C, Rerkasem B, Khan DF, Hauggaard-Nielsen H, Jensen ES (2009) The contributions of nitrogen-fixing crop legumes to the productivity of agricultural systems. *Symbiosis* 48: 1-17.
- Pérez-Alfocea F, Balibrea ME, Cruz AS, Estañ MT (1996) Agronomical and physiological characterization of salinity tolerance in a commercial tomato hybrid. *Plant and Soil* 180: 251-257. doi: 10.1007/bf00015308.
- Perez-Amador MA, Carbonell J, Granell A (1995) Expression of arginine decarboxylase is induced during early fruit-development and in young tissues of *Pisum sativum* (L). *Plant Molecular Biology* 28: 997-1009. doi: 10.1007/bf00032662.
- Phillips DA (1980) Efficiency of Symbiotic Nitrogen Fixation in Legumes. *Annual Review of Plant Physiology* 31: 29-49. doi: 10.1146/annurev.pp.31.060180.000333.
- Planas-Riverola A, Gupta A, Betegón-Putze I, Bosch N, Ibañes M, Caño-Delgado AI (2019) Brassinosteroid signaling in plant development and adaptation to stress. *Development* 146: dev151894. doi: 10.1242/dev.151894.
- Podlešáková K, Ugena L, Spíchal L, Doležal K, De Diego N (2019) Phytohormones and polyamines regulate plant stress responses by altering GABA pathway. *New Biotechnology* 48: 53-65. doi: 10.1016/j.nbt.2018.07.003.
- Pottosin I, Shabala S (2014) Polyamines control of cation transport across plant membranes: implications for ion homeostasis and abiotic stress signaling. *Frontiers in Plant Science* 5. doi: 10.3389/fpls.2014.00154.
- Prosperi J-M, Jenczewski E, Angevain M, Ronfort J (2006) Morphologic and Agronomic Diversity of Wild Genetic Resources of *Medicago sativa* L. Collected in Spain. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 843-856. doi: 10.1007/s10722-004-6476-3.
- Quinet M, Ndayiragije A, Lefevre I, Lambillotte B, Dupont-Gillain CC, Lutts S (2010) Putrescine differently influences the effect of salt stress on polyamine metabolism and ethylene synthesis in rice cultivars differing in salt resistance. *Journal of Experimental Botany* 61: 2719-2733. doi: 10.1093/jxb/erq118.
- Rengasamy P (2006) World salinization with emphasis on Australia. *Journal of Experimental Botany* 57: 1017-1023. doi: 10.1093/jxb/erj108.

## Bibliografía

---

- Rhodes D, Nadolska-Orczyk A, Rich PJ (2004) Salinity, osmolytes and compatible solutes. In: Läuchli A., Lüttge U. (eds) Salinity: Environment - Plants - Molecules. Springer, Dordrecht. Doi: 10.1007/0-306-48155-3\_9
- Rigaud J, Puppo A (1975) Indole-3-acetic-acid catabolism by soybean bacteroids. *Journal of General Microbiology* 88: 223-228.
- Rodríguez AA, Maiale SJ, Menéndez AB, Ruiz OA (2009) Polyamine oxidase activity contributes to sustain maize leaf elongation under saline stress. *Journal of Experimental Botany* 60: 4249-4262. doi: 10.1093/jxb/erp256.
- Romero-Puertas MC, Rodríguez-Serrano M, Corpas FJ, Gómez M, Del Río LA, Sandalio LM (2004) Cadmium-induced subcellular accumulation of O<sup>2.-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in pea leaves. *Plant, Cell and Environment* 27: 1122-1134. doi: 10.1111/j.1365-3040.2004.01217.x.
- Roy P, Niyogi K, SenGupta DN, Ghosh B (2005) Spermidine treatment to rice seedlings recovers salinity stress-induced damage of plasma membrane and PM-bound H<sup>+</sup>-ATPase in salt-tolerant and salt-sensitive rice cultivars. *Plant Science* 168: 583-591. doi: 10.1016/j.plantsci.2004.08.014.
- Rubio MC, Becana M, Sato S, James EK, Tabata S, Spaink HP (2007) Characterization of genomic clones and expression analysis of the three types of superoxide dismutases during nodule development in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 262-275. doi: 10.1094/mpmi-20-3-0262.
- Rubio MC, Bustos-Sanmamed P, Clemente MR, Becana M (2009) Effects of salt stress on the expression of antioxidant genes and proteins in the model legume *Lotus japonicus*. *New Phytologist* 181: 851-859. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02718.x.
- Sagor GHM, Berberich T, Takahashi Y, Niitsu M, Kusano T (2013) The polyamine spermine protects Arabidopsis from heat stress-induced damage by increasing expression of heat shock-related genes. *Transgenic Research* 22: 595-605. doi: 10.1007/s11248-012-9666-3.
- Sagor GHM, Zhang SY, Kojima S, Simm S, Berberich T, Kusano T (2016) Reducing Cytoplasmic Polyamine Oxidase Activity in Arabidopsis Increases Salt and Drought Tolerance by Reducing Reactive Oxygen Species Production and Increasing Defense Gene Expression. *Frontiers in Plant Science* 7. doi: 10.3389/fpls.2016.00214.
- Sanchez DH, Cuevas JC, Chiesa MA, Ruiz OA (2005) Free spermidine and spermine content in *Lotus glaber* under long-term salt stress. *Plant Science* 168: 541-546. doi: 10.1016/j.plantsci.2004.09.025.
- Sańko-Sawczenko I, Łotocka B, Mielecki J, Rekosz-Burlaga H, Czarnocka W (2019) Transcriptomic Changes in *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus* Root Nodules during Drought Stress. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 1204.

- Sannazzaro AI, Echeverría M, Albertó EO, Ruiz OA, Menéndez AB (2007) Modulation of polyamine balance in *Lotus glaber* by salinity and arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 39-46. doi: 10.1016/j.plaphy.2006.12.008.
- Scharff AM, Egsgaard H, Hansen PE, Rosendahl L (2003) Exploring symbiotic nitrogen fixation and assimilation in pea root nodules by in vivo <sup>15</sup>N nuclear magnetic resonance spectroscopy and liquid chromatography-mass spectrometry. *Plant physiology* 131: 367-378. doi: 10.1104/pp.015156.
- Schubert M, Koteyeva NK, Wabnitz PW, Santos P, Büttner M, Sauer N, Demchenko K, Pawlowski K (2011) Plasmodesmata distribution and sugar partitioning in nitrogen-fixing root nodules of *Datisca glomerata*. *Planta* 233: 139-152. doi: 10.1007/s00425-010-1285-8.
- Seefeldt LC, Hoffman BM, Dean DR (2012) Electron transfer in nitrogenase catalysis. *Current Opinion in Chemical Biology* 16: 19-25. doi: 10.1016/j.cbpa.2012.02.012.
- Seifi H, Shelp B (2019) Spermine Differentially Refines Plant Defense Responses Against Biotic and Abiotic Stresses, *Frontiers in Plant Front. Plant Sci.* 10:117. doi: 10.3389/fpls.2019.00117.
- Shahbaz M, Ashraf M, Athar H-u-R (2008) Does exogenous application of 24-epibrassinolide ameliorate salt induced growth inhibition in wheat (*Triticum aestivum* L.)? *Plant Growth Regulation* 55: 51-64. doi: 10.1007/s10725-008-9262-y.
- Shahid MA, Pervez MA, Balal RM, Mattson NS, Rashid A, Ahmad R, Ayyub CM, Abbas T (2011) Brassinosteroid (24-epibrassinolide) enhances growth and alleviates the deleterious effects induced by salt stress in pea (*Pisum sativum* L.). *Australian Journal of Crop Science* 5: 500-510.
- Shao H, Li-Ye C, Chang-Xing Z, Qing-Jie G, Liu X-A, Ribaut J-M (2006) Plant Gene Regulatory Network System Under Abiotic Stress. *Acta Biologica Szegediensis* 50(1-2):1-9.
- Shao H-B, Chu L-Y, Lu Z-H, Kang C-M (2007) Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. *International journal of biological sciences* 4: 8-14.
- Sharma I, Kaur N, Pati PK (2017) Brassinosteroids: A Promising Option in Deciphering Remedial Strategies for Abiotic Stress Tolerance in Rice. *Frontiers in Plant Science* 8. doi: 10.3389/fpls.2017.02151.
- Shaw FL, Elliott KA, Kinch LN, Fuell C, Phillips MA, Michael AJ (2010) Evolution and Multifarious Horizontal Transfer of an Alternative Biosynthetic Pathway for the Alternative Polyamine sym-Homospermidine. *Journal of Biological Chemistry* 285: 14711-14723. doi: 10.1074/jbc.M110.107219.
- Shevyakova NI, Il'ina EN, Stetsenko LA, Kuznetsov VV (2011) Nickel Accumulation in Rape Shoots (*Brassica napus* L.) Increased by Putrescine. *International Journal of Phytoremediation* 13: 345-356. doi: 10.1080/15226514.2010.495147.

## *Bibliografía*

---

- Shevyakova NI, Shorina MV, Rakitin VY, Kuznetsov VV (2006) Stress-dependent accumulation of spermidine and spermine in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* under salinity conditions. *Russian Journal of Plant Physiology* 53: 739-745. doi: 10.1134/s1021443706060021.
- Shi H, Ye T, Chan Z (2013) Comparative Proteomic and Physiological Analyses Reveal the Protective Effect of Exogenous Polyamines in the Bermudagrass (*Cynodon dactylon*) Response to Salt and Drought Stresses. *Journal of Proteome Research* 12: 4951-4964. doi: 10.1021/pr400479k.
- Sirhindi G (2013) Brassinosteroids: Biosynthesis and Role in Growth, Development, and Thermotolerance Responses. In: GR Rout, AB Das (eds) *Molecular Stress Physiology of Plants*. Springer India, India.
- Smit G, Swart S, Lugtenberg BJJ, Kijne JW (1992) Molecular mechanisms of attachment of *Rhizobium* bacteria to plant roots. *Molecular Microbiology* 6: 2897-2903. doi: 10.1111/j.1365-2958.1992.tb01748.x.
- Smith BE (2002) Nitrogenase Reveals Its Inner Secrets. *Science* 297: 1654-1655. doi: 10.1126/science.1076659.
- Smith TA (1977) Homospermidine in *Rhizobium* and legume root nodules. *Phytochemistry* 16: 278-279. doi: 10.1016/S0031-9422(00)86803-X.
- Smýkal P, Coyne CJ, Ambrose MJ, Maxted N, Schaefer H, Blair MW, Berger J, Greene SL, Nelson MN, Besharat N, Vymyslický T, Toker C, Saxena RK, Roorkiwal M, Pandey MK, Hu J, Li YH, Wang LX, Guo Y, Qiu LJ, Redden RJ, Varshney RK (2015) Legume Crops Phylogeny and Genetic Diversity for Science and Breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences* 34: 43-104. doi: 10.1080/07352689.2014.897904.
- Sprent JI (1979) *The biology of nitrogen-fixing organisms* / Janet I. Sprent. McGraw-Hill, London ; New York.
- Sprent JI, James EK (2007) Legume evolution: Where do nodules and mycorrhizas fit in? *Plant Physiology* 144: 575-581. doi: 10.1104/pp.107.096156.
- Su GX, An ZF, Zhang WH, Liu YL (2005) Light promotes the synthesis of lignin through the production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediated by diamine oxidases in soybean hypocotyls. *Journal of Plant Physiology* 162: 1297-1303. doi: 10.1016/j.jplph.2005.04.033.
- Su GX, Bai X (2008) Contribution of putrescine degradation to proline accumulation in soybean leaves under salinity. *Biologia Plantarum* 52: 796-799. doi: 10.1007/s10535-008-0156-7.
- Subramanian S, Stacey G, Yu O (2006) Endogenous isoflavones are essential for the establishment of symbiosis between soybean and *Bradyrhizobium japonicum*. *The Plant Journal* 48: 261-273. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02874.x.

- Supanjani S, Habib A, Mabood F, Lee KD, Donnelly D, Smith DL (2006) Nod factor enhances calcium uptake by soybean. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 866-872. doi: 10.1016/j.plaphy.2006.10.001.
- Swanepoel PA, Tshuma F (2017) Soil quality effects on regeneration of annual *Medicago* pastures in the Swartland of South Africa. *African Journal of Range & Forage Science* 34: 201-208. doi: 10.2989/10220119.2017.1403462.
- Szepesi Á, Csiszár J, Gémes K, Horváth E, Horváth F, Simon ML, Tari I (2009) Salicylic acid improves acclimation to salt stress by stimulating abscisic aldehyde oxidase activity and abscisic acid accumulation, and increases Na<sup>+</sup> content in leaves without toxicity symptoms in *Solanum lycopersicum* L. *Journal of Plant Physiology* 166: 914-925.
- Takács Z, Poór P, Tari I (2016) Comparison of polyamine metabolism in tomato plants exposed to different concentrations of salicylic acid under light or dark conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* 108: 266-278. doi: 10.1016/j.plaphy.2016.07.020.
- Takahashi Y, Ono K, Akamine Y, Asano T, Ezaki M, Mouri I (2018) Highly-expressed polyamine oxidases catalyze polyamine back conversion in *Brachypodium distachyon*. *Journal of Plant Research* 131: 341-348. doi: 10.1007/s10265-017-0989-2.
- Tajima S, Nomura M, Kouchi H (2004) Ureide biosynthesis in legume nodules. *Frontiers in Bioscience* 9:1374-81.
- Tang H, Krishnakumar V, Bidwell S, Rosen B, Chan A, Zhou S, Gentzbittel L, Childs KL, Yandell M, Gundlach H, Mayer KF, Schwartz DC, Town CD (2014a) An improved genome release (version Mt4.0) for the model legume *Medicago truncatula*. *BMC Genomics* 15: 312. doi: 10.1186/1471-2164-15-312.
- Tang L, Cai H, Zhai H, Luo X, Zhenyu W, Cui L, Bai X (2014b) Overexpression of Glycine soja WRKY20 enhances both drought and salt tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 118: 77. doi: 10.1007/s11240-014-0463-y.
- Tang W, Newton RJ (2005) Polyamines reduce salt-induced oxidative damage by increasing the activities of antioxidant enzymes and decreasing lipid peroxidation in Virginia pine. *Plant Growth Regulation* 46: 31-43. doi: 10.1007/s10725-005-6395-0.
- Tavladoraki P, Cona A, Federico R, Tempera G, Viceconte N, Saccoccio S, Battaglia V, Toninello A, Agostinelli E (2012) Polyamine catabolism: target for antiproliferative therapies in animals and stress tolerance strategies in plants. *Amino Acids* 42: 411-426. doi: 10.1007/s00726-011-1012-1.
- Tejera García NA, Iribarne C, Palma F, Lluch C (2007) Inhibition of the catalase activity from *Phaseolus vulgaris* and *Medicago sativa* by sodium chloride. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 535-541. doi: 10.1016/j.plaphy.2007.04.008.
- Tejera N, Ortega EH-C, Jose A. Pieckenstein, F. & Lluch, C. (2006) Endófitos diazotrofos: *Gluconacetobacter diazotrophicus* como bacteria modelo. Fijación de Nitrógeno:

## *Bibliografía*

---

- Fundamentos y Aplicaciones. Publisher: Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno. Editors: EJ Bedmar, J González, C Lluch, B Rodelas. Pág: 124-136. ISBN: 84-611-1198-5.
- Tejera NA, Soussi M, Lluch C (2006) Physiological and nutritional indicators of tolerance to salinity in chickpea plants growing under symbiotic conditions. *Environmental and Experimental Botany* 58: 17-24. doi: 10.1016/j.envexpbot.2005.06.007.
- Terakado J, Yoneyama T, Fujihara S (2006) Shoot-applied polyamines suppress nodule formation in soybean (*Glycine max*). *Journal of Plant Physiology* 163: 497-505. doi: 10.1016/j.jplph.2005.05.007.
- Terakado-Tonooka J, Fujihara S (2008) Involvement of polyamines in the root nodule regulation of soybeans (*Glycine max*). *Plant Root* 2: 46-53. doi: 10.3117/plantroot.2.46.
- Terui Y, Ohnuma M, Hiraga K, Kawashima E, Oshima T (2005) Stabilization of nucleic acids by unusual polyamines produced by an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *Biochemical Journal* 388: 427-433.
- Tiburcio AF, Alcázar R (2018) Potential Applications of Polyamines in Agriculture and Plant Biotechnology. In: R Alcázar, AF Tiburcio (eds) *Polyamines: Methods and Protocols*. Springer New York, New York, NY.
- Tomar PC, Lakra N, Mishra SN (2013) Cadaverine: A lysine catabolite involved in plant growth and development. *Plant Signaling & Behavior* 8: e25850. doi: 10.4161/psb.25850.
- Toumi I, Moschou PN, Paschalidis KA, Bouamama B, Ben Salem-Fnayou A, Ghorbel AW, Mliki A, Roubelakis-Angelakis KA (2010) Abscisic acid signals reorientation of polyamine metabolism to orchestrate stress responses via the polyamine exodus pathway in grapevine. *Journal of Plant Physiology* 167: 519-525. doi: 10.1016/j.jplph.2009.10.022.
- Trinchant JC, Bosdari A, Spermato G, Van de Sype G, Le Rudulier D (2004) Proline betaine accumulation and metabolism in alfalfa plants under sodium chloride stress. Exploring its compartmentalization in nodules. *Plant Physiology* 135: 1583-1594. doi: 10.1104/pp.103.037556.
- Troll W, Lindsley J (1955) A photometric method for the determination of proline. *Journal of Biological Chemistry* 215: 655-660.
- Udvardi M, Poole PS (2013) Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annual Review of Plant Biology* 64: 781-805.
- Van Oosten MJ, Sharkhuu A, Batelli G, Bressan RA, Maggio A (2013) The *Arabidopsis thaliana* mutant *air1* implicates *SOS3* in the regulation of anthocyanins under salt stress. *Plant Molecular Biology* 83: 405-415. doi: 10.1007/s11103-013-0099-z.
- Vance CP (1998) Legume Symbiotic Nitrogen Fixation: Agronomic Aspects. In: HP Spaink, A Kondorosi, PJJ Hooykaas (eds) *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*. Springer Netherlands, Dordrecht.



- Vance CP (2008) Carbon and Nitrogen Metabolism in Legume Nodules. In: MJ Dilworth, EK James, JI Sprent, WE Newton (eds) Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Vardhini BV, Rao SSR (1998) Effect of brassinosteroids on growth, metabolite content and yield of arachis hypogaea. *Phytochemistry* 48: 927-930. doi: 10.1016/S0031-9422(97)00710-3.
- Vassileva V, Ignatov G (1999) Polyamine-induced changes in symbiotic parameters of the *Galega orientalis*-*Rhizobium galegae* nitrogen-fixing system. *Plant and Soil* 210: 83-91. doi: 10.1023/a:1004636800869.
- Walsh KB (1995) Physiology of the legume nodule and its response to stress. *Soil Biology and Biochemistry* 27: 637-655. doi: 10.1016/0038-0717(95)98644-4.
- Wang D, Griffiths J, Starker C, Fedorova E, Limpens E, Ivanov S, Bisseling T, Long S (2010) A Nodule-Specific Protein Secretory Pathway Required for Nitrogen-Fixing Symbiosis. *Science* 327: 1126-1129. doi: 10.1126/science.1184096.
- Wang W, Paschadalis K, Feng J-C, Song J, Liu H-J (2019) Polyamine Catabolism in Plants: A Universal Process With Diverse Functions. *Front. Plant Sci.* 10:561. doi: 10.3389/fpls.2019.00561.
- Watson MB, Emory KK, Piatak RM, Malmberg RL (1998) Arginine decarboxylase (polyamine synthesis) mutants of *Arabidopsis thaliana* exhibit altered root growth. *The Plant Journal* 13: 231-239. doi: 10.1046/j.1365-313X.1998.00027.x.
- Wei Z, Li J (2016) Brassinosteroids Regulate Root Growth, Development, and Symbiosis. *Molecular Plant* 9: 86-100. doi: 10.1016/j.molp.2015.12.003.
- Wimalasekera R, Tebartz F, Scherer GFE (2011) Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. *Plant Science* 181: 593-603. doi: 10.1016/j.plantsci.2011.04.002.
- Wisniewski JP, Brewin NJ (2000) Construction of transgenic pea lines with modified expression of diamine oxidase and modified nodulation responses with exogenous putrescine. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 922-928. doi: 10.1094/mpmi.2000.13.9.922.
- Witty JF, Minchin FR (1998) Hydrogen measurements provide direct evidence for a variable physical barrier to gas diffusion in legume nodules. *Journal of Experimental Botany* 49: 1015-1020. doi: 10.1093/jexbot/49.323.1015.
- Xing SG, Jun YB, Hau ZW, Liang LY (2007) Higher accumulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid induced by salt stress through stimulating the activity of diamine oxidases in *Glycine max* (L.) Merr. roots. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 560-566. doi: 10.1016/j.plaphy.2007.05.007.
- Xu Y, Shi GX, Ding CX, Xu XY (2011) Polyamine metabolism and physiological responses of *Potamogeton crispus* leaves under lead stress. *Russian Journal of Plant Physiology* 58: 460-466. doi: 10.1134/s1021443711030204.

## Bibliografía

---

- Xue B, Zhang A, Jiang M (2009) Involvement of Polyamine Oxidase in Abscisic Acid-induced Cytosolic Antioxidant Defense in Leaves of Maize. *Journal of Integrative Plant Biology* 51: 225-234. doi: 10.1111/j.1744-7909.2008.00766.x.
- Yamaguchi K, Takahashi Y, Berberich T, Imai A, Miyazaki A, Takahashi T, Michael A, Kusano T (2006) The polyamine spermine protects against high salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 580: 6783-6788. doi: 10.1016/j.febslet.2006.10.078.
- Yamaguchi K, Takahashi Y, Berberich T, Imai A, Takahashi T, Michael AJ, Kusano T (2007) A protective role for the polyamine spermine against drought stress in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 352: 486-490. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.11.041.
- Yamchi A, Jazii FR, Mousavi A, Karkhane AA (2007) Proline accumulation in transgenic tobacco as a result of expression of *Arabidopsis*  $\delta$ -(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) during osmotic stress. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 16: 9-15.
- Yu S, Tang K (2004) MAP kinase cascades responding to environmental stress in plants. *Journal of Biosciences* 10(05). doi: 10.12692/ijb/10.5.250-256.
- Zabalza A, Orcaray L, Gaston S, Royuela M (2004) Carbohydrate accumulation in leaves of plants treated with the herbicide chlorsulfuron or imazethapyr is due to a decrease in sink strength. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 7601-7606. doi: 10.1021/jf0486996.
- Zahaf O, Blanchet S, de Zélicourt A, Alunni B, Plet J, Laffont C, de Lorenzo L, Imbeaud S, Ichanté J-L, Diet A, Badri M, Zabalza A, González EM, Delacroix H, Gruber V, Frugier F, Crespi M (2012) Comparative Transcriptomic Analysis of Salt Adaptation in Roots of Contrasting *Medicago truncatula* Genotypes. *Molecular Plant* 5: 1068-1081. doi: 10.1093/mp/sss009.
- Zapata PJ, Serrano M, Pretel MT, Amorós A, Botella MA (2004) Polyamines and ethylene changes during germination of different plant species under salinity. *Plant Science* 167: 781-788. doi: 10.1016/j.plantsci.2004.05.014.
- Zepeda-Jazo I, Velarde-Buendía AM, Enríquez-Figueroa R, Bose J, Shabala S, Muñiz-Murguía J, Pottosin II (2011) Polyamines Interact with Hydroxyl Radicals in Activating Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> Transport across the Root Epidermal Plasma Membranes. *Plant Physiology* 157: 2167-2180. doi: 10.1104/pp.111.179671.
- Zhao F, Song C-P, He J, Zhu H (2007) Polyamines Improve K/Na<sup>+</sup> Homeostasis in Barley Seedlings by Regulating Root Ion Channel Activities. *Plant Physiology* 145: 1061-1072. doi: 10.1104/pp.107.105882.
- Zheng Q, Liu J, Liu R, Wu H, Jiang C, Wang C, Guan Y (2016) Temporal and spatial distributions of sodium and polyamines regulated by brassinosteroids in enhancing

- tomato salt resistance. *Plant and Soil* 400: 147-164. doi: 10.1007/s11104-015-2712-1.
- Zhu H, Choi H-K, Cook DR, Shoemaker RC (2005) Bridging Model and Crop Legumes through Comparative Genomics. *Plant Physiology* 137: 1189-1196. doi: 10.1104/pp.104.058891.
- Zhu H, Ding GH, Fang K, Zhao FG, Qin P (2006) New perspective on the mechanism of alleviating salt stress by spermidine in barley seedlings. *Plant Growth Regulation* 49: 147-156. doi: 10.1007/s10725-006-9004-y.
- Zhu J-K (2003) Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 441-445. doi: 10.1016/S1369-5266(03)00085-2.
- Zhuo C, Liang L, Zhao Y, Guo Z, Lu S (2018) A cold responsive ethylene responsive factor from *Medicago falcata* confers cold tolerance by up-regulation of polyamine turnover, antioxidant protection, and proline accumulation. *Plant, Cell & Environment* 41: 2021-2032. doi: 10.1111/pce.13114.
- Zúñiga D (1997) Contribución relativa de los simbiositos en la fijación de nitrógeno por *Phaseolus vulgaris* en condiciones de estrés salino. Universidad de Granada, Granada. doi: 10481/35627.

