UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

“Efecto de riboflavina y *Rhizobium tropici* en plantas de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con hongos micorrizógenos arbusculares”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PRESENTA

MSc. Jacob Isaias Bañuelos Trejo
2192802101
0000-0001-8182-9360
llacoob@hotmail.com

DIRECTORA DE TESIS:
Dra. Sara Lucía Camargo Ricalde
CODIRECTORA DE TESIS:
Dra. María Esperanza Martínez Romero

JURADO
Presidente: Dra. Sara Lucía Camargo Ricalde
Secretaria: Dra. María Esperanza Martínez Romero
Vocal: Dr. Noé Manuel Montaño Arias
Vocal: Dr. Alejandro Alarcón
Vocal: Doctora: Mónica Cristina Rodríguez Palacio

Iztapalapa, Ciudad de México al 31 de marzo del 2025

Ciudad de México, 31 de marzo 2025

El presente trabajo fue realizado con recursos del Laboratorio de Biosistemática de Leguminosas, del Departamento de Biología, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Sara Lucía Camargo Ricalde y el asesoramiento del Dr. Noé Manuel Montaño Arias. Se hizo también uso de los recursos del Laboratorio Ecología en Genómica de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. María Esperanza Martínez Romero.

El autor de esta tesis agradece al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por la beca otorgada para sus estudios de Doctorado con el número de registro 286223, que comprendió el periodo de 2019 a 2023. El Doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, pertenece al padrón de posgrados de excelencia de CONAHCyT y, además, cuenta con el apoyo del mismo Consejo con el convenio PFP-20-93.

El jurado designado por la Comisión Académica del Doctorado y las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco y de Ciencias Naturales e Ingeniería de la Unidad Cuajimalpa

Nombre del alumno: Jacob Isaias Bañuelos Trejo

Fecha de aprobación de tesis: 5 de noviembre del 2024

JURADO:

Dra. Sara Lucía Camargo Ricalde

Presidente

Dra. María Esperanza Martínez Romero

Secretario

Dr. Noe Manuel Montaño Arias

Vocal 1

Dr. Alejandro Alarcón

Vocal 2

Dra. Mónica Cristina Rodríguez Palacio

Vocal 3

Agradecimientos

A la Dra. Sara Lucía Camargo Ricalde, mi codirectora de tesis, quien me apoyó tanto con sus consejos, como con recursos para realizar y concluir este trabajo.

A la Dra. María Esperanza Martínez Romero, mi codirectora, por su apoyo, guía, espacio y recursos aportados para este trabajo.

Al Dr. Noé Manuel Montaño Arias, gracias por los consejos, la disciplina y la formación.

A la Universidad Autónoma Metropolitana por la oportunidad de cursar este posgrado y otorgar el espacio y recursos para realizarlo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por el espacio y recursos otorgados para la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por el apoyo para llevar a cabo mis estudios.

A la Universidad Veracruzana, por el apoyo en el uso de instalaciones durante la fase experimental.

Dedicatoria:

A mi madre,

quien siempre ha sido y será la inspiración para superarme

y seguir el camino de la ciencia

A mis hermanos,

quienes, con su apoyo y aliento, me permitieron

formarme para conseguir mis sueños

Declaración de originalidad

El que suscribe, Jacob Isaias Bañuelos Trejo, alumno del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, de las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud, y de Ciencias Naturales e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana, y autor de la tesis titulada: "Efecto de riboflavina y *Rhizobium tropici* en plantas de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con hongos micorrizógenos arbusculares"

Declaro que:

1. La tesis que presentó ante el Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, para lo obtención del grado de Doctor, es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual, el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis no he reproducido párrafos completos, ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y/o fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México,

Atentamente: Jacob Isaias Bañuelos Trejo

Carta de Cesión de Derechos

En la Ciudad de México, el día 28 de marzo del 2025, quien suscribe, Jacob Isaias Bañuelos Trejo, alumno del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, manifiesta que es el autor intelectual de la tesis titulada "Efecto de riboflavina y *Rhizobium tropici* en plantas de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con hongos micorrizógenos arbusculares", la cual estuvo bajo la dirección del Comité Tutoral conformado por la Dra. Sara Lucía Camargo Ricalde, la Dra. María Esperanza Martínez Romero y el Dr. Noé Manuel Montaño Arias, ceden los derechos del trabajo de tesis a la Universidad Autónoma Metropolitana para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin permiso expreso del autor o del Comité Tutorial del trabajo. Con el fin de solicitar autorización, los usuarios podrán escribir al correo electrónico llacoob@hotmail.com; si el permiso es otorgado, el usuario deberá dar el seguimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Jacob Isaias Bañuelos Trejo

Matrícula: 2192802101

Índice

Dedicatoria: 2
Abreviaturas 14
Resumen 15
Abstract 16
CAPÍTULO I 17
1. Introducción general 17
2. Marco teórico 19
Fijación de nitrógeno 19
Fijación simbiótica de nitrógeno 19
Desarrollo del nódulo 20
Translocación de nitrógeno fijado 21
Hongos micorrizógenos 23
Tipos de asociación micorrizógena 23
Hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) 23
Hifas 25
Arbúsculos 27
Interacción entre distintas especies HMA 28
Interacción con otros microorganismos 30
Interacción hongos micorrizógenos arbusculares (HMA)-bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN) 30
Mecanismos de interacción entre simbiontes 31
Presencia de vitaminas en la interacción HMA-BFN 32
Vitaminas del grupo B 33
Tiamina (B1) 37
Riboflavina (B2) 38
Piridoxina (B6) 40
Ácido fólico (B9) 41
Colbalamina (B12) 43
Identidad del hospedero 43
Referencias 44
3. Preguntas de investigación 68

4. Hipótesis 68
5. Objetivo general 68
6. Objetivos específicos 68
CAPÍTULO II 70
Folates in legume root nodules 70
Folatos en nódulos de raíz en leguminosas 70
Abstract 70
Resumen 71
1 Introducción 72
2 Folatos como precursores de purinas 73
3 Folatos para las transformilaciones en la biosíntesis de purinas 75
4 Folatos en la interconversión de serina a glicina 79
5 Etileno y folatos 82
6 Conclusiones 84
7 Referencias 85
CAPÍTULO III 93
Rhizobium tropici and riboflavin amendment condition arbuscular mycorrhiza colonization in *Phaseolus vulgaris* L. 93
La adición de *Rhizobium tropici* y riboflavin condicionan la colonización micorrizógena arbuscular en *Phaseolus vulgaris* L. 93
Abstract 93
Resumen 94
1 Introducción 95
2. Materiales y métodos 98
2.1. Diseño Experimental 98
2.2. Suelo 99
2.3. Material vegetal 99
2.4. Concentraciones de Riboflavina (Vitamina B2) 100
2.5. Hongos Micorrizógenos Arbusculares 100
2.6. Cepa Bacteriana y Preparación del Inóculo 102
2.7. Análisis en Plantas 103
2.8. Extracción y Amplificación de ADN de Hongos Micorrizógenos Arbusculares (HMA) 103
2.9. Análisis Bioinformático 104

2.10. Statistical Analysis 105
3 Resultados 105
3.1. La Riboflavina Estimula el Crecimiento de las Plantas 105
3.2. La Riboflavina Estimula la Colonización por Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) 106
3.3. Efecto de la Coinoculación de *R. tropici* y Riboflavina 107
3.4. Inoculación con *R. tropici* Modifica el Perfil de Especies de HMA que Colonizan *P. vulgaris* 108
4 Discusión 110
4.1. Cambios en la Estructura de la Comunidad de Hongos Micorrizógenos Arbusculares (HMA) a causa de la planta 110
4.2. Efecto de *R. tropici* y los Posibles Mecanismos que Influyen en los Hongos Micorrizógenos Arbusculares (HMA) 111
5 Conclusiones 115
6 Financiamiento 115
7 Agradecimientos 115
8 Conflicto de intereses 116
9 Referencias 116
CAPÍTULO IV 127
Folic acid (vitamin B9) and inoculation effects on plant growth in *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae) 127
Ácido fólico (vitamina B9) y de la inoculación en el crecimiento de Phaseolus vulgaris L. (Fabaceae) 127
Abstract 127
Resumen 128
1. Introducción 129
2. Materiales y métodos 131
2.1. Diseño experimental 131
2.2. Condiciones de manejo del experimento 131
2.3. Material vegetal 132
2.4. Irrigación con ácido fólico (vitamina B9) 132
2.5. Inóculo de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) 133
2.6. Índice de color verde obscuro (DGCI) 134
2.7. Determinación del contenido de Prolina 135
2.8. Variables de crecimiento vegetal 135

2.9. Análisis estadístico 136
3. Resultados y discusión 136
3.1. Crecimiento Vegetal 136
3.2. Índice de color verde oscuro (DGCI) 141
3.3. Contenido de prolina 142
4. Conclusiones 143
5. Declaración de ética 144
6. Consentimiento de publicación 144
7. Disponibilidad de datos 144
8. Conflicto de intereses 144
9. Financiamiento 144
10. Contribuciones de los autores 144
11. Agradecimientos 145
12. Referencias 145
CAPÍTULO V 154
DISCUSIÓN GENERAL 154
Referencias 157
CAPÍTULO VI 163
CONCLUSIONES GENERALES 163
Objetivo a) Identificar genes candidatos de transporte de vitaminas B2 y B9 en especies de *Rhizobium.* 163
Objetivo b) Identificar genes de biosíntesis de vitaminas B2 y B9 en rizobacterias y hongos micorrizógenos arbusculares. 163
Objetivo c) Identificación de concentraciones de vitamina B2 que afectan la colonización micorrízica en *P. vulgaris.* 164
Objetivo d) Evaluar el efecto de la vitamina B2 durante la simbiosis micorrízica y *Rhizobium tropici* en *P. vulgaris.* 164
Objetivo e) Determinar los efectos en las especies de hongos micorrizógenos en coinoculación con *R. tropici*. 165
CAPÍTULO VII 166
PERSPECTIVAS 166
Anexos 168
Anexo 1. Análisis comparativo de genomas de 33 especies de *Rhizobium* que comparten genes de biosíntesis de riboflavina. 168

Anexo 2. Análisis comparativo de genomas de 33 especies de *Rhizobium* que comparten genes de biosíntesis de folatos. 169

Lista de figuras

Capítulo I

Figura 1. Rutas de biosíntesis de vitaminas del grupo B faltantes en dos especies de *Rhizophagus* (T.H. Nicolson y N.C. Shenck)

34

Capítulo II

Figura 1. Uso general de los derivados de folato durante la fijación de nitrógeno, la biosíntesis de purinas de novo y las enzimas de biosíntesis de folato directamente involucradas en la fijación simbiótica de N_2.

73

Figura 2. Resumen de las reacciones involucradas en el ciclo del metilo

82

Capítulo III

Figura 1. Peso fresco total en *Phaseolus vulgaris* (frijol común) 35 días después de ser co-inoculado con inóculo de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y *Rhizobium tropici* CIAT 899.

105

Figura 2. La riboflavina estimula la colonización por hongos micorrizógenos arbusculares (HMA).

106

Figura 3. Efecto de la coinoculación de *Rhizobium tropici* y riboflavina (vitamina B2) en *Phaseolus vulgaris*.

107

Figura 4. Composición y abundancias relativas de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) en las raíces de *Phaseolus vulgaris* determinadas mediante un análisis de secuenciación de amplicones de ARNr SSU micorrízicos.

108

Capítulo IV

Figura 1. a) Peso seco de *Phaseolus vulgaris* L. (foliar y raíz), b) área foliar, c) altura de la planta, y d) número de trifolios inoculadas con (HMA) o controles no inoculados (C) y regadas con 50 µM de ácido fólico (vitamina B9, B9) o no (control, C); 35 días después de la inoculación micorrizógena y bacteriana.

138

Figura 2. Índice de Color Verde Oscuro (DGCI) en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. inoculadas (HMA) o controles no inoculados (C) y regadas con 50 µM de ácido fólico (vitamina B9, B9) o no (control, C), 35 días después de la inoculación con la mezcla de HMA y bacterias.

141

Figura 3. Contenido de prolina en hojas de *Phaseolus vulgaris* L. inoculadas con hongos micorrizógenos arbusculares (AMF) o no (control, C) y regadas con 50 µM de ácido fólico (vitamina B9) o no (control, C).

142

Índice de cuadros

Capítulo I

Cuadro 1. Principales diferencias de los nódulos determinados e indeterminados de leguminosas en simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno.

19

11

Cuadro 2. Propiedades, procesos y funciones ecológicas de las hifas de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) contrastadas con las de las raíces de plantas.

24

Cuadro 3. Funciones de las principales vitaminas del grupo B en las plantas y su relación con microorganismos asociados.

34

Capítulo II

Cuadro 1 . Cambio en la expresión de los transcritos que codifican para las enzimas relacionadas con los folatos, según lo determinado en los análisis de transcriptoma de los nódulos de soya en comparación con las raíces no inoculadas, de Yang et al. (2010) e Ishikawa et al. (2018)

75

Cuadro 2. Datos metabolómicos de diferentes leguminosas durante la simbiosis con sus bacterias simbióticas. Compilado y analizado de Lardi et al. (2016, 2018)

77

Capítulo III

Cuadro 1. Lista de especies de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) contenidas en el inóculo identificadas por análisis de secuencia de ARNr SSU.

100

Capítulo IV

Cuadro 1. Lista de las 14 especies de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) contenidos en la mezcla del inóculo adicionado a plantas de *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae)

Abreviaturas

AMF	Arbuscular mycorrhizal fungi
ARNi	Ácido ribonucleico de interferencia
Asn	Asparagina
B1	Tiamina
B12	Cobalamina
B2	Riboflavina
B3	Niacina
B5	Pantotenato
B6	Piridoxina
B7	Biotina
B9	Folatos
BEG	Banco internacional para Glomeromycota
Eh	Potencial redox
FDR	Tasa de descubrimientos falsos
HMA	Hongos micorrizógenos arbusculares
mm	milímetro
NFB	nitrogen fixing bacteria
pH	Potencial de hidrógeno
µM	microMolar
µm	micrómetro

Resumen

Phaseolus vulgaris L. (Fabaceae) forma simbiosis tripartita con hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) y bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN). Esta asociación tripartita utiliza señalización por moléculas para establecerse intracelular en las raíces. La meta de esta tesis doctoral fue determinar si *Rhizobium tropici* CIAT 899 (Rhizobiaceae) y la aplicación exógena de riboflavina (vitamina B2) afecta la selección de especies de HMA y la colonización fúngica de las raíces en *P. vulgaris*. Al utilizar la amplificación de fragmentos de SSU rRNA extraídos del ADN de raíces colonizadas de *P. vulgaris*, se registró que la presencia de *R. tropici* alteró la abundancia relativa de especies de HMA. *Dominikia bernensis* fue la especie más abundante en raíces de *P. vulgaris*, pero cuando se inoculó con *R. tropici*, las especies de *Glomus* dominaron. Rizobacterias como *R. tropici*, secretan riboflavina y pueden afectar la simbiosis micorrizógena. La adición de riboflavina 50 µM a *P. vulgaris*, incrementó el crecimiento de la planta (28%), el peso seco de los nódulos (18%), la colonización micorrizógena (248%) y la frecuencia de vesículas micorrizógenas (56%) en las raíces de frijol. La aplicación de riboflavina en concentraciones 3.12 y 12.5 µM favoreció la presencia de *Glomus macrocarpum* Nicolson y Gerd. en las raíces de *P. vulgaris*. Este trabajo resalta la importancia de la identidad de hospedero-simbionte y el condicionamiento que la riboflavina causa en la colonización por HMA en raíces de *P. vulgaris*.

Palabras clave: Vitaminas, riboflavina, prolina, simbiosis, micorrizas

Abstract

Phaseolus vulgaris L. (Fabaceae) forms a tripartite symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and nitrogen-fixing bacteria (NFB). The tripartite association utilizes molecular signals to establish itself intracellularly in roots. The aim of this doctoral thesis was to determine whether *Rhizobium tropici* CIAT 899 (Rhizobiaceae) and the exogenous application of riboflavin (vitamin B2) affect the selection of AMF species and fungal colonization of the roots in *P. vulgaris*. By amplifying SSU rRNA fragment extracted amplification of the DNA of *P. vulgaris* colonized roots, it was observed that the presence of *R. tropici* altered the relative abundance of AMF species. *Dominikia bernensis* (Glomeraceae) was the most abundant AMF species in *P. vulgaris* roots, but when inoculated with *R. tropici*, *Glomus* species dominated. Rhizobacteria like *R. tropici* secrete riboflavin and may affect mycorrhizal symbiosis. The addition of 50 µM riboflavin to *P. vulgaris* increased plant growth (28%), dry weight of nodule (18%), mycorrhizal colonization (248%), and the frequency of mycorrhizal vesicle (56%) in bean roots. The application of riboflavin at concentrations of 3.12 and 12.5 µM favored the presence of *Glomus macrocarpum* Nicolson y Gerd. ((Glomeraceae) in *P. vulgaris* roots. This work highlights the importance of host-symbiont identity and the conditioning effect that riboflavin has on AMF colonization in *P. vulgaris* roots.

Keywords: Vitamins, riboflavin, proline, symbiosis, mycorrhiza

CAPÍTULO I

1. Introducción general

Las plantas utilizan distintos mecanismos para superar las limitaciones ambientales como la falta e insuficiencia de recursos disponibles y el estrés ambiental. Una de las más efectivas es la simbiosis con otros organismos, especialmente microorganismos. Por ejemplo, las plantas forman asociaciones simbióticas con hongos micorrizógenos que colonizan sus raíces y extienden su red hifal en el suelo, lo que aumenta la absorción de agua y nutrientes, especialmente de nutrientes poco móviles como el fósforo (P) (Bonfante y Anca 2009). Por otra parte, las leguminosas establecen también relaciones simbióticas con bacterias fijadoras de nitrógeno (por ejemplo, *Rhizobium* Franck), esto es especialmente relevante en suelos pobres en nitrógeno (N) (Gough et al. 2022). Estas relaciones simbióticas pueden ser tripartitas; es decir, ocurren al mismo tiempo en algunas plantas, y son esenciales para la supervivencia y desarrollo de éstas, sobre todo, en ambientes adversos (Musyoka et al. 2020). Estas interacciones son complejas y pueden variar de acuerdo con el entorno y las especies involucradas (Yu et al. 2023). Además de las especies involucradas, el intercambio de moléculas que son secretadas durante la relación tripartita puede influir en el desarrollo y eficiencia de la simbiosis. Por una parte, las plantas secretan una mezcla de moléculas, por ejemplo, estrigolactonas (Bouwmeester et al. 2019), flavonoides (Sugiyama 2021), saponinas (Sugiyama 2021), entre otras, que influyen en la rizósfera y promueven la movilización de nutrientes para su absorción (Dakora y Phillips 2002; Rohrbacher y St-Arnaud 2016). Por otra parte, los rizobios pueden exudar moléculas que afectan el desarrollo vegetal (Phillips et al. 1999; Marek-Kozaczuk y Skorupska 2001). Un grupo de moléculas que no se han estudiado en una interacción tripartita son las vitaminas, las cuales no solo afectan a la planta,

sino que pueden estimular el crecimiento de otros organismos simbiontes, como los hongos micorrizógenos (Strzelczyk y Pokojska 1990; Kobayashi et al. 2018). La investigación entre la simbiosis micorrizógena y los rizobios se ha centrado en los beneficios que otorga a la planta (Kaschuk et al. 2010; Larimer et al. 2014), pero pocos son los estudios enfocados en la interacción entre ambos microorganismos simbiontes en el mismo hospedero (Afkhami et al. 2021). Por lo tanto, este trabajo doctoral se enfocó en la interacción de los simbiontes, no solo de manera individual, sino también sinérgica en la rizosfera *Phaseolus vulgaris* L., una planta modelo (Bitocchi et al. 2017), ampliamente estudiada, y esencial en la alimentación mexicana(Alcázar-Valle et al. 2021), incluyendo la presencia de una vitamina (B2) secretada tanto por la planta como por los rizobios. La información sobre los mecanismos y efectos de esta interacción coadyuva a mejorar el entendimiento sobre el papel de las especies de manera individual, sus ciclos de vida, control, sobrevivencia y eficiencia.

La presente tesis doctoral se encuentra organizada por capítulos que contienen los artículos publicados. En el Capítulo I se introducen a los hongos micorrizógenos arbusculares, las rizobacterias fijadoras de nitrógeno, su interacción tripartita con su hospedero, las vitaminas del grupo B, así como los posibles mecanismos relacionados en la simbiosis con rizobios. En el Capítulo II, se documentó cómo las concentraciones de la vitamina B2 afectan la simbiosis micorrizógena arbuscular en *P. vulgaris*, en coinoculación con *R. tropici* CIAT 899 Martínez-Romero (Rhizobiaceae) . En el Capítulo III se aborda el efecto de la vitamina B9 sobre la simbiosis micorrizógena arbuscular en *P. vulgaris*. Finalmente, se presenta, una discusión integral, basada en los principales hallazgos apartados por esta tesis, una sección de conclusiones, y de las perspectivas que deja este trabajo.

2. Marco teórico

Fijación de nitrógeno

Las plantas requieren nutrientes esenciales para su crecimiento y supervivencia. El nitrógeno (N) es un elemento utilizado en la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y otros compuestos esenciales (Sun et al. 2020). La mayoría de las plantas no pueden utilizar el nitrógeno atmosférico (N_2) de manera directa; por lo tanto, necesitan de la fijación de nitrógeno, un proceso por el cual el N se convierte en una forma utilizable por medio de la acción de algunos procariontes (Boyd y Peters 2013).

La fijación de nitrógeno es un proceso por el cual el N_2 se reduce en una forma utilizable a amonio (NH_4^+). Este proceso lo realizan bacterias o arqueas fijadoras de nitrógeno y puede ser una fijación simbiótica o asimbiótica (Franche et al. 2009). Las bacterias conocidas colectivamente como "rizobios", viven en el suelo y forman relaciones simbióticas con las plantas de la familia Fabaceae. Las bacterias fijadoras de nitrógeno están clasificadas en dos grupos: aquéllas de vida libre y los simbiontes (Smercina et al. 2019). Las bacterias de vida libre, como *Azotobacter* Beijerinck 1901 (Pseudomonadaceae), y *Azospirillum* Tarrand (Azospirillaceae), viven de manera independiente en el suelo (Steenhoudt y Vanderleyden 2000; Wani et al. 2016).

Fijación simbiótica de nitrógeno

Los rizobios que forman asociaciones simbióticas en las raíces de leguminosas, forman nódulos que son estructuras especializadas dónde se lleva a cabo la fijación de nitrógeno (Ferguson et al. 2010; Mus et al. 2016). Dependiendo de la planta, los nódulos formados

pueden ser indeterminados, con un meristemo apical, o determinados, con una expansión de las células infectadas de la zona central del nódulo (Cuadro 1) (Ferguson et al. 2010).

Cuadro 1. Principales diferencias de los nódulos determinados e indeterminados de leguminosas en simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno.

	Indeterminados	**Determinados**
División celular	**Córtex interno de la raíz adyacente al xilema**	**Córtex externo o medio adyacente al xilema**
Tipo de meristemo	**persistente**	**no persistente**
Forma del nódulo	**Cilíndrico/ramificado**	**Esférico**
Hilo de infección	**Amplio**	**Angosto**
Células infectadas	**Altamente vacuoladas**	**Vacuolas mínimas**
Forma principal del bacteroide	**Alargado, viabilidad baja, una por simbiosoma**	**Tipo bacilo, viabilidad alta, múltiples por simbiosoma**
Región geográfica de la planta	**Región templada**	**Región tropical y subtropical**
Ejemplos de hospederos	***Medicago truncatula* (Gartner), *Trifolium* spp. (L.), *Pisum sativum* (L.)**	***Glycine max* (L.) Merr., *Phaseolus vulgaris* (L.) y *Lotus japonicus* (Regel) K. Larsen**

Modificado de Ferguson et al. (2010)

Una vez dentro de la raíz, los rizobios se diferencian en bacteroides englobados en la célula vegetal, formando un simbiosoma, donde pueden reducir el N (Becker 2017).

Desarrollo del nódulo

La simbiosis de rizobios con las leguminosas, depende de la especificidad, infectividad y efectividad de los rizobios. Todo esto es resultado de la expresión de diferentes moléculas

en la bacteria, la planta huésped o en ambos. Flavonoides específicos, liberados por las raíces de las plantas, sirven como moléculas que atraen a los rizobios, pero, también, activan la expresión de los genes *nod* (Mathesius 2020), responsables de la síntesis de los factores nod, lipo-quito-oligosacáridos que inducen en la planta la formación de los nódulos (Oldroyd 2013).

Después de este reconocimiento, se intercambian varias moléculas involucradas en la infección de las bacterias en las raíces (Van Damme et al. 2004). Una vez que la bacteria entra a la planta, se transforma en bacteroide, iniciando un proceso de endorreduplicación (González-Sama et al. 2006) de material genético necesario para la simbiosis; aunque, también, reduce la expresión de genes de biosíntesis de aminoácidos en el bacteroide (Prell et al. 2009; Carter y Tegeder 2016). Durante este proceso, la bacteria expresa, principalmente, la enzima nitrogenasa, encargada de la fijación de nitrógeno (Hoffman et al. 2014). Por su parte, la planta produce leghemoglobina que protege a la nitrogenasa del oxígeno (O_2), pero provee de O_2 a los bacteroides aerobios (Ramírez et al. 1999). Otras moléculas son clave durante la nodulación y son usadas durante el desarrollo de la planta o las interacciones bióticas, como las fitohormonas (Buhian y Bensmihen 2018; Lin et al. 2020) y algunas vitaminas (Cowles et al. 1969; Matamoros et al. 2006), como la riboflavina y el lumicromo (Dakora et al. 2015), tiamina (Yin et al. 2019), vitamina C (Kamran et al. 2023), entre otras.

Translocación de nitrógeno fijado

En los bacteroides, el N_2, fijado en forma de NH_4^+, es transportado a través de la membrana del simbiosoma hacia la célula infectada del hospedero para su reducción a glutamina y asparagina (Lodwig et al. 2003). Con base en la composición del xilema de las

leguminosas, asociadas a bacterias fijadoras de nitrógeno, las leguminosas pueden clasificarse como exportadoras de amidas o ureídos. Las amidas son la forma de N dominante en leguminosas con nódulos indeterminados (Carvalho et al. 2003); mientras que, en nódulos determinados, el N es exportado como ureídos (Atkins and Pate 1982; Atkins and Smith 2000; Baral et al. 2016).

En plantas con translocación de N por ureídos, el contenido de ureídos se correlaciona con la fijación simbiótica de N (Sanyal et al. 2018), esto significa que la disponibilidad de precursores utilizados en la ruta de biosíntesis, influyen en la fijación simbiótica de N. Por ejemplo, Reynolds et al. (1982) y Atkins et al. (1997) observaron que la tasa de síntesis *de novo* de sustratos de purinas, determinaba su contribución a la biosíntesis de ureídos y, posiblemente, a la fijación simbiótica de N. Atkins et al. (1988) utilizó alopurinol para bloquear la biosíntesis de purinas en frijol, en simbiosis con rizobacterias, donde el N fijado no era asimilado, ni siquiera como asparagina (Asn). De hecho, varios compuestos nitrogenados (Yamashita et al. 2019), transportadores (Carter y Tegeder 2016), ARNi (Collier y Tegeder 2012) y enzimas ligadas a la síntesis de ureídos (Le Deunff et al. 2019), tienen influencia en la fijación simbiótica de N (Schwember et al. 2019). Estos experimentos pusieron en evidencia que muchos de los metabolitos relacionados con esta ruta, influyen en la asimilación simbiótica de N y, por lo tanto, podrían ser cruciales en el establecimiento y funcionalidad de la simbiosis.

Mientras que la fijación de N es esencial para el crecimiento de las plantas, no es el único proceso simbiótico involucrado en la obtención de nutrientes esenciales. Por ejemplo, otro proceso simbiótico importante es el que ocurre entre las plantas y los hongos micorrizógenos.

Hongos micorrizógenos

El término micorriza proviene de las palabras griegas “mykos” para hongo y “rhiza” para raíz, y describe la asociación entre las raíces de plantas y hongos simbiontes (Smith and Read 2010). Esta interacción permite la obtención de carbono (C) desde la planta hacia el hongo, y algunos nutrientes del hongo hacia la planta (Bonfante y Anca 2009; Koller et al. 2013).

Tipos de asociación micorrizógena

Existen cuatro tipos de micorrizas y se han descrito basados en sus estructuras y funciones: micorrizas orquidiales, ericoides, ecto y endomicorrizas o micorrizas arbusculares (van der Heijden et al. 2015). Una característica común entre todos los tipos de simbiosis micorrizógena es que los hongos colonizan dos ambientes, las raíces de las plantas (excepcionalmente los rizoides de las briofitas) y el suelo o sustrato circundante, interconectando estos hábitats por medio de las hifas (Jansa y Gryndler 2010). Tradicionalmente, la investigación se ha enfocado en dos tipos de hongos micorrizógenos, las micorrizas arbusculares y las ectomicorrizas (Finlay 2004).

Hongos micorrizógenos arbusculares (HMA)

Los hongos micorrizógenos arbusculares son organismos diversos con 350 especies descritas (Wijayawardene et al. 2020). Estos hongos son ampliamente utilizados en la agricultura (Neuenkamp et al. 2018), pues su presencia puede influir de manera directa al hospedero y de manera indirecta la diversidad y composición de comunidades vegetales (Klironomos et al. 2011). La identidad de la planta hospedera y su abundancia pueden influir

en la composición de comunidades de estos hongos (Davison et al. 2016); además, las plantas prefieren colocar su C en aquellos simbiontes que les provean un mayor beneficio (Ji y Bever 2016). Esto sugiere que, a pesar de que se perciba a estos hongos como generalistas, el ensamble entre plantas y comunidades de hongos micorrizógenos está relacionado, ya sea con comunidades que exhiben cambios correlacionados a lo largo de gradientes ambientales o durante la sucesión (Neuenkamp et al. 2018).

La eficiencia de una especie de HMA con el hospedero se puede observar cuando se inocula en distintos hospederos. Por ejemplo, la inoculación de *Rhizophagus intraradices* (N.C. Schenck & G.S. Sm.) C. Walker & A. Schüßle en cuatro especies vegetales (*Salvia officinalis* L. (Lamiaceae), *Lavandula dentata* L.(Lamiaceae), *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae) y *Santolina chamaecyparissus* L.(Asteraceae) mostró efectos diferenciales en el crecimiento vegetal; es decir, la respuesta al mismo inoculante es diferencial dependiendo de la especie vegetal (Rodríguez-Caballero et al. 2017). La inoculación con *R. intraradices* tuvo un incremento de 59 % en hoja y 172 % en raíz, más en el peso seco de *S. officinalis*; mientras que con *L. dentata* fue de 100 y 270 %, respectivamente (Rodríguez-Caballero et al. 2017). Este tipo de estudios demuestran que las especies vegetales responden diferencialmente a una misma especie de HMA, por lo que es relevante conocer la especie de HMA que se adecúe a la especie vegetal.

La asociación requiere de cambios en las raíces de las plantas, con modificaciones estructurales y funcionales. Durante el establecimiento de la simbiosis, los procesos son altamente regulados por ambos individuos. Cada paso requiere de la formación de nuevas estructuras, cuyas funciones finales determinarán el desarrollo y eficiencia de la asociación (Ho-Plágaro y García-Garrido 2022).

Hifas

Las primeras estructuras en desarrollarse son las hifas que conforman el talo del hongo. De manera general, las hifas de los HMA penetran en la epidermis de la planta, formando puntos de entrada en las células epidérmicas o hipodérmicas. Los puntos de entrada de las raíces difieren entre especies de hongos. Las hifas de las especies de *Glomus* forman estructuras del tipo apresorio en la superficie, antes de penetrar las raíces; mientras que *Scutelospora calaspora* (Nicolson y Gerdemann) C. Walker y F.E. Sanders y *Gigaspora margarita* W.N. Becker y I.R. Hall pueden penetrar de manera directa (Dickson 2004).

La mayoría de las plantas en simbiosis poseen una hifósfera, que es una zona que rodea a las hifas de los HMA, la cual se extiende más allá de la rizósfera. Esta zona tiene un papel relevante en la nutrición, adquisición de agua, agregación del suelo, secuestro de C e interacción con microorganismos. Una de las razones por la cual la hifósfera se distingue de la rizósfera es el diámetro de las hifas micorrizógenas (2–10 μm) que es dos órdenes de magnitud menor que las raíces más finas (0.2 mm o menos); por lo tanto, la densidad longitudinal de las hifas en el suelo (excediendo 10^8 m/m^3) es mucho mayor a la de las raíces (*ca.* 10^4 m/m^3) (Miller et al. 1995; Allen 2007). Esta característica permite que las hifas de los HMA tengan distintas propiedades que son comparadas en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Propiedades, procesos y funciones ecológicas de las hifas de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) contrastadas con las de las raíces de plantas.

Propiedades	**Raíz/rizósfera**	**Hifas/hifósfera**	**Referencias**
Morfológicas	**Diámetro de raíces finas menor a 0.2 mm (*ca.* 10^4 m/m^3 en densidad longitudinal)**	**Diámetro hifal de 2-10 μm**	**(Miller et al. 1995; Allen 2007)**

Zona efectiva	**0-4 mm de la superficie radical de la raíz**	**0-2 mm de la superficie hifal y extendiéndose hasta 120 mm**	**(Li et al. 1991a, b, c; Gai et al. 2015; Kuzyakov y Razavi 2019)**
Físicas	**Penetración y distribución de bioporos en el suelo** **Flujo de agua y empuje hidráulico** **Penetración en rocas**	**Entramado hifal** **Formación de agregados del suelo** **Flujo de agua y empuje hidráulico hifal** **Red micorrizógena común mediada por la redistribución de agua obtenida por las raíces** **Estabilización de carbono (C) en el suelo** **Ruta para el desplazamiento de bacterias**	**(Barea y Jefferies 1995; Egerton-Warburton et al. 2008; Thorley et al. 2015; Verbruggen et al. 2016; Jiang et al. 2021)**
Químicas	**Cambios en pH o/y Eh** **Agotamiento y movilización de nutrientes** **Absorción mineral**	**Absorción y transporte de nutrientes: Nitrógeno (N, NO_3^-, NH_4^+, aminoácidos) desde el suelo. ortofosfatos (P)**	**(Jin et al. 2005; Bonfante y Genre 2010; Ding et al. 2011; Whiteside et al. 2012)**
Biológicas	**Deposición de ácidos orgánicos que sirven de substrato a las bacterias en la micorrizósfera** **Señalización,** **Priming y actividad fosfatasa,**	**Deposición de carbono (C) en exudados hifales**	**(Bharadwaj et al. 2012; Cavagnaro et al. 2015; Paterson et al. 2016; Hao et al. 2021)**

	Estructura e interacción con su microbioma

Modificado de (Wang et al. 2022)

Las hifas intrarradicales tienen un rol distinto a las extrarradicales, pues están rodeadas de células vegetales y están en un ambiente más estable y homogéneo (Jansa y Gryndler 2010). Por otro lado, las hifas extrarradicales producen muchas ramificaciones, con lo que pueden incrementar la superficie efectiva de contacto con el suelo (Lanfranco et al. 2018). Esto provee una zona activa para el intercambio físico, químico y biológico (Cuadro 2).

Arbúsculos

Los arbúsculos son estructuras de hífas ramificadas en donde se transfieren nutrientes entre la planta y el hongo a nivel celular. En el caso de las plantas, estas suelen recibir fósforo (P), y los hongos reciben carbohidratos, aunque también, pueden recibir ácidos grasos de la planta (Keymer et al.). Dado que no se han localizado genes de síntesis de ácidos grasos, se consideran a los HMA como auxótrofos de ácidos grasos (Wewer et al. 2014). Experimentos donde se inducen distintos genes de biosíntesis de ácidos grasos, muestran que estos son requeridos para la simbiosis (Bravo *et al.* 2017). Una expresión heteróloga de acyl ACP tioesterasa (específica para el ácido graso C12:O), en *Medicago truncatula* (Gärtner) con HMA, muestran que la acumulación de este compuesto se da en los hongos (Wang et al. 2017; Jiang *et al.*, 2017).

El desarrollo de arbúsculos está asociado con cambios extremos en la estructura y función celular; una célula cortical, que predominantemente está ocupada por una vacuola y tiene un

rol estructural en las raíces, se reprograma durante la estimulación simbiótica (Harrison 2012). Al penetrar el hongo en las células, se pueden formar dos patrones morfológicos llamados *Arum* o *Paris* (Dickson 2004), que dependen de la combinación de la planta como del HMA (Bonfante y Genre 2008).

La mayoría de las plantas presentan una colonización micorrizógena tipo *Arum*, que se caracteriza por la expansión de las estructuras hifales dentro de las raíces del huésped. Estas forman estructuras conocidas como arbúsculos, con apariencia de pequeños árboles dentro de las células colonizadas, las cuales se expanden empujando la membrana plasmática sin penetrarla (Brundrett 2004). Por otro lado, la colonización micorrizógena tipo *París* es común en árboles y hierbas forestales, y se distingue por la formación de pelotones e hifas enroscadas dentro de las células (Dickson 2004).

Interacción entre distintas especies HMA

Usualmente, el sistema radical de una sola planta está colonizado por una diversidad de especies de HMA de manera simultánea, formando redes comunes de hifas continuas en el sistema planta-suelo. van der Heijden et al. (1998) sugieren que la diversidad de HMA puede incrementar la biodiversidad de las comunidades vegetales, así como su productividad. Distintas especies de HMA muestran una capacidad diversa de respuesta en la planta y los organismos con los que interactúa (Zhou et al. 2020). La especie vegetal tiene fuerte influencia en las comunidades bacterianas presentes en la rizósfera (Emmett et al. 2021); aunque, los mecanismos de selección todavía no son claros.

En el caso de mezclas de HMA, la combinación de distintas especies se utiliza con frecuencia para incrementar sus efectos benéficos (Yooyongwech et al. 2023); por ejemplo,

la combinación de *Funneliformis* (Schüßler y Walker) con especies de *Acaulospora* (Gerd. Trappe) incrementó significativamente la adaptabilidad fisiológica y bioquímica de *Sorghum bicolor* (Mönch) (Poaceae)1 durante sequía (Neumann y George 2004). De igual manera, una inoculación con 25 especies de HMA, de 4 géneros, que incluyen *Funneliformis*, *Acaulospora*, *Gigaspora* (Gerd. y Trappe) y *Scutellospora* (Walker y Sanders), resultó en un incremento en el desarrollo vegetal (Yooyongwech et al. 2013).

En otros estudios, la coinoculación de seis especies nativas distintas de HMA en *Metrosideros laurifolia* (Brongn. y Gris) (Myrtaceae), inducen un incremento en el crecimiento vegetal, mayor tolerancia al estrés por metales pesados y a deficiencias de nutrición mineral, mayor cociente Ca/Mg, en comparación con inóculos comerciales con una sola especie (Crossay et al. 2019).

La selección específica de especies de HMA y sus combinaciones puede contribuir a una asociación eficiente en el uso de HMA. En *Oryza sativa* L. (Poaceae), el uso individual y en distintas combinaciones de *Funneliformis mosseae* (T.H. Nicolson y Gerd.) (BEG12), *Acaulospora laevis* (Gerd. y Trappe) (BEG13), y *Gigaspora margarita* (Becker y Hall) (BEG34), mostró que sólo la combinación de *A. laevis* y *G. margarita* incrementaba el rendimiento de *O. sativa* entre 125 y 145%; mientras que la inoculación individual, mostraba un incremento, significativamente, menor. Estudios como los anteriormente citados, revelan que la investigación específica de la combinación adecuada de especies de HMA es vital para la toma de decisiones en los productos y especies utilizadas para inocular.

Interacción con otros microorganismos

Los HMA y las plantas interactúan con las comunidades microbianas del suelo contiguo (Rodríguez-Caballero et al. 2017), en parte, por la cantidad y la fuente de C que la planta hospedera ingresa al suelo (De Gruyter et al. 2022).

El grupo de las leguminosas tiene la capacidad de interactuar, simultáneamente, con dos simbiontes, los HMA y los rizobios; ambos interactúan con la misma planta, formando estructuras especializadas en las raíces y son mantenidas por la energía proporcionada por la planta a sus raíces (Javaid 2010). Durante esta interacción, ambos simbiontes pueden afectarse mutuamente (Tsikou et al. 2023); aunque, puede depender de la combinación y las especies de simbiontes involucradas (Kavadia et al. 2021).

Interacción hongos micorrizógenos arbusculares (HMA)-bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN)

La interacción entre rizobios y HMA es común, ya que estas relaciones simbióticas no solo comparten espacio y hospederos. Muchos componentes moleculares involucrados en las rutas de señalización de leguminosas y rizobios también son esenciales para la colonización de las raíces por parte de los HMA (Tsikou et al. 2023). Por ejemplo, las moléculas de señalización de rizobios son casi idénticas a las moléculas de señalización micorrízicas: cadenas cortas de quitina con una cola lipídica, lipoquitooligosacáridos (LCO) (Harris et al. 2020). Este fenómeno se conoce como la ruta común simbiótica (Oldroyd et al. 2009). Aunque existen estudios de la interacción tripartita, los aspectos que influyen en la efectividad de cada simbionte sobre el otro, no son claros (Tsikou et al. 2023).

En leguminosas, se tiene evidencia directa de que las plantas micorrizadas incrementan la nodulación (Kaschuk et al. 2010). Por su parte, las bacterias parecen representar un tercer

componente en las asociaciones micorrizógenas y pueden jugar un papel relevante en sus funciones (Bonfante y Anca 2009). Existen varios mecanismos que están involucrados en la promoción y el crecimiento de las leguminosas con la inoculación compuesta de HMA y bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN).

Mecanismos de interacción entre simbiontes

En la simbiosis con BFN, existen moléculas producidas por rizobios que son importantes para el establecimiento de la simbiosis (factores Nod). Aunque su función primaria es iniciar la formación de nódulos, también tienen un impacto en la micorrización (Oláh et al. 2005). Los factores Nod son reconocidos por receptores específicos en las raíces de las plantas, lo que activa las rutas de señalización para promover la formación de nódulos (Buhian y Bensmihen 2018). Estas rutas involucran los genes DMI1/DMI2, que también están involucrados en el proceso de micorrización (Oláh et al. 2005). Se ha demostrado que, incluso, en bajas concentraciones (10-7 nM) de factores Nod, la colonización micorrizógena se incrementa en las raíces tanto noduladas como no noduladas (Xie et al. 1995), lo cual sugiere que este metabolito comparte una ruta metabólica de respuesta de la planta en el establecimiento de la simbiosis por HMA (Parniske 2008).

También, se tiene registro de que los rizobios pueden afectar la germinación de esporas micorrizógenas arbusculares y el crecimiento micelial (Artursson et al. 2006), en parte debido a factores Nod (Nagae et al. 2016a). De igual manera los HMA secretan lipoquitooliosacáridos (factores Myc), que promueven la formación de nódulos radicales de rizobacterias (Nuccio et al. 2013) e incrementan la expresión de genes de nodulación de los rizobios (Backer et al. 2018) Por ejemplo, la inoculación con *Rhizophagus irregularis*

(Błaszk., Wubet, Renker & Buscot) C. Walker & A. Schüßler modifica la estructura microbiana en la rizósfera, creando un ambiente favorable para *Rhizobium* (Vestergård et al. 2008; Mechri et al. 2014); aunque, este efecto, también, depende del hospedero (Söderberg et al. 2002).

Distintas especies de rizobios sintetizan una variedad de metabolitos para su crecimiento celular, entre los que destacan las vitaminas del grupo B, como la tiamina, niacina, biotina y riboflavina, entre otros (Dakora et al. 2015). El efecto de estas vitaminas en el desarrollo de la planta se conoce desde hace más de 30 años, pero no se conoce el efecto directo de estas moléculas en la simbiosis micorrizógena. Al interactuar los HMA con los rizobios, es probable que estas moléculas influyan en la interacción entre estos grupos de microorganismos y su relación con la planta hospedera.

Presencia de vitaminas en la interacción HMA-BFN

Las vitaminas son esenciales para el crecimiento de los organismos y se conocen, por lo menos, 30 diferentes compuestos considerados como vitaminas, de las cuales 20 son consideradas necesarias para la salud humana (Wang et al. 2021). Estas vitaminas pueden ser solubles en grasas o en agua. Muchas plantas y microorganismos los pueden sintetizar de manera natural; mientras que los animales necesitan adquirir estas vitaminas a través de su dieta o suplementos (Li et al. 2021; Wang et al. 2021). Entre estas vitaminas, las del complejo B, se sabe que son esenciales en numerosos procesos metabólicos, pues, además de sus papeles como cofactores de enzimas, tienen funciones distintivas en las plantas y en los microorganismos (Roje 2007).

Vitaminas del grupo B

Las vitaminas del grupo B juegan un papel importante en la formación de la simbiosis entre las raíces de las plantas con microorganismos, ya que tienen influencia en distintos aspectos del desarrollo de los individuos, interacción, establecimiento y funcionamiento en general. Los roles específicos de cada vitamina en la simbiosis con estos microrganismos se pueden categorizar en varios puntos clave:

a) *Crecimiento y desarrollo***.** Promueven el crecimiento y desarrollo tanto para las plantas como de sus simbiontes. Ambos, producen nutrientes esenciales que son requeridos para procesos celulares y actividades metabólicas involucrados en su crecimiento. Por ejemplo, la tiamina o vitamina B1 es necesaria para el desarrollo de las raíces y, en general, promueve el crecimiento de las plantas (Muthukrishnan et al. 2019).

b) *Procesos metabólicos.* Las vitaminas actúan como coenzimas y cofactores para distintos procesos metabólicos, influyendo en la biosíntesis de compuestos esenciales. Por ejemplo, la riboflavina es necesaria para el transporte de electrones y la producción de energía (Sepúlveda Cisternas et al. 2018); mientras que la piridoxina se utiliza para la biosíntesis de aminoácidos y hormonas (Parra et al. 2018). Ambos procesos permiten a los microorganismos y las plantas metabolizar su energía química, así como construir las biomoléculas necesarias para el crecimiento, comunicación celular y defensas.

c) *Moléculas de señalización.* Algunas vitaminas tienen el papel de comunicación entre plantas y sus simbiontes (Dakora et al. 2015). Por ejemplo, la forma activa de la tiamina pirofosfato, actúa como una molécula de señalización involucrada en las respuestas de la defensa en el establecimiento de asociaciones mutualistas (Ahn et al. 2005). Estas funciones son importantes para coordinar las interacciones simbióticas y modular las respuestas de ambos organismos.

d) *Intercambio de nutrientes y funciones simbióticas.* Las vitaminas contribuyen al funcionamiento de la fijación simbiótica de nitrógeno, ya que proveen los cofactores necesarios para la fijación de nitrógeno (Dakora et al. 2015).

En plantas, los primeros estudios de la biosíntesis de vitaminas B se enfocaron en la tiamina y niacina, entre 1930 y 1940; sin embargo, hoy se reconocen más funciones en plantas (Roje 2007).

Las rutas de biosíntesis del ácido pantoténico, piridoxal, riboflavina, biotina y folatos en plantas han sido ampliamente estudiadas, ya que se conoce a la mayoría de los intermediarios, enzimas y genes involucrados (Roje 2007). Sin embargo, pocos son los estudios que involucran el estudio de estas vitaminas durante la simbiosis entre microorganismos y la planta.

Se conocen las rutas y genes involucrados en la biosíntesis de estas vitaminas en bacterias simbiontes, pero, para el caso de los HMA, estos carecen de dichas rutas, sobre todo de las vitaminas B1, B6, B7 y B9 (Figura 1) (Kobayashi et al. 2018; Morin et al. 2019; Venice et al. 2020). Esta carencia puede explicar, en parte, la dependencia simbiótica de los HMA con sus hospederos vegetales, ya que requieren que las plantas, u otros organismos, les proporcionen estas vitaminas (Genre et al. 2020). Los HMA son microorganismos muy difíciles de cultivar de manera axénica y en condiciones *in vitro* (Fortin et al. 2005), lo que está relacionado con la dependencia auxotrófica de la simbiosis. El crecimiento de HMA se cree, entonces, que depende de muchos compuestos adicionales que van más allá de carbohidratos y lípidos proporcionados por el hospedero, por lo que este podría ser el caso de las vitaminas.

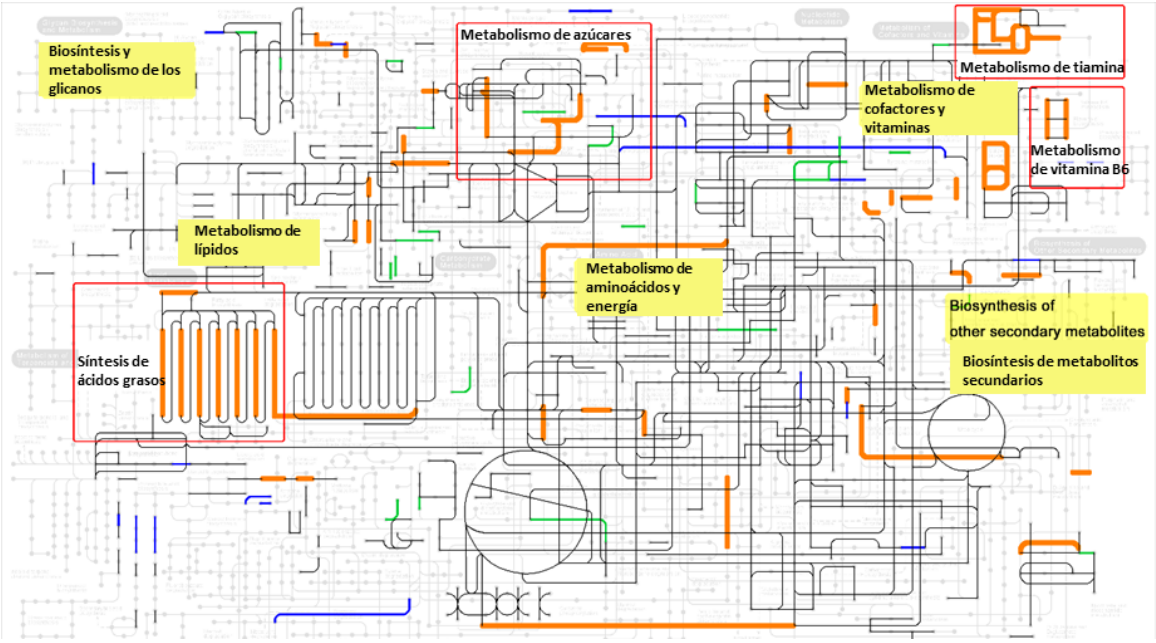


Figura 1. Rutas de biosíntesis de vitaminas del grupo B faltantes en dos especies de *Rhizophagus* (T.H. Nicolson y N.C. Shenck). Las líneas naranjas indican rutas enzimáticas cuyos genes están ausentes en *Rhizophagus clarus* (T.H. Nicolson y N.C. Schenck) C. Walker y A. Schüßler y *Rhizophagus irregularis* (Błaszk., Wubet, Renker y Buscot) C. Walker y A. Schüßler pero presentes en *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen. Las líneas negras indican rutas enzimáticas cuyos genes están presentes en *R. clarus* y *R. irregularis*. Las líneas verdes y azules indican rutas enzimáticas cuyos genes están presentes en *R. clarus* o *R. irregularisi*, respectivamente (Kobayashi et al. 2018).

Cada vitamina tiene una función particular en las plantas y en los microorganismos (Cuadro 3), pero, durante la simbiosis, éstas podrían ser o no determinantes en la eficiencia y el éxito de la interacción biótica.

Cuadro 3. Funciones de las principales vitaminas del grupo B en las plantas y su relación con microorganismos asociados.

Vitamina	**Función**	**Referencias**
Tiamina (B1)	Cofactor en el metabolismo celular/crecimiento de nódulos	Nagae et al. (2016b)
	Síntesis de hormonas vegetales	Ahn et al. (2005); Suohui et al. (2022); Sadak (2023)
	Reacciones de defensa de la planta	Fitzpatrick y Chapman (2020)
	Promoción de crecimiento en las plantas y raíces	Muthukrishnan et al. (2019); Jabeen et al.(2022)
	Formación de esporas de HMA	(Nagae et al. 2016b)
	Colonización y producción de nódulos de rizobios	Marek-Kozaczuk y Skorupska (2001); Nagae et al. (2016a)
	Promoción del crecimiento hifal	Abeysinghe et al. (2020)
Riboflavina (B2)	Cofactor en el metabolismo celular	Walsh y Wencewicz (2013)
	Reacciones de defensa de la planta	Nie y Xu (2016)
	Promoción de crecimiento de la planta y división celular	Phillips et al. (1999); Pholo et al. (2018); Tian et al. (2022)
	Reducción de estrés por salinidad	Jiadkong et al. (2023)
	Quorum-sensing (señalizacion de quorum) en bacterias/molécula señal	Rajamani et al. (2008)
	Nodulación efectiva/simbiosis	Schwinghamer (1970); Gouws et al. (2012)
Niacina (B3)	Tolerancia al estrés Crecimiento de la planta	Vendruscolo et al. (2019)
	Reducción de estrés salino	Pradi-Vendruscolo y Seleguini (2020)
	Desarrollo y producción de nódulos	Marek-Kozaczuk y Skorupska (2001)

Ácido pantoténico (B5)	Cofactor en el metabolismo celular	White et al. (2001)
Piridoxina (B6)	Cofactor en el metabolismo celular	
	Reacciones de defensa de la planta	Zhu et al. (2018)
	Promoción de crecimiento vegetal	
	Involucrado en la fijación simbiótica de nitrógeno	Taga y Walker (2010)
Biotina (B7)	Cofactor en el metabolismo celular	Sirithanakorn y Cronan (2021)
	Quórum-sensing en bacterias/molécula señal	
	Reducción de estrés en plantas	Wang et al. (2020)
	Inducción de raíces laterales	Ruiz-Herrera et al. (2019)
	Crecimiento celular bacteriano	Watson et al. (2001)
Folatos (B9)	Biosíntesis de purinas en nódulos bacterianos	Zrenner et al. (2006)
Cobalamina (B12)	Cofactor en el metabolismo celular	
	Cofactor involucrado en la fijación simbiótica de nitrógeno	Taga y Walker (2010)

Modificado de Palacios et al. (2014)

Tiamina (B1)

La tiamina es esencial para el desarrollo de todos los organismos vivos. En el caso de las plantas, se requiere para su crecimiento (Goyer 2010). En microorganismos simbiontes, su función es variada; por ejemplo, los HMA carecen de muchas de las rutas de biosíntesis de vitaminas, como la B1 (Tisserant et al. 2013; Nagae et al. 2016b), por lo que esta vitamina la reciben de la planta para sus funciones vitales o de reproducción. En nódulos de *Lotus japonicus* (Regel), la adición externa de tiamina incrementa su diámetro; aunque, en la simbiosis micorrizógena arbuscular (MA) no se aprecia un incremento en la colonización

(Nagae et al. 2016a). A pesar de esto, en esporas de HMA la acumulación de esta vitamina es considerable, a diferencia de las concentraciones registradas en raíces (Nagae et al. 2016b), sugiriendo que los HMA absorben activamente tiamina de su hospedero durante la simbiosis.

La falta de la ruta biosintética de la tiamina en HMA, la cual es esencial, por ejemplo, para la infección de otros hongos como los tizones (Sohn et al. 2000), sugiere que esta vitamina puede ser fundamental para la interacción de los HMA con las raíces de las plantas (Kobayashi et al. 2018).

Riboflavina (B2)

Se tiene registro de que las bacterias que colonizan las raíces de sus hospederos exudan riboflavina, una biomolécula que desempeña un papel crucial en las relaciones mutualistas entre las plantas y las bacterias (García-Angulo 2017). En un análisis comparativo de genomas mediante el paquete get_homologes (Contreras-Moreira and Vinuesa 2013) de 33 especies del género *Rhizobium*, se encontró que las 33 especies analizadas cuentan con los genes necesarios para su biosíntesis (Anexo 1) (García-Angulo 2017), los cuales son: *ribAB* (GTP ciclohidrolasa II/ 3,4-dihidroxi-2-butanona-4-fosfato sintasa), *RibD* (Pirimidina deaminasa/reductasa), *ribE* (Riboflavina sintasa), *ribH* (6,7 dimetil 8-ribityllumazine sintasa).

La riboflavina, también conocida como vitamina B2, juega un papel crítico en el metabolismo de los organismos vivos, ya que es necesaria para la biosíntesis de flavin adenina dinucleótido (FAD) y flavin mononucleótido (FMN), que son cofactores implicados en las reacciones redox de las células. Las bacterias simbiontes fijadoras de nitrógeno (BFN) requieren de esta vitamina para su crecimiento y para llevar a cabo la fijación de nitrógeno.

La biosíntesis de FAD y de FMN en las BFN es catalizado por las enzimas riboflavina sintasa y FMN sintasa, respectivamente (Moreno et al. 2022). Estas enzimas utilizan la vitamina B2 como sustrato para su actividad y su deficiencia puede limitar la biosíntesis de estos cofactores (Abbas y Sibirny 2011), produciendo, al mismo tiempo, un crecimiento reducido bacteriano y, por ende, una menor fijación simbiótica de N (Gouws et al. 2012).

Se han detectado altas concentraciones de flavinas, principalmente riboflavina (80%) y flavin mononucleótido (20%), en el espacio peribacteroidal de *Bradyrhizobium diazoefficiens* (Delamuta) en la soya, independientemente de si los nódulos son efectivos o no. Esta acumulación de flavinas no está presente en raíces no infectadas ni en rizobios de vida libre, lo que indica que la acumulación de esta vitamina es el resultado de la interacción simbiótica (Fehling et al. 1992).

Yurgel et al. (2014 a, b) encontraron que *Ensifer meliloti* (Dangeard, synonym *Sinorhizobium meliloti*) contiene dos rutas biosintéticas de riboflavina paralelas, una para el metabolismo interno y otra para exportación (Yurgel et al. 2014). Al ser una molécula grande, la explicación de esta redundancia puede radicar en la dificultad de transportar esta molécula a través de la membrana (Jin et al. 2017).

Estudios anteriores han demostrado el papel de la riboflavina en las BFN y su importancia en la fijación simbiótica de N. Por ejemplo, un estudio realizado por Yurgel et al. (2014) demostró que la riboflavina es necesaria para establecer simbiosis efectiva con el hospedero, pues una baja concentración afecta la colonización y nodulación de las raíces. En otro estudio, *E. meliloti* (Dangeard), con una copia extra del gen *ribBA* para la biosíntesis de riboflavina, fue 55% más eficiente en colonizar las raíces de alfalfa al formar nódulos (Yang et al. 2002).

Un derivado de la riboflavina, el lumicromo, incrementa la acumulación de almidón en soya y tomate, al incrementar transcritos de gliceraldeido-3-fosfato deshidrogenasa (Gouws et al. 2012). Además, el lumicromo puede reducir los niveles de expresión génica de la ACC oxidasa en plantas, una enzima para la síntesis de etileno, reduciendo, por lo tanto, la producción de etileno y, por ende, la formación de nódulos simbióticos en las raíces (Gouws et al. 2012).

Las rizobacterias no sólo sintetizan la vitamina B2, sino que también se tiene registro de que puede transportarla a través de sus membrana y pared celular (Phillips et al., 1999). Se tienen identificados distintos genes que expresan transportadores de esta vitamina, como el RibU (Duurkens et al., 2007), RibN (Garcia-Angulo et al., 2013), RibM (Hemberger et al., 2011), RfuABCD (Deka et al., 2013), RfnT (Vitreschak et al. 2002; Gutiérrez-,Preciado et al. 2015), RibXY (Sun et al., 2013), ImpX (Vitreschak et al., 2002) y RibZ (Gutiérrez-Preciado et al., 2015). Estos transportadores pueden servirle a las rizobacterias para interactuar con el entorno rizosférico.

En las plantas, esta vitamina puede incrementar la respiración en las raíces incrementando la concentración de CO_2 en la rizósfera (Lowe y Evans 1962). Un incremento de CO_2 en la rizósfera a causa de esta vitamina, puede, también, estimular el crecimiento de los HMA (Bécard y Piché 1989); aunque, evidencia directa de este efecto no ha sido documentada.

Piridoxina (B6)

Rhizobium puede sintetizar la vitamina B6 o pirodoxina (TAZOE et al. 2002); esta vitamina se encuentra acoplada con la biosíntesis de folatos (vitamina B9), en la ruta de un carbono

(Rush et al. 2005). La presencia de folatos regula la producción de vitamina B6 y viceversa, debido a que la síntesis de vitamina B6 es dependiente de la conversión de THF y 5,10-MTHF, lo que limita la producción de precursores de aminoácidos (Zheng et al. 2019). Esto significa que variaciones en la presencia de la vitamina B9, puede incrementar la producción de la vitamina B6 en *Rhizobium*, posiblemente, estimulando la actividad simbiótica en la planta.

Ácido fólico (B9)

La vitamina B9, ácido fólico o folatos, es un componente importante del metabolismo de los organismos vivos (Cossins y Chen 1997), debido a que son donadores/aceptores de unidades de un carbono que forman parte de moléculas importantes, como aminoácidos y ácidos nucleicos (Gorelova et al. 2017). Las reacciones catalizadas por los folatos proveen de grupos metilos, indispensables para regular la expresión génica, pero, también, son prerrequisitos para la síntesis de lípidos, proteínas, clorofila y lignina (Gorelova et al. 2017). Las BFN, como *Azorhizobium* sp. (Dreyfus), pueden producir hasta 0.96mM de folatos (Bhadrecha et al. 2021), lo cual podría impactar, directamente, a la planta y a otros microorganismos del suelo como los HMA.

En un análisis comparativo de genomas mediante el paquete get_homologes (Contreras-Moreira and Vinuesa 2013) de 33 especies del género *Rhizobium*, se encontró que las 33 especies analizadas cuentan con los genes necesarios para su biosíntesis (Anexo 2) (de Crécy-Lagard et al., 2007), los cuales son: *folA* (Dihidrofolato reductasa), *MAT* (metionina adenosiltransferasa), ALDH1L1 (10-formiltetrahidrofolato deshidrogenasa), *folE* (GTP cicloidrolasa), *ADCs* (Aminodeoxicorsimato sintasa), *folP* (Dihidropteroato sintasa), *folC*

(Folipoliglutamil sintasa), *MTHFR* (Metilenetetrahidrofolato reductasa), glyA (Serina/glicina hidroximetil transferasa), *SAM* (Adenosil metionina sintasa), *FBP* (proteína ligadora de folatos), *folK* (hidroximetildihudropterina pirofosfokinase), *GGH* (Gamma glutamil hidrolasa).

Durante la simbiosis con BFN de nódulos determinados, el N fijado es traslocado del nódulo a la planta como ureidos (Atkins 1987). La ruta de biosíntesis de ureidos en nódulos determinados es precedida por la biosíntesis *de novo* de purinas (Tajima et al. 2004). En esta ruta se requieren dos moléculas de 10-formyl-tetrahydrofolatos (folatos) (Zrenner et al. 2006) y una molécula de glicina que utiliza, a su vez, una molécula de tetrahidrofolato para su interconversión de serina (Mitchell et al. 1986). El papel de los folatos durante la fijación simbiótica de N no ha sido estudiado; aunque, debido a su relación directa con la translocación del N fijado en nódulos, se puede considerar que la concentración de esta vitamina puede influir en las BFN.

Si bien no hay varios estudios sobre la producción de folatos por parte de las rizobacterias, se presume que distintas bacterias gram-negativas pueden exudar ya sea folatos o sus derivados, ya que poseen los genes completos para su biosíntesis (Ledesma-Amaro et al., 2013; Marek-Kozaczuk & Skorupska, 2001; Revuelta et al., 2018). Además, se han identificado dos transportadores de membrana de folatos en bacterias, el FolT (Eudes et al., 2008) y el FBT(Eudes et al., 2010), lo cual también abre la posibilidad de que esta vitamina interactúe con los elementos de la rizósfera.

El contenido de folatos en plantas se puede ver afectado por otros componentes como la concentración de ácido salicílico, ya que su presencia incrementa el contenido de folatos en plantas (Puthusseri et al. 2012). En la simbiosis MA, la colonización de las raíces varía de acuerdo con la concentración de ácido salicílico en la planta hospedera (Herrera Medina et

al. 2003). En un estudio con plantas transgénicas de tabaco, tanto con niveles reducidos como con biosíntesis constitutiva de ácido salicílico, se observó una reducción en el porcentaje de colonización MA en las raíces (Herrera Medina et al. 2003).

Colbalamina (B12)

La vitamina B12, también, es fundamental para la fijación de N (Taga y Walker 2010) porque su concentración está directamente relacionada con el crecimiento de la bacteria *E. meliloti* (Dangeard)(Taga et al. 2007) y el número de bacteroides presentes en los nódulos (Dilworth et al. 1979).

Identidad del hospedero

La diversidad de plantas y la productividad de los ecosistemas está influenciada, significativamente, por la diversidad de especies de HMA del suelo (van der Heijden et al. 1998). Además, las especies vegetales pueden responder diferencialmente a cada especie de HMA (Ramírez-Viga et al. 2018) e, incluso, a la mezcla de otros microorganismos que constituyen consorcios (Berendsen et al. 2012).

El crecimiento y productividad de las leguminosas son dependientes de la combinación específica de sus rizobios y los HMA con un hospedero, indicando que hay interacciones sinérgicas entre los microorganismos simbiontes compatibles. En un estudio de Xavier y Germida (2002), observaron que la respuesta de *Lens culinaris* (Medik) a dos especies de HMA y 9 cepas de *Rhizobium leguminosarum* (Frank) bv *viceae*, varió significativamente y, por su parte, una selección no compatible de una especie micorrizógena podría reducir la eficacia de una cepa eficiente de *R. leguminosraum* bv *vicaea*. Por el contrario, una especie

de HMA compatible, podría mejorar la eficacia de una cepa ineficiente de *R. Leguminosarum* (Frank) bv vicaea. Por otro lado, la efectividad de los HMA en el crecimiento vegetal depende de la combinación hospedero-especie simbionte (Shi et al. 2016). Kavadia et al. (2021) observaron que la presencia de *E. meliloti* en *Vigna unguiculata* (L.) Walp. inoculada con tres especies de HMA, favorecía la presencia de *Rhizophagus irregularis* (Błaszk., Wubet, Renker y Buscot) sobre las demás especies de HMA, y la eficiencia de la interacción en la planta dependía de la combinación de especies fúngicas.

En resumen, la interacción entre rizobios, HMA y las vitaminas del complejo B, es un proceso complejo y multifactorial, donde cada componente juega un papel esencial en el establecimiento y éxito de la simbiosis. Las vitaminas del grupo B, al influir en el crecimiento, desarrollo, metabolismo y comunicación entre las plantas y sus simbiontes, podrían ser un factor clave para optimizar la efectividad de estas asociaciones simbióticas. Aunque, este dependerá no solo de la especie vegetal, sino de la identidad de cada microorganismo.

Referencias

Abbas CA, Sibirny AA (2011) Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers. Microbiology and Molecular Biology Reviews 75:321–360. https://doi.org/10.1128/MMBR.00030-10

Abeysinghe G, Kuchira M, Kudo G, et al (2020) Fungal mycelia and bacterial thiamine establish a mutualistic growth mechanism. Life Science Alliance 3:e202000878. https://doi.org/10.26508/lsa.202000878

Afkhami ME, Friesen ML, Stinchcombe JR (2021) Multiple mutualism effects generate synergistic selection and strengthen fitness alignment in the interaction between

legumes, rhizobia and mycorrhizal fungi. Ecology Letters 24:1824–1834. https://doi.org/10.1111/ele.13814

Ahn I-P, Kim S, Lee Y-H (2005) Vitamin B1 functions as an activator of plant disease resistance. Plant Physiologyogy 138:1505–1515. https://doi.org/10.1104/pp.104.058693

Allen MF (2007) Mycorrhizal fungi: highways for water and nutrients in arid soils. Vadose Zone Journal 6:291–297. https://doi.org/10.2136/vzj2006.0068

Artursson V, Finlay RD, Jansson JK (2006) Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. Environmental Microbiology 8:1–10. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00942.x

Atkins C, Pate J (1982) Metabolism and translocation of allantoin in ureide-producing grain legumes. Plant Physiologyogy 70:476–82. https://doi.org/10.1104/pp.70.2.476

Atkins C, Smith P (2000) Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process. In: Triplett EW (ed) Ureide synthesis in legume nodules. Horizon Scientific Press, Wymondham, UK, pp 559–587

Atkins C, Smith PMC, Storer PJ (1997) Reexamination of the intracellular localization of de novo purine synthesis in cowpea nodules. Plant Physiologyogy 113:127–135

Atkins CA (1987) Metabolism and translocation of fixed nitrogen in the nodulated legume. Plant and Soil 100:157–169

Atkins CA, Sanford PJ, Storer PJ, Pate JS (1988) Inhibition of nodule functioning in cowpea by a xanthine oxidoreductase inhibitor, allopurinol. Plant Physiologyogy 88:1229–1234

Backer R, Rokem JS, ilangumaran G, Lamont J, Praslickova D, Ricci E, Subramanian S, Smith DL. (2018) Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of

action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. Frontiers in Plant Science 9:1473. doi: 10.3389/fpls.2018.01473

Baral B, Teixeira da Silva JA, Izaguirre-Mayoral ML (2016) Early signaling, synthesis, transport and metabolism of ureides. Journal of Plant Physiologyogy 193:97–109. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.01.013

Barea JM, Jefferies P (1995) Arbuscular mycorrhizas in sustainable plant-soil systems. In: Varma A, Hock B (eds) Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology, 2nd edn. Springer Verlag, Heidelberg, Germany, pp 521–560

Bécard G, Piché Y (1989) Fungal growth stimulation by CO_2 and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. Applied Environmental Microbiology 55:2320–2325. https://doi.org/10.1128/aem.55.9.2320-2325.1989

Becker A (2017) Classic Spotlight: Bacteroids—Views of an enigmatic bacterial state in root nodule symbiosis through the centuries. Journal of Bacteriology 199:e00741-16. https://doi.org/10.1128/JB.00741-16

Berendsen RL, Pieterse CMJ, Bakker PAHM (2012) The rhizosphere microbiome and plant health. Trends in Plant Science 17:478–486. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.001

Bhadrecha P, Bala M, Kaushik V, et al (2021) Folate-producing rhizobacteria of *Hippophae rhamnoides* L. from Indian trans-Himalaya low atmospheric zone. BIOCELL 45:387–394. https://doi.org/10.32604/biocell.2021.013824

Bharadwaj DP, Alström S, Lundquist P-O (2012) Interactions among *Glomus irregulare*, arbuscular mycorrhizal spore-associated bacteria, and plant pathogens under *in vitro* conditions. Mycorrhiza 22:437–447. https://doi.org/10.1007/s00572-011-0418-7

Bonfante P, Anca I-A (2009) Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. Annual Review of Microbiology 63:363–383. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073504

Bonfante P, Genre A (2010) Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. Nature Communications 1:1–11. https://doi.org/10.1038/ncomms1046

Bonfante P, Genre A (2008) Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: an evolutionary-developmental perspective. Trends in Plant Science 13:492–498. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.07.001

Boyd ES, Peters JW (2013) New insights into the evolutionary history of biological nitrogen fixation. Frontiers in Microbiology 4:201. https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00201

Brundrett M (2004) Diversity and classification of mycorrhizal associations. Biological Reviews 79:473–495. https://doi.org/10.1017/S1464793103006316

Buhian WP, Bensmihen S (2018) Mini-review: nod factor regulation of phytohormone signaling and homeostasis during rhizobia-legume symbiosis. Frontiers in Plant Science 3;9:1247. doi: 10.3389/fpls.2018.01247

Carter AM, Tegeder M (2016) Increasing nitrogen fixation and seed development in soybean requires complex adjustments of nodule nitrogen metabolism and partitioning processes. Current Biology 26:2044–2051. https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.06.003

Carvalho HG, Lopes-Cardoso IA, Lima LM, et al (2003) Nodule-specific modulation of glutamine synthetase in transgenic *Medicago truncatula* leads to inverse alterations in asparagine synthetase expression. Plant Physiologyogy 133:243–252. https://doi.org/10.1104/pp.102.017830

Cavagnaro TR, Bender SF, Asghari HR, Heijden MGA van der (2015) The role of arbuscular mycorrhizas in reducing soil nutrient loss. Trends in Plant Science 20:283–290. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.03.004

Collier R, Tegeder M (2012) Soybean ureide transporters play a critical role in nodule development, function and nitrogen export. The Plant Journal 72:355–367. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.05086.x

Cossins EA, Chen L (1997) Folates and one-carbon metabolism in plants and fungi. Phytochemistry 45:437–452. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00833-3

Cowles JR, Evans HJ, Russell SA (1969) B12 Coenzyme-dependent ribonucleotide reductase in R*hizobium* species and the effects of cobalt deficiency on the activity of the enzyme. Journal of Bacteriology 97:1460–1465. https://doi.org/10.1128/jb.97.3.1460-1465.1969

Crossay T, Majorel C, Redecker D, et al (2019) Is a mixture of arbuscular mycorrhizal fungi better for plant growth than single-species inoculants? Mycorrhiza 29:325–339. https://doi.org/10.1007/s00572-019-00898-y

Dakora FD, Matiru VN, Kanu AS (2015) Rhizosphere ecology of lumichrome and riboflavin, two bacterial signal molecules eliciting developmental changes in plants. Frontiers in Plant Science 6:. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00700

Dakora FD, Phillips DA (2002) Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. Plant and Soil 245:35–47. https://doi.org/10.1023/A:1020809400075

Davison J, Moora M, Jairus T, et al (2016) Hierarchical assembly rules in arbuscular mycorrhizal (AM) fungal communities. Soil Biology and Biochemistry 97:63–70

De Gruyter J, Weedon JT, Elst EM, et al (2022) Arbuscular mycorrhizal inoculation and plant response strongly shape bacterial and eukaryotic soil community trajectories. Soil Biology and Biochemistry 165:108524. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108524

Dickson S (2004) The Arum–Paris continuum of mycorrhizal symbioses. New Phytologist 163:187–200. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01095.x

Dilworth MJ, Robson AD, Chatel DL (1979) Cobalt and nitrogen fixation in *Lupinus angustifolius* L. II. Nodule formation and function. The New Phytologist 83:63–79

Ding X, Fu L, Liu C, et al (2011) Positive feedback between acidification and organic phosphate mineralization in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.). Plant and Soil 349:13–24. https://doi.org/10.1007/s11104-011-0783-1

Egerton-Warburton LM, Querejeta JI, Allen MF (2008) Efflux of hydraulically lifted water from mycorrhizal fungal hyphae during imposed drought. Plant Signaling y Behavior 3:68–71. https://doi.org/10.4161/psb.3.1.4924

Emmett BD, Lévesque-Tremblay V, Harrison MJ (2021) Conserved and reproducible bacterial communities associate with extraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. The ISME Journal 1–13. https://doi.org/10.1038/s41396-021-00920-2

Fehling C, Bassarab S, Werner D (1992) High flavin/protein ratio in the symbiosome space of soybean nodules. Current Microbiology 25:269–273. https://doi.org/10.1007/BF01575860

Ferguson BJ, Indrasumunar A, Hayashi S, et al (2010) Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. Journal of Integrative Plant Biology 52:61–76. https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00899.x

Fitzpatrick TB, Chapman LM (2020) The importance of thiamine (vitamin B1) in plant health: From crop yield to biofortification. Journal of Biological Chemistry 295:12002–12013. https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.010918

Franche C, Lindström K, Elmerich C (2009) Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. Plant and Soil 321:35–59. https://doi.org/10.1007/s11104-008-9833-8

Gai J, Gao W, Liu L, et al (2015) Infectivity and community composition of arbuscular mycorrhizal fungi from different soil depths in intensively managed agricultural ecosystems. Journal of Soils and Sediments 15:1200–1211. https://doi.org/10.1007/s11368-015-1060-3

García-Angulo VA (2017) Overlapping riboflavin supply pathways in bacteria. Critical reviews in microbiology 43:196–209. https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1192578

Genre A, Lanfranco L, Perotto S, Bonfante P (2020) Unique and common traits in mycorrhizal symbioses. Nature Reviews Microbiology 18:649–660. https://doi.org/10.1038/s41579-020-0402-3

González-Sama A, de la Peña TC, Kevei Z, et al (2006) Nuclear dna endoreduplication and expression of the mitotic inhibitor CCS52 associated to determinate and lupinoid nodule organogenesis. MPMI 19:173–180. https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0173

Gorelova V, Ambach L, Rébeillé F, et al (2017) Folates in plants: research advances and progress in crop biofortification. Frontiers in Chemistry 5: https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00021

Gough EC, Owen KJ, Zwart RS, Thompson JP (2022) The role of nutrients underlying interactions among root-nodule bacteria (*Bradyrhizobium* sp.), arbuscular

mycorrhizal fungi (*Funneliformis mosseae*) and root-lesion nematodes (*Pratylenchus thornei*) in nitrogen fixation and growth of mung bean (*Vigna radiata*). Plant and Soil 472:421–449. https://doi.org/10.1007/s11104-021-05254-8

Gouws LM, Botes E, Wiese AJ, et al (2012) The plant growth promoting substance, lumichrome, mimics starch, and ethylene-associated symbiotic responses in *Lotus* and tomato roots. Frontiers in Plant Science 3: https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00120

Goyer A (2010) Thiamine in plants: Aspects of its metabolism and functions. Phytochemistry 71:1615–1624. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.06.022

Hao L, Zhang Z, Hao B, et al (2021) Arbuscular mycorrhizal fungi alter microbiome structure of rhizosphere soil to enhance maize tolerance to La. Ecotoxicology and Environmental Safety 212:111996. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.111996

Harris JM, Pawlowski K, Mathesius U (2020) Editorial: Evolution of signaling in plant symbiosis. Frontiers in Plant Sciences. 11. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00456

Harrison MJ (2012) Cellular programs for arbuscular mycorrhizal symbiosis. Current Opinion in Plant Biology 15:691–698. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.08.010

Herrera Medina MJ, Gagnon H, Piché Y, et al (2003) Root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi is affected by the salicylic acid content of the plant. Plant Science 164:993–998. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00083-9

Hoffman BM, Lukoyanov D, Yang Z-Y, et al (2014) Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: the next stage. Chemical Reviews 114:4041–4062. https://doi.org/10.1021/cr400641x

Ho-Plágaro T, García-Garrido JM (2022) Molecular regulation of arbuscular mycorrhizal symbiosis. International Journal of Molecular Sciences 23:5960. https://doi.org/10.3390/ijms23115960

Jabeen M, Akram NA, Ashraf M, et al (2022) Thiamin stimulates growth, yield quality and key biochemical processes of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) under arid conditions. PLOS ONE 17:e0266372. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266372

Jansa J, Gryndler M (2010) Biotic environment of the arbuscular mycorrhizal fungi in soil. In: Koltai H, Kapulnik Y (eds) Arbuscular mycorrhizas: physiology and function. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 209–236

Javaid A (2010) Role of arbuscular mycorrhizal fungi in nitrogen fixation in legumes. In: Khan MS, Musarrat J, Zaidi A (eds) Microbes for legume improvement. Springer, Vienna, pp 409–426

Ji B, Bever JD (2016) Plant preferential allocation and fungal reward decline with soil phosphorus: implications for mycorrhizal mutualism. Ecosphere 7:e01256. https://doi.org/10.1002/ecs2.1256

Jiadkong K, Nampei M, Wangsawang S, Ueda A (2023) Riboflavin seed priming activates OsNHXs expression to alleviate salinity stress in rice seedlings. Journal of Plant Growth Regulationation 42:3032–3042. https://doi.org/10.1007/s00344-022-10768-1

Jiang F, Zhang L, Zhou J, et al (2021) Arbuscular mycorrhizal fungi enhance mineralization of organic phosphorus by carrying bacteria along their extraradical hyphae. New Phytologist nph.17081. https://doi.org/10.1111/nph.17081

Jin C, Yao Y, Yonezawa A, et al (2017) Riboflavin transporters RFVT/SLC52A mediate translocation of riboflavin, rather than FMN or FAD, across plasma membrane. Biological and Pharmaceutical Bulletin 40:1990–1995. https://doi.org/10.1248/bpb.b17-00292

Jin H, Pfeffer PE, Douds DD, et al (2005) The uptake, metabolism, transport and transfer of nitrogen in an arbuscular mycorrhizal symbiosis. New Phytologist 168:687–696. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01536.x

Kaschuk G, Leffelaar PA, Giller KE, et al (2010) Responses of legumes to rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi: A meta-analysis of potential photosynthate limitation of symbioses. Soil Biology and Biochemistry 42:125–127. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.10.017

Kavadia A, Omirou M, Fasoula DA, et al (2021) Co-inoculations with rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi alters mycorrhizal composition and lead to synergistic growth effects in cowpea that are fungal combination-dependent. Applied Soil Ecology 167:104013. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104013

Kobayashi Y, Maeda T, Yamaguchi K, et al (2018) The genome of *Rhizophagus clarus* HR1 reveals a common genetic basis for auxotrophy among arbuscular mycorrhizal fungi. BMC Genomics 19:. https://doi.org/10.1186/s12864-018-4853-0

Koller R, Rodriguez A, Robin C, et al (2013) Protozoa enhance foraging efficiency of arbuscular mycorrhizal fungi for mineral nitrogen from organic matter in soil to the benefit of host plants. New Phytologist 199:203–211. https://doi.org/10.1111/nph.12249

Kuzyakov Y, Razavi BS (2019) Rhizosphere size and shape: Temporal dynamics and spatial stationarity. Soil Biology and Biochemistry 135:343–360. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.05.011

Lanfranco L, Fiorilli V, Gutjahr C (2018) Partner communication and role of nutrients in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. New Phytologist 220:1031–1046. https://doi.org/10.1111/nph.15230

Larimer AL, Clay K, Bever JD (2014) Synergism and context dependency of interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia with a prairie legume. Ecology 95:1045–1054. https://doi.org/10.1890/13-0025.1

Le Deunff E, Beauclair P, Deleu C, Lecourt J (2019) Inhibition of aminotransferases by aminoethoxyvinylglycine triggers a nitrogen limitation condition and deregulation of histidine homeostasis that impact root and shoot development and nitrate uptake. Frontiers in Plant Science 10: https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01387

Li X-L, George E, Marschner H (1991a) Phosphorus depletion and pH decrease at the root–soil and hyphae–soil interfaces of VA mycorrhizal white clover fertilized with ammonium. New Phytologist 119:397–404. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1991.tb00039.x

Li X-L, George E, Marschner H (1991b) Extension of the phosphorus depletion zone in VA-mycorrhizal white clover in a calcareous soil. Plant and Soil 136:41–48. https://doi.org/10.1007/BF02465218

Li X-L, Marschner H, George E (1991c) Acquisition of phosphorus and copper by VA-mycorrhizal hyphae and root-to-shoot transport in white clover. Plant and Soil 136:49–57. https://doi.org/10.1007/BF02465219

Li Y, Yang C, Ahmad H, Maher M, Fang C, Luo J (2021) Benefiting others and self: Production of vitamins in plants. Journal of Integrative Plant Biology 63:210–227. https://doi.org/10.1111/jipb.13047

Lin J, Frank M, Reid D (2020) No home without hormones: how plant hormones control legume nodule organogenesis. Plant Communications 1:100104. https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100104

Lodwig EM, Hosie AHF, Bourdès A, Findlay K, Allaway D, Karunakaran R, Downie JA, Poole PS (2003) Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume–*Rhizobium* symbiosis. Nature 422:722–726. https://doi.org/10.1038/nature01527

Lowe RH, Evans HJ (1962) Carbon dioxide requirements for growth of legume nodule bacteria. Soil Science 94:351

Marek-Kozaczuk M, Skorupska A (2001) Production of B-group vitamins by plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* strain 267 and the importance of vitamins in the colonization and nodulation of red clover. Biology and Fertility of Soils 33:146–151. https://doi.org/10.1007/s003740000304

Matamoros MA, Loscos J, Coronado MJ, Ramos J, Sato S, Testillano PS, Tabata S, Becana M (2006) Biosynthesis of ascorbic acid in legume root nodules. Plant Physiologyogy 141:1068–1077. https://doi.org/10.1104/pp.106.081463

Mathesius U (2020) The role of the flavonoid pathway in *Medicago truncatula*, in root nodule formation. A review. In: The Model Legume *Medicago truncatula*. John Wiley y Sons, Ltd, pp 434–438

Mechri B, Manga AGB, Tekaya M, Attia F, Cheheb H, Meriem FB, Braham M, Boujnah D, Hammami M (2014) Changes in microbial communities and carbohydrate profiles induced by the mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) in rhizosphere of olive

trees *Olea europaea* L.). Applied Soil Ecology 75:124–133. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.11.001

Miller RM, Jastrow JD, Reinhardt DR (1995) External hyphal production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in pasture and tallgrass prairie communities. Oecologia 103:17–23. https://doi.org/10.1007/BF00328420

Mitchell MK, Reynolds PHS, Blevins DG (1986) Serine hydroxymethyltransferase from soybean root nodules 1. Plant Physiology 81:553–557

Moreno A, Taleb V, Sebastián M, et al (2022) Cofactors and pathogens: Flavin mononucleotide and flavin adenine dinucleotide (FAD) biosynthesis by the FAD synthase from *Brucella ovis*. IUBMB Life 74:655–671. https://doi.org/10.1002/iub.2576

Morin E, Miyauchi S, San Clemente H, Chen ECH, Pelin A, de la Providencia I, Ndikumana S, Beaudet D, Hainaut M, Drula E, Kuo A, Tang N, Roy S, Viala J, Henrissat B, Grigoriev IV, Corradi N, Roux C, Martin FM (2019) Comparative genomics of *Rhizophagus irregularis, R. cerebriforme, R. diaphanus* and *Gigaspora rosea* highlights specific genetic features in Glomeromycotina. New Phytologist 222:1584–1598. https://doi.org/10.1111/nph.15687

Mus F, Crook MB, Garcia K, Garcia Costas A, Geddes BA, Kouri ED, Paramasivan P, Ryu MH, Oldroyd GE, Poole PS, Udvardi MK, Voigt CA, Ané JM, Peters JW (2016) Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to non legumes. Applied and Environmental Microbiology 82:3698–3710. https://doi.org/10.1128/AEM.01055-16

Musyoka DM, Njeru EM, Nyamwange MM, Maingi JM (2020) Arbuscular mycorrhizal fungi and *Bradyrhizobium* co-inoculation enhances nitrogen fixation and growth of

green grams (*Vigna radiata* L.) under water stress. Journal of Plant Nutrition 43:1036–1047. https://doi.org/10.1080/01904167.2020.1711940

Muthukrishnan S, Murugan I, Selvaraj M (2019) Chitosan nanoparticles loaded with thiamine stimulate growth and enhances protection against wilt disease in Chickpea. Carbohydrate Polymers 212:169–177. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.02.037

Nagae M, Parniske M, Kawaguchi M, Takeda N (2016a) The thiamine biosynthesis gene THI1 promotes nodule growth and seed maturation1. Plant Physiology 172:2033–2043. https://doi.org/10.1104/pp.16.01254

Nagae M, Parniske M, Kawaguchi M, Takeda N (2016b) The relationship between thiamine and two symbioses: Root nodule symbiosis and arbuscular mycorrhiza. Plant Signaling y Behavior 11: https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1265723

Neuenkamp L, Moora M, Öpik M, Davison J, Gerz M, Männistö, Jairus T, Vasar M, Zobel M (2018) The role of plant mycorrhizal type and status in modulating the relationship between plant and arbuscular mycorrhizal fungal communities. New Phytologist 220:1236–1247. https://doi.org/10.1111/nph.14995

Neumann E, George E (2004) Colonization with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol. y Gerd.) enhanced phosphorus uptake from dry soil in *Sorghum bicolor* (L.). Plant and Soil 261:245–255. https://doi.org/10.1023/B:PLSO.0000035573.94425.60

Nie S, Xu H (2016) Riboflavin-induced disease resistance requires the mitogen-activated protein kinases 3 and 6 in *Arabidopsis thaliana*. PLoS One 11:e0153175. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153175

Nuccio EE, Hodge A, Pett-Ridge J, Herman DJ, Weber PK, Firestone MK (2013) An arbuscular mycorrhizal fungus significantly modifies the soil bacterial community

and nitrogen cycling during litter decomposition. Environmental Microbiology 15:1870–1881. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12081

Oláh B, Briere C, Becard G, Denarie J, Gough C (2005) Nod factors and a diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi stimulate lateral root formation in *Medicago truncatula* via the DMI1/DMI2 signalling pathway. The Plant Journal 44:195-207 https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02522.x

Oldroyd GED (2013) Speak, friend, and enter: signaling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. Nature Reviews Microbiology 11:252–263. https://doi.org/10.1038/nrmicro2990

Oldroyd GED, Harrison MJ, Paszkowski U (2009) Reprogramming plant cells for endosymbiosis. Science 324:753–754. https://doi.org/10.1126/science.1171644

Palacios OA, Bashan Y, de-Bashan LE (2014) Proven and potential involvement of vitamins in interactions of plants with plant growth-promoting bacteria—an overview. Biology and Fertility of Soils 50:415–432. https://doi.org/10.1007/s00374-013-0894-3

Parniske M (2008) Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. Nature Reviews Microbiology 6:763–775. https://doi.org/10.1038/nrmicro1987

Parra M, Stahl S, Hellmann H (2018) Vitamin B6 and its role in cell metabolism and physiology. Cells 7:84. https://doi.org/10.3390/cells7070084

Paterson E, Sim A, Davidson J, Daniell TJ (2016) Arbuscular mycorrhizal hyphae promote priming of native soil organic matter mineralization. Plant and Soil 408:243–254. https://doi.org/10.1007/s11104-016-2928-8

Phillips DA, Joseph CM, Yang G-P, et al (1999) Identification of lumichrome as a *Sinorhizobium* enhancer of alfalfa root respiration and shoot growth. PNAS 96:12275–12280. https://doi.org/10.1073/pnas.96.22.12275

Pholo M, Coetzee B, Maree HJ, et al (2018) Cell division and turgor mediate enhanced plant growth in *Arabidopsis* plants treated with the bacterial signaling molecule lumichrome. Planta 248:477–488. https://doi.org/10.1007/s00425-018-2916-8

Pradi-Vendruscolo E, Seleguini A (2020) Effects of vitamin pre-sowing treatment on sweet maize seedlings irrigated with saline water. Acta Agronómica 69:20–25

Prell J, White JP, Bourdes A, Bunnewel S, Bongaerts RJ, Poole PS (2009) Legumes regulate *Rhizobium* bacteroid development and persistence by the supply of branched-chain amino acids. PNAS 106:12477–12482. https://doi.org/10.1073/pnas.0903653106

Puthusseri B, Divya P, Lokesh V, Neelwarne B (2012) Enhancement of folate content and its stability using food grade elicitors in coriander (*Coriandrum sativum* L.). Plant Plant Foods for Human Nutrition 67:162–170. https://doi.org/10.1007/s11130-012-0285-1

Rajamani S, Bauer WD, Robinson JB, Farrow JM, Pesci EC, Teplitski M, Gao M, Sayre RT, Phillips DA (2008) The vitamin riboflavin and its derivative lumichrome activate the LasR bacterial quorum sensing receptor.Molecular Plant-Microbe Interactions 21: https://doi.org/10.1094/MPMI-21-9-1184

Ramírez M, Valderrama B, Arredondo-Peter R, Soberón M, Mora J, Hernández G (1999) *Rhizobium etli* genetically engineered for the heterologous expression of *Vitreoscilla* sp. hemoglobin: effects on free-living and symbiosis. Molecular Plant-Microbe Interactions 12:1008–1015

Ramírez-Viga TK, Aguilar R, Castillo-Argüero S, Chiappa-Carrara X, Guadarrama P, Ramos-Zapata J (2018) Wetland plant species improve performance when inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi: a meta-analysis of experimental pot studies. Mycorrhiza 28:477–493. https://doi.org/10.1007/s00572-018-0839-7

Reynolds PHS, Boland MJ, Blevins DG, Schubert KR, Randall DD (1982) Enzymes of amide and ureide biogenesis in developing soybean nodules. Plant Physiology 69:1134–8. https://doi.org/10.1104/pp.69.6.1334

Rodríguez-Caballero G, Caravaca F, Fernández-González AJ, Alguacil MM, Fernández-López M, Roldán A (2017) Arbuscular mycorrhizal fungi inoculation mediated changes in rhizosphere bacterial community structure while promoting revegetation in a semiarid ecosystem. Science of The Total Environment 584–585:838–848. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.128

Rohrbacher F, St-Arnaud M (2016) Root Exudation: The ecological driver of hydrocarbon rhizoremediation. Agronomy 6:19. https://doi.org/10.3390/agronomy6010019

Roje S (2007) Vitamin B biosynthesis in plants. Phytochemistry 68:1904–1921. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.03.038

Ruiz-Herrera L, Hernández-Equihua MG, Boone-Villa D, Jacobo GCM, Aguilera-Méndez A (2019) Biotin supplementation alters root system architecture and development in *Arabidopsis thaliana*. Plant Root 13:29–40. https://doi.org/10.3117/plantroot.13.29

Rush J, Moritz A, Lee KA, Guo A, Goss VL, Spek EJ, Zhang H, Zha XM, Polakiewicz RD , Comb MJ (2005) Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells. Nature Biotechnology 23:94–101. https://doi.org/10.1038/nbt1046

Sadak MS (2023) Physiological role of arbuscular mycorrhizae and vitamin B1 on productivity and physio-biochemical traits of white lupine *Lupinus termis* L.) Under Salt Stress. Gesunde Pflanzen. https://doi.org/10.1007/s10343-023-00855-y

Sanyal D, Goos RJ, Chatterjee A (2018) Determining symbiotic nitrogen fixation in dry bean cultivars using ureide method and isotope dilution techniques. Communications in

Soil Science and Plant Analysis 49:2042–2052. https://doi.org/10.1080/00103624.2018.1495727

Schwember AR, Schulze J, del Pozo A, Cabeza RA (2019) Regulation of symbiotic nitrogen fixation in legume root nodules. Plants 8:333. https://doi.org/10.3390/plants8090333

Schwinghamer EA (1970) Requirement for riboflavin for effective symbiosis on clover by an auxotrophic mutant strain of *Rhizobium Trifolii*. Australian Journal of Biological Sciences 23:1187–1196. https://doi.org/10.1071/bi9701187

Sepúlveda Cisternas I, Salazar JC, García-Angulo VA (2018) Overview on the bacterial iron-riboflavin metabolic axis. Frontiers in Microbiology 9: https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01478

Shi S-M, Chen K, Gao Y, et al (2016) Arbuscular mycorrhizal fungus species dependency governs better plant physiologyogical characteristics and leaf quality of mulberry (*Morus alba* L.) seedlings. Frontiers in Microbiology 7:

Sirithanakorn C, Cronan JE (2021) Biotin, a universal and essential cofactor: synthesis, ligation and regulation. FEMS Microbiology Reviews 45:fuab003. https://doi.org/10.1093/femsre/fuab003

Smercina DN, Evans SE, Friesen ML, Tiemann LK (2019) To fix or not to fix: controls on free-living nitrogen fixation in the rhizosphere. Applied and Environmental Microbiology 85:e02546-18. https://doi.org/10.1128/AEM.02546-18

Smith SE, Read DJ (2010) Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press

Söderberg KH, Olsson PA, Bååth E (2002) Structure and activity of the bacterial community in the rhizosphere of different plant species and the effect of arbuscular mycorrhizal colonisation. FEMS Microbiology Ecology 40:223–231. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00955.x

Sohn J, Voegele RT, Mendgen K, Hahn M (2000) High level activation of vitamin b1 biosynthesis genes in haustoria of the rust fungus *Uromyces fabae*. MPMI 13:629–636. https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.6.629

Steenhoudt O, Vanderleyden J (2000) *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. FEMS Microbiology Reviews 24:487–506. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00552.x

Strzelczyk E, Pokojska A (1990) Effect of B-group vitamins on auxin-like substances production by ectomycorrhizal fungi of pine (*Pinus sylvestris* L.). Agriculture, Ecosystems y Environment 28:483–491. https://doi.org/10.1016/0167-8809(90)90085-R

Sun Y, Wang M, Mur LAJ, et al (2020) Unravelling the roles of nitrogen nutrition in plant disease defences. International Journal of Molecular Sciences 21:572. https://doi.org/10.3390/ijms21020572

Suohui T, Yanping C, Shuhui Z, et al (2022) Thiamine induces resistance in tobacco against black shank. Australasian Plant Pathology 51:231–243. https://doi.org/10.1007/s13313-021-00848-3

Taga ME, Larsen NA, Howard-Jones AR, et al (2007) BluB cannibalizes flavin to form the lower ligand of vitamin B12. Nature 446:449–453. https://doi.org/10.1038/nature05611

Taga ME, Walker GC (2010) *Sinorhizobium meliloti* requires a cobalamin-dependent ribonucleotide reductase for symbiosis with its plant host. Molecular Plant-Microbe Interactions 23:1643–1654. https://doi.org/10.1094/MPMI-07-10-0151

Tajima S, Nomura M, Kouchi H (2004) Ureide biosynthesis in legume nodules. Frontiers in Bioscience 9:1374–81

Tazome M, IchikaWA K, Hoshino T (2002) Biosynthesis of vitamin b6 in *rhizobium*: *in vitro* synthesis of pyridoxine from 1-deoxy-D-xylulose and 4-hydroxy-L-threonine. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 66:934–936. https://doi.org/10.1271/bbb.66.934

Thorley RMS, Taylor LL, Banwart SA, Leake JR, Beerling DJ (2015) The role of forest trees and their mycorrhizal fungi in carbonate rock weathering and its significance for global carbon cycling. Plant, Cell y Environment 38:1947–1961. https://doi.org/10.1111/pce.12444

Tian Q, Wang G, Ma X, et al (2022) Riboflavin integrates cellular energetics and cell cycle to regulate maize seed development. Plant Biotechnology Journal 20:1487–1501. https://doi.org/10.1111/pbi.13826

Tisserant E, Malbreil M, Kuo A, et al (2013) Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. Proceedings of the National Academy of Sciences U S A 110:20117–20122. https://doi.org/10.1073/pnas.1313452110

Tsikou D, Nikolaou CN, Tsiknia M, et al (2023) Interplay between rhizobial nodulation and arbuscular mycorrhizal fungal colonization in Lotus japonicus roots. Journal of Applied Microbiology 134:lxac010. https://doi.org/10.1093/jambio/lxac010

T. Walsh C, A. Wencewicz T (2013) Flavoenzymes: Versatile catalysts in biosynthetic pathways. Natural Product Reports 30:175–200. https://doi.org/10.1039/C2NP20069D

Van Damme EJM, Barre A, Rougé P, Peumans WJ (2004) Cytoplasmic/nuclear plant lectins: a new story. Trends in Plant Science 9:484–489. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.08.003

van der Heijden MGA, Boller T, Wiemken A, Sanders IR (1998) Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. Ecology 79:2082–2091. https://doi.org/10.1890/0012-9658(1998)079[2082:DAMFSA]2.0.CO;2

Vendruscolo EP, Rodrigues AHA, Correa RS, Seleguini A, Ferreira de Lima S (2019) Different soaking times and niacin concentrations affect yield of upland rice under water deficit conditions. Agronomía Colombiana 37:166–172

Venice F, Ghignone S, Salvioli di Fossalunga A, Amselem J, Novero M, Xianan X, Sędzielewska Toro K, Morin E, Lipzen A, Grigoriev IV, Henrissat B, Martin FM, Bonfante P (2020) At the nexus of three kingdoms: the genome of the mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* provides insights into plant, endobacterial and fungal interactions. Environmental Microbiology 22:122–141. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14827

Verbruggen E, Jansa J, Hammer EC, Rillig MC (2016) Do arbuscular mycorrhizal fungi stabilize litter-derived carbon in soil? Journal of Ecology 104:261–269. https://doi.org/10.1111/1365-2745.12496

Vestergård M, Henry F, Rangel-Castro JI, Michelsen A, Prosser JI, Christensen S (2008) Rhizosphere bacterial community composition responds to arbuscular mycorrhiza, but not to reductions in microbial activity induced by foliar cutting. FEMS Microbiology Ecology 64:78–89. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00447.x

Wang F, Zhang L, Zhou J, et al (2022) Exploring the secrets of hyphosphere of arbuscular mycorrhizal fungi: processes and ecological functions. Plant and Soil 481:1–22. https://doi.org/10.1007/s11104-022-05621-z

Wang W, Shi J, Xie Q, Jiang Y, Yu N, Wang E (2017) Nutrient exchange and regulation in arbuscular mycorrhizal symbiosis. Molecular Plant 10:1147–1158. https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.07.012

Wang Y, Liu L, Jin Z, Zhang D (2021) Microbial cell factories for green production of vitamins. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology 9:661562. https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.661562

Wang Y, Wang M, Ye X, Liu H, Takano T, Tsugama D, Liu S, Bu Y (2020) Biotin plays an important role in *Arabidopsis thaliana* seedlings under carbonate stress. Plant Science 300:110639. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110639

Wani SA, Chand S, Wani MA, Ramzan M, Hakeem KR (2016) *Azotobacter chroococcum* – A potential biofertilizer in agriculture: an overview. In: Hakeem KR, Akhtar J, Sabir M (eds) Soil science: agricultural and environmental prospectives. Springer International Publishing, Cham, pp 333–348

Watson RJ, Heys R, Martin T, Savard M (2001) *Sinorhizobium meliloti* Cells require biotin and either cobalt or methionine for growth. Applied Environmental Microbiology 67:3767–3770. https://doi.org/10.1128/AEM.67.8.3767-3770.2001

White WH, Gunyuzlu PL, Toyn JH (2001) *Saccharomyces cerevisiae* is capable of de novo pantothenic acid biosynthesis involving a novel pathway of β-alanine production from spermine *. Journal of Biological Chemistry 276:10794–10800. https://doi.org/10.1074/jbc.M009804200

Whiteside MD, Garcia MO, Treseder KK (2012). Amino acid uptake in arbuscular mycorrhizal plants. LoS ONE 7(10): e47643. doi:10.1371/journal.pone.0047643

Xavier LJC, Germida JJ (2002) Response of lentil under controlled conditions to co-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia varying in efficacy. Soil Biology and Biochemistry 34:181–188. https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00165-1

Xie ZP, Staehelin C, Vierheilig H, Wiemken A, Jabbouri S, Broughton WJ, Vogeli-Lange R, Boller T (1995) Rhizobial nodulation factors stimulate mycorrhizal colonization of nodulating and nonnodulating soybeans. Plant Physiologyogy 108:1519–1525. https://doi.org/10.1104/pp.108.4.1519

Yamashita N, Tanabata S, Ohtake N, Sueyoshi K, Sato T, Higuchi K, Saito A, Ohyama T (2019) Effects of different chemical forms of nitrogen on the quick and reversible inhibition of soybean nodule growth and nitrogen fixation activity. Frontiers in Plant Science 10:. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00131

Yang G, Bhuvaneswari TV, Joseph CM, King MD, Phillips DA (2002) Roles for riboflavin in the *Sinorhizobium* -alfalfa association. Molecular Plant-Microbe Interactions 15:456–462. https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.5.456

Yooyongwech S, Phaukinsang N, Cha-um S, Supaibulwatana K (2013) Arbuscular mycorrhiza improved growth performance in *Macadamia tetraphylla* L. grown under water deficit stress involves soluble sugar and proline accumulation. Plant Growth Regulation 69:285–293. https://doi.org/10.1007/s10725-012-9771-6

Yooyongwech S, Tisarum R, Samphumphuang T, et al (2023) Integrated strength of osmotic potential and phosphorus to achieve grain yield of rice under water deficit by

arbuscular mycorrhiza fungi. Scientific Reports 13:5999. https://doi.org/10.1038/s41598-023-33304-x

Yu L, Zhang H, Zhang W, et al (2023) Arbuscular mycorrhizal fungi alter the interaction effects between *Bacillus* and *Rhizobium* on root morphological traits of *Medicago ruthenica* L. Journal of Soil Science and Plant Nutrition 23:2868–2877. https://doi.org/10.1007/s42729-023-01242-2

Yurgel SN, Rice J, Domreis E, Lynch J, Sa N, Qamar Z, Rajamani S, Gao M, Roje S, Bauer WD (2014) *Sinorhizobium meliloti* flavin secretion and bacteria-host interaction: role of the bifunctional ribba protein. Molecular Plant-Microbe Interactions 27:437–445. https://doi.org/10.1094/MPMI-11-13-0338-R

Zheng Y, Ramsamooj S, Li Q, Johnson JL, Yaron TM, Sharra K, Cantley LC (2019) Regulation of folate and methionine metabolism by multisite phosphorylation of human methylenetetrahydrofolate reductase. Scientific Reports 9:4190. https://doi.org/10.1038/s41598-019-40950-7

Zhou J, Chai X, Zhang L, George TS, Wang F, Feng G (2020) Different arbuscular mycorrhizal fungi colonizing on a single plant root system recruit distinct microbiomes. mSystems 15:5(6) 00929-20. https://doi.org/10.1128/mSystems.00929-20

Zhu X, Pan L, Xiao T, Ren X, Liu Z (2018) Exogenous niacin treatment increases NADPH oxidase in kiwifruit. Brazilian Journal of Biology 78:686–690. https://doi.org/10.1590/1519-6984.173709

Zrenner R, Stitt M, Sonnewald U, Boldt R (2006) Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. Annual Review of Plant Biology 57:805–836. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105421

3. Preguntas de investigación

¿Las vitaminas del grupo B pueden influir en la simbiosis tanto micorrízica como en la fijación simbiótica de nitrógeno?

¿Cuál es la concentración de vitamina B2 afecta la colonización micorrizógena?

¿Qué efecto tiene la riboflavina y la coinoculación de *R. tropici* en la simbiosis micorrizógena, su desarrollo y la selección de especies de HMA?

4. Hipótesis

La adición de riboflavina y *Rhizobium tropici* condiciona la simbiosis entre *Phaseolus vulgaris* y hongos micorrizógenos arbusculares.

5. Objetivo general

Determinar el efecto de la inoculación de *Rhizobium tropici* y la adición de riboflavina en las comunidades de HMA asociadas a *Phaseolus vulgaris.*

6. Objetivos específicos

a) Identificar genes candidatos de transporte de vitaminas B2 y B9 en especies de *Rhizobium*.
b) Identificar genes de biosíntesis de vitaminas B2 y B9 en rizobacterias y hongos micorrizógenos arbusculares.

c) Identificación de concentraciones de vitamina B2 que afectan la colonización micorrízica en *P. vulgaris*.

d) Evaluar el efecto de la vitamina B2 durante la simbiosis micorrízica y *Rhizobium tropici* en *P. vulgaris*.

e) Determinar los efectos en las especies de hongos micorrizógenos en coinoculación con *R. tropic*

CAPÍTULO II

Folates in legume root nodules

Folatos en nódulos de raíz en leguminosas

https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ppl.13218

Jacob Banuelos[1], Esperanza Martínez-Romero[2], Noé Manuel Montaño[3],

Sara Lucía Camargo-Ricalde[3]

1 Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México, México.

2 Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México.

3 Departamento de Biología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México, México

Abstract

Folates are multifunctional metabolites in plants that are essential for cell division, nucleic acids and amino acid synthesis. During symbiotic nitrogen fixation in legumes, these cofactors are needed for de novo purine biosynthesis, meaning that changes in the folate pools could directly affect the flow of fixed nitrogen to the plant. Its role related to symbiotic nitrogen fixation has not been yet explored, but recent data suggests a relevant role during

Banuelos J, Martínez-Romero E, Montaño N, Camargo-Ricalde S. (2021). Folates in legume root nodules. Physiol Plant. 171: 447–52. https://doi.org/10.1111/ppl.13218

the first steps. Transcriptomic, metabolomic and proteomic analyses indicate that folates are accumulated in symbiotic plant tissue, as they are involved, not only in de novo purines biosynthesis, but in nitrogen translocation, endoreduplication and phytohormones biosynthesis. Understanding the possible implication of folate pools during the nitrogen fixation and assimilation, might aid for new engineering targets, in relation to the two transformylations or the production of glycine by serine hydroxymethyltransferase during the de novo purine biosynthetic pathway. In this review, we intend to deliver and discuss the available evidence that supports a relevant role of folates during the symbiotic nitrogen fixation.

Resumen

Los folatos son metabolitos multifuncionales en las plantas, esenciales para la división celular, la síntesis de ácidos nucleicos y de aminoácidos. Durante la fijación simbiótica de nitrógeno en leguminosas, estos cofactores son necesarios para la biosíntesis de novo de purinas, lo que significa que los cambios en los reservorios de folatos podrían afectar directamente el flujo de nitrógeno fijado hacia la planta. Su papel relacionado con la fijación simbiótica de nitrógeno aún no ha sido explorado, pero datos recientes sugieren un rol relevante durante los primeros pasos. Análisis transcriptómicos, metabolómicos y proteómicos indican que los folatos se acumulan en los tejidos simbióticos de las plantas, ya que están involucrados no solo en la biosíntesis de novo de purinas, sino también en la translocación de nitrógeno, la endorreduplicación y la biosíntesis de fitohormonas. Comprender la posible implicación de los reservorios de folatos durante la fijación y

Banuelos J, Martínez-Romero E, Montaño N, Camargo-Ricalde S. (2021). Folates in legume root nodules. Physiol Plant. 171: 447–52. https://doi.org/10.1111/ppl.13218

asimilación de nitrógeno, podría proporcionar nuevos objetivos de ingeniería, en relación con las dos transformilaciones o la producción de glicina por la serina hidroximetiltransferasa durante la vía biosintética de purinas de novo. En esta revisión, pretendemos presentar y discutir la evidencia disponible que apoya un papel relevante de los folatos durante la fijación simbiótica de nitrógeno.

1 Introducción

Las leguminosas forman nódulos radiculares y fijan nitrógeno atmosférico en asociación simbiótica con rizobios (Kouchi et al., 2010). Bergersen (1954) demostró que el NH_4^+ fue el primer producto estable de la fijación simbiótica de N_2 (SNF) en los nódulos de leguminosas, lo cual implicaba el uso de la enzima nitrogenasa. Posteriormente, se demostró que los bacteroides (bacterias simbióticas activas en la fijación) excretan NH_4^+ en el citoplasma de la célula vegetal (Tegeder y Perchlik, 2018). Según la composición del fluido del xilema de las leguminosas que fijan N_2, estas se clasifican como exportadoras de amidas o ureidos (Schubert, 1986). En leguminosas de clima templado, los aminoácidos asparagina (Asn) y glutamina (Gln) son los principales productos de transporte para el N_2 fijado (Todd *et al*., 2006) esto se conoce como la ruta de las amidas; mientras que en las leguminosas tropicales, el proceso pasa por la biosíntesis y degradación de purinas de novo hasta ureidos (Atkins, 1987). En la ruta de los ureidos, se expresan significativamente más de 20 enzimas (O'Rourke et al., 2014) en comparación con cuatro en la ruta de las amidas (Smith y Atkins, 2002), sin incluir las enzimas utilizadas para los precursores de cada vía.

Banuelos J, Martínez-Romero E, Montaño N, Camargo-Ricalde S. (2021). Folates in legume root nodules. Physiol Plant. 171: 447–52. https://doi.org/10.1111/ppl.13218

En las leguminosas tropicales, el contenido de ureidos se correlaciona con la fijación simbiótica de N_2 (SNF) (Sanyal *et al*., 2018), lo que significa que los precursores en la ruta sintética influyen en el proceso de fijación de nitrógeno. Reynolds et al. (1982) y Atkins et al. (1997) notaron que la tasa de síntesis de sustratos de purinas de novo determinaba su contribución a la biosíntesis de ureidos y, probablemente, a la SNF. Por ejemplo, Atkins et al. (1988) usaron alopurinol para bloquear la biosíntesis de purinas en frijoles comunes bajo SNF, donde el N_2 fijado no se asimilaba, ni siquiera como Asn. Otros compuestos de N (Yamashita et al., 2019), transportadores (Carter y Tegeder, 2016), ARN de interferencia (Collier y Tegeder, 2012) y enzimas (Carter y Tegeder, 2016; Matamoros et al., 2018; Le Deunff et al., 2019) de la ruta de síntesis de ureidos han demostrado influir en la SNF (Schwember et al., 2019). Estos experimentos han proporcionado evidencia de que existen más de un compuesto o mecanismos relacionados que regulan la SNF.

2 Folatos como precursores de purinas

Las purinas se sintetizan de novo a partir de pequeñas moléculas que incluyen 5-fosforibosil-1-pirofosfato (PRPP), glutamina, aspartato, dióxido de carbono, derivados de 10-formil-tetrahidrofolato (10-CHO-THF) y glicina (Zrenner et al., 2006). Dos de estas moléculas pertenecen al metabolismo de los folatos: el 10-CHO-THF, que se utiliza para dos transformilaciones (Mitchell et al., 1986), y la glicina (gly), que en un paso anterior utiliza

Banuelos J, Martínez-Romero E, Montaño N, Camargo-Ricalde S. (2021). Folates in legume root nodules. Physiol Plant. 171: 447–52. https://doi.org/10.1111/ppl.13218

serina y tetrahidrofolato (THF) para la interconversión de serina a glicina (Figura 1).

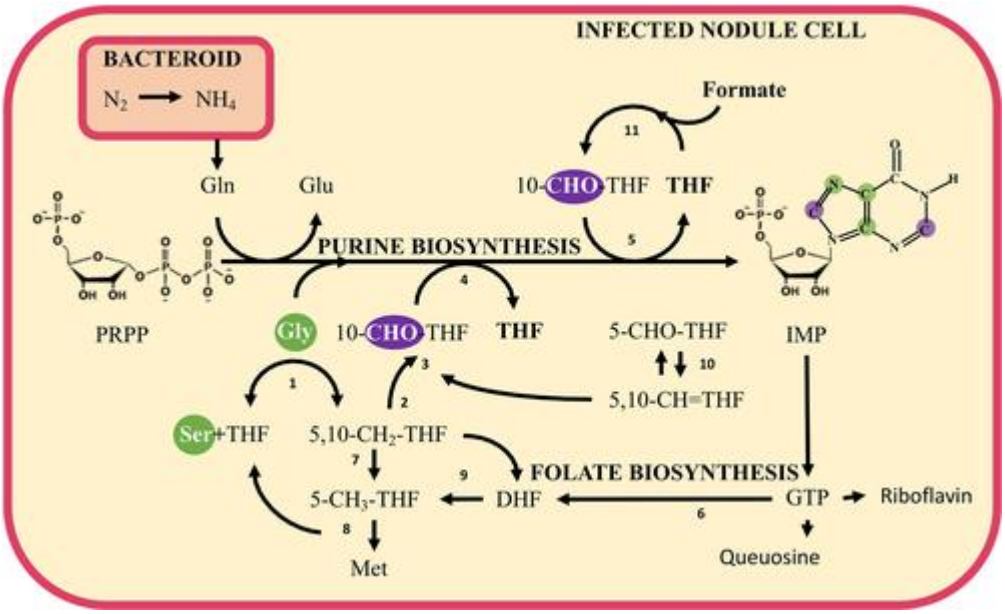


Figura 1. Uso general de los derivados de folato durante la fijación de nitrógeno, la biosíntesis de purinas de novo y las enzimas de biosíntesis de folato directamente involucradas en la fijación simbiótica de N_2. 1, SHMT; 2, 5,10-CH2-THF deshidrogenasa; 3, cicloliasa de 5,10-CH=THF; 4, GAR transformilasa; 5, AICAR transformilasa; 6, GTP cicloliasa; 7, 5,10-CH2-THF reductasa; 8, metionina sintasa; 9, dihidrofolato reductasa; 10, 5-CHO-THF cicloligasa; 11, formato THF ligasa; PRPP, 5-fosforibosil-1-pirofosfato; IMP, monofosfato de inosina; GTP, trifosfato de guanosina. Los círculos verdes y púrpuras indican los donantes de carbono para el anillo de purina. (Imagen realizada por Jacob Banuelos).

Los folatos y sus derivados son moléculas tripartitas compuestas por pterina, p-aminobenzoato (pABA) y residuos de glutamato. En las plantas, los folatos solo se sintetizan en las mitocondrias; las pterinas se producen en el citosol y el pABA en los plastidios (Hanson y Gregory, 2011), mientras que, en las bacterias, la ruta completa está presente en el citosol (de Crécy-Lagard et al., 2007).

Banuelos J, Martínez-Romero E, Montaño N, Camargo-Ricalde S. (2021). Folates in legume root nodules. Physiol Plant. 171: 447–52. https://doi.org/10.1111/ppl.13218

Además de su papel en la biosíntesis de purinas de novo, los folatos contribuyen a otras funciones metabólicas: son cofactores que actúan como transportadores de unidades de un carbono (1C) en reacciones enzimáticas, están involucrados en la metilación del ADN y la biosíntesis de ácidos nucleicos (Smith y Atkins, 2002), etileno (Wang et al., 2002), S-adenosilmetionina, metionina, glicina y serina (Hanson y Gregory, 2011).

El grado de influencia del metabolismo de los folatos durante la SNF no ha sido estudiado directamente, aunque existe evidencia acumulada proteómica, metabolómica y transcriptómica que sugiere que los folatos juegan un papel relevante durante la simbiosis. Aquí, tenemos la intención de proporcionar y discutir la evidencia disponible que respalda el papel relevante de los folatos durante la SNF.

3 Folatos para las transformilaciones en la biosíntesis de purinas

La biosíntesis de purinas de novo involucra dos transformilaciones completadas por la fosforibosilglicinamida (GAR) y la fosforibosilaminoimidazolcarboxamida (AICAR) transformilasa (Zrenner et al., 2006). Ambas enzimas se expresan significativamente durante la fijación activa de nitrógeno en los nódulos radiculares de soja en comparación con las raíces no infectadas (Cuadro 1), Sugiriendo que habría una demanda significativa de moléculas de 10-CHO-THF para ambos pasos. En las plantas, hay dos pasos enzimáticos que las sintetizan: la hidrólisis de 5,10-metenil tetrahidrofolato (5,10-CH=THF) por la 5,10-CH=THF ciclohidrolasa y la asimilación de formato de THF por la formato THF ligasa (Figura 1) (Gorelova et al., 2019). Si la vía de biosíntesis de purinas de novo aumenta durante la SNF, debería ocurrir un incremento correspondiente en la expresión de genes o en las

Banuelos J, Martínez-Romero E, Montaño N, Camargo-Ricalde S. (2021). Folates in legume root nodules. Physiol Plant. 171: 447–52. https://doi.org/10.1111/ppl.13218

actividades enzimáticas. Considerando esta observación, Tajima et al. (2004) sugirieron que los reservorios de folatos en los nódulos radiculares determinados podrían tener un posible papel regulador durante la SNF.

Cuadro 1. Cambio en la expresión de los transcritos que codifican para las enzimas relacionadas con los folatos, según lo determinado en los análisis de transcriptoma de los nódulos de soya en comparación con las raíces no inoculadas, de Yang et al. (2010) e Ishikawa et al. (2018).

	Soya	
	GSE104582[a]	**GSE18822[b]**
Log2 (FC) Enzima	**Nod/raíz**	**Nod/raíz**
5FCL	**2.2**	**1.0**
ACS	**5.0**	**−2.9**
ADCS	**4.5**	**2.1**
DHFR	**1.9**	**−1.0**
DHFS	**1.2**	**0.8**
DHNPA	**0.9**	
FPGS	**2.6**	**0.6**
GTP CH	**2.6**	
HPPK/DHPS	**2.0**	
MetS	**1.1**	**0.5**
5,10-CH_2-THF DH/CH	**5.1**	**4.5**

Banuelos J, Martínez-Romero E, Montaño N, Camargo-Ricalde S. (2021). Folates in legume root nodules. Physiol Plant. 171: 447–52. https://doi.org/10.1111/ppl.13218

	Soya	
	GSE104582[a]	**GSE18822[b]**
Log2 (FC) Enzima	**Nod/raíz**	**Nod/raíz**
AICAR TF	**3.9**	**2.4**
GAR TF	**5.8**	**4.0**
SAM DC	**2.2**	**0.6**
SAMS	**5.8**	**0.5**
SHMT	**3.2**	**2.0**
THFS	**−2.9**	**1.3**

Nota: FC: log2(cambio en la expresión); números en negrita: *q*-value y FDR <0.05; nod, nódulo de raíz activo; root, raíz sin inocular. [a] Ishikawa *et al*. (2018), [b] Yang *et al*. (2010).

Reynolds et al. (1982) encontraron un aumento de seis veces en la actividad específica de la 5,10-CH_2-THF deshidrogenasa/ciclohidrolasa en los nódulos radiculares de 23 días, una enzima bifuncional que oxida 5,10-CH_2-THF a 5,10-CH=THF y luego lo hidroliza a 10-CHO-THF (Vickers et al., 2009). Los transcriptomas de los nódulos radiculares de *Glycine max* (L.) de Yang et al. (2010) e Ishikawa et al. (2018) mostraron un aumento significativo en la expresión de 4.5 y 5.1 veces (respectivamente) en el gen 5,10-CH_2-THF deshidrogenasa/ciclohidrolasa, en comparación con las raíces no inoculadas (Cuadro 1). Al comparar esta información con análisis metabolómicos recientes de nódulos radiculares determinados, hay un aumento significativo en la concentración de 10-CHO-THF en los nódulos radiculares activos (Cuadro 2). Aunque se podría esperar un aumento significativo

Banuelos J, Martínez-Romero E, Montaño N, Camargo-Ricalde S. (2021). Folates in legume root nodules. Physiol Plant. 171: 447–52. https://doi.org/10.1111/ppl.13218

de folatos durante la biosíntesis de purinas en los nódulos radiculares, no se ha realizado la conexión experimental correspondiente. Con los datos transcriptómicos y metabolómicos recientes, ahora es posible explorar el papel de los folatos durante la SNF y diseñar experimentos que puedan corroborar el papel regulador de los folatos.

Cuadro 2. Datos metabolómicos de diferentes leguminosas durante la simbiosis con sus bacterias simbióticas. Compilado y analizado de Lardi et al. (2016, 2018).

Log2 (FC)	**Soya**					**Frijol común[b]**	**Caupí**	**Frijol mungo**	**Siratro[a]**
metabolitos	**Nod/raíz**	**Nod/ raíz**	**NifH/ raíz**	**NifA/nod**	**NifH/nod**	**Nod/ raíz**	**Nod/ raíz**	**Nod/ raíz**	**Nod/ raíz**
Glicina	1.1	−0.6	**−1.1**	−1.2	−1.7	1.3	**0.6**	1.3	1.0
L-Serina	1.0	**−1.4**	−1.4	**−2.1**	−2.1		1.2	0.6	**1.4**
Fumarato	**1.4**	0.0	**1.9**	−1.5	0.5	**1.2**	2.4	**3.2**	**2.6**
L-Asparagina	**2.4**	**−5.2**	**−4.1**	**−6.7**	−5.7		0.0	−0.6	2.2
Shikimato	**1.8**	**−0.2**	**0.7**	**−2.2**	**−1.2**	**0.5**	**1.6**	**1.6**	**3.1**
O-Succinil-L-homoserina	**2.0**	**0.9**	**1.8**	**−1.7**	**−0.8**	**3.4**	**6.0**	**3.3**	**6.4**
HMDHP-P_2	−0.3	0.1	−0.4	0.3	−0.2	**0.6**	**1.5**	**1.8**	**2.1**
5,10-CH = THF	**−3.0**	**−4.0**	**−4.8**	**−0.7**	**−1.6**	**1.6**	**0.8**	**0.4**	−0.7
10-CHO-THF	**1.0**	**0.9**	**0.8**	−0.3	**−0.4**	**4.2**	**1.1**	0.5	**1.5**

Banuelos J, Martínez-Romero E, Montaño N, Camargo-Ricalde S. (2021). Folates in legume root nodules. Physiol Plant. 171: 447–52. https://doi.org/10.1111/ppl.13218

Nota: FC: log2(cambio de expresión); números en negritas: *q*-value y FDR <0.05. [a] Lardi *et al*. (2016). [b] Lardi *et al*. (2018); nod se refieren a nódulos de la raíz activos, nifA y nifH son nódulos que no fija nitrógeno.

4 Folatos en la interconversión de serina a glicina

El otro paso que requiere folatos es la síntesis de glicina, ya que es uno de los primeros requisitos para la síntesis de purinas (Zrenner et al., 2006). La principal fuente de glicina en el nódulo radicular durante la SNF podría provenir de la conversión de serina por la serina/glicina hidroximetiltransferasa (SHMT). Este proceso produce glicina y 5,10-CH_2-THF (Igamberdiev y Kleczkowski, 2018), que luego se puede utilizar para sintetizar 10-CHO-THF (Gorelova et al., 2019).

SHMT ocupa una posición central en el flujo de carbono desde los fotosintatos hacia el anillo de purina en la síntesis de ureídos, ya que la glicina se incorpora completamente al anillo de purina, representando dos carbonos de la estructura, mientras que los otros dos carbonos provienen del sistema de transferencia de 1C a través de 10-CHO-THF (Mitchell et al., 1986) (Figura 1).

Durante la fotorrespiración, el flujo de interconversión de serina a glicina se desplaza hacia la síntesis de serina (Wang et al., 2015); mientras que, en tejidos no fotosintéticos como las raíces, el flujo va hacia la síntesis de glicina (Ireland y Hiltz, 1995; Igamberdiev y Kleczkowski, 2018). La dirección de la reacción catalizada por SHMT debería estar controlada por la oferta y demanda de unidades 1C y, por lo tanto, de folatos; y al igual que

Banuelos J, Martínez-Romero E, Montaño N, Camargo-Ricalde S. (2021). Folates in legume root nodules. Physiol Plant. 171: 447–52. https://doi.org/10.1111/ppl.13218

con 10-CHO-THF, el proceso general debería estar acoplado a la biosíntesis de purinas relacionada con la SNF.

Es posible que Reynolds et al. (1982) hayan proporcionado evidencia para esta afirmación, ya que midieron los nódulos radiculares de *G. max* de 23 días, que mostraron un aumento de tres veces en la actividad específica de una SHMT en comparación con las raíces no infectadas. En soya, se estima que hay entre 15 y 18 copias del gen SHMT; mientras que *Arabidopsis thaliana* tiene 7 y *Medicago truncatula* 8 (Lakhssassi et al., 2019; Zhang et al., 2019). Aunque cada enzima puede tener su papel metabólico en diferentes tejidos, una mayor expresión de al menos una de ellas podría satisfacer la demanda metabólica en los nódulos radiculares determinados durante la SNF, ya que la tasa de fijación de nitrógeno está acoplada a la vía biosintética de purinas.

En soya, el patrón de expresión génica diferencial de los 18 genes mostró que la SHMT más expresada se localizaba en los nódulos radiculares activos, y el aumento de la expresión en comparación con las raíces fue 13 veces (Lakhssassi et al., 2019).

Para la vía de las purinas, los genes que codifican para SHMT son buenos marcadores para validar los datos de perfiles de transcripción que implican la expresión génica específica o preferencial de nódulos (Yang et al., 2010). A la luz de esto, realizamos un análisis de expresión génica diferencial para genes relacionados con los folatos en la vía, utilizando GEO2R (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/) a partir de los conjuntos de datos de transcriptomas de *G. max* disponibles públicamente GSE18822 y GSE104582 (Yang et al., 2010; Ishikawa et al., 2018). Simultáneamente, realizamos un análisis univariado

Banuelos J, Martínez-Romero E, Montaño N, Camargo-Ricalde S. (2021). Folates in legume root nodules. Physiol Plant. 171: 447–52. https://doi.org/10.1111/ppl.13218

comparativo (Storey y Tibshirani, 2003; Lardi et al., 2018) con los datos metabolómicos disponibles de soja (Lardi et al., 2016, 2018). Como era de esperarse, encontramos que algunos de los metabolitos acumulados diferencialmente están relacionados con el metabolismo de los folatos en los nódulos, raíces no infectadas y nódulos que no fijan nitrógeno (Cuadro 2). De manera consistente con Lakhssassi *et al*. (2019), los conjuntos de datos transcriptómicos mostraron, al menos, una copia de una enzima SHMT (Glyma13g29410) que fue significativamente sobreexpresada en nódulos radiculares activos de soja (Cuadro 1), en comparación con raíces no inoculadas. El aumento en la expresión de SHMT, durante la SNF, podría tener el papel activo de suministrar glicina a la vía de biosíntesis de purinas de novo para producir ureidos. Esto se ve aún más respaldado por la acumulación significativa de glicina y serina en los nódulos radiculares de soja, frijol común, frijol mungo, caupí y sirato, en comparación con raíces no inoculadas (Cuadro 2).

Al comparar los nódulos radiculares que no fijan nitrógeno (mutante nifA) con los nódulos radiculares que sí lo fijan en soja (nod), hay una disminución en la concentración de estos dos metabolitos, en comparación con nódulos radiculares eficientes (Cuadro 2). Según el razonamiento de la vía purina-SNF, la demanda de estos metabolitos debería aumentar al mismo ritmo que el nitrógeno fijado simbióticamente.

Además del 10-CHO-THF y el THF para la glicina, hay otros precursores de la vía biosintética de los folatos que se acumulan de manera significativa en los nódulos radiculares activos (Cuadro 2). Dos de ellos, el shikimato y el 6-hidroximetildihidro-pterina difosfato (HMDHP-P2), precursores de las porciones pABA y pteridina de la molécula de folato (Hanson y Gregory, 2011), se acumulan significativamente en los nódulos radiculares

Banuelos J, Martínez-Romero E, Montaño N, Camargo-Ricalde S. (2021). Folates in legume root nodules. Physiol Plant. 171: 447–52. https://doi.org/10.1111/ppl.13218

activos. Finalmente, un aumento en el fumarato podría indicar que la formiato-THF-ligasa está formando 10-CHO-THF a partir de THF (Figura 1).

Aunque esta evidencia podría denotar una demanda de especies de folato para la SNF relacionada con la biosíntesis de purinas, otros procesos de simbiosis podrían requerir folatos. Esta sugerencia se basa en los patrones de expresión de algunas de las enzimas relacionadas con los folatos, así como en la acumulación de sus productos durante la SNF.

5 Etileno y folatos

El etileno es una fitohormona que induce el endociclo de manera dependiente de la concentración (Gendreau et al., 1999), está involucrado en la diferenciación de raíces (Nziengui et al., 2018) y su producción previene la iniciación de otros primordios de nódulos en la misma área de la raíz (van Zeijl et al., 2015). En mutantes insensibles al etileno de *M. truncatula* (van Zeijl et al., 2015) y *Lotus japonicus* (Murray et al., 2007), se pueden encontrar múltiples primordios de nódulos.

como donante de metilo para sintetizar metionina y regenerar el grupo metilo de la S-adenosil metionina (SAM) (González y Vera, 2019). El ácido aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) es producido por la ACC sintasa (ACS) utilizando SAM como sustrato, tras lo cual es oxidado por la ACC oxidasa (ACO) para sintetizar etileno (Figura 2) (Sauter et al., 2013).

Banuelos J, Martínez-Romero E, Montaño N, Camargo-Ricalde S. (2021). Folates in legume root nodules. Physiol Plant. 171: 447–52. https://doi.org/10.1111/ppl.13218

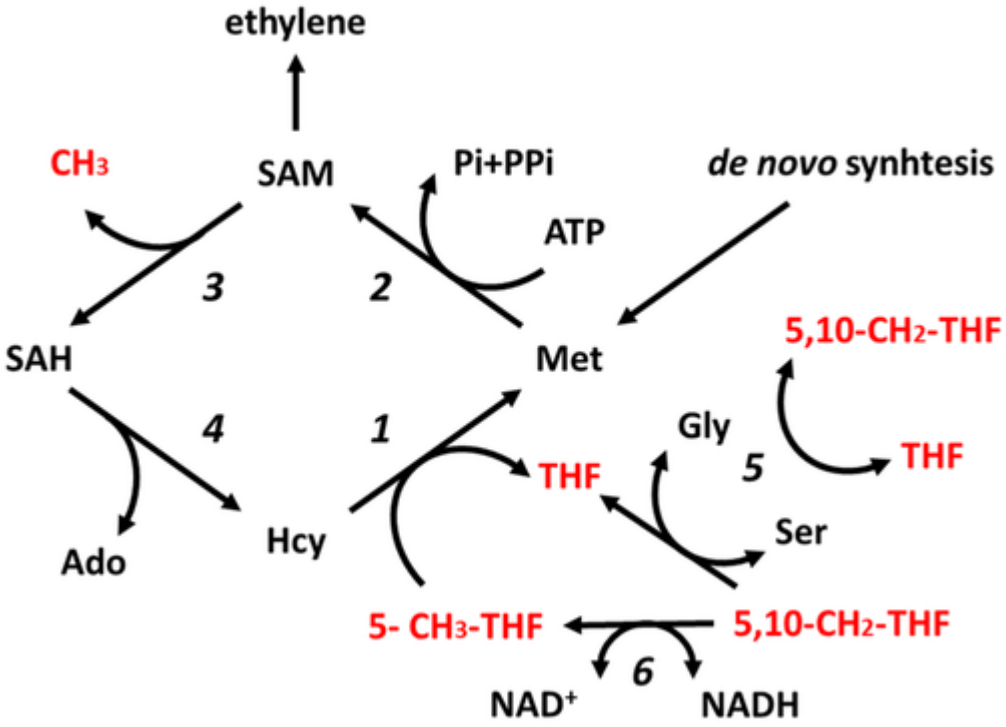


Figura 2. Resumen de las reacciones involucradas en el ciclo del metilo: 1, met sintasa; 2, SAM sintasa; 3, metiltransferasas; 4, SAH hidrolasa; 5, SHMT; 6, 5,10-CH2-THF reductasa; ado, adenosina (modificado de Rhaikainen et al., 2018) (imagen realizada por Jacob Banuelos).

En el transcriptoma de soja de Ishikawa et al. (2018), los genes para ACS, MetS y SAM sintasa están significativamente sobreexpresados (Cuadro 1), lo que indica que la biosíntesis de etileno podría estar activa. Los reservorios de folatos deberían estar disponibles para alimentar la ruta biosintética a través de la metionina, aunque estos no han sido medidos.

Un experimento anterior realizado por Arshad et al. (1993) mostró que la aplicación externa de metionina (10^{-6} g kg^{-1} suelo) a la leguminosa *Albizia lebbeck* L. (Fabaceae) tuvo un efecto significativo en el crecimiento general de la planta y en el peso seco de los nódulos

Banuelos J, Martínez-Romero E, Montaño N, Camargo-Ricalde S. (2021). Folates in legume root nodules. Physiol Plant. 171: 447–52. https://doi.org/10.1111/ppl.13218

radiculares. Esto significa que los reservorios de folatos podrían tener un impacto directo en la SNF a través de la producción de metionina o etileno, aunque se requiere una correlación entre los folatos y la fijación de nitrógeno en los nódulos radiculares.

6 Conclusiones

Como las plantas pueden sintetizar folatos de novo, proporcionan los reservorios necesarios para las rutas metabólicas durante la fijación de nitrógeno. Los folatos, como donadores y aceptores de 1C, están involucrados en la biosíntesis de purinas, al menos en dos pasos del proceso. Las dos transformilaciones durante la biosíntesis de purinas de novo requieren folatos en forma de 10-CHO-THF y su concentración muestra un aumento, desde el punto de vista transcriptómico y metabolómico.

Dado que se requiere glicina para la biosíntesis de purinas, los folatos en forma de THF son utilizados por la enzima SHMT, cuya actividad ha mostrado aumentar en varios estudios transcriptómicos en nódulos radiculares activos.

El grado de dependencia de los folatos aún está por definirse, pero la evidencia metabolómica y transcriptómica de diferentes leguminosas indica que podría ser significativa.

Como los folatos están involucrados en prácticamente todos los aspectos de la fisiología vegetal, los cambios en el metabolismo de los folatos pueden llevar a cambios importantes en el crecimiento y la productividad de las plantas, especialmente durante la simbiosis. La revisión presentada en este trabajo se centra únicamente en los folatos como metabolitos

Banuelos J, Martínez-Romero E, Montaño N, Camargo-Ricalde S. (2021). Folates in legume root nodules. Physiol Plant. 171: 447–52. https://doi.org/10.1111/ppl.13218

intermedios durante la simbiosis y, en cuanto a la evidencia indirecta, sugiere que los folatos tienen un papel relevante durante la simbiosis.

7 Referencias

Arshad, M., Hussain, A., Javed, M. y Frankenberger, W.T., Jr. (1993) Effect of soil applied L-methionine on growth, nodulation and chemical composition of *Albizia lebbeck* L. Plant and Soil, 148, 129–135.

Atkins, C.A. (1987) Metabolism and translocation of fixed nitrogen in the nodulated legume. Plant and Soil, 100, 157–169.

Atkins, C.A., Sanford, P.J., Storer, P.J. y Pate, J.S. (1988) Inhibition of nodule functioning in cowpea by a xanthine oxidoreductase inhibitor, allopurinol. Plant Physiologyogy, 88, 1229–1234.

Atkins, C.A., Smith, P. y Storer, P.J. (1997) Reexamination of the intracellular localization of de novo purine synthesis in cowpea nodules. Plant Physiologyogy, 113, 127–135.

Bergersen, F.J. (1954) Ammonia-an early stable product of nitrogen fixation by soybean root nodules. Australian Journal of Biological Sciences, 18, 1–9.

Carter, A.M. y Tegeder, M. (2016) Increasing nitrogen fixation and seed development in soybean requires complex adjustments of nodule nitrogen metabolism and partitioning processes. Current Biology, 26, 2044–2051.

Collier, R. y Tegeder, M. (2012) Soybean ureide transporters play a critical role in nodule development, function and nitrogen export. The Plant Journal, 72, 355–367.

de Crécy-Lagard, V., El Yacoubi, B., de la Garza, R., Noiriel, A. y Hanson, A.

D. (2007) Comparative genomics of bacterial and plant folate synthesis and salvage: predictions and validations. BMC Genomics, 8, 245.

Gendreau, E., Orbovic, V., Höfte, H. y Traas, J. (1999) Gibberellin and ethylene control endoreduplication levels in the *Arabidopsis thaliana* hypocotyl. Planta, 209, 513–516.

González, B. y Vera, P. (2019) Folate metabolism interferes with plant immunity through 1C methionine synthase-directed genome-wide DNA methylation enhancement. Molecular Plant, 12, 1227–1242.

González-Sama, A., de la Peña, T.C., Kevei, Z., Mergaert, P., Lucas, M.M., de Felipe, M.R., et al. (2006) Nuclear DNA endoreduplication and expression of the mitotic inhibitor ccs52 associated to determinate and lupinoid nodule organogenesis. MPMI, 19, 173–180.

Gorelova, V., Bastien, O., Clerck, O.D., Lespinats, S., Rébeillé, F. y Straeten, D.V.D. (2019) Evolution of folate biosynthesis and metabolism across algae and land plant lineages. Scientific Reports, 9, 1–16.

Hanson, A.D. y Gregory, J.F. (2011) Folate biosynthesis, turnover, and transport in plants. Annual Review of Plant Biology, 62, 105–125.

Banuelos J, Martínez-Romero E, Montaño N, Camargo-Ricalde S. (2021). Folates in legume root nodules. Physiol Plant. 171: 447–52. https://doi.org/10.1111/ppl.13218

Igamberdiev, A.U. y Kleczkowski, L.A. (2018) The glycerate and phosphorylated pathways of serine synthesis in plants: the branches of plant glycolysis linking carbon and nitrogen metabolism. Frontiers in Plant Science, 9, 318.

Ireland, R.J. y Hiltz, D.A. (1995) Glycine and serine synthesis in nonphotosynthetic tissues. In: Wallsgrove, R.M. (Ed.) Amino acids and their derivatives in higher plants. Cambridge, UK: Cambridge University Press, pp. 111–118.

Ishikawa, S., Ono, Y., Ohtake, N., Sueyoshi, K., Tanabata, S. y Ohyama, T. (2018) Transcriptome and metabolome analyses reveal that nitrate strongly promotes nitrogen and carbon metabolism in soybean roots, but tends to repress it in nodules. Plants, 7, 32.

Kondorosi, E. y Kondorosi, A. (2004) Endoreduplication and activation of the anaphase-promoting complex during symbiotic cell development. FEBS Letters, 567, 152–157.

Kondorosi, E., Roudier, F. y Gendreau, E. (2000) Plant cell-size control: growing by ploidy? Current Opinion in Plant Biology, 3, 488–492.

Kondorosi, E., Redondo-Nieto, M. y Kondorosi, A. (2005) Ubiquitinmediated proteolysis. To be in the right place at the right moment during nodule development. Plant Physiologyogy, 137, 1197–1204.

Kouchi, H., Imaizumi-Anraku, H., Hayashi, M., Hakoyama, T., Nakagawa, T., Umehara, Y., et al. (2010) How many peas in a pod? Legume genes responsible for mutualistic symbioses underground. Plant y Cell Physiology, 51, 1381–1397.

Banuelos J, Martínez-Romero E, Montaño N, Camargo-Ricalde S. (2021). Folates in legume root nodules. Physiol Plant. 171: 447–52. https://doi.org/10.1111/ppl.13218

Lakhssassi, N., Patil, G., Piya, S., Zhou, Z., Baharlouei, A., Kassem, M.A., et al. (2019) Genome reorganization of the GmSHMT gene family in soybean showed a lack of functional redundancy in resistance to soybean cyst nematode. Scientific Reports, 9, 1–16.

Lardi, M., Murset, V., Fischer, H.M., Mesa, S., Ahrens, C.H., Zamboni, N., et al. (2016) Metabolomic profiling of *Bradyrhizobium diazoefficiens* induced root nodules reveals both host plant-specific and developmental signatures. International Journal of Molecular Sciences, 17, 815.

Lardi, M., Liu, Y., Giudice, G., Ahrens, C.H., Zamboni, N. y Pessi, G. (2018) Metabolomics and transcriptomics identify multiple downstream targets of *Paraburkholderia phymatum* σ54 during symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. International Journal of Molecular Sciences, 19, 1049.

Le Deunff, E., Beauclair, P., Deleu, C. y Lecourt, J. (2019) Inhibition of aminotransferases by aminoethoxyvinylglycine triggers a nitrogen limitation condition and deregulation of histidine homeostasis that impact root and shoot development and nitrate uptake. Frontiers in Plant Science, 10, 1387.

Maróti, G. y Kondorosi, É. (2014) Nitrogen-fixing rhizobium-legume symbiosis: are polyploidy and host peptide-governed symbiont differentiation general principles of endosymbiosis? Frontiers in Microbiology, 5, 326.

Matamoros, M.A., Kim, A., Peñuelas, M., Ihling, C., Griesser, E., Hoffmann, R., et al. (2018) Protein carbonylation and glycation in legume nodules. Plant Physiologyogy, 177, 1510–1528.

Maunoury, N., Redondo-Nieto, M., Bourcy, M., de, V.W.V., Alunni, B., Laporte, P., et al. (2010) Differentiation of symbiotic cells and endosymbionts in *Medicago truncatula* nodulation are coupled to two transcriptome-switches. PLoS ONE, 5, e9519.

Mitchell, M.K., Reynolds, P.H.S. y Blevins, D.G. (1986) Serine hydroxymethyltransferase from soybean root nodules 1. Plant Physiologyogy, 81, 553–557.

Murray, J.D., Karas, B.J., Sato, S., Tabata, S., Amyot, L. y Szczyglowski, K. (2007) A cytokinin perception mutant colonized by rhizobium in the absence of nodule organogenesis. Science, 315, 101–104.

Nziengui, H., Lasok, H., Kochersperger, P., Ruperti, B., Rébeillé, F., Palme, K., et al. (2018) Root gravitropism is regulated by a crosstalk between Para-aminobenzoic acid, ethylene, and auxin. Plant Physiologyogy, 178, 1370–1389.

O'Rourke, J.A., Iniguez, L.P., Fu, F., Bucciarelli, B., Miller, S.S., Jackson, S.A., et al. (2014) An RNA-Seq based gene expression atlas of the common bean. BMC Genomics, 15, 866.

Rahikainen, M., Alegre, S., Trotta, A., Pascual, J. y Kangasjärvi, S. (2018) Trans-methylation reactions in plants: focus on the activated methyl cycle. Physiol Plantarum, 162, 162–176.

Reynolds, P.H.S., Boland, M.J., Blevins, D.G., Schubert, K. y Randall, D.D. (1982) Enzymes of amide and ureide biogenesis in developing soybean nodules. Plant Physiologyogy, 69, 1134–1138.

Sanyal, D., Goos, R.J. y Chatterjee, A. (2018) Determining symbiotic nitrogen fixation in dry bean cultivars using ureide method and isotope dilution techniques. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 49, 2042–2052.

Sauter, M., Moffatt, B., Saechao, M.C., Hell, R. y Wirtz, M. (2013) Methionine salvage and S-adenosylmethionine: essential links between sulfur, ethylene and polyamine biosynthesis. Biochemical Journal, 451, 145–154.

Schubert, K.R. (1986) Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport, and metabolism. Annual Review of Plant Physiologyogy, 37, 539–574.

Schwember, A.R., Schulze, J., del Pozo, A. y Cabeza, R.A. (2019) Regulation of symbiotic nitrogen fixation in legume root nodules. Plants, 8, 333.

Smith, P. y Atkins, C. (2002) Purine biosynthesis. Big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation. Plant Physiologyogy, 128, 793–802.

Storey, J.D. y Tibshirani, R. (2003) Statistical significance for genomewide studies. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100, 9440–9445.

Banuelos J, Martínez-Romero E, Montaño N, Camargo-Ricalde S. (2021). Folates in legume root nodules. Physiol Plant. 171: 447–52. https://doi.org/10.1111/ppl.13218

Tajima, S., Nomura, M. y Kouchi, H. (2004) Ureide biosynthesis in legume nodules. Frontiers in Bioscience, 9, 1374–1381.

Tegeder, M. y Perchlik, M. (2018) The importance of organic nitrogen transport processes for plant productivity and nitrogen use efficiency. In: Shrawat, A., Zayed, A. y Lightfoot, D.A. (Eds.) Engineering nitrogen utilization in crop plants. Cham: Springer International Publishing, pp. 233–253.

Todd, C.D., Tipton, P.A., Blevins, D.G., Piedras, P., Pineda, M. y Polacco, J.C. (2006) Update on ureide degradation in legumes. Journal of Experimental Botany, 57, 5–12.

van Zeijl, A., Op den Camp, R.H.M., Deinum, E.E., Charnikhova, T., Franssen, H., Op den Camp, H.J.M., et al. (2015) *Rhizobium* lipochitooligosaccharide signaling triggers accumulation of cytokinins in *Medicago truncatula* roots. Molecular Plant, 8, 1213–1226.

Vickers, T.J., Murta, S.M.F., Mandell, M.A. y Beverley, S.M. (2009) The enzymes of the 10-formyl-tetrahydrofolate synthetic pathway are found exclusively in the cytosol of the trypanosomatid parasite *Leishmania major*. Molecular and Biochemical Parasitology, 166, 142–152.

Vinardell, J.M., Fedorova, E., Cebolla, A., Kevei, Z., Horvath, G., Kelemen, Z., et al. (2003) Endoreduplication mediated by the anaphase-promoting complex activator ccs52a is required for symbiotic cell differentiation in *Medicago truncatula* nodules. Plant Cell, 15, 2093–2105.

Banuelos J, Martínez-Romero E, Montaño N, Camargo-Ricalde S. (2021). Folates in legume root nodules. Physiol Plant. 171: 447–52. https://doi.org/10.1111/ppl.13218

Wang, D., Liu, H., Li, S., Zhai, G., Shao, J. y Tao, Y. (2015) Characterization and molecular cloning of a serine hydroxymethyltransferase 1 (OsSHM1) in rice. Journal of Integrative Plant Biology, 57, 745–756.

Wang, K.L.C., Li, H. y Ecker, J.R. (2002) Ethylene biosynthesis and signaling networks. Plant Cell, 14, S131–S151.

Wiggers, R.J. (1990) DNA content and variation in chromosome number in plant cells affected by *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. Phytopathology, 80, 1391.

Yamashita, N., Tanabata, S., Ohtake, N., Sueyoshi, K., Sato, T., Higuchi, K., et al. (2019) Effects of different chemical forms of nitrogen on the quick and reversible inhibition of soybean nodule growth and nitrogen fixation activity. Frontiers in Plant Science, 10, 131.

Yang, S.S., Valdés-López, O., Xu, W.W., Bucciarelli, B., Gronwald, J.W., Hernández, G., et al. (2010) Transcript profiling of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using the GeneChip®soybean genome Array: optimizing analysis by masking biased probes. BMC Plant Biology, 10, 85.

Zhang, J., Li, M., Bryan, A.C., Geun Yoo, C., Rottmann, W., Winkeler, A.K., et al. (2019) Overexpression of a serine hydroxymethyltransferase increases biomass production and reduces recalcitrance in the bioenergy crop Populus. Sustein Energ Fuels, 3, 195–207.

Zrenner, R., Stitt, M., Sonnewald, U. y Boldt, R. (2006) Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. Annual Review of Plant Biology, 57, 805–836

Banuelos J, Martínez-Romero E, Montaño N, Camargo-Ricalde S. (2021). Folates in legume root nodules. Physiol Plant. 171: 447–52. https://doi.org/10.1111/ppl.13218

CAPÍTULO III

Rhizobium tropici and riboflavin amendment condition arbuscular mycorrhiza colonization in *Phaseolus vulgaris* L.

La adición de *Rhizobium tropici* y riboflavin condicionan la colonización micorrizógena arbuscular en *Phaseolus vulgaris* L.

https://www.mdpi.com/2073-4395/13/3/876

Jacob Banuelos[1], Esperanza Martínez-Romero [2,†], Noé Manuel Montaño[3]

and Sara Lucía Camargo-Ricalde[3,*,†]

1 Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico City 09310, Mexico; llacoob@gmail.com

2 Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Cuernavaca 62210, Mexico

3 Departamento de Biología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco 186, Mexico City 09310, Mexico

Abstract

Phaseolus vulgaris L. (Fabaceae) forms symbioses with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and nitrogen-fixing rhizobia (NFB). The tripartite relationship uses molecular signals to establish intracellular symbioses in roots. The goal of this study was to determine if *Rhizobium tropici* CIAT 899 and exogenous riboflavin (vitamin B2) have an effect on AMF

Banuelos J, Martínez-Romero E, Montaño NM, Camargo-Ricalde SL.(2023) *Rhizobium tropici* and Riboflavin Amendment Condition Arbuscular Mycorrhiza Colonization in *Phaseolus vulgaris* L. *Agronomy*; 13(3):876. https://doi.org/10.3390/agronomy13030876

species selection and root colonization of *P. vulgaris*. Using SSU rRNA fragment amplification of DNA extracted from *P. vulgaris* roots, we found that the presence of *R. tropici* altered the relative distribution of AMF species. *Dominikia bernensis* (Ohel) was the most abundant AMF species in *P. vulgaris* roots but when *R. tropici* was co-inoculated, Glomus species dominated. Rhizobacteria such as *R. tropici*, secrete riboflavin and could affect AMF symbiosis. Addition of 50 µM riboflavin to *P. vulgaris*, increased plant growth (28%), dry nodule weight (18%), AMF colonization (248%) and mycorrhizal vesicle frequency (56%) in bean roots. 3.12 and 12.5 µM riboflavin favored the presence of *Glomus macrocarpum* in *P. vulgaris* roots. This work provides the basis to further study of rhizobial and mycorrhizal co-inoculation of *Phaseolus vulgaris* bean.

Keywords:

arbuscular mycorrhiza; species composition; riboflavin (vitamin B2); nitrogen fixing; vesicles; *Dominikia*; *Glomus macrocarpum*; *Rhizophagus.*

Resumen

Phaseolus vulgaris L. (Fabaceae) forma simbiosis con hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y rizobios fijadores de nitrógeno (NFR). La relación tripartita utiliza señales moleculares para establecer simbiosis intracelulares en las raíces. El objetivo de este estudio fue determinar si *Rhizobium tropici* CIAT 899 y la riboflavina exógena (vitamina B2) tienen un efecto en la selección de especies de HMA y en la colonización de las raíces de *P. vulgaris*. Utilizando la amplificación de fragmentos de ARNr SSU de ADN extraído de raíces de *P. vulgaris*, encontramos que la presencia de *R. tropici* alteró la distribución relativa de las especies de HMA. *Dominikia bernensis* (Ohel) fue la especie de HMA más abundante en las raíces de *P. vulgaris*, pero cuando se co-inoculó con *R. tropici*, las especies de *Glomus*

dominaron. Las rizobacterias, como *R. tropici*, secretan riboflavina y podrían afectar la simbiosis de HMA. La adición de 50 μM de riboflavina a *P. vulgaris* aumentó el crecimiento de la planta (28%), el peso seco de los nódulos (18%), la colonización de HMA (248%) y la frecuencia de vesículas micorrízicas (56%) en las raíces de frijol. Las concentraciones de 3.12 y 12.5 μM de riboflavina favorecieron la presencia de *Glomus macrocarpum* en las raíces de *P. vulgaris.* Este trabajo sienta las bases para el estudio adicional de la co-inoculación de rizobios y micorrizas en frijol *P. vulgaris*.

1 Introducción

Phaseolus vulgaris L. (Fabaceae) es una leguminosa ampliamente utilizada en la nutrición humana y puede formar asociaciones simbióticas con hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y rizobacterias fijadoras de nitrógeno (NFR) [1]. Entre las especies bacterianas que forman nódulos radiculares en *P. vulgaris*, *Rhizobium etli*, *Rhizobium phaseoli* y *Rhizobium tropici* [2,3]. *R. tropici* tiene una notable resistencia al estrés [4] y se ha utilizado con éxito como inoculante de *P. vulgaris* inoculant en América del Sur [5]. Diversos HMA se han utilizado como inoculantes en la agricultura [6] para promover la movilización de nutrientes [7,8], la absorción de minerales [9] y el crecimiento general de las plantas [10]. En cierta medida, las plantas inoculadas con HMA mejoraron la fotosíntesis y regulan osmoprotectores [11]. Entre los hongos micorrízicos arbusculares, las especies modelo *Rhizophagus irregularis* y *Funneliformis mosseae* son de las más utilizadas [11], aumentando significativamente los rendimientos en cultivos de importancia global [12,13], incluyendo *P. vulgaris* [14]. En cinco leguminosas diferentes inoculadas con *Funneliformis mosseae*, el mayor número de esporas, el peso de los nódulos y el porcentaje de colonización de HMA se encontraron en *Vigna radiata* L. (Wilczek), en comparación con otras plantas hospedadoras

Banuelos J, Martínez-Romero E, Montaño NM, Camargo-Ricalde SL. (2023) *Rhizobium tropici* and Riboflavin Amendment Condition Arbuscular Mycorrhiza Colonization in *Phaseolus vulgaris* L. *Agronomy* 13(3):876. https://doi.org/10.3390/agronomy13030876

como *Glycine max* L. [15]. En diferentes cultivares de *Coffea arabica*, la combinación de tres especies de HMA seleccionadas fue más eficiente que la inoculación con una sola especie, aunque el efecto dependía del cultivar de *C. arabica* [16]. Se ha demostrado que las comunidades nativas de HMA interactúan positivamente con la planta hospedadora bajo condiciones de estrés, en contraste con los HMA introducidos [17].

La inoculación con rizobios se ha practicado durante más de cien años, mientras que la co-inoculación de rizobios y micorrizas es más reciente y conduce a mayores rendimientos en cultivos compatibles [18]. La co-inoculación generalmente conduce a un aumento en la colonización de HMA, pero depende de las especies de HMA [19]. En trébol, la doble inoculación de *Rhizophagus intraradices* y *Rhizobium trifolii* mostró que este último estimulaba la colonización micorrízica, y ambos tenían un efecto aditivo sobre los metabolitos de nitrógeno (N) y la asimilación de N [20]. Sin embargo, la presencia de simbiontes micorrízicos y rizobiales en las raíces de leguminosas no siempre fue beneficiosa para la planta [21]. La mayor asimilación de N podría permitir a la planta albergar otros organismos beneficiosos, especialmente en condiciones desfavorables [22]. La interacción entre los hongos micorrízicos y los simbiontes rizobiales con el hospedador podría afectar la eficiencia o la evolución de cada simbiosis, y el desafío en una simbiosis tripartita es comprender cómo la diversidad taxonómica de los HMA interactúa con las bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno y cómo afecta al hospedador. Se ha demostrado que la colonización de HMA en caupí (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) y la composición de especies de HMA en las raíces se cambió cuando estuvo presente *Sinorhizobium meliloti* (Dangeard) [19].

Para lograr la mayor eficiencia de HMA y NFR, la selección de especies de HMA compatibles con NFR es esencial [23]. Dado que hay más de 400 especies de HMA, el uso de inoculantes con múltiples cepas podría aumentar la interacción con los NFR para seleccionar las especies de HMA que son funcionales en la interacción tripartita. La respuesta de los HMA puede estar relacionada con las cepas rizobiales que se asocian específicamente con la planta. Las bacterias fijadoras de nitrógeno pueden estimular y mejorar la colonización micorrízica incluso antes de la formación de nódulos [24]. Es necesario desarrollar una estrategia sólida para aumentar la eficiencia en el uso de inoculantes multiespecie.

La simbiosis micorrízica es evolutivamente más antigua que la simbiosis rizobial y se considera la "madre de las simbiosis de plantas" [25,26]. Tanto los rizobios como las micorrizas utilizan una vía genética simbiótica común en las plantas leguminosas [27]. Esta vía de señalización compartida afecta a ambos simbiontes; por ejemplo, la colonización de HMA puede no ocurrir en algunos mutantes de leguminosas no nodulantes [28], ya que los HMA pueden depender de las mismas señales que los rizobios para facilitar la infección. Ambas asociaciones mutualistas están presentes en la rizosfera, y a pesar de sus aparentes diferencias, varias señales moleculares son reclutadas por la célula vegetal para ambas simbiosis [29]. Además, el factor Myc de las micorrizas y los factores Nod de los rizobios tienen estructuras químicas similares [30] y la aplicación de factores Nod externos aumenta la colonización micorrízica [31].

La riboflavina (vitamina B2) es el precursor de las coenzimas transportadoras de electrones flavina adenina dinucleótido (FAD) y flavina mononucleótido (FMN). Estas coenzimas están involucradas en procesos metabólicos que incluyen la producción de energía y actúan como antioxidantes. La riboflavina y el lumicromo pueden aumentar el crecimiento de los brotes y

la disponibilidad de CO_2 en las raíces [32]. La riboflavina es producida por algunas rizobacterias [33] que requieren CO_2 exógeno para el crecimiento de los nódulos [34]. Cepas de S. meliloti que sobreproducen riboflavina exhibieron un 55% más de eficiencia en la colonización de raíces [35], y cantidades nanomolares de riboflavina pueden estimular la colonización de *S. meliloti* en alfalfa [36]. La riboflavina de los rizobios podría beneficiar no solo a las plantas, sino también a otros simbiontes como los HMA, ya que la riboflavina promueve el crecimiento de hifas en los HMA [37] y estimula la nodulación rizobial [38]. Aún no se ha determinado en qué medida la riboflavina puede afectar el desarrollo de los HMA durante la co-inoculación con NFR. El objetivo de esta investigación fue explorar si *Rhizobium tropici* CIAT 899 y la riboflavina exógena administrada a las plantas tienen un efecto en la selección de especies de HMA (de una mezcla de hongos) por *Phaseolus vulgaris.*

2. Materiales y métodos

2.1. Diseño Experimental

Se realizaron dos experimentos bajo condiciones de invernadero. En el primero, un experimento completamente aleatorio, con cuatro tratamientos y cuatro repeticiones fue llevado a cabo. Las plántulas de *P. vulgaris* fueron inoculadas con una mezcla de HMA y se regaron semanalmente durante 35 días con cuatro concentraciones de riboflavina (50, 25, 12.5 y 3.12 μM).

En el segundo experimento, se estableció un diseño fijo trifactorial: plantas micorrizadas, *R. tropici* CIAT 899, con o sin riboflavina, con ocho repeticiones. Basado en los resultados del primer experimento, se seleccionó una concentración de riboflavina que tuvo un efecto significativo en los HMA. Los tratamientos sin HMA o riboflavina fueron los controles.

Ambos experimentos se realizaron bajo condiciones de invernadero (humedad relativa promedio 78%, temperatura promedio 20 °C) en la Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Veracruzana (N 19′ 30″ 54–W 96′ 55″ 05).

2.2. Suelo

El suelo utilizado en las macetas tenía las siguientes características: P 63.5 (%); fósforo disponible (P), 40.52 mg kg^{-1} (Olsen); amonio (NH_4-N), 34.28 mg kg^{-1} (método salicilato); nitratos (NO_3-N), 36.28 mg kg^{-1}; hierro extraíble con pirofosfato (Fe) (PeF), 1016 mg kg^{-1}; materia orgánica (OM), 7.13% (Walkley-Black); carbono orgánico (OC), 4.14% (Walkley-Black); sodio (Na), 0.029 mol kg^{-1} (espectrometría de absorción atómica); calcio (Ca) 0.0173 mol kg^{-1} (espectrometría de absorción atómica) y magnesio (Mg) 0.0327 mol kg^{-1} espectrometría de absorción atómica). El pH fue de 6.7 y se obtuvo en una suspensión de suelo

desionizada (1:2 p/v). El análisis del suelo fue realizado por el Laboratorio de Análisis de Suelos del INECOL, Xalapa, México. El suelo utilizado fue esterilizado en autoclave para evitar la competencia de microbios nativos [11]. El suelo fue adquirido en "Viveros El Olmo", una tienda de plantas ubicada en Xalapa, Veracruz, México.

2.3. Material vegetal

Phaseolus vulgaris L. cv Negro Jamapa es una variedad de frijol liberada en Veracruz, México, hace sesenta años [39]. Las semillas de frijol Negro Jamapa fueron desinfectadas superficialmente [40] tratándolas con etanol al 70% durante 1 minuto, seguido de hipoclorito de sodio al 1.2% durante 15 minutos, enjuagándolas cuatro veces con agua estéril, una vez

con tiosulfato de sodio al 2% y un enjuague final con agua. Las semillas fueron germinadas en arena de cuarzo esterilizada a capacidad total de retención de agua (42.7%) antes de ser plantadas en macetas de 1 L (13 cm de diámetro) con suelo autoclavado (120 °C durante 40 minutos).

2.4. Concentraciones de Riboflavina (Vitamina B2)

Se preparó una solución madre de 50 µM de riboflavina de Sigma-Aldrich (BioReagent para cultivo celular) en agua estéril desionizada, agitando durante 10 minutos en la oscuridad y almacenada a 4 °C antes de su uso. Se hicieron diluciones de la solución madre con agua estéril desionizada para obtener concentraciones de 50, 25, 12.5 y 3.12 µM. Se añadieron 50 mL de riboflavina a la planta a 2 cm del tallo por la noche para evitar la degradación de la riboflavina. Se aplicó cinco días después de la inoculación micorrízica y cada cinco días hasta la cosecha. Los tratamientos de control fueron regados con agua estéril desionizada. Inicialmente, se probaron estas cuatro concentraciones de riboflavina y luego solo se utilizó 50 µM en presencia de ambos simbiontes.

2.5. Hongos Micorrizógenos Arbusculares

La mezcla de HMA fue proporcionada por el Laboratorio de Organismos Benéficos de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Veracruzana, México. El inoculante utilizado ha sido probado como altamente efectivo en piña [41], cultivos de cobertura [42], aguacate [43], y está disponible comercialmente como Rhizofermic. El inoculante solo había sido identificado morfológicamente y aquí identificamos su contenido por primera vez mediante análisis de secuencias de ARNr SSU, identificando 14 especies; solo la especie de *Acaulospora* no pudo ser determinada (Cuadro 1).

Cuadro 1. Lista de especies de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) contenidas en el inóculo identificadas por análisis de secuencia de ARNr SSU.

Familia	**Especies**	**Sinónimo**
Archaeosporaceae	*Archaeospora trappei* (R.N. Ames y Linderman .B. Morton y D. Redecker	*Acaulospora trappei*
Acaulosporaceae	*Acaulospora* sp	
Gigasporaceae	*Dentiscutata savannicola* (R.A. Herrera y Ferrer . Walker y A. Schüßler	*Gigaspora savannicola* *Fuscutata savannicola* *Scutellospora savannicola*
	Gigaspora rosea T.H. Nicolson y N.C. Schenck	
	Tetraspora pellucida (T.H. Nicolson y N.C chenck) Oehl, F.A. Souza y Sieverding	*Scutellospora pellucida*
Diversisporaceae	*Diversispora varaderana* J. Błaszkowski, G hwat, Kovács y Góralska	
Claroideoglomeraceae	*Claroideoglomus etunicatum* (W.N. Becker erd.) C. Walker y A. Schüßler	*Glomus etunicatum*
Glomeraceae	*Dominikia bernensis* Oehl, Palenz., Sánchez astro, N.M.F. Sousa y G.A. Silva	
	Dominikia lithuanica J. Błaszkowski, G. Chwat . Góralska	
	Rhizophagus aggregatus (N.C. Schenck y G.S m.) C. Walker	*Glomus aggregatum;* *Rhizoglomus aggregatum*
	Glomus macrocarpum T.H. Nicolson y Gerd	*Endogone macrocarpa*
	Funneliformis mosseae T.H. Nicolson y Gerd	
	Kamienskia bistrata J. Błaszkowski, G. Chwat Kovács	

Banuelos J, Martínez-Romero E, Montaño NM, Camargo-Ricalde SL. (2023) *Rhizobium tropici* and Riboflavin Amendment Condition Arbuscular Mycorrhiza Colonization in *Phaseolus vulgaris* L. *Agronomy* 13(3):876. https://doi.org/10.3390/agronomy13030876

hizophagus irregularis Błaszk., Wubet, Renker y

Buscot (C. Walker y A. Schüßler comb. Nov)

hizophagus neocaledonicus D. Redecker,

rossay y Cilia

El inóculo se reprodujo en plantas trampa de *Brachiaria decumbens* Stapf (Poaceae) durante 90 días, en arena de cuarzo autoclavada e irrigada con agua desionizada estéril. El riego se suspendió durante 30 días para inducir la esporulación. Las raíces se analizaron para determinar el porcentaje de colonización de HMA, obteniéndose un 80% [45,46]. La arena contenía 4658 esporas por cada 100 g^{-1}, que se aislaron mediante tamizado en húmedo y decantación, seguidos de centrifugación en una solución de sacarosa al 40% [47]. Las plantas se inocularon con HMA cinco días después de la germinación de las semillas y antes del trasplante. Se utilizó una mezcla de 10 g de raíces y arena de cuarzo con esporas (1:9) para un total de 419 esporas por semilla germinada. Para los tratamientos sin inoculación de HMA, el inóculo se preparó de la siguiente manera: 500 g del inóculo fueron autoclavados durante 45 minutos a 120 °C y 1.05 kg cm^{-2}.

2.6. Cepa Bacteriana y Preparación del Inóculo

La cepa *Rhizobium tropici* CIAT 899 [48] fue obtenida de la colección de cultivos del Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México. La cepa se cultivó en caldo PY esterilizado (5 g de peptona, 3 g de extracto de levadura y 0.6 g de CaCl2 por litro) durante 24 horas a 30 °C con agitación constante (250 rpm). Los cultivos se centrifugaron durante 3 minutos a 4000×g y los sedimentos se lavaron con 10 mM de MgSO4 [49]. La concentración final de bacterias se ajustó a mL^{-1}, y se

inocularon 2 mL en cada semilla germinada en cada maceta. Se realizó una segunda inoculación después de una semana.

2.7. Análisis en Plantas

Todas las plantas se cosecharon 35 días después de la inoculación. El suelo fue lavado de las raíces y estas se colocaron entre 4 toallas de papel para eliminar el exceso de agua. Las plantas se pesaron por separado en raíces y brotes. Se recolectaron submuestras de raíces (200 mg) para el examen microscópico de las estructuras de HMA, y las raíces y brotes restantes se separaron y congelaron a −20 °C para la extracción de ADN. Se utilizó una solución de azul tripano para visualizar las estructuras fúngicas en las submuestras de raíces [46], y se determinó el porcentaje de colonización de HMA en las raíces [50].

2.8. Extracción y Amplificación de ADN de Hongos Micorrizógenos Arbusculares (HMA)

Tres submuestras aleatorias por sistema radicular fueron agrupadas por tratamiento, congeladas a −80 °C con N_2 líquido y trituradas hasta obtener un polvo fino utilizando un mortero y maja estériles antes de la extracción de ADN [51,52]. El ADN se extrajo de las muestras de raíces utilizando el kit de extracción de ADN Qiagen PowerSoil (Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante, obteniendo 50 µL de tampón de elución que contenía ADN genómico total. La cantidad y calidad de los extractos de ADN se evaluaron en un gel de agarosa al 1.5% antes de continuar con el procesamiento.

La PCR, clonación y secuenciación fueron realizadas por MACROGEN, Corea. Las amplificaciones por PCR se realizaron individualmente a partir del ADN extraído de las raíces utilizando los pares de cebadores NS1 (GTAAGTCATATGCTTGTCTC) y NS41 (CCCGTGTTGAGTCAAATTA) para amplificar un fragmento de 1.2 kb [53]. Los

productos de la PCR se utilizaron como plantillas en una PCR anidada subsecuente. El conjunto de cebadores para la segunda ronda usó los cebadores AM1 (ATCACTTTCGATGGTAGGATAGA) y AM2 (GAACCCAAACACTTTGGTTTCC) [54], obteniendo un producto de 800 pb dirigido a las regiones variables del gen nuclear 18S rRNA (SSU). Las bibliotecas de amplicones se prepararon utilizando el kit Nextera XT de preparación de bibliotecas de ADN y se secuenciaron como lecturas de un solo extremo utilizando la plataforma Illumina [55]. Para la primera ronda de PCR, las condiciones fueron las siguientes: 94 °C durante 3 min; 25 ciclos de 94 °C, 3 min; 60 °C, 1 min; 72 °C, 1 min; extensión final a 72 °C durante 7 min. Para la segunda ronda, las condiciones fueron 94 °C durante 3 min; 32 ciclos de 94 °C, 1 min; 55 °C, 1 min; 72 °C, 1 min y extensión final a 72 °C durante 10 min. Los datos en bruto se subieron a la base de datos SRA.

2.9. Análisis Bioinformático

La calidad de las secuencias en bruto se verificó utilizando FASTQC v0.11.8 [56], y las secuencias en bruto demultiplexadas se procesaron utilizando el paquete QIIME2 versión 2021.8 [57]. Se eliminó el ruido de las secuencias, se eliminaron réplicas y filtraron quimeras utilizando el complemento DADA2 [58]. Las secuencias se recortaron para incluir solo bases con valores de calidad > 20. Se recortaron los primeros 21–24 nucleótidos. Se eliminaron las ASV con una frecuencia inferior al 0.1%. Para las comparaciones de taxones, utilizamos el complemento q2-feature-classifier de QIIME2 y el clasificador Bayes entrenado en la base de datos MaarjAM para QIIME 2 [59]; para las secuencias ambiguas se realizó un BLAST con secuencias cercanas de GenBank y UNITE.

2.10. Statistical Analysis

Se realizó una ANOVA de una vía y una prueba t- student comparando tratamientos para cada variable de crecimiento. Los resultados se expresaron como medias, con ± desviación estándar . Diferencias significativas entre tratamientos se analizaron utilizando el análisis post-hoc de Tukey (HSD $p \leq 0.05$) o una prueba t- student. Se probaron los supuestos de normalidad y homogeneidad con las pruebas Shapiro–Wilk y Levene. Los análisis se realizaron en Minitab 21.1.0.

3 Resultados

3.1. La Riboflavina Estimula el Crecimiento de las Plantas

La adición de riboflavina a *P. vulgaris* aumentó el peso de la planta (ANOVA $p \leq 0.000$; $F(2.17) = 6.63$; HSD $p \leq 0.05$) (Figura 1). Los tratamientos con riboflavina incrementaron el peso de las raíces y los brotes (Figura 1). La riboflavina, junto con *R. tropici* y la mezcla de HMA, aumentó aún más el crecimiento de la planta (Figura 1).

Banuelos J, Martínez-Romero E, Montaño NM, Camargo-Ricalde SL. (2023) *Rhizobium tropici* and Riboflavin Amendment Condition Arbuscular Mycorrhiza Colonization in *Phaseolus vulgaris* L. *Agronomy* 13(3):876. https://doi.org/10.3390/agronomy13030876

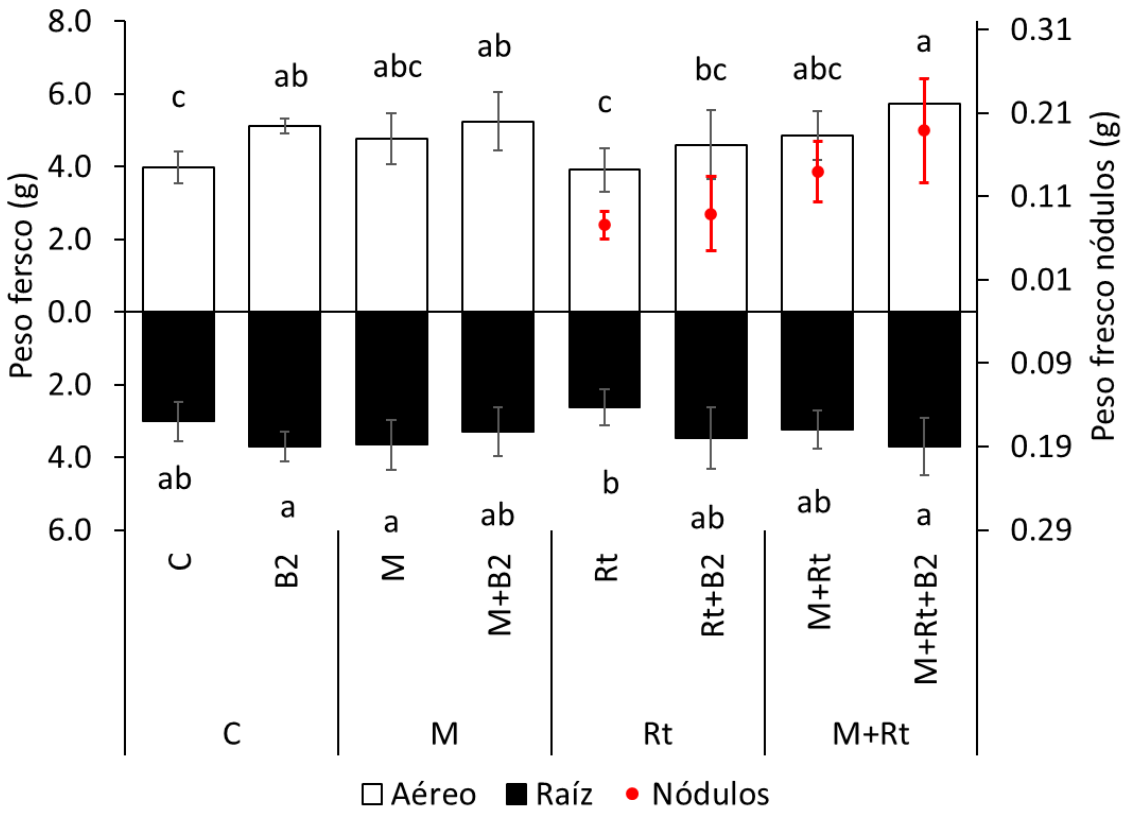


Figura 1. Peso fresco total en *Phaseolus vulgaris* (frijol común) 35 días después de ser coinoculado con inóculo de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y *Rhizobium tropici* CIAT 899. n = 8. Las barras representan la media ± desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de un mismo tejido, Tukey HSD ($p \leq 0.05$). M, inoculado con hongos micorrízógenos arbusculares; B2, irrigado con 50 µM de riboflavina; Rt, inoculación con *Rhizobium tropici* CIAT 899; C, control sin inoculación.

3.2. La Riboflavina Estimula la Colonización por Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA)

La riboflavina aumentó significativamente la colonización de HMA a 12.5 µM (HSD $p \leq 0.05$). La riboflavina a 25 µM mostró la mayor colonización de HMA en las raíces, aunque

Banuelos J, Martínez-Romero E, Montaño NM, Camargo-Ricalde SL. (2023) *Rhizobium tropici* and Riboflavin Amendment Condition Arbuscular Mycorrhiza Colonization in *Phaseolus vulgaris* L. *Agronomy* 13(3):876. https://doi.org/10.3390/agronomy13030876

no hubo diferencias significativas entre las diversas concentraciones de riboflavina (Figura 2a). Notablemente, la distribución de las estructuras cambió con la adición de riboflavina, ya que aumentaron las vesículas y se redujeron los arbúsculos y las hifas. Las diferentes concentraciones de riboflavina tuvieron un efecto diferencial en la colonización de las raíces, con un mayor aumento de vesículas a 25 µM (Figura 2b).

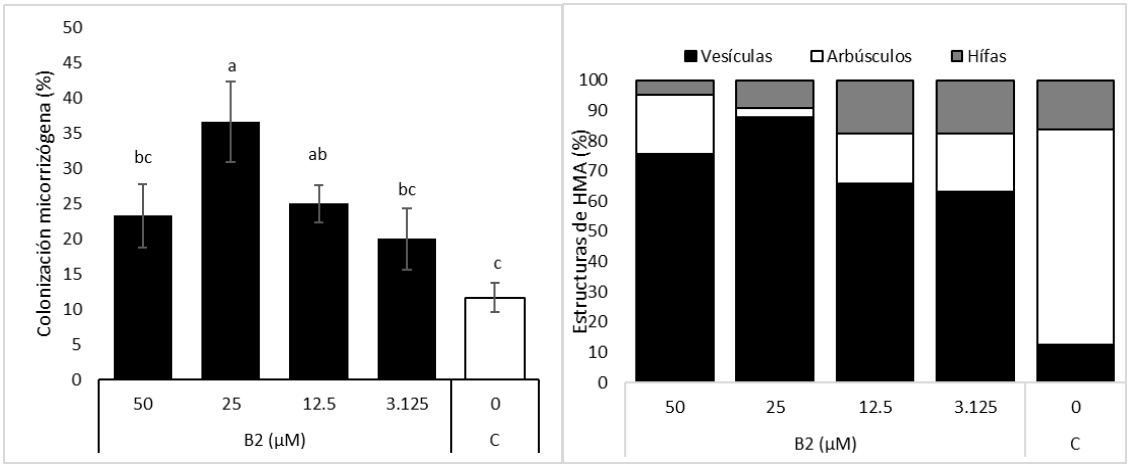


Figura 2. La riboflavina estimula la colonización por hongos micorrizógenos arbusculares (HMA). (a) Porcentaje de colonización de raíces por HMA, y (b) proporción de estructuras de HMA en las raíces con diferentes concentraciones de riboflavina 35 días después de la inoculación. n = 4. Las barras representan la media ± desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos, Tukey HSD ($p \leq 0.05$).

3.3. Efecto de la Coinoculación de *R. tropici* y Riboflavina

La coinoculación con *R. tropici* CIAT 899 aumentó la colonización por HMA en un 31.4% en comparación con las plantas solo micorrizadas, pero no hubo diferencia cuando se agregó riboflavina a las plantas de frijol coinoculadas (Figura 3a). La proporción de vesículas aumentó con la adición de riboflavina, mientras que los arbúsculos y las hifas se redujeron en comparación con las plantas solo micorrizadas, como en el primer experimento (Figura

Banuelos J, Martínez-Romero E, Montaño NM, Camargo-Ricalde SL. (2023) *Rhizobium tropici* and Riboflavin Amendment Condition Arbuscular Mycorrhiza Colonization in *Phaseolus vulgaris* L. *Agronomy* 13(3):876. https://doi.org/10.3390/agronomy13030876

2b). Se observó un efecto similar en las raíces de frijol coinoculadas (Figura 3b). *R. tropici* y la riboflavina afectaron la longitud de la raíz y la colonización por HMA.

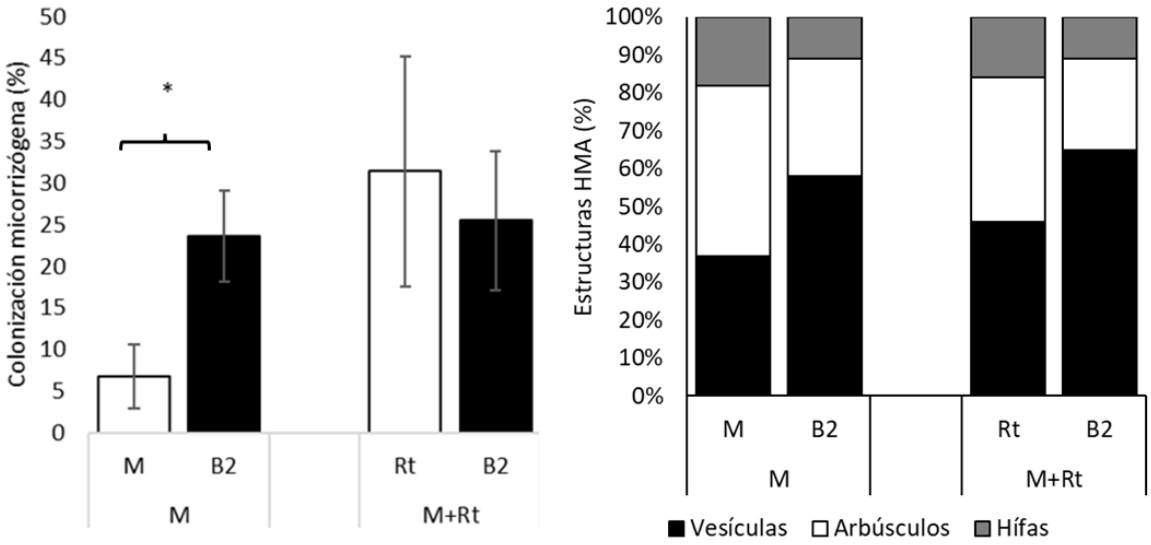


Figura 3. Efecto de la coinoculación de *Rhizobium tropici* y riboflavina (vitamina B2) en *Phaseolus vulgaris*. (a) Porcentaje de colonización de raíces por hongos micorrízicos arbusculares (HMA), y (b) porcentaje de colonización por estructuras de HMA en las raíces con o sin riboflavina y con o sin *Rhizobium tropici* 35 días después de la inoculación. N = 4. Las barras representan la media ± desviación estándar. M, inóculo de HMA; B2, riboflavina (50 µM); Rt, *R. tropici* CIAT 899. *, diferencias significativas (prueba t, $p \leq 0.05$).

3.4. Inoculación con *R. tropici* Modifica el Perfil de Especies de HMA que Colonizan *P. vulgaris*

El inóculo original se analizó para determinar la composición relativa de especies, mostrando que *R. irregularis* era la especie predominante (Figura 4). Cuando el inóculo se utilizó en *P. vulgaris*, *D. bernensis* se convirtió en la especie dominante, seguida de *R. irregularis* y *C.*

pellucida en menores proporciones. La familia principal que colonizó las raíces de *P. vulgaris* fue Glomeraceae.

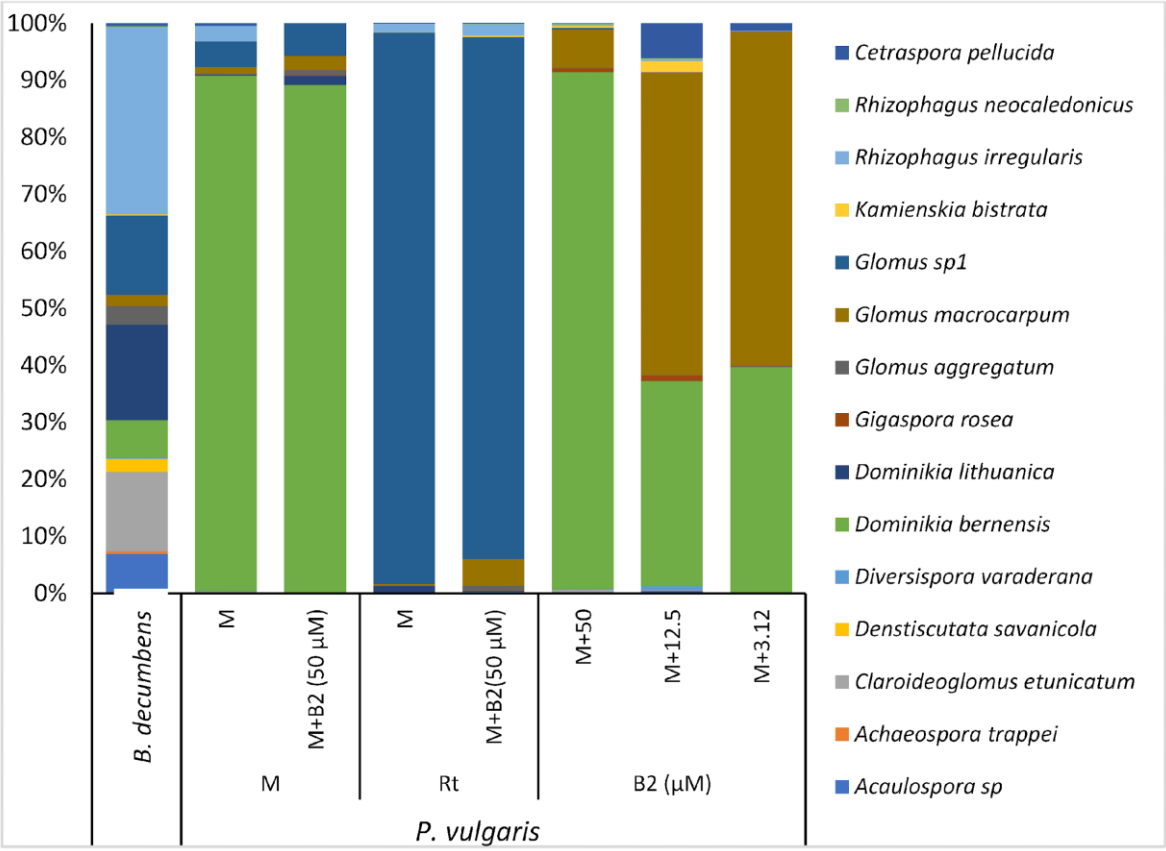


Figura 4. Composición y abundancias relativas de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) en las raíces de *Phaseolus vulgaris* determinadas mediante un análisis de secuenciación de amplicones de ARNr SSU micorrízicos. A la izquierda, inóculo original obtenido de *Brachiaria decumbens* Stapf (Poaceae). M, inoculación con HMA; B2, irrigado con 50 µM de riboflavina n; Rt, inoculación con *Rhizobium tropici* CIAT 899; C, control sin inoculación.

La riboflavina tuvo un pequeño efecto sobre la proporción relativa de especies de HMA en los tratamientos inoculados con *R. tropici* (Figura 4). Cuando se inoculó solo con micorriza, la proporción de *G. macrocarpum* aumentó cuando se agregó riboflavina a bajas

concentraciones (Figura 4 derecha). La riboflavina alteró las proporciones de especies recuperadas de las raíces de *P. vulgaris*, disminuyendo la dominancia de *D. bernensis* a favor de *G. macrocarpum*. En los ensayos de plantas realizados aquí, el peso seco de los nódulos en *P. vulgaris* fue similar con o sin riboflavina. Las plantas con riboflavina, hongos micorrízicos y *R. tropici* tuvieron un peso seco de nódulos significativamente mayor que las plantas inoculadas con ambos inóculos biológicos, pero sin riboflavina añadida (Figura 1). La proporción de especies de HMA depende de la coinoculación con *R. tropici* y la identidad del huésped.

4 Discusión

Varios estudios han reportado los efectos beneficiosos de la micorriza en plantas de *P. vulgaris* utilizando monocultivos fúngicos, especialmente *R. irregularis* [14,60]. *R. irregularis* es ampliamente utilizado porque puede cultivarse in vitro [61] y se considera una especie modelo [62]. En contraste, aquí usamos un inóculo compuesto por múltiples especies. La diversidad de especies de HMA suele estar asociada con una mayor producción de biomasa vegetal y absorción de nutrientes [21]. El uso de un inóculo multiespecie puede aumentar las posibilidades de lograr efectos benéficos [33,44].

4.1. Cambios en la Estructura de la Comunidad de Hongos Micorrizógenos Arbusculares (HMA) a causa de la planta

Las plantas hospedadoras son determinantes importantes en la composición de la comunidad de AMF [63], aunque las condiciones del suelo y el ambiente también pueden influir. El efecto de la coinoculación micorrízica y rizobial puede estar influenciado por la planta hospedadora, las especies de rizobios y AMF. A su vez, las plantas pueden dirigir el

suministro de carbohidratos a los hongos más adecuados para las condiciones específicas [39,40]. En este estudio, obtuvimos evidencia de una selección micorrízica por parte de *P. vulgaris*, lo que resulta en que solo unas pocas especies de una mezcla de AMF colonizan las raíces. *P. vulgaris* seleccionó a *D. bernensis* de entre las otras especies presentes (Figura 4). En *B. decumbens* (el hospedador original de la mezcla de AMF) se observó una distribución de especies diferente (Figura 4), donde *R. irregularis* fue la más abundante en las raíces de la planta. *R. irregularis* puede ser más competitiva que otras especies de AMF cuando se coinocula [19,64], pero en nuestros resultados, la planta hospedadora y el NFR influyeron en la abundancia de cada especie de AMF. Las interacciones competitivas entre especies de AMF u otros simbiontes [65] son otro factor importante en la estructura de la comunidad de AMF intraradical.

4.2. Efecto de *R. tropici* y los Posibles Mecanismos que Influyen en los Hongos Micorrizógenos Arbusculares (HMA)

De acuerdo con nuestros resultados, *R. tropici* podría estar afectando la composición micorrízica en las raíces de frijol, favoreciendo a *Glomus sp.* como la especie dominante y reduciendo la prevalencia de *D. bernensis*. Los mecanismos directos para este cambio podrían ser diferentes, pero algunos antifúngicos producidos por *Rhizobium* podrían tener un impacto en la prevalencia de las especies de AMF [66]. Breil et al. [67] informaron que *Rhizobium spp.* produce trifolitoxina, que tiene actividad antimicrobiana que afecta a los patógenos fúngicos del suelo [68]. Otros mecanismos podrían ser la competencia por nutrientes [69], ya que *R. tropici* puede alcanzar un gran número de células en las raíces, lo que sería un sumidero de carbono. De otra manera, *R. tropici* podría desencadenar respuestas

de defensa de la planta [70] o tener un efecto de señalización que condicione la colonización por diferentes especies de micorrizas, favoreciendo a algunas especies e inhibiendo a otras. La inoculación con rizobios puede reducir la colonización de hifas de AMF en las raíces, pero esto depende de la identidad del simbionte y la disponibilidad de nutrientes [71]. Las comunidades de AMF están influenciadas por los nutrientes disponibles (nitrógeno y fósforo) [72], la interacción del hospedador con otros simbiontes en la rizosfera [73] o cambios en las respuestas inmunes innatas de la planta [74]. Observamos un aumento en la colonización de la longitud de las raíces por AMF cuando *R. tropici* fue coinoculado con la mezcla de AMF. Dependiendo de la especie de AMF, la colonización de las raíces puede verse afectada de manera positiva, negativa o no significativamente por la presencia de NFB [75]. Tsikou et al. [75] encontraron que *Mesorhizobium loti* favoreció la colonización de raíces por *C. etunicatum*, mientras que no afectó a *F. mosseae*. En nuestro estudio, *R. tropici* favoreció a *Glomus sp1* sobre *D. bernensis*, por lo que en este sistema, el efecto sobre la colonización podría depender de las especies micorrizógenas.

Además, *R. tropici* produce vitaminas como la riboflavina [38] y hormonas vegetales como las auxinas [76], que pueden alterar las respuestas de defensa de la planta o la producción de metabolitos vegetales, pero también podrían ser asimiladas por los hongos para alterar la capacidad competitiva de diferentes especies de micorrizas. Por lo tanto, investigamos los efectos de la riboflavina exógena sobre la colonización micorrízica en *P. vulgaris*.

4.3. Efecto de la Riboflavina en los Hongos Micorrizógenos en *Phaseolus vulgaris*

La riboflavina aumentó la colonización micorrízica y la presencia de vesículas en las raíces colonizadas por AMF. Las vesículas son las principales estructuras de almacenamiento de lípidos y fósforo en los AMF, y cantidades mayores pueden servir como un importante

sumidero de recursos para proporcionar a las plantas colonizadas [77]. La riboflavina producida por *R. tropici* podría ser responsable del cambio en la dominancia de especies en las raíces. Estudios previos mostraron que la riboflavina aumentó el contenido de CO_2 en las raíces de *Medicago sativa* [33] hasta en un 100% [78]. Becard et al. [37] informaron que un aumento en el contenido de CO_2 podría favorecer la colonización de raíces por AMF. Es probable que los AMF se beneficien del aumento de CO_2 promovido por la riboflavina producida por rizobios en las raíces. Se ha informado que el CO_2 elevado estimula significativamente la biomasa radicular y la abundancia de genes de AMF [79]. Además, los hongos micorrízicos arbusculares mejoran la acumulación de nutrientes en el trigo cuando se exponen a CO_2 [80]. Se ha sugerido que el CO_2 atmosférico elevado puede cambiar el flujo de carbono de las raíces hacia las comunidades microbianas asociadas, particularmente los hongos micorrízicos arbusculares, ya que son actores clave en la transferencia de carbono entre las plantas y el suelo [81]. Aunque se ha documentado la promoción de una asociación simbiótica entre AMF y el hospedador, el CO_2 elevado en las raíces de *Pisum sativum L.* [82] no tiene efecto en el desarrollo micorrízico de algunas cepas de AMF [82], lo que implica que puede haber diferencias interespecíficas entre los hongos a considerar [83]. El lumicromo, un derivado de la riboflavina, aplicada a *Lotus japonicus* y *Solanum lycopersicum*, promovió la nodulación de *Mesorhizobium loti* (en *L. japonicus*) y la formación de hifas de *Glomus intraradices* (*R. intraradices*) y *Glomus mosseae* (*F. mosseae*), retrasando la maduración del arbúsculo [84]. Nuestros resultados apoyan la sugerencia de que el aumento de la respiración en las raíces, causado por la administración de riboflavina exógena, también altera y promueve la simbiosis AMF [37.

La familia *Glomeraceae* produce una gran cantidad de biomasa intraradical [85], mientras que *Gigasporaceae* produce más hifas extraradicales [85,86]. En nuestro análisis molecular, encontramos una mayor abundancia de *Glomeraceae* en la mayoría de los tratamientos (*Dominikia* y *Glomus*). El inóculo inicial tenía una gran abundancia relativa de *R. irregularis*, que generalmente es la primera especie en colonizar las plantas (en dos semanas) en comparación con especies como *Glomus aggregatum* (cuatro semanas) [64]. *R. irregularis* tiene la ventaja de colonizar una mayor porción de la raíz y reproducirse cuando las condiciones son apropiadas [64].

El patrón de colonización de las raíces es de especial interés. Cuando se coinoculó con *Bradyrhizobium* CB1015, la proporción de vesículas de *F. mosseae* aumentó en frijol mungo (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) [87]. La colonización micorrízica aumentó no solo con *R. tropici*, sino también con riboflavina, lo que también aumentó el porcentaje de vesículas en comparación con el control (Figura 2b). En general, un aumento de los hongos arbusculares corresponde a un aumento en el contenido de fósforo en la raíz [88]. Cuando las plantas crecen en ambientes estresantes, la colonización de las raíces por AMF se estimula, afectando la cantidad de vesículas y arbúsculos [89].

El desarrollo de un inóculo de AMF para leguminosas debe considerar tanto la identidad de las especies de AMF como los efectos sobre el rendimiento y desempeño de las plantas. Este estudio proporciona la base para futuros estudios que exploren más a fondo la interacción del inóculo de AMF con rizobios eficientes, y cómo la riboflavina, una vitamina producida por rizobios, puede aumentar la colonización de AMF en función de la concentración

5 Conclusiones

La riboflavina puede aumentar la colonización de raíces por AMF en plantas de *P. vulgaris*, dependiendo de la concentración. Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo que reporta cambios en la colonización por hongos micorrízicos arbusculares inducidos por riboflavina. La coinoculación de AMF con *R. tropici* CIAT899 también aumenta la colonización de raíces por AMF, pero no se incrementa más con la adición de 50 µM de riboflavina.

Encontramos que la composición de AMF cambió con respecto a la mezcla de AMF utilizada originalmente como inóculo. *P. vulgaris* podría tener preferencia por *D. bernensis* dentro de una mezcla diversa de AMF, mientras que la riboflavina puede ejercer una presión de selección sobre las especies de AMF a cierta concentración.

La coinoculación de AMF con *R. tropici* CIAT899 a una concentración de 50 µM tuvo poco o ningún efecto en la composición de especies de AMF. Nuestros datos sugieren que los metabolitos secundarios y la presencia de otros simbiontes, como *R. tropici*, pueden influir en la composición de especies de AMF en raíces micorrizadas.

6 Financiamiento

Este estudio no recibió financiamiento externo.

7 Agradecimientos

Los autores quisieran agradecer a M. Dunn y M. Rosenblueth por leer y comentar en el manuscrito.

8 Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses. No hubo factores externos que tuvieran algún rol en el diseño del estudio; en la recolección, análisis o interpretación de los datos; en la redacción del manuscrito; ni en la decisión de publicar los resultados.

9 Referencias

1. Santos, M.S.; Nogueira, M.A.; Hungria, M. Microbial Inoculants: Reviewing the Past, Discussing the Present and Previewing an Outstanding Future for the Use of Beneficial Bacteria in Agriculture. *AMB Express* **2019**, *9*, 205, doi:10.1186/s13568-019-0932-0.
2. Ormeño-Orrillo, E.; Menna, P.; Almeida, L.G.P.; Ollero, F.J.; Nicolás, M.F.; Pains Rodrigues, E.; Shigueyoshi Nakatani, A.; Silva Batista, J.S.; Oliveira Chueire, L.M.; Souza, R.C.; et al. Genomic Basis of Broad Host Range and Environmental Adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp. PRF 81 Which Are Used in Inoculants for Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC Genomics* **2012**, *13*, 735, doi:10.1186/1471-2164-13-735.
3. Igiehon, O.N.; Babalola, O.O. *Rhizobium* and Mycorrhizal Fungal Species Improved Soybean Yield under Drought Stress Conditions. *Curr. Microbiol.* **2021**, *78*, 1615–1627, doi:10.1007/s00284-021-02432-w.
4. Sidorova, I.; Voronina, E. Microbiome-Driven Nutrient Fortification in Plants. In *The Plant Microbiome in Sustainable Agriculture*; John Wiley y Sons, Ltd, 2020; pp. 211–230 ISBN 978-1-119-50545-7.
5. de Souza Buzo, F.; Satin Mortinho, E.; Lobo Santana, T.L.; Militão Garcia, I.; de Carvalho, C.L.M.; Filho, M.C.M.T. Bean Nutrition and Development in the Function

of Reduced Phosphorus Doses and Inoculation with Arbuscular Mycorrhizal Fungus. *J. Plant Nutr.* **2022**, *45*, 1942–1952, doi:10.1080/01904167.2022.2043372.

6. Tao, Q.; Zhao, J.; Li, J.; Liu, Y.; Luo, J.; Yuan, S.; Li, B.; Li, Q.; Xu, Q.; Yu, X.; et al. Unique Root Exudate Tartaric Acid Enhanced Cadmium Mobilization and Uptake in Cd-Hyperaccumulator *Sedum alfredii*. *J. Hazard. Mater.* **2020**, *383*, 121177, doi:10.1016/j.jhazmat.2019.121177.
7. Diagne, N.; Ngom, M.; Djighaly, P.I.; Fall, D.; Hocher, V.; Svistoonoff, S. Roles of Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Plant Growth and Performance: Importance in Biotic and Abiotic Stressed Regulation. *Diversity* **2020**, *12*, 370, doi:10.3390/d12100370.
8. Sammauria, R.; Kumawat, S.; Kumawat, P.; Singh, J.; Jatwa, T.K. Microbial Inoculants: Potential Tool for Sustainability of Agricultural Production Systems. *Arch. Microbiol.* **2020**, *202*, 677–693, doi:10.1007/s00203-019-01795-w.
9. Xie, M.-M.; Chen, S.-M.; Zou, Y.-N.; Srivastava, A.K.; Rahman, M.M.; Wu, Q.-S.; Kuča, K. Effects of *Rhizophagus Intraradices* and *Rhizobium Trifolii* on Growth and N Assimilation of White Clover. *Plant Growth Regulation.* **2021**, *93*, 311–318, doi:10.1007/s10725-020-00689-y.
10. Musyoka, D.M.; Njeru, E.M.; Nyamwange, M.M.; Maingi, J.M. Arbuscular Mycorrhizal Fungi and *Bradyrhizobium* Co-Inoculation Enhances Nitrogen Fixation and Growth of Green Grams (*Vigna radiata* L.) under Water Stress. *J. Plant Nutr.* **2020**, *43*, 1036–1047, doi:10.1080/01904167.2020.1711940.
11. Kavadia, A.; Omirou, M.; Fasoula, D.A.; Louka, F.; Ehaliotis, C.; Ioannides, I.M. Co-Inoculations with Rhizobia and Arbuscular Mycorrhizal Fungi Alters Mycorrhizal Composition and Lead to Synergistic Growth Effects in Cowpea That Are Fungal

Combination-Dependent. *Appl. Soil Ecol.* **2021**, *167*, 104013, doi:10.1016/j.apsoil.2021.104013.

12. Genre, A.; Russo, G. Does a Common Pathway Transduce Symbiotic Signals in Plant–Microbe Interactions? *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*.
13. Remy, W.; Taylor, T.N.; Hass, H.; Kerp, H. Four Hundred-Million-Year-Old Vesicular Arbuscular Mycorrhizae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 11841–11843.
14. Parniske, M. Arbuscular Mycorrhiza: The Mother of Plant Root Endosymbioses. *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6*, 763–775, doi:10.1038/nrmicro1987.
15. Martin, F.M.; Uroz, S.; Barker, D.G. Ancestral Alliances: Plant Mutualistic Symbioses with Fungi and Bacteria. *Science* **2017**, *356*, eaad4501, doi:10.1126/science.aad4501.
16. Cárdenas, L.; Alemán, E.; Nava, N.; Santana, O.; Sánchez, F.; Quinto, C. Early Responses to Nod Factors and Mycorrhizal Colonization in a Non-Nodulating *Phaseolus vulgaris* Mutant. *Planta* **2006**, *223*, 746–754.
17. Oláh, B.; Brière, C.; Bécard, G.; Dénarié, J.; Gough, C. Nod Factors and a Diffusible Factor from Arbuscular Mycorrhizal Fungi Stimulate Lateral Root Formation in *Medicago truncatula* via the DMI1/DMI2 Signalling Pathway. *Plant J.* **2005**, *44*, 195–207, doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02522.x.
18. Xie, Z.P.; Staehelin, C.; Vierheilig, H.; Wiemken, A.; Jabbouri, S.; Broughton, W.J.; Vogeli-Lange, R.; Boller, T. Rhizobial Nodulation Factors Stimulate Mycorrhizal Colonization of Nodulating and Nonnodulating Soybeans. *Plant Physiology.* **1995**, *108*, 1519–1525, doi:10.1104/pp.108.4.1519.
19. Coker, G.T.; Schubert, K.R. Carbon Dioxide Fixation in Soybean Roots and Nodules: I. Characterization and Comparison with n $_2$ Fixation and Composition of Xylem

Exudate during Early Nodule Development. *Plant Physiology.* **1981**, *67*, 691–696, doi:10.1104/pp.67.4.691.

20. Phillips, D.A.; Joseph, C.M.; Yang, G.-P.; Martínez-Romero, E.; Sanborn, J.R.; Volpin, H. Identification of Lumichrome as a *Sinorhizobium* Enhancer of Alfalfa Root Respiration and Shoot Growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 12275–12280, doi:10.1073/pnas.96.22.12275.
21. Lowe, R.H.; Evans, H.J. Carbon Dioxide Requirements for Growth of Legume Nodule Bacteria. *Soil Sci.* **1962**, *94*, 351.
22. Yang, G.; Bhuvaneswari, T.V.; Joseph, C.M.; King, M.D.; Phillips, D.A. Roles for Riboflavin in the *Sinorhizobium* -Alfalfa Association. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **2002**, *15*, 456–462, doi:10.1094/MPMI.2002.15.5.456.
23. Streit, W.R.; Joseph, C.M.; Phillips, D.A. Biotin and Other Water-Soluble Vitamins Are Key Growth Factors for Alfalfa Root Colonization by *Rhizobium meliloti* 1021. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **1996**, *9*, 330–338.
24. Bécard, G.; Piché, Y. Fungal Growth Stimulation by CO2 and Root Exudates in Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* **1989**, *55*, 2320–2325, doi:10.1128/aem.55.9.2320-2325.1989.
25. Omirou, M.; Ioannides, I.M.; Ehaliotis, C. Mycorrhizal Inoculation Affects Arbuscular Mycorrhizal Diversity in Watermelon Roots, but Leads to Improved Colonization and Plant Response under Water Stress Only. *Appl. Soil Ecol.* **2013**, *63*, 112–119, doi:10.1016/j.apsoil.2012.09.013.

26. Voysest, O. *Variedades de Frijol En América Latina y Su Origen*; Agronomía Programa de Frijol; Centro International de Agricultura Tropical (CIAT): Cali, Colombia, 1983; ISBN 84-89206-26-0.
27. Rosenblueth, M.; Martínez-Romero, E. *Rhizobium etli* Maize Populations and Their Competitiveness for Root Colonization. *Arch. Microbiol.* **2004**, *181*, 337–344, doi:10.1007/s00203-004-0661-9.
28. Trejo, D.; Sangabriel-Conde, W.; Gavito-Pardo, M.E.; Banuelos, J. Mycorrhizal Inoculation and Chemical Fertilizer Interactions in Pineapple under Field Conditions. *Agriculture* **2021**, *11*, 934, doi:10.3390/agriculture11100934.
29. Trejo, D.; Hernández-Acosta, E.; Baeza-Guzmán, Y.; Pérez-Toledo, G.; Morgado-Viveros, E.; Bañuelos, J.; Trejo, D.; Hernández-Acosta, E.; Baeza-Guzmán, Y.; Pérez-Toledo, G.; et al. Effectivity of introduced and native arbuscular mycorrhizal fungi in six crop legumes. *Sci. Fungorum* **2021**, *51*, doi:10.33885/sf.2021.51.1320.
30. Banuelos, J.; Sangabriel, W.; Gavito, M.E.; Trejo Aguilar, D.; Camara, S.; Medel Ortiz, R.; Carreón Abud, Y. Effect of Different Phosphorus Levels on Avocado Inoculated with Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* **2017**, *8*, 1509–1520.
31. Pistelli, L.; Ulivieri, V.; Giovanelli, S.; Avio, L.; Giovannetti, M.; Pistelli, L. Arbuscular Mycorrhizal Fungi Alter the Content and Composition of Secondary Metabolites in *Bituminaria bituminosa* L. *Plant Biol. Stuttg. Ger.* **2017**, *19*, 926–933, doi:10.1111/plb.12608.
32. Phillips, J.M.; Hayman, D.S. Improved Procedures for Clearing Roots and Staining Parasitic and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi for Rapid Assessment of Infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **1970**, *55*, 158–161.

33. Martínez-Romero, E.; Segovia, L.; Martins-Mercante, F.; Franco, A.A.; Graham, P.; Pardo, M.A. 1991 *Rhizobium tropici*, a Novel Species Nodulating *Phaseolus vulgaris* L. Beans and *Leucaena* Sp. Trees. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **1991**, *41*, 417–426, doi:https://doi.org/10.1099/00207713-41-3-417.
34. Aguirre-Noyola, J.L.; Rosenblueth, M.; Santiago-Martínez, M.G.; Martínez-Romero, E. Transcriptomic Responses of *Rhizobium phaseoli* to Root Exudates Reflect Its Capacity to Colonize Maize and Common Bean in an Intercropping System. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 740818, doi:10.3389/fmicb.2021.740818.
35. Giovannetti, M.; Mosse, B. An Evaluation Techniques for Measuring Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Infection in Roots. *New Phytologist.* **1979**, *84*, 489–500, doi:10.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x.
36. Lekberg, Y.; Vasar, M.; Bullington, L.S.; Sepp, S.-K.; Antunes, P.M.; Bunn, R.; Larkin, B.G.; Öpik, M. More Bang for the Buck? Can Arbuscular Mycorrhizal Fungal Communities Be Characterized Adequately alongside Other Fungi Using General Fungal Primers? *New Phytologist.* **2018**, *220*, 971–976, doi:10.1111/nph.15035.
37. Lee, J.; Lee, S.; Young, J.P.W. Improved PCR Primers for the Detection and Identification of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2008**, *65*, 339–349, doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00531.x.
38. Hassan, S.E.D.; Boon, E.; St-Arnaud, M.; Hijri, M. Molecular Biodiversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Trace Metal-Polluted Soils. *Mol. Ecol.* **2011**, *20*, 3469–3483, doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05142.x.
39. Andrews, S. FastQC A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data 2010.

40. Bolyen, E.; Rideout, J.R.; Dillon, M.R.; Bokulich, N.A.; Abnet, C.C.; Al-Ghalith, G.A.; Alexander, H.; Alm, E.J.; Arumugam, M.; Asnicar, F.; et al. Reproducible, Interactive, Scalable and Extensible Microbiome Data Science Using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 852–857, doi:10.1038/s41587-019-0209-9.
41. Öpik, M.; Vanatoa, A.; Vanatoa, E.; Moora, M.; Davison, J.; Kalwij, J.M.; Reier, Ü.; Zobel, M. The Online Database MaarjAM Reveals Global and Ecosystemic Distribution Patterns in Arbuscular Mycorrhizal Fungi (Glomeromycota). *New Phytologist.* **2010**, *188*, 223–241, doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03334.x.
42. Arthikala, M.-K.; Nava, N.; Quinto, C. Effect of Rhizobium and Arbuscular Mycorrhizal Fungi Inoculation on Electrolyte Leakage in *Phaseolus vulgaris* Roots Overexpressing RbohB. *Plant Signal. Behav.* **2015**, *10*, e1011932, doi:10.1080/15592324.2015.1011932.
43. Hidalgo Rodríguez, J.E.M.; Ramos Otiniano, C.C.; Lezama Asencio, P.B.; Chuna Mogollón, P.; Chaman Medina, M.E. Coinoculación de *Rhizophagus irregularis* y Rhizobium Sp. En *Phaseolus vulgaris* L. Var. Canario (Fabaceae) "frijol Canario. *Arnaldoa* **2019**, *26*, 991–1006, doi:10.22497/arnaldoa.263.26309.
44. Rosikiewicz, P.; Bonvin, J.; Sanders, I.R. Cost-Efficient Production of in vitro *Rhizophagus irregularis*. *Mycorrhiza* **2017**, *27*, 477–486, doi:10.1007/s00572-017-0763-2.
45. Chen, E.C.H.; Morin, E.; Beaudet, D.; Noel, J.; Yildirir, G.; Ndikumana, S.; Charron, P.; St-Onge, C.; Giorgi, J.; Krüger, M.; et al. High Intraspecific Genome Diversity in the Model Arbuscular Mycorrhizal Symbiont *Rhizophagus irregularis*. *New Phytologist.* **2018**, *220*, 1161–1171, doi:10.1111/nph.14989.

46. Trejo, D.; Bañuelos, I.; Bañuelos, J.; Moreira, C.; Lara, L.; Reyes, A. Effect of Diesel and Biodiesel on the Growth of *Brachiaria decumbens* Inoculated with Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Trop. Subtrop. Agroecosystems* **2013**, *16*, 391–398.
47. Bañuelos, J.; Conde, W.S.; Gavito, M.E.; Aguilar, D.T.; Camara, S.; Ortíz, R.M.; Abud, Y.C. Efecto de Diferentes Niveles de Fósforo En Aguacate Inoculado Con Hongos Micorrízicos Arbusculares. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* **2017**, *8*, 1509–1520.
48. Omirou, M.; Fasoula, D.A.; Ioannides, I.M. *Bradyrhizobium* Inoculation Alters Indigenous AMF Community Assemblages and Interacts Positively with AMF Inoculum to Improve Cowpea Performance. *Appl. Soil Ecol.* **2016**, *108*, 381–389, doi:10.1016/j.apsoil.2016.09.018.
49. Hoeksema, J.D.; Chaudhary, V.B.; Gehring, C.A.; Johnson, N.C.; Karst, J.; Koide, R.T.; Pringle, A.; Zabinski, C.; Bever, J.D.; Moore, J.C.; et al. A Meta-Analysis of Context-Dependency in Plant Response to Inoculation with Mycorrhizal Fungi. *Ecol. Lett.* **2010**, *13*, 394–407, doi:10.1111/j.1461-0248.2009.01430.x.
50. Jansa, J.; Smith, F.A.; Smith, S.E. Are There Benefits of Simultaneous Root Colonization by Different Arbuscular Mycorrhizal Fungi? *New Phytologist.* **2008**, *177*, 779–789, doi:10.1111/j.1469-8137.2007.02294.x.
51. Guzman, A.; Montes, M.; Hutchins, L.; DeLaCerda, G.; Yang, P.; Kakouridis, A.; Dahlquist-Willard, R.M.; Firestone, M.K.; Bowles, T.; Kremen, C. Crop Diversity Enriches Arbuscular Mycorrhizal Fungal Communities in an Intensive Agricultural Landscape. *New Phytologist.* **2021**, *231*, 447–459, doi:10.1111/nph.17306.

52. Tahat, M.M.; Sijam, K.; Alananbeh, K. Exploring the Use of Legumes as Host Plant Species in *Glomus Mosseae* Sporulation. *Legume Res.* **2018**, *4*, 913–918, doi:10.18805/LR-419.
53. Hernandez'Acosta, E.; Trejo Aguilar, D.; Ferrera Cerrato, R.; Rivera-Fernández, A.; Gonzalez-Chavez, C. Hongos micorrízicos arbusculares en el crecimiento de café (*Coffea arabica* L.) variedades garnica, catimor, caturra y catuaí. *Agro Product.* **2018**, *11*.
54. Drapeau, R.; Fortin, J.A.; Gagnon, C. Antifungal Activity of Rhizobium. *Can. J. Bot.* **1973**, *51*, 681–682, doi:10.1139/b73-081.
55. Kiers, E.T.; Denison, R.F. Sanctions, Cooperation, and the Stability of Plant-Rhizosphere Mutualisms. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **2008**, *39*, 215–236, doi:10.1146/annurev.ecolsys.39.110707.173423.
56. Ballhorn, D.J.; Kautz, S.; Schädler, M. Induced Plant Defense via Volatile Production Is Dependent on Rhizobial Symbiosis. *Oecologia* **2013**, *172*, 833–846, doi:10.1007/s00442-012-2539-x.
57. Abdel-Lateif, K.; Bogusz, D.; Hocher, V. The Role of Flavonoids in the Establishment of Plant Roots Endosymbioses with Arbuscular Mycorrhiza Fungi, Rhizobia and *Frankia* Bacteria. *Plant Signal. Behav.* **2012**, *7*, 636–641, doi:10.4161/psb.20039.
58. Tóth, K.; Stacey, G. Does Plant Immunity Play a Critical Role during Initiation of the Legume-Rhizobium Symbiosis? *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*.
59. Dakora, F.D.; Matiru, V.N.; Kanu, A.S. Rhizosphere Ecology of Lumichrome and Riboflavin, Two Bacterial Signal Molecules Eliciting Developmental Changes in Plants. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, doi:10.3389/fpls.2015.00700.

60. Etesami, H.; Alikhani, H.A.; Akbari, A.A. Evaluation of Plant Growth Hormones Production (IAA) Ability by Iranian Soils Rhizobial Strains and Effects of Superior Strains Application on Wheat Growth Indexes. **2009**, 9.
61. Olsson, P.A.; Hammer, E.C.; Pallon, J.; van Aarle, I.M.; Wallander, H. Elemental Composition in Vesicles of an Arbuscular Mycorrhizal Fungus, as Revealed by PIXE Analysis. *Fungal Biol.* **2011**, *115*, 643–648, doi:10.1016/j.funbio.2011.03.008.
62. Volpin, H.; Phillips, D.A. Respiratory Elicitors from *Rhizobium meliloti* Affect Intact Alfalfa Roots. *Plant Physiology.* **1998**, *116*, 777–783.
63. Gouws, L.M.; Botes, E.; Wiese, A.J.; Trenkamp, S.; Torres-Jerez, I.; Tang, Y.; Hills, P.N.; Usadel, B.; Lloyd, J.R.; Fernie, A.R.; et al. The Plant Growth Promoting Substance, Lumichrome, Mimics Starch, and Ethylene-Associated Symbiotic Responses in Lotus and Tomato Roots. *Front. Plant Sci.* **2012**, *3*, doi:10.3389/fpls.2012.00120.
64. Maherali, H.; Klironomos, J.N. Influence of Phylogeny on Fungal Community Assembly and Ecosystem Functioning. *Science* **2007**, *316*, 1746–1748, doi:10.1126/science.1143082.
65. Denison, R.F.; Kiers, E.T. Life Histories of Symbiotic Rhizobia and Mycorrhizal Fungi. *Curr. Biol.* **2011**, *21*, R775–R785, doi:10.1016/j.cub.2011.06.018.
66. Werner, G.D.A.; Kiers, E.T. Order of Arrival Structures Arbuscular Mycorrhizal Colonization of Plants. *New Phytologist.* **2015**, *205*, 1515–1524, doi:10.1111/nph.13092.
67. Bueno de Mesquita, C.P.; Martinez del Río, C.M.; Suding, K.N.; Schmidt, S.K. Rapid Temporal Changes in Root Colonization by Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Fine

Root Endophytes, Not Dark Septate Endophytes, Track Plant Activity and Environment in an Alpine Ecosystem. *Mycorrhiza* **2018**, *28*, 717–726, doi:10.1007/s00572-018-0863-7.

68. Gough, E.C.; Owen, K.J.; Zwart, R.S.; Thompson, J.P. Arbuscular Mycorrhizal Fungi Acted Synergistically with *Bradyrhizobium* Sp. to Improve Nodulation, Nitrogen Fixation, Plant Growth and Seed Yield of Mung Bean (*Vigna Radiata*) but Increased the Population Density of the Root-Lesion Nematode *Pratylenchus Thornei*. *Plant and Soil* **2021**, *465*, 431–452, doi:10.1007/s11104-021-05007-7.
69. Martínez-García, L.B.; de Dios Miranda, J.; Pugnaire, F.I. Impacts of Changing Rainfall Patterns on Mycorrhizal Status of a Shrub from Arid Environments. *Eur. J. Soil Biol.* **2012**, *50*, 64–67, doi:10.1016/j.ejsobi.2011.12.005.

CAPÍTULO IV

Folic acid (vitamin B9) and inoculation effects on plant growth in *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae)

Ácido fólico (vitamina B9) y de la inoculación en el crecimiento de Phaseolus vulgaris L. (Fabaceae)

https://doi.org/10.28940/terralatinoamericana.v43i.2090

Jacob Banuelos [1](https://orcid.org/0000-0001-8182-9360), Esperanza Martínez-Romero [2] (https://orcid.org/0000-0002-2295-2606), Noé Manuel Montaño (https://orcid.org/0000-0001-5836-9837) [‡,3] and Sara Lucía Camargo-Ricalde (https://orcid.org/0000-0003-0967-5904)[3]

[1]Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico City, Mexico

[2]Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, 62210, Cuernavaca, Morelos, Mexico

[3]Departamento de Biología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, 09310, Mexico City, Mexico.

[‡]Corresponding author: nmma@xanum.uam.mx

Abstract

Folic acid (vitamin B9) plays a crucial role in chlorophyll synthesis and its exogenous application to plants could positively influence chlorophyll index and plant growth. This study investigated the effect of vitamin B9 supplementation in inoculated *Phaseolus vulgaris*

L. (Fabaceae).The inoculant used contained both arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and bacteria. We measured chlorophyll index, plant growth variables and AMF colonization 35 days after planting. Our results showed that in *P. vulgaris* treated with vitamin B9, both plant growth and chlorophyll index increased, compared to controls. However, the addition of vitamin B9 to *P. vulgaris* plants, inoculated with a mixture of AM fungi and bacteria, did not further increase plant growth, suggesting that inoculated plants are not limited by vitamin B9. This study is the first to highlight the role of vitamin B9 in inoculated *P. vulgaris* plants. Independently, both vitamin B9 amendment and mycorrhization increased the measured variables; though, their combined effect was not additive. Therefore, our results suggest that the addition of vitamin B9 does not further increase the measured variables when the plants are inoculated with a mixed AMF and bacterial inoculant.

Keywords: *Arbuscular mycorrhizal fungi, B9, chlorophyll*, *proline*, *vitamin.*

Resumen

El ácido fólico (vitamina B9) juega un papel crucial en la síntesis de clorofila y su aplicación exógena a las plantas podría influir positivamente en el índice de clorofila y crecimiento vegetal. Este estudio investigó el efecto de la suplementación de la vitamina B9 en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae) inoculadas. El inoculante utilizado contenía tanto hongos micorrízicos arbusculares (HMA) como bacterias. Se midió el índice de clorofila, variables de crecimiento de las plantas y la colonización de HMA, 35 días después de la siembra. Los resultados mostraron que en *P. vulgaris* tratadas con la vitamina B9, tanto el crecimiento de la planta como el índice de clorofila aumentaron en comparación con el control. Sin embargo, la adición de la vitamina B9 a las plantas de *P. vulgaris* inoculadas con una mezcla de HMA, no aumentó aún más el crecimiento de estas, lo que sugiere que las

plantas inoculadas no están limitadas por la vitamina B9. Este estudio es el primero en destacar el papel de la vitamina B9 en plantas de *P. vulgaris* inoculadas. De manera independiente, tanto la adición de la vitamina B9 como de la micorrización incrementaron las variables medidas; sin embargo, el efecto combinado no fue aditivo. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la adición de la vitamina B9 no produce un mayor incremento en las variables medidas cuando las plantas están inoculadas con un inoculante mixto de HMA y bacterias.

Palabras clave: *hongos micorrízicos arbusculares, B9, clorofila, prolina, vitamina.*

1. Introducción

Los folatos son vitaminas del grupo B, solubles en agua y que desempeñan un papel crucial en diversos procesos biológicos, incluidos el crecimiento y desarrollo de las plantas. Son esenciales para la formación de purinas (Zrenner, Sitt, Sonnewald & Boldt, , 2006), que son fundamentales para la división celular, e influyen en la producción de hormonas vegetales, de las auxinas (Li *et al*., 2023) y el etileno (Wang *et al.*, 2002), así como en la formación de raíces y la elongación celular (Hwang *et al*., 2018). Los folatos también mejoran la tolerancia al estrés en las plantas (Aljuaid *et al*., 2022; Alsamadany, Mansour, Elkelish & Ibrahim, 2022), son necesarios para la formación de metionina, serina y glicina (Basset, Quinlivan, Gregory & Hanson, 2005), y actúan como reguladores durante las interacciones simbióticas (Bekuzarova, Kozyrev, Shabanova, Lushenko & Weissfeld, 2020; Banuelos, Martínez-Romero, Montaño & Camargo-Ricalde, 2021; Piya *et al.*, 2023). Aunque las plantas pueden sintetizar folatos, a menudo dependen de fuentes externas para un suministro adecuado. Esto se ha observado en *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae), donde la aplicación foliar de ácido fólico (vitamina B9) (0.1-0.2 mM) aumentó significativamente el crecimiento de brotes y raíces, así como el contenido de clorofila a, b y carotenoides

(Alsamadany *et al.*, 2022). Además, se ha demostrado que el precursor de folatos, pABA (ácido 4-aminobenzoico) mejora el crecimiento de las plantas, particularmente al aumentar el número de nódulos radiculares fijadores de nitrógeno en *Trifolium rapens* L. (Fabaceae) y *Medicago sativa* L. (Fabaceae) (Bekuzarova *et al*., 2020). La síntesis de folatos aumenta durante la exposición elevada a la luz (Jabrin, Ravanel, Gambonnet, Douce & Rébeillé, 2003), ya que los folatos están involucrados en la biosíntesis de clorofila a través de su contribución al metabolismo de un carbono (Van Wilder *et al.*, 2009). En consecuencia, un aumento en el suministro de folatos podría alterar la producción de clorofila y afectar la simbiosis.

Los folatos también confieren tolerancia contra el estrés de las plantas, principalmente a través de la regulación de los metabolitos vegetales. Una de estas moléculas es la prolina, un aminoácido que funciona como un osmorregulador para el estrés por salinidad y sequía, así como en los cambios en la simbiosis de las plantas con hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) (Banuelos *et al*., 2012; Alsamadany *et al*., 2022). Aunque los folatos son vitaminas esenciales para la mayoría de los organismos vivos, los HMA no biosintetizan la mayoría de las vitaminas (Ghignone *et al.*, 2012). Por lo tanto, la adición de folatos podría afectar la colonización de las raíces por HMA y las respuestas de las plantas hospederas. Tenemos la hipótesis de que la adición de una fuente externa de folatos como la vitamina B9 podría aumentar los parámetros de crecimiento de las plantas, incluido el índice de clorofila, al tiempo que afecta la presencia de HMA o su efecto. Los objetivos de este estudio fueron determinar si la aplicación exógena de vitamina B9 podría afectar la colonización de los HMA en *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae), así como al crecimiento y el índice de clorofila en *P. vulgaris*.

2. Materiales y métodos

2.1. Diseño experimental

El diseño experimental fue completamente al azar, utilizando un esquema factorial 2×2 con dos tratamientos de inoculación (con y sin HMA); dos tratamientos de riego con vitaminas (con y sin vitamina B9), y la combinación de ambos. Utilizamos 4 réplicas por tratamiento, dando un total de 16 unidades experimentales.

2.2. Condiciones de manejo del experimento

El experimento se llevó a cabo durante un período de 35 días bajo condiciones de invernadero, en la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Veracruzana, en Xalapa, México. El invernadero mantuvo una humedad relativa promedio del 74% y una temperatura promedio de 20 °C. Las plantas se cultivaron en macetas de un litro y se regaron cada tercer día hasta la cosecha. El sustrato utilizado para el estudio se obtuvo de los primeros 10 cm de suelo en una zona de cultivo de café, ubicada dentro de un bosque mesófilo de montaña, en Coatepec, Veracruz, México. El análisis del suelo fue realizado por el Laboratorio de Análisis de Suelos del Instituto Nacional de Ecología (INECOL), Xalapa, México, y presentó las siguientes características físicas y químicas: 63.5% de fósforo total (P); 40.52 mg kg^{-1} de P disponible (PO4-, Olsen); 34.28 mg kg^{-1} de amonio (NH4-N) (método de salicilato); 36.28 mg kg^{-1} de nitratos (NO3-N); 1016 mg kg^{-1} de hierro extraíble con pirofosfato (Fe) (PeF); 7.13% de materia orgánica (MO), (Walkley-Black); 4.14% de carbono orgánico (CO) (Walkley-Black); 0.029 mol kg^{-1} de sodio (Na^{+}) (espectrometría de absorción atómica); 0.0173 mol kg−1 de calcio (Ca^{2+}) (espectrometría de absorción atómica), y 0.0327 mol kg^{-1} de magnesio (Mg^{2+}) (espectrometría de absorción atómica). El pH fue de 6.7, obtenido en

una suspensión de suelo y agua desionizada (1:2 p/v). El sustrato se esterilizó durante 40 minutos mediante autoclave, a 120 °C, 1.05 kg cm^{-2} (Khavazi, Rejali, Seguin & Miransari, 2007; Sheteiwy *et al*., 2022).

2.3. Material vegetal

Phaseolus vulgaris cv "Negro Jamapa" es una variedad de frijol de Veracruz, México (Voysest, 1983). Las semillas de frijol Negro Jamapa se desinfectaron superficialmente tratándolas con etanol al 70% durante 1 minuto, seguido de hipoclorito de sodio al 1.2% durante 15 minutos. Luego, las semillas se enjuagaron cuatro veces con agua esterilizada, una vez con tiosulfato de sodio al 2% y un último enjuague con agua (Rosenblueth & Martínez-Romero, 2004). Las semillas se germinaron en arena de cuarzo esterilizada a capacidad de campo (42.7%) antes de ser plantadas en macetas de 1 litro (13 cm de diámetro) con suelo autoclavado (120 °C, 1.05 kg cm^{-2} durante 40 minutos).

2.4. Irrigación con ácido fólico (vitamina B9)

Para este experimento utilizamos ácido fólico, una forma monoglutamilada completamente oxidada de la vitamina B9. Se preparó una solución madre de 50 µM de la vitamina B9 de Sigma-Aldrich (BioReagent para cultivo celular) en agua estéril desionizada, agitando durante 10 minutos en la oscuridad y almacenando a 4 °C hasta su uso. Añadimos 50 mL de la vitamina B9 a las plantas, a 2 cm del tallo, en un entorno de poca luz para prevenir la degradación, cinco días después de la inoculación micorrízica y cada cinco días hasta la cosecha. Los tratamientos control se irrigaron de la misma manera con agua estéril desionizada.

2.5. Inóculo de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA)

La mezcla de HMA fue proporcionada por el Laboratorio de Organismos Benéficos, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Veracruzana, México. Este inoculante contiene 14 especies de HMA (Cuadro 1) (Banuelos, Martínez-Romero, Montaño & Camargo-Ricalde, 2023) y una diversidad de especies bacterianas (Hernádez-Álvarez et al., 2023). Después de 35 días, medimos el porcentaje de colonización de HMA (Giovannetti & Mosse, 1979) mediante el clareo y tinción de raíces de las plantas (Phillips & Hayman, 1970).

Cuadro 1. Lista de las 14 especies de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) contenidos en la mezcla del inóculo adicionado a plantas de *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae).

Familia	**Especies**	**Sinonímia**
Archaeosporaceae	*Archaeospora trappei* (R.N. Ames y Linderman) J.B. Morton y D. Redecker	*Acaulospora trappei*
Acaulosporaceae	*Acaulospora* sp	
Gigasporaceae	*Dentiscutata savannicola* (R.A. Herrera y Ferrer) C. Walker y A. Schüßler	*Gigaspora savannicola; Fuscutata savannicola; Scutellospora savannicola*
	Gigaspora rosea T.H. Nicolson y N.C. Schenck	
	Cetraspora pellucida (T.H. Nicolson y N.C. Schenck) Oehl, F.A. Souza y Sieverding	*Scutellospora pellucida*
Diversisporaceae	*Diversispora varaderana* J. Błaszkowski, G. Chwat, Kovács y Góralska	
Claroideoglomeraceae	*Claroideoglomus etunicatum* (W.N. Becker y Gerd.) C. Walker y A. Schüßler	*Glomus etunicatum; Entrophospora etunicata*
Glomeraceae	*Dominikia bernensis* Oehl, Palenz., Sánchez-Castro, N.M.F. Sousa y G.A. Silva	

Dominikia lithuanica J. Błaszkowski, G. Chwat, A. Góralska	
Rhizophagus aggregatus (N.C. Schenck y G.S. Sm.) C. Walker	*Glomus aggregatum.* *Rhizoglomus aggregatum*
Glomus macrocarpum T.H. Nicolson y Gerd	*Endogone macrocarpa*
Funneliformis mosseae T.H. Nicolson y Gerd	
Kamienskia bistrata J. Błaszkowski, G. Chwat y Kovács	
Rhizophagus irregularis Błaszk., Wubet, Renker y Buscot (C. Walker y A. Schüßler comb. Nov)	
Rhizophagus neocaledonicus D. Redecker, Crossay y Cilia	

Tomado de Banuelos *et al*. (2023)

El inóculo utilizado fue reproducido en una planta hospedero que contiene principalmente HMA; sin embargo, existen bacterias asociadas en este inoculante (Hernádez-Álvarez et al., 2023).

2.6. Índice de color verde obscuro (DGCI)

Utilizamos un método indirecto para medir el contenido de clorofila. Este es un método no destructivo que nos permitió usar la cámara de un teléfono móvil Android para medir los cambios en las hojas obteniendo un índice de color verde oscuro (DGCI) en una escala de 0 a 1 (Petiole LTD, 2019). El DGCI es una medida cuantitativa relativa de verdor, estrechamente relacionada con la concentración de nitrógeno (N) en las hojas (Kaler *et al.*, 2020). El procedimiento se basa en el uso de una tarjeta de calibración para normalizar el color entre las muestras, mientras se normalizan los cambios en la luz de fondo. El teléfono móvil se colocó en un soporte estacionario, a 5 cm por encima de la muestra de la hoja, en

un entorno de luz controlada y se tomó una fotografía para luego ser utilizada en la aplicación móvil Petiole Pro.

Es común utilizar un medidor de clorofila accesible para determinar el verdor de las hojas e inferir indirectamente la concentración de clorofila en las hojas (Kaler *et al*., 2020). Karcher & Richardson (2003) encontraron que el análisis de imagen digital se puede utilizar para determinar diferencias entre plantas fertilizadas con N midiendo su DGCI.

2.7. Determinación del contenido de Prolina

El contenido de prolina se determinó utilizando el método de Bates (1973), con modificaciones. Se homogeneizó una muestra de 0.25 g con nitrógeno líquido en un mortero, y se añadieron 5 mL de ácido sulfosalicílico al 3%. El extracto se filtró al vacío. Alícuotas de 0.5 mL del extracto se mezclaron con 0.5 mL de solución de ácido ninhidrina, junto con 0.5 mL de ácido acético. Las muestras se calentaron durante 30 minutos a 90 °C y se enfriaron en un baño de hielo hasta alcanzar la temperatura ambiente. Se utilizó tolueno para extraer el aminoácido, y las muestras se incubaron durante 20 minutos en un ambiente oscuro. La absorbancia de la fase orgánica se midió a 520 nm utilizando un espectrofotómetro (Thermo-scientific GENESYS 10S UV-Vis). La concentración de prolina se calculó utilizando una curva de calibración y se expresó como µmoles mg^{-1}.

2.8. Variables de crecimiento vegetal

Las plantas cosechadas se dividieron en raíz y parte aérea, y luego se secaron en horno a 45°C durante tres días, hasta alcanzar un peso constante. Contamos el número de trifolios al momento de la cosecha. La altura de la planta se midió desde la base del tallo y las hojas

trifoliadas se contaron manualmente. El área foliar se midió utilizando la aplicación móvil Petiole Pro (Petiole LTD, 2019).

2.9. Análisis estadístico

Se realizó un ANOVA de dos vías para comparar los tratamientos. Los resultados se expresaron como medias con desviación estándar (±). Las diferencias significativas entre las medias de los tratamientos se analizaron utilizando la prueba post hoc de Tukey (HSD, $p \leq 0.05$). Además, se utilizó la prueba t de Student para comparar plantas micorrizadas *vs* no micorrizadas, dentro de cada factor. La normalidad y la homogeneidad de las varianzas se verificaron utilizando las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene. Todos los análisis de datos se realizaron en Minitab 21.1.0.

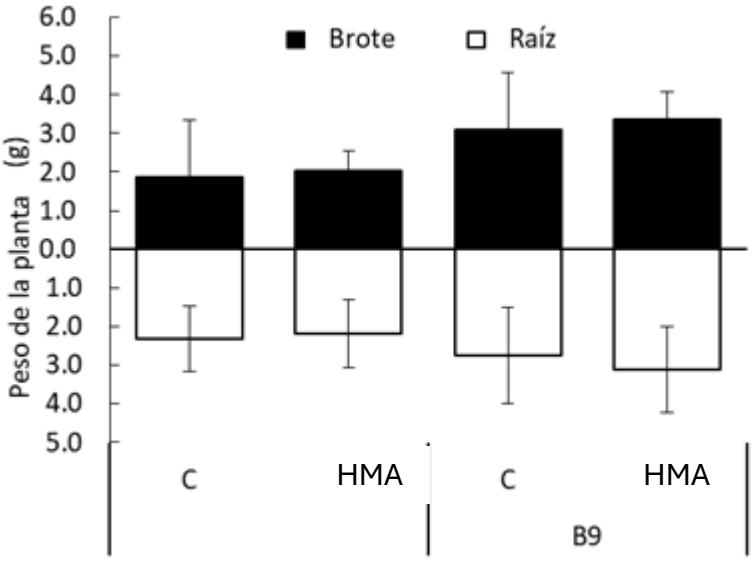
3. Resultados y discusión

3.1. Crecimiento Vegetal

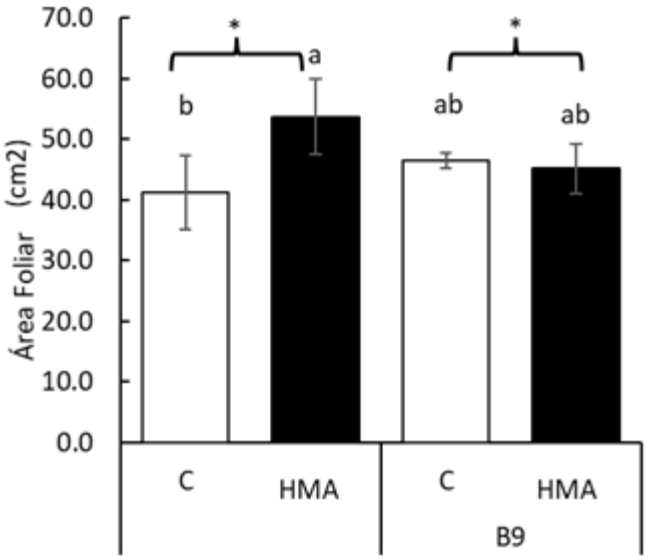
A medida que la producción de *P. vulgaris* avanza hacia métodos más sostenibles, se necesita información novedosa sobre el uso de biofertilizantes y metabolitos no sintéticos. En este estudio, observamos un aumento del 67% en el peso seco de los brotes con la adición de la vitamina B9 (F: 5.01, $p \leq 0.047$; Fig. 1a). Esto se alinea con estudios previos en *Capsicum annuum* L. (Solanaceae) y *Triticum aestivum* L. (Poaceae), donde la suplementación con la vitamina B9 también incrementó su biomasa (Al-Said & Kamal, 2008; Esfandiari, Enayati, Sabaghina & Janmohammadi, 2012). Este aumento podría traducirse potencialmente en mayores rendimientos en etapas posteriores, como se ha sugerido en otros

estudios (Rashidi, Yousefi, Pouryusef & Goicoechea, 2021). La vitamina B9 es esencial para procesos como la síntesis de ADN, la división celular y el metabolismo de aminoácidos, los cuales desempeñan roles importantes en el crecimiento general de la planta (Gorelova, Ambach, Rébeillé, Stove & Van Der Straeten, 2017). Su bajo costo y efectividad probada en cultivos como *Pisum sativum* L. (Fabaceae) (Farouk & Abdul Qados, 2018) y *P. vulgaris* L. (Fabaceae) (Ibrahim, Ibrahim & Adb El-Gawad, 2021) la posicionan como una herramienta prometedora para mejorar la productividad de los cultivos. El impacto positivo de la suplementación con la vitamina B9 en el peso de la planta indica que probablemente actúa como un promotor general del crecimiento, contribuyendo a una mayor acumulación de biomasa tanto en los tejidos de los brotes como de las raíces (Burguieres, McCue, Kwon & Shetty, 2007). Otros estudios han demostrado que la deficiencia de la vitamina B9 puede causar anomalías en el crecimiento y a una reducción del vigor general de la planta (Li *et al.*, 2023), y al aumentar su suministro podemos mejorar su vigor. El aumento del peso de la planta tras la adición de vitamina B9 también podría atribuirse a la restauración de las vías metabólicas relacionadas con los folatos, lo que lleva a un mejor crecimiento y desarrollo ((Ayala-Rodríguez, Barrera-Ortíz, Ruiz-Herrera & López-Bucio, 2017). Los folatos son esenciales para la biosíntesis de piruvato, que es vital para la producción de biomasa (Bar-Even, Noor & Flamholz, 2013; Kim *et al.*, 2020).

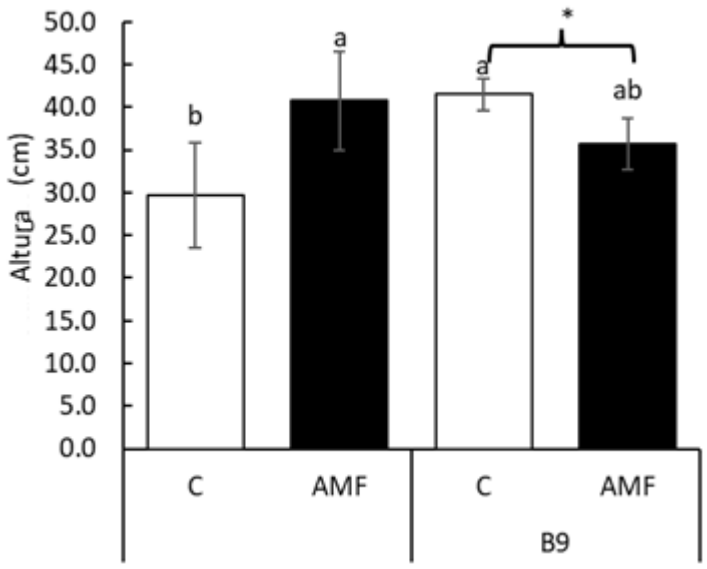
a)


Brote
Raíz
Peso de la planta (g)
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
1.0
2.0
3.0
4.0
5.0
C
HMA
C
HMA
B9

b)


Área Foliar (cm2)
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
*
a
b
*
ab
ab
C
HMA
C
HMA
B9

c)



d)

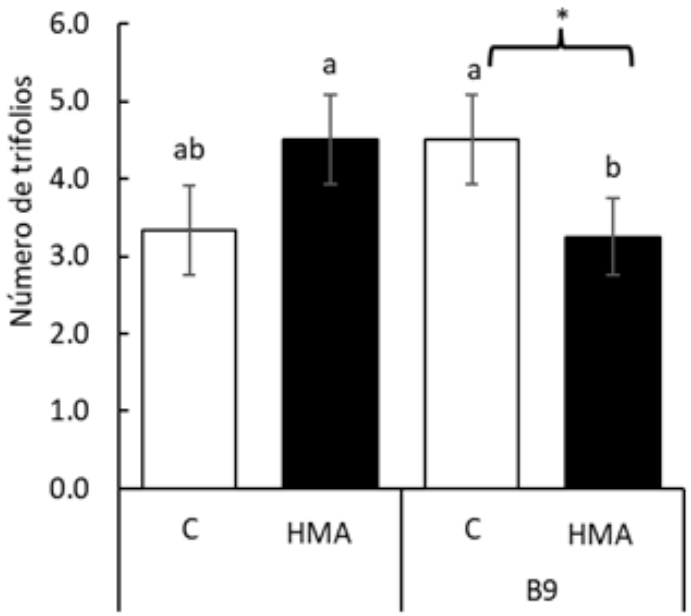


Figura 1. a) Peso seco de *Phaseolus vulgaris* L. (foliar y raíz), b) área foliar, c) altura de la planta, y d) número de trifolios inoculadas (HMA) o controles no inoculados (C) y regadas con 50 µM de ácido fólico (vitamina B9) o no (control, C); 35 días después de la inoculación

de la mezcla micorrizógena y bacteriana. Medias ± desviación estándar con n=4. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (Tukey HSD $p \leq 0.05$). El asterisco (*) sobre las barras indica una diferencia significativa entre dos tratamientos (prueba t de Student).

La inoculación con HMA aumentó significativamente el área foliar (F: 4.36, $p \leq 0.030$; Fig. 1b), lo cual es consistente con el papel bien documentado de los HMA en la adquisición y transporte de nutrientes (Augé Stodola, Ebel & Duan, 1995; Kavanova, Grimoldi, Lattanzi & Schnyder *et al*., 2006). La expansión del área foliar puede deberse a la mejor disponibilidad de nutrientes facilitada por la red hifal micorrízica, que mejora la capacidad fotosintética y el vigor general de la planta (Cela *et al.*, 2022; Tao, Dong, Wang, Chen & Tang, 2022). Los HMA aumentaron la altura de las plantas (F: 5.25, $p \leq 0.017$); sin embargo, cuando se añadió la vitamina B9, las plantas inoculadas tenían menor altura en comparación con las no inoculadas (F: 13.63, $p \leq 0.004$; Fig. 1c). Además, las plantas mostraron un aumento en el número de trifolios cuando fueron inoculadas (F: 5.92, $p \leq 0.012$), pero el número de trifolios no aumentó cuando se añadió la vitamina B9 (F: 0.02, $p \leq 0.888$, Fig. 1d). Curiosamente, la ausencia de un efecto aditivo de la suplementación con vitamina B9 en las plantas inoculadas con HMA-bacterias sobre estas variables, sugiere un posible umbral en la disponibilidad de los folatos, donde los folatos adicionales no confieren beneficios extras. La planta podría optimizar la adquisición de la vitamina B9 hasta el punto donde la inoculación con HMA-bacterias no mejora los procesos fisiológicos responsables de los parámetros de crecimiento de la planta. Además, los mecanismos regulatorios que gobiernan el desarrollo de la planta podrían involucrar otros factores, como la señalización hormonal (Pozo, López-Ráez, Azcón-Aguilar, & García-Garrido, 2015). La falta de un efecto

aditivo también podría indicar que la interacción específica entre los microbios y la planta hospedadora, modula la respuesta a la vitamina B9 exógena de manera distinta en comparación con las plantas no micorrizadas (Seddas *et al*., 2009). Las bacterias presentes en el inoculante también podrían ser una fuente de vitaminas, en particular de vitamina B9 (Hernández-Álvarez, Peimbert, Rodríguez-Mertin, Trejo-Aguilar & Acaraz, 2023), pero no encontramos diferencias entre plantas inoculadas y plantas inoculadas más la vitamina B9 (Figura 1).

3.2. Índice de color verde oscuro (DGCI)

Medimos el DGCI como un indicador de la capacidad fotosintética afectada por el inoculante y la suplementación con la vitamina B9. Las plantas inoculadas no aumentaron el DGCI ($F: 1.31$, $p \leq 0.276$). Usualmente, la inoculación con HMA incrementa la concentración clorofila en las plantas (Kavanova et al., 2006; Kayoumu et al., 2023); aunque estudios con *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) inoculada con HMA también han mostrado que el contenido de clorofila no varía en comparación con plantas no inoculadas (Ye et al., 2022). El riego con la vitamina B9 aumentó el DGCI ($F: 19.27$, $p \leq 0.001$); mientras que la combinación de la vitamina B9 y el inoculante no difirió del tratamiento con solo la vitamina B9 ($F: 4.40$, $p \leq 0.006$) (Fig. 2). El aumento en DGCI debido a la suplementación con la vitamina B9 podría deberse a que los folatos están involucrados en el metabolismo del nitrógeno, mediando su translocación desde la raíz hasta el brote (Banuelos *et al.,* 2021). La disponibilidad de nitrógeno afecta la fotosíntesis de las plantas, ya que la clorofila está asociada con los niveles de nitrógeno (Wang *et al*., 2021) y la suplementación con la vitamina B9 podría haber incrementado la absorción de nitrógeno expresada en el contenido de clorofila por el DGCI.

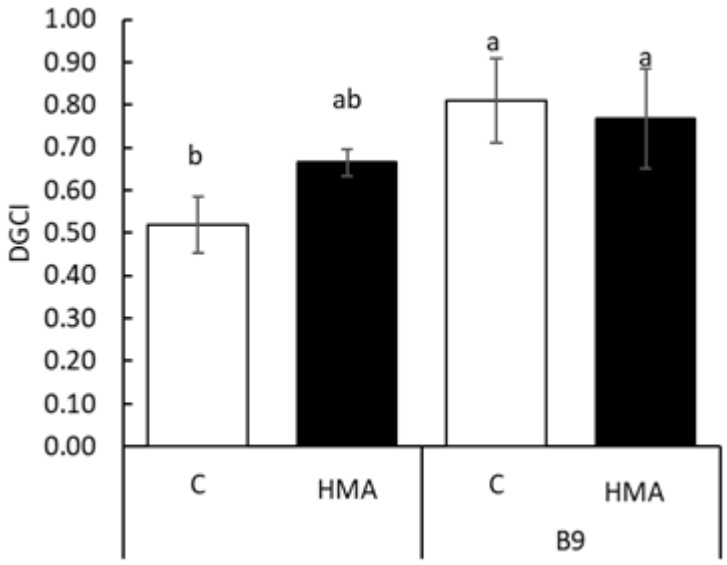


Figura 2. Índice de Color Verde Oscuro (DGCI) en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. inoculadas (HMA) o controles no inoculados (C) y regadas con 50 µM de ácido fólico (vitamina B9) o no (control, C), 35 días después de la inoculación con la mezcla de HMA y bacterias. Medias ± desviación estándar con n=4. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (Tukey HSD $p \leq 0.05$).

3.3. Contenido de prolina

La inoculación redujo el contenido de prolina en las hojas; aunque no significativamente (F: 4.02, $p \leq 0.07$). Por otro lado, observamos que la adición de la vitamina B9 disminuyó significativamente la concentración del metabolito relacionado con el estrés, la prolina, tanto en las plantas de control como en las inoculadas con HMA (F: 37.63, $p \leq 0.000$; Fig. 3). Esta disminución en la prolina podría estar relacionada con la mejora en la eficiencia del uso del agua observada con el tratamiento con la vitamina B9, que se ha reportado reduce la necesidad de metabolitos osmorreguladores como la prolina en las plantas (Ibrahim *et al.*, 2021; Al-Elwany *et al*., 2022). Por ejemplo, el riego foliar con 150 µM de vitamina B9 puede

aumentar la eficiencia del uso del agua en un 29% (Ibrahim et al., 2021). En *P. vulgaris* L. (Fabaceae), se ha demostrado que la suplementación con la vitamina B9 alivia el estrés salino, que a menudo está vinculado a la eficiencia del uso del agua (Alsamadany *et al*., 2022; Ma, Wei, Liu, Liu & Liu , 2021). Por lo tanto, los efectos promotores del crecimiento de la vitamina B9 también pueden contribuir a reducir el estrés de la planta, como se refleja en los niveles más bajos de prolina.

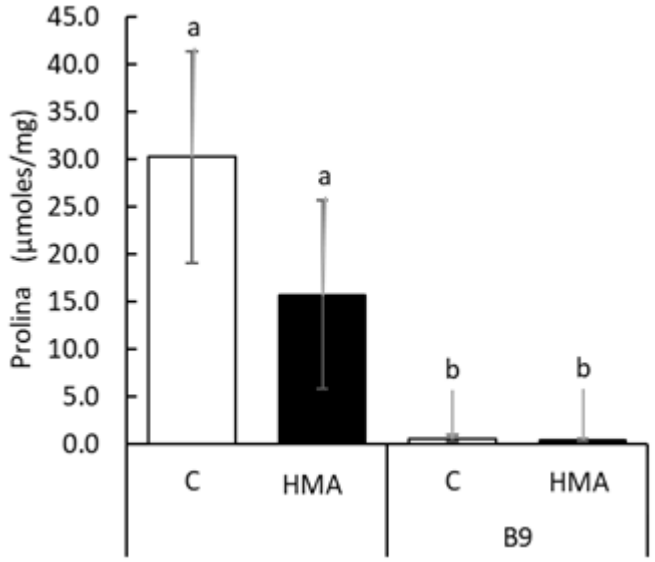


Figura 3. Contenido de prolina en hojas de *Phaseolus vulgaris* L. inoculadas (AMF) o controles no inoculados (C) y regadas con 50 µM de ácido fólico (vitamina B9) o no (control, C). 35 días después de la inoculación con la mezcla de HMA y bacterias. Medias ± desviación estándar con n=4. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (Tukey HSD $p \leq 0.05$).

4. Conclusiones

El impacto positivo de la vitamina B9 en el peso de *P. vulgaris* se alinea con su papel establecido en las vías metabólicas que promueven el crecimiento. El aumento del área foliar

con la inoculación microbiana destaca la contribución de la simbiosis en la adquisición de nutrientes y la eficiencia fotosintética. La falta de un efecto aditivo de la vitamina B9 en el área foliar, en *P. vulgaris* L. inoculada, indica una interacción compleja entre la disponibilidad de nutrientes, las interacciones simbióticas y las respuestas fisiológicas de *P. vulgaris* L. Una limitación biológica y/o física podría limitar cuánto puede utilizar *P. vulgaris* L. la vitamina B9, y no puede mejorar por la inoculación con los microbios.

5. Declaración de ética

No aplica

6. Consentimiento de publicación

No aplica

7. Disponibilidad de datos

Todos los datos generados o analizados durante este estudio están en este artículo

8. Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses

9. Financiamiento

No aplica

10. Contribuciones de los autores

Conceptualización, JB.; Metodología, JB, SLCR, NMM, EMR.; Investigación, JB, EMR, SLCR, NMM.; Recursos, EMR, NMM, SLCR.; Supervisión, SLCR, EMR, NMM.; Escritura: preparación del borrador original, JB; Escritura: revisión y edición, SLCR, NMM, EMR

11. Agradecimientos

JBT agradece a la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) y a CONAHCyT por la beca (286223) para obtener el grado doctoral del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana. JBT también agradece al Centro de Ciencias Genómicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y a la Universidad Veracruzana (UV) por los recursos proporcionados para desarrollar este proyecto.

12. Referencias

Al-Elwany, O. A. A. I., Hemida, K. A., Abdel-Razek, M. A., El-Mageed, T. A. A., El-Saadony, M. T., AbuQamar, S. F., El-Tarabily, K. A., & Taha, R. S. (2022). Impact of folic acid in modulating antioxidant activity, osmoprotectants, anatomical responses, and photosynthetic efficiency of *Plectranthus amboinicus* under salinity conditions. *Frontiers in Plant Science, 13*. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.887091

Aljuaid BS, Mukherjee S, Sayed AN, El-Gabry YA, Omar MMA, Mahmoud SF, Alsubeie MS, Darwish DBE, Al-Qahtani SM, Al-Harbi NA, Alzuaibr FM, Basahi MA, Hamada MMA (2022) Folic acid reinforces maize tolerance to sodic-alkaline stress through modulation of growth, biochemical and molecular mechanisms. Life 12:1327. https://doi.org/10.3390/life12091327

Al-Said, M. A., & Kamal, A. M. (2008). Effect of foliar spray with folic acid and some amino acids on flowering yield and quality of sweet pepper. *Journal of Plant Production, 33*(10), 7403–7412. https://doi.org/10.21608/jpp.2008.171240

Alsamadany, H., Mansour, H., Elkelish, A., & Ibrahim, M. F. M. (2022). Folic acid confers tolerance against salt stress-induced oxidative damages in snap beans through regulation growth, metabolites, antioxidant machinery and gene expression. *Plants*, *11*(11), Article 11. https://doi.org/10.3390/plants11111459

Augé, R. M., Stodola, A. J. W., Ebel, R. C., & Duan, X. (1995). Leaf elongation and water relations of mycorrhizal sorghum in response to partial soil drying: Two *Glomus* species at varying phosphorus fertilization. *Journal of Experimental Botany*, *46*(3), 297–307. https://doi.org/10.1093/jxb/46.3.297

Augé, R. M., Toler, H. D., & Saxton, A. M. (2015). Arbuscular mycorrhizal symbiosis alters stomatal conductance of host plants more under drought than under amply watered conditions: A meta-analysis. *Mycorrhiza*, *25*(1), 13–24. https://doi.org/10.1007/s00572-014-0585-4

Ayala-Rodríguez, J. Á., Barrera-Ortiz, S., Ruiz-Herrera, L. F., & López-Bucio, J. (2017). Folic acid orchestrates root development linking cell elongation with auxin response and acts independently of the target of rapamycin signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, *264*, 168–178. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.09.011

Banuelos, J., Martínez-Romero, E., Montaño, N. M., & Camargo-Ricalde, S. L. (2021). Folates in legume root nodules. *Physiologia Plantarum*, *171*(3), 447–452. https://doi.org/10.1111/ppl.13218

Banuelos, J., Martínez-Romero, E., Montaño, N. M., & Camargo-Ricalde, S. L. (2023). *Rhizobium tropici* and riboflavin amendment condition arbuscular mycorrhiza colonization

in *Phaseolus vulgaris* L. *Agronomy*, *13*(3), Article 3. https://doi.org/10.3390/agronomy13030876

Banuelos, J., Trejo, D., Alarcon, A., Lara, L., Moreira, C., & Cruz, S. (2012). The reduction in proline buildup in mycorrhizal plants affected by nematodes. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, *12*(2), 263–270. https://doi.org/10.4067/S0718-95162012000200006

Bar-Even, A., Noor, E., Flamholz, A., & Milo, R. (2013). Design and analysis of metabolic pathways supporting formatotrophic growth for electricity-dependent cultivation of microbes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1827*(8), 1039–1047. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2012.10.013

Basset, G. J. C., Quinlivan, E. P., Gregory, J. F., & Hanson, A. D. (2005). Folate synthesis and metabolism in plants and prospects for biofortification. *Crop Science*, *45*(2), 449–453. https://doi.org/10.2135/cropsci2005.0449

Bates, L. S. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil*, *39*, 205–207.

Bekuzarova, S. A., Kozyrev, A. K., Shabanova, I. A., Lushenko, G. V., & Weissfeld, L. I. (2020). Enhancing of nitrogen fixation by legumes. *BIO Web of Conferences*, *23*, 02006. https://doi.org/10.1051/bioconf/20202302006

Burguieres, E., McCue, P., Kwon, Y.-I., & Shetty, K. (2007). Effect of vitamin C and folic acid on seed vigor response and phenolic-linked antioxidant activity. *Bioresource Technology*, *98*(7), 1393–1404. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.046

Cela, F., Avio, L., Giordani, T., Vangelisti, A., Cavallini, A., Turrini, A., Sbrana, C., Pardossi, A., & Incrocci, L. (2022). Arbuscular mycorrhizal fungi increase nutritional quality of soilless grown lettuce while overcoming low phosphorus supply. *Foods*, *11*(22), Article 22. https://doi.org/10.3390/foods11223612

Esfandiari, E., Enayati, W., Sabaghnia, N., & Janmohammadi, M. (2012). Effects of folic acid on seed germination properties and seedling growth of wheat. *Albanian Journal of Agricultural Sciences*, *11*(3), 185–192.

Farouk, S., & Abdul Qados, A. M. S. (2018). Enhancing seed quality and productivity as well as physio-anatomical responses of pea plants by folic acid and/or hydrogen peroxide application. *Scientia Horticulturae*, *240*, 29–37. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.05.049

Ghignone, S., Salvioli, A., Anca, I., Lumini, E., Ortu, G., Petiti, L., Cruveiller, S., Bianciotto, V., Piffanelli, P., Lanfranco, L., & Bonfante, P. (2012). The genome of the obligate endobacterium of an AM fungus reveals an interphylum network of nutritional interactions. *The ISME Journal*, *6*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/ismej.2011.110

Giovannetti, M., & Mosse, B. (1979). An evaluation technique for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, *84*(3), 489–500. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x

Gorelova, V., Ambach, L., Rébeillé, F., Stove, C., & Van Der Straeten, D. (2017). Folates in plants: research advances and progress in crop biofortification. *Frontiers in Chemistry*, *5*. https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00021

Hwang, S. Y., Kang, Y. J., Sung, B., Jang, J. Y., Hwang, N. L., Oh, H. J., Ahn, Y. R., Kim, H. J., Shin, J. H., Yoo, M.-A., Kim, C. M., Chung, H. Y., & Kim, N. D. (2018). Folic acid is necessary for proliferation and differentiation of C2C12 myoblasts. *Journal of Cellular Physiology*, *233*(2), 736–747. https://doi.org/10.1002/jcp.25989

Ibrahim, M. F. M., Ibrahim, H. A., & Abd El-Gawad, H. G. (2021). Folic acid as a protective agent in snap bean plants under water deficit conditions. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, *96*(1), 94–109. https://doi.org/10.1080/14620316.2020.1793691

Jabrin, S., Ravanel, S., Gambonnet, B., Douce, R., & Rébeillé, F. (2003). One-carbon metabolism in plants. Regulation of tetrahydrofolate synthesis during germination and seedling development. *Plant Physiology*, *131*(3), 1431–1439. https://doi.org/10.1104/pp.016915

Kaler, A. S., Abdel-Haleem, H., Fritschi, F. B., Gillman, J. D., Ray, J. D., Smith, J. R., & Purcell, L. C. (2020). Genome-wide association mapping of dark green color index using a diverse panel of soybean accessions. *Scientific Reports*, *10*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/s41598-020-62034-7

Karcher, D. E., & Richardson, M. D. (2003). Quantifying turfgrass color using digital image analysis. *Crop Science*, *43*(3), 943–951. https://doi.org/10.2135/cropsci2003.9430

Kavanova, M., Grimoldi, A. A., Lattanzi, F. A., & Schnyder, H. (2006). Phosphorus nutrition and mycorrhiza effects on grass leaf growth. P status- and size-mediated effects on growth zone kinematics. *Plant, Cell & Environment*, *29*(4), 511–520. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01428.x

Kayoumu, M., Iqbal, A., Muhammad, N., Li, X., Li, L., Wang, X., Gui, H., Qi, Q., Ruan, S., Guo, R., Zhang, X., Song, M., & Dong, Q. (2023). Phosphorus availability affects the photosynthesis and antioxidant system of contrasting low-P-tolerant cotton genotypes. *Antioxidants*, *12*(2), 466. https://doi.org/10.3390/antiox12020466

Khavazi, K., Rejali, F., Seguin, P., & Miransari, M. (2007). Effects of carrier, sterilization method, and incubation on survival of *Bradyrhizobium japonicum* in soybean (Glycine max L.) inoculants. *Enzyme and Microbial Technology*, *41*(6), 780–784. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.06.011

Kim, S., Lindner, S. N., Aslan, S., Yishai, O., Wenk, S., Schann, K., & Bar-Even, A. (2020). Growth of *E. coli* on formate and methanol via the reductive glycine pathway. *Nature Chemical Biology*, *16*(5), Article 5. https://doi.org/10.1038/s41589-020-0473-5

Li, Y., Luo, J., Chen, R., Zhou, Y., Yu, H., Chu, Z., Lu, Y., Gu, X., Wu, S., Wang, P., Kuang, H., & Ouyang, B. (2023). Folate shapes plant root architecture by affecting auxin distribution. *The Plant Journal*, *113*(5), 969–985. https://doi.org/10.1111/tpj.16093

Ma, Y., Wei, Z., Liu, J., Liu, X., & Liu, F. (2021). Growth and physiological responses of cotton plants to salt stress. *Journal of Agronomy and Crop Science*, *207*(3), 565–576. https://doi.org/10.1111/jac.12484

Petiole LTD. (2019). *Petiole Pro: Plant Phenotyping* (Version 2.0.1) [Android]. Petiole LTD. https://play.google.com/store/apps/details?id=com.petiolepro.farmvision&hl=en

Phillips, J. M., & Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, *55*, 158–161.

Piya, S., Pantalone, V., Zadegan, S. B., Shipp, S., Lakhssassi, N., Knizia, D., Krishnan, H. B., Meksem, K., & Hewezi, T. (2023). Soybean gene co-expression network analysis identifies two co-regulated gene modules associated with nodule formation and development. *Molecular Plant Pathology*, *24*(6), 628–636. https://doi.org/10.1111/mpp.13327

Pozo, M. J., López-Ráez, J. A., Azcón-Aguilar, C., & García-Garrido, J. M. (2015). Phytohormones as integrators of environmental signals in the regulation of mycorrhizal symbioses. *New Phytologist*, *205*(4), 1431–1436. https://doi.org/10.1111/nph.13252

Rashidi, S., Yousefi, A. R., Pouryousef, M., & Goicoechea, N. (2021). Mycorrhizal impact on competitive relationships and yield parameters in *Phaseolus vulgaris* L. —Weed mixtures. *Mycorrhiza*, *31*(5), 599–612. https://doi.org/10.1007/s00572-021-01046-1

Rosenblueth, M., & Martínez-Romero, E. (2004). *Rhizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization. *Archives of Microbiology*, *181*(5), 337–344. https://doi.org/10.1007/s00203-004-0661-9

Seddas, P. M. A., Arias, C. M., Arnould, C., van Tuinen, D., Godfroy, O., Benhassou, H. A., Gouzy, J., Morandi, D., Dessaint, F., & Gianinazzi-Pearson, V. (2009). Symbiosis-related plant genes modulate molecular responses in an arbuscular mycorrhizal fungus during early root interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, *22*(3), 341–351. https://doi.org/10.1094/MPMI-22-3-0341

Sheteiwy, M. S., El-Sawah, A. M., Korany, S. M., Alsherif, E. A., Mowafy, A. M., Chen, J., Jośko, I., Selim, S., & AbdElgawad, H. (2022). Arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* impacts on physiological and biochemical responses of ryegrass and chickpea plants under beryllium stress. *Environmental Pollution*, *315*, 120356. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120356

Tao, J., Dong, F., Wang, Y., Chen, H., & Tang, M. (2022). Arbuscular mycorrhizal fungi enhance photosynthesis and drought tolerance by regulating MAPK genes expressions of *Populus simonii* × *P. nigra*. *Physiologia Plantarum*, *174*(6), e13829. https://doi.org/10.1111/ppl.13829

Van Wilder, V., De Brouwer, V., Loizeau, K., Gambonnet, B., Albrieux, C., Van Der Straeten, D., Lambert, W. E., Douce, R., Block, M. A., Rebeille, F., & Ravanel, S. (2009). C1 metabolism and chlorophyll synthesis: The Mg-protoporphyrin IX methyltransferase activity is dependent on the folate status. *New Phytologist*, *182*(1), 137–145. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02707.x

Voysest, O. (1983). *Variedades de frijol en América Latina y su origen*. Centro International de Agricultura Tropical (CIAT).

Wang, K. L.-C., Li, H., & Ecker, J. R. (2002). Ethylene biosynthesis and signaling networks. *The Plant Cell*, *14*(suppl 1), S131–S151. https://doi.org/10.1105/tpc.001768

Wang, N., Fu, F., Wang, H., Wang, P., He, S., Shao, H., Ni, Z., & Zhang, X. (2021). Effects of irrigation and nitrogen on chlorophyll content, dry matter and nitrogen accumulation in

sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Scientific Reports*, *11*(1), 16651. https://doi.org/10.1038/s41598-021-95792-z

Ye, Q., Wang, H., & Li, H. (2022). Arbuscular mycorrhizal fungi improve growth, photosynthetic activity, and chlorophyll fluorescence of *Vitis vinifera* L. cv. Ecolly under drought stress. *Agronomy*, *12*(7), Article 7. https://doi.org/10.3390/agronomy12071563

Zrenner, R., Stitt, M., Sonnewald, U., & Boldt, R. (2006). Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annual Review of Plant Biology*, *57*, 805–836. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105421

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN GENERAL

En esta tesis se planteó que las vitaminas del grupo B, en específico la riboflavina y los folatos, juegan un papel relevante en las interacciones simbióticas entre plantas, hongos micorrizógenos y rhizobios. Este supuesto partió de un análisis *in sílico* y revisión bibliográfica que sugirió, que durante la simbiosis entre leguminosas y rizobios, la presencia de folatos era esencial, no solo para el establecimiento de la simbiosis, sino que también para la translocación de N (Banuelos et al., 2021). En este sentido, se observó que la ruta de biosíntesis de purinas, necesaria para la translocación del N fijado en nódulos, requiere de por lo menos 3 moléculas de folatos para producir ureidos (Banuelos et al., 2021), una forma degradada de las purinas que transloca el N fijado al resto de la planta (Schubert, 1986).

Además, existe una sobre expresión de por lo menos 16 genes directamente relacionados con la biosíntesis de folatos durante la fijación simbiótica de nitrógeno en *G.max* L. inoculadas con *Bradirhizobium diazoefficiens* (Delamuta) (Cuadro 1, Capítulo II). Una observación relevante en la revisión publicada del Capítulo II, fue que, durante la translocación de nitrógeno vía la ruta de biosíntesis de purinas, se generaba guanosin trifostato (GTP) (Figura 1, Capítulo 2), un precursor no solo de folatos, sino también de la riboflavina (vitamina B2), otra vitamina del grupo B. Además, la presencia activa de la GTP ciclohidrolasa, enzima que sintetiza dicho nucleótido, es una de las enzimas primarias para la síntesis, no sólo de la vitamina B9, sino también de la vitamina B2. Esta observación permitió considerar que ambas vitaminas podrían tener funciones relevantes durante los procesos de simbiosis entre plantas y microorganismos. De hecho la vitamina B2, promueve

la activación de la vitamina B9 (Averianova et al., 2020), lo que contribuyó a la idea de que ambas vitaminas podrían tener funciones interconectadas.

Como se mencionó en la introducción, la vitamina B2, afecta positivamente la producción de nódulos, incrementa la fijación de nitrógeno y la respiración de las raíces, durante la simbiosis entre leguminosas y rizobios (Abbas & Sibirny, 2011; García-Angulo, 2017; Lowe & Evans, 1962; Yurgel et al., 2014). Además, la vitamina B2 es una molécula secretada por los rizobios (Dakora et al., 2015). En el Capítulo I, se recopilaron estudios que observaron que rizobios no solo exudaban vitaminas como la B2 (Phillips et al., 1999), sino que también poseen distintos genes que permiten su transporte a través de membranas bacterianas (Deka et al., 2013; Duurkens et al., 2007; Garcia-Angulo et al., 2013; Gutiérrez-Preciado et al., 2015; Hemberger et al., 2011; Sun et al., 2013; Vitreschak et al., 2002). Estos transportadores pueden contribuir para que los rizobios interactúen con el entorno rizosférico, como se planteó en el objetivo "a". Sin embargo, no existía información directa relacionada con su efecto en la simbiosis micorrízica, otra simbiosis importante que suele compartir espacio en las raíces del mismo hospedero que los rizobios.

Los únicos indicios sobre cuál podría ser el efecto de la vitamina B2 en la simbiosis de HMA, se encontraban en la posibilidad de que su presencia en la rizósfera (secretada por rizobios u otra fuente) aumentará la concentración de CO_2 (Lowe y Evans 1962), estimulando el crecimiento de los HMA (Bécard y Piché 1989).

En el Capítulo III se investigó la influencia de dicha vitamina en la simbiosis micorrizógena (Objetivo "c"), al adicionar de manera externa concentraciones conocidas de la vitamina B2 en presencia o ausencia de *R. tropici* en *P vulgaris* L. inoculados con HMA. Además, en este Capítulo también se abordó el objetivo general de la tesis, dónde la adición de la vitamina B2 a *P. vulgaris* inoculado con HMA, resultó en un incremento significativo

en la colonización micorrizógena, y este efecto fue dependiente de la concentración de la vitamina B2 (Banuelos et al., 2023). Otra biomolécula cuya aplicación exógena incrementa la colonización micorrízica, especialmente las vesículas y esporas, es el miristato (un lípido de cadena C14:0)(Liu et al., 2023). Aunque, a diferencia de la vitamina B2, el miristrato no tiene ningún efecto sobre el crecimiento vegetal. En esta tesis, la vitamina B2, no solamente incrementa la colonización micorrízica, en especial la cantidad de vesículas, sino que también incrementa parámetros de crecimiento de la planta (Banuelos et al., 2023). A la fecha, esta es la primera publicación que experimenta con el efecto de la vitamina B2 o cualquier vitamina en la simbiosis micorrizógena.

Es importante mencionar que en esta tesis no se determinó si la vitamina B2 suministrada al sistema, fue absorbida directamente por los HMA o vía la raíz de la planta hacia los HMA. Lo cual deja un área de oportunidad de investigación futura.

Otro dato relevante en la presente investigación fue que la adición de la vitamina B2 en *P. vulgaris* inoculado con una mezcla de 15 HMA, influía en la selección y distribución relativa de especies de HMA en las raíces (Figura 4, Capítulo III), considerando el consorcio original (Cuadro 1, Capítulo III). En dicho Capítulo, se abordó el objetivo “e” de la presente tesis.

La mayoría de los factores ambientales suelen afectar las comunidades de HMA en las raíces , tales como los cambios fisicoquímicos del suelo, nutrientes e incluso hospedero (Han et al., 2023), pero hasta este momento, no se había estudiado si una vitamina como la B2 podría también afectar las poblaciones de HMA.. Una de las posibles explicaciones de tal respuesta, podría deberse a la naturaleza a auxotrófica de los HMA, ya que carecen de los genes necesarios para la biosíntesis de las vitaminas B1, B2, B6 y B9 (Kobayashi et al., 2018; Morin et al., 2019; Tisserant et al., 2013; Venice et al., 2020). En este sentido, se podría

asumir que HMA específicos como *G. macrocarpum* y *D. bernensis*, son especialmente sensibles a los cambios de concentración de esta vitamina o que pueden aprovecharlos de manera diferencial a las demás especies del consorcio (Figura 4, Capítulo III).

La vitamina B2 suplementada en plantas, puede inducir resistencia sistémica, es decir que involucra la expresión de genes relacionados con la patogénesis (Dong & Beer, 2000). En el Capítulo III, se observó que los HMA no solo no se veían afectados por el efecto de resistencia sistémica inducida de la vitamina B2, sino que su colonización incrementó de manera significativa (Figuras 2 y 3, Capítulo III). Este descubrimiento puede proporcionar herramientas a los agricultores que no solo incrementan la resistencia de sus plantas a los patógenos, sino que estimulan microorganismos benéficos como los HMA.

Referencias

Abbas, C. A., & Sibirny, A. A. (2011). Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *75*(2), 321–360. https://doi.org/10.1128/MMBR.00030-10

Averianova, L. A., Balabanova, L. A., Son, O. M., Podvolotskaya, A. B., & Tekutyeva, L. A. (2020). Production of vitamin B2 (Riboflavin) by microorganisms: An Overview. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*. https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.570828

Banuelos, J., Martínez-Romero, E., Montaño, N. M., & Camargo-Ricalde, S. L. (2021). Folates in legume root nodules. *Physiologia Plantarum*, *171*(3), 447–452. https://doi.org/10.1111/ppl.13218

Banuelos, J., Martínez-Romero, E., Montaño, N. M., & Camargo-Ricalde, S. L. (2023). *Rhizobium tropici* and riboflavin amendment condition arbuscular mycorrhiza colonization in *Phaseolus vulgaris* L. *Agronomy*, *13*(3), Article 3. https://doi.org/10.3390/agronomy13030876

Bécard, G., & Piché, Y. (1989). Fungal growth stimulation by CO_2 and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology*, *55*(9), 2320–2325. https://doi.org/10.1128/aem.55.9.2320-2325.1989

Contreras-Moreira, B., & Vinuesa, P. (2013). GET_HOMOLOGUES, a Versatile Software Package for Scalable and Robust Microbial Pangenome Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*(24), 7696–7701. https://doi.org/10.1128/AEM.02411-13

Dakora, F. D., Matiru, V. N., & Kanu, A. S. (2015). Rhizosphere ecology of lumichrome and riboflavin, two bacterial signal molecules eliciting developmental changes in plants. *Frontiers in Plant Science*, *6*. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00700

Deka, R. K., Brautigam, C. A., Biddy, B. A., Liu, W. Z., & Norgard, M. V. (2013). Evidence for an ABC-Type Riboflavin Transporter System in Pathogenic Spirochetes. *mBio*, *4*(1). https://doi.org/10.1128/mBio.00615-12

Dong, H., & Beer, S. V. (2000). Riboflavin induces disease resistance in plants by activating a novel signal transduction pathway. *Phytopathology*, *90*(8), 801–811. https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.8.801

Duurkens, R. H., Tol, M. B., Geertsma, E. R., Permentier, H. P., & Slotboom, D. J. (2007). Flavin Binding to the High Affinity Riboflavin Transporter RibU. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(14), 10380–10386. https://doi.org/10.1074/jbc.M608583200

Eudes, A., Erkens, G. B., Slotboom, D. J., Rodionov, D. A., Naponelli, V., & Hanson, A. D. (2008). Identification of Genes Encoding the Folate- and Thiamine-Binding Membrane Proteins in Firmicutes. *Journal of Bacteriology*, *190*(22), 7591–7594. https://doi.org/10.1128/JB.01070-08

Eudes, A., Kunji, E. R. S., Noiriel, A., Klaus, S. M. J., Vickers, T. J., Beverley, S. M., Gregory, J. F., & Hanson, A. D. (2010). Identification of Transport-critical Residues in a Folate Transporter from the Folate-Biopterin Transporter (FBT) Family. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(4), 2867–2875. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.063651

García-Angulo, V. A. (2017). Overlapping riboflavin supply pathways in bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, *43*(2), 196–209. https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1192578

Garcia-Angulo, V., Bonomi, H., Posadas, D., Serer, I., Torres, A., Zorreguieta, A., & A Goldbaum, F. (2013). Identification and Characterization of RibN, a Novel Family of Riboflavin Transporters from Rhizobium leguminosarum and Other Proteobacteria. *Journal of Bacteriology*, *195*. https://doi.org/10.1128/JB.00644-13

Gutiérrez-Preciado, A., Torres, A. G., Merino, E., Bonomi, H. R., Goldbaum, F. A., & García-Angulo, V. A. (2015). Extensive identification of bacterial riboflavin transporters and their distribution across bacterial Species. *PLoS ONE*, *10*(5). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126124

Han, S., Wang, X., Cheng, Y., Wu, G., Dong, X., He, X., & Zhao, G. (2023). Multidimensional analysis reveals environmental factors that affect community dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi in poplar roots. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 1068527. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1068527

Hemberger, S., Pedrolli, D. B., Stolz, J., Vogl, C., Lehmann, M., & Mack, M. (2011). RibM from Streptomyces davawensis is a riboflavin/roseoflavin transporter and may be useful for the optimization of riboflavin production strains. *BMC Biotechnology*, *11*(1), 119. https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-119

Kobayashi, Y., Maeda, T., Yamaguchi, K., Kameoka, H., Tanaka, S., Ezawa, T., Shigenobu, S., & Kawaguchi, M. (2018). The genome of *Rhizophagus clarus* HR1 reveals a common genetic basis for auxotrophy among arbuscular mycorrhizal fungi. *BMC Genomics*, *19*. https://doi.org/10.1186/s12864-018-4853-0

Ledesma-Amaro, R., Santos, M. A., Jiménez, A., & Revuelta, J. L. (2013). 21—Microbial production of vitamins. In B. McNeil, D. Archer, I. Giavasis, & L. Harvey (Eds.), *Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals* (pp. 571–594). Woodhead Publishing. https://doi.org/10.1533/9780857093547.2.571

Liu, X., Feng, Z., Zhang, W., Yao, Q., & Zhu, H. (2023). Exogenous myristate promotes the colonization of arbuscular mycorrhizal fungi in tomato. *Frontiers in Plant Science*, *14*. https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1250684

Lowe, R. H., & Evans, H. J. (1962). Carbon dioxide requirements for growth of legume nodule bacteria. *Soil Science*, *94*(6), 351.

Marek-Kozaczuk, M., & Skorupska, A. (2001). Production of B-group vitamins by plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* strain 267 and the importance of vitamins in the colonization and nodulation of red clover. *Biology and Fertility of Soils*, *33*(2), 146–151. https://doi.org/10.1007/s003740000304

Morin, E., Miyauchi, S., San Clemente, H., Chen, E. C. H., Pelin, A., de la Providencia, I., Ndikumana, S., Beaudet, D., Hainaut, M., Drula, E., Kuo, A., Tang, N., Roy, S., Viala, J., Henrissat, B., Grigoriev, I. V., Corradi, N., Roux, C., & Martin, F. M.

(2019). Comparative genomics of *Rhizophagus irregularis, R. cerebriforme, R. diaphanus* and *Gigaspora rosea* highlights specific genetic features in Glomeromycotina. *The New Phytologist*, *222*(3), 1584–1598. https://doi.org/10.1111/nph.15687

Phillips, D. A., Joseph, C. M., Yang, G.-P., Martínez-Romero, E., Sanborn, J. R., & Volpin, H. (1999). Identification of lumichrome as a *Sinorhizobium* enhancer of alfalfa root respiration and shoot growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(22), 12275–12280. https://doi.org/10.1073/pnas.96.22.12275

Revuelta, J. L., Serrano-Amatriain, C., Ledesma-Amaro, R., & Jiménez, A. (2018). Formation of folates by microorganisms: Towards the biotechnological production of this vitamin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(20), 8613–8620. https://doi.org/10.1007/s00253-018-9266-0

Schubert, K. R. (1986). Products of biological nitrogen fixation in higher plants: Synthesis, transport, and metabolism. *Annual Review of Plant Physiology*, *37*, 539–574.

Sun, E. I., Leyn, S. A., Kazanov, M. D., Saier, M. H., Novichkov, P. S., & Rodionov, D. A. (2013). Comparative genomics of metabolic capacities of regulons controlled by cis-regulatory RNA motifs in bacteria. *BMC Genomics*, *14*, 597. https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-597

Tisserant, E., Malbreil, M., Kuo, A., Kohler, A., Symeonidi, A., Balestrini, R., Charron, P., Duensing, N., Frei dit Frey, N., Gianinazzi-Pearson, V., Gilbert, L. B., Handa, Y., Herr, J. R., Hijri, M., Koul, R., Kawaguchi, M., Krajinski, F., Lammers, P. J., Masclaux, F. G., … Martin, F. (2013). Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America, *110*(50), 20117–20122. https://doi.org/10.1073/pnas.1313452110

Venice, F., Ghignone, S., Salvioli di Fossalunga, A., Amselem, J., Novero, M., Xianan, X., Sędzielewska Toro, K., Morin, E., Lipzen, A., Grigoriev, I. V., Henrissat, B., Martin, F. M., & Bonfante, P. (2020). At the nexus of three kingdoms: The genome of the mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* provides insights into plant, endobacterial and fungal interactions. *Environmental Microbiology*, *22*(1), 122–141. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14827

Vitreschak, A. G., Rodionov, D. A., Mironov, A. A., & Gelfand, M. S. (2002). Regulation of riboflavin biosynthesis and transport genes in bacteria by transcriptional and translational attenuation. *Nucleic Acids Research*, *30*(14), 3141–3151. https://doi.org/10.1093/nar/gkf433

Yurgel, S. N., Rice, J., Domreis, E., Lynch, J., Sa, N., Qamar, Z., Rajamani, S., Gao, M., Roje, S., & Bauer, W. D. (2014). *Sinorhizobium meliloti* Flavin Secretion and Bacteria-Host Interaction: Role of the Bifunctional RibBA Protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *27*(5), 437–445. https://doi.org/10.1094/MPMI-11-13-0338-R

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES GENERALES

En esta sección se presentan de manera integral las conclusiones generales obtenidas, analizando los resultados en relación con la hipótesis y los objetivos de la presente tesis.

Objetivo a) Identificar genes candidatos de transporte de vitaminas B2 y B9 en especies de *Rhizobium*.

Los genes *ribU, ribN, ribM, rfuABCD, rfnT, ribXY, impX* y riBZ son los ocho genes de transporte de riboflavina para bacterias del género *Rhizobium* publicados hasta el momento, mientras que se encontraron registro de dos genes para el transporte de folatos, el *rolT* y *rBT* . Esta información nos permite asumir que las rizobacterias pueden transportar ambas vitaminas e interactuar con estas en la rizósfera. Afectando tanto a la raíz del hospedero como a otros simbiontes de la raíz, como pueden ser los HMA.

Objetivo b) Identificar genes de biosíntesis de vitaminas B2 y B9 en rizobacterias y hongos micorrizógenos arbusculares.

Los HMA carecen de los genes completos para la biosíntesis de las vitaminas B2 y B9, lo cual los hace altamente dependientes de fuentes externas de estas vitaminas, generalmente proporcionadas por las plantas hospederas o bacterias de la rizósfera.

Treinta y tres rizobacterias del género *Rhizobium* cuentan con los genes *ribAB, ribD, ribE, ribH* , necesarios para la biosíntesis de la vitamina B2. Lo cual les permite sintetizar de

manera independiente la vitamina B2, liberándola en la rizósfera, dónde afecta las raíces del hospedero y a otros simbiontes como los HMA.

Treinta y tres rizobacterias del género *Rhizobium* cuentan con los genes *folA, folC, folE, ALDH1L1, ADCs, folP, MAT, MTHFR, glyA, SAM, FBP* y *GGH*, Lo cual les permite sintetizar de independiente la vitamina B9, liberándola en la rizósfera, dónde afecta las raíces del hospedero y a otros simbiontes como los HMA.

Objetivo c) Identificación de concentraciones de vitamina B2 que afectan la colonización micorrízica en *P. vulgaris.*

La riboflavina proporcionada de manera exógena en concentraciones micromolares de 3.12, 12.5, 25 y 50 µM incrementan el porcentaje de colonización micorrízica en raíces de *P. vulgaris*. Aquí se encontró que la concentración de 25 µM de vitamina B2 incrementa mayormente la colonización. Considerando que las BFN sintetizan y exudan esta vitamina, se puede considerar que la vitamina B2 que exudan puede ser una de las causas del incremento de la colonización de los HMA.

Objetivo d) Evaluar el efecto de la vitamina B2 durante la simbiosis micorrízica y *Rhizobium tropici* en *P. vulgaris.*

La inoculación de *R. tropici* CIAT 899 aumenta la colonización de HMA en *P. vulgaris* pero la adición de la vitamina B2 no causa un efecto aditivo en esa variable. De igual manera las variables de crecimiento de la planta medida no cambian con la adición de la vitamina en co-inoculación de los simbiontes. Se desconoce si este efecto se debe a un límite de absorción tanto de la planta, como de los HMA de la vitamina B2.

La vitamina B2 puede ejercer una presión de selección sobre las especies de HMA, favoreciendo a *G. macrocarpum*, lo cual podría indicar una mayor dependencia de esta vitamina o un mecanismo eficiente de asimilación.

Objetivo e) Determinar los efectos en las especies de hongos micorrizógenos en coinoculación con *R. tropici*.

La composición de las especies de HMA del inóculo original cambia al ser inoculado en *P. vulgaris* L., es decir, puede existir una preferencia específica dependiendo del hospedero. *D. bernensis* (Ohel) tiene una preferencia al ser inoculado en *P. vulgaris* L. de una mezcla diversa de HMA y bacterias en *B. decumbens* Stapf (Poaceae).

Los datos aquí presentados sugieren que la vitamina B2, así como la presencia de *R. tropici*, favorecen a *D. bernensis* (Ohel) y a *G. macrocarpum* (Nicholson y Gerd.) respectivamente, en la colonización de raíces de *P. vulgaris.*

CAPÍTULO VII

PERSPECTIVAS

Si bien la aplicación exógena de la vitamina B2 resultó en un incremento en la colonización de HMA, es necesario considerar el mecanismo por el cual los HMA obtienen la vitamina B2. Los HMA pueden obtener la vitamina B2 mediante la absorción directa del suelo o a través del hospedero, considerando que la planta absorbe primero la vitamina y se la proporciona al simbionte.

Dado que la vitamina B2 en distintas concentraciones micromolares puede alterar el porcentaje de colonización micorrízica en las raíces de *P. vulgaris* L., sería importante profundizar en los siguientes aspectos:

a) Demostrar que el efecto observado de la vitamina B2 también afecta a los HMA inoculados en otras leguminosas o plantas micotróficas.

En esta tesis se comprobó que la vitamina B2 es una molécula que influye en la simbiosis micorrízica, pero solamente en *P. vulgaris* L. Al demostrar que este efecto es constante en otras plantas, se podría considerar un componente esencial de la simbiosis, así como una opción para desarrollar medios de cultivo in vitro para especies de HMA, hasta ahora difíciles de cultivar. Además, en términos de producción de biofertilizantes in vivo, la irrigación de esta vitamina serviría para aumentar la calidad y los propágulos fúngicos con fines comerciales.

b) Revisar la colonización de HMA en distintos tiempos de cosecha del mismo experimento, para verificar si el efecto se sostiene durante los distintos tiempos de

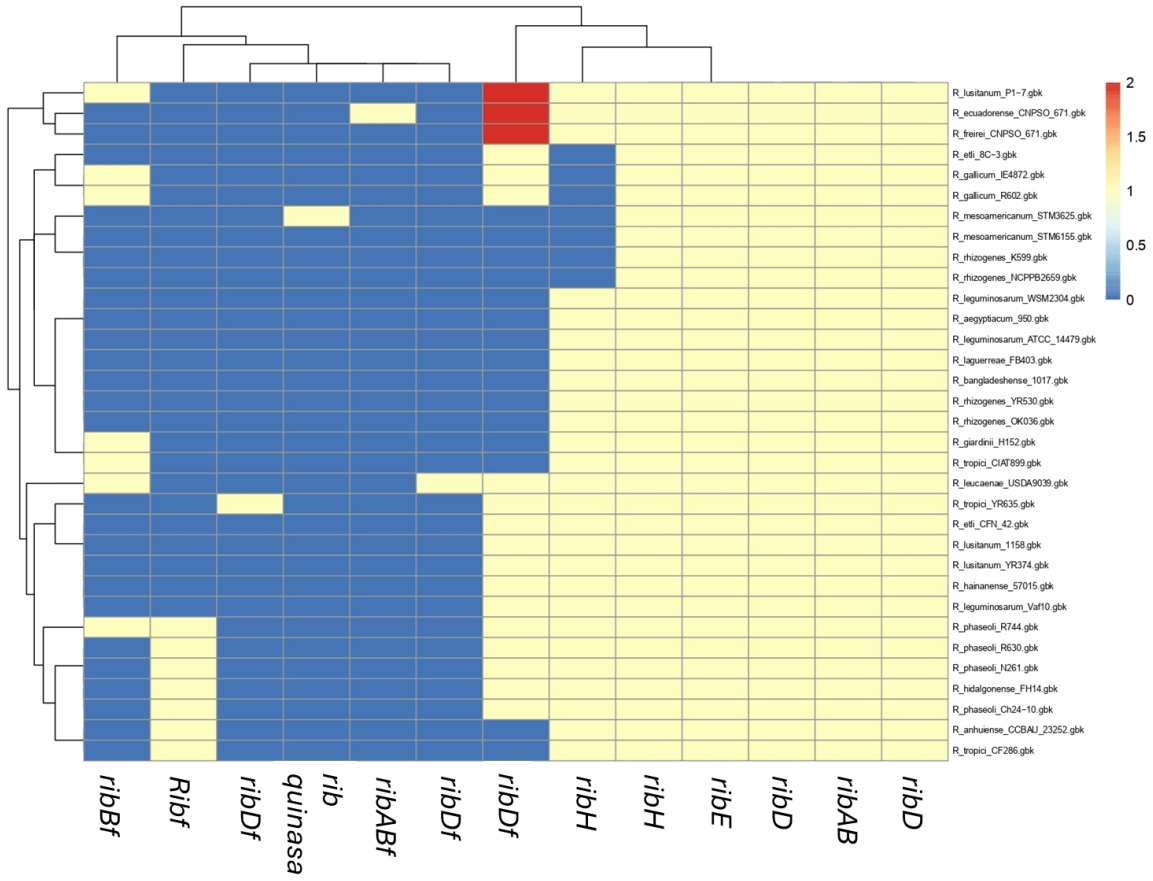
cosecha o varía. Además, este estudio permitiría demostrar la dominancia de *D. bernensis* o *G. macrocarpum* en distintas etapas fenológicas de la planta.

Este experimento indicará la sensibilidad de *G. macrocarpum* a la vitamina B2 durante las distintas etapas de la colonización micorrízica. De igual manera, tendrá fines de mejoramiento de los medios de cultivo in vitro o para incrementar la colonización de plantas de interés agrícola, botánico o en peligro de extinción que requieran una mayor colonización micorrízica.

Si bien no se ha establecido que exista una especificidad o preferencia de especies de HMA a un hospedero o a una rizobacteria, esta tesis demostró que existe una selección entre estas especies que beneficia a la planta. La identidad, tanto de las especies de HMA como el hospedero y *Rhizobiu*m puede contribuir a desarrollar inoculantes más eficientes. Esto, considerando los resultados aquí presentados en *P. vulgaris*, pues se demostró una preferencia por *D. bernensis* de una mezcla diversa de HMA. .

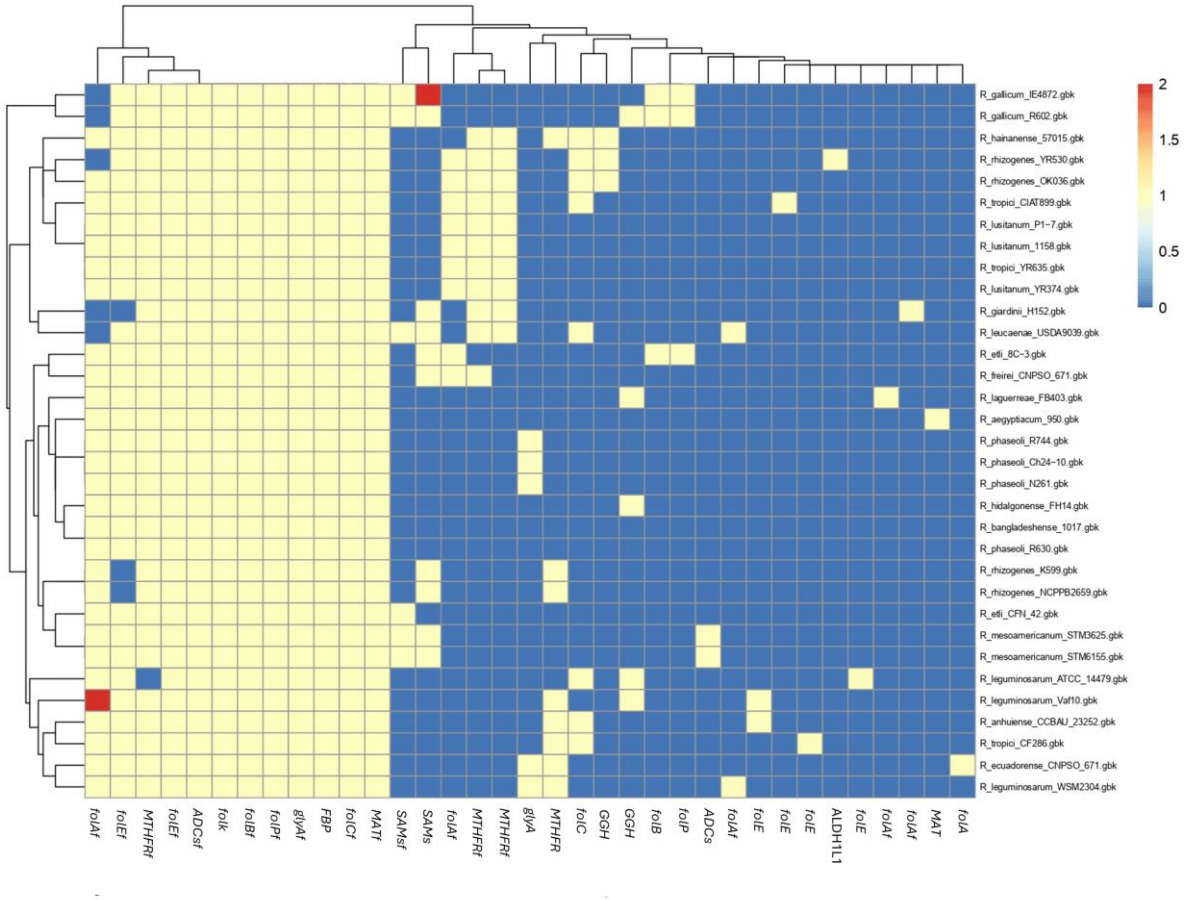
Anexos

Anexo 1. Análisis comparativo de genomas de 33 especies de *Rhizobium* que comparten genes de biosíntesis de riboflavina.



Análisis de 33 especies del género *Rhizobium* que cuentan con genes de biosíntesis de la vitamina B2. Cuadro realizado con el paquete get_homologes en BASH (Contreras-Moreira & Vinuesa, 2013) y 33 genomas descargados de NCBI. La barra de colores lateral indica la cantidad de copias; azul, 0; amarillo, 1; rojo 2.

Anexo 2. Análisis comparativo de genomas de 33 especies de *Rhizobium* que comparten genes de biosíntesis de folatos.



Análisis de 33 especies del género *Rhizobium* que cuentan con genes de biosíntesis de la vitamina B9. Cuadro realizado con el paquete get_homologes en BASH (Contreras-Moreira & Vinuesa, 2013) y 33 genomas descargados de NCBI. La barra de colores lateral indica la cantidad de copias; azul, 1; amarillo, 0; rojo 2.

Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00159
Matrícula: 2192802101

Efecto de ríboflavina y Rhizobium tropici en plantas de Phaseolus vulgaris inoculadas con hongos micorrizógenos arbusculares.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 31 del mes de marzo del año 2025 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE
DR. ALEJANDRO ALARCON
DRA. MONICA CRISTINA RODRIGUEZ PALACIO
DR. NOE MANUEL MONTAÑO ARIAS
DRA. MARIA ESPERANZA MARTINEZ ROMERO

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DE: JACOB ISAIAS BAÑUELOS TREJO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

JACOB ISAIAS BAÑUELOS TREJO
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

VOCAL

DR. ALEJANDRO ALARCON

VOCAL

DRA. MONICA CRISTINA RODRIGUEZ PALACIO

VOCAL

DR. NOE MANUEL MONTAÑO ARIAS

SECRETARIA

DRA. MARIA ESPERANZA MARTINEZ ROMERO