

DESCRIPCIÓN

Todas las plantas contienen hemoglobinas (Glbs) de tres clases que se diferencian por su origen evolutivo y propiedades bioquímicas. Además, las leguminosas contienen otro tipo de hemoglobinas denominadas leghemoglobinas (Lbs), que se expresan solo en los nódulos de las raíces. Dentro de los nódulos se lleva a cabo la fijación simbiótica de nitrógeno (FSN) por los bacteroides, que reducen el nitrógeno atmosférico a amonio asimilable por la planta; a cambio, la planta suministra sustratos carbonados para la respiración del bacteroide. La FSN representa una alternativa económica y limpia frente al uso excesivo de fertilizantes nitrogenados. La principal función de las Lbs es el transporte y suministro de oxígeno a los bacteroides. El nitrato a baja concentración (0.1-0.5 mM) promueve la FSN, mientras que a alta concentración (5-10 mM) provoca la degradación de las Lbs y de los nódulos y la pérdida de la FSN. Una función de las Glbs de clase 1 es la modulación de la molécula señal óxido nítrico (NO) para evitar la respuesta defensiva de la planta durante la simbiosis. Se desconocen las funciones de las Glbs de clases 2 y 3. En esta propuesta de tesis se investigará la regulación transcripcional y postraducciona de las tres clases de Glbs y de las Lbs en presencia de bajo y alto nitrato. Para ello se utilizará la leguminosa modelo *Lotus japonicus*, cuyo genoma está totalmente secuenciado, y técnicas multidisciplinares.

El **objetivo general** de la tesis doctoral es elucidar los mecanismos por los que el nitrato regula las hemoglobinas a nivel de transcrito y proteína en la simbiosis rizobio-leguminosa. Para ello se utilizará una combinación de técnicas de fisiología, bioquímica, microbiología y biología celular y molecular. La persona contratada participará en las siguientes tres **objetivos específicos**. (1) Determinar **el efecto de sobreexpresar cada una de las tres clases de Glbs** en fondo genético silvestre (WT) y en fondo mutante (lb123) de plantas deficientes en las tres Lbs de *L. japonicus*. Estos experimentos nos darán información sobre la función de las Glbs en el desarrollo de la planta y nos servirán para averiguar si alguna Glb es capaz de sustituir funcionalmente a las Lbs (es decir, si existe complementación entre Lbs y Glbs). Las líneas sobreexpresantes de Glbs y la mutante lb123 están disponibles en nuestro laboratorio y las plantas transgénicas crecerán en condiciones de bajo y alto nitrato. (2) Estudiar la **producción y localización de NO** en nódulos y otros órganos vegetales utilizando una sonda fluorescente mediante microscopía confocal y HPLC acoplado a espectrometría de masas. El NO es un radical libre y una molécula señal que requiere una estricta homeostasis in vivo. El NO se cuantificará en plantas WT y en plantas deficientes en hemoglobinas obtenidas por CRISPR/Cas9. (3) Investigar el papel del **factor de transcripción NLP1** en la regulación transcripcional de las hemoglobinas. Se sabe que NLP1 responde al nitrato y se sospecha que puede unirse a los promotores de los genes de las hemoglobinas. Para ello utilizaremos plantas transgénicas de *L. japonicus* que sobreexpresan NLP1 que tenemos disponibles. A las secuencias de estos factores de transcripción se les ha añadido un pequeño péptido en el N- o C-terminal para poder purificarlos por inmunoprecipitación. Tras la purificación de NLP1 *in vivo* se analizarán las posibles **modificaciones postraduccionales** (PTMs) en plantas crecidas sin o

con nitrato. Al mismo tiempo, estudiaremos las posibles PTMs de las Lbs por inmunoprecipitación con anticuerpos disponibles en nuestro laboratorio. Las PTMs analizarán por técnicas proteómicas con HPLC-MS (especialmente, fosforilación) y "biotin switch" (nitrosilación).

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Grupo de investigación Gobierno de Aragón:

Función de genes, proteínas y metabolitos de plantas

Grupo de investigación CSIC:

Fijación de nitrógeno en la simbiosis-rizobio-leguminosa

Líneas de investigación. (1) Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (RONS) y antioxidantes en leguminosas. (2) Estrés abiótico y estrés oxidativo y nitrosativo en nódulos. (3) Senescencia natural e inducida por estrés en nódulos. (4) Funciones de las RONS como señales moleculares. (5) Estructura y función de hemoglobinas vegetales. (6) Genómica estructural y funcional de leguminosas modelo y cultivadas.

PLAN DE FORMACIÓN

Entre otros aspectos, el plan de formación incluye. (1) Matriculación en el **programa de doctorado** "Bioquímica y Biología Molecular" de la Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza. (2) **Formación mutidisciplinar** con técnicas variadas y punteras en biología vegetal. (3) **Estancias cortas** en centros de excelencia, nacionales e internacionales, para aprendizaje de metodologías complementarias y promover el trabajo en equipo. Se prevé al menos 2 estancias de 1-3 meses durante los 4 años. (4) Participación en **seminarios, redes temáticas de excelencia, actividades de divulgación y congresos nacionales e internacionales** de la especialidad. (5) **Publicaciones** en revistas internacionales de alto factor de impacto (10% superior en JCR "Plant Sciences").

CURRICULUM VITAE ABREVIADO (CVA) DEL IP1 DEL PROYECTO

El CVA incluye, entre otros apartados, 10 publicaciones y proyectos financiados del grupo. Para ver más publicaciones se puede utilizar el código ORCID 0000-0002-1083-0804 (<https://orcid.org/signin>) o en Google Scholar (<https://scholar.google.es/>).

SUMMARY OF CURRICULUM VITAE

IMPORTANT – The Curriculum Vitae cannot exceed 4 pages. Instructions to fill this document are available in the website.

Part A. PERSONAL INFORMATION

First name	Manuel		
Family name	Becana Ausejo		
Gender	Male	Birth date	28/04/1959
ID	17701707X		
e-mail	becana@eead.csic.es	URL Web	
Open Researcher and Contributor ID (ORCID)	0000-0002-1083-0804		

A.1. Current position

Position	Profesor de Investigación CSIC (Full Professor)		
Initial date	2001		
Institution	Estación Experimental de Aula Dei, CSIC		
Department/Center	Plant Biology		
Country	Spain	Telephone	976-716055
Key words	Antioxidants, Hemoglobins, Legume nodules, Nitrogen fixation, Nitro-oxidative stress, Reactive oxygen and nitrogen species, Symbiosis		

A.2. Previous positions (research activity interruptions, indicate total months)

Period	Position/Institution/Country/Interruption cause
1982-1986	Profesor Ayudante y Encargado de Fisiología Vegetal
1987-1992	Colaborador Científico CSIC
1992-2001	Investigador Científico CSIC

A.3. Education

PhD, Licensed, Graduate	University/Country	Year
PhD Plant Physiol, Special Award	University of Navarra, Spain	1985
MSc Biol Sci, National Prize	University of Navarra; Ministry of Science	1981

Part B. CV SUMMARY (max. 5000 characters, including spaces)

WoS: L-5454-2014 (*h* 41, 5753 citations). **Scopus:** 7004671816 (*h* 44, 6377 citations). **Discipline index** "Biology and Biochemistry, *D-index* 50 (8769 citations). **Google Scholar** (*h* 52, 9812 citations). **Number of publications:** 106. **Publications Q1:** 100%. **Publications D1:** > 95%. **Sexenios:** 6 (1984-2019), maximum number.

Manuel Becana is M.Sc. (1981) and Ph.D. (1985). In 1987 he got a permanent post as Colaborador Científico (Assistant professor). After two postdoctoral stays with Janet Sprent (UK) and Bob Klucas (USA), he established his laboratory in 1990 at Estación Experimental de Aula Dei (CSIC), Zaragoza. In 1992 he was awarded a Prize of the Federation of European Societies of Plant Physiology (FESPP) for his scientific accomplishments and was promoted to Investigador Científico (Associate Professor). Since 2001, he is Profesor de Investigación (Full Professor).

Research interests. His specific lines of investigation concern the role of reactive oxygen/nitrogen species, antioxidants, nitro-oxidative stress, and nonsymbiotic and symbiotic hemoglobins of legume nodules. In broader terms, his interests are the biochemistry and physiology of symbiotic nitrogen fixation, with particular emphasis on the legume side of the symbiosis.

Publications. Manuel Becana is principal author or coauthor of >100 publications in international journals, >95% ranking at the top 10% based on their impact factors in 'Plant Sciences' (SCI) in the year of publication. He has authored also many contributions in national and international books. **Grants.** He is also PI of several major competitive grants of the Spanish National Program of Agriculture, which has provided continuous funding to his lab since 1990.



PhD supervision. He has supervised 14 PhDs (+1 in progress).

Conferences. Participation in >60 national and >100 international conferences, many as invited speaker.

Board of Directors in national societies. He has been Board member, including vice-president and president, of Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno / Spanish Society of Nitrogen Fixation (SEFIN) to which he belongs since its inception. He is member of the Grupo Español de Investigación en Radicales Libres / Spanish Group for Free Radical Research (GEIRLI) and, for more than 30 years, of Sociedad Española de Biología Vegetal / Spanish Society of Plant Biology (SEBV).

Funding by regional grants (as PI). Research groups “Nitrogen fixation, hemoglobins and nitro-oxidative stress in legumes” (A53, 2010-2016) and "Function of genes, proteins and metabolites of plants" (A09_17R, 2017-2019 y A09_20R, 2020-2022) por Gobierno de Aragón. **Funding by national and international grants (as PI).** Comunidad Autónoma de Aragón, Acciones Hispano-Británicas, CSIC, PGC, PN Biotecnología-Feder, PN Agricultura, UE. **Grants for infrastructure and facilities (as PI or RI).** CSIC, DGA-CSIC, CICYT-CSIC, Feder-CSIC.

Management of scientific research. Head of Department of Plant Nutrition, EEAD (2002-2011). Board member of Comité Asesor 5 (Ciencias de la Naturaleza) de la Comisión Nacional Evaluadora de la Actividad Investigadora / National Committee for Evaluation of Research Activity (CNEAI). Evaluación de Sexenios. 2009-2011. **Reviewer for journals.** Reviewer of most journals of the specialty, including *New Phytol*, *Plant Physiol*, *J Exp Bot*, *Plant Cell Environ*, *Planta*, *Plant J* and *Nature Plants*.

Reviewer of contracts and permanent positions. Reviewer for Gobierno de Aragón. President or Board member of committees for permanent posts at CSIC and Universities: Científico Titular, Investigador Científico, Investigador Titular OPIs, Profesor de Investigación and Catedrático. Selection committees for permanent positions at CSIC and University. **Evaluation of national grants.** Comisión Nacional de Expertos Programas de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias y de Biotecnología. Evaluador de proyectos del PN de I+D+i y Plan Sectorial de Agricultura (ANEP). Proyectos de PGC. Proyectos cofinanciados CICYT-Feder (ANEP). Proyectos de Infraestructura. **Evaluation of international grants.** International Science Foundation, USDA and Murdock Charitable Trust (USA), Deutsche Forschungsgemeinschaft (Alemania), Fondo Clemente Estable (Uruguay), Ministerio Educación, Ciencia y Tecnología, PICT (Argentina).

Supervision of PhDs. PhDs (14) supervised, all of them marked as "Sobresaliente *cum laude*", some with Premio Extraordinario / Extraordinary Award. One additional PhD supervision is in progress. Also, he is professor in doctorate courses and member of the managing committee of one of them.

Dissemination of results. In addition to dissemination of results in articles, conferences and courses, he has participated in supervising lab visits of students, seminars and communication media.

Organization of R+D+I activities. Organization of seminars invited researchers and professors, EEAD-CSIC. Several years. Organization of PhD courses EEAD-CSIC and Department of Biochemistry, Univ. of Zaragoza. Several years. President of Organizing Committee of VI Network on “Biotechnologies of beneficial interactions between plants and microorganisms”. Jaca (Huesca). June 2005. President of Organizing Committee of XIII National Meeting of SEFIN and II Spanish-Portuguese Meeting on Nitrogen Fixation. Zaragoza. June 2010. Member of scientific committees of several SEFIN conferences.

Part C. RELEVANT MERITS (sorted by typology)

C.1. Publications (instructions: maximum 10 of the last 10 years)

Listed are the most relevant references for the subject of the proposal. For all of them please see ORCID.

Matamoros MA, Romero LC, Tian T, Roman A, Duanmu D, Becana M (2024) Persulfidation of plant and bacteroid proteins is involved in legume nodule development and senescence. *Journal of Experimental Botany* **75**: 3009-3025.

Minguillón S, Román A, Pérez-Rontomé C, Wang L, Xu P, Murray JD, Duanmu D, Rubio MC, Becana M (2024) Dynamics of hemoglobins during nodule development, nitrate response, and dark stress in *Lotus japonicus*. *Journal of Experimental Botany* **75**: 1547-1564.

Minguillón S, Matamoros MA, Duanmu D, Becana M (2022) Signaling by reactive molecules and antioxidants in legume nodules. *New Phytologist* **236**: 815-832.



Villar I, Rubio MC, Calvo-Begueria L, Pérez-Rontomé C, Larrainzar E, Wilson MT, Sandal N, Mur LA, Wang L, Reeder B, Duanmu D, Uchiumi T, Stougaard J, Becana M (2021) Three classes of hemoglobins are required for optimal vegetative and reproductive growth of *Lotus japonicus*: genetic and biochemical characterization of LjGlb2-1. *Journal of Experimental Botany* **72**: 7778-7791.

Villar I, Larrainzar E, Milazzo L, Pérez-Rontomé C, Rubio MC, Smulevich G, Martínez JI, Wilson MT, Reeder B, Huertas R, Abbruzzetti S, Udvardi MK, Becana M (2020) A plant gene encoding one-heme and two-heme hemoglobins with extreme reactivities toward diatomic gases and nitrite. *Frontiers Plant Science* **11**: article 600336.

Becana M, Yruela I, Sarath G, Catalán P, Hargrove MS (2020) Plant hemoglobins: a journey from unicellular green algae to vascular plants. *New Phytologist* **227**: 1618-1635.

Rubio MC, Calvo-Begueria L, Díaz-Mendoza M, Elhiti M, Moore M, Matamoros MA, James EK, Díaz I, Pérez-Rontomé C, Villar I, Calvo V, Hebelstrup KH, Dietz KJ, Becana M (2019) Phytoglobins in the chloroplasts, nuclei and cytoplasm modulate nitric oxide signaling, and interact with abscisic acid. *Plant Journal* **100**: 38-54.

Matamoros MA, Kim A, Peñuelas M, Ihling C, Griesser E, Hoffmann R, Fedorova M, Frolov A, Becana M (2018) Protein carbonylation and glycation in legume nodules. *Plant Physiology* **177**: 1510-1528.

Calvo-Begueria L, Rubio MC, Martínez JI, Pérez-Rontomé C, Delgado MJ, Bedmar EJ, Becana M (2018) Redefining nitric oxide production in legume nodules through complementary insights from electron paramagnetic resonance spectroscopy and specific fluorescent probes. *Journal of Experimental Botany* **69**: 3703-3714.

Sainz M, Calvo-Begueria L, Pérez-Rontomé C, Wienkoop S, Abián J, Staudinger C, Bartesaghi S, Radi R, Becana M (2015) Leghemoglobin is nitrated in functional legume nodules in a tyrosine residue within the heme cavity by a nitrite/peroxide-dependent mechanism. *Plant Journal* **81**: 723-735.

C.2. Congress (*maximum 10 in the last 10 years, indicating the modality of participation*)

Becana M. Member of Organizing Committee. XVIII National Meeting of the Spanish Society of Nitrogen Fixation and 1st Congress on Beneficial Plant-Microbe Interactions. Oeiras, Portugal (2022).

Becana M. Invited speaker. *Hemoglobins of vascular plants: from model plants to crops (and way back)*. 4th International Brachypodium Conference. Huesca, España (2019).

Becana M. Member of Organizing Committee. XVII National Meeting of the Spanish Society of Nitrogen Fixation and VI Portuguese-Spanish Congress on Nitrogen Fixation. Madrid (2019).

Becana M. Invited speaker. *Insights and pitfalls of the methodology for free radical research in legume nodules: hemoglobins as a case study*. 21st International Nitrogen Fixation Conference. Wuhan, China (2019).

Becana M. Invited speaker. *Legume hemoglobins: roles inside and outside the symbiosis*. 20th International Conference on Oxygen Binding and Sensing proteins (O2BIP). Barcelona (2018).

Becana M. Invited speaker. *Symbiotic and nonsymbiotic hemoglobins: possible functions in nitric oxide scavenging and signaling*. 20th International Nitrogen Fixation Conference. Granada (2017).

Becana M. Invited speaker. *Symbiotic and nonsymbiotic hemoglobins in plants*. Wilhelm-Kühnelt lecture series. University of Vienna, Austria. Viena, Austria (2017).

Becana M. Invited speaker. *Symbiotic and nonsymbiotic hemoglobins in legumes*. XVI Reunión Nacional de la Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno, III Conferencia Iberoamericana de Interacciones Beneficiosas Microorganismo-Planta-Ambiente y XXVIII Reunión Latinoamericana de Rizobiología. Lima, Perú (2017).

Becana M. Invited speaker. *Interactions of ROS and RNS with plant hemoglobins*. X Meeting of the Spanish Group for Research on Free Radicals. "Symposium on Oxidative Stress and Redox Signaling in Biology and Medicine". Valencia (2014)

Becana M. Invited speaker. *Reactive oxygen/nitrogen species and hemoglobins in legume nodules*. Two talks as invited professor in Campus of Slagelse and Campus of Aarhus. University of Aarhus, Denmark (2014).

C.3. Research projects (maximum 10 in the last 10 years, indicating your personal contribution)

PID2023-147035NB-I00. Regulation of hemoglobins in the legume-rhizobium symbiosis in response to low and high nitrate. 2024-2027. PIs: M. Becana and M.A. Matamoros. EEAD-CSIC.

PID2020-113985GB-I00. Function of hemoglobins in the legume-rhizobia symbiosis under physiological and nutritional stress conditions. 2021-2024. PI: M. Becana. EEAD-CSIC.

AGL2017-85775-R. Function of hemoglobins and nitric oxide in the rhizobia-legume symbiosis. Ministry of Economy and Competitiveness. 2018-2021. PIs: M. Becana and M.C. Rubio. EEAD-CSIC.

Grupo Consolidado del Gobierno de Aragón. A53 (2010-2016). EEAD-CSIC. Nitrogen fixation and oxidative stress in legumes. IP: M. Becana. EEAD-CSIC. Funding: 37.391 €. **Grupo Consolidados del Gobierno de Aragón**. IP: M. Becana. **A09_17R (2017-2019), A09_20R (2020-2022) and A09_23R (2023-2025)**. Functions of genes, proteins and metabolites of plants.

AGL2014-53717-R. Nitrogen fixation by the rhizobia-legume symbiosis: hemoglobins and oxidative modifications of proteins during nodule development and senescence. Ministry of Economy and Competitiveness. 2015-2018. PIs: M. Becana and M. Matamoros. EEAD-CSIC.

CSIC-201240E150. Structure and function of hemoglobins of leguminous plants. Special CSIC grant. 2013-2015. PI: M. Becana. EEAD-CSIC.

AGL2011-24524. Signaling by oxygen/nitrogen species and antioxidants in the nitrogen-fixing rhizobium-legume symbiosis. Ministry of Science and Innovation. 2012-2014. PI: M. Becana. EEAD-CSIC.