



**UNIVERSIDAD DE TALCA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
MAGÍSTER EN HORTOFRUTICULTURA**

**EFFECTO LOCAL Y SISTÉMICO DEL NITRATO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LOS  
NÓDULOS DE *Medicago truncatula* DURANTE LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO**

**POR  
VICTORIA OSSES ANTÚNEZ**

**PROFESOR GUÍA: Dr. RICARDO A. CABEZA**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER  
TALCA – CHILE  
2021**

## CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2021

Título: Efecto local y sistémico del nitrato sobre la actividad de los nódulos de *Medicago truncatula* durante la fijación de nitrógeno

Title: Local and systemic effect of nitrate on the nodule activity of *Medicago truncatula* during the nitrogen fixation process

Por Victoria Osses Antúnez

Fecha Inicio: Octubre de 2017

Fecha Término: Diciembre 2020

Profesor Guía: Dr. Ricardo A. Cabeza

(Departamento de Producción Agrícola, Laboratorio de Nutrición Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca, rcabeza@utalca.cl)

Profesor Informante: Dr. Alejandro del Pozo Lira

(Centro de Mejoramiento Genético y Fenómica Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca, adelpozo@utalca.cl)

## ÍNDICE

	pág.
Resumen	1
Abstract	3
1. Introducción	5
2. Materiales y Métodos	9
2.1. Material vegetal	9
2.2. Expresión de genes luego de la adición de nitrato (experimento 1)	9
2.3. Extracción de ARNm y síntesis de cADN para la medición de la expresión de genes candidatos a través del tiempo luego de la aplicación de nitrato	10
2.4. PCR cuantitativa (qPCR)	10
2.5. Sistema de raíces-divididas (split-root) para la determinación del efecto del nitrato sobre la expresión de genes del nódulo (experimento 2)	11
2.6. Extracción de ARN, preparación de cADN y secuenciamiento del ARNm	12
2.7. Análisis estadísticos	12
3. Resultados	13
3.1. Evaluación de la aplicación de nitrato sobre la expresión de genes en nódulos	13
3.2. Efecto global de la aplicación de nitrato a nivel del transcriptoma de los nódulos	17
3.3. Efecto de la aplicación de nitrato sobre genes involucrados en el metabolismo de N	20
4. Discusión	25
5. Conclusiones	31
6. Citas bibliográficas	32

## ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

	pág.
Cuadro 1. Genes evaluados como indicadores de la regulación molecular de la fijación de N <sub>2</sub> en nódulos de <i>M. truncatula</i> tratados con nitrato.	13
Cuadro 2. Número de genes expresados diferencialmente en nódulos tratados con nitrato en el experimento de raíz dividida (split-root).	20
Cuadro 3. Genes centinelas expresados diferencialmente en nódulos tratados con nitrato en el experimento de raíz dividida (split-root).	21
Figura 1. Expresión a través del tiempo del gen que codifica para leghemoglobina (Medtr5g041610.1) en diferentes órganos de <i>M. truncatula</i> luego de la aplicación de 5 mM de KNO <sub>3</sub> .	14
Figura 2. Expresión a través del tiempo del gen que codifica para 'Hypoxia' (Medtr3g072170.1) en diferentes órganos de <i>M. truncatula</i> luego de la aplicación de 5 mM de KNO <sub>3</sub> .	15
Figura 3. Expresión de nicotianamina sintasa (Medtr1g084050.1) en diferentes órganos de <i>M. truncatula</i> luego de la aplicación de 5 mM de KNO <sub>3</sub> .	16
Figura 4. Expresión de un marcador de nitrato reductasa (Medtr3g073180.1), en diferentes órganos de <i>M. truncatula</i> luego de la aplicación de 5 mM KNO <sub>3</sub> .	17
Figura 5. Análisis de cluster o agrupamiento de las muestras analizadas mediante secuenciamiento del ARNm.	19
Figura 6. Análisis de la expresión de genes involucrados en el transporte de nitrato en nódulos tratados con nitrato mediante el software MapMan.	22
Figura 7. Análisis de la expresión de genes involucrados la síntesis de ATP con el software MapMan.	23
Figura 8. Resumen de los procesos celulares en nódulos tras la aplicación de nitrato.	24

## Resumen

Las leguminosas son de gran importancia para la rotación de cultivos. Estas plantas son capaces de realizar simbiosis con bacterias del género *Rhizobium* para formar un órgano en las raíces conocido como nódulo radicular en donde se produce la fijación de nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ). Las plantas son las encargadas de regular la fijación del  $N_2$ , mediante dos procesos: 1) control de la cantidad de nódulos que desarrolla, y; 2) reducción de la actividad de los nódulos, es decir, la cantidad de  $N_2$  fijado. Factores ambientales como las deficiencias nutricionales afectan el crecimiento de la planta, provocando un cambio en la concentración de nitrógeno (N) en las hojas, generando una regulación de la actividad de los nódulos. Por otra parte, la adición de una fuente externa de N hace reducir la fijación de  $N_2$ , reprimiendo la actividad en los nódulos. Varios trabajos indican que la inhibición de la fijación de  $N_2$  podría estar mediada por una regulación molecular a nivel del nódulo. Sin embargo, una diferenciación del efecto local y sistémico del nitrato sobre la inhibición de la actividad del nódulo es necesaria para entender su funcionamiento, como también conocer cómo son las reacciones tempranas de la expresión de genes en los nódulos después de la adición de nitrato. Por ejemplo, genes candidatos como nicotianamina sintasa podrían estar involucrados en la regulación de la actividad de los nódulos. La nicotianamina es un precursor de fitosideróforos los cuales poseen una alta afinidad por el hierro (Fe), favoreciendo la movilidad celular de este elemento. Este mineral es esencial para la formación de la enzima nitrogenasa y la proteína leghemoglobina, ambas centrales para el correcto funcionamiento de la fijación de  $N_2$ .

En este estudio se busca caracterizar el efecto temprano de la adición de nitrato sobre la actividad de los nódulos y diferenciar si este efecto es local y/o sistémico. Plantas noduladas crecidas en macetas fueron tratadas con nitrato de potasio ( $KNO_3$ ), en las cuales se evaluó la expresión de genes candidatos en nódulos, raíces y hojas a los siguientes tiempos: 0, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos desde la aplicación. La expresión de los genes se cuantificó mediante PCR cuantitativa. Para diferenciar el efecto local del sistémico, se realizó un análisis del transcriptoma de los nódulos en plantas crecidas en un sistema de raíz dividida

(split-root) y tratadas con nitrato en uno de sus lados. En este experimento se comparó la expresión de genes de los nódulos de la parte tratada con nitrato y los de la parte sin tratar.

Los principales resultados indican que la adición de nitrato afecta de manera rápida la actividad de genes involucrados en la fijación de  $N_2$ . La actividad de los genes que codifican para leghemoglobina, hipoxia y nicotianamina sintasa alteraron su expresión rápidamente tras la adición de nitrato. La expresión aumentó en los nódulos en respuesta a la adición de nitrato, aunque en el caso de hipoxia, el comportamiento de la expresión fue más errática. El aumento de la expresión de un gen que codifica para nitrato reductasa indica que, posiblemente, el nódulo posee una actividad importante de transporte y asimilación de nitrato. El análisis del transcriptoma de nódulos en plantas que fueron tratadas a un solo lado de las raíces/nódulos con nitrato, indica que existe una reprogramación de la expresión de los genes en los nódulos de ambos lados de la planta. Esto sugiere que el nitrato posee un efecto local y sistémico. No sólo se ven afectados los genes involucrados en el transporte y asimilación de nitrato, sino que también, aquellos genes responsables de la generación de energía y senescencia del nódulo.

## **Abstract**

Legumes are of great importance for crop rotation. These plants are able to fix atmospheric nitrogen ( $N_2$ ) in symbiosis with *Rhizobium* bacteria in a specialized organ called nodule, which is developed in the roots. Plants regulate the  $N_2$  fixation process by two main processes: 1) controlling the number of nodules, and; 2) reducing the nodule activity, i.e. the amount of  $N_2$  fixed. Environmental factors such as nutritional deficiencies affect the growth of the plant, causing a change in the concentration of N in the leaves, which triggers a regulation of the nodule activity. The addition of an external source of N reduces the  $N_2$  fixation by repressing the nodule activity. Several works indicate that the inhibition of  $N_2$  fixation could be mediated by a molecular regulation at the nodule level. However, distinguishing the local and systemic effect of nitrate on the inhibition of the nodule activity is necessary to understand the process, as well as how is the early reactions of gene expression of nodules after the nitrate addition. For instance, genes such as nicotianamine (NAS) synthase could be involved in the regulation of nodule activity. NAS is a precursor of phytosiderophores which have a high affinity for iron (Fe), favoring cellular mobility. Fe is essential for the formation of the nitrogenase and leghemoglobin, both are central for the normal functioning of  $N_2$  fixation.

The aim of the present work was to characterize the early effect of the addition of nitrate on nodule activity and to identify whether this effect is local and/or systemic. Plants with nodules were cultivated in pots and treated with potassium nitrate ( $KNO_3$ ). The expression of (x number) genes in nodules, roots, and leaves was evaluated at 0, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90 and 120 minutes after nitrate addition, using quantitative PCR. To differentiate the local from the systemic effect, a transcriptome analysis (RNAseq) was carried out in plants grown in a split-root system and treated with nitrate on one side.

Results indicated that the nitrate addition affected rapidly the genes involved in the  $N_2$  fixation process. The activity of genes coding for leghemoglobin, hypoxia, and nicotianamine synthase altered their expression rapidly after the addition of nitrate. The expression increased in the nodules in response to the addition of nitrate, although in the case of hypoxia, the expression pattern was more erratic. The



up-regulated expression of the nitrate reductase gene indicated that the nodule, possibly, has significant nitrate transport and assimilation activity. The transcriptome of nodules in a split-root experiment indicated that there was a reprogramming of gene expression at both sides of the plant, suggesting that nitrate has a local and systemic effect. Not only the genes involved in nitrate transport and assimilation were affected, but also those genes responsible for the generation of energy and nodule senescence.

## 1. Introducción

Las leguminosas juegan un rol central en la rotación de cultivos, especialmente en la pequeña agricultura y en sistemas de producción orgánica. Estas plantas son capaces de realizar simbiosis con bacterias del género *Rhizobium* para formar un órgano en las raíces conocido como nódulo radicular. En el nódulo, las bacterias en simbiosis con la planta son capaces de reducir el nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) a amonio, el cual es asimilado por las plantas para ser usado en su propio metabolismo. Debido a esta particularidad, las leguminosas son usadas en la agricultura para mejorar el estado nutricional de los suelos, mediante la incorporación de residuos ricos en nitrógeno (N). Las leguminosas son de gran importancia en los sistemas agrícolas de bajo input o agricultura orgánica, en donde el uso de fertilizantes inorgánicos está limitado (Badgley et al., 2007; Bedoussac et al., 2015). Por otra parte, las leguminosas son parte importante de la dieta humana en varios países, especialmente en aquellos en vías de desarrollo (FAO, 2016). Lo anterior se debe a que los granos de leguminosas son ricos en proteínas, fibras y minerales. Todo lo anterior transforma a las leguminosas en cultivos claves en la agricultura moderna.

Desde el punto de vista fisiológico, la fijación de  $N_2$  es un proceso que demanda de la planta una gran cantidad de energía, tanto como asimilados y en forma de ATP (Schulze, 2004). Por lo anterior, la planta regula finamente la cantidad de  $N_2$  que deben reducir o fijar los nódulos. La regulación se basa en dos principios básicos: 1) control de la cantidad de nódulos que la planta desarrolla, y; 2) mediante una disminución controlada de la actividad de los nódulos ya existentes, esto es, mediante una disminución de la actividad de la nitrogenasa (Nasa). La Nasa es la enzima responsable de la reducción del  $N_2$  en amonio (Eady and Postgate, 1974). El control de la cantidad de nódulos es un proceso molecular relativamente bien descrito, y que está mediado por una serie de señales entre la raíz-parte aérea-raíz (Ferguson et al., 2010). Al momento del inicio de la infección de las raíces por las bacterias, los factores de nodulación (factores Nod) inducen la formación de péptidos Clavata3/Embryo Surrounding Region-Related (CLE), los cuales viajan hacia la parte aérea de la planta para interactuar con un receptor quinasa (leucine-

rich repeat [LRR] receptor kinase) conocido en *Medicago truncatula* como SUNN (Super Numeric Nodules) (Gresshoff and Ferguson, 2017). La activación de este receptor quinasa LRR activa la producción de una molécula de composición desconocida llamada inhibidor derivado de las hojas (shoot-derived inhibitor, SDI), el cual viaja desde la parte aérea hacia las raíces para frenar la formación de nuevos nódulos (Lin et al., 2010). Por otro lado, el mecanismo por el cual se regula la disminución de la actividad de los nódulos, es menos conocida. Trabajos recientes han mostrado que distintos factores ambientales que afectan el crecimiento de la planta, generan una disminución de la actividad de los nódulos (Liese et al., 2017). Por ejemplo, la deficiencia de fósforo (P), ya sea permanente o repentina, genera una disminución de la actividad de los nódulos (Cabeza et al., 2014b; Liese et al., 2017). También se ha observado que la adición de una fuente alternativa de N, por ejemplo nitrato o amonio, hace disminuir la fijación de N<sub>2</sub> (Cabeza et al., 2014a; Cabeza et al., 2015). Ambas situaciones descritas (deficiencia de P, fuente alternativa de N) generan un aumento de la concentración de N en las hojas, generando una situación de exceso de N en la parte aérea de la planta, lo cual aparentemente desencadena una señal que llegaría a los nódulos para disminuir la fijación de N<sub>2</sub>. Por el momento no se conoce la naturaleza de la señal, ni tampoco cómo señala la disminución de la actividad de los nódulos.

El análisis del transcriptoma de nódulos de *M. truncatula* tratados con nitratos (disminución de la actividad de los nódulos) y nódulos de plantas creciendo bajo deficiencia de P, muestra que hay una serie de componentes en común. Por ejemplo, en ambos casos existe una represión de la expresión de genes que intervienen en la formación de péptidos ricos en cisteína, los cuales son agentes anti bacterianos que facilitan la transformación de las bacterias de vida libre a bacteroides, paso esencial para la formación de Nasa (Van de Velde et al., 2010). Además, se ha observado que el transporte de O<sub>2</sub> al interior del nódulo se ve restringido, debido a una represión de genes que codifican para la proteína leghemoglobina. La leghemoglobina está encargada del transporte específico de O<sub>2</sub> hacia el interior del nódulo, lo cual es esencial para la mantención de los procesos respiratorios, y por lo tanto de producción de energía (ATP). La disminución de la

expresión de estos genes se produce, aparentemente, de forma sincronizada y podría ser parte de la cadena de eventos moleculares que intervienen en la disminución de la actividad de los nódulos (Liese et al., 2017). Sin embargo, esto no será abordado en este estudio.

Otro componente esencial para la regulación de la actividad de los nódulos, es la represión de un gen que podría estar involucrado en el transporte de hierro (Fe). El gen que codifica para la producción de nicotianamina se reprime en situaciones de disminución de la actividad de los nódulos (Cabeza et al., 2014a; Avenhaus et al., 2016). La nicotianamina es un precursor de fitosideróforos los cuales poseen una alta afinidad por el Fe, favoreciendo la movilidad intercelular de este elemento. Es importante mencionar que el Fe es esencial para la formación de la enzima Nasa y la proteína leghemoglobina, ambas centrales para el correcto funcionamiento de la fijación de N<sub>2</sub>.

La Nasa es un complejo de dos proteínas, una de ellas es de 60 a 64 kDa de tamaño, conocida como la proteína de Fe, la cual posee un complejo de Fe y azufre (Fe-S), mientras que la proteína más grande (240 kDa) contiene, además de complejos Fe-S, un complejo con Fe y molibdeno (cofactor de FeMo) (Jones et al., 2012). Por otra parte, la proteína leghemoglobina es una hemoproteína, con un grupo prostético que posee Fe coordinado con N. En ambos casos, la presencia de Fe es esencial, por lo tanto, es indispensable mantener un aporte y ciclaje de Fe adecuado en los nódulos. Sin embargo, aún no está claro si la disminución de la expresión de este gen es causal de la inhibición debido a la restricción en el abastecimiento de Fe o simplemente es una consecuencia de la disminución de la fijación de N<sub>2</sub>.

Una parte esencial para entender el efecto inhibitorio del nitrato sobre la actividad de los nódulos es descifrar si este ion afecta en forma sistémica la fijación de N<sub>2</sub>. Estudios con sistema de raíz dividida (split-root) en *M. truncatula* muestran que cuando el lado de las raíces noduladas dejan de recibir nitrato, el otro lado no aumenta la fijación de N<sub>2</sub> como una forma de compensar el déficit de N fijado, pero comienza a aumentar la cantidad de nódulos que la planta desarrolla a largo plazo (Jeudy et al., 2010). Sin embargo, se debe tener en consideración que la fijación de

N<sub>2</sub> en los nódulos parece ser siempre máxima, y sólo se ha observado que la fijación de N<sub>2</sub> disminuye debido a un ajuste de la demanda de N por parte de la planta (Liese et al., 2017). Lo anterior implica que el ajuste, a una necesidad mayor de N por parte de la planta, es compensado por un aumento de la cantidad de nódulos. Aunque parece claro que la inhibición de la fijación de N<sub>2</sub> en los nódulos por parte de la adición de nitrato tiene un componente local, no es tan evidente si a corto plazo existe una regulación sistémica de la cantidad de N<sub>2</sub> fijado (Becana and Sprent, 1987; Cabeza et al., 2014a). Experimentos con sistema de split-root pueden ayudar a descifrar si el efecto del nitrato sobre la actividad de los nódulos posee un elemento mediado por la parte aérea de la planta.

En base a lo anteriormente expuesto, la hipótesis de esta tesis de grado es que la adición de nitrato desencadena un cambio rápido y local en la expresión de genes en nódulos activos de *Medicago truncatula*, aunque también un cambio en la expresión inducido sistémicamente. Así, el objetivo de esta tesis es caracterizar la expresión temprana de genes candidatos después de la adición de nitrato a plantas noduladas de *M. truncatula* y determinar si el efecto de la adición de nitrato a plantas noduladas actúa a nivel local o sistémico sobre la expresión de los genes.

## **2. Materiales y Métodos**

### **2.1 Material vegetal**

Se usaron semillas de *Medicago truncatula* cv. Jemalong. Las semillas tienen un tamaño de entre 2 a 4 mm de largo con forma de poroto, son muy similares a las semillas de trébol y alfalfa y se obtuvieron de las vainas mecánicamente, ejerciendo presión sobre ellas, pero manteniendo la integridad de las semillas. Una vez colectadas, alrededor de 600 semillas fueron escarificadas con ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 95-97%) durante 5 min en una campana de extracción de aire. Posteriormente, las semillas se lavaron con abundante agua destilada y se dejaron embeber en agua destilada por cuatro días (96 h) en un envase plástico, dispuesto en posición horizontal a 4°C.

Para la germinación se usaron bandejas de germinación, con una mezcla de turba, arena y perlita (1:1:1) a una temperatura de entre 18-22°C en invernadero. Una vez germinadas (5 cm de alto), se seleccionaron 60 plántulas y fueron trasplantadas a macetas de diámetro 20 cm con medio kg de sustrato, compuestos de una mezcla de arena y perlita (3:1), en las mismas condiciones de temperatura.

### **2.2 Expresión de genes luego de la adición de nitrato (experimento 1)**

Una vez trasplantadas, 40 plantas fueron inoculadas con 2 mL de una suspensión de bacterias del género *Rhizobium*, específicamente con la especie *Sinorhizobium meliloti* (10<sup>9</sup> u.f.c. [Biogram]). Después de cinco días se seleccionó el 5% de las plantas trasplantadas (cuatro) para observar si la nodulación se había producido. Los nódulos eran visibles a simple vista y al romperlos, mostraban el típico color rojo de los nódulos activos debido a la oxidación de la proteína leghemoglobina. El riego y adición de nutrientes se realizó con solución nutritiva Hoagland N° 2 sin N, agregando 20 mL por maceta y 50 mL de agua cada dos días o según la demanda de la planta.

Después de un mes desde el trasplante, las plantas fueron tratadas con una fuente externa de N: nitrato de potasio (KNO<sub>3</sub>). Así, se adicionaron 20 mL de una solución con una concentración de 5 mM de KNO<sub>3</sub>. Una vez tratadas con KNO<sub>3</sub> se colectaron, desde 3 réplicas biológicas independientes, siete hojas, 15 nódulos y 20

trozos de raíces de cada una de las plantas, en cada uno de los siguientes tiempos: 0, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90 y 120 min. Inmediatamente colectados los órganos, estos fueron depositados en sobres de aluminio y congelados con N líquido y almacenados a -80°C. Se usaron tres repeticiones biológicas en cada uno de los tiempos de evaluación utilizando el tiempo 0 como control; sin aplicación de KNO<sub>3</sub>.

### **2.3 Extracción de ARNm y síntesis de cADN para la medición de la expresión de genes candidatos a través del tiempo luego de la aplicación de nitrato**

Para la síntesis inicial de cADN, el ARN total fue extraído desde los diferentes órganos vegetales (raíz, nódulos y hojas), utilizando el kit comercial SV Total ARN Isolation System (Promega, Madison, WI, USA), respetando el protocolo establecido por el fabricante. La correcta extracción del ARN de las muestras fue verificada mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% p/v y la concentración del ARN fue cuantificada y estimada a 260/280 nm, en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA).

La reacción de la transcripción reversa para síntesis de la primera hebra de cADN se realizó sobre 0,1-5 g de ARN total tratado con DNasa. Para estas reacciones se utilizó el sistema AffinityScript qPCR cADN Synthesis Kit (Agilent Technologies, USA). Se prepararon mezclas que contienen para cada reacción: 20 µL de mezcla “first strand master” (2X), 6 µL de oligo (dT) (0,1 µg/µL), 2 µL de mezcla enzimática Affinity Script RT/RNase Block y 12 µL de mezcla (ARN+agua, según concentración usada de ARN) para un volumen final de 20 µL de reacción. Las reacciones se incubaron a 37°C por 60 min para síntesis de cADN. Las reacciones fueron detenidas a 70°C por 5 min. Los productos de cADN fueron almacenados a -20°C.

### **2.4 PCR cuantitativa (qPCR)**

La reacción de qRT-PCR fue llevada a cabo bajo el protocolo descrito en el artículo de Donadeu *et al.* (1999). Para ello se utilizó el sistema Brilliant SYBR Green qPCR MasterMix (Stratagene, La Jolla, CA) en un termociclador ADN engine Option 2 Cycler System (MJ Research, Watertown, MA). Las condiciones de PCR fueron:

95°C por 10 min; 40 ciclos de 95°C por 15 s, 60°C por 20 s, y 72°C por 20 s; y con una curva de disociación de 55°C por 30 s, y 95°C por 5 min. Se realizaron dos réplicas técnicas por cada réplica biológica de cada tejido. Para cada reacción se utilizó 10 µL de SYBR Green Master Mix 2X, 0,8 µL de cada partidor, 6,4 µL de agua libre de nucleasas y 2 µL de cADN 25 ng/µL obteniendo un volumen final de 20 µL. Los primers que se utilizaron para amplificar los genes candidatos fueron diseñados con el software basado en la web, NCBI Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Para determinar la expresión relativa se utilizó el método 2- $\Delta$ CT de Livak y Schmittgen (2001). Los genes candidatos utilizados fueron: hypoxia-responsive family protein (Medtr3g072170.1), leghemoglobin Lb120-1 (Medtr5g041610.1), nicotianamine synthase-like protein (Medtr1g084050.1), nitrato reductasa (Medtr3g073180.1). Además, se analizó la expresión de genes constitutivos que codifican para ubicuitinas.

## **2.5 Sistema de raíces-divididas (split-root) para la determinación del efecto del nitrato sobre la expresión de genes del nódulo (experimento 2)**

Se seleccionaron 9 plantas homogéneas de 12 semanas de edad y se separaron sus raíces y nódulos de forma equitativa; posteriormente se trasplantaron las plantas en un sistema de split-root, dejando las dos mitades de raíces/nódulos separadas físicamente. Para esto, se usaron dos envases TetraPak® unidos en el centro y abiertos en su parte superior. Se utilizó 1 kg de sustrato (arena y perlita [3:1]) por compartimento. Una vez establecidas, ambos compartimentos fueron inoculados con 2 mL de una suspensión de bacterias *S. meliloti* ( $10^9$  u.f.c. [Biogram]). El riego y adición de nutrientes se realizó cada 2 días de igual forma que para las plantas en macetas normales (ver experimento 1).

En el experimento 2 se analizó el transcriptoma de los nódulos después de la adición externa de nitrato. Así, en el experimento de split-root, se aplicaron 100 mL de una solución de KNO<sub>3</sub> a una concentración de 10 mM a uno de los lados. Al cabo de 2 h, se colectaron los nódulos de las raíces desde ambos lados (tratados con nitrato y sin tratar). Además, se colectaron nodulos de plantas que no fueron tratadas con nitrato (control absoluto). Los nódulos fueron depositados en bolsas de



papel aluminio y congelados en N líquido (-180°C) y almacenados a -80°C. Luego se realizó la extracción de ARN de los nódulos colectados (ver sección 2.3) y las muestras fueron enviadas para análisis al Laboratorio de Secuenciación y Tecnologías OMICAS de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

## **2.6 Extracción de ARN, preparación de cADN y secuenciamiento del ARNm**

En el caso de la extracción de ARN desde los nódulos del experimento en split-root, se procedió de forma similar que en la extracción de ARN del experimento 1. Una vez determinada la integridad y calidad del ARN total extraído desde los nódulos, se realizó secuenciamiento masivo del ARN mensajero (ARNm). La preparación de la librería para el secuenciamiento de ARNm fue hecha con el kit TruSeq Sample Preparation (Illumina ®) de acuerdo con el protocolo establecido por el fabricante. Los análisis de secuenciamiento (ARNseq) fueron realizados en el Laboratorio de Secuenciación y Tecnologías OMICAS de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

## **2.7 Análisis estadísticos**

El nivel de expresión de genes para el experimento 1 (qPCR) fue calculado de acuerdo con el método de  $2^{-\Delta CT}$  que corresponde a una medición relativa de la expresión de un transcrito con relación a la expresión de este transcrito en la situación control o tiempo 0. El análisis estadístico entre las dos condiciones fue realizado mediante una comparación simple pareada mediante un t-test. En el caso del análisis estadístico del experimento de secuenciamiento del ARNm, la expresión de los transcritos en ambos compartimentos (con y sin adición de nitratos), y en las plantas control, se analizó mediante el procedimiento DESeq (Dillies et al., 2013). La expresión diferencial de los genes se expresó como logaritmo en base 2 del cambio total entre condiciones ( $\log_2FC$ ). Los gráficos fueron hechos con el software GraphPad Prism® v8 y la evaluación de los procesos metabólicos mediante el software MapMan (Thimm et al., 2004).

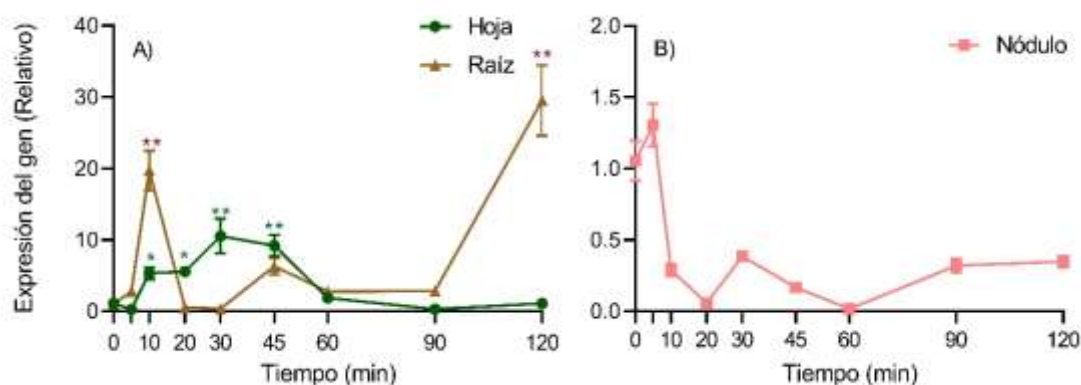
### 3. Resultados

#### 3.1 Evaluación de la aplicación de nitrato sobre la expresión de genes en nódulos

En un primer experimento, donde se analizó el efecto de la adición de nitrato a plantas de *M. truncatula* inoculadas con *S. meliloti*, en el cual se determinó la expresión de 4 genes relacionados directamente con el metabolismo de la fijación de N<sub>2</sub> en los nódulos mediante la cuantificación del ARNm mediante qPCR (Cuadro 1). Se presentan cuatro figuras que reflejan el comportamiento de los genes mencionados en los órganos analizados después de la aplicación de 20 mL de KNO<sub>3</sub>.

**Cuadro 1.** Genes evaluados como indicadores de la regulación molecular de la fijación de N<sub>2</sub> en nódulos de *M. truncatula* tratados con nitrato.

Gen	Codifica para
Medtr5g041610.1	Leghemoglobina
Medtr3g072170.1	Hipoxia
Medtr1g084050.1	Nicotianamina Sintasa
Medtr3g073180.1	Nitrato Reductasa

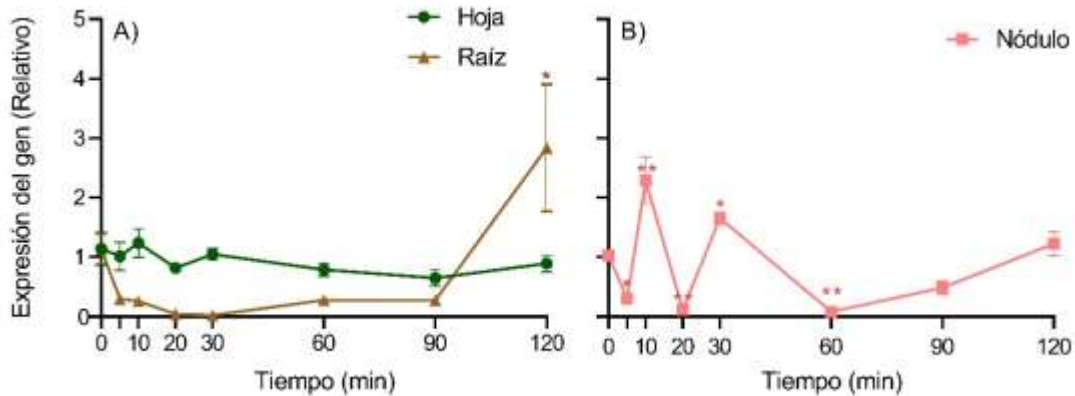


**Figura 1.** Expresión relativa a través del tiempo del gen que codifica para leghemoglobina (Medtr5g041610.1), con respecto a housekeeping ubiquitina; en diferentes órganos de *M. truncatula* luego de la aplicación de 5 mM de KNO<sub>3</sub>: (A) raíces y hojas; (B) nódulos. Las

plantas tenían 12 semanas de edad. Los datos fueron obtenidos a partir de 3 réplicas biológicas y cada una con 2 réplicas técnicas. Las barras representan el error estándar. \*, \*\* indican diferencias estadísticas con respecto al tiempo 0. Nota: A y B presentan escalas relativas diferentes de expresión.

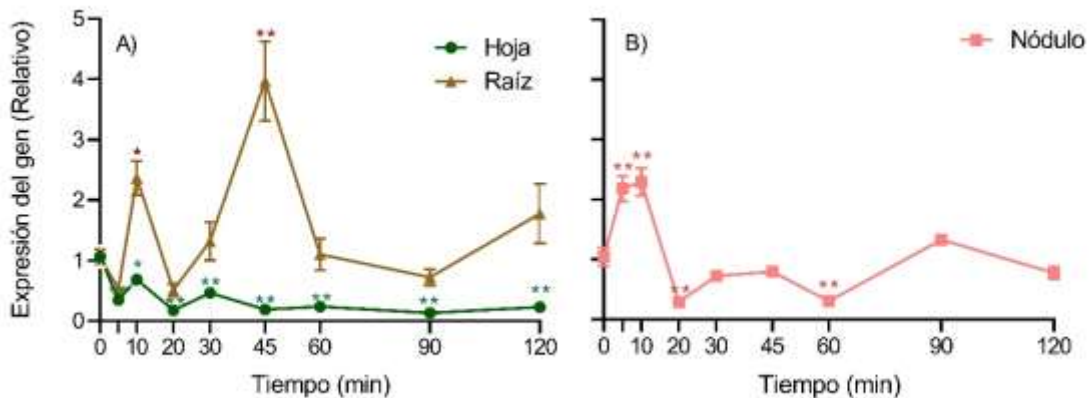
En la Fig. 1 se muestra la expresión relativa del gen Medtr5g041610.1, el cual codifica para la proteína leghemoglobina, en nódulos, raíces y hojas de plantas tratadas con  $\text{KNO}_3$ . El tiempo inicial cero fue previo a la aplicación de nitrato y, por lo tanto, es considerado como control o punto de referencia para la expresión del gen luego de la aplicación de nitrato. Luego de la adición de 5 mM de  $\text{KNO}_3$  se observa que en la raíz, se produce un aumento de la expresión de este gen hasta el minuto 10, posteriormente disminuye al nivel inicial transcurridos 20 minutos, a continuación existe un aumento de la expresión en el minuto 120. En hojas, la expresión aumenta hasta los 45 min y luego disminuye hasta valores similares al momento previo de la adición. Luego de 10 minutos, la expresión en hojas aumentó aproximadamente 5 veces, esta tendencia se mantuvo hasta los 45 minutos. Por otro lado, en los nódulos, la actividad inicial de leghemoglobina es alta y aumenta rápidamente a los cinco minutos. Transcurrido diez minutos desde la adición de nitrato, la actividad disminuye hasta valores cercanos a cero. Tanto en nódulos como en raíces, la expresión del gen sigue una forma similar, con un efecto inicial marcado, para luego disminuir la expresión. Sin embargo, existe un aumento de la actividad de este gen en las raíces en la última medición (120 min).

La expresión del gen Medtr3g072170.1, el cual codifica para `hypoxia-responsive family protein` disminuyó con la aplicación de  $\text{KNO}_3$  (5mM) hasta el minuto 30, para posteriormente ascender levemente hasta los 90 minutos (Fig. 2A); luego de dos horas de la aplicación se observó un fuerte aumento de la expresión en raíces. Luego de dos horas de la aplicación se observó un fuerte aumento de la expresión en raíces. En hojas, la expresión del gen no presentó diferencias significativas con respecto al tiempo 0 (Fig. 2A). La expresión en nódulos fue variable, con aumentos y bajadas hasta los primeros 60 min transcurrida la aplicación de nitrato (Fig. 2B). Posteriormente, aumentó la expresión levemente, aunque sin diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 2.** Expresión a través del tiempo del gen que codifica para 'Hypoxia' (Medtr3g072170.1) con respecto a housekeeping ubiquitina; en diferentes órganos de *M. truncatula* luego de la aplicación de 5 mM de KNO<sub>3</sub>: A) raíces y hojas; (B) nódulos. Las plantas tenían 12 semanas de edad. Los datos fueron obtenidos a partir de 3 réplicas biológicas y cada una con 2 réplicas técnicas. Las barras representan el error estándar. \*, \*\* Indican diferencias estadísticas con respecto al tiempo 0.

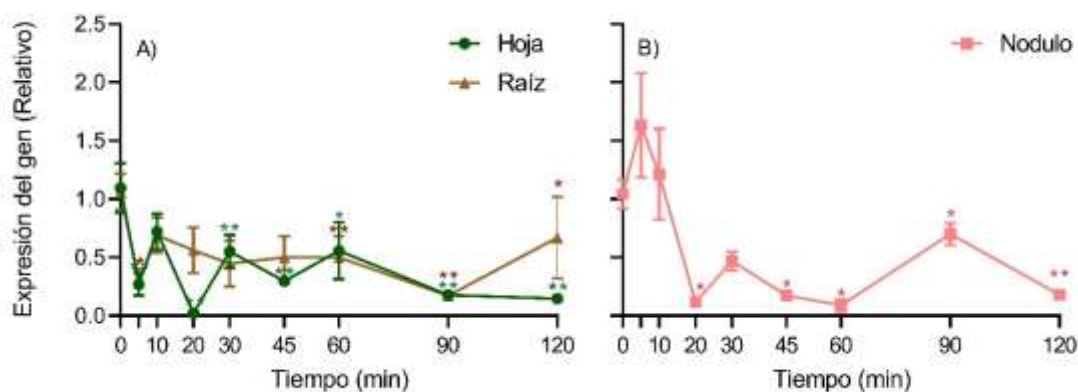
La expresión del gen Medtr1g084050.1, el cual codifica para 'Nicotianamina sintasa' se muestra en la Fig. 3.



**Figura 3.** Expresión de nicotianamina sintasa (Medtr1g084050.1) con respecto a housekeeping ubiquitina; en diferentes órganos de *M. truncatula* luego de la aplicación de 5 mM de KNO<sub>3</sub>: (A) raíces y hojas; (B) nódulos. Las plantas tenían 12 semanas de edad. Los datos fueron obtenidos a partir de 3 réplicas biológicas y 2 réplicas técnicas. Los datos

fueron recopilados a través del tiempo desde el minuto 0 hasta el minuto 120. Las barras representan el error estándar. \*, \*\* Indican diferencias estadísticas con respecto al tiempo 0.

Una vez aplicado  $\text{KNO}_3$  (5mM) se observó una disminución de la expresión del gen en hojas desde la aplicación hasta el minuto 120 (Fig. 3A); en todos los tiempos las diferencias fueron significativas con respecto al tiempo 0. En raíz, la expresión del gen alcanzó un máximo a los 45 min, para luego disminuir y alcanzar los niveles previos a la aplicación de  $\text{KNO}_3$  (Fig. 3A).. En los nódulos hubo un rápido aumento de la expresión del gen hasta los 10 min, para luego descender y mantenerse a niveles similares al del tiempo 0 (Fig. 3B).



**Figura 4.** Expresión de un marcador de nitrato reductasa (Medtr3g073180.1) con respecto a housekeeping ubiquitina; en diferentes órganos de *M. truncatula* luego de la aplicación de 5 mM  $\text{KNO}_3$ : (A) raíces y hojas; (B) nódulos. Las plantas tenían 12 semanas de edad. Los datos fueron obtenidos a partir de 3 réplicas biológicas y cada una con 2 réplicas técnicas. Las barras representan el error estándar. \*, \*\* Indican diferencias estadísticas con respecto al tiempo 0.

En la Fig. 4 se observó la expresión del gen Medtr3g073180.1 que codifica para 'Nitrato reductasa', y el cual fue usado como gen centinela o marcador de la actividad del nitrato en la planta. Una vez aplicado el  $\text{KNO}_3$  (5mM) se observó que hojas y raíces presentaron una reacción similar a la presencia de nitrato. En ambos

órganos disminuyó la expresión del gen a medida que transcurrió el tiempo desde la aplicación de KNO<sub>3</sub>. La expresión de este gen en nódulos aumentó levemente en el minuto 5 para posteriormente, a partir del minuto 10 descendió la expresión con respecto a los niveles del tiempo 0.

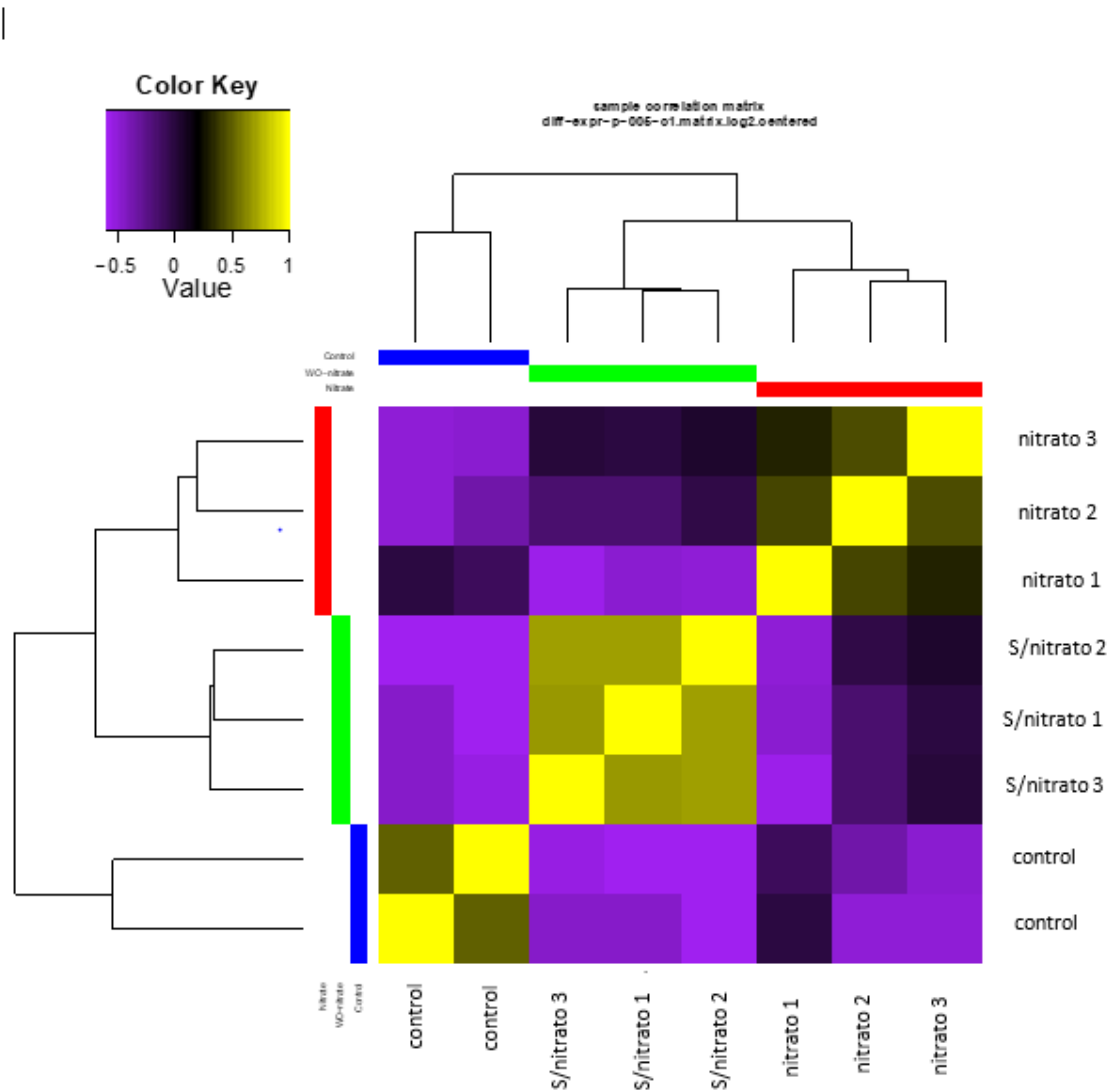
### **3.2 Efecto global de la aplicación de nitrato a nivel del transcriptoma de los nódulos**

En el experimento 2 se analizó el efecto de la aplicación de nitrato sobre el transcriptoma de los nódulos, en plantas con raíces divididas o split-root, donde el nitrato fue aplicado sólo a una mitad del sistema raíz-nódulo. Así, se cuantificó mediante análisis de secuenciamiento del ARNm (RNA-seq) de los nódulos, el efecto de aplicar nitrato sobre la mitad de los nódulos activos y el posible efecto sobre la mitad de nódulos que no recibieron nitrato en forma directa.

. El análisis de agrupamiento realizado fue jerárquico y utilizó todas las unidades de transcripción consideradas como expresadas. Para considerar una unidad de transcripción como expresada, se debió cumplir con el siguiente criterio:  $\geq 20$  hits o unidades DEseq. La expresión conjunta de los genes en los nódulos del control se separaron de aquella en los nódulos de las plantas que recibieron nitrato, ya sea en la parte que recibió el efecto directo del nitrato o de la mitad que es afectada indirectamente (Fig. 5). La expresión total para el control fue de 26.177 transcriptos, mientras que para los nódulos que recibieron nitrato, 26.566 transcriptos fueron considerados como expresados. En el caso de la mitad de los nódulos que no recibieron nitrato, 27.024 transcriptos fueron considerados expresados. En relación con la cantidad de transcriptos que se encuentran anotados en el transcriptoma de referencia de *M. truncatula*, Mt 4.0 (62.319 unidades), en los tratamientos se expresaron proporcionalmente: 42,0, 42,6 y 43,3%, para control, mitad tratada con nitrato y mitad sin nitrato, respectivamente. Estos números sugieren que el efecto directo o indirecto de la aplicación de nitrato sólo altera una proporción de los genes totales de *M. truncatula*.

Un total de 540 genes fueron considerados como expresados diferencialmente al comparar la mitad de los nódulos tratados con las plantas sin

tratar, mientras que 1.185 genes se expresaron diferencialmente entre los nódulos no tratados con nitrato y las plantas control (Cuadro 1). Al comparar las dos mitades de la misma planta (split-root), con adición de nitrato y sin adición de nitrato, se consideraron como diferencialmente expresados 455 genes.



**Figura 5.** Análisis de cluster o agrupamiento de las muestras analizadas mediante secuenciación del ARNm.

La cantidad de genes que fueron sobre-expresados o reprimidos se muestra en el Cuadro 2. La cantidad de genes sobre expresados en la mitad que recibió nitrato

fue de 299, mientras que en la mitad que no recibió, estos aumentaron a 548 genes. Los genes reprimidos en la mitad tratada con nitrato fueron 241, mientras que en la mitad que no recibió nitrato estos suman 637. En la mitad que recibió nitrato, los genes sobre-expresados representan un 55,4% y en la mitad sin aplicación de nitrato estos representan el 46,2%.

**Cuadro 2.** Número de genes expresados diferencialmente en nódulos tratados con nitrato en el experimento de raíz dividida (split-root). Los datos fueron obtenidos mediante el cálculo de la expresión diferencial (DESeq).

<b>Comparación</b>	<b>Sobreexpresado</b>	<b>Reprimido</b>	<b>Total</b>
Control vs Nitrato	299	241	540
Control vs Sin Nitrato	548	637	1185
Sin Nitrato vs Nitrato	77	378	455

### **3.3 Efecto de la aplicación de nitrato sobre genes involucrados en el metabolismo de N**

La aplicación de nitrato afectó a grupos involucrados en el metabolismo del N. En el Cuadro 3, se muestra la expresión diferencial de algunos genes considerados como centinelas o marcadores y que están directamente involucrados en el transporte de nitrato y su posterior reducción. Tres genes descritos como transportadores de nitrato aumentaron su expresión luego de dos horas desde la aplicación de nitrato a la mitad de las raíces con nódulos (Figura 6). La expresión es comparada con la expresión de genes de plantas sin la aplicación de nitrato (control absoluto). También aumentó la expresión de un gen que codifica para una proteína “like” nitrato reductasa, o para la unidad reductora (NADH) y para síntesis de glutamina. Además, aumentó la expresión de la síntesis de asparagina, indicando un aumento de la asimilación y transporte de N.

Al comparar el efecto de la aplicación de nitrato sobre la expresión de los nódulos en ambos lados de la misma planta, se observó un cambio en varios grupos de genes. Incluso al comparar la misma planta, el efecto del nitrato se observó en el aumento de la expresión de dos transportadores de nitrato (high affinity nitrate transporter 2.7: Medtr4g057865.1 y Medtr4g057890.1). También se alteró la

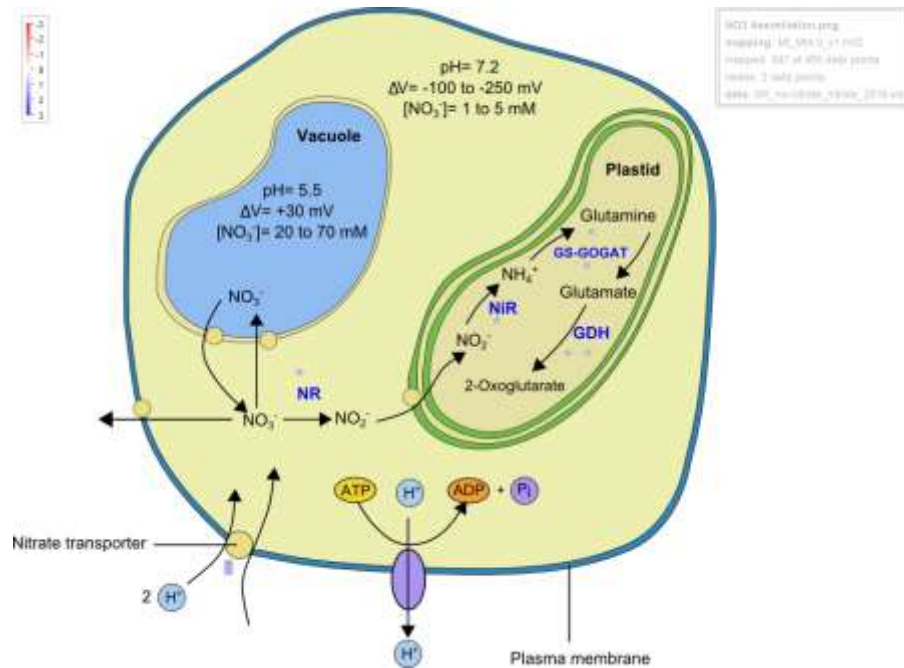


expresión de una familia de genes relacionados con resistencia a enfermedades (por ej. Medtr1g037150.1 y otros 35), los cuales disminuyeron su expresión en los nódulos que recibieron directamente la aplicación de nitrato. Un grupo de genes involucrado en el transporte y desintoxicación de metales (heavy metal transport/detoxification superfamily protein) también modificó su expresión. De un total de 15 genes 13 se reprimieron y dos aumentaron su expresión. Otros genes relacionados con procesos de transporte de metales también disminuyeron la expresión (ZIP zinc/iron transport family protein: Medtr3g081690.1; Medtr3g082050.2).

**Cuadro 3.** Genes centinelas expresados diferencialmente en nódulos tratados con nitrato en el experimento de raíz dividida (split-root). Los datos fueron obtenidos mediante el cálculo de la expresión diferencial (DESeq) en nódulos de plantas tratadas con nitrato en un experimento de raíz dividida en comparación con nódulos de plantas que no recibieron nitrato.

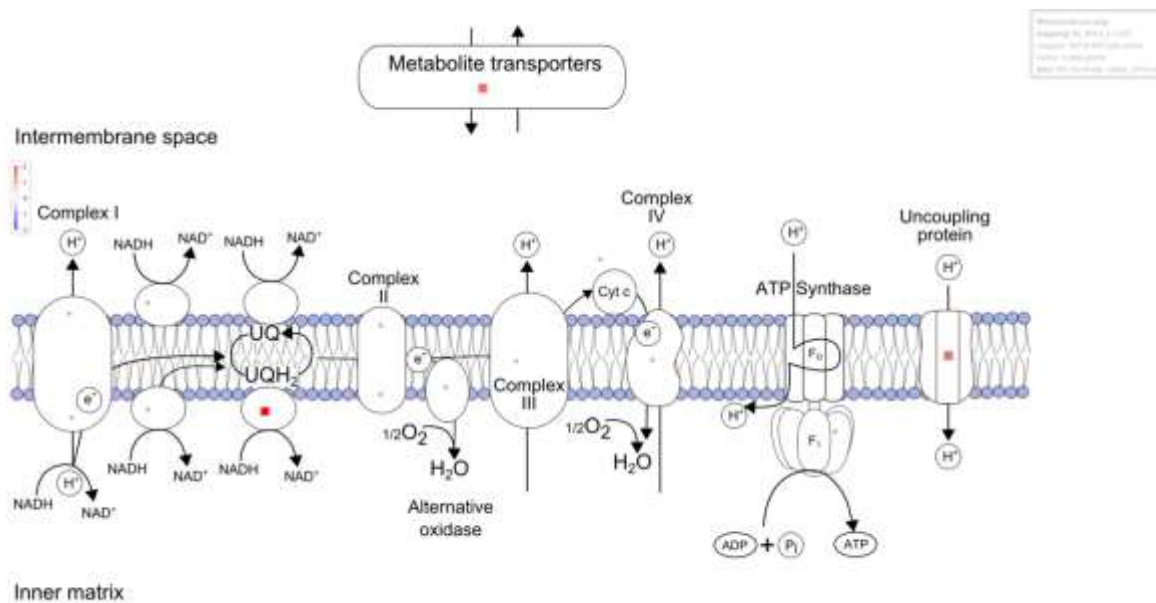
<b>Gen</b>	<b>Descripción</b>	<b>FC</b>
Medtr4g057865.1	High affinity nitrate transporter 2.7	2.84
Medtr5g012290.1	Peptide/nitrate transporter	2.06
Medtr4g057890.1	High affinity nitrate transporter 2.7	1.96
Medtr3g073180.1	Nitrate reductase [NADH]-like protein	1.51
Medtr1g027020.1	NADH glutamate synthase	1.86
Medtr3g464580.3	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing] protein	7.75
Medtr5g071360.2	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing] protein	2.46
Medtr5g071360.1	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing] protein	2.06

Los genes relacionados con la percepción de P también disminuyeron la expresión en los nódulos tratados con nitrato (phosphate-responsive 1 family protein: Medtr3g074860.1; Medtr5g064360.1; Medtr3g074890.1). También se observó la disminución de la expresión de un gen relacionado con procesos de nodulación (early nodulin-like protein; Medtr2g090580.1).



**Figura 6.** Análisis de la expresión de genes involucrados en el transporte de nitrato en nódulos tratados con nitrato mediante el software MapMan. Los casilleros marcados en azul indican un aumento de la expresión de los transportadores de alta afinidad para nitrato: Medtr4g057865.1 y Medtr4g057890.1. Los puntos de color gris indican una ruta que no registró un cambio en la expresión diferencial de los genes involucrados en el experimento. La intensidad del color indica el logaritmo del cambio en la expresión ( $\log_2FC$ , FC: fold change) entre los nódulos que recibieron nitrato y aquellos que no en la misma planta.

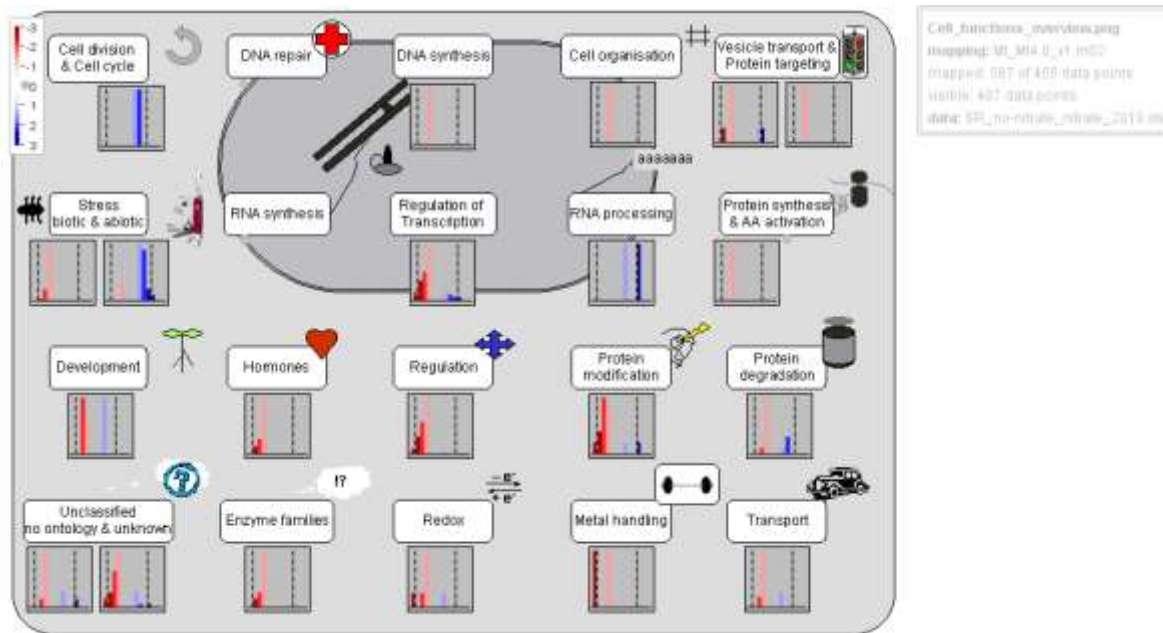
La cadena transportadora de electrones también fue afectada (Figura 7). Un gen involucrado con el traspaso de electrones (Medtr8g094730.5) y otro en el desacoplamiento de la síntesis de ATP fueron reprimidos (Medtr5g032420.1).



**Figura 7.** Análisis de la expresión de genes involucrados la síntesis de ATP con el software MapMan. Los casilleros marcados en rojo indican una disminución de la expresión de los genes involucrados en el traspaso de electrones (Medtr8g094730.5) y en el desacoplamiento de la producción de ATP (Medtr5g032420.1). Los puntos de color gris indican una ruta que no registró un cambio en la expresión diferencial de los genes involucrados en el experimento. La intensidad del color indica el logaritmo del cambio en la expresión ( $\log_2FC$ , FC: fold change) entre los nódulos que recibieron nitrato y aquellos que no en la misma planta.

El análisis mediante la herramienta computacional MapMan indicó una reestructuración completa del metabolismo de los nódulos como reacción a la aplicación de nitrato (Figura 8). En la mayoría de los procesos se manifiesta una disminución de la expresión de genes que participan en la función indicada en la figura. Algunos de esos procesos se encuentran involucrados en la fijación de  $N_2$ , como los procesos de reducción y transporte de metales. El transporte de nutrientes, así como de péptidos, también fue reprimido (con excepción del transporte de nitrato). La percepción de señales de calcio y receptores de quinasas también redujeron su expresión (Regulation). Genes asociados al desarrollo, la regulación de la transcripción y la organización celular también fueron afectados. Un aumento

de la expresión se manifestó en aquellos procesos relacionados con el estrés, específicamente en genes vinculados a la percepción de estrés térmico.



**Figura 8.** Resumen de los procesos celulares en nódulos tras la aplicación de nitrato. Las barras en azul indican un aumento de la expresión, mientras que las barras rojas una represión de los procesos celulares. La intensidad del color indica el logaritmo del cambio en la expresión ( $\log_2FC$ , FC: fold change) entre los nódulos que recibieron nitrato y aquellos que no en la misma planta.

#### 4. Discusión

Luego de la adición de nitrato a plantas de *M. truncatula* que dependían exclusivamente de la fijación de N<sub>2</sub> para su nutrición nitrogenada, varios genes relacionados al metabolismo del N alteraron su actividad, particularmente en los nódulos, aunque también en raíces y hojas.

Se sabe que la absorción de nitrato en las plantas es rápida y que el cambio de la expresión de genes relacionados con la asimilación ocurre en los primeros minutos desde la exposición de las raíces a nitrato (Krouk et al., 2010). Al absorber nitrato, la planta reacciona con cambios en la expresión de la enzima nitrato reductasa (NR), la cual es el primer paso para la asimilación de este anión (Jones et al., 2012). Se esperaba que aumentará la expresión de este gen debido al proceso de asimilación del nitrato, sin embargo, más bien reaccionó con una disminución de la expresión, principalmente en nódulos. Esto último se puede deber a la menor capacidad de los nódulos de asimilar nitrato en comparación con las raíces. Sin embargo, la respuesta de la enzima NR a la presencia de nitrato en los nódulos parece ser dependiente de la especie. Por ejemplo, en frejol (*Phaseolus vulgaris*), la adición de nitrato no produjo alteración de NR en nódulos y su actividad se mantuvo baja durante la exposición a concentraciones crecientes de nitrato, mientras que en *Phaseolus lanatus*, la actividad de NR aumentó considerablemente, indicando una mayor habilidad de esta última para asimilar nitrato en el nódulo (Silveira et al., 2001). Esto podría estar en conexión con la sensibilidad de la fijación de N<sub>2</sub> que poseen las distintas leguminosas a la exposición a fuentes externas de N (Menge et al., 2015). En el caso de la expresión de NR en hojas y raíces, esta fue más errática, aunque prevalece un aumento de la expresión inicial, para luego disminuir y mantenerse estable. Lo anterior sugiere una rápida asimilación del nitrato.

La presencia de leghemoglobina es esencial para el funcionamiento de los nódulos y se ha demostrado que el nitrato inhibe su actividad (Vessey and Waterer, 1992) restringiendo el oxígeno al interior del nódulo (Hunt and Layzell, 1993). En los nódulos, el gen que codifica para leghemoglobina disminuyó su expresión rápidamente luego de la aplicación de nitrato. La reacción inicial más errática (Fig.

1), indicaría una regulación de la concentración de oxígeno al interior del nódulo para mantener una concentración constante (Layzell and Hunt, 1990; Layzell, 2000). Es tal la importancia de esta proteína para el funcionamiento del nódulo, que se ha demostrado que el silenciamiento de un sólo gen codificante para leghemoglobina en soya, produce nódulos blancos incapaces de fijar  $N_2$  (Ott et al., 2009). Leghemoglobina tampona el  $O_2$  libre al interior del nódulo, pero manteniendo la tasa de transferencia necesaria hacia los citocromos para la respiración microbial (Preisig et al., 1996). El análisis de la expresión de leghemoglobina indica que existió una reacción en raíces y nódulos. En el caso de la inhibición de la expresión en raíces, esto puede ser el resultado de la nitrosilación de la proteína ante la presencia de nitrato (Kanayama and Yamamoto, 1991).

Otro argumento relacionado con la restricción de  $O_2$  tras la adición de nitrato es la reacción del gen que codifica para 'Hipoxia' en raíces y nódulos. Es posible que la reacción de este gen funcione como un sensor de la presencia de  $O_2$  al interior del nódulo. La regulación de este gen parece ser central en el proceso de la nodulación en soya (Yan et al., 2015). En este sentido, la expresión del miRNA164 (microRNA) de interferencia, que tiene como objetivo el gen hipoxia (Glyma02g42770), aumentó durante el proceso de nodulación. Lo anterior podría indicar que, en el nódulo, la percepción de la presencia de  $O_2$  es central para el proceso de fijación de  $N_2$  o para su inhibición. Además, la expresión del gen en hojas se mantuvo relativamente constante, lo cual sugiere, que el gen posee un rol específico a nivel de nódulos.

La proteína nicotianamina sintasa (NAS) juega un rol fundamental en la homeostasis celular del Fe en las plantas (Hofmann, 2012) y está relacionada al transporte de Fe en los nódulos (Avenhaus et al., 2016). En el trabajo de Avenhaus et al. (2016), la mutación en plantas de *M. truncatula* para el gen que codifica para NAS, produjo clorosis y la senescencia acelerada de las hojas y una baja actividad de los nódulos. Lo anterior ha sido recientemente validado mediante la alteración del gen NAS2 en *M. truncatula* y la observación de la distribución de Fe en los nódulos (Escudero et al., 2020). La observación de los nódulos de las plantas sin alteración en el gen NAS (wild type) y aquellas con una inserción que causa

mutación, mostró que el Fe estaba en bajas concentraciones en la zona activa de los nódulos en las plantas defectuosas en comparación con las plantas sin alteración, indicando que NAS participa en la distribución del Fe en los nódulos. De este modo, en el presente estudio, la disminución de la expresión de este gen en nódulos puede estar relacionada a la menor formación de la enzima nitrogenasa (menor demanda de Fe) (Cabeza et al., 2014a). El Fe no solo es importante para la enzima nitrogenasa, sino que para otras enzimas involucradas en la fijación de N<sub>2</sub>, como leghemoglobina y ferredoxina. Esta última está involucrada en el traspaso de agente reductor a la enzima nitrogenasa y en otros procesos que necesitan electrones (Jones et al., 2012).

El análisis global de la expresión de genes en los nódulos, indica que la regulación de la fijación de N<sub>2</sub> ante la adición de nitrato es compleja. Lo anterior queda de manifiesto en la cantidad de genes regulados en los nódulos de las plantas tratadas con nitrato (Cuadro 2). Los datos muestran que la adición de nitrato desencadena un comportamiento local y sistémico en la planta; lo anterior se evidencia en el comportamiento de los genes expresados diferencialmente (GED). Así, la cantidad de GED en los nódulos tratados con nitrato en comparación con las plantas control fue de 540, lo cual puede ser interpretado como el efecto local de la aplicación de nitrato. Al comparar los nódulos de la mitad que no recibieron nitrato directamente, queda de manifiesto que también existe un cambio transcripcional, el cual no es mediado directamente por la adición de nitrato. Dicho de otra manera, la adición de nitrato alteró la expresión de genes en la otra mitad, mediante el cambio sistémico del metabolismo relacionado a la absorción y demanda de N. Lo anterior ha sido recientemente descrito por Schulze *et al.* (2020), quienes en un experimento de raíces divididas, midieron el efecto de la adición de nitrato sobre la fijación de N<sub>2</sub> en tiempo real, y llegaron a la conclusión, que la mitad que recibió nitrato inhibió de manera directa la fijación de N<sub>2</sub>, mientras que la otra mitad fue inhibida luego de un desfase de un par de horas y de forma parcial. Esto último es una evidencia del efecto sistémico de la adición de nitrato sobre la fijación de N<sub>2</sub> en *M. truncatula*.

Uno de los primeros efectos observados es la reacción de genes considerados como centinelas o genes marcadores de la absorción de nitrato. Así,

el gen que codifica para el transportador de nitrato (High affinity nitrate transporter 2.7) aumentó su expresión. Este gene es inducido por la presencia de nitrato y está involucrado en su transporte con alta afinidad y en las señales metabólicas que controlan el funcionamiento de los nódulos (Pellizzaro et al., 2015). Lo anterior sugiere que este gen puede estar involucrado en las primeras señales de percepción del nitrato y el control de los procesos en el nódulo. Un punto importante que se debe mencionar es que el transporte entre raíces y nódulos para nitrato no ha sido evaluado y, por lo tanto, no se puede descartar que este transportador sea responsable del transporte de nitrato al interior del nódulo desde las células de las raíces (Pellizzaro et al., 2017). Otras proteínas transportadoras de péptidos (Peptide/nitrate transporter) también aumentaron su expresión debido a la aplicación de nitrato (Forde, 2000; Forde, 2014), un gen que codifica para nitrato reductasa (Horchani et al., 2011) y glutamato sintasa también fueron alteradas. El glutamato es dependiente de ferroxina, enzima que funciona bajo el suministro de Fe, clave para la fijación de N<sub>2</sub> y el cual está en conexión con nicotianamina sintasa (Escudero et al., 2020).

Por otra parte, la producción de asparagina es clave para la exportación de N desde el nódulo a la parte aérea de la planta. Una vez que el N<sub>2</sub> ha sido reducido a amonio, el N es asimilado para formar moléculas de asparagina (Suliman and Tran, 2013). El aumento de la actividad de esta enzima al interior del nódulo sugiere un aumento de la presencia de N asimilado, lo cual, en este caso particular, es más probable que provenga de la absorción de nitrato. Todos estos elementos indican que la absorción de nitrato y su asimilación se encuentra activo en los nódulos de *M. truncatula*.

Al comparar los nódulos de ambos lados de la planta (con adición directa de nitrato y sin adición), existe información que da cuenta de una acción directa del nitrato sobre el metabolismo de los nódulos. En el lado expuesto a nitrato, existió una respuesta de transportadores de nitrato (high affinity nitrate transporter) (Fig. 6), indicando una mayor actividad asociada al transporte de este ion al interior del nódulo. Del mismo modo, y en concordancia con lo ya mencionado para la actividad de NAS, otro grupo de genes involucrado en el transporte de metales disminuyó su



expresión. Otros metales diferentes al Fe también son necesarios para el metabolismo del nódulo y la fijación de N<sub>2</sub>, por ejemplo: Zn, Cu y Mo (Abreu et al., 2020; Castro-Rodríguez et al., 2020). Al interrumpir la expresión de genes involucrados en el transporte de metales, Castro-Rodríguez *et al.* (2020), notaron que el Fe se retuvo en la región apical del nódulo, el cual presenta una menor actividad de fijación de N<sub>2</sub>, mientras que Zn se acumuló fuertemente en el tejido vascular del nódulo. Lo anterior sugiere que no sólo es Fe, sino que también el Zn podría estar involucrado en el correcto funcionamiento del nódulo. La represión de dos transportadores de Zn (Medtr3g081690.1; Medtr3g082050.2) en el presente estudio, podrían estar vinculados en procesos de homeostasis de metales al interior de los nódulos.

Otra reacción interesante está relacionada con el transporte de P. El P es esencial para la producción de energía en forma de ATP, el cual a su vez, es usado para el funcionamiento de la Nasa. Así, en los nódulos que recibieron directamente la dosis de nitrato, la expresión de genes relacionados a la percepción de P disminuyó. Lo anterior sugiere una disminución de la demanda por P y posiblemente, una reducción de la producción de energía en forma de ATP. La relación entre el P y la fijación de N<sub>2</sub> ha sido establecida hace bastante tiempo. Estudios pioneros realizados por Israel (1987) dan cuenta del efecto de la deficiencia de P en leguminosas con nódulos activos. En estos estudios, se mostró que plantas de soya (*Glycine max*) disminuyeron el tamaño de los nódulos y su actividad cuando fueron cultivadas con una baja disponibilidad de P. Más recientemente, Cabeza *et al.* (2014b) mostraron que los nódulos de *M. truncatula* mantienen la fijación de N<sub>2</sub> en un nivel mínimo de sobrevivencia en plantas de *M. truncatula*, desacoplando varios procesos moleculares ante la deficiencia de este elemento, entre ellos la producción de ATP. Lo anterior también fue observado en el presente estudio. A la vez varios genes de la cadena transportadora de electrones fueron reprimidos; un gen involucrado con el traspaso de electrones (Medtr8g094730.5) y otro en el desacoplamiento de la síntesis de ATP fueron reprimidos (Medtr5g032420.1), esta reacción concuerda con varios informes sobre la relación ATP/ADP en los nódulos luego de la aplicación de una fuente alterna de

N (Cabeza et al., 2014b). Lo anterior sugiere que, en los nódulos tratados directamente con nitrato, la maquinaria para la fijación de  $N_2$  está demandando menor cantidad de energía, debido a la inhibición de la actividad del nódulo (Cabeza et al., 2014b; Schulze et al., 2020).

Un conjunto de genes relacionados a la resistencia a enfermedades disminuyó su expresión en los nódulos expuestos directamente al nitrato (35 genes). Es importante mencionar que las bacterias al interior del nódulo siguen siendo percibidas como un agente patógeno y, que la planta, activa mecanismos de defensa para su protección. El mecanismo más ampliamente aceptado es la producción de péptidos del nódulo ricos en cisteína (nodule cysteine-rich peptides, NCR), los cuales no cambiaron su expresión en el presente estudio. Los NCR mantienen las bacterias en su forma de bacteroide al interior del nódulo, y activan la fijación de  $N_2$  y, del mismo modo, establecen una presión hacia las bacterias para mantener la fijación de  $N_2$  (Pan and Wang, 2017). Aunque no se observó un cambio en la expresión de los péptidos NCR, la alteración de otros genes relacionados a la defensa, sugieren que la percepción de las bacterias en los nódulos como patógenos disminuye, lo cual a su vez podría ser una señal para el comienzo de la senescencia del órgano. Lo anterior también está en conexión con el proceso de nodulación. En este caso, la disminución de la expresión de genes relacionados con la nodulación, sugieren una inhibición de la formación de nuevos nódulos.

Finalmente, existió una reprogramación completa del transcriptoma del nódulo, involucrando cambios en la percepción de señales de Ca y receptores de quinasas. La percepción de quinasas es esencial en la cascada de señales que conducen a la nodulación y es parte esencial de los mecanismos de represión de la fijación de  $N_2$  en las leguminosas (Endre et al., 2002). Otros genes relacionados al desarrollo también fueron afectados por la adición de  $N_2$ , en general, la mayoría disminuyeron su expresión. En conjunto, el presente estudio muestra que el nitrato afecta no sólo algunos genes claves relacionados con la fijación de  $N_2$ , sino que actúa modificando completamente la actividad de los nódulos, reprogramando la expresión de genes y probablemente, preparando la senescencia del nódulo.

## 5. Conclusiones

Luego de la adición de nitrato a plantas de *M. truncatula*, se observaron cambios en los genes involucrados en los procesos de transporte de O<sub>2</sub> y Fe, lo cual confirma que estos son claves en la modulación de la actividad de los nódulos. Los genes que codifican para leghemoglobina e hipoxia (transporte y señalización de O<sub>2</sub>), alteraron su expresión tras la adición de nitrato, lo cual sugiere que estos están involucrados en el control del proceso de fijación de N<sub>2</sub>. Algo similar ocurre con el gen que codifica para NAS, involucrado en el transporte de Fe.

La adición de nitrato a una porción de raíces con nódulos (split-root) sugiere que el nitrato modifica el transcriptoma de forma directa (la presencia del ion) y mediante un proceso de señalización sistémico. Esto último, se base en la alteración del transcriptoma de los nódulos del lado sin contacto directo con el nitrato. En forma global, el nitrato ejerce un efecto rápido, local y sistémico sobre la actividad de los nódulos en *M. truncatula*.

## 6. Citas bibliográficas

- Abreu I, Escudero V, Montiel J, Castro- Rodríguez R, González-Guerrero M** (2020) Metal transport in *Medicago truncatula* nodule rhizobia-infected cells. Model Legume IMedicago Truncatulai. John Wiley & Sons, Ltd, pp 652–664
- Avenhaus U, Cabeza RA, Liese R, Lingner A, Dittert K, Salinas-Riester G, Pommerenke C, Schulze J** (2016) Short-term molecular acclimation processes of legume nodules to increased external oxygen concentration. Front Plant Sci 1133
- Badgley C, Moghtader J, Quintero E, Zakem E, Chappell MJ, Avilés-Vázquez K, Samulon A, Perfecto I** (2007) Organic agriculture and the global food supply. Renew Agric Food Syst 22: 86–108
- Becana M, Sprent JI** (1987) Nitrogen fixation and nitrate reduction in the root nodules of legumes. Physiol Plant 70: 757–765
- Bedoussac L, Journet E-P, Hauggaard-Nielsen H, Naudin C, Corre-Hellou G, Jensen ES, Prieur L, Justes E** (2015) Ecological principles underlying the increase of productivity achieved by cereal-grain legume intercrops in organic farming. A review. Agron Sustain Dev 35: 911–935
- Cabeza RA, Koester B, Liese R, Lingner A, Baumgarten V, Dirks J, Salinas-Riester G, Pommerenke C, Dittert K, Schulze J** (2014a) An RNA sequencing transcriptome analysis reveals novel insights into molecular aspects of the nitrate impact on the nodule activity of *Medicago truncatula*. Plant Physiol 164: 400–411
- Cabeza RA, Liese R, Fischinger SA, Sulieman S, Avenhaus U, Lingner A, Hein H, Koester B, Baumgarten V, Dittert K, et al** (2015) Long-term non-invasive and continuous measurements of legume nodule activity. Plant J 81: 637–648
- Cabeza RA, Liese R, Lingner A, Stieglitz I von, Neumann J, Salinas-Riester G, Pommerenke C, Dittert K, Schulze J** (2014b) RNA-seq transcriptome profiling reveals that *Medicago truncatula* nodules acclimate N<sub>2</sub> fixation before emerging P deficiency reaches the nodules. J Exp Bot 65: 6035–6048
- Castro-Rodríguez R, Abreu I, Reguera M, Novoa-Aponte L, Mijovilovich A, Escudero V, Jiménez-Pastor FJ, Abadía J, Wen J, Mysore KS, et al** (2020) The *Medicago truncatula* Yellow Stripe1-Like3 gene is involved in vascular delivery of transition metals to root nodules. J Exp Bot 71: 7257–7269
- Dillies M-A, Rau A, Aubert J, Hennequet-Antier C, Jeanmougin M, Servant N, Keime C, Marot G, Castel D, Estelle J, et al** (2013) A comprehensive evaluation of normalization methods for Illumina high-throughput RNA sequencing data analysis. Brief Bioinform 14: 671–683
- Donadeu M, Arias M, Gomez-Tejedor C, Agüero M, Romero LJ, Christianson WT, Sanchez-Vizca?no JM** (1999) Using polymerase chain reaction to obtain PRRSV-free piglets from endemically infected herds. J Swine Health Prod 7: 255–261
- Eady RR, Postgate JR** (1974) Nitrogenase. Nature 249: 805–810
- Endre G, Kereszt A, Kevei Z, Mihacea S, Kaló P, Kiss GB** (2002) A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. Nature 417: 962–966
- Escudero V, Abreu I, del Sastre E, Tejada-Jiménez M, Larue C, Novoa-Aponte L, Castillo-González J, Wen J, Mysore KS, Abadía J, et al** (2020)

- Nicotianamine synthase 2 is required for symbiotic nitrogen fixation in *Medicago truncatula* nodules. *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2019.01780
- FAO** (2016) 2016 International Year of Pulses. <http://www.fao.org/pulses-2016/about/en/>
- Ferguson BJ, Indrasumunar A, Hayashi S, Lin M-H, Lin Y-H, Reid DE, Gresshoff PM** (2010) Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *J Integr Plant Biol* **52**: 61–76
- Forde BG** (2000) Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* **1465**: 219–235
- Forde BG** (2014) Nitrogen signalling pathways shaping root system architecture: an update. *Curr Opin Plant Biol* **21**: 30–36
- Gresshoff PM, Ferguson BJ** (2017) Molecular signals in nodulation control. *Int J Mol Sci* **18**: 125
- Hofmann NR** (2012) Nicotianamine in Zinc and Iron homeostasis. *Plant Cell* **24**: 373–373
- Horchani F, Prévot M, Boscari A, Evangelisti E, Meilhoc E, Bruand C, Raymond P, Boncompagni E, Aschi-Smiti S, Puppo A, et al** (2011) Both plant and bacterial nitrate reductases contribute to nitric oxide production in *Medicago truncatula* nitrogen-fixing nodules. *Plant Physiol* **155**: 1023–1036
- Hunt S, Layzell DB** (1993) Gas exchange of legume nodules and the regulation of nitrogenase activity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **44**: 483–511
- Israel DW** (1987) Investigation of the role of phosphorus in symbiotic dinitrogen fixation. *Plant Physiol* **84**: 835–840
- Jedy C, Ruffel S, Freixes S, Tillard P, Santoni AL, Morel S, Journet E-P, Duc G, Gojon A, Lepetit M, et al** (2010) Adaptation of *Medicago truncatula* to nitrogen limitation is modulated via local and systemic nodule developmental responses. *New Phytol* **185**: 817–828
- Jones R, Ougham H, Thomas H, Waaland S** (2012) *The molecular life of plants.* Wiley-Blackwell
- Kanayama Y, Yamamoto Y** (1991) Formation of nitrosylhemoglobin in nodules of nitrate-treated cowpea and pea plants. *Plant Cell Physiol* **32**: 19–24
- Krouk G, Mirowski P, LeCun Y, Shasha DE, Coruzzi GM** (2010) Predictive network modeling of the high-resolution dynamic plant transcriptome in response to nitrate. *Genome Biol* **11**: R123
- Layzell DB** (2000) Oxygen regulation and adenylates in legume nodules. *Nitrogen Fixat. Mol. Crop Product.* Springer, Dordrecht, pp 367–368
- Layzell DB, Hunt S** (1990) Oxygen and the regulation of nitrogen fixation in legume nodules. *Physiol Plant* **80**: 322–327
- Liese R, Schulze J, Cabeza RA** (2017) Nitrate application or P deficiency induce a decline in *Medicago truncatula* N<sub>2</sub>-fixation by similar changes in the nodule transcriptome. *Sci Rep* **7**: 46264
- Lin Y-H, Ferguson BJ, Kereszt A, Gresshoff PM** (2010) Suppression of hypernodulation in soybean by a leaf-extracted, NARK- and Nod factor-dependent, low molecular mass fraction. *New Phytol* **185**: 1074–1086
- Menge DNL, Wolf AA, Funk JL** (2015) Diversity of nitrogen fixation strategies in Mediterranean legumes. *Nat Plants* **1**: 15064
- Ott T, Sullivan J, James EK, Flegmetakis E, Günther C, Gibon Y, Ronson C,**

- Udvardi M** (2009) Absence of symbiotic leghemoglobins alters bacteroid and plant cell differentiation during development of *Lotus japonicus* root nodules. *Mol Plant Microbe Interact* **22**: 800–808
- Pan H, Wang D** (2017) Nodule cysteine-rich peptides maintain a working balance during nitrogen-fixing symbiosis. *Nat Plants* **3**: 1–6
- Pellizzaro A, Alibert B, Planchet E, Limami AM, Morère-Le Paven M-C** (2017) Nitrate transporters: an overview in legumes. *Planta* **246**: 585–595
- Pellizzaro A, Clochard T, Planchet E, Limami AM, Paven M-CM** (2015) Identification and molecular characterization of *Medicago truncatula* NRT2 and NAR2 families. *Physiol Plant* **154**: 256–269
- Preisig O, Zufferey R, Thöny-Meyer L, Appleby CA, Hennecke H** (1996) A high-affinity cbb3-type cytochrome oxidase terminates the symbiosis-specific respiratory chain of *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* **178**: 1532–1538
- Schulze J** (2004) How are nitrogen fixation rates regulated in legumes? *J Plant Nutr Soil Sci* **167**: 125–137
- Schulze J, Liese R, Ballesteros G, Casieri L, Salinas G, Cabeza RA** (2020) Ammonium acts systemically while nitrate exerts an additional local effect on *Medicago truncatula* nodules. *Plant Sci* **292**: 110383
- Silveira JAG, Matos JCS, Cecatto VM, Viegas RA, Oliveira JTA** (2001) Nitrate reductase activity, distribution, and response to nitrate in two contrasting *Phaseolus* species inoculated with *Rhizobium* spp. *Environ Exp Bot* **46**: 37–46
- Suliman S, Tran L-SP** (2013) Asparagine: an amide of particular distinction in the regulation of symbiotic nitrogen fixation of legumes. *Crit Rev Biotechnol* **33**: 309–327
- Thimm O, Bläsing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Krüger P, Selbig J, Müller LA, Rhee SY, Stitt M** (2004) MapMan: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J* **37**: 914–939
- Van de Velde W, Zehirov G, Szatmari A, Debreczeny M, Ishihara H, Kevei Z, Farkas A, Mikulass K, Nagy A, Tiricz H, et al** (2010) Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. *Science* **327**: 1122–1126
- Vessey JK, Waterer J** (1992) In search of the mechanism of nitrate inhibition of nitrogenase activity in legume nodules: recent developments. *Physiol Plant* **84**: 171–176
- Yan Z, Hossain MS, Arikiti S, Valdés-López O, Zhai J, Wang J, Libault M, Ji T, Qiu L, Meyers BC, et al** (2015) Identification of microRNAs and their mRNA targets during soybean nodule development: functional analysis of the role of miR393j-3p in soybean nodulation. *New Phytol* **207**: 748–759