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

**VICTORIA OSSES ANTÚNEZ
MAGÍSTER EN HORTOFRUTICULTURA**

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 (N₂). Las plantas son las encargadas de regular la fijación del N₂, 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 N₂ 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 N₂, reprimiendo la actividad en los nódulos. Varios trabajos indican que la inhibición de la fijación de N₂ 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 N₂. 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 (KNO₃), 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 N₂. 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 (N₂) in symbiosis with Rhizobium bacteria in a specialized organ called nodule, which is developed in the roots. Plants regulate the N₂ fixation process by two main processes: 1) controlling the number of nodules, and; 2) reducing the nodule activity, i.e. the amount of N₂ 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 N₂ fixation by repressing the nodule activity. Several works indicate that the inhibition of N₂ 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 expresión 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 N₂ 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 (KNO₃). 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 N₂ 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.