

Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales
Carrera de Ciencias Biológicas



Participación del Óxido Nítrico y Nitrato Reductasa en la
inhibición por nitrato de la interacción leguminosa-rizobio

Tesina de Grado

Director: Hernán Ramiro Lascano

Firma: _____

Codirector: Claudio Alejandro González

Firma: _____

Tesinista: Palacios, Dahyana Ayelen

Firma: _____

Cátedra de Fisiología vegetal

-2017-

“Participación del Óxido Nítrico y Nitrato Reductasa en la inhibición por nitrato de la interacción leguminosa-rizobio”

Tribunal Examinador:

Nombre y Apellido:

Firma:

Nombre y Apellido:

Firma:

Nombre y Apellido:

Firma:

Calificación:

Fecha:

“Participación del óxido nítrico y nitrato reductasa en la inhibición por nitrato de la interacción leguminosa-rizobio”

Palabras claves: *nitrato reductasa- óxido nítrico- interacción simbiótica- nodulación-soja*

Resumen

El nitrógeno en las plantas es de vital importancia, siendo el principal macronutriente que más condiciona el crecimiento y desarrollo de las mismas. Las principales fuentes de nitrógeno para las plantas son nitratos, nitrito y amonio. Las formas oxidadas como nitrato y nitrito deben ser reducidas a amonio para poder ser asimiladas en cadenas carbonadas formando aminoácidos y nucleótidos. En dicha reducción participan las enzimas Nitrato Reductasa (NR) y Nitrito Reductasa (NiR). A pesar de que la atmósfera posee un 79% de nitrógeno, el mismo no está disponible de manera directa para las plantas. La Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN), mediado por el complejo Nitrogenasa, el cual solamente es codificado en organismos procariotas, permite la reducción y asimilación del nitrógeno atmosférico. Este proceso ocurre tanto en bacterias de vida libre como en bacterias que establecen simbiosis con plantas. La interacción entre leguminosas y bacterias fijadoras de nitrógeno se generó hace unos 40 millones de años y significó una importante ventaja evolutiva para esta familia de plantas, las cuales tienen altos requerimientos de nitrógeno debido que las proteínas son una forma principal de reservas seminales. La interacción simbiótica leguminosa rizobio conlleva la formación de un nuevo órgano: el nódulo, donde tiene lugar la FBN dado que este nuevo órgano brinda las condiciones micro anaeróbicas óptimas para la actividad Nitrogenasa. La interacción leguminosa- rizobios es un proceso finamente regulado y mediado por un diálogo molecular entre planta y bacteria, sumamente sensible y dependiente de las condiciones ambientales en la que se encuentran tanto hospedante como huésped. Una de estas condiciones es la disponibilidad de nitrógeno en el suelo, que cuando es limitante favorece y cuando es óptima o excesiva inhibe la interacción simbiótica. Otra condición es la

presencia o ausencia de oxígeno. Se sabe que el O₂ es necesario para la actividad respiratoria de los bacteroides y que en ambientes denominados anóxicos, carentes de oxígeno y con disponibilidad de nitrito y nitrato como aceptores de electrones, suele producirse la desnitrificación, proceso por el cual el nitrato y el nitrito reemplazan al oxígeno en la cadena de transporte de electrones. Este proceso integra cuatro etapas de reducción secuenciales, catalizados por diversas enzimas, entre ellas la nitrito reductasas y nitrato reductasa.

El óxido nítrico (ON) es una molécula señal involucrada en numerosos procesos fisiológicos, los que a nivel de raíz incluyen: formación de raíces laterales, elongación de pelos radicales, respuesta gravitrópicas, y también en las diferentes etapas de la interacción simbiótica leguminosa rizobio. A diferencia de animales, las plantas no presentan gen de la óxido nítrico sintasa. Existen numerosas evidencias que indican que una de las fuentes principales de ON en plantas estaría relacionado con la actividad Nitrato Reductasa.

Con este marco conceptual y dado que no existe información sobre la participación del ON generado por actividad NR, como mediador en la inhibición de nodulación mediada por nitratos, se planteó la siguiente hipótesis: *La inhibición de la nodulación en soja por nitratos se debe, al menos en parte, a la producción de óxido nítrico mediado por la actividad nitrato reductasa.* Para contrastar esta hipótesis el Objetivo del trabajo fue estudiar la participación del óxido nítrico y nitrato reductasa en la inhibición de la interacción simbiótica leguminosa-rizobio mediada por nitrato.

Bajo este marco de estudio se evidenció que la presencia de nitrato e hipoxia aumentó los niveles de proteína Nitrato Reductasa y su actividad, además indujo la generación de ON en las raíces mantenidas en condiciones no inhibitorias de la nodulación. Al mismo tiempo que se demostró que el ON actuaría como una molécula inhibidora de la interacción simbiótica con *B. japonicum* en raíces de soja.

Introducción

La humanidad se enfrenta hoy en día a importantes desafíos relacionados con el incremento de la población mundial, sin precedente. Este hecho pone en tensión la producción de alimentos; formas de energías y viviendas, entre otros. La necesidad de un desarrollo socio-económico armónico que garantice a millones de personas sus necesidades sin continuar agravando el fuerte deterioro del ambiente, es un gran desafío. Esta tensión económico-ambiental tuvo sus comienzos pasada la segunda guerra mundial, con la llamada “Revolución Verde”; en donde se planteó la necesidad de producir mayores cantidades de alimentos para abastecer a la población mundial, en crecimiento. Esta revolución convirtió a la agricultura en dependiente de una gran variedad de insumos químicos (fertilizantes y plaguicidas). Pero, el tiempo ha demostrado que la relación entre costos y beneficios de este modo de producción que promovió la revolución verde no es ni eficiente ni ecológicamente sustentable (Martinez et al. 2002) Esto condujo a cuestionamientos de esta forma de producción y a promover innovaciones científico-tecnológicas en el área de la agricultura tendientes a generar sistemas productivos sustentables.

La fertilización con nitrógeno inorgánico fue uno de los pilares, de la Revolución Verde, que permitió incrementar la producción de alimentos. Una característica distintiva de un sistema natural respecto de un sistema productivo intensivo o extensivo, como por ejemplo el cultivo de soja, radica en que, para alcanzar rendimientos, los requerimientos de nitrógeno asimilable exceden al contenido natural del suelo. Por lo tanto, esta práctica, si bien dio resultados inmediatos y notables desde el punto de vista productivo, desde una perspectiva ambiental puede resultar perjudicial bajo determinadas situaciones ya que aumenta la concentración de nitratos en los suelos y en las cuencas hídricas, Por otro lado, la fertilización nitrogenada es altamente costosa energéticamente, ya que la reducción industrial de N_2 gaseoso, hacia formas asimilables requiere de alta temperatura y presión.

Un elemento esencial de la sostenibilidad agrícola implica, manejo adecuado de N_2 en el suelo, evitando fertilizaciones de excesiva o de lujo y mejora genética de

la eficiencia en el uso del N. Otra forma de racionalizar la nutrición nitrogenada en suelos y plantas, es utilizar la capacidad de fijar biológicamente el nitrógeno atmosférico que poseen ciertas rizobacterias. Las más importantes son las del género *Rizobium* que realizan simbiosis con leguminosas, como por ejemplo soja, y llegan a fijar hasta 300kg N/ha (Schvarzer & Tavosnanska 2007). Estas interacciones simbióticas constituyen un punto principal de entrada al ciclo del nitrógeno, de gran importancia dentro del contexto económico de la agricultura mundial, y en funcionamiento de muchos ecosistemas naturales (Abbott y Murphy 2003)

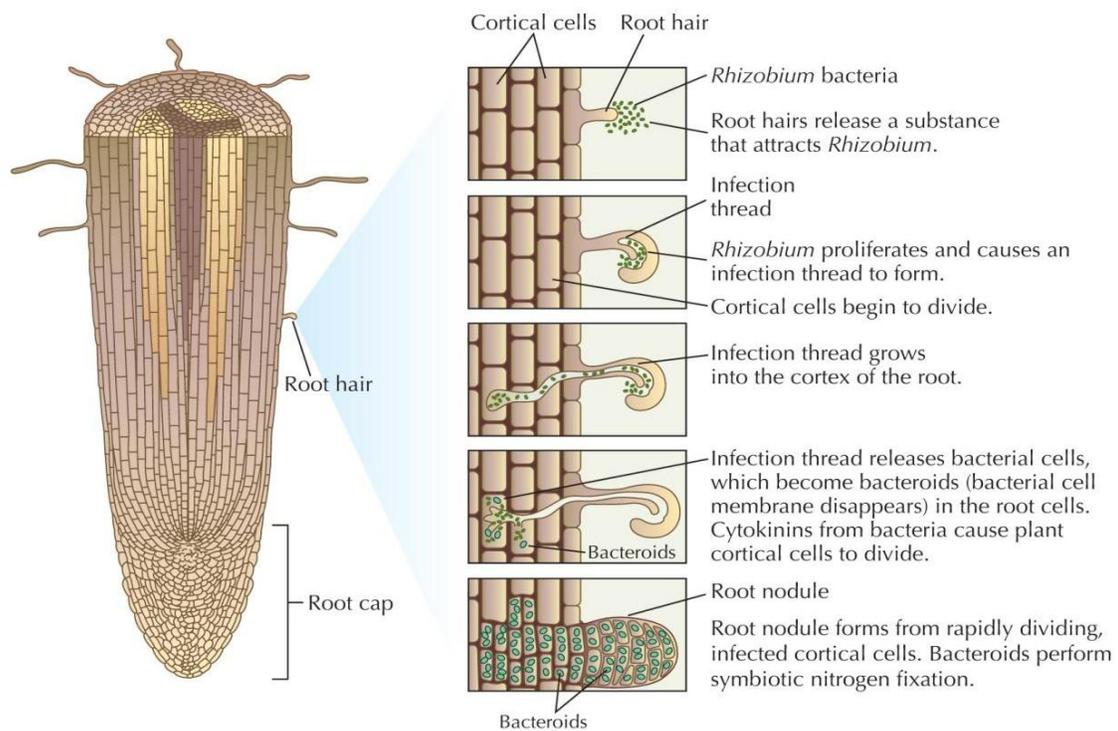
Cabe destacar que, en los últimos 20 años la soja se ha convertido en el mayor protagonista de la economía Argentina. Diversos factores han intervenido para que la soja se incorpore en nuestros campos y se posicione como el mayor producto agropecuario de exportación. La soja es una especie de la familia de las leguminosas, Fabaceae. Su mayor particularidad radica en que los granos de esta leguminosa presentan altos contenidos de proteínas y aceite, por ello también pertenece al grupo de las oleaginosas. Esta acumulación de proteínas en la semilla, convierte a esta leguminosa atractiva para su utilización en la alimentación tanto humana como animal. Pero ese alto contenido de proteínas viene acompañado de una gran demanda de nitrógeno (N). Es por ello que el N es el nutriente más crítico para el cultivo, pudiendo estimarse que se requieren 80 kg de N para producir un tonelada de soja (González, 2007).

Teniendo en cuenta el alto requerimiento de este nutriente (N) por parte de esta leguminosa y su protagonismo en la economía Argentina, resulta esencial poder aplicar técnicas de asimilación de nitrógeno ecológicas como la fijación biológica del nitrógeno, FBN.

Este proceso, es un componente de gran importancia ya que, el 78% de la composición de la atmósfera es N_2 , siendo un gran reservorio del mismo. El N_2 en la atmósfera es muy estable, su triple enlace covalente hace que la mayoría de los seres vivos no lo puedan utilizar directamente, solo este pequeño grupo de microorganismos (de vida libre o simbiosis), muy especializados y denominados diazotrofos, pueden reducir el N_2 a amonio (NH_4^+) (esta última es la forma

asimilable por las plantas) ya que poseen el complejo enzimático nitrogenasa que cataliza la reacción de reducción de N_2 a NH_4^+ utilizando poder reductor, ferredoxina y energía metabólica (ATP) (Becana y Bedmar, 1991).

La interacción simbiótica, leguminosa rizobio, da origen a la formación de un órgano nuevo en las raíces de la leguminosa, el nódulo, en el cual ocurre la fijación del N_2 (Becana y Bedmar, 1991). Esta asociación, entre rizobio y leguminosa, es específica y depende de las interacciones moleculares que ocurren en las etapas iniciales de la formación de los nódulos (Debellé, et al., 2001). El primer paso es un reconocimiento específico entre rizobio y la leguminosa con adhesión del rizobio al pelo radical. En el reconocimiento actúan principalmente, flavonoides (flavonas, flavononas e isoflavonas) exudadas por las raíces de las leguminosas, que son sintetizados como parte del metabolismo secundario, a partir de la ruta de los fenilpropanoides. Estos flavonoides, y principalmente Genisteína, promueven en los rizobios, a través de la inducción de genes de nodulación (genes Nod ABC), la síntesis de factores de nodulación (Factores Nod), moléculas complejas de lipoquitinolisacáridos (LQO), compuestos por monómeros N-acetilglucosamina (Jones et al.; 2007). La interacción de los factores NOD con receptores específicos a nivel de la membrana plasmática, induce vías de señalización a nivel epidérmico y con ello la despolarización de membranas celulares (Felle et al., 1995), cambio en el flujo de iones, oscilaciones en la concentración de calcio y curvatura de pelos radicales, y a nivel cortical el reingreso al ciclo mitótico de las células subcorticales de la raíz que van a dar origen al primordio del nódulo (Cárdenas et al., 2000), entre otros efectos tempranos. La siguiente etapa es la formación del cordón de infección, una estructura de crecimiento polar generada por la planta que se inicia por acción de las células sobre las paredes celulares e inicio de la síntesis. El cordón de infección penetra hasta las células corticales y los rizobios son liberados dentro de ellas por endocitosis quedando envueltos en la membrana peribacteroidal de origen vegetal, dando origen a los simbiosomas que son vesículas membranosas donde ocurre la diferenciación de las bacterias en bacterioides que adquieren la capacidad bioquímica para reducir N_2 a NH_4^+ (figura n° 1) (Madigan, et al., 2006).



Evolution © 2007 Cold Spring Harbor Laboratory Press

Figura n° 1: proceso de infección de pelos radicales en raíces de leguminosas. Extraída de “Evolución 2007”.

Esta reacción es llevada a cabo por un complejo proteico llamado nitrogenasa formado por dos metaloproteínas: la ferroproteína y la molibdoferroproteína. Esta última produce la catálisis de la reacción primordial de la fijación del nitrógeno, es decir, la transformación en amoníaco del nitrógeno presente en la atmósfera, según la siguiente reacción:



El complejo enzimático nitrogenasa se inactiva irreversiblemente en presencia de oxígeno, por lo tanto, la presencia de oxígeno en el nódulo radicular restringe la fijación de nitrógeno. Sin embargo, el O₂ es necesario para la actividad respiratoria de los bacteroides (heterótrofos). Este compromiso se resolvió durante la

evolución con diversas estrategias (barreras físicas, químicas o bioquímicas). Dentro de las últimas, encontramos la leghemoglobina que regula la tensión de oxígeno en el nódulo radicular. Para mantener una concentración baja constante de oxígeno, la leghemoglobina realiza un ciclo desde la forma oxidada Fe⁺³ a la forma reducida Fe⁺², funcionando como un “tapón de oxígeno” (Madigan, et al., 2006). De esta forma permite que la nitrogenasa desarrolle su actividad eficientemente, para lo cual requiere gasto de ATP y es inhibida por ADP.

Sumado a lo anterior, sabemos que, durante todo el desarrollo del proceso de nodulación, desde la detección mutua planta-simbionte en la rizosfera, hasta el desarrollo del nódulo maduro y funcional, las especies activas del oxígeno (EAO) juegan papeles claves (Santos, et al. 2001). Las EAO, son formas parcialmente reducidas o activas del oxígeno. La configuración electrónica del mismo (dos electrones desapareados en el último orbital) lo hacen altamente sensible a la reducción mono electrónica, dando lugar a la formación de EAO.

Durante muchos años y producto de la alta capacidad de generar daño a diferentes moléculas celulares las EAO fueron estudiadas como producto indeseable del metabolismo celular. Pero la fina regulación entre generación de EAO y su remoción, que es fundamental en el mantenimiento de la homeostasis y funcionamiento celular, ha llevado a proponer a estas moléculas como reales encargadas de regular vías de señalización (Lascano et al, 2003).

Existe una gran cantidad de fuentes potenciales de EAO en plantas, producto del metabolismo normal como por ejemplo fotosíntesis y respiración. Pero al mismo tiempo existen otras fuentes de generación, que toman relevancia en diversas condiciones, como por ejemplo el complejo NADPH oxidasa de membrana plasmática (Vandenabeele et al, 2003). La producción de EAO, producto de la actividad del complejo NADPH oxidasa participan en eventos de señalización y desarrollo en plantas que incluye, respuestas de defensa, muerte celular, estrés abiótico, cierre de estomas, crecimiento polar de los pelos radicales y la percepción de rizobios por las leguminosas (Foreman et al, 2003). Podemos destacar que, análisis realizados en *Arabidopsis thaliana*, indican que la enzima de membrana plasmática NADPH oxidasa es requerida para la producción localizada

y oscilatoria de EAO durante la elongación del pelo radical, sugiriendo que estas estarían involucradas en la rigidización de la pared celular (Swanson y Giroy 2010). Algunos otros autores, proponen también, que la producción de EAO por NADPH oxidasa es requerida para el establecimiento de un gradiente de calcio focalizado en el extremo del pelo radical (Foreman, et al. 2003). Cardenas et al, 2008, trabajando bajo una cinética de producción intracelular de EAO en pelos radicales, vio que ocurre un incremento rápido y transiente luego de aplicar factores nod, y posterior a este incremento una caída en el contenido intracelular de EAO, sugiriendo entonces que esta caída de la generación de EAO participa en la deformación de pelos radicales. Entonces, podemos decir, los pelos radicales presentan un crecimiento polar donde la generación de especies activas del oxígeno, producto de la actividad del complejo NADPH oxidasa y los gradientes de calcio juegan un rol clave en el crecimiento polar.

Retomando, el proceso de asimilación del nitrógeno en las leguminosas, es de vital importancia. En la naturaleza existen dos fuentes de nitrógeno inorgánico para estas leguminosas, el nitrógeno mineral (NO_3^- y NH_4^+) y el nitrógeno atmosférico (N_2). El NH_4^+ puede ser absorbido directamente por las raíces de las plantas y así ser asimilado en esqueletos carbonados. El NO_3^- es la principal forma de nitrógeno mineral disponible para las plantas y regula el crecimiento y desarrollo de las mismas (Parsons y Sunley, 2001). El nitrato puede ser utilizado directamente, según entra en la célula, o acumularse en vacuolas, debido a que en determinadas concentraciones es tóxico. Una vez en la planta, el nitrato debe reducirse hasta amonio mediante una reacción en la cual no hay actividad nitrogenasa. Esta reducción se lleva a cabo en dos pasos, el NO_3^- primero debe ser reducido a nitrito (NO_2^-) y luego a amonio (NH_4^+). Existen dos enzimas responsables de ello; la Nitrato Reductasa (NR), que cataliza un primer paso, y la Nitrito Reductasa (NiR) en un segundo paso como se muestra a continuación:



Tanto el NO_2^- y NH_4^+ , son tóxicos para la planta por ello es de suma importancia la coordinación de la actividad catalítica de dichas enzimas (Pearsons y Sunley,

2001).

La NR es una enzima citosólica clave en la ruta de asimilación y reducción del NO_3^- , ya que es la que finalmente controla la provisión de NH_4^+ para la asimilación (Parsons y Sunley, 2001). Su estructura molecular es un homodímero, donde cada monómero cuenta con tres dominios de unión a grupos prostéticos, que tienen función en la transferencia electrónica, FAD (flavin adenina dinucleótido), Hemo y MoCo (Pterina complejo de molibdeno) (Campbell, 1999). Podemos dividir al ciclo catalítico de la NR en tres partes, la oxidación del NAD(P)H, la transferencia electrónica al dominio FAD vía citocromo b5, y la reducción del NO_3^- a nivel de MoCo (Fischer, et al., 2005).

La actividad NR está regulada a nivel transcripcional, traduccional y postraduccional, principalmente por la disponibilidad de nitrato, carbohidratos y luz. El nitrato induce una rápida acumulación de ARNm, seguida por un aumento gradual de la actividad, (Campbell, 1999). A nivel post-traduccional, la actividad de NR tiene dos tipos de regulación, una vía rápida por fosforilación y posterior unión a proteína del tipo 14-3-3 y una vía más lenta mediada por proteasas (Fischer, et al., 2005)

En las plantas la NR tiene varias isoformas, que difieren entre sí por tener diferente afinidad por NADH o NADPH. En la subfamilia Papilionidae de las Leguminosas, se encuentran dos isoformas de NR, una inducible (NRi) por nitrato, que utiliza NADH como dador de electrones y otras dos isoformas constitutivas (NRc) de la misma enzima. Estas últimas se encuentran en las raíces de plantas de toda la subfamilia y también se diferencian entre sí porque NRc1 utiliza NADPH mientras que NRc2 utiliza NADH como dador de electrones (Dean V.J., 1988).

Por otro lado, se sabe que, la NR bajo condiciones tales como, alta disponibilidad de poder reductor o hipoxia, puede tener una actividad adicional que produce óxido nítrico (ON) (Lombardo, et al. 2006). El óxido nítrico es una molécula gaseosa cuya presencia ha sido detectada tanto en animales como en plantas. Las características químicas y físicas del ON le confieren la propiedad de atravesar fácilmente las membranas biológicas y en consecuencia difundir intracelularmente (Meilhoc et al. 2011).

Si bien se conoce su rol como señalizador intercelular, y que podría regular genes involucrados en el desarrollo del nódulo, se ha señalado su toxicidad debido a las reacciones con grupos tioles y centros de metales de transición de proteínas (Lombardo, et al. 2006). Tanto su toxicidad o su efecto señal dependen de su concentración en el lugar de acción (Damiani et al, 2016).

Como ya se mencionó, una de las fuentes de producción ON es la actividad NR reductora de plantas por la transferencia de un electrón desde el NAD(P)H, hacia el NO_2^- . Esta actividad NR, localizada en el citosol, luego de catalizar la reducción de NO_3^- a NO_2^- , puede generar ON a partir de éste (Yamasaki, 2000) sin embargo esta reacción requiere baja tensión de O_2 , y altas concentraciones de NO_3^- (Lombardo, et al. 2006).

Con lo mencionado anteriormente, podemos destacar que en las plantas existen tres rutas principales de generación de ON. Una, de naturaleza no enzimática, que ocurre a nivel de apoplasto (Arasimowicz et al. 2007) y otras dos vías (biosintéticas) que comprenden, una actividad enzimática tipo NOS (óxido nítrico sintasa, presente en animales) que cataliza la oxidación de la L-arginina en NO y L-citrulina, y la ya mencionada NR (Meilhoc et al. 2011).

Se conoce que el ON es un componente esencial en cascadas de señales implicadas en: - la inducción de raíces adventicias y raíces laterales inducida por auxinas, -la nutrición mineral, -el establecimiento de simbiosis, -la regulación del crecimiento y desarrollo y – las respuestas tempranas a diversos tipos de estrés abiótico (Correa-Aragunde et al. 2004). Las primeras evidencias de emisiones gaseosas de ON fueron reportadas en soja, donde también se demostró la dependencia de esta emisión con la actividad NR. En otras especies como *Chlamydomonas*, *Arabidopsis* y tabaco, también se demostró la generación de ON dependiente de NR (Arasimowicz, 2007).

La producción de NO también se informó durante las interacciones simbióticas, particularmente en la simbiosis fijadora de nitrógeno entre leguminosas y rizobio. Se ha establecido que tanto las plantas como los rizobios son capaces de producir NO en nódulos simbióticos. Y se ha observado la producción de NO muy temprano cuando se inoculan con simbionte, lo que sugiere que la producción de

NO podría estar implicada en el reconocimiento específico de la planta- bacteria. Por otro lado, condiciones hipóxicas han demostrado aumentar significativamente la producción de NO en soja. De todos modos, parece que la concentración de NO debe ser estrictamente regulada para lograr plenamente su señalización o funciones metabólicas en el nódulo y, al mismo tiempo a un nivel suficientemente bajo para evitar una inhibición de la Nitrogenasa en el bacteroide y por consiguiente la nodulación (Meilhoc et al, 2011).

Como se mencionó más arriba, el nitrato por un lado es necesario para la expresión y activación de la NR y por otro lado en concentraciones mayores a 2,5 mM inhibitorio del proceso de nodulación. Así mismo, si bien existen reportes sobre la participación del ON en diferentes eventos de interacción simbiótica leguminosa-rizobios (Romero Puertas & Delledone, 2003; Chandok et al., 2004, Meilhoc et al. 2011), su participación en la inhibición de la nodulación por nitratos, no ha sido estudiada.

Para finalizar, podemos resaltar la importancia del estudio de las prácticas culturales agropecuarias por un lado, mientras que por otro resulta de suma importancia el estudio del proceso de reducción y asimilación de NO_3^- , la regulación de la actividad Nitrato Reductasa y de la FBN.

En base a lo dicho anteriormente, las **hipótesis** bajo las cuales se trabajó son:

- La inhibición de la nodulación en soja en presencia de nitratos se debe, al menos en parte, a la producción de óxido nítrico mediado por la actividad nitrato reductasa.
- Las plantas con raíces transgénicas con expresión de la Óxido Nítrico Sintasa tendrán inhibida la nodulación en ausencia de nitratos o bajas concentraciones de nitrato que permiten la nodulación.

Los objetivos planteados son:

Objetivo general:

- Estudiar la participación del Óxido Nítrico y Nitrato Reductasa en la inhibición de la interacción simbiótica leguminosa-rizobio mediada por nitrato.

Objetivo específico:

- Estudiar el comportamiento de la enzima Nitrato Reductasa bajo condiciones de nitrato permisiva e inhibitorias de la nodulación.
- Evaluar la relación existente entre la actividad Nitrato Reductasa y la producción de Óxido Nítrico.
- Evaluar los efectos de la expresión de óxido nítrico sintasa del alga *Ostrococcus tauri* en raíces transgénicas de soja sobre la producción de Óxido Nítrico y diferentes eventos de la interacción simbiótica soja-*Bradyrhizobium japonicum*, bajo condiciones permisiva e inhibitorias de nitrato.

Materiales y métodos

A) Análisis in silico de la enzima Nitrato Reductasa

La búsqueda de genes que codifican para Nitrato Reductasa en *G. Max* se realizó en la base de datos Phytozome utilizando como motor de búsqueda la secuencia Nitrato Reductasa de *A. thaliana* (At1g37130).

Para un análisis detallado de la enzima *nitrato reductasa* se trabajó con los siguientes software: *Phytozome*, *Soybean*, *pfam*, *eFP Browser* y *uniprot*. Con los mismos se realizaron, análisis de homologías, modelos de los dominios, niveles de expresión bajo condiciones tales como nitrato e inoculación, entre otros.

B) Germinación y preparación del material biológico

Se trabajó con radículas de semillas de soja nativa (*Glycine max*. L cv Bragg) de tres días de post germinación. Las semillas fueron esterilizadas con hipoclorito de sodio al 5% durante diez minutos y luego se lavaron sucesivamente con agua destilada. La germinación se realizó en cámara húmeda, bandejas de plástico con tapa, con un manto de algodón y papel secante humedecido con agua destilada; bajo oscuridad y a 28°C durante 72 h (Muñoz et al. 2012).

El cultivo bacteriano, cepa *Bradyrhizobium japonicum* E-109, se realizó en medio líquido LMA con agitación constante a 28°C durante 5 días. Luego fue centrifugado a 9500 rpm durante 20 minutos, el pellet generado se re suspendió en agua estéril hasta una DO =0,6. La inoculación se efectuó del siguiente modo: 1 ml del re suspendido cada 50 ml de solución para los tratamientos de 4h de KNO₃, y 2 ml del re suspendido por planta en el medio hidropónico (Muñoz,et. al, 2011).

C) Trabajos con genotipo WT

Actividad Nitrato Reductasa

Tratamiento: Las raíces del genotipo salvaje obtenidas de la germinación mencionada anteriormente, fueron sometidas a tratamientos. Los mismos consistieron de combinaciones de inoculación/ no inoculación, de *Brdyrhizobuim japonicum* y diversas concentraciones de nitrato (0- 1,25- 5 mM) en presencia o

ausencia (hipoxia) de oxígeno. Los tratamientos fueron aplicados durante un periodo de tiempo de 4 horas y los que contenían el inóculo, contaban de 1 ml de una suspensión (DO=0,6) de bacterias *Bradyrhizobium japonicum* E-109.

Para determinar la actividad *Nitrato Reductasa*, se realizó un homogeneizado, en mortero y con nitrógeno líquido, de aprox 400 mg de las raíces tratadas. Se le agregó 1 ml de medio de extracción que consistió en Buffer Hepes (50 mM), pH: 7,5 EDTA (1 mM), cisteína (1 mM) e inhibidores de proteasas: E-64 (1 mM) y Quimostatina (1 mM).

El homogeneizado fue centrifugado a 12.000 rpm, a 4°C durante 15 minutos y el sobrenadante obtenido fue utilizado para la determinación de la actividad *Nitrato Reductasa*. La misma se realizó en tiempo real, por consumo de NADPH (7 mg/ml) estimando la caída de la absorbancia a 340 nm durante 90 segundos y efectuando lecturas cada 10 segundos (Weiner H. and W. Kaiser., 1999).

Se calcularon los valores para la actividad NR teniendo en cuenta los mg de peso fresco de las raíces y los niveles de proteínas de las muestras según el método Bradford.

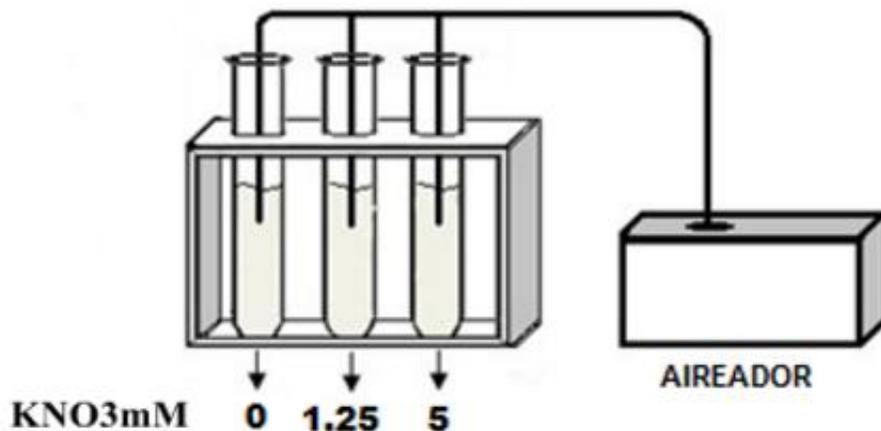


Figura n°2: Esquema del sistema de aireación y tratamiento de las diferentes concentraciones de nitrato de potasio. En hipoxia se repite el mismo sistema solo que sin aireación.

Análisis inmunoquímico para determinar los niveles de proteínas específicas

Para cuantificar el nivel de proteínas específicas de *Nitrato Reductasa*, (NR), en la muestra se realizó un análisis inmunoquímico de WESTERN-Blot. Esta técnica combina la separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida y la identificación de las mismas con anticuerpos específicos. Para ello se trabajó con un homogeneizado similar al realizado para medir actividad *Nitrato Reductasa*. Del centrifugado se tomó una alícuota del sobrenadante obtenido. De ella se sembró una fracción que contenía 30 µg de proteínas por muestra, en el gel de poliacrilamida al 12% y se lo corrió a 100V constante utilizando como marcador de peso molecular Multicolor Broad Range #SM 1841 Fermentas. Luego de la electroforesis, las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa y se incubaron con anticuerpos específicos o primarios anti-NR de maíz, anticuerpos secundarios (IgG de cabra, anti-IgG de conejo, Sigma Co) y sustrato de fosfatasa alcalina (NBT y BCIP), enzima acomplejada al anticuerpo secundario cuya actividad desarrolla color.

Mediante el método de Bradford se determinaron los niveles de proteínas totales de cada muestra (Laemmli, 1970).

Cuantificación de niveles de Óxido Nítrico

Para la cuantificación de los niveles de *Óxido Nítrico* se trabajó con una Sonda DAF-FM (4-amino-5-methylamino-2,7-difluorescein). Las raíces de plántulas salvajes germinadas bajo las condiciones descritas anteriormente, fueron incubadas con diferente concentración de KNO₃, 0- 1,25 y 5 mM, con aireación o hipoxia (mismos tratamientos que los aplicados para la medición de actividad NR). Se inoculó con *Bradyrhizobium japonicum* E109, que es la cepa recomendada por Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), para la inoculación de soja en Argentina (Torres, 2015). Las raíces se incubaron con las bacterias durante 4 h en las diferentes concentraciones y condiciones ya mencionadas y luego con DAF-FM (7µM), 1 h en oscuridad a 25 °C (Mur, 2011). Posterior a ello fueron lavadas con agua destilada. Estas raíces se colocaron en una cápsula de Petri de plástico

perforada y sellada con un cubre objeto por detrás. Este sistema permitió contener a las raíces y que las mismas queden cubiertas por una película de agua, evitando de este modo la deshidratación. Encima de esta película se colocó un papel celofán transparente humedecido y se procedió a observar en un microscopio confocal invertido NIKON ECLIPSE Ti, utilizando el modo epifluorescencia, provisto por el INTA (longitud de onda de excitación/emisión de la sonda DAF: 495/515 nm) Se tomaron fotografías para el posterior análisis semicuantitativo de las mismas mediante el software ImageJ.

D) Raíces transgénicas en cabelleras - sobreexpresión de Óxido Nítrico Sintasa

Para la obtención de las raíces en cabellera transgénicas de soja con sobreexpresión de Óxido Nítrico Sintasa se utilizó *Agrobacterium Rhizogenes K599*.

La construcción para la sobreexpresión de ONs de *Ostrococcus tauri* fue gentilmente donada por el Dr. Lorenzo Lamatinna (Univ. Nac. Mar del Plata) (figura n°3). La misma se encontraba en *E.coli*, por lo tanto, en primera instancia, se realizó la purificación del plásmido. Este protocolo se utiliza para extraer ADN plasmídico a partir de un cultivo bacteriano líquido y se basa en el procedimiento de lisis alcalina. Los plásmidos son moléculas de ADN relativamente pequeñas y superenrollados, y el ADN cromosómico bacteriano es mucho más grande y menos superenrollado. Esta diferencia en la topología permite una precipitación selectiva del ADN cromosómico y de proteínas por un lado, y de los plásmidos y ARN por el otro. Las células son lisadas bajo condiciones alcalinas, lo que a su vez desnatura ácidos nucleicos y proteínas. Cuando la solución es neutralizada por el agregado de acetato de potasio, el ADN cromosómico y las proteínas precipitan debido a que es imposible que se neutralicen correctamente por su gran tamaño. Los plásmidos se renaturalizan correctamente y permanecen en solución separándolos efectivamente.

Con los plásmidos obtenidos, se transformó *Agrobacterium rhizogenes K599*. Para ello, se realizaron células competentes químicas de *Agrobacterium rhizogenes K599* de acuerdo al protocolo establecido (Sambrook. et.al, 1989), las

a partir del cual comienza la organogénesis de raíces en cabellera. Las plantas con raíces en cabellera crecieron durante 10-15 días en una cámara de crecimiento, con un periodo de luz/oscuridad de 16/8 y una temperatura de 27+-1°C. Pasado este periodo, el éxito de la transgénesis, solo del vector vacío, se evaluó por observación en lupa fluorescencia ya que poseía GPF, mientras que la construcción sobre expresamente no.

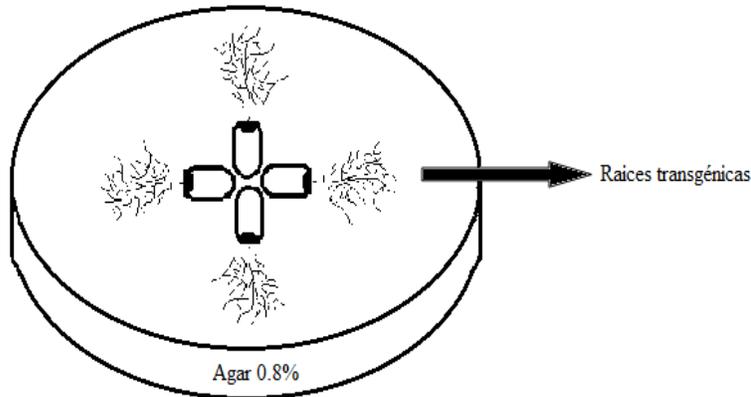


Figura n°4: Esquema del sistema para obtener las raíces en cabelleras. En el centro los cotiledones con las respectivas raíces transgénicas.

Con las raíces transgénicas (raíces en cabelleras) obtenidas anteriormente, se procedió al estudio de la nodulación: Eventos tempranos de la interacción leguminosa-rizobio; mediante el estudio de la deformación de pelos radicales (curling).

Como evidencia morfológica temprana de la interacción simbiótica entre soja con *B. japonicum* se cuantificó el porcentaje de deformación de pelos radicales en raíces transgénicas.

Para ello, se procedió a incubar durante 4 hs, con B.j E-109, las raíces transformadas. Antes de montar los cortes y proceder a observar al microscopio primero se sumergieron las raíces, por dos segundos, en una solución al 0,1% de azul de toluidina para dar contraste. Se realizaron 4 cortes finos a modo de peeling con bisturí por raíz tomando la zona susceptible a la infección hasta el extremo de la raíz. Los cortes fueron montados en un portaobjetos y observados en un microscopio de campo claro, modelo Olympus BX 61 proporcionado por IMBIV. Las

fotografías se obtuvieron con cámara Color DP 71 y el software de adquisición utilizado fue el DP Controlled asociado a la misma cámara. La cuantificación de pelos se realizó recorriendo y fotografiando cuidadosamente cada corte longitudinal de peeling de raíz.

Del mismo modo, también, se procedió a la obtención de raíces transgénicas en cabellera con el sistema como se muestra en la figura n°5. Este consta de dos tubos, uno de menor tamaño, inserto en el interior del otro de mayor tamaño. El tubo más pequeño contenía medio de crecimiento ByD (Broughton y Dilworth, 1971) y el tubo más grande agua destilada para mantener la humedad del sistema. Las bocas de los tubos fueron tapadas con papel aluminio y autoclavados para esterilizarlos. Posterior a ello se colocó una semilla de tres días de germinación encima del papel aluminio del tubo menor, que contenía el medio ByD, con la radícula en contacto con el medio de crecimiento y el tubo de mayor tamaño fue tapado con papel film. Las diferentes transgénicas y sus controles respectivos, se obtuvieron por inyecciones con jeringas de tuberculina por debajo del nudo cotiledonar, cargadas con *Agrobacterium rhizogenes* K599 transformadas con las diferentes construcciones. Esto se realizó en una cámara de flujo laminar, para mantener la esterilidad del sistema. Las plantas con raíces en cabellera crecieron durante 10-15 días en una cámara de crecimiento, con un periodo de luz/oscuridad de 16/8 y una temperatura de 27+- 1°C.

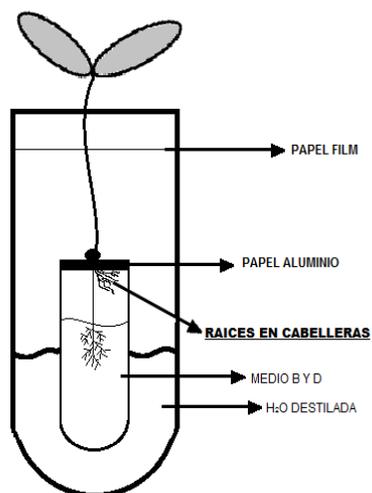


Figura n°5: Esquema del sistema de tubos para obtener las raíces en cabelleras.

Pasado este periodo, las plantas fueron transferidas a un cultivo hidropónico que consistió en macetas jardineras plásticas que contenían la solución hidropónica, medio descrito por Broughton y Dilwoth (1971). Las plántulas fueron colocadas en tapas acrílicas perforadas y opacas, para proteger la solución y las raíces de la luz, al mismo tiempo que contenían un sistema de aireación. El pH de la solución se mantuvo estable a 6.5, el fotoperiodo fue de 16/8h, la temperatura de 28 °C y al medio se le colocó una suspensión de E-109 (DO=0,6).

Pasado 20 días se comparó la formación de nódulos en las diversas raíces transgénicas en cabelleras con respecto al control.

E) Análisis estadístico

Los resultados obtenidos durante el desarrollo del presente trabajo fueron analizados mediante el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo et al, 2012) e ImageJ.

Resultados

Análisis in silico de la enzima Nitrato Reductasa

La enzima NR es un homodímero compuesto de 2 subunidades idénticas de 100 kDa aproximadamente, conteniendo cada subunidad tres grupos prostéticos: un equivalente de FAD (flavina adenina dinucleótido), hemo-Fe y un complejo de Molibdeno (Mo). El molibdeno está unido a la enzima por un complejo orgánico llamado pterina formando el Mo-molibdoterina (Mo-MPT). En consecuencia, la enzima contiene tres cofactores internos: FAD, hemo y MPT y dos iones metálicos: Fe y Mo en cada subunidad como se muestra a continuación.

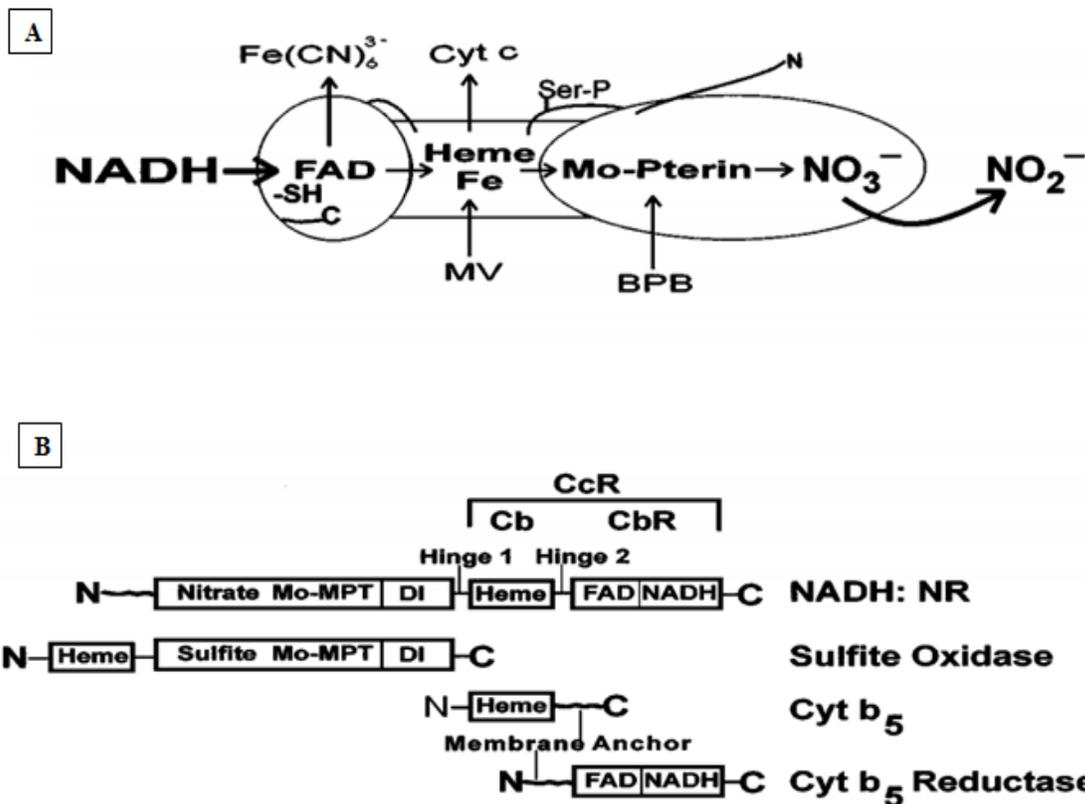


Figura n°6: Modelos de nitrato reductasa. (A) Modelo funcional de la enzima; (B) Modelo secuencial de la enzima NR y otras enzimas que poseen dominios común a NR. Extraído de: nitrate reductase structure, function and regulation: Bridging the Gap between Biochemistry and Physiology. Wilbur H. Campbell.

Para un análisis más detallado de la *Nitrato Reductasa*, y dado que el genoma de soja se encuentra totalmente secuenciado, se realizó una búsqueda de genes que codifican para la nitrato reductasa en *Glycine Max*, utilizando la base de datos *Phytozome* y como motor de búsqueda las secuencias de NR de *Arabidopsis thaliana* (AT1G37130, AT1G77760).

Como resultados se obtuvieron las siguientes cuatro secuencias que fueron seleccionadas en base al valor E (Expect values) y los dominios descriptos para las mismas:

NR1: Glyma.13G084000.1 (Glyma13g02510)

NR2: Glyma.06G109200.1 (Glyma06g11430)

NR3: Glyma.14G164900.1 (Glyma14g33480)

NR4: Glyma.14G165000.1 (Glyma14g33490)

De acuerdo a los datos de expresión obtenidos por RNAseq publicados en la base de datos SoyBase (<https://www.soybase.org/soyseq/#>) se pudo observar que solo tres de ellas (*NR1, NR2, NR4*) se expresan en raíces, siendo las dos primeras las de niveles más elevados y las únicas presentes en nódulos. Mientras que la *NR3* no se expresa en raíces pero sí en otros órganos de *G. max* como son hojas jóvenes, flores, vainas y semillas (figura n°7).

Download List	young_leaf	flower	one cm pod	pod shell 10DAF	pod shell 14DAF	seed 10DAF	seed 14DAF	seed 21DAF	seed 25DAF	seed 28DAF	seed 35DAF	seed 42DAF	root	nodule
Glyma06g11430	103	258	3	19	36	0	4	1	0	0	0	0	12173	2840
Glyma13g02510	9	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	4107	86
Glyma14g33480	26	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Glyma14g33490	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0

Figura n°7: Valores absolutos de la expresión génica por secuenciación de ARN-seq en los diferentes genes de G. max analizado (NR1, NR2, NR3, NR4).

Las proteínas codificadas por los cuatro genes NR descritos, exhiben los dominios característicos de enzimas nitrato reductasas, que a continuación se grafican detalladamente.

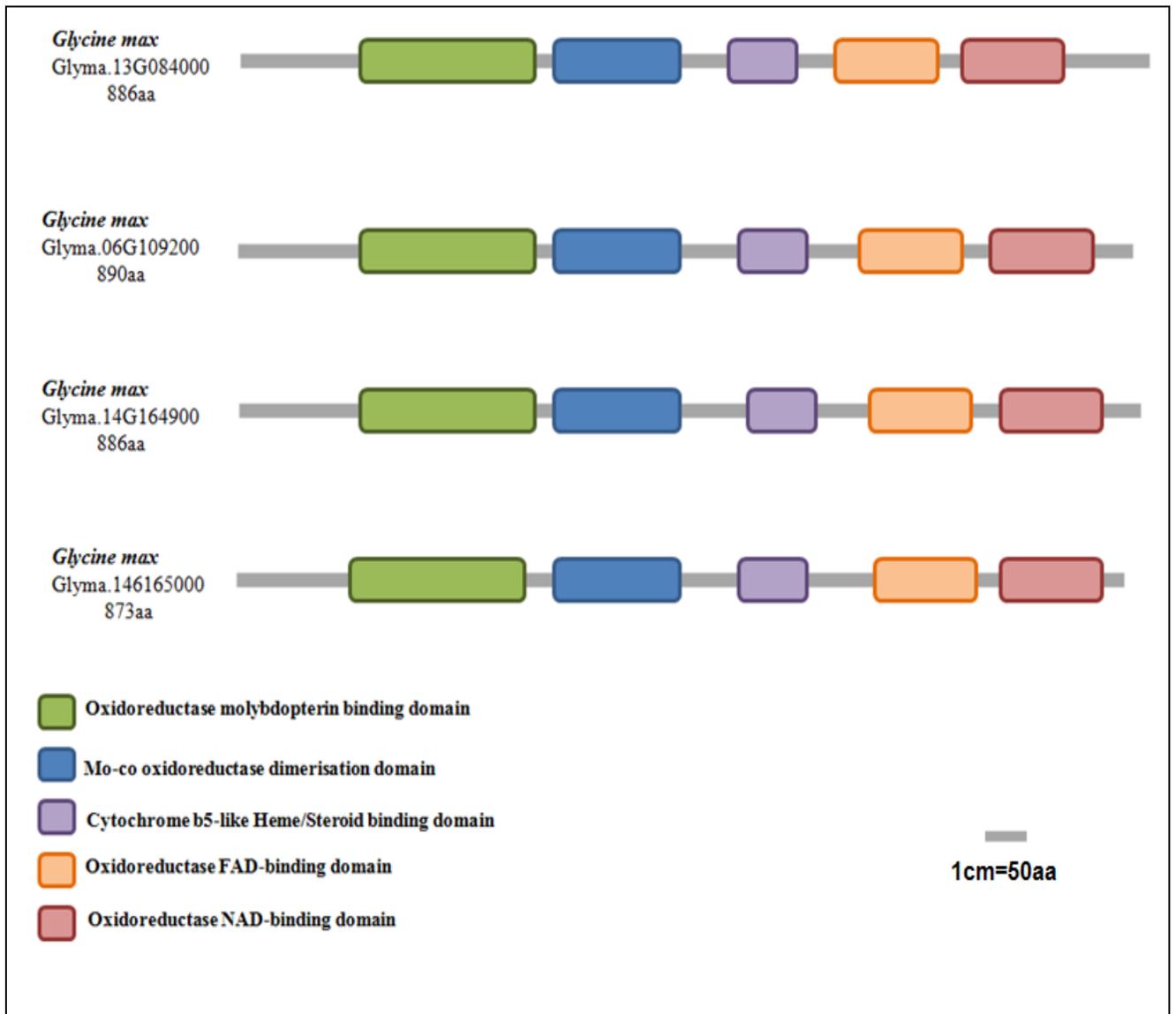


Figura n°8: Caracterización modular Nitrato Reductasa. Dominios: Oxidoreductase molybdopterin binding domain, Mo-co oxidoreductase dimerisation domain, Cytochrome b5-like Heme/Steroid binding domain, Oxidoreductase FAD-binding domain, Oxidoreductase NAD-binding domain, para cada secuencia mencionada al comienzo del análisis (NR1, NR2, NR3, NR4).

Sumado a lo anterior se realizó un análisis de similitud entre estas cuatro secuencias de NR presentes en *Glycine Max* con dos de *Arabidopsis thaliana* (AT1G77760-AT1G37130), y se pudo observar que existe un alto grado de homología entre las mismas (Figura 9).

	Glyma.13G084000	Glyma.06G109200	Glyma.14G164900	Glyma.14G165000
AT1G77760 (NR1)	73.2%	71.2%	67.9%	64.4%
AT1G37130 (NR2)	74.0%	72.0%	69.0%	65.7%

Figura n°9: Porcentajes de homología entre Glycine max y Arabidopsis thaliana. Valores obtenidos de Biology work bench (<http://seqtool.sdsc.edu/CGI/BW.cgi>).

Niveles de expresión de *Nitrato Reductasa* en diferentes tejidos de *Glycine max*

Con el fin de conocer los niveles de expresión de los genes mencionados anteriormente en los distintos tejidos de *Glycine max*, y bajo diversas condiciones, se realizó una búsqueda en la base de datos eFP Browser (<http://bar.utoronto.ca/efpsoybean/cgi-bin/efpWeb.cgi>) del *Phytozome* (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#>). Se observa que los niveles de expresión por secuenciación RNAseq en los distintos genes varía, siendo la *NR1* y *NR2* las que presentan mayores niveles en raíces y nódulos bajo condiciones estándares y un aumento de la misma en condiciones de nitrato y simbiosis. Si bien estos genes también se expresan en otros tejidos como hojas, en menor proporción, resaltamos raíces y nódulos ya que son de nuestro interés (figura n°10,11,12,13 y 14). Resultados similares se pueden observar en los datos brindados por eFP Browser, donde la *NR1* y *NR2* poseen mayores niveles de expresión en raíces y nódulos, apareciendo además en este análisis la *NR4* en el órgano raíz.

Datos de eFP Browser

NR1:Glyma.13G084000.1(Glyma13g02510)

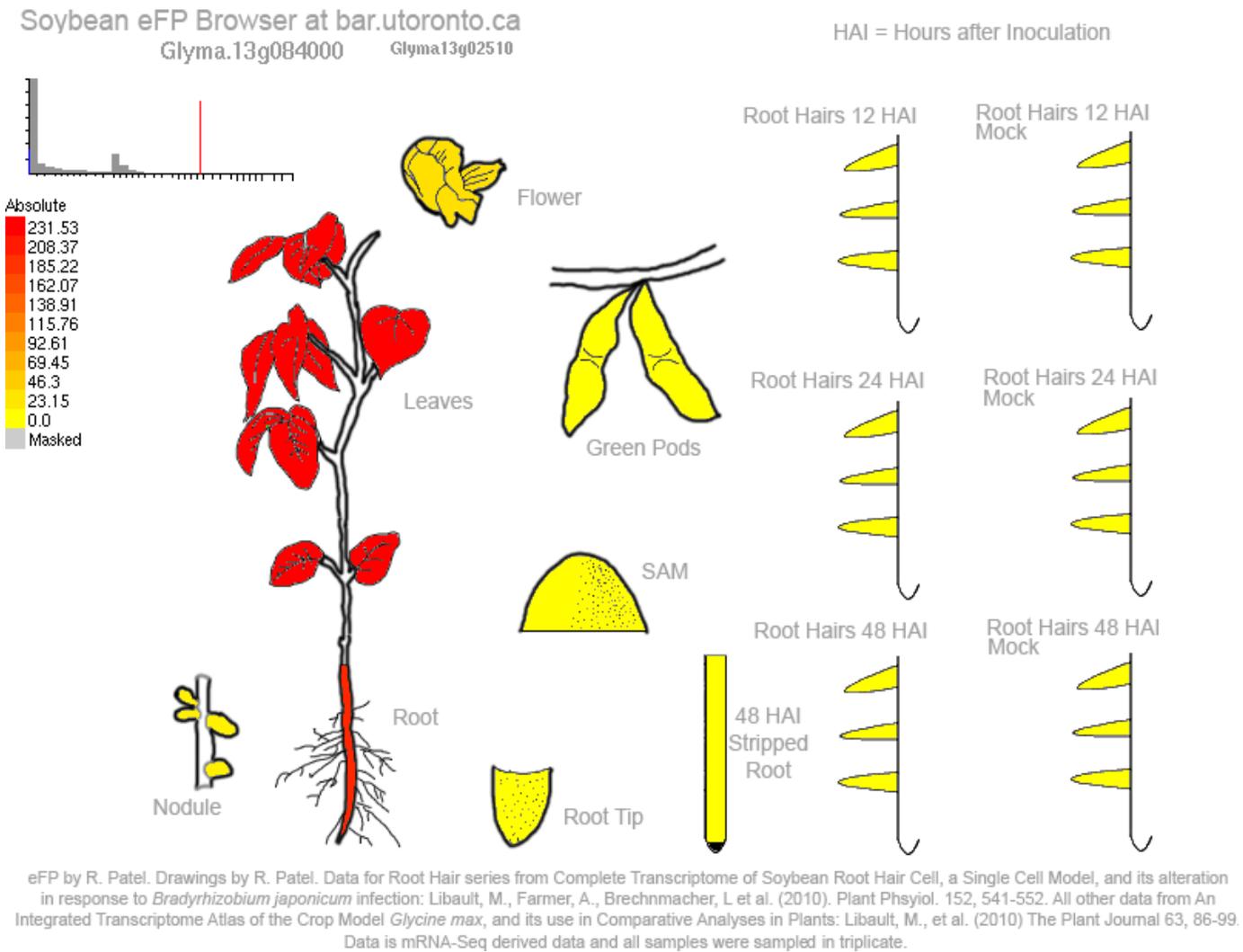


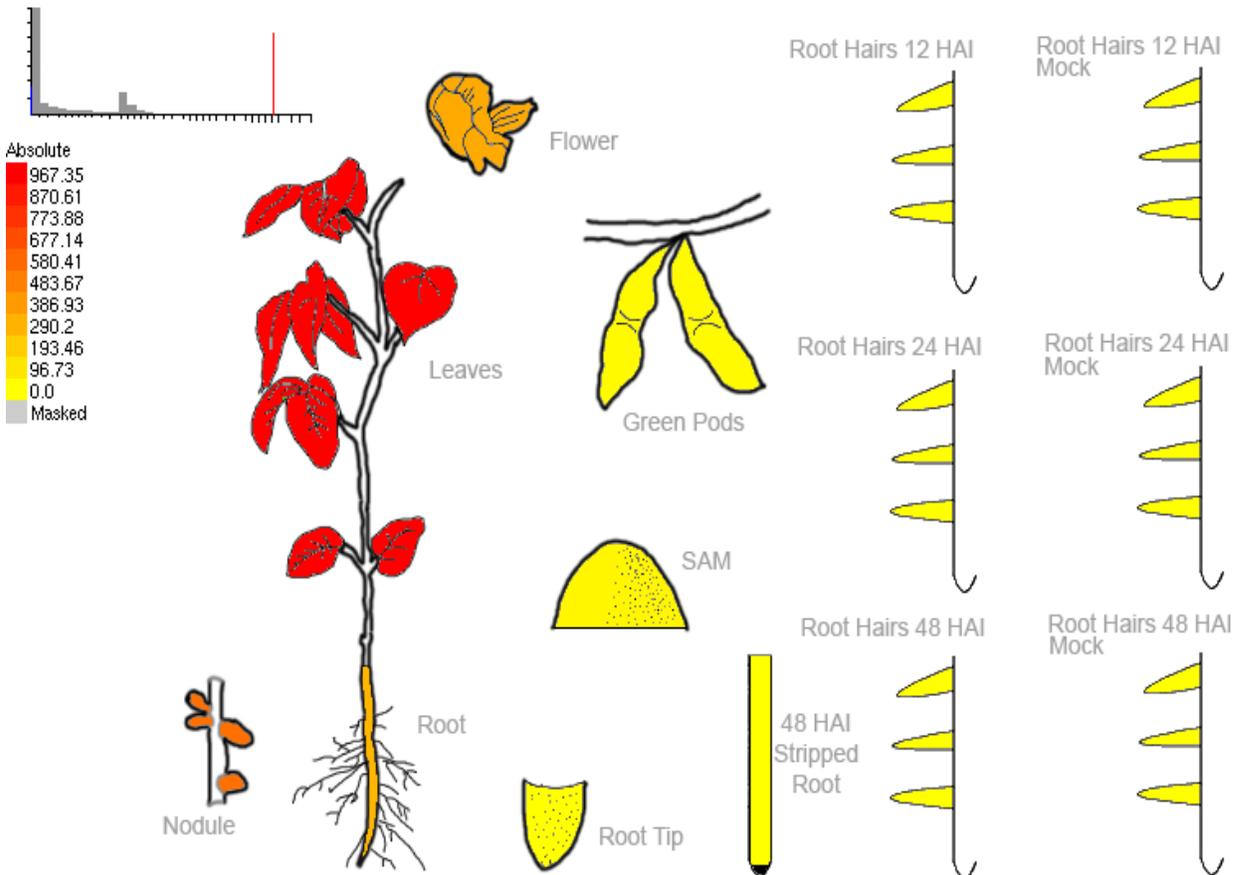
Figura n°10: Niveles de expresión del gen NR1: Glyma.13G084000.1(Glyma13g02510) en los diferentes tejidos de *Glycine max*. Los colores rojos y anaranjados indican mayores niveles de expresión.

NR2: *Glyma.06G109200.1* (*Glyma06g11430*)

Soybean eFP Browser at bar.utoronto.ca

Glyma.06g109200 *Glyma06g11430*

HAI = Hours after Inoculation



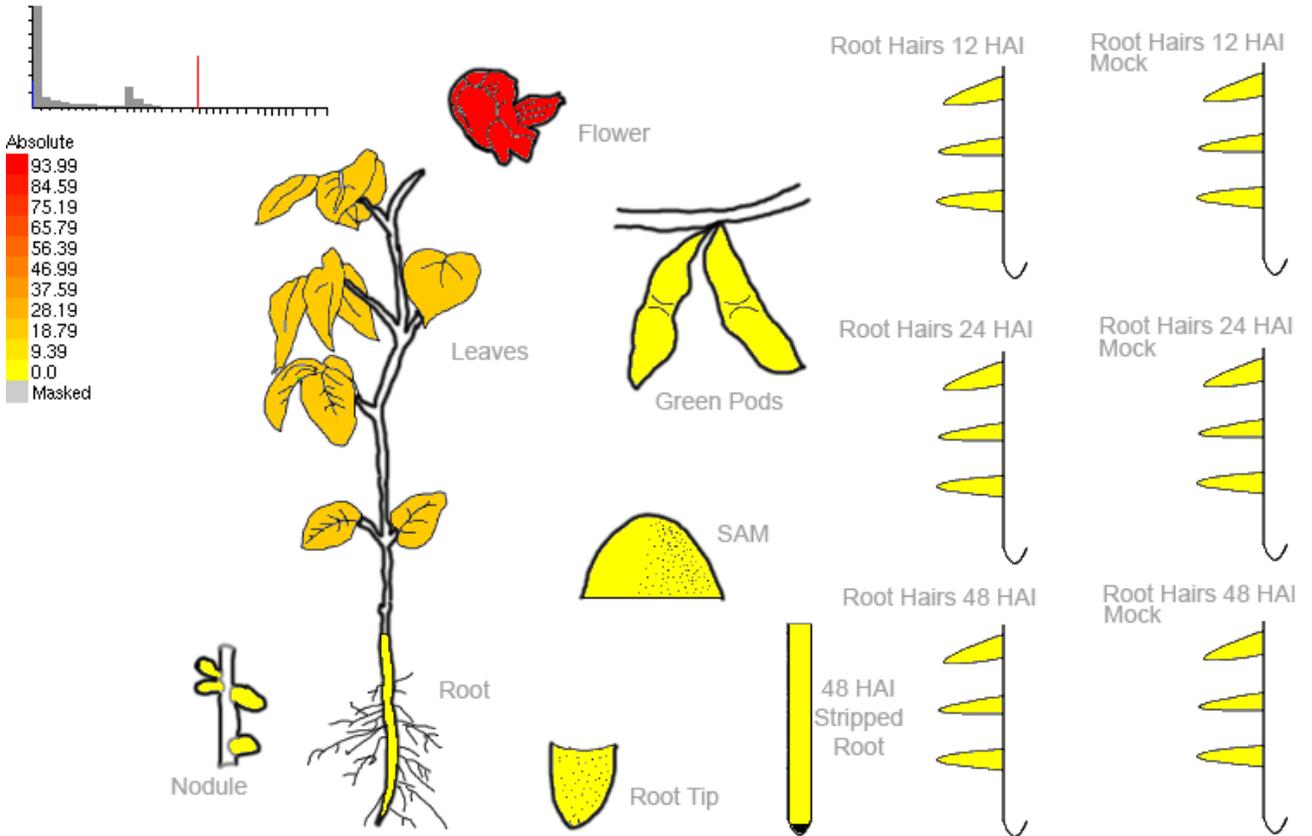
eFP by R. Patel. Drawings by R. Patel. Data for Root Hair series from Complete Transcriptome of Soybean Root Hair Cell, a Single Cell Model, and its alteration in response to *Bradyrhizobium japonicum* infection: Libault, M., Farmer, A., Brechnmacher, L et al. (2010). *Plant Physiol.* 152, 541-552. All other data from An Integrated Transcriptome Atlas of the Crop Model *Glycine max*, and its use in Comparative Analyses in Plants: Libault, M., et al. (2010) *The Plant Journal* 63, 86-99. Data is mRNA-Seq derived data and all samples were sampled in triplicate.

Figura n°11: Niveles absolutos de expresión del gen NR2: *Glyma.06G109200.1* (*Glyma06g11430*) en los diferentes tejidos de *Glycine max*. Los colores rojos y anaranjados indican mayores niveles de expresión.

NR3:Glyma.14G164900.1(Glyma14g33480)

Soybean eFP Browser at bar.utoronto.ca
 Glyma.14g164900 Glyma14g33480

HAI = Hours after Inoculation



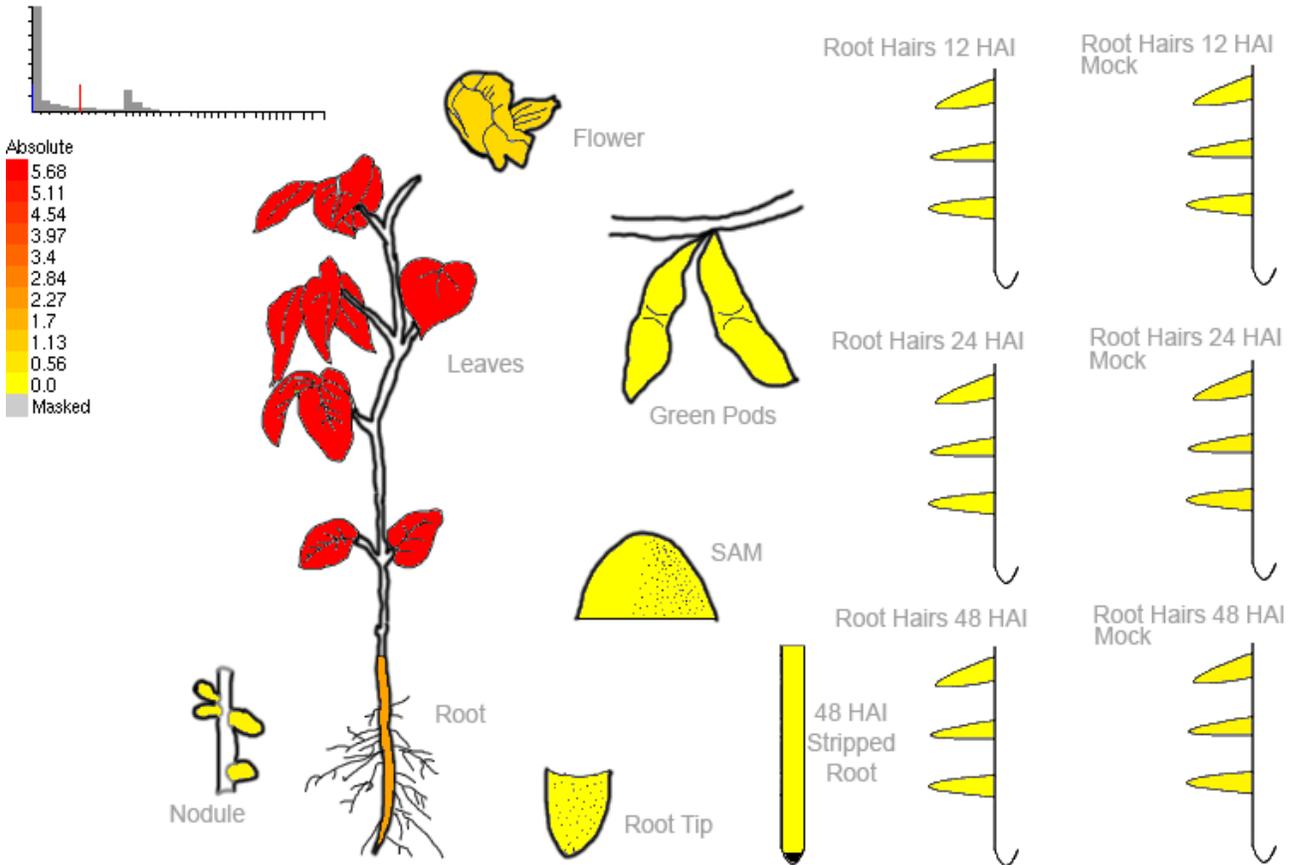
eFP by R. Patel. Drawings by R. Patel. Data for Root Hair series from Complete Transcriptome of Soybean Root Hair Cell, a Single Cell Model, and its alteration in response to *Bradyrhizobium japonicum* infection: Libault, M., Farmer, A., Brechnmacher, L et al. (2010). Plant Physiol. 152, 541-552. All other data from An Integrated Transcriptome Atlas of the Crop Model *Glycine max*, and its use in Comparative Analyses in Plants: Libault, M., et al. (2010) The Plant Journal 63, 86-99. Data is mRNA-Seq derived data and all samples were sampled in triplicate.

Figura n°12: Niveles de expresión del gen NR3: Glyma.14G164900.1(Glyma14g33480) en los diferentes tejidos de *Glycine max*. Los colores rojos y anaranjados indican mayores niveles de expresión.

NR4:Glyma.14G165000.1(Glyma14g33490)

Soybean eFP Browser at bar.utoronto.ca
 Glyma.14g165000 Glyma14g33490

HAI = Hours after Inoculation

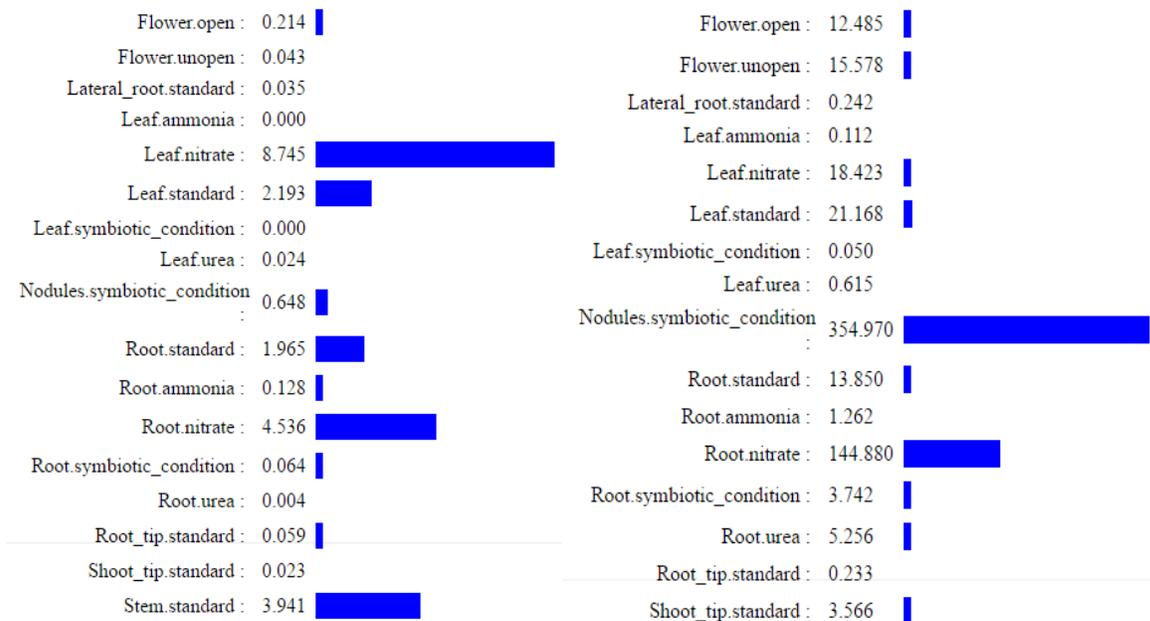


eFP by R. Patel. Drawings by R. Patel. Data for Root Hair series from Complete Transcriptome of Soybean Root Hair Cell, a Single Cell Model, and its alteration in response to *Bradyrhizobium japonicum* infection: Libault, M., Farmer, A., Brechnmacher, L et al. (2010). Plant Physiol. 152, 541-552. All other data from An Integrated Transcriptome Atlas of the Crop Model *Glycine max*, and its use in Comparative Analyses in Plants: Libault, M., et al. (2010) The Plant Journal 63, 86-99. Data is mRNA-Seq derived data and all samples were sampled in triplicate.

Figura n°13: Niveles de expresión del gen NR4: Glyma.14G165000.1(Glyma14g33490) en los diferentes tejidos de *Glycine max*. Los colores rojos y anaranjados indican mayores niveles de expresión.

Datos obtenidos de Phytozome: Niveles de expresión por secuenciación RNA

NR1:Glyma.13G084000.1(Glyma13q02510) **NR2:Glyma.06G109200.1(Glyma06g11430)**



NR3:Glyma.14G164900.1(Glyma14q33480) **NR4:Glyma.14G165000.1(Glyma14q33490)**

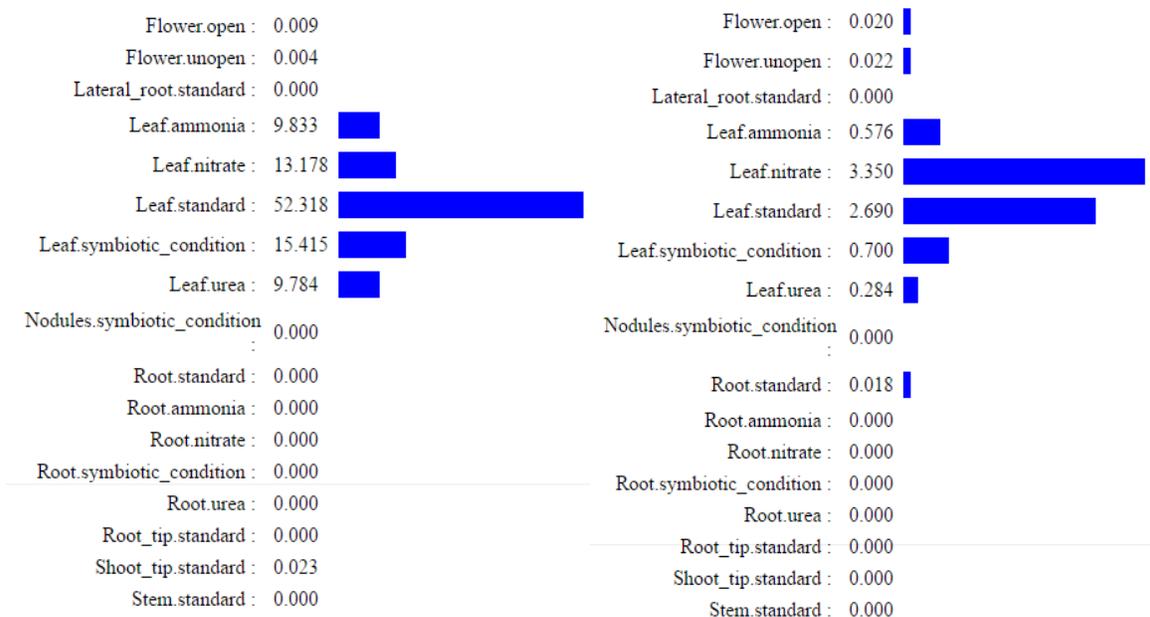


Figura n°14: Niveles de expresión de NR1, NR2, NR3, NR4 por secuenciación RNAseq en los diferentes tejidos de Glycine max. La barra azul indica el nivel de expresión.

Efectos de la concentración de nitrato sobre la actividad de la enzima Nitrato Reductasa en soja (*Glycine max* (L.))

Con el objetivo de evaluar la actividad NR en concentraciones de nitrato permisivas (0 mM, 1,25 mM) e inhibitorias (5 mM) de la nodulación, la actividad de esta enzima fue determinada en raíces de tres días de post germinación y sometidas a los diferentes tratamientos durante 4 horas. Fueron seleccionadas estas concentraciones de nitrato, ya que altas concentraciones inhiben el proceso de infección, el desarrollo de los nódulos y la expresión de la actividad de la nitrogenasa, por lo tanto a mayor presencia de nitrato en el suelo, menores posibilidades hay para la FBN y, a la inversa (Paredes, 2013).

Al mismo tiempo estos tratamientos de nitrato fueron sometidos a otra variable respuesta que fue normoxia (aire) e hipoxia. Ya que, se sabe, que la falta de oxígeno resulta una limitante importante tanto para la planta huésped como para la FBN. La falta de oxígeno induce a la respiración anaeróbica (fermentación), y por consecuencia a la reducción energética, induciendo al cierre de estomas y posterior reducción de la fotosíntesis (Paredes, 2013).

En los experimentos realizados se pudo observar que la actividad NR presentó un aumento significativo a medida que aumentó la concentración de nitrato (figura n° 15 y 16), tanto en presencia de inóculo o en ausencia, verificando de este modo el conocido efecto inductor que posee el nitrato sobre la actividad NR (Cervantes, 2009).

Por otro lado se verificó que la hipoxia incrementó la actividad NR, tanto en presencia de inóculo o en ausencia, conforme lo descrito en bibliografía (Cervantes, 2009). Se sabe que en ambientes denominados anóxicos, carentes de oxígeno y con disponibilidad de nitrito y nitrato como aceptores de electrones, suele producirse la desnitrificación, proceso por el cual el nitrato y el nitrito reemplazan al oxígeno en la cadena de transporte de electrones. En esta vía desnitrificante, la producción energética (ATP) es menor que la obtenida a partir de oxígeno (Cervantes, 2009). La desnitrificación a partir de nitrato integra cuatro procesos de reducción secuenciales, catalizados por diversas enzimas, entre ellas la nitrito reductasas y nitrato reductasa.

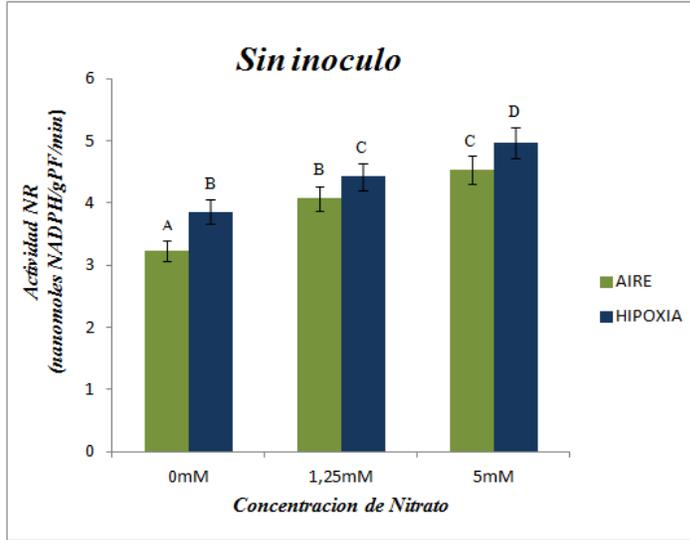


Figura n°15: Efecto del nitrato sobre la actividad NR en raíces de soja de tres días de germinación tratadas durante 4 horas en las condiciones indicadas. La actividad de la enzima fue medida por la caída del NADPH a 340nm. Letras diferentes indican diferencias significativas con test Duncan $P < 0,05$ con $N=6$.

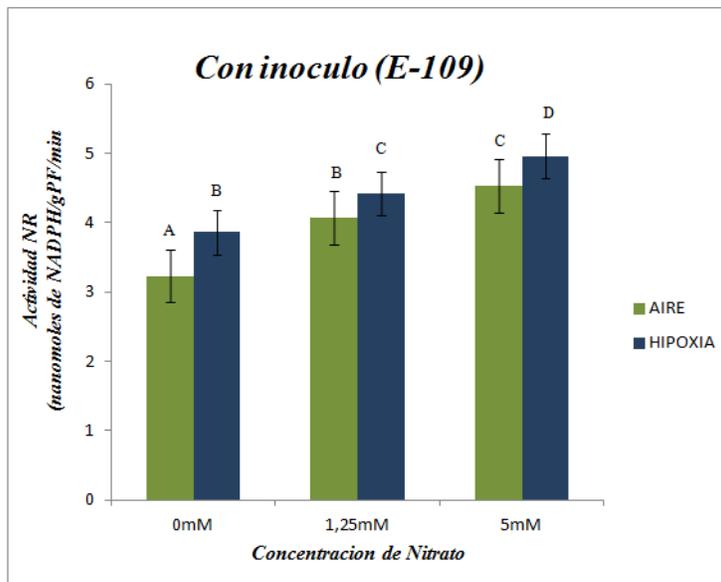


Figura n°16: Efecto del nitrato en la actividad NR en raíces de soja de tres días de germinación tratadas durante 4 horas en las condiciones indicadas. La actividad de la enzima fue medida por la caída del NADPH a 340nm. Letras diferentes indican diferencias significativas con test Duncan $P < 0,05$ con $N=6$.

Efecto de diferentes concentraciones de nitrato/hipoxia sobre los niveles de Óxido Nítrico.

Los niveles de ON se determinaron utilizando una sonda fluorescente DAF-FM y observando el material con microscopía de fluorescencia. Se pudo determinar que en raíces de soja el contenido de ON incrementa a consecuencia de la hipoxia, y de la concentración de nitrato, en condiciones no inhibitorias de la nodulación con 0 -y 1,25 mM de nitrato (figuras n° 17,18,19). Estos resultados verifican que la NR bajo condiciones tales como, alta disponibilidad de poder reductor o hipoxia, puede tener una actividad adicional que produce óxido nítrico (ON), siendo esta una de las fuentes de producción ON en plantas por la transferencia de un electrón desde el NAD(P)H, hacia el NO₂ generando ON a partir de éste; sin embargo, como se mencionó, esta reacción requiere baja tensión de O₂, y altas concentraciones de NO₃ (Lombardo, et al. 2006).

Por otro lado, se puede observar que con 5 mM KNO₃ (concentración inhibitoria de la nodulación)–este patrón no se presenta, solamente se observa una mayor producción de ON en la condición de inóculo e hipoxia.

Por lo tanto podemos decir que, estadísticamente el aumento de la concentración de nitrato no se corresponde con un aumento en la producción de ON, en concentraciones inhibitorias de la nodulación. Pero si se puede observar el aumento en la producción de ON en hipoxia y diferentes concentraciones de nitrato, en condiciones no inhibitorias de la nodulación.

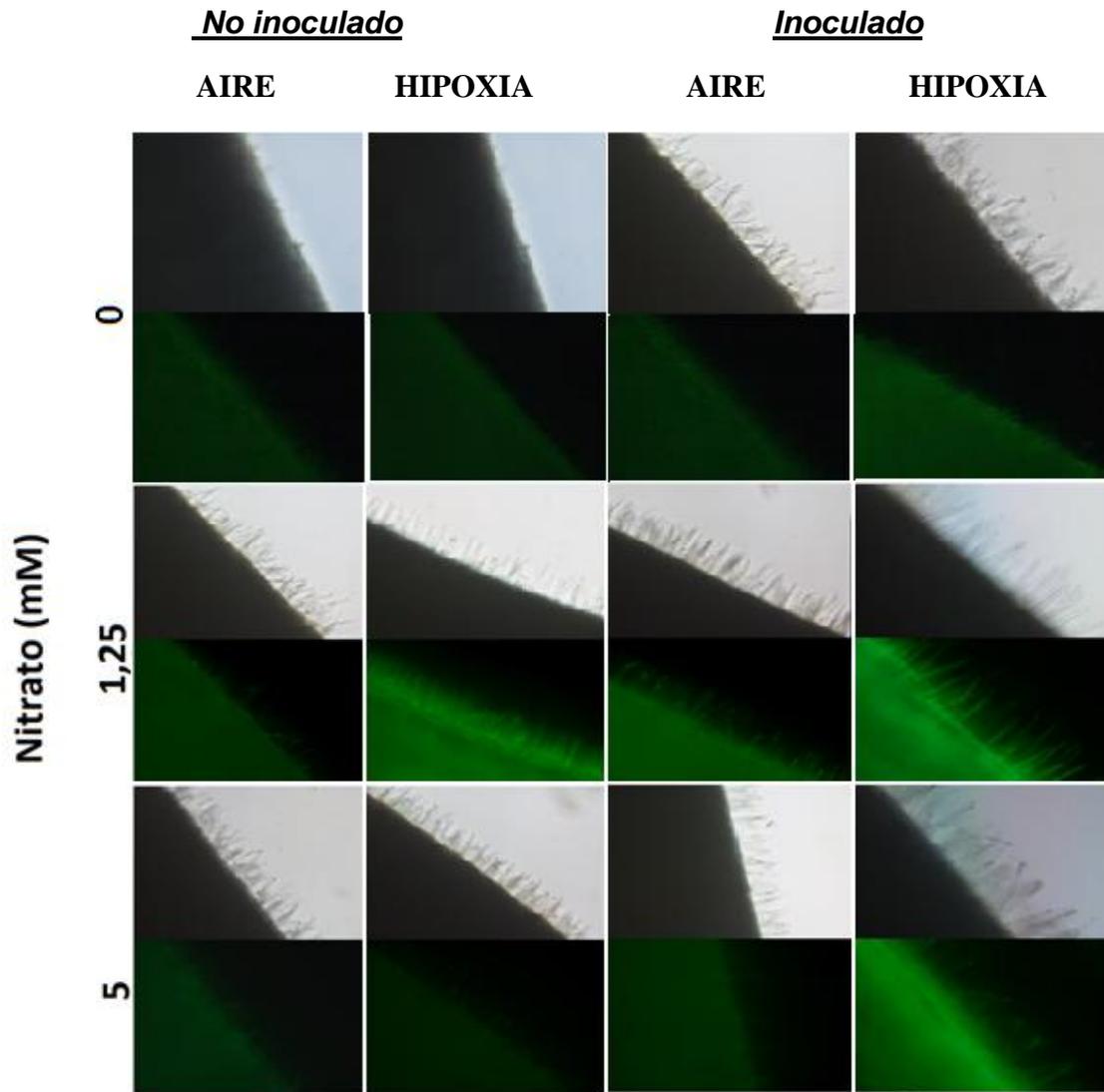


Figura n°17: Medición de ON (DAF-FM: 7 μ M) en los diferentes tratamientos de nitrato: 0, 1,25Mm y 5Mm. Contrastando dos condiciones, control (aireado) e hipoxia. Genotipo: wt incubado con Bacteria: E109.

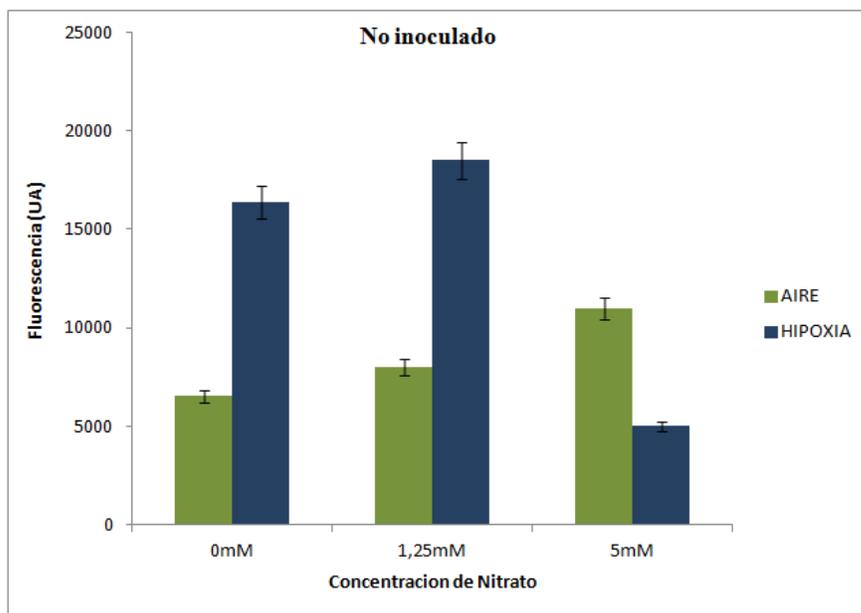


Figura n°18: Cuantificación de ON detectado en raíces no inoculadas, por fluorescencia con sonda -DAF-FM: 7 μ M.. Resultados obtenidos por el procesamiento de las imágenes anteriores con ImageJ . Las barras indican el error estándar con un N=6.

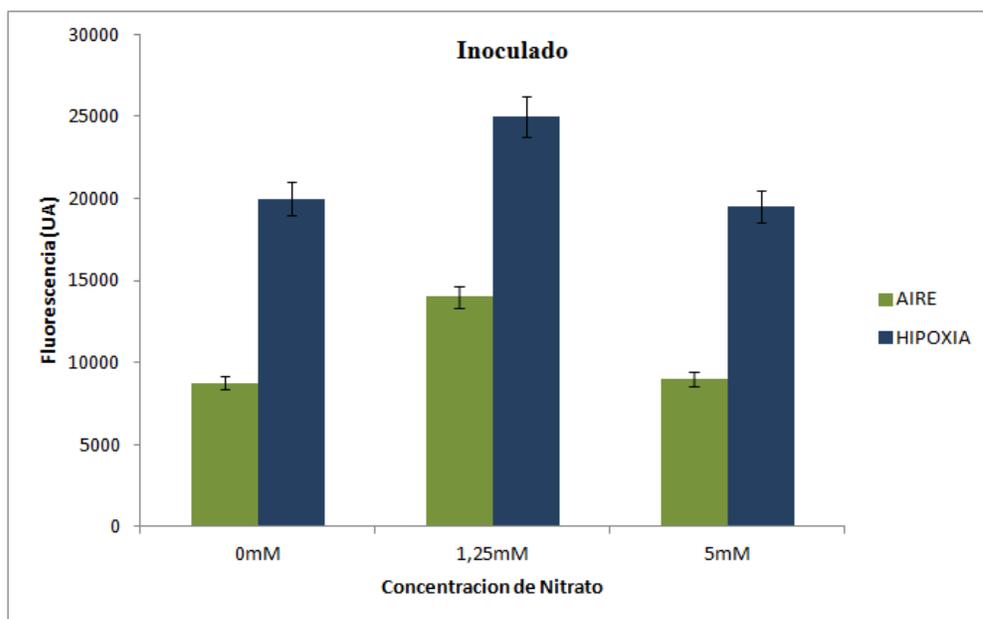


Figura n°19: Cuantificación de ON detectado en raíces no inoculadas, por fluorescencia con sonda -DAF-FM: 7 μ M.. Resultados obtenidos por el procesamiento de las imágenes anteriores con ImageJ . Las barras indican el error estándar con un N=6.

Regulación por nitrato del nivel de proteína NR en raíces con y sin inoculación

En las plantas sin inocular, se vio, mediante Western Blot, que la banda correspondiente a 100kDa (peso molecular determinado para la subunidad de la NR , Campbell et al. 1999), coincidente con la de NR pura de maíz expresada en *E. coli* (Campbell et al. 1999), aumenta su intensidad conforme incrementa la concentración de KNO₃ en el medio, lo que verifica que el nivel de proteína NR es regulado por la concentración de nitrato (Cervantes, 2009) y que este efecto es amplificado por la hipoxia.

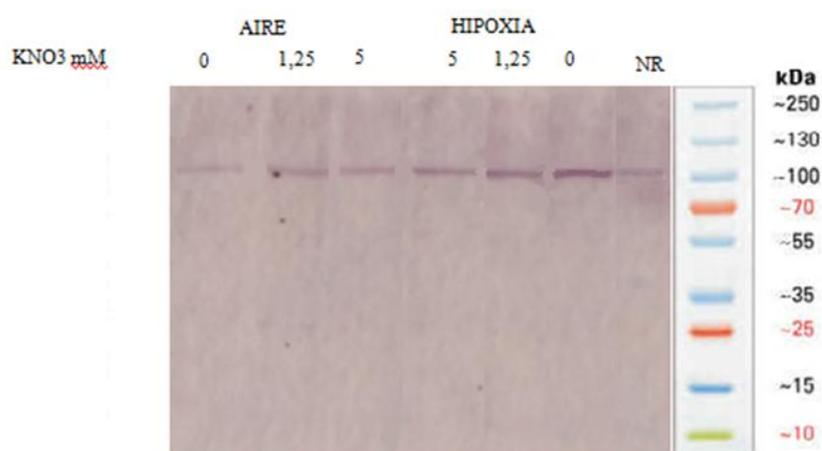


Figura n°20: Efectos del nitrato en la cantidad de proteínas totales de NR evaluado por western blot de NR. Se sembraron 30 µg de proteínas por calle sobre un SDS-PAGE. Se pueden observar las diferentes concentraciones de nitrato y nitrato reductasa pura (NR).

Cuando se realizó el mismo experimento pero con raíces inoculadas con *Bradyrhizobium japonicum* E-109 también se observó un aumento de la proteína NR en relación a la concentración de nitrato en el medio y también se verifica el efecto amplificador de la hipoxia (figura 21).

En este Western blot se puede observar la aparición de una segunda banda de 40kDa aproximadamente que se corresponde con la NR bacteriana (E109). Los resultados sugieren que el nitrato y la hipoxia parecen afectar solamente al nivel de proteína NR perteneciente a la especie vegetal.

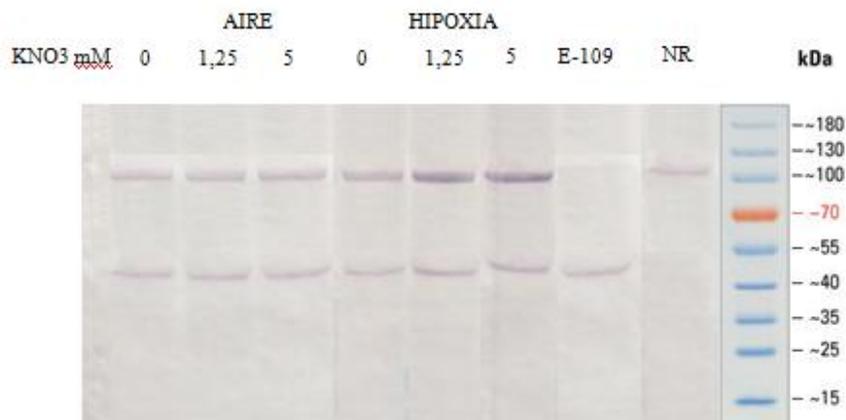


Figura n°21: Efectos del nitrato, hipoxia y bacteria E-109 en la cantidad de proteínas totales de NR evaluado por western blot de NR. Se sembraron 30 µg de proteínas por calle sobre un SDS-PAGE. Se pueden observar las diferentes concentraciones de nitrato y nitrato reductasa pura (NR).

Efecto de la producción de ON sobre la deformación de pelos radicales.

Con el objetivo de estudiar el efecto de la producción de óxido nítrico sobre los eventos tempranos de la interacción leguminosa- rizobio, se cuantificó el porcentaje de deformación de pelos radicales por curling en raíces transgénicas que sobre expresan ON.

Los resultados obtenidos demuestran que la mayor concentración de ON presente en raíces en cabelleras transgénicas, disminuye significativamente la deformación de los pelos radicales inducidos por *Bradyrhizobium japonicum*, inhibiendo de esta manera los eventos tempranos de la interacción leguminosa- rizobio, en contraste con control, vector vacío (figura n°22 y 23).



Figura n°22: Imágenes obtenidas en microscopio de campo claro que muestran la deformación de pelos radicales en raíces en cabellera. Imagen A, raíces con la construcción sobre expresante de ON. Imagen B, raíces vector vacío como control.

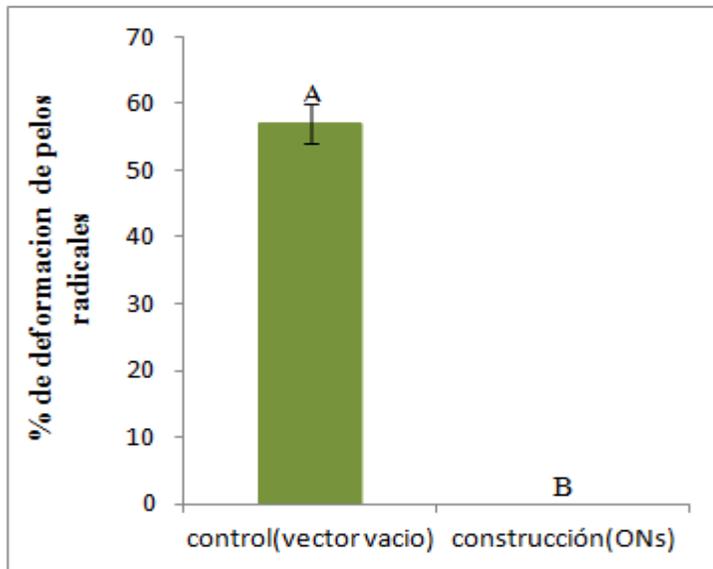


Figura n°23: Efecto del ON en la deformación de pelos radicales. Datos obtenidos de acuerdo al porcentaje de deformación de pelos por campo. Raíces transgénicas en cabelleras, B) transformadas con construcción que sobre expresa ON y A) control (vector vacío). La barra indica el error estándar con un N=6. Letras diferentes indican diferencia significativas con test de Duncan $P < 0,05$.

Efecto del ON sobre la nodulación en raíces transgénicas de soja.

Para evaluar el efecto del nitrato sobre la nodulación, se generaron raíces en cabellera (vector vacío y sobre expresante de ON) con el sistema de tubos que se menciona en materiales y métodos (figura n° 5). Posteriormente fueron crecidas en hidroponía durante 20 días, medio ByD, e inoculadas con *Bradyrhizobium japonicum* E-109. Pasado este periodo se cuantificó el número de nódulos por planta.

Se pudo observar la presencia de nódulos en raíces control (vector vacío), mientras que en las que sobre expresan ON, no se generaron nódulos radicales. Correspondiéndose estos resultados con los mencionados anteriormente en la deformación de pelos radicales, interacción leguminosa- rizobio.

Si bien, el número de nódulos por planta fue pequeño, la presencia de los mismos nos permite explicar que la producción de ON en la planta lleva a inhibir tanto, los eventos tempranos de la interacción leguminosa-rizobio (deformación de pelos radicales), como los eventos tardíos (nodulación).

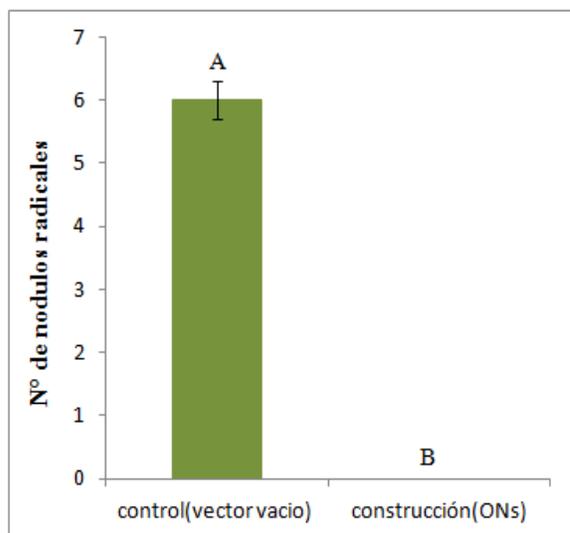


Figura n°24: efecto del ON en la formación de nódulos radicales en raíces en cabelleras transgénicas que sobre expresan ON y su respectivo control. La barra indica el error estándar con un N=12. Letras diferentes indican diferencia significativas con test de Duncan $P < 0,05$.

Conclusión y discusión

Las interacciones simbióticas han sido poderosos motores en el devenir de la vida. El estudio de las interacciones entre plantas y microorganismos simbióticos, su co evolución y regulación, es de fundamental importancia para comprender procesos adaptativos, aclimatación y evolutivos de las plantas. Asimismo, dada la influencia económica que tiene el cultivo de soja en nuestro país, la particularidad de sus granos con un alto contenido de proteínas y por ende su alto requerimiento de nitrógeno, denotan la importancia de generar conocimientos básicos y aplicados que aporten sustentabilidad agrícola y ambiental a la producción de esta oleaginosa.

En plantas que no realizan FBN la principal vía de incorporación de N es el NO_3 del suelo mediante transportadores específicos de membrana, este es reducido a nitrito (NO_2) por la actividad de la Nitrato Reductasa (NR) en citoplasma y luego a amonio (NH_4) por la Nitrito Reductasa en cloroplastos (NiR). La actividad NR está regulada a nivel transcripcional, traduccional y postraduccional, principalmente por la disponibilidad de nitrato, carbohidratos y luz (Campbell, 1999).

La fijación biológica del nitrógeno (FBN), proceso mediante el cual el N_2 atmosférico es reducido a NH_4 por actividad del complejo nitrogenasa presente en microorganismos procariotas de vida libre o simbioses, es la principal fuente de entrada en ciclo del N de la biosfera.

En las interacciones leguminosas-rizobios, la FBN ocurre en órganos especializados denominados nódulos, los cuales son el producto de una fina y sensible comunicación bioquímica-molecular entre planta y microorganismos. Como se mencionó anteriormente existen diversas condiciones ambientales, las cuales inhiben la interacción leguminosa-rizobio y por lo tanto la FBN. Una de ellas es la alta concentración de nitratos (NO_3) en el suelo; las cuales inhiben el proceso de infección, el desarrollo de los nódulos y la expresión de la actividad de la nitrogenasa (Paredes, 2013). Otra de las condiciones que influyen en la FBN es la disponibilidad de O_2 , ya que por un lado es necesario para mantener las altas tasas respiratorias y producción de ATP que demanda el complejo enzimático

nitrogenasa, pero por otro este último se inactiva irreversiblemente en presencia de O_2 . Una de las funciones del proceso organogénico nodular es precisamente resolver esta paradoja a través de la generación de barreras físicas, químicas o bioquímicas. Asimismo, los ambiente hipóxicos o anóxicos inducen la desnitrificación, ya que tanto nitratos como nitritos actúan como aceptores de electrones respiratorios posibilitando la producción de ATP (Cervantes, 2009). La vía desnitrificante implica entre otras, la actividad de NR.

En trabajos previos del grupo se caracterizó el efecto de diferentes concentraciones de nitrato sobre la nodulación, identificando concentraciones permisivas (1.25 mM) e inhibitorias (a partir de 2.5 mM) de nitratos. Asimismo, se determinó que las concentraciones de nitrato inhibitorias de la nodulación, se debían a la inhibición de la deformación de pelos radicales y producción de especies activas del oxígeno relacionadas.

En el presente trabajo se determinó que tanto condiciones permisivas como inhibitorias de nitrato incrementan tanto la actividad como la cantidad de proteína NR en forma dosis dependiente. También se demostró que la hipoxia aumenta aún más tanto la actividad como la cantidad de proteína NR, evidenciando un efecto aditivo entre nitrato e hipoxia. Asimismo, la inoculación con *B. japonicum* en estos experimentos no tuvo efecto significativo sobre esta variable de respuesta.

Por otro lado, se sabe que, la NR bajo condiciones tales como, alta disponibilidad de poder reductor o hipoxia, puede tener una actividad adicional que produce óxido nítrico (ON) por la transferencia de un electrón desde el NAD(P)H, hacia el NO_2 . Esta actividad NR, localizada en el citosol, luego de catalizar la reducción de NO_3 a NO_2 , puede generar ON a partir del NO_2 (Yamasaki, 2000), sin embargo esta reacción requiere baja tensión de O_2 , y altas concentraciones de NO_3 (Lombardo, et al. 2006). En nuestro sistema experimental, cuando las raíces de soja fueron tratadas con los diferentes tratamientos (concentraciones de nitrato, normoxia e hipoxia) se vio una correlación positiva entre el ON, la disponibilidad de NO_3 y O_2 en el medio, en condiciones no inhibitorias, y una correlación negativa en condiciones inhibitorias de la nodulación. A estos resultados se los puede relacionar con la actividad *Nitrato Reductasa* ya mencionada, concluyendo

que un aumento en la concentración de nitratos, y el efecto de la hipoxia, llevan a un aumento en la actividad NR y en consecuencia a un aumento en la producción de ON.

Con el objetivo de acercar más evidencias experimentales sobre si la producción de ON, mediada por la NR podría ser una vía de inhibición en el desarrollo de la nodulación bajo condiciones de altas concentraciones de nitratos, se obtuvieron raíces transgénicas en cabelleras con la incorporación de una construcción sobre expresante de óxido nítrico sintasa de *Ostrococu tauri*. Si bien los niveles de producción de ON en estas raíces no fueron cuantificados, pudimos observar, que raíces transgénicas que contienen la construcción sobre-expresante parecieran tener inhibida la interacción temprana (deformación de pelos radicales) y la nodulación misma (figuras n° 12-13 y 14).

Nuestros resultados demuestran que un aumento en la concentración de nitratos induciría un aumento en la síntesis y actividad de la enzima Nitrato Reductasa, con una consecuente mayor producción de ON en dichas condiciones y por otro lado, que las plantas transformadas con la ON sintasa tuvieran menos nódulos que los controles en condiciones no inhibitorias de la nodulación. Conjuntamente esto sugiere que parte de la inhibición de la nodulación por nitratos estaría mediada por una alteración en los niveles normales de ON en las raíces y que la NR sería la principal fuente generadora del mismo.

Al comienzo de este trabajo, mencionamos las especies activas del oxígeno (ROS), al óxido nítrico (ON) y sus efectos sobre la nodulación. Pero no debemos dejar de mencionar la estrecha relación que existe entre ellos. Ambos han sido determinados en los primeros estadios de la interacción simbiótica y son señales determinantes para la especificidad de la interacción, por medio de una regulación redox. Los factores de nodulación, que están implicados en el desarrollo del nódulo se activan con la primera producción de ROS. Durante el proceso de infección se genera el ion O_2^- y H_2O_2 , localizados en el hilo de infección y células infectadas. Por otro lado el peroxinitrito ($ONOO^-$) es la molécula señal formada cuando el ON reacciona con el O_2 .

No se ha determinado aún, pero se cree que el H_2O_2 podría controlar la

regulación transcripcional de enzimas involucradas en la homeostasis del ON y que la actividad postraduccional del ON/ONOO⁻ proporciona un enlace entre ON/O₂ siendo esta la señalización y el metabolismo del N en nódulos.

Para finalizar, en el siguiente esquema se intenta graficar la hipótesis planteada anteriormente, dejando abierta nuevas líneas de investigación.

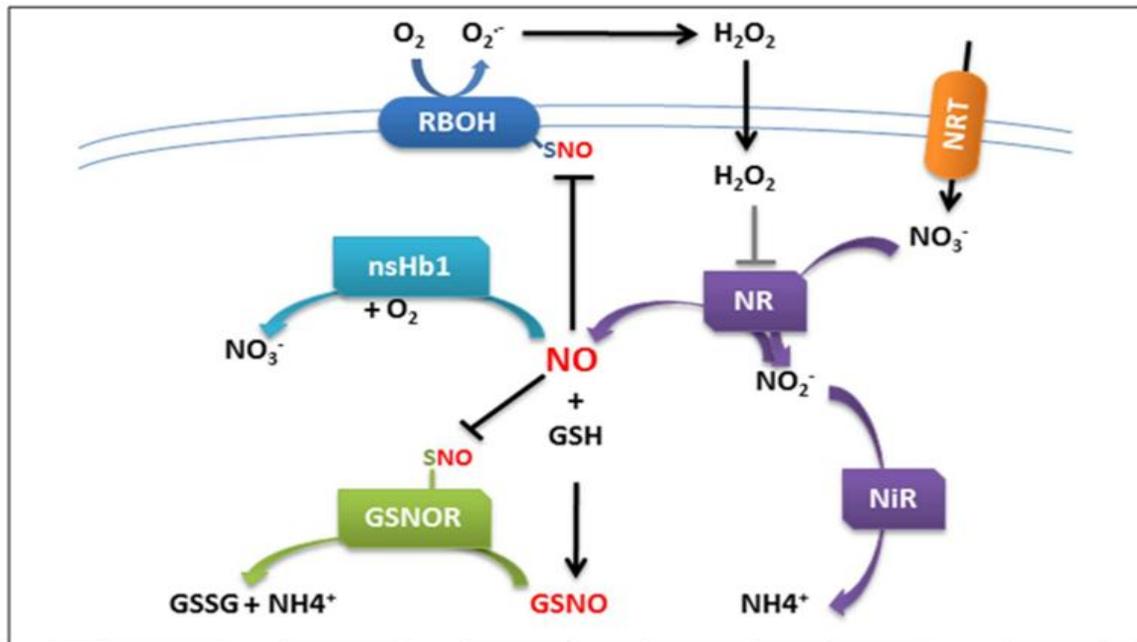


Figura n°25: Modelo esquemático de la regulación de la interferencia entre ROS y NO en células vegetales. H₂O₂ producido por NADPH oxidasa conduce a la activación de Nitrato reductasa (NR) y la producción de NO. La acumulación de NO a su vez atenúa/reduce la actividad de NADPH oxidasa por S-nitrosilación, evitando la acumulación de exceso de ROS. En la vía de asimilación de nitrógeno, el nitrato (NO₃) es absorbido por transportadores de nitratos (NRT) y reducido a nitrito (NO₂) por NR. El nitrito se reduce a NO por NR. NO reacciona con glutatión reducido (GSH) en presencia de O₂ para formar S-nitrosoglutathione (GSNO). GSNO es convertido por la enzima GSNO Reductasa (GSNOR) en glutatión oxidado (GSSG) y NH₃. La acumulación de NO conduce a GSNOR S-nitrosilación e inhibición que previenen la degradación del GSNO. **Extraído de:** Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide Control Early Steps of the Legume – Rhizobium Symbiotic Interaction, Damiani et al, 2003.

Referencias bibliográficas

Abbott L, & Murphy D. 2004. A key to sustainable land use in agriculture. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.

Arasimowicz, M. & Floryszak. W. J. 2007. Nitric Oxide as a bioactive signaling molecule in plant stress responses. *Plant Science*. 172: 876- 887.

Becana, M., Bedmar, E.J. 1991. Metabolismo del nitrógeno y oxígeno en nódulos de leguminosas. En: Olivares, J., ed; Barea J.M., ed. Fijación y movilización Biológica de Nutrientes. Vol 2. Madrid, CSIC, p. 33-45.

Broughton & Diltwoth. 1971. Control of leghemeoglobin synthesis in snakes beans. *The biochemical journal*. 125: 1075-1080.

Broughton & Dilwoth. 1971. Control of leghemeoglobin synthesis in snakes beans. *The biochemical journal*.

Campbell, W. H. 1999. Nitrate reductase structure, function and regulation: Bridging the gap between biochemistry and physiology. *Plant Physiology*.

Cardenas L., T. L. Holdaway-Clarke, F. Sanchez, C. Quinto, J. A. Feijo, J. G. Kunkel y P. K. Hepler. 2000. Ion changes in legume root hairs responding to Nod factors. *Plant. Physiol*. 123: 443-452.

Cardenas L, Martínez A, Sanchez F y Quinto C. 2008. Fast, transient and specific intracellular ROS changes in living root hair cells responding to Nod factors (NFs). *The Plant Journal*. 56: 802-813.

Correa-Aragunde, N., Graziano, M. & Lamatina, L. 2004. Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta*. 218: 900-905.

Damiani I, Pauly N, Puppo A, Brouquisse R, y Boscari A. 2016. Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide Control Early Steps of the Legume – Rhizobium Symbiotic Interaction. *Plant Science*.

Dean J. V. & Harper J. E. 1988. The Conversion of Nitrite of Nitrogen Oxide by the Constitutive NADH(P)H- Nitrate Reductase Enzyme from Soybean. *Plant Physiol*: 88. 389-395.

Debellé, F, Mounlin, L, Mangin, B, Denarié, J, Boivin, C. 2001. Nod genes and Nod signals and the evolution of the Rhizobium legumes symbiosis. *Acta Biochim*

Pol. Vol, 48.

Delamuta, J. et al. 2013. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* Group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. IJSEM Papers in Press.

Felle, H. H., A. Kondorosi, B. Kondorosi y M. Schultze. 1995. Nod signal-induced plasma membrane potential changes in alfalfa root hairs are differentially sensitive to structural modifications of the lipochitooligosaccharide. *Plant J.* 7: 939-947.

Fischer, K; Barbier, G.G; Hecht, H. J; Mendel, R. R; Campbell, W. H. & Schwarza, G. 2005. Structural basis of eukaryotic nitrate reduction: Crystal structures of the nitrate reductase active site.

Foreman J, Demidchik V, Bothwell J, Mylona P, Miedema H, Torres M, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones J, D. 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature.* 422- 446.

González N. 2007. Nitrogen fixation in soybean inoculants: current situation and Perspectives in Argentina. From the biology of Soils to Agriculture,(Thuar, A, Cassan, F, & Olmedo, C, eds), pp. 161– 173. Río Cuarto.

Gresshoff, P. M; Ferguson, B. J; Indrasumunar, A; Hayashi, S; Han Lin, M; Hsiang Lin, Y. & Reid, D. E. 2010. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of integrative plant biology.*

Jones KM, Kobayashi H, Davies BW, Taga ME & Walker GC. 2007. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nature reviews. Microbiology* 5: 619–633.

Laemmli, U. K. 1970. *Nature* 227. Extraído the: Preparation of protein samples for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis: procedures and tips.

Lascano H, Melchiorre, Luna C y Trippi V. 2003. Effect of photooxidative stress induce by paraquat in two wheat cultivars whit differential tolerance to water stress. *Plant Science.* 164; 841-846.

Lombardo, M; Graziano, M; Polacco, J; Lamattina, L. 2006. Nitric Oxide Functions as a Positive Regulator of Root Hair Development. *Plant Signaling & Behavior.*

- Martinez-Drets, G., A. Gardiol y A. Arias.** 2002. 6-Phospho-D-gluconate: NAD⁺ 2- oxidoreductase (decarboxylating) from slow- growing rhizobia. *J. Bacteriol.* 130: 1139- 1143.
- Medigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J.** 2006. *Brock Biology of Microorganismos.* Madrid. Person Prentice Hall.
- Meilhoc, E., Boscari, A., Bruand, C., Puppo, A. & Brouquisse, R.** 2011. Nitric Oxide in legume- rhizobium symbiosis. *Plant Science.* 181: 573-581.
- Minchin et al.** 2008. Oxygen diffusion, production of reactive oxygen and nitrogen species and antioxidants in legume nodules. *Springer Sci. Most Agronomically Used Nitrogen-Fixing Rhizobacteria in Argentina.* Journals.ASM.org.
- Muñoz, N; Robert, G; Melchiorre, M; Racca, R; Lascano, R.** 2012. Saline and osmotic stress differentially affects apoplastic and intracellular reactive oxygen species production, curling and death of root hair during *Glicine max L- Bradyrhizobium japonicum* interaction. *Environmental and experimental botany.*
- Mur, Luis A.J. Julien Mandonb, Simona M. Cristescub, Frans J.M. Harrenb, Elena Pratsc.** 2011. Methods of nitric oxide detection in plants: A commentary. *Plant Science* 181: 509– 519.
- Paredes, M. C.** 2013. Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencia Agrarias. Universidad Católica Argentina.
- Parson, R. and Sunley, R. J.** 2001. Nitrogen nutrition and the role of root-shoot nitrogen signaling particularly in symbiotic system. *Journal of Experimental Botany.*
- Perret X, Staehelin C & Broughton WJ.** 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 64: 180–201.
- Romero Puertas, M. C. & Delledonne, M.** 2003. Nitric oxide signaling in plant-pathogen interaction. *IUBMB Life*, 55: 558-579.
- Sambrook J. Fritsch E.F. and T. Maniatis** . 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. p.1.74.
- Santos R, Herouart D, Sigaud S, Touati D y Puppo A.** 2001. Oxidative burst in alfalfa *Sinorhizobium meliloti* simbiotic interaction. *Molecular Plant Microbe Interaction.* 14: 86-89

- Schvarzer J & Tavošnanska A** .2007. The Argentinian sojourn complex. Evolution and Economic prospects, U de BAF de C, ed. Memories 2010 -INTA Field Experimental EEA Gral. Villegas 2122: 65–70.
- Swanson S. & Gilroy S.** 2010.. ROS in plant development. *Physiologia Plantarum*. 138:384-392.
- Taiz, L; Eduardo, Z.** 2006. Plant physiology. Sinauer Associates.
- Torres, D. et al.** 2015. Genome Sequence of *Bradyrhizobium japonicum* E109, One of the Most Agronomically Used Nitrogen-Fixing Rhizobacteria in Argentina. *Journals.ASM.org*.
- Vandenabeele S, Van Der Kelen K y Dat J.** 2003. A comprehensive analysis of hydrogen peroxide-induced gene expression in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United of America*. 100: 16113-16118.
- Weiner, H & Kaiser, W.** 1999. Proteins control proteolysis of nitrate reductase in spinach leaves. *FEBS letters*.455: 75-78.
- Yamasaki, H.** 2000. Nitrite-dependent nitric oxide production pathway: implications for involvement of active nitrogen species in photoinhibition in vivo. The royal society publishing.